

BAN BIÊN TẬP TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

STT	Họ và tên	Đơn vị	Nhiệm vụ
I	Thành viên trong nước		
1	Chế Minh Tùng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Tổng biên tập
2	Nguyễn Đình Phú	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM University of California, Irvine, Mỹ	Biên tập viên
3	Lê Đình Đôn	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
4	Lê Quốc Tuấn	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
5	Nguyễn Bạch Đằng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
6	Nguyễn Huy Bích	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
7	Phan Tại Huân	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
8	Nguyễn Phú Hòa	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
9	Võ Thị Trà An	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
10	Tăng Thị Kim Hồng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
II	Thành viên nước ngoài		
11	Tô Phúc Tường	Nguyên chuyên gia IRRI, Việt Nam	Biên tập viên
12	Peeyush Soni	Asian Institute of Technology, Thái Lan	Biên tập viên
13	Ta-Te Lin	National Taiwan University, Đài Loan	Biên tập viên
14	Glenn M. Young	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên
15	Soroosh Sorooshian	University of California, Irvine, Mỹ	Biên tập viên
16	Katleen Raes	Ghent University, Bỉ	Biên tập viên
17	Vanessa Louzier	Lyon University, Pháp	Biên tập viên
18	Wayne L. Bryden	The University of Queensland, Úc	Biên tập viên
19	Jitender Singh	Sardar Vallabhbhai Patel University of Agriculture and Technology, Ấn Độ	Biên tập viên
20	Kevin Fitzsimmons	University of Arizona, Mỹ	Biên tập viên
21	Cyril Marchand	University of New-Caledonia, Pháp	Biên tập viên
22	Koichiro Shiomori	University of Miyazaki, Nhật Bản	Biên tập viên
23	Kazunari Tsuji	Saga University, Nhật Bản	Biên tập viên
24	Sreeramanan Subramaniam	Universiti Sains Malaysia, Malaysia	Biên tập viên
25	Thomas L. Rost	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên
26	James E. Hill	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên

BAN THƯ KÝ TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

STT	Họ và tên	Đơn vị	Nhiệm vụ
1	Nguyễn Thị Thương	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Trưởng ban thư ký
2	Trương Quang Bình	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Trưởng ban trị sự
3	Hoàng Minh Phương	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Thành viên

Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển

Giấy phép xuất bản:
567/GP-BVHTT-24/12/2002
175/GP-BTTTT-20/04/2018

Tòa soạn:

Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM
Khu phố 33, Phường Linh Xuân, TP.HCM
Điện thoại: (028)37245670
Email: jad@hcmuaf.edu.vn

MỤC LỤC (CONTENT)

Kinh tế và Kinh doanh nông nghiệp (Agribusiness and Economics)

- 1 The effects of capital, labor and random component on cooperative revenue in the Mekong delta region using the Oaxaca-Blinder decomposition method

Luat D. N. Tran, & Thong Q. Le

Ảnh hưởng của vốn, lao động và thành phần phân biệt đến doanh thu của hợp tác xã tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long tiếp cận theo phương pháp phân rã Oaxaca-Blinder

Trần Duy Nghiêm Luật & Lê Quang Thông

Nông học, Lâm nghiệp (Agronomy and Forestry Sciences)

- 10 Assessment of the effectiveness of some antibiotics in limiting the growth of some endogenous bacteria causing infections during *in vitro* cutting of black pepper plant (*Piper nigrum* L.)

Kiet C. Nguyen, Tri M. Bui, & An T. Nguyen

Đánh giá hiệu quả của một số kháng sinh trong hạn chế sự phát triển của một số vi khuẩn nội sinh gây nhiễm trong quá trình giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.)

Nguyễn Cao Kiệt, Bùi Minh Trí & Nguyễn Tấn An

- 22 Identification of plant-parasitic nematodes present in roots and rhizosphere of rice (*Oryza sativa*) in Soc Trang province

Thu N. M. Ngo, Huy G. Nguyen, Tuan V. Nguyen, & Phien V. Tran

Định danh thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật hiện diện tại rễ và vùng đất quanh rễ cây lúa (*Oryza sativa*) tại tỉnh Sóc Trăng

Ngô Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Gia Huy, Nguyễn Văn Tuấn & Trần Vũ Phấn

Chăn nuôi, Thú y, Thủy sản (Animal Sciences, Veterinary Medicine and Aquaculture)

- 40 Presence and genetic diversity of *Mycoplasma suis* group related to reproductive disorders in breeding pigs

Phat T. Tran, Luan M. Nguyen, Ngoc T. H. Nguyen, Linh N. M. Tran, Tram T. N. Ngo, Phu H. Doan, Nam M. Nguyen, & Duy T. Do

Sự hiện diện và đa dạng di truyền của *Mycoplasma suis* group gây rối loạn sinh sản trên heo giống

Trần Tấn Phát, Nguyễn Minh Luân, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Trần Ngọc Mỹ Linh, Ngô Thị Ngọc Trâm, Đoàn Hoàng Phú, Nguyễn Minh Nam & Đỗ Tiến Duy

- 54 Probiotic potential and resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* of *Bacillus amyloliquefaciens*
 Linh D. Nguyen, Duong P. A. Nguyen, Nhi P. U. Le, Ngoc H. Le, Mai C. Duong, & Hien T. Le
 Tiềm năng probiotic và khả năng kháng *Escherichia coli*, *Salmonella* của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*
 Nguyễn Duy Linh, Nguyễn Phạm Ánh Dương, Lê Phương Uyển Nhi, Lê Hữu Ngọc, Đường Chi Mai & Lê Thanh Hiền
- 66 Safety and quick, long-lasting immune response of the ileitis vaccine in pigs with two schemes at 3 and 5 week-old
 Thanh P. Nguyen, Thang D. Hoang, Duyen T. M. Pham, Tram T. N. Ngo, Nghia D. Tran, Tuyen T. B. Nguyen, & Duy T. Do
 Sự an toàn và khả năng đáp ứng miễn dịch nhanh, kéo dài của vắc-xin phòng bệnh viêm hồi tràng trên heo theo hai quy trình tiêm 3 và 5 tuần tuổi
 Nguyễn Phương Thanh, Hoàng Đức Thắng, Phạm Thị Mỹ Duyên, Ngô Thị Ngọc Trâm, Trần Đại Nghĩa, Nguyễn Thị Bích Tuyền & Đỗ Tiến Duy
- 76 Evaluation of the antibacterial activity of *Garcinia mangostana* L. peel extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from canine wounds
 Xuan N. T. Nguyen, Hieu M. Bui, Hau T. H. Tran, Trung M. Nguyen, & Yen T. H. Tran
 Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết vỏ măng cụt (*Garcinia mangostana* L) trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* phân lập trên vết thương của chó
 Nguyễn Ngọc Thanh Xuân, Bùi Minh Hiếu, Trần Thị Hải Hậu, Nguyễn Minh Trung & Trần Thị Hải Yến
- Công nghệ thực phẩm (Food Science and Technology)**
- 89 Assessment of the effectiveness of pectinase treatment on cocoa mesocarp (*Theobroma cacao* L.)
 Dieu M. T. Nguyen, Phuong H. T. Vo, Do N. Nguyen, Nghi N. Duong, & Phuong H. Le
 Đánh giá hiệu quả sử dụng pectinase để xử lý thịt vỏ quả cacao (*Theobroma cacao* L.)
 Nguyễn Mai Thị Diệu, Võ Hoàng Trúc Phương, Nguyễn Nam Đô, Dương Ngọc Nghi & Lê Hồng Phương

The effects of capital, labor and random component on cooperative revenue in the Mekong delta region using the Oaxaca-Blinder decomposition method

Luat D. N. Tran^{2*}, & Thong Q. Le¹

¹Faculty of Economics, Ho Chi Minh City University of Technology and Education, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Economics - Business, Hoa Sen University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: September 08, 2024

Revised: November 25, 2024

Accepted: January 03, 2025

Keywords

Capital

Cooperatives

Labor

Oaxaca-blinder decomposition

Revenue

*Corresponding author

Tran Duy Nghiem Luat

Email:

luat.tranduyngkiem@hoasen.edu.vn

ABSTRACT

This research aimed to estimate the effects of capital, labor and random components on cooperative revenue in localities of the Mekong delta region using the Oaxaca-Blinder decomposition method. The study used statistical panel data on revenue, number of employees and capital of cooperatives during the period 2015 - 2022 in 13 different provinces in the Mekong delta. The study employed Fixed Effects Model (FEM) regression using the Least Squares Dummy Variable (LSSV) approach and Random Effects Model (REM) with an Error Correction Model (ECM) specification to estimate the regression coefficients based on an extended Cobb-Douglas production function. Subsequently, the Oaxaca-Blinder decomposition method was applied to assess the impact of locational differences within the Mekong delta on the revenue of cooperatives. This impact was decomposed into two components: (1) the explained differences between the two groups attributable to labor and capital, and (2) the unexplained component or discrimination.

Cited as: Tran, L. D. N., & Le, T. Q. (2025). The effects of capital, labor and random component on cooperative revenue in the Mekong delta region using the Oaxaca-Blinder decomposition method. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 1-9.

Ảnh hưởng của vốn, lao động và thành phần phân biệt đến doanh thu của hợp tác xã tại 31 khu vực Đồng bằng sông Cửu Long tiếp cận theo phương pháp phân rã Oaxaca-Blinder

Trần Duy Nghiêm Luật^{2*} & Lê Quang Thông¹

¹Khoa Kinh Tế, Trường Đại Học Sư Phạm Kỹ Thuật TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Kinh Tế - Quản Trị, Đại Học Hoa Sen, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 08/09/2024

Ngày chỉnh sửa: 25/11/2024

Ngày chấp nhận: 03/01/2025

Từ khóa

Doanh thu

Hợp tác xã

Lao động

Phân rã Oaxaca-blinder

Vốn

*Tác giả liên hệ

Trần Duy Nghiêm Luật

Email:

luat.tranduyngheiem@hoasen.edu.vn

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là ước lượng mức độ ảnh hưởng của vốn, lao động và thành phần phân biệt tác động đến doanh thu của hợp tác xã ở các địa phương khu vực Đồng bằng sông Cửu Long bằng phương pháp Oaxaca-Blinder. Nghiên cứu này sử dụng dữ liệu bảng thống kê về doanh thu, số lượng lao động và nguồn vốn của các Hợp tác xã trong thời gian 2015 - 2022. Nghiên cứu được thực hiện kiểm định các mô hình hồi quy FEM (LSSV_least square dummy variable), REM (ECM_Error Correction Model) để ước lượng các hệ số hồi quy theo hàm Cobb-Douglas mở rộng, sau đó ứng dụng phương pháp phân rã Oaxaca – Blinder để đánh giá mức độ ảnh hưởng giữa các địa phương tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long về doanh thu của Hợp tác xã do 2 thành phần tạo ra là: (1) sự khác biệt giữa 2 nhóm có thể giải thích được từ biến Lao động và Vốn, (2) Thành phần ngẫu nhiên hay sự phân biệt.

1. Đặt Vấn Đề

Sự tác động của 2 thành phần đầu vào là vốn và lao động đến đầu ra có sử dụng hàm Cobb Douglas mở rộng được nhiều tác giả nghiên cứu. Nguyen (2015) nghiên cứu về tác động của vốn và lao động đến giá trị đầu ra của các doanh nghiệp vận tải đường thủy ở Việt Nam, với kết quả là hệ số co giãn theo giá trị đầu ra của lượng vốn là 0,404; chi phí lao động là 0,507; còn năng suất các yếu tố tổng hợp là 2,814. Vo & Nguyen (2020) với nghiên cứu phân tích hiệu quả hoạt động của các hợp tác xã nông nghiệp trên địa

bàn tỉnh Vĩnh Long, với kết luận rằng khi số thành viên tham gia hợp tác xã (HTX) tăng lên 1 thì lợi nhuận của HTX tăng lên 1.184 triệu đồng và vốn điều lệ của HTX không có ý nghĩa thống kê trong mô hình. Balistreri & ctv. (2003) nghiên cứu về độ co giãn của vốn và lao động của ngành công nghiệp Hoa kỳ trong 28 lĩnh vực, sử dụng hàm cobb douglass, với kết luận rằng "Giá trị độ co giãn thay thế vốn-lao động là một nằm trong phạm vi ước tính hiện có và phù hợp với cấu trúc của hầu hết các mô hình tăng trưởng". Uche & ctv. (2021) khẳng định rằng mô hình Cobb-Douglas cung cấp kết quả tốt hơn về mặt các

đặc tính kinh tế và thống kê của các hệ số, do đó được khuyến nghị để ước tính hiệu quả kỹ thuật của các trang trại khoai tây Ireland.

Phương pháp phân rã Oaxaca-Blinder được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về sự phân biệt giới tính, thu nhập và vùng miền,... Trong nghiên cứu về tác động đến thu nhập của việc xóa bỏ sự phân biệt đối xử trực tiếp trong mức lương tối thiểu giữa nam và nữ tại Úc kể từ khi Úc có chính sách trả lương bình đẳng cho nam và Nữ năm 1969 và năm 1972, với kết quả sự khác biệt trong tiền lương của nam và nữ tại Úc đã giảm từ 37% (1973) xuống còn 13% (1989) (Miller, 1994). Sarker & Hossain (2021) nghiên cứu về Sự khác biệt thu nhập giữa các nhóm làm việc, giữa khu vực công và tư tại Bangladesh, nhân viên nam và nhân viên khu vực công kiếm được trung bình nhiều hơn 35,6 và 71,2% so với nhân viên nữ và nhân viên khu vực tư nhân. Nghiên cứu của Takahashi (2007) về các yếu tố quyết định sự chênh lệch thu nhập giữa các vùng ở nông thôn Việt Nam, đặc biệt nhấn mạnh vào vai trò của vốn con người và đất đai. Trong nghiên cứu này tác giả sử dụng phương pháp phân rã Oaxaca-Blinder. Với các giả thuyết là (1) “vốn con người, là một trong những yếu tố hàng đầu giải thích sự khác biệt về thu nhập giữa các khu vực”; và (2) “sự khác biệt về nguồn đất đai không tương quan chặt chẽ với chênh lệch thu nhập giữa các vùng vì khả năng tiếp cận đất đai tốt hơn trong một vùng được bù đắp một phần bởi lợi nhuận thấp hơn”.

Lĩnh vực kinh tế hợp tác và hợp tác xã, các nghiên cứu về mối liên hệ giữa đầu ra và các yếu tố đầu vào như vốn và lao động được chú ý. Các nghiên cứu này nhằm định lượng, giải thích các sự tác động của các yếu tố đầu đến đầu ra như năng suất, sản lượng, hoặc doanh thu.

Nghiên cứu này được thực hiện trong giới hạn tác động của vốn và lao động đến doanh thu của hợp tác xã thông qua 2 nội dung: (1) Thực hiện các kiểm định thống kê về tác động của vốn và lao động đến doanh thu của hợp tác xã theo mô hình Cobb - Douglas mở rộng để đo lường mức độ tác động của vốn và lao động đến doanh thu của hợp tác xã tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. (2) Ước lượng được mức độ khác biệt của các thành phần tác động ở các địa phương trong khu vực theo phân rã Oaxaca - Blinder.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

Nghiên cứu sử dụng bộ dữ liệu bảng thu thập từ Niên giám thống kê và sách trắng về hợp tác xã (HTX) năm 2023, kết hợp với thông tin điều tra bổ sung từ các HTX. Bộ dữ liệu bao gồm thông tin về doanh thu, lao động và vốn của các HTX tại 13 tỉnh thành thuộc Đồng bằng sông Cửu Long trong giai đoạn 2011 - 2022. Dữ liệu đã được làm sạch và chuẩn hóa trước khi tiến hành phân tích bằng mô hình hồi quy panel. Việc lựa chọn phương pháp này giúp kiểm soát các yếu tố cố định không quan sát được và đánh giá chính xác hơn tác động của vốn và lao động đến doanh thu của HTX. Các số liệu được nhập, mã hoá và sử dụng phần mềm Stata 17.

Trong nghiên cứu này, mô hình hồi quy FEM (LSSV_least square dummy variable) và REM (ECM_Error Correction Model) được dùng để ước lượng các hệ số hồi quy theo hàm Cobb - Douglas mở rộng, sau đó ứng dụng phương pháp phân rã Oaxaca - Blinder để đánh giá mức độ ảnh hưởng giữa các địa phương tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long về doanh thu của HTX do 2 thành phần tạo ra là (1) sự khác biệt giữa 2 nhóm có thể giải thích được (explained) từ biến lao động và vốn, và (2) thành phần không thể giải thích được (unexplained) hay sự phân biệt (Discrimination) trong các địa phương khác nhau.

Hàm Cobb - Douglas mở rộng được thể hiện bằng biểu thức sau:

$$\ln(\text{Rev}) = \beta_0 + \beta_1 \ln(\text{Cap}) + \beta_2 \ln(\text{Lab}) \quad (1)$$

Trong đó:

Rev = Doanh thu của HTX theo địa phương trong năm;

Lab = đầu vào lao động của các HTX theo địa phương trong năm;

Cap = vốn đầu vào của HTX theo địa phương trong năm;

β_0 = tổng năng suất nhân tố, β_1 và β_2 lần lượt là hệ số co giãn đầu ra của vốn và lao động.

Neumark (1988) đề xuất phân tích 2 thành phần trong phương pháp phân rã Oaxaca - Blinder như sau:

Gọi β^* là hệ số tham chiếu với $\beta^1 < \beta^* < \beta^2$

Ta có phương trình tham chiếu:

$$(4) \Delta \bar{Y} = \sum_{j=1}^k \beta_j^* (\bar{x}_j^1 - \bar{x}_j^2) + [\sum_{j=1}^k \bar{x}_j^1 (\beta_j^1 - \beta_j^*) + \sum_{j=1}^k \bar{x}_j^2 (\beta_j^1 - \beta_j^2)]$$

Thành phần $E_c = \sum_{j=1}^k \beta_j^* (\bar{x}_j^1 - \bar{x}_j^2)$ (5) là phần của sự khác biệt nhóm được giải thích bởi sự khác biệt về mức độ của các đặc điểm quan sát được. Điều này cũng được gọi là “hiệu ứng hỗ trợ (nguồn lực)”.

Thành phần $U_c = [\sum_{j=1}^k \bar{x}_j^1 (\beta_j^1 - \beta_j^*) + \sum_{j=1}^k \bar{x}_j^2 (\beta_j^1 - \beta_j^2)]$ (6) đề cập đến phần khoảng cách do sự khác biệt của $\beta^1 < \beta^*$ không phân biệt. Nó cũng bao gồm sự khác biệt về mức độ của các biến không quan sát được và cả các hiệu ứng phân biệt (discrimination).

3. Kết Quả và Thảo Luận

Dữ liệu thống kê mô tả của các biến LnCap, LnLab, LnRev của 13 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long.

Giá trị kết quả (Y) được giải thích bởi K biến ($x_1, \dots, x_k$) trong mô hình hồi quy tuyến tính, thì kết quả dự đoán trung bình cho nhóm g (1 và 2) có thể được biểu thị như sau:

$$\bar{Y}^g = \beta_0^g + \sum_{j=1}^k \beta_j^g \bar{x}_j^g \quad (2)$$

trong đó là giá trị trung bình của mỗi yếu tố dự báo và β là hệ số hồi quy ước tính.

Do đó, sự khác biệt trung bình về kết quả giữa 2 nhóm (1 và 2) như sau:

$$\Delta \bar{Y} = (\beta_0^1 - \beta_0^2) + \sum_{j=1}^k (\beta_j^1 \bar{x}_j^1 - \beta_j^2 \bar{x}_j^2) \quad (3)$$

Sự khác biệt trung bình của kết quả là tổng các hiệu ứng của các thành phần khác nhau, bao gồm (1) sự khác biệt trung bình giữa mức độ của mỗi biến quan sát được (x_j); (2) các hiệu ứng khác biệt (β_j) của các biến này trong 2 nhóm so sánh, và (3) sự khác biệt cơ bản bao gồm hiệu ứng của các biến chưa biết không được đưa vào mô hình.

Bảng 1. Dữ liệu thống kê mô tả các biến của mô hình

Stt	Giá trị	Biến		
		LnCab	LnLab	LnRev
1	Trung bình	6,920	7,319	6,095
2	Trung vị	6,928	7,299	5,995
3	Giá trị lớn nhất	8,408	8,443	7,730
4	Giá trị nhỏ nhất	5,468	6,188	4,820
5	Độ lệch chuẩn	0,717	0,506	0,684
6	Hệ số bất đối xứng	0,032	0,038	0,420
7	Hệ số nhọn	2,229	2,311	2,271
8	Jarque-Bera	2,595	2,085	5,355
9	Probability	0,273	0,353	0,069
10	Tổng	7,196	7,612	6,339
11	Tổng bình phương sai lệch	5,301	2,634	4,817
12	Số quan sát	104	104	104

Dữ liệu thống kê trong Bảng 1 cho ta thấy trị số Probability của 3 biến LnCab = 0,273; LnLab = 0,353; LnRev = 0,069 đều có giá trị nhỏ hơn 0,05, nên dữ liệu có phân phối chuẩn. Ước lượng

mô hình FEM, REM, kiểm định Hausman, kiểm định Breusch - Pagan, khắc phục hiện tượng phương sai, sai số thay đổi FGLS. Các giá trị thống kê như sau:

Bảng 2. Tổng hợp các hệ số 3 mô hình FEM, REM, FGLS

	(1)	(2)	(3)
	lnRev	lnRev	lnRev
lnLab	0,308 ² (2,48)	0,324 ³ (2,88)	0,354 ³ (5,66)
lnCap	0,447 ³ (4,78)	0,479 ³ (5,73)	0,532 ³ (13,39)
_cons	0,747 (0,83)	0,404 (0,50)	-0,226 (-0,59)
N	104	104	104
R-sq	0,329		

Các mức ý nghĩa: ¹"-" $P < 0,1$; ²"-" $P < 0,05$; ³"-" $P < 0.01$.

Dữ liệu thống kê trong Bảng 2 cho thấy có ý nghĩa về sự tác động của yếu tố vốn và lao động đến doanh thu của các HTX trong các địa phương ở đồng bằng sông Cửu Long, với mức ý nghĩa 99%. Với các kết luận như sau:

Khi lượng vốn trong HTX tăng 1%, các yếu tố khác không đổi thì lượng doanh thu của HTX

của các địa phương tăng 0,532%. Tương tự khi lượng lao động trong HTX tăng 1%, các yếu tố khác không đổi thì lượng doanh thu của HTX của các địa phương tăng 0,354%. Phần tỉ lệ % tăng của từng địa phương cụ thể được điều chỉnh bởi hệ số của từng địa phương trong Bảng 3.

Bảng 3. Hệ số ước lượng cho từng địa phương

Stt	Địa phương	Hệ số
1	An Giang	0,026
2	Bạc Liêu	-0,217
3	Bến Tre	-0,237
4	Cà Mau	-0,480
5	Cần Thơ	0,294
6	Đồng Tháp	-0,571
7	Hậu Giang	-0,292
8	Kiên Giang	-0,752
9	Long An	-0,424
10	Sóc Trăng	0,144
11	Tiền Giang	0,565
12	Trà Vinh	-0,472
13	Vĩnh Long	-0,300

Thành phần giải thích được (biến vốn và lao động) với thành phần không giải thích được theo phân rã Oaxaca - Blinder, phân tích 2 thành phần theo đề xuất của Neumark (1988), các tác giả Jann & Zúrich (2008), Bonnal & ctv. (2013), Rahimi & Nazari (2021), và Ojo & Baiyegunhi (2023) sử dụng phương pháp phân

tích 2 thành phần trong các nghiên cứu liên quan dùng phương pháp phân rã Oaxaca - Blinder. Trong nghiên cứu này, nhóm tham chiếu cao là địa phương tỉnh Tiền Giang với hệ số = 0,565 trong Bảng 3 được lựa chọn để so sánh với các địa phương tỉnh khác trong khu vực Đồng bằng sông Cửu long.

Bảng 4. Tổng hợp các thành phần phân rã Oaxaca - Blinder của các địa phương

Stt	Địa phương	Thành phần				
		Khác biệt thô (R)	Phân biệt (Uc)	Giải thích (Ec)	Tỉ lệ % Uc/R	Tỉ lệ % Ec/R
1	Cà Mau	2,138	0,067	2,071	3,1 ¹	96,9
2	Vĩnh Long	1,807	0,061	1,746	3,4 ¹	96,6
3	Hậu Giang	1,700	0,064	1,636	3,8 ¹	96,2
4	Long An	1,562	0,146	1,416	9,3 ¹	90,7
5	Bạc Liêu	0,952	0,090	0,862	9,5 ¹	90,5
6	Bến Tre	1,690	0,194	1,496	11,5 ²	88,5
7	Trà Vinh	1,661	0,196	1,465	11,8 ²	88,2
8	Sóc Trăng	0,858	0,142	0,716	16,6 ²	83,4
9	Đồng Tháp	1,568	0,375	1,193	23,9 ²	76,1
10	Cần Thơ	0,549	0,199	0,350	36,2 ³	63,8
11	An Giang	0,411	0,186	0,225	45,3 ³	54,7
12	Kiên Giang	1,413	0,935	0,478	66,2 ³	33,8

¹"-"¹ Uc/R < 10%, ²"-"² 10% Uc/R < 30%, ³"-"³ Uc/R 30%,

Dữ liệu trong Bảng 4 cho thấy sự khác biệt của các địa phương trong khu vực Đồng bằng sông Cửu Long với địa phương đối sánh là tỉnh Tiền Giang trong khu vực đều có các yếu tố giải thích là tỉ lệ Ec/R đều lớn hơn 50%, ngoại trừ tỉnh Kiên Giang (33,8%). Điều này cho thấy sự tác động của các thành phần giải thích được của mô hình là vốn và lao động (Hiệu ứng hỗ trợ hay hiệu ứng nguồn lực) có ý nghĩa thống kê. Các thành phần không giải thích được (hay thành phần phân biệt Uc) với tỉ lệ Uc/R được chia thành 3 nhóm:

Nhóm 1: Có sự khác biệt so với địa phương đối sánh là tỉnh Tiền Giang gồm các tỉnh có tỉ lệ Uc/R nhỏ hơn 10%. Bao gồm các tỉnh Cà Mau (3,1%), Vĩnh Long (3,4%), Hậu Giang (3,8%), Long An (9,3%) và Bạc Liêu (9,5%).

Nhóm 2: Có sự khác biệt so với địa phương đối sánh là tỉnh Tiền Giang gồm các tỉnh có tỉ lệ Uc/R lớn hơn 10% và nhỏ hơn 30%. Bao gồm các tỉnh: Bến Tre (11,5%), Trà Vinh (11,8%), Sóc Trăng (16,6%) và Đồng Tháp (23,9%).

Nhóm 3: Có sự khác biệt so với địa phương đối sánh là tỉnh Tiền Giang gồm các tỉnh có tỉ lệ Uc/R lớn hơn 30%. Bao gồm các tỉnh Cần Thơ (36,2%), An Giang (45,3%), Kiên Giang (66,2%).

Các yếu tố thành công của Hợp tác xã do môi trường pháp lý và chính sách của chính phủ (Sargent, 1982) trong phân tích và so sánh về sự phát triển hợp tác xã ở bảy quốc gia bao gồm Vương quốc Anh, Ireland, Hoa kỳ, Đan Mạch, Hà Lan, Pháp và Ý. Các nghiên cứu tương tự được thực hiện tại các HTX ở miền trung và đông bắc Trung quốc (Huang & ctv., 2016; Yu & Nilsson, 2018), HTX tại tỉnh Phú Yên của Việt Nam (Dao & Tran, 2023). Điều này tác động đến hoạt động của HTX và ảnh hưởng đến doanh thu và tạo ra mức độ khác biệt trong doanh thu giữa các HTX.

Hiệu quả kỹ thuật (TE) đề cập đến khả năng được sản lượng tối đa có thể thu được từ một tập hợp đầu vào cụ thể, với công nghệ hiện có được đề cập trong nghiên cứu của Yu & Huang (2020), sự khác biệt này tương đồng với nhận định của Akridge & Hertel (1992), Soboh & ctv. (2009).

Sự khác biệt trong Doanh thu của HTX giữa các địa phương chịu sự tác động của các biến liên quan đến đào tạo thành viên cũng có liên quan đến hiệu quả và đo lường hiệu suất của các hợp tác xã (Huang & ctv., 2013; Cui & ctv., 2016; Dao & Tran, 2023).

4. Kết Luận và Đề Nghị

Nghiên cứu cho thấy sự tác động của vốn và lao động của HTX ở các địa phương khu vực Đồng bằng sông Cửu Long có ảnh hưởng đến doanh thu của HTX dựa trên nền tảng lý thuyết của hàm Cobb - Douglas cho các mức ý nghĩa: (1) vốn tăng 1%, các yếu tố khác không đổi thì lượng doanh thu của HTX của các địa phương tăng 0,532%; (2) lượng lao động trong HTX tăng 1%, các yếu tố khác không đổi thì lượng doanh thu của HTX của các địa phương tăng 0,354%.

Phân tích phân rã Oaxaca - Blinder giữa các địa phương trong khu vực đối sánh với địa phương tỉnh Tiền Giang trong cùng khu vực cũng cho thấy có sự khác biệt về tỉ lệ tăng doanh thu được thể hiện thành phần phân biệt được giữa các địa phương còn lại thành 3 nhóm:

- Nhóm 1: Sự khác biệt không giải thích được nhỏ hơn 10%, gồm các tỉnh Cà Mau, Vĩnh Long, Hậu Giang, Long An và Bạc Liêu.

- Nhóm 2: Sự khác biệt không giải thích được lớn hơn 10% và nhỏ hơn 30%, gồm các tỉnh Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng và Đồng Tháp.

- Nhóm 3: Sự khác biệt không giải thích được lớn hơn 30%, gồm các tỉnh Cần Thơ, Kiên Giang và An Giang.

Tuy nhiên, để có thể khẳng định một cách rõ ràng sự phân biệt trên, cần tiến hành thêm các nghiên cứu sâu rộng hơn. Các nghiên cứu này sẽ cung cấp bằng chứng thực nghiệm cụ thể hơn.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan nghiên cứu của nhóm tác giả thực hiện.

Lời Cảm Ơn

Bài báo được thực hiện từ thực tiễn nghiên cứu và học tập trong chương trình nghiên cứu sinh, chuyên ngành Kinh tế Nông nghiệp của Trường Đại Học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh. Bài báo được thực hiện bởi tác giả và giảng viên hướng dẫn Thầy Lê Quang Thông.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Akridge, J. T., & Hertel, T. W. (1992). Cooperative and investor-oriented firm efficiency: A multiproduct analysis. *Journal of Agricultural Cooperation* 7, 1-14. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.46280>.
- Balistreri, E. J., McDaniel, C. A., & Wong, E. V. (2003). An estimation of US industry-level capital-labor substitution elasticities: Support for Cobb-Douglas. *North American Journal of Economics and Finance* 14(3), 343-356. [https://doi.org/10.1016/S1062-9408\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S1062-9408(03)00024-X).
- Bonnal, L., Boumahdi, R., & Favard, P. (2013). The easiest way to estimate the Oaxaca-Blinder decomposition. *Applied Economics Letters* 20(1), 96-101. <https://doi.org/10.1080/13504851.2012.681021>.
- Cui, B. Y., Xu, Y. T., & Jian, P. (2016). Farmer's specialized cooperatives: Efficiency measurement and "paradox" in improvement. *China Rural Economic* 1, 69-82.
- Dao, A. X., & Tran, H. T. (2023). Factors affecting business results of agricultural service cooperatives in Phu Yen province. *Hue University Journal of Science* 132(5), 5-22. <https://doi.org/10.26459/hueunijed.v132i5A.6935>.
- Huang, W., Brummer, B., & Huntsinger, L. (2016). Incorporating measures of grassland productivity into efficiency estimates for livestock grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau in China. *Ecological Economics* 122, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2015.11.025>.
- Huang, Z. H., Fu, Y. Z., Liang, Q., Song, Y., & Xu, X. (2013). The efficiency of agricultural marketing cooperatives in China's Zhejiang province. *Managerial and Decision Economics* 34(3-5), 272-282. <https://doi.org/10.1002/mde.2589>.
- Jann, B., & Zuřich, E. T. H. (2008). The Blinder-Oaxaca decomposition for linear regression models. *The Stata Journal* 8(4), 453-479. <https://doi.org/10.1177/1536867X0800800401>.
- Miller, P. W. (1994). Effects on earnings of the removal of direct discrimination in minimum wage rates: A validation of the Blinder decomposition. *Labour Economics* 1(3-4), 347-363. [https://doi.org/10.1016/0927-5371\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0927-5371(94)90017-5).
- Neumark, D. (1988). Employers' discriminatory behavior and the estimation of wage discrimination. *The Journal of Human Resources* 3(23), 279-295. <https://doi.org/10.2307/145830>.
- Nguyen, H. Q. (2015). The impact of capital and labor on the output value of waterway transport enterprises in Vietnam. *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science - Economics and Business Administration* 10(3), 185-193.
- Nguyen, M. H., Le, B. L., & Le, V. H. (2015). Oaxaca-Blinder model in economic analysis. *Ho Chi Minh City Open University Science Journal* 10(1), 50-58.
- Ojo, T. O., & Baiyegunhi, L. J. (2023). Gender differentials on productivity of rice farmers in south western Nigeria: An Oaxaca-Blinder decomposition approach. *Heliyon* 9(12), e22724. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22724>.

- Rahimi, E., & Nazari, H. S. S. (2021). A detailed explanation and graphical representation of the Blinder-Oaxaca decomposition method with its application in health inequalities. *Emerging Themes in Epidemiology* 18(12). <https://doi.org/10.1186/s12982-021-00100-9>.
- Sargent, M. (1982). *Agricultural co-operation*. Surrey, UK: Gower Publishing Company.
- Sarker, S. M., & Hossain, E. M. (2021). Earning differentials between working groups: An analysis based on Oaxaca-Blinder decomposition approach. *Journal of Business Studies* 1(13), 129-142.
- Soboh, R. A. M. E., Lansink, A. O., Giesen, G., & van Dijk, G. (2009). Performance measurement of the agricultural marketing cooperatives: The gap between theory and practice. *Agricultural and Applied Economics Association* 31(3), 446-469. <https://doi.org/10.2307/40588507>.
- Takahashi, K. (2007). *Sources of regional income disparity in rural Vietnam: Oaxaca-Blinder decomposition*. Retrieved August 25, 2024, from <https://ideas.repec.org/p/jet/dpaper/dpaper95.html>.
- Uche, C. O., Umar, H. S., Girei, A. A., & Ibrahim, H. Y. (2021). Performance of Translog and Cobb-Douglas models in the estimation of technical efficiency of Irish potato production in Plateau State, Nigeria. *Agro-Science* 20(2), 62-67. <https://doi.org/10.4314/as.v20i2.10>.
- Vo, T. H., & Nguyen, T. T. (2020). Analysis of the performance of agricultural cooperatives in Vinh Long province. *Can Tho University Journal of Science* 56(6), 313-321. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.171>.
- Yu, L., & Huang, W. (2020). Non-economic societal impact or economic revenue? A performance and efficiency analysis of farmer cooperatives in China. *Journal of Rural Studies* 80, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2020.08.010>.
- Yu, L., & Nilsson, J. (2018). Societal capital and the financing performance of farmer cooperatives in Fujian Province, China. *Agribusiness* 34(4), 847-864. <https://doi.org/10.1002/agr.21560>.

Assessment of the effectiveness of some antibiotics in limiting the growth of some endogynous bacteria causing infections during *in vitro* cutting of black pepper plant (*Piper nigrum* L.)

Kiet C. Nguyen*, Tri M. Bui, & An T. Nguyen
Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Research Paper Received: August 17, 2024 Revised: September 30, 2024 Accepted: October 04, 2024 Keywords Antibiotics Endophytic bacteria <i>In vitro</i> cuttings <i>Piper nigrum</i> L. Vinh Linh black pepper *Corresponding author Nguyen Cao Kiet Email: kiet.nguyencao@hcmuaf.edu.vn	Determining the optimal type and concentration of antibiotics to be added to the <i>in vitro</i> rooting medium for Vinh Linh black pepper plants is currently an important issue. This will enhance the breeding efficiency and meet the quality and quantity demands for seedlings in the market. The study aimed to determine the effectiveness of three antibiotics Ampicillin, Cefotaxime and Gentamicin on endophytic bacteria isolated from black pepper stem nodes and to determine the appropriate antibiotic concentration to control endophytic bacteria growing during <i>in vitro</i> cuttings of Vinh Linh black pepper plants. The study included two experiments: the experiment 1 was to determine the effectiveness of antibiotics and antibiotic concentrations against endophytic bacteria isolated from black pepper stem segments and the experiment 2 was to determine the appropriate antibiotics and antibiotic concentrations to prevent endophytic bacteria growing from <i>in vitro</i> black pepper stem segments. Each experiment had 2 factors arranged according to a completely randomized design with 3 repetitions. The results showed that for endophytic bacteria in the stem nodes of Vinh Linh black pepper after being isolated, the antibiotic concentration used was 20 mg/L of all 3 tested antibiotics, which allowed inhibition of colony formation. Meanwhile, the use of Gentamicin antibiotic at a concentration of 40 mg/L gave the best disinfection effect. Under this disinfection condition, the highest survival rate was 89%. The shoot height of Vinh Linh black pepper was highest, reaching 20 mm.

Cited as: Nguyen, K. C., Bui, T. M., & Nguyen, A. T. (2025). Assessment of the effectiveness of some antibiotics in limiting the growth of some endogynous bacteria causing infections during *in vitro* cutting of black pepper plant (*Piper nigrum* L.). *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 10-21.

Đánh giá hiệu quả của một số kháng sinh trong hạn chế sự phát triển của một số vi khuẩn nội sinh gây nhiễm trong quá trình giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.)

Nguyễn Cao Kiệt*, Bùi Minh Trí & Nguyễn Tấn An
Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 17/08/2024
Ngày chỉnh sửa: 30/09/2024
Ngày chấp nhận: 04/10/2024

Từ khóa

Kháng sinh
Giâm cành *in vitro*
Piper nigrum L.
Tiêu Vĩnh Linh
Vi khuẩn nội sinh

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Cao Kiệt
Email:
kiet.nguyencao@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Việc xác định loại và nồng độ kháng sinh tối ưu để bổ sung vào môi trường giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh là vấn đề cần được quan tâm hiện nay, điều này sẽ cho phép nâng cao hiệu quả nhân giống, đáp ứng được nhu cầu chất lượng và số lượng cây giống cho thị trường. Nghiên cứu nhằm xác định hiệu quả của ba loại kháng sinh Ampicillin, Cefotaxime, Gentamicin đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu và xác định nồng độ kháng sinh phù hợp để kiểm soát vi khuẩn nội sinh phát triển trong quá trình giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh. Nghiên cứu gồm 2 thí nghiệm: thí nghiệm 1, xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh; thí nghiệm 2, xác định loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển từ mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*. Mỗi thí nghiệm có 2 yếu tố được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các kết quả đã chỉ ra rằng đối với các vi khuẩn nội sinh trong đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh sau khi được phân lập thì nồng độ kháng sinh được sử dụng là 20 mg/L của cả 3 loại kháng sinh thử nghiệm đều cho phép ức chế sự hình thành của khuẩn lạc. Trong khi đó, việc sử dụng kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L cho hiệu quả khử trùng tốt nhất. Trong điều kiện khử trùng này, tỷ lệ sống cao nhất với tỷ lệ là 89%. Chiều cao chồi cây tiêu Vĩnh Linh cao nhất đạt 20 mm.

1. Đặt Vấn Đề

Hồ tiêu là cây gia vị quan trọng ở các nước châu Á, được coi là vua các loại gia vị và có nhiều giá trị dược liệu (Do, 2004). Trong đó, hồ tiêu Vĩnh Linh là loài cây không những có năng suất, chất lượng tốt mà còn có giá trị kinh tế cao tại Việt Nam. Hình thức nhân giống cây hồ tiêu hiện nay chủ yếu là biện pháp giâm cành, đây là kỹ thuật còn nhiều hạn chế, khó kiểm soát nguồn bệnh từ cây mẹ. Trong khi đó, giâm cành *in vitro* là hình thức nhân giống vô tính, giúp tạo ra cây sạch bệnh và có thể nhân nhanh ở quy mô công nghiệp (Nguyen & ctv., 2019).

Để giâm cành *in vitro* đạt hiệu quả, bước khử trùng mẫu có tầm quan trọng vì yêu cầu phải loại trừ được các nhóm vi sinh vật. Trong các nhóm nấm và vi khuẩn, vi khuẩn nội sinh có khả năng xâm nhiễm sâu trong mô cây và tồn tại lâu dài, do đó thường không có nhiều giải pháp; cách xử lý phổ biến và hiệu quả là dùng kháng sinh để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn. Mặt khác, mẫu cây trồng ngoài tự nhiên thường bị nhiễm một số vi khuẩn nội sinh làm cho việc khử trùng mẫu khó khăn, nhất là những cây có giá trị kinh tế cao như cây hồ tiêu. Vi khuẩn nội sinh cư trú ở bề mặt hoặc phân bố bên trong thực vật, duy trì môi trường hóa học bình thường của thực vật, chỉ có quan hệ hỗ trợ, cộng sinh với thực vật (Strobel, 2004). Tuy nhiên, đối với môi trường *in vitro* thì vi khuẩn nội sinh trong thân tiêu cần được ngăn chặn nhằm cho phép cây hồ tiêu sinh trưởng tốt.

Chính vì vậy, việc xác định loại và nồng độ kháng sinh tối ưu là hết sức cần thiết, điều này sẽ cho phép nâng cao hiệu quả giâm cành *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh, đáp ứng được nhu cầu chất lượng và số lượng cây giống cho thị trường.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật và Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thuộc Khu thực nghiệm Bộ môn Sinh lý – Sinh hóa, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 02/2024 đến tháng 8/2024.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

2.2.1. Thí nghiệm 1: Xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với các vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh

Thí nghiệm 1 có 2 yếu tố: yếu tố K là 3 loại kháng sinh gồm Ampicillin, Cefotaxime và Gentamicin và yếu tố N là 4 nồng độ kháng sinh gồm 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, và 20 mg/L. Thí nghiệm bao gồm 12 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi lần lặp lại của một nghiệm thức là 5 đĩa petri.

2.2.2. Thí nghiệm 2: Xác định loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển trên mẫu đốt thân cây hồ tiêu *in vitro*

Thí nghiệm 2 có 2 yếu tố: yếu tố K là 3 loại kháng sinh gồm Ampicillin, Cefotaxime và Gentamicin và yếu tố N là 3 nồng độ kháng sinh gồm 20 mg/L, 40 mg/L và 60 mg/L. Thí nghiệm bao gồm 9 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi lần lặp lại của một nghiệm thức là 3 bình. Mỗi bình chứa 1 mẫu.

2.3. Phương pháp thí nghiệm

Thí nghiệm 1 được thực hiện trên đĩa petri, chọn loại vi khuẩn nội sinh được phân lập từ đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh có màu trắng đục đã được

phân lập trước đó theo mô tả của Nguyen & ctv. (2018) để tiến hành thí nghiệm. Nồng độ kháng sinh được xác định thông qua quy trình MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Sau đó, môi trường NA được pha có bổ sung 3 loại kháng

sinh với 4 nồng độ đã đề cập. Mẫu vi khuẩn nội sinh được cấy vào đĩa petri có môi trường đã chứa kháng sinh bằng phương pháp cấy chằng. Các kết quả nồng độ của thí nghiệm 1 là cơ sở để chọn nồng độ kháng sinh cho thí nghiệm 2.



Hình 1. Đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh.

Đối với thí nghiệm 2, đốt thân cây hồ tiêu (Hình 1) được khử trùng bằng dung dịch C_2H_5OH 70% trong 60 giây, sau đó, mẫu được xử lý với dung dịch đồng sunfat ($CuSO_4$) 1% trong 10 phút và bằng dung dịch Javen 0,1% trong 20 phút. Tiếp theo, mẫu được ngâm trong dung dịch chứa 3 loại kháng sinh với 3 nồng độ như đã đề cập trong 30 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất hấp khử trùng 5 lần để loại bỏ các hóa chất còn sót lại (sau mỗi bước sử dụng hóa chất đều rửa lại với nước 2 lần). Nước rửa mẫu ở lần thứ 5 được cấy vào môi trường NA để kiểm tra không có sự hiện diện của vi khuẩn ngoại sinh. Mẫu đốt thân hồ tiêu được cấy vào môi trường MS có chứa 3 loại kháng sinh với 3 nồng độ như đã đề cập.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi

2.4.1. Thí nghiệm 1

Khuẩn lạc được theo dõi hàng ngày liên tục trong 5 ngày bao gồm các chỉ tiêu:

Số khuẩn lạc hình thành (số): đếm số khuẩn lạc có trên đĩa.

Đường kính khuẩn lạc (mm): đo đường kính trung bình các của các khuẩn lạc sau cấy.

2.4.2. Thí nghiệm 2

Các chỉ tiêu của mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh được theo dõi 6 ngày/lần, trong vòng 30 ngày bao gồm:

Chiều cao chồi (cm): đo chiều chồi tính từ điểm phân chồi.

Tỷ lệ nhiễm khuẩn (%): tính số mẫu bị nhiễm/tổng số mẫu cấy ở từng nghiệm thức.

Tỷ lệ sống (%): tính phần trăm mẫu sống ở từng nghiệm thức.

2.5. Xử lý số liệu

Dữ liệu được lưu trữ bằng Excel 2010 (Microsoft, Hoa Kỳ). R (phiên bản 4.2.3) được sử dụng để thực hiện bảng ANOVA và trắc nghiệm phân hạng bằng Duncan ở $\alpha = 0,05$ hoặc $\alpha = 0,01$ hoặc $\alpha = 0,001$. Các số liệu về số khuẩn lạc và đường kính khuẩn lạc trong thí nghiệm 1

được chuyển đổi bằng công thức $\log(x+1)$. Các số liệu về tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ sống ở thí nghiệm 2 đã được chuyển đổi bằng công thức trước khi phân tích thống kê, giá trị 0 được thay thế bằng $1/4n$ và 100 được thay thế bằng $100 - 1/4n$ ($n = 9$ mẫu) trước khi công thức được áp dụng (Gomez & Gomez, 1984).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ảnh hưởng của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đối với vi khuẩn nội sinh phân lập từ đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh

3.1.1. Xác định hiệu quả của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến số khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng ở yếu tố loại kháng sinh cùng với sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, số khuẩn lạc ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành khuẩn lạc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và các nồng độ kháng sinh đến số khuẩn lạc (khuẩn lạc) của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)				Trung bình (K)
		5	10	15	20	
1	Ampicillin	115,3	59,7	0,0	0,0	43,6
	Cefotaxime	101,3	45,0	0,0	0,0	36,1
	Gentamicin	99,6	41,3	0,0	0,0	35,6
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,9%; $F_K = 1,6^{ns}$; $F_N = 1523,8^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						
3	Ampicillin	115,3	59,7	1,8	0,0	44,0
	Cefotaxime	101,3	45,0	1,6	0,0	36,6
	Gentamicin	99,7	41,3	1,0	0,0	35,9
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	1,46 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,5%; $F_K = 3,3^{ns}$; $F_N = 1142,5^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						
5	Ampicillin	115,3	59,7	1,8	0,0	44,0
	Cefotaxime	101,3	45,0	1,6	0,0	36,7
	Gentamicin	99,7	41,3	1,0	0,0	35,9
	Trung bình (N)	105,4 ^a	48,4 ^b	1,46 ^c	0,0 ^c	
CV(%) = 8,5%; $F_K = 3,3^{ns}$; $F_N = 1142,5^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$						

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện. ns: không khác biệt; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Các kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng ở yếu tố loại kháng sinh cùng với sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, số khuẩn lạc ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành khuẩn lạc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

3.1.2. Xác định hiệu quả của kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến đường kính khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

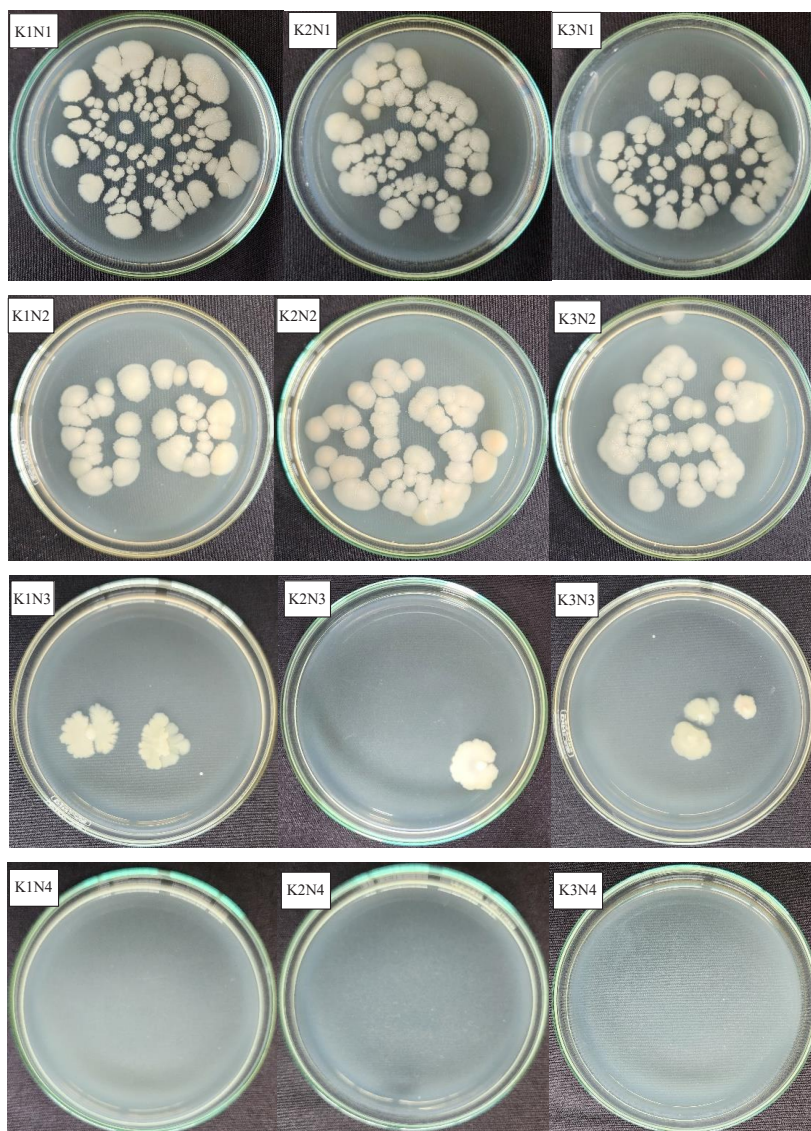
Bảng 2. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và các nồng độ kháng sinh đến đường kính khuẩn lạc (mm) của vi khuẩn nội sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)				Trung bình (K)
		5	10	15	20	
1	Ampicillin	1,3	1,2	0,0	0,0	0,6
	Cefotaxime	1,4	0,9	0,0	0,0	0,6
	Gentamicin	1,2	1,3	0,0	0,0	0,6
Trung bình (N)		1,3 ^a	1,6 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	
CV(%) = 21,4%; $F_K = 0,2^{ns}$; $F_N = 262,1^{***}$; $F_{K*N} = 1,4^{ns}$						
3	Ampicillin	5,2	6,0	1,6	0,0	3,2
	Cefotaxime	5,2	5,8	1,6	0,0	3,2
	Gentamicin	5,1	5,6	1,7	0,0	3,1
Trung bình (N)			5,2 ^b	5,8 ^a	1,6 ^c	0 ^d
CV(%) = 8,1%; $F_K = 0,1^{ns}$; $F_N = 781,4^{***}$; $F_{K*N} = 0,1^{ns}$						
5	Ampicillin	10,3 ^b	11,9 ^a	2,9 ^d	0,0 ^e	6,3 ^a
	Cefotaxime	8,2 ^c	11,9 ^a	3,1 ^d	0,0 ^e	5,8 ^b
	Gentamicin	8,6 ^c	11,8 ^a	3,1 ^d	0,0 ^e	5,5 ^b
Trung bình (N)		9 ^b	11,8 ^a	3 ^c	0 ^d	
CV(%) = 3,2%; $F_K = 2,2^{**}$; $F_N = 4546,7^{***}$; $F_{K*N} = 3,6^*$						

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê. ns: không khác biệt; *: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; **: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Tại thời điểm 5 ngày sau cấy, xét theo yếu tố loại kháng sinh, đường kính khuẩn lạc của vi khuẩn nội sinh trên môi trường được bổ sung kháng sinh Gentamicin ghi nhận kết quả tốt nhất với đường kính khuẩn lạc là 5,5 mm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, đường kính khuẩn lạc trên môi trường có bổ sung kháng sinh 20 mg/L ghi nhận kết quả không có sự hình thành, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Xét sự tương tác giữa các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh, đường kính khuẩn lạc trên môi trường được bổ sung mỗi kháng sinh với nồng độ kháng sinh ở 20 mg/L ghi nhận không có sự hình thành, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ (Hình 2). Các kết quả trên hoàn toàn là phù hợp vì kháng sinh có hiệu quả trong việc tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn (Kohanski & ctv., 2010).



Hình 2. Các đĩa petri trong thí nghiệm 1 ở 5 ngày sau cấy. K1 là Ampicillin, K2 là Cefotaxime và K3 là Gentamicin, N1 là 5 mg/L, N2 là 10 mg/L, N3 là 15 mg/L, N4 là 20 mg/L.

3.2. Ảnh hưởng của loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh phù hợp để ngăn chặn vi khuẩn nội sinh phát triển trên mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Kháng sinh đóng vai trò quan trọng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật bao gồm kỹ thuật giảm cạnh tranh *in vitro*, đặc biệt là trong việc kiểm soát sự nhiễm khuẩn bằng cách ngăn chặn sự phát của vi khuẩn và tăng cường sự sống sót của tế bào thực vật (Cassells, 1991; Kohanski & ctv., 2010).

3.2.1. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến chiều cao chồi hình thành từ đốt thân trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Kết quả Bảng 3 và Hình 3 cho thấy các mẫu đốt thân khi được xử lý với 3 loại kháng sinh ở nồng độ 20 mg/L đều bị nhiễm dẫn đến bị chết, do đó không thể hình thành chồi. Đến ngày thứ 30, các đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh chỉ còn sống trên môi trường có bổ sung kháng sinh Ampicillin, Cefotaxime, Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L và Cefotaxime, Gentamicin ở nồng độ 60 mg/L.

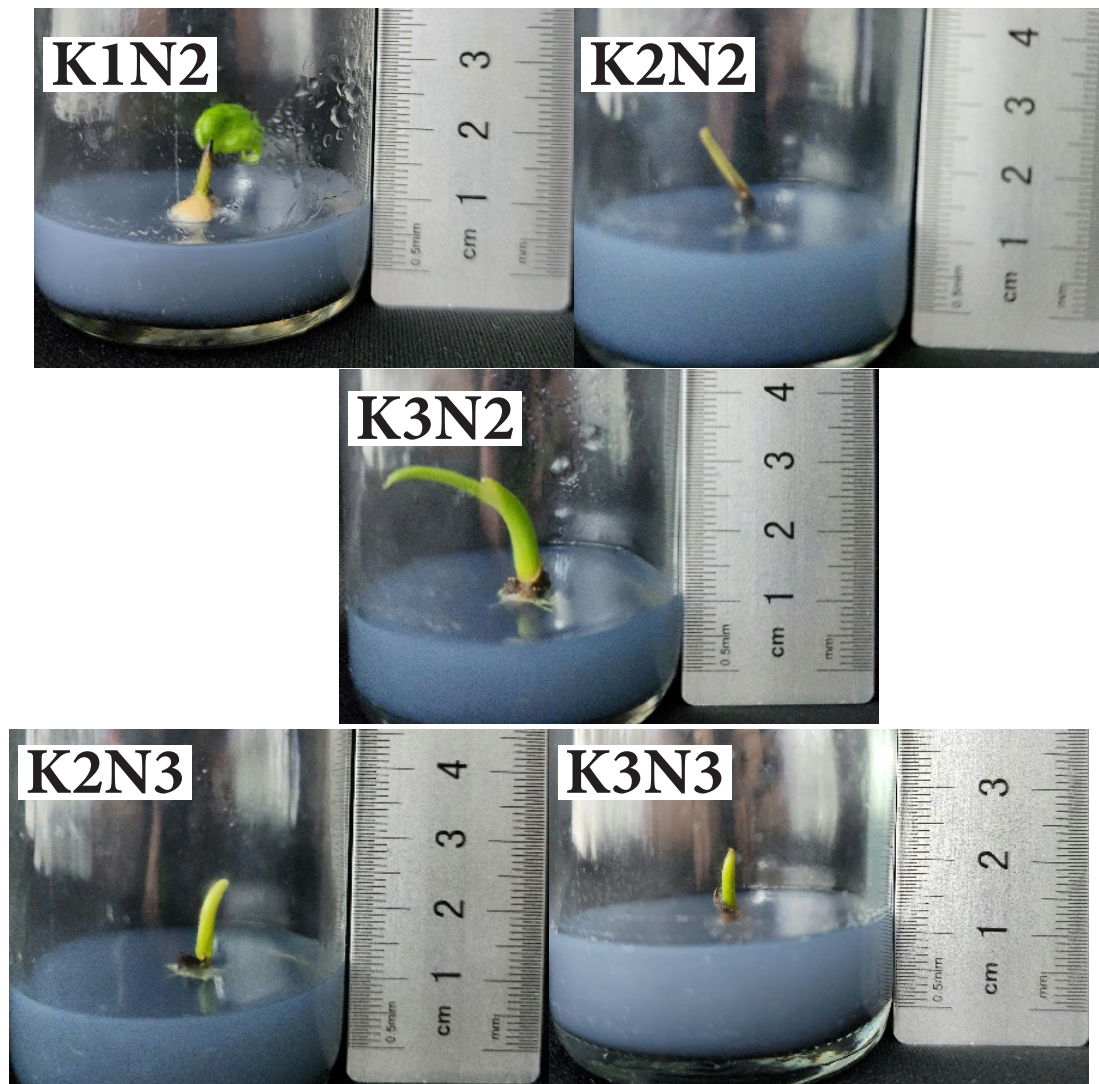
Bảng 3. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến chiều cao đốt thân (mm) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)		
		20	40	60
6	Ampicillin	-	7,4 ^{ab}	5,7 ^{bc}
	Cefotaxime	-	7,6 ^{ab}	3,8 ^c
	Gentamicin	-	9,2 ^a	4,0 ^c
CV(%) = 8,5%; $F_K = 198,5^{***}$; $F_N = 5,3^*$; $F_{K \times N} = 16,1^{***}$				
12	Ampicillin	-	9,4 ^a	7,8 ^b
	Cefotaxime	-	9,2 ^a	5,7 ^c
	Gentamicin	-	10,3 ^a	6,5 ^c
CV(%) = 8,5%; $F_K = 83,4^{***}$; $F_N = 4,8^*$; $F_{K \times N} = 4,5^*$				
18	Ampicillin	-	11,2	8,7
	Cefotaxime	-	12,3	9,7
	Gentamicin	-	14,9	10,8
CV(%) = 18,4%; $F_K = 9,9^{**}$; $F_N = 3,0^{ns}$; $F_{K \times N} = 0,28^{ns}$				
24	Ampicillin	-	12,5 ^b	-
	Cefotaxime	-	13,9 ^{ab}	10,4 ^b
	Gentamicin	-	17,2 ^a	11,6 ^b
CV(%) = 9,6%; $F_K = 210,5^{***}$; $F_N = 95,9^{***}$; $F_{K \times N} = 30,0^{***}$				
30	Ampicillin	-	13,3 ^b	-
	Cefotaxime	-	14,5 ^b	11,5 ^b
	Gentamicin	-	20,0 ^a	12,3 ^b
CV(%) = 8,6%; $F_K = 273,0^{***}$; $F_N = 133,2^{***}$; $F_{K \times N} = 37,8^{***}$				

Dấu “-” là trường hợp các mẫu bị nhiễm vi khuẩn nội sinh dẫn đến bị chết và không hình thành chồi. ns: không khác biệt; *: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; **: khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Từ 6 ngày đến 30 ngày sau cấy, chiều cao chồi hình thành hầu hết ở các bình được xử lý với 2 nồng độ kháng sinh là 40 mg/L và 60 mg/L, trong đó chiều cao chồi luôn đạt cao nhất

khi xử lý với Gentamicin ở nồng độ kháng sinh 40 mg/L, sự khác biệt rõ rệt với chiều cao đạt 20 mm vào ngày thứ 30, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.



Hình 3. Một số mẫu hồ tiêu Vĩnh Linh không bị chết do nhiễm khuẩn nội sinh ở thời điểm 30 ngày sau cấy. K1 là Ampicillin, K2 là Cefotaxime và K3 là Gentamicin, N2 là 40 mg/L, N3 là 60 mg/L.

3.2.2. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Các kết quả ở Bảng 4 chỉ ra rằng từ ngày 6 đến ngày thứ 12 sau cấy, xét yếu tố loại kháng sinh

và sự tương tác giữa loại và nồng độ kháng sinh, sự khác biệt tỷ lệ nhiễm khuẩn không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, xét yếu tố nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm đạt 100% ở nồng độ 20 mg/L, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh đến tỷ lệ nhiễm (%) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)			Trung bình (K)
		20	40	60	
6	Ampicillin	100	33,0	55,3	62,7
	Cefotaxime	100	44,3	33,0	59,1
	Gentamicin	100	33,0	55,3	62,7
	Trung bình (N)	100 ^a	36,7 ^b	47,8 ^b	
CV(%) = 26,1%; $F_K = 0,1^{ns}$; $F_N = 29,4^{***}$; $F_{K*N} = 0,7^{ns}$					
12	Ampicillin	100	33,0	77,6	70,0
	Cefotaxime	100	44,3	33,0	59,1
	Gentamicin	100	44,3	55,3	66,5
	Trung bình (N)	100 ^a	40,5 ^b	55,3 ^b	
CV(%) = 25,7%; $F_K = 0,8^{ns}$; $F_N = 23,9^{**}$; $F_{K*N} = 1,6^{ns}$					
18	Ampicillin	100 ^a	33,0 ^b	100 ^a	77,6
	Cefotaxime	100 ^a	44,3 ^b	33,0 ^b	59,1
	Gentamicin	100 ^a	44,3 ^b	55,3 ^b	66,5
	Trung bình (N)	100 ^a	40,5 ^c	62,7 ^b	
CV(%) = 18,6%; $F_K = 4,1^{ns}$; $F_N = 40,6^{***}$; $F_{K*N} = 6,3^{ns}$					
24	Ampicillin	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Cefotaxime	100 ^a	100 ^a	33,0 ^b	77,0 ^b
	Gentamicin	100 ^a	100 ^a	55,3 ^b	85,0 ^b
	Trung bình (N)	100 ^a	100 ^a	62,7 ^b	
CV(%) = 13,1%; $F_K = 7,0^{**}$; $F_N = 25,0^{***}$; $F_{K*N} = 7,0^{**}$					
30	Ampicillin	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Cefotaxime	100 ^a	100 ^a	33,0 ^b	77,0 ^b
	Gentamicin	100 ^a	100 ^a	55,3 ^b	85,0 ^b
	Trung bình (N)	100 ^a	100 ^a	62,7 ^b	
CV(%) = 13,0%; $F_K = 7,0^{**}$; $F_N = 25,0^{***}$; $F_{K*N} = 7,0^{**}$					

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ns: sự khác biệt không có ý nghĩa; **: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,01$; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Tỷ lệ nhiễm khuẩn tiếp tục tăng ở mẫu đốt thân được cấy vào một số môi trường chứa kháng sinh từ ngày 18 đến ngày thứ 24 sau cấy. Tại thời điểm 30 ngày sau cấy, xét theo yếu tố loại kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất là kháng sinh Cefotaxime với tỷ lệ nhiễm là 77%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất tại nồng độ kháng sinh 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 62,7%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,001$. Xét sự tương tác giữa các loại kháng sinh

và nồng độ kháng sinh, tỷ lệ nhiễm thấp nhất là kháng sinh Cefotaxime ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 33%, khác biệt không có ý nghĩa so với tỷ lệ nhiễm của mẫu đốt thân hồ tiêu cấy trên môi trường kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 60 mg/L với tỷ lệ nhiễm là 55,3% nhưng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,01$ so với các nghiệm thức còn lại.

Các kết quả đã chỉ ra rằng môi trường bổ sung kháng sinh giúp mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh hạn chế sự hình thành và phát triển của vi khuẩn

nội sinh trong nhân giống cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*, kết quả này tương tự với nghiên cứu của Thuyen & ctv. (2014) trên cây hồ tiêu và nghiên cứu của Nguyen & Phan (2022) trên cây lan ý.

3.2.3. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Từ ngày 6 đến ngày thứ 24, tỷ lệ sống có xu hướng giảm ở các mẫu đốt thân trên các môi trường có bổ sung loại và nồng độ kháng sinh

khác nhau. Tại thời điểm 30 ngày sau cấy, xét theo yếu tố kháng sinh, tỷ lệ sống trung bình dao động từ 26% đến 37%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Xét theo yếu tố nồng độ kháng sinh, nồng độ kháng sinh giúp đạt được tỷ lệ sống cao nhất là nồng độ 40 mg/L với tỷ lệ sống là 81,6%, sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê ở mức $\alpha = 0,001$. Xét sự tương tác giữa các kháng sinh và nồng độ kháng sinh, tỷ lệ sống cao nhất là kháng sinh Gentamicin ở nồng độ kháng sinh sử dụng là 40 mg/L với tỷ lệ là 89%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 5. Các loại kháng sinh và nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống (%) trong nhân giống hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro*

Ngày sau cấy	Loại kháng sinh	Nồng độ kháng sinh (mg/L)			Trung bình (K)
		20	40	60	
6	Ampicillin	0,0	100	11,0	37,0
	Cefotaxime	0,0	89,0	33,0	40,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	22,0 ^b	
CV(%) = 36,2%; $F_K = 0,2^{ns}$; $F_N = 90,9^{***}$; $F_{K*N} = 1,3^{ns}$					
12	Ampicillin	0,0	100	11,0	37,0
	Cefotaxime	0,0	89,0	33,0	40,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	22,0 ^b	
CV(%) = 36,2%; $F_K = 90,9^{ns}$; $F_N = 0,2^{***}$; $F_{K*N} = 1,3^{ns}$					
18	Ampicillin	0,0 ^b	100 ^a	0,0 ^b	33,0
	Cefotaxime	0,0 ^b	89,0 ^a	33,0 ^b	40,6
	Gentamicin	0,0 ^b	89,0 ^a	22,0 ^{bc}	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^c	92,6 ^a	18,3 ^b	
CV(%) = 32,5%; $F_K = 1,0^{ns}$; $F_N = 124,8^{***}$; $F_{K*N} = 3,5^*$					
24	Ampicillin	0,0	89,0	0,0	29,6
	Cefotaxime	0,0	89,0	11,0	33,3
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^b	89,0 ^a	11,0 ^b	
CV(%) = 47,8%; $F_K = 71,3^{***}$; $F_N = 0,6^{ns}$; $F_{K*N} = 0,6^{ns}$					
30	Ampicillin	0,0	78,0	0,0	26,0
	Cefotaxime	0,0	78,0	11,0	29,6
	Gentamicin	0,0	89,0	22,0	37,0
	Trung bình (N)	0,0 ^b	81,6 ^a	11,0 ^b	
CV(%) = 52,1%; $F_K = 1,4^{ns}$; $F_N = 57,2^{***}$; $F_{K*N} = 0,5^{ns}$					

Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ns: sự khác biệt không có ý nghĩa; ***: sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,001$.

Kết quả Bảng 5 cho thấy nồng độ kháng sinh ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sau khi khử trùng mẫu đốt thân hồ tiêu Vĩnh Linh, nồng độ kháng sinh 60 mg/L đạt tỷ lệ sạch cao nhưng tỷ lệ sống thấp (so với Bảng 4). Trái lại, nồng độ kháng sinh 40 mg/L đạt tỷ lệ sống cao. Kết quả này cũng phù hợp với các ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh đến tỷ lệ mẫu sạch của Pham & ctv. (2021) khi nghiên cứu trên cây bạch đàn. Nguyên nhân là do kháng sinh hạn chế sự phát triển của vi khuẩn nhưng việc bổ sung kháng sinh vào môi trường nuôi cấy *in vitro* ở nồng độ cao cũng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của thực vật (Grzebelus & Skop, 2014).

4. Kết Luận

Các kết quả cho thấy nồng độ 20 mg/L được chọn là nồng độ phù hợp để ức chế các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Đối với việc khử trùng các vi khuẩn nội sinh tồn tại bên trong mẫu đốt thân cây hồ tiêu Vĩnh Linh, việc sử dụng kháng sinh Gentamicin ở nồng độ 40 mg/L cho hiệu quả khử trùng tốt nhất. Trong điều kiện khử trùng này, tỷ lệ sống cao nhất, với tỷ lệ là 89%. Chiều cao chồi cao nhất, với chiều cao chồi đạt 20 mm.

Lời Cam Đoan

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của nhóm tác giả. Dữ liệu và kết quả trình bày trong nghiên cứu này là trung thực và chưa từng được công bố trên bất kỳ tạp chí nào khác.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu của Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: Culture contamination. In Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (Eds.). *Micropropagation technology and application* (31-34). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Do, L. T. (2004). *Medicinal plants and medicinal herbs of Vietnam*. Ha Noi, Vietnam: Medical Publishing House.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research* (2nd ed., 680). New York, USA: John Wiley and Sons.
- Grzebelus, E., & Skop, L. (2014). Effect of B-lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 50(5), 568-575. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9626-0>.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8(6), 423-435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>.
- Nguyen, A. V., Le, B. V., & Tran, M. T. (2019). *Principles and practices of plant tissue culture* (12-13). Can Tho, Vietnam: Can Tho University Press.
- Nguyen, P. T., & Phan, H. T. T. (2022). Effects of Cefotaxime (bactericidal antibiotic) on the growth dynamics of Peace Lily (*Spathiphyllum wallisii*). *Journal of Forestry Science and Technology* 3, 39-45.
- Nguyen, T. T., Tran, H. T. T., Nguyen, T. X., & Nguyen, G. V. (2018). Isolation and investigation of some biological characteristics of endophytic bacterial strains from the roots of pepper plants. *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology* 10(95), 85-90.
- Pham, T. H., Pham, T. M. T., & Tran, V. T. T. (2021). Effects of various antibiotic concentrations on growth parameters of eucalyptus seedlings in in vitro propagation conditions. *Scientific Journal of Tan Trao University* 7(22), <https://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/578>.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67, 257-268.
- Thuyen, D. A., Du, T. X., Giap, D. D., & Ton, N. T. (2014). Preliminary study on the micropropagation in vitro of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Academia Journal of Biology* 27(3), 39-45. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v27n3.5268>.

Identification of plant-parasitic nematodes present in roots and rhizosphere of rice (*Oryza sativa*) in Soc Trang province

Thu N. M. Ngo, Huy G. Nguyen*, Tuan V. Nguyen, & Phen V. Tran
College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: August 13, 2024
Revised: November 23, 2024
Accepted: November 28, 2024

Keywords

Composition
Identification
Nematodes
Rice roots and rhizosphere
Soc Trang province

*Corresponding author

Nguyen Gia Huy
Email:
giahuybvtv@gmail.com

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is a crucial staple crop in Vietnam, and plant-parasitic nematodes are of increasing concern due to their negative impacts. This study aimed to identify the nematode species parasitizing rice (Dai Thom 8) in several cultivation areas of Soc Trang province. The results showed that four genera including *Meloidogyne*, *Hirschmanniella*, *Tylenchorhynchus*, and *Tylenchus* were detected. Based on morphological characteristics and morphometrics, seven nematode species were identified: *Meloidogyne graminicola*, *Hirschmanniella diversa*, *H. mucronata*, *H. oryzae*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *T. nudus*, and *Tylenchus* sp. Notably, *Hirschmanniella* appeared with high density and was present in 100% of surveyed samples, with higher parasitic density in root samples than in soil samples. *Meloidogyne graminicola* was common but occurred at low density in the flooded rice model, while *Tylenchorhynchus* appeared sporadically, with higher density in roots than in soil. This study indicates that the rice cultivation area in Soc Trang province has low nematode diversity, with *Hirschmanniella* identified as the main harmful nematode in the rhizosphere. These results provide an important scientific basis for developing control measures in future research.

Cited as: Ngo, T. N. M., Nguyen, H. G., Nguyen, T. V., & Tran, P. V. (2025). Identification of plant-parasitic nematodes present in roots and rhizosphere of rice (*Oryza sativa*) in Soc Trang province. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 22-39.

**Định danh thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật hiện diện tại rễ và vùng đất quanh rễ cây
lúa (*Oryza sativa*) tại tỉnh Sóc Trăng**

Ngô Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Gia Huy*, Nguyễn Văn Tuấn & Trần Vũ Phấn
Trường Nông Nghiệp, Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 13/08/2024
Ngày chỉnh sửa: 23/11/2024
Ngày chấp nhận: 28/11/2024

Từ khóa

Định danh
Rễ và vùng rễ lúa
Thành phần
Tỉnh Sóc Trăng
Tuyến trùng

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Gia Huy
Email:
giahuybvtv@gmail.com

TÓM TẮT

Cây lúa (*Oryza sativa*) là cây lương thực quan trọng hàng đầu tại Việt Nam, những nghiên cứu gần đây cho thấy tuyến trùng ký sinh thực vật ngày càng được quan tâm do tác động tiêu cực mà chúng gây ra. Nghiên cứu này nhằm xác định các loài tuyến trùng ký sinh trên cây lúa (Đài Thơm 8) tại một số khu vực canh tác ở tỉnh Sóc Trăng. Kết quả đã xác định được 4 giống bao gồm *Meloidogyne*, *Hirschmanniella*, *Tylenchorhynchus* và *Tylenchus*. Dựa vào đặc điểm và các chỉ số hình thái đã định danh được 7 loài tuyến trùng gồm: *Meloidogyne graminicola*, *Hirschmanniella diversa*, *H. mucronata*, *H. oryzae*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *T. nudus* và *Tylenchus* sp. Đáng chú ý, giống *Hirschmanniella* xuất hiện với mật độ cao và hiện diện 100% trong tất cả các mẫu khảo sát, mật độ ký sinh trong rễ cao hơn trong đất; loài *Meloidogyne graminicola* phổ biến nhưng ghi nhận mật số thấp trên mô hình lúa ngập nước; loài *Tylenchorhynchus leviterminalis* chỉ xuất hiện với mật độ rải rác và mật độ trong rễ cao hơn trong đất. Vùng canh tác lúa tại tỉnh Sóc Trăng có sự đa dạng thấp về thành phần tuyến trùng và *Hirschmanniella* là tuyến trùng gây hại chính trong vùng đất quanh rễ lúa. Kết quả này là cơ sở khoa học để xây dựng các biện pháp phòng trừ tuyến trùng ký sinh trên lúa trong các nghiên cứu tiếp theo.

1. Đặt Vấn Đề

Cây lúa (*Oryza sativa*) là cây lương thực thiết yếu đối với phần lớn dân số toàn cầu chiếm 30% sản lượng ngũ cốc trên thế giới (Shrestha & ctv., 2007), đặc biệt là ở châu Á. Tại Việt Nam, đến năm 2022 thì khối lượng xuất khẩu gạo đạt 7,11 triệu tấn và đạt 3,45 tỷ USD (AGROINFO, 2022). Tuy nhiên, tuyến trùng ký sinh thực vật đóng một vai trò quan trọng, tạo ra những hạn chế lớn trong sản xuất cây trồng thành công và gây thiệt hại năng suất lúa lên đến 90% và các loài gây hại trên lúa bao gồm *Ditylenchus angustus*, *Aphelenchoides besseyi*, *Hirschmanniella* spp., *Heterodera oryzae* và *Meloidogyne graminicola* (Jain & ctv., 2012). Các loài tuyến trùng gặp phải chủ yếu phụ thuộc vào hệ thống canh tác lúa như loài *Hirschmanniella oryzae* thích nghi với điều kiện ngập nước, trong khi tuyến trùng sừng rế *Meloidogyne* spp. (RKN) phổ biến ở các cánh đồng lúa cạn và được tưới tiêu (Fortuner & Merny, 1979). Cây lúa khi bị tấn công bởi *M. graminicola* có biểu hiện còi cọc và vàng lá do các vết phỏng hoặc sừng đặc trưng ở đầu rễ, cuối cùng dẫn đến giảm sinh trưởng và năng suất nghiêm trọng (Jain & ctv., 2012). Trong khi đó, cây lúa bị nhiễm *Hirschmanniella* có biểu hiện còi cọc và giảm khả năng đẻ nhánh tới 60% dẫn đến thiệt hại 25% năng suất (Hollis & Keoboonrueng, 1984; Bridge & ctv., 2005). Tại Việt Nam, nhiều báo cáo đã ghi nhận sự hiện diện của các loài tuyến trùng ký sinh trên cây lúa, trong điều kiện ngập nước sâu, các loài như *Hirschmanniella mucronata*, *H. oryzae*, *Meloidogyne graminicola*, và *Tylenchorhynchus annulatus* trở nên phổ biến hơn (Cuc & Prot, 1992). Đặc biệt, các yếu tố như lựa chọn luân canh không hợp lý, việc sử dụng giống lúa nhạy cảm và phương pháp gieo sạ trực tiếp đã làm gia tăng mức độ gây hại của tuyến trùng trên các cánh đồng khảo sát (Nguyen & ctv., 2020a), đặc biệt sự kết hợp giữa thay đổi

điều kiện khí hậu và môi trường, cường độ sản xuất lúa cao với ba vụ mỗi năm ở một số khu vực, cùng với sự đa dạng giống lúa mà nông dân Việt Nam sử dụng, có thể tạo ra điều kiện thuận lợi cho sự hiện diện và phát triển tính đa dạng di truyền cao (Bellafiore & ctv., 2015). Ví dụ điển hình là việc độc canh kéo dài đã dẫn đến sự gia tăng tích lũy mật độ tuyến trùng, với mật độ quần thể của *Hirschmanniella* spp. trong các cánh đồng lúa hai vụ cao gấp đôi so với các cánh đồng lúa một vụ (Khuong, 1987). Mặt khác, các nghiên cứu về thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây lúa ở đồng bằng sông Cửu Long trong thời gian gần đây ít được thực hiện, dẫn đến thiếu hụt cơ sở dữ liệu khoa học cần thiết để hỗ trợ các mục tiêu phòng trừ tuyến trùng một cách hiệu quả. Đặc biệt là tỉnh Sóc Trăng nơi canh tác của nhiều giống lúa ngon và nổi tiếng thế giới như Đài Thơm 8, ST24, ST25... thì sự gây hại của tuyến trùng càng quan trọng hơn do sự tấn công của chúng ảnh hưởng đến năng suất của cây lúa cao sản càng rõ rệt, đặc biệt là gia tăng thâm canh lúa (Khuong, 1987; Nguyen & ctv., 2020b). Từ những vấn đề trên, nghiên cứu này đã xác định các giống/loài tuyến trùng ký sinh quan trọng trên cây lúa làm cơ sở khoa học trong xây dựng biện pháp phòng trừ.

2. Đối Tượng và Phương Pháp

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tuyến trùng ký sinh thực vật trên rễ và vùng đất quanh rễ cây lúa tại tỉnh Sóc Trăng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Cách thu mẫu: Mẫu được lấy ngẫu nhiên theo đường zig-zắc và được trộn đều tách riêng phần đất và rễ. Sau đó, mẫu được bảo quản trong thùng xốp và đem về phòng thí nghiệm với 40 mẫu đất và 40 mẫu rễ tại tỉnh Sóc Trăng theo Hình 1.



Hình 1. Bản đồ các vị trí thu mẫu tại tỉnh Sóc Trăng.

Phương pháp tách lọc mẫu đất và rễ: Mẫu đất được trộn đều và định lượng 250 cm^3 được tách lọc theo phương pháp lọc tĩnh; mẫu rễ được định lượng 5 g (Chau, 2003).

Phương pháp cố định mẫu: Tuyến trùng sau khi cố định trong nước ấm nhiệt độ khoảng 60°C trong 30 giây, rồi chuyển sang dung dịch TAF (Southey, 1986) để cố định trong 4 - 5 ngày. Sau đó, tuyến trùng được cố định trong dung dịch FA (4:1) nóng theo Seinhorst (1966). Các mẫu được xử lý với glycerol tinh khiết và được gắn lên các lame dựa theo phương pháp của Hooper (1986) với những điều chỉnh cần thiết. Mẫu được quan sát ở vật kính 10X, 40X và 100X trên kính hiển vi (Nikon E100, Nhật Bản).

Tính toán các chỉ số sinh thái học quần thể tuyến trùng mật số trung bình (MSTB), tần suất tuyệt đối (absolute frequency - AF), tần suất tương đối (relative frequency - RF), chỉ số giá trị ưu thế (prominence value - PV) theo Norton (1978).

Định danh đến loài dựa trên các chỉ số hình thái định tính, định lượng và các khóa phân loại đến loài của các giống có liên quan dựa vào khóa phân loại của Chau & Thanh (2000)

và Siddiqi (2000) kết hợp với các công thức về chỉ số hình thái lượng.

2.3. Phân tích số liệu

Các chỉ số về hình thái và mật số tuyến trùng được tổng hợp và xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2016. Giá trị mật số trung bình và chỉ số hình thái được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn (min - max). Mật số tuyến trùng được kiểm định Shapiro-Wilk về normal distribution và so sánh sự khác biệt qua kiểm định Kruskal-Wallis được thực hiện trên phần mềm SPSS version 22.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm sinh học thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây lúa

Kết quả khảo sát thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên giống lúa Đài Thơm 8 tại 4 khu vực thành phố Sóc Trăng và các huyện Ngã Năm, Kế Sách và Trăn Đề. Bảng 1 cho thấy trong mẫu đất ghi nhận 4 giống tuyến trùng bao gồm *Meloidogyne*, *Hirschmanniella*, *Tylenchorhynchus* và *Tylenchus*. Về mật số trung bình thể hiện giống *Hirschmanniella* hiện diện với mật số cao đạt 262 ± 66 cá thể/ 250 cm^3 đất, rất khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các giống còn lại và mật số ghi nhận cao nhất là 1520 cá thể/ 250 cm^3 đất. Bên cạnh đó, tần suất xuất hiện (AF), tần suất tương đối (RF) và chỉ số ưu thế (PV) là 100%, 33,9% và 262,4 và cao nhất so với các giống tuyến trùng khác. Tuyến trùng *Meloidogyne* hiện diện mật số thấp hơn so với *Hirschmanniella* chỉ đạt 9 ± 2 cá thể/ 250 cm^3 đất nhưng AF lại đạt 87,5% cho thấy sự hiện diện phổ biến trong mẫu đất nhưng lại hiện diện với mật số không cao trong đất ngập nước. Tuy nhiên, nhiều ghi nhận cho thấy chúng được xem là một trong

các nhóm tuyến trùng ký sinh đe dọa đến nền nông nghiệp lúa nước tại châu Á (De Waele & Elsen, 2007) thích nghi tốt trong điều kiện ngập nước nhưng sự tấn công của chúng không ảnh hưởng sinh trưởng và năng suất của cây

lúa (Tandingan & ctv., 1996; Mantelin & ctv., 2017). Các giống tuyến trùng khác có mật số thấp hơn đáng kể và AF, RF, PV cũng thấp hơn so với *Hirschmanniella*, cho thấy sự ảnh hưởng không lớn của chúng trong mẫu đất.

Bảng 1. Đặc điểm sinh học thành phần tuyến trùng ký sinh cây lúa tại mẫu đất (cá thể/250 cm³)

Tuyến trùng	Trung bình $\pm$ sai số	Min - max	AF (%)	RF (%)	PV
<i>Meloidogyne</i>	9 ^b $\pm$ 2	0 - 40	87,50	29,66	8,23
<i>Hirschmanniella</i>	262 ^a $\pm$ 66	14 - 1.520	100	33,90	262,40
<i>Tylenchorhynchus</i>	2 ^b $\pm$ 1	0 - 17	47,50	16,10	1,41
<i>Tylenchus</i>	1 ^b $\pm$ 1	0 - 11	30,00	10,17	0,77
Mức ý nghĩa	**				

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột theo sau bởi chữ cái khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê. **: Khác biệt ý nghĩa 1%. Min - max: Nhỏ nhất - lớn nhất, AF (%): Tần suất xuất hiện, RF (%): Tần suất tương đối; PV: Chỉ số ưu thế.

Bảng 2 cho thấy trong mẫu rễ, có ba giống tuyến trùng đã được ghi nhận: *Meloidogyne*, *Hirschmanniella* và *Tylenchorhynchus*. *Hirschmanniella* với mật số trung bình cao nhất là 516 $\pm$ 73 cá thể/5 g rễ và mật số cao nhất ghi nhận là 1651 cá thể/5 g rễ. Loài này có tần suất xuất hiện (AF) và chỉ số ưu thế (PV) lần lượt là 100% và 516,25, cho thấy sự chiếm ưu thế tuyệt đối trong quần xã tuyến trùng ký sinh trên mẫu rễ. Các giống tuyến trùng

khác như *Meloidogyne* và *Tylenchorhynchus* hiện diện với mật số thấp và không chiếm vị trí ưu thế như *Hirschmanniella*. Điều này cho thấy sự phân bố và ưu thế khác nhau của các loài tuyến trùng trong môi trường mẫu rễ. Qua đó, *Hirschmanniella* là tuyến trùng chiếm ưu thế cao nhất và có sự hiện diện rộng rãi nhất trong mẫu rễ, trong khi các giống khác có mật số thấp hơn và không phổ biến trong mẫu này.

Bảng 2. Đặc điểm sinh học thành phần tuyến trùng ký sinh cây lúa tại mẫu rễ (cá thể/5 g)

Tuyến trùng	Trung bình $\pm$ sai số	Min - max	AF (%)	RF (%)	PV
<i>Meloidogyne</i>	12 ^b $\pm$ 2	0 - 44	87,50	36,46	10,87
<i>Hirschmanniella</i>	516 ^a $\pm$ 73	25 - 1.651	100	41,67	516,25
<i>Tylenchorhynchus</i>	6 ^b $\pm$ 2	0 - 36	35	14,58	3,48
Mức ý nghĩa	**				

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột theo sau bởi chữ cái khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê. **: Khác biệt ý nghĩa 1%. Min - max: Nhỏ nhất - lớn nhất, AF (%): Tần suất xuất hiện, RF (%): Tần suất tương đối; PV: Chỉ số ưu thế.

Nhìn chung, *Hirschmanniella* là giống tuyến trùng phổ biến nhất và ưu thế trong cả mẫu đất và mẫu rễ. Mẫu rễ mật số tuyến trùng *Hirschmanniella* cao hơn so với mẫu đất, cho thấy nơi này là môi trường phát triển phù hợp do đặc điểm nội ký sinh của chúng. Sự phân bố và ưu thế khác nhau của *Hirschmanniella* trong cả mẫu đất và mẫu rễ có thể phản ánh sự ưu thế của giống tuyến trùng này trong khu vực nghiên cứu, có thể ảnh hưởng đáng kể đến sinh thái của cây trồng, đặc biệt là trong điều kiện ngập nước phổ biến nhất ở đất ẩm như trên ruộng lúa (Luc, 1987; Bridge & ctv., 2005). Kết quả này tương đồng với những phát hiện từ nghiên cứu tại các vùng trồng lúa ở tỉnh Pathum Thani, Thái Lan, khi cho thấy *Hirschmanniella* chiếm ưu thế trong cả mẫu đất và rễ lúa so với các loài tuyến trùng ký sinh thực vật (PPNs) khác; đồng thời, mật độ quần thể *Hirschmanniella* được ghi nhận cao hơn trong rễ lúa so với trong đất (Beesa & ctv., 2021a), sự thích nghi trong rễ giúp chúng sống sót tốt hơn (Fortuner & Merny, 1979). Đặc biệt, *Hirschmanniella* spp. liên quan đến việc giảm năng suất lúa trong hệ thống lúa độc canh và sự hiện diện của chúng cũng trở nên ít phổ biến và mật số

thấp hơn ở các loại cây trồng cạn so với lúa nước, điều này gợi ý về luân canh đa dạng cây trồng với cây lúa thúc đẩy cải tạo tính chất đất và làm tăng sự đa dạng sinh học trong môi trường đất canh tác (Nguyen & ctv., 2020b; Nguyen & ctv., 2020c).

3.2. Đặc điểm hình thái các loài tuyến trùng ký sinh ghi nhận trên cây lúa

Qua khảo sát các mẫu rễ và vùng đất quanh rễ cây lúa đã định danh được 7 loài bao gồm *Hirschmanniella diversa*, *H. mucronata*, *H. oryzae*, *Meloidogyne graminicola*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *T. nudus* và *Tylenchus* sp. (Bảng 3). Hầu hết các loài này đều ghi nhận trong các nghiên cứu trước đó trên cây lúa (Chau & Thanh, 2000), điều này cho thấy mức độ tương đồng cao về thành phần tuyến trùng hiện diện cây lúa. Tuy nhiên, đối với loài *Tylenchus* sp. do nhiều tài liệu cho thấy chúng là loài ngoại ký sinh, mặc dù kim nhỏ của chúng có khả năng dinh dưỡng từ rễ lông hút, sợi nấm, tảo và rong (Yeates & ctv., 1993). Do vai trò ký sinh thực vật của *Tylenchus* spp. chưa rõ ràng, nên giống này không được coi là quan trọng đối với cây trồng nói chung (Chau & Thanh, 2000).

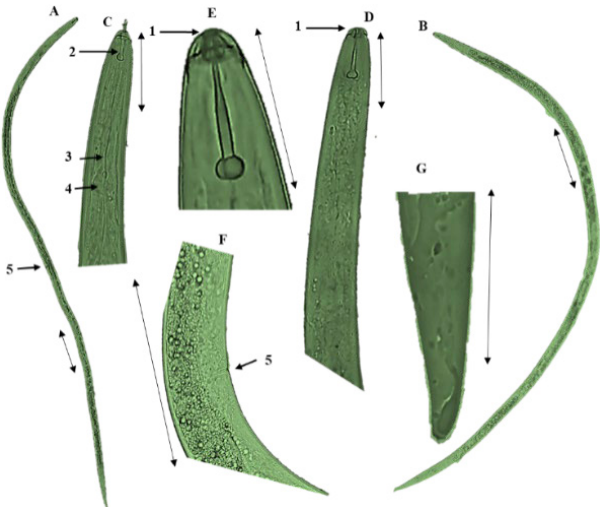
Bảng 3. Thành phần tuyến trùng ký sinh cây lúa tại tỉnh Sóc Trăng

Họ	Giống	Loài	Đặc điểm ký sinh
Pratylenchidae	<i>Hirschmanniella</i>	<i>H. diversa</i>	Nội ký sinh di động
		<i>H. mucronata</i>	
		<i>H. oryzae</i>	
Meloidogynidae	<i>Meloidogyne</i>	<i>M. graminicola</i>	Nội ký sinh cố định
Telotylenchidae	<i>Tylenchorhynchus</i>	<i>T. leviterminalis</i>	Bán nội ký sinh hoặc ngoại ký sinh
		<i>Tylenchorhynchus nudus</i>	
Tylenchidae	<i>Tylenchus</i>	<i>Tylenchus</i> sp.	Ngoại ký sinh

3.2.1. *Hirschmanniella diversa*

Đặc điểm hình thái của *H. diversa* dựa theo khóa phân loại của Chau & Thanh (2000) kết

hợp với so sánh với chỉ số đo của Sher (1968), Eroshenko & ctv. (1985).



Hình 2. Hình thái của *Hirschmanniella diversa*: A, B. Cơ thể con cái; C, D: Vùng đầu, E: Vùng môi, F. Hệ sinh dục, G. Vùng đuôi (1. Vùng môi; 2. Kim hút, 3. Ống bài tiết, 4. Điều giữa, 5. Âm hộ); Scale: A, B: 100 μ m; C - F: 50 μ m; G: 25 μ m.

Con cái sau khi cố định nhiệt cơ thể thường hay cong, cơ thể có kích thước tương đối lớn $2,34 \pm 0,29$ (1,98 - 2,63) mm, vùng môi dạng hình bán cầu có 4 - 6 vòng cutin, kim to khỏe, để kim tròn, cạnh trước hơi vát về phía sau; điều giữa hình oval, lỗ bài tiết thường nằm gần ngang van ruột thực quản. Túi chứa tinh dạng oval; gần vùng đuôi ít areolation; đuôi hình chóp, không phân

đốt một đoạn 4 - 6 vòng cutin (Hình 2). Con đực không tìm thấy trong mẫu khảo sát. Mặc dù, các nghiên cứu tại Nhật Bản chỉ ra rằng loài này gây hại quan trọng nhất đối với việc trồng sen và sự tồn tại của chúng trên các khu vực trồng sen trên nền đất lúa (Takagi & ctv., 2019; Takagi & ctv., 2022), điều này củng cố giả thiết về sự hiện diện của chúng trên đất lúa.

Bảng 4. Số đo hình thái của quần thể loài *Hirschmanniella diversa*

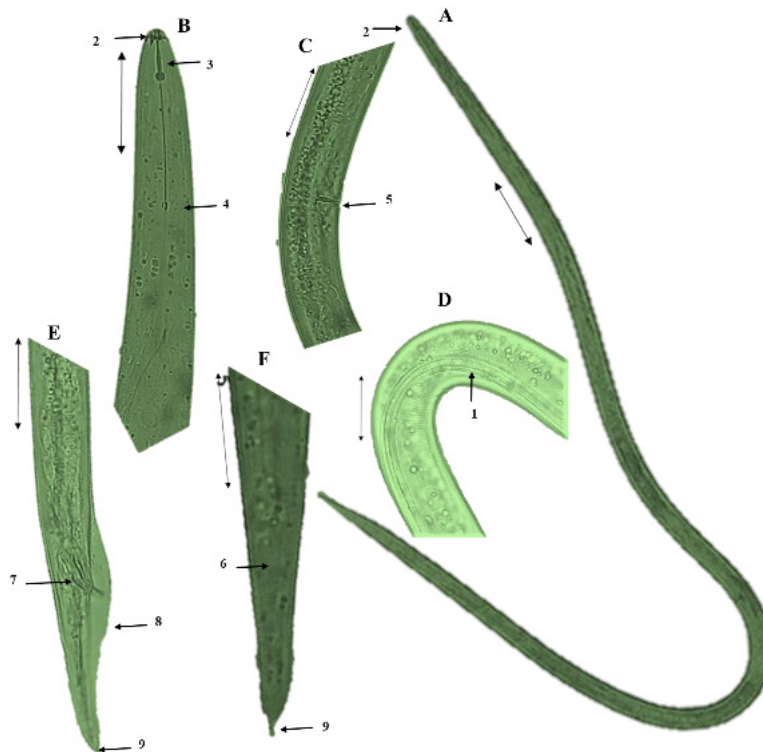
Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu	Sher (1968)	Eroshenko & ctv. (1985)
Số mẫu (n)	5 ♀♀	20 ♀♀	10 ♀♀
L (mm)	$2,34 \pm 0,29$ (1,98 - 2,63)	2,40 (1,87 - 2,85)	1,9 - 2,1
a	$70,74 \pm 9,19$ (58 - 83,4)	65 (54 - 75)	58 - 64
b	$17 \pm 2,1$ (13,8 - 19,1)	17,8 (13 - 20)	13 - 15
b'	$7,34 \pm 0,4$ (6,8 - 7,9)	-	6 - 7,4
c	$16,46 \pm 1,4$ (14,6 - 18,2)	18,7 (15 - 20)	14 - 16
c'	$6,22 \pm 0,95$ (4,9 - 7,3)	5,3 (4,8 - 6,2)	5,2 - 6,6
Stylet (μ m)	$23,94 \pm 1,35$ (22 - 25,6)	24 (23 - 25)	24
V (%)	$50,00 \pm 1,33$ (48 - 51,2)	49 (45 - 51)	47 - 51

3.2.2. *Hirschmanniella mucronata*

Loài *H. mucronata* với các đặc điểm về hình thái học dựa theo mô tả của Chau & Thanh (2000) và khóa phân loại chuyên biệt các loài thuộc giống *Hirschmanniella* theo các khóa định danh của Sher (1968); chỉ số hình thái lượng được so sánh với các nghiên cứu của Beesa & ctv. (2021a; 2021b) tại Campuchia và Thái Lan.

Con cái: Vùng đầu có vỏ cứng mạnh, môi hình bán cầu với 4 - 6 vòng cutin hơi lếch, và vùng bên hình ô vuông (areolation) phía sau cơ thể, vùng bên có 4 đường với cấu trúc chạy dọc cơ thể nhưng mờ và không hoàn chỉnh, kể cả vùng đuôi, mặc dù các đặc điểm phân loại của Khun & ctv. (2015). Kim hút ngắn, chắc và khỏe, để kim tròn và cạnh trước hơi vát về phía sau. Đuôi hình chóp, phân đốt đến hết đuôi và có

1 mucro hướng về phía bụng. Hệ sinh dục kép đối xứng qua vulva, thực quản tuyến có hai thùy che ruột về phía bụng. Noãn bào xếp thành dãy trong buồng trứng, túi chứa tinh hình oval. Con đực thì tương tự con cái nhưng tinh hoàn dạng đơn ngắn hơn ống sinh tinh. Cánh màng đuôi phát triển hẹp và che phủ theo dạng leptoderal. Gai sinh dục dài khoảng $29,52 \pm 3,02$ (26 - 34) μm (Hình 3). Mặc dù (Bảng 5), kích thước con cái tại Việt Nam ($1.986 \pm 119 \mu\text{m}$) tương tự với mẫu phân tích tại Campuchia ($2.023 \pm 140 \mu\text{m}$) thì các cá thể đực ($2.020 \pm 210 \mu\text{m}$) to hơn cả hai mẫu nghiên cứu tại Thái Lan và Campuchia (Beesa & ctv., 2021a; Beesa & ctv., 2021b). Mucro con cái trong mẫu tại Sóc Trăng rõ ràng và dễ nhận diện hơn so với mẫu Campuchia, con đực cánh màng đuôi phủ rộng và dài hơn, trong khi cloaca ít nhô ra.



Hình 3. Hình thái của *Hirschmanniella mucronata*: A. Hình thái con cái, B. Vùng đầu, C. Hệ sinh dục con cái, D. Vùng bên, E. Vùng đuôi con đực, F. Vùng đuôi con cái (1. Đường bên, 2. Vùng môi, 3. Kim hút, 4. Điều giữa, 5. Âm hộ, 6. Areolation, 7. Gai sinh dục, 8. Cánh màng, 9. Mucro). Scale: A - D: 100 μm ; B - F: 50 μm .

Bảng 5. Số đo hình thái của quần thể loài *Hirschmanniella mucronata*

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu		Beesa & ctv. (2021a)		Beesa & ctv. (2021b)	
Số mẫu (n)	5 ♀♀	5 ♂♂	21 ♀♀	30 ♂♂	24 ♀♀	24 ♂♂
L (µm)	1986 ± 119 (1.850 - 2.130)	2020 ± 210 (1.810 - 2.340)	1734 ± 186 (1.421 - 2.109)	1775 ± 188 (1.260 - 2.160)	2,023 ± 140 (1.780 - 2.330)	1,864 ± 131 (1.640 - 2.220)
a	55,04 ± 2,25 (51,39 - 56,9)	48,38 ± 8,34 (38,11 - 57,3)	59 ± 7,6 (45 - 81)	58 ± 5,2 (47 - 67)	63,7 ± 4,2 (55,8 - 72,8)	63,8 ± 6 (52,4 - 75,5)
b	12,62 ± 1,58 (10,62 - 14,8)	13,00 ± 2,47 (9,09 - 15,7)	13,9 ± 1,7 (11,0 - 16,7)	14,0 ± 1,1 (12 - 16)	16 ± 1,2 (14 - 19)	14,5 ± 1,4 (12,4 - 18,5)
b'	5,41 ± 0,67 (4,6 - 6,3)	4,96 ± 0,24 (4,73-5,3)	5,8 ± 0,7 (4,5 - 7,0)	5,9 ± 0,7 (4,4 - 7,4)	6,1 ± 1,1 (4,8 - 8,7)	5,5 ± 0,6 (4,2 - 7,0)
c	19,41 ± 1,11 (17,88 - 20,55)	20,06 ± 2,09 (17,04 - 22,8)	21,0 ± 2,2 (17 - 25)	22 ± 2,7 (16 - 28)	23,6 ± 3 (18 - 30)	22,3 ± 2,3 (17,5 - 26,7)
c'	4,42 ± 0,80 (3,43 - 5,46)	4,22 ± 0,68 (3,33 - 5,00)	4,4 ± 0,4 (3,5 - 5,1)	3,7 ± 0,4 (2,8 - 5,0)	4 ± 0,4 (3,1 - 4,6)	4,5 ± 0,6 (3,6 - 6,0)
Stylet (µm)	25,76 ± 3,23 (21,5 - 30)	25,12 ± 1,7 (22,5 - 27)	23 ± 1,2 (21 - 26)	22,2 ± 0,6 (21 - 23)	25,8 ± 1,1 (24 - 27)	25,7 ± 1,1 (24 - 27)
V (%)	-	57,9 ± 4,2 (53,48 - 62,70)	-	52 ± 2,3 (49 - 59)	53 ± 1,7 (49,2 - 57,3)	-
Spicule (µm)	29,52 ± 3,02 (26 - 34)	-	34 ± 1,6 (31 - 37)	-	-	31,9 ± 1,9 (29 - 36)

3.2.3. *Hirschmanniella oryzae*

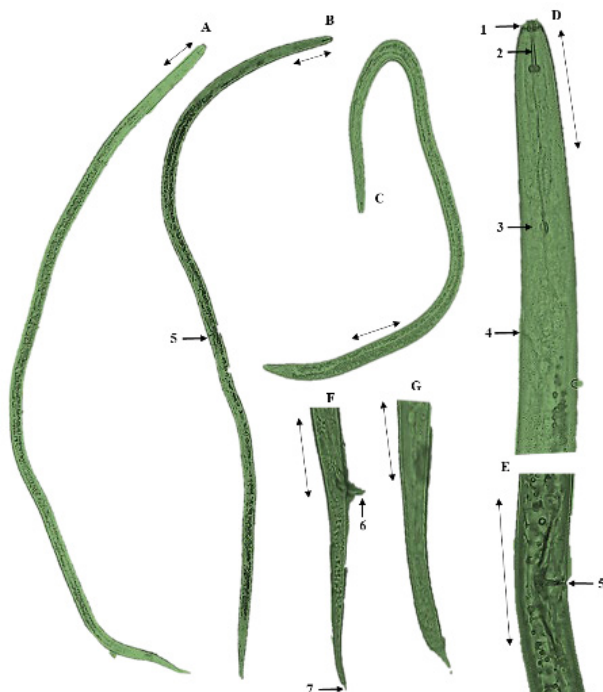
Loài *H. oryzae* với các đặc điểm về hình thái học dựa theo mô tả của Chau & Thanh (2000) và chỉ số hình thái lượng tương đồng được so sánh với các nghiên cứu của Sher (1968) và Eroshenko & ctv. (1985) của chúng cao được mô tả như sau:

Con cái: Khi cố định, thân hình thường có xu hướng cong. Vùng đầu có vỏ cứng mạnh, môi bằng phẳng với từ 3 - 4 vòng cutin. Vùng bên có 4 đường nhưng không có cấu trúc areolation. Kim hút ngắn, nhỏ nhưng rất khô, với núm gốc của stylet tròn. Diều giữa có hình oval. Thực quản tuyến che ruột về phía bụng. Lỗ bài tiết nằm ngang với van thực quản - ruột. Hệ sinh sản kiểu đối xứng nhau theo dạng didelphic - amphidelphic. Noãn bào xếp thành một dãy

trong buồng trứng, túi chứa tinh hình oval và đầy tinh trùng. Đuôi hình chóp, có mucro ở tận cùng đuôi hướng về phía bụng (Hình 4).

Con đực: Tương tự con cái nhưng có những đặc điểm riêng như tinh hoàn dạng đơn và ngắn hơn ống sinh tinh. Cánh màng đuôi phát triển không rộng và che phủ theo dạng leptoderal.

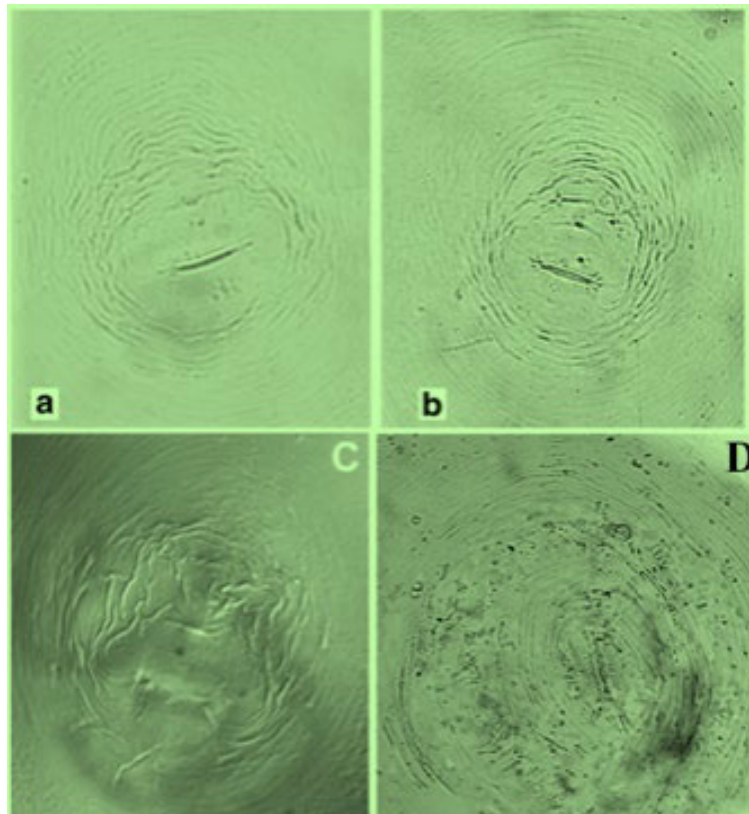
Hầu hết các bằng chứng cho thấy *H. mucronata* và *H. oryzae* được tìm thấy phổ biến tại Philippines và Trung Quốc (Chen & ctv., 2006; Pascual & ctv., 2014). Đặc biệt, *H. oryzae* được đánh giá là nguyên nhân gây ra hiện tượng đổi màu, suy giảm và thối rữa rễ lúa, dẫn đến sự ngừng phát triển và giảm 60% số nhánh lúa (Beesa & ctv., 2021b).



Hình 4. Hình thái của *Hirschmanniella oryzae*: A. Con cái; B. Con đực; C. Ấu trùng; D. Vùng đầu; E. Hệ sinh dục con cái; F. Vùng đuôi con đực; G. Vùng đuôi con cái (1. Vùng môi; 2. Kim hút; 3. Điều giữa; 4. Lỗ bài tiết; 5. Âm hộ; 6. Gai sinh dục; 7. Mucro). Scale: A - D: 100 μ m; E - G: 50 μ m.

Bảng 6. Số đo hình thái của quần thể loài *Hirschmanniella oryzae*

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu		Sher (1968)		Eroshenko & ctv. (1985)	
Số mẫu (n)	5 ♀♀	5 ♂♂	17 ♀♀	10 ♂♂	10 ♀♀	10 ♂♂
L (mm)	1,46 $\pm$ 0,08 (1,33 - 1,54)	1,45 $\pm$ 0,06 (1,28 - 1,65)	1,44 (1,14 - 1,63)	1,17 (1,01 - 1,40)	1,25 - 1,68	1,30 - 1,60
a	61,43 $\pm$ 3,84 (57,04 - 65,4)	53,63 $\pm$ 5,48 (47,66 - 60,72)	60 (50 - 67)	59 (52 - 61)	47 - 62	52 - 61
b	9,58 $\pm$ 0,84 (8,53 - 10,85)	9,91 $\pm$ 1,26 (8,25 - 11,65)	10,7 (8,8 - 12,1)	10,0 (9,1 - 11,3)	8 - 11	8 - 10
b'	4,7 $\pm$ 0,44 (4,03 - 5,14)	4,63 $\pm$ 0,28 (4,20 - 4,95)	-	-	4,2 - 5,4	4,1 - 4,9
c	18,36 $\pm$ 2,62 (14,78 - 21,85)	18,08 $\pm$ 1,93 (15,71 - 20,45)	17 (15 - 19)	17 (16 - 18)	15 - 17	16 - 18
c'	4,17 $\pm$ 0,50 (3,5 - 4,65)	3,99 $\pm$ 0,42 (3,50 - 4,60)	4,6 (4,3 - 5,5)	4,9 (4,1 - 5,4)	3,2 - 4,1	3,9 - 4,2
Stylet (μ m)	17,89 $\pm$ 1,39 (16 - 19,8)	17,39 $\pm$ 0,33 (16,90 - 17,80)	17 (16 - 19)	17 (16 - 18)	17 - 18	16 - 18
V (%)	53,83 $\pm$ 2,24 (50,97 - 56,39)	-	52 (50 - 55)	-	51 - 54	-
Spicule (μ m)	-	20,42 $\pm$ 1,06 (19 - 21,5)	-	23 (18 - 26)	-	20 - 21



Hình 5. Vên sinh môn *Meloidogyne graminicola*.

A, B: Bellé & ctv. (2019); C: Khan & Ahamad (2020); D: mẫu nghiên cứu.

3.2.4. *Meloidogyne graminicola*

Loài *M. graminicola* với các đặc điểm về hình thái học dựa theo mô tả của Chau & Thanh (2000), Perry & ctv. (2009):

Ấu trùng tuổi J2: Cơ thể hình trụ, vòng cutin phân đốt mảnh. Vùng bên với 3 đường và vùng đầu không phân biệt với đường viền cơ thể; vùng môi chitin hóa yếu với 3 vòng cutin tính từ đầu. Kim hút mảnh với đế kim tròn. Vị trí của lỗ bài tiết nằm ngang hoặc ở sau so với vòng thần kinh. Điều giữa hình tròn với van bên trong tâm rất phát triển. Cuối đuôi mút đuôi tròn. Con cái đặc điểm cơ thể hình tròn với cổ ngắn, vỏ cutin trắng đục và phân đốt, môi đẹp và nhẵn. Vên sinh môn được so sánh và đồng nhất với mô tả của Bellé & ctv. (2019), Khan & Ahamad (2020) như sau vên

sinh môn dạng oval, tạo thành các vên tròn, vòm lưng với các đường thô, mấu đuôi thô và vùng đuôi có nhiều đường không thành hàng, vùng bên mờ hoặc không có (Hình 5). Con đực thì chưa tìm thấy trong nghiên cứu này. Loài này được xem là nguyên nhân chính gây mất năng suất đáng kể ở tất cả các hệ sinh thái nông nghiệp trồng lúa ở châu Á (Bellafiore & ctv., 2015), vòng đời của chúng phụ thuộc rất lớn vào giống kháng và giống nhạy cảm dao động từ 21 - 28 ngày (Nguyễn & ctv., 2021). Đặc biệt, trong mô hình ngập khô xen kẽ thì sự hiện diện của chúng trở nên phổ biến hơn (Win & ctv., 2013). Đặc biệt sự lưu tồn trên cây cỏ gấu (*Cyperus rotundus*) và cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli*), dẫn đến sự hiện diện của chúng cần được kiểm soát nguồn nước, giống kháng và cây ký chủ trung gian (Netscher & Erlan, 1993).

3.2.5. *Tylenchorhynchus leviterminalis*

Loài *Tylenchorhynchus leviterminalis* với các đặc điểm về hình thái học dựa theo khóa phân loại chuyên biệt của các loài

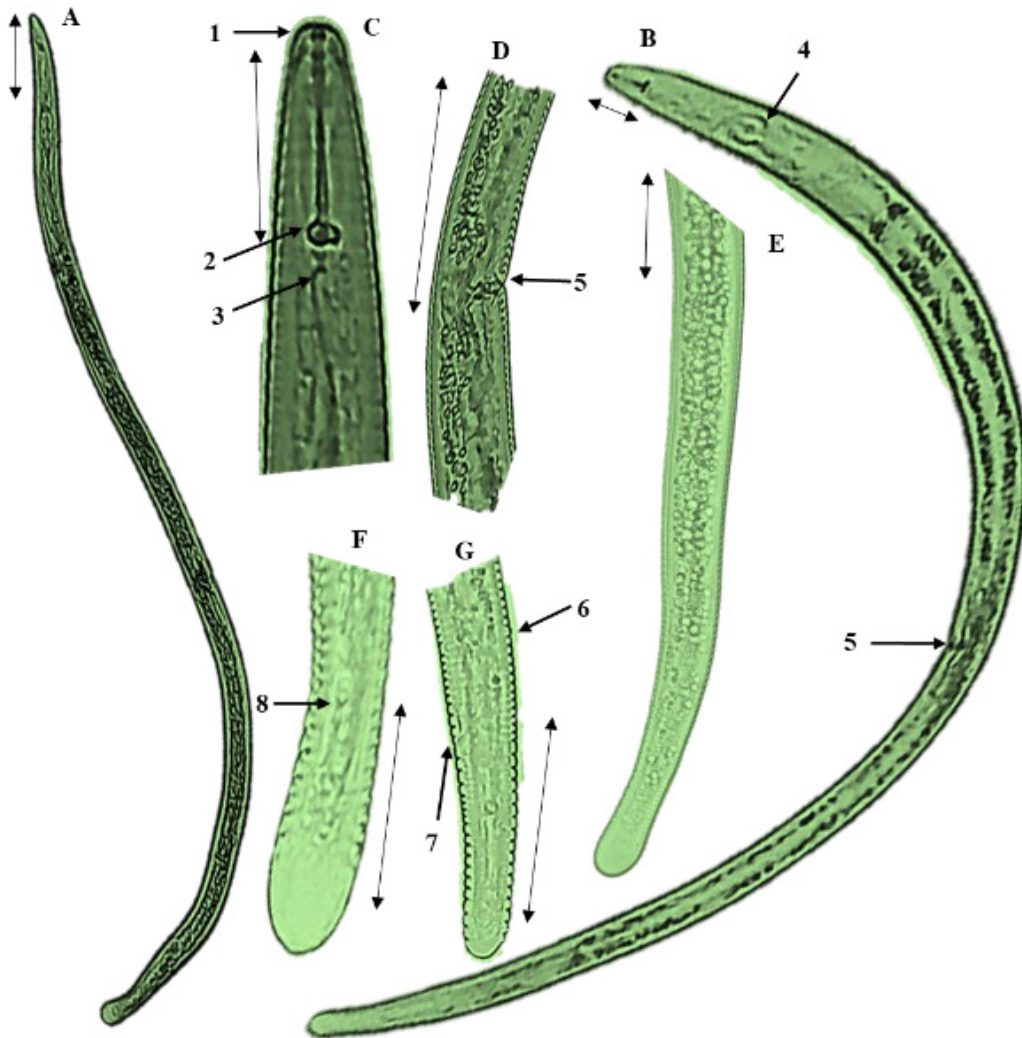
Tylenchorhynchus của Handoo (2000); Chau & Thanh (2000); chỉ số hình thái lượng được so sánh với các nghiên cứu của Siddiqi & ctv. (1982), Talavera & ctv. (2002), và Tram & ctv. (2023) chúng được mô tả như sau:

Bảng 7. Số đo hình thái của quần thể loài *Tylenchorhynchus leviterminalis*

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu	Siddiqi & ctv. (1982)	Talavera & ctv. (2002)	Tram & ctv. (2023)
Số mẫu (n)	5 ♀♀	15 ♀♀	10 ♀♀	15 ♀♀
L (µm)	641,00 ± 35,58 (570 - 710)	650 (540 - 750)	700 ± 30 (600 - 720)	732,5 ± 33 (670 - 760)
a	30,84 ± 1,31 (29,6 - 32,8)	31 (28 - 38)	30,6 ± 2,1 (27,5 - 33,5)	30,2 ± 1,7 (26,9 - 33,8)
b	4,58 ± 0,16 (4,4 - 5,8)	5,4 (5 - 6)	-	5,1 ± 0,2 (4,6 - 5,3)
b'	-	-	5,3 ± 0,2 (5 - 5,5)	-
c	11,48 ± 1,02 (10 - 12,3)	14 (12 - 16)	13 ± 1,2 (11,5 - 14)	12,8 ± 1,1 (11,2 - 15)
c'	3,34 ± 0,36 (2,9 - 3,9)	3,8 (3,0 - 4,5)	3,9 ± 0,3 (3,5 - 4,5)	3,2 ± 0,4 (2,8 - 4,0)
Stylet (µm)	17,82 ± 1,31 (16,4 - 19,6)	18 (17 - 19)	20,5 ± 0,7	19,3 ± 0,8 (18 - 20)
V (%)	59,16 ± 1,83 (56,5 - 61)	54 (52 - 58)	52,9 ± 2,3 (51 - 56,5)	54,0 ± 2,0 (51,1 - 58,5)

Con cái của loài này có cơ thể cong dạng chỉ, cân đối và thuôn dần về hai phía đầu và đuôi. Đầu nhô cao, rõ ràng phân biệt với đường viền của cơ thể, không có sự phân đốt. Phần bên của cơ thể có bốn đường và hai đường lượn sóng kéo dài đến hết đuôi. Kim ký sinh của chúng phát triển bình thường, mảnh và để kim có hình dạng giống như cái chén với hai cạnh cong về phía trước. Điều giữa hình oval hoặc

tròn với van phát triển, eo thực quản mảnh và vòng thần kinh nằm giữa isthmus và thực quản tuyến. Lỗ bài tiết nằm ở giữa thực quản tuyến. Phần thực quản tuyến không che ruột. Hệ sinh dục kép với hai buồng trứng đối xứng nhau được chitin hóa mạnh nhưng không có màng vulva. Túi chứa tinh to, tròn và chứa đầy tinh trùng, thường nằm ở cuối đuôi dạng dùi trống hoặc hình cầu (Hình 6).



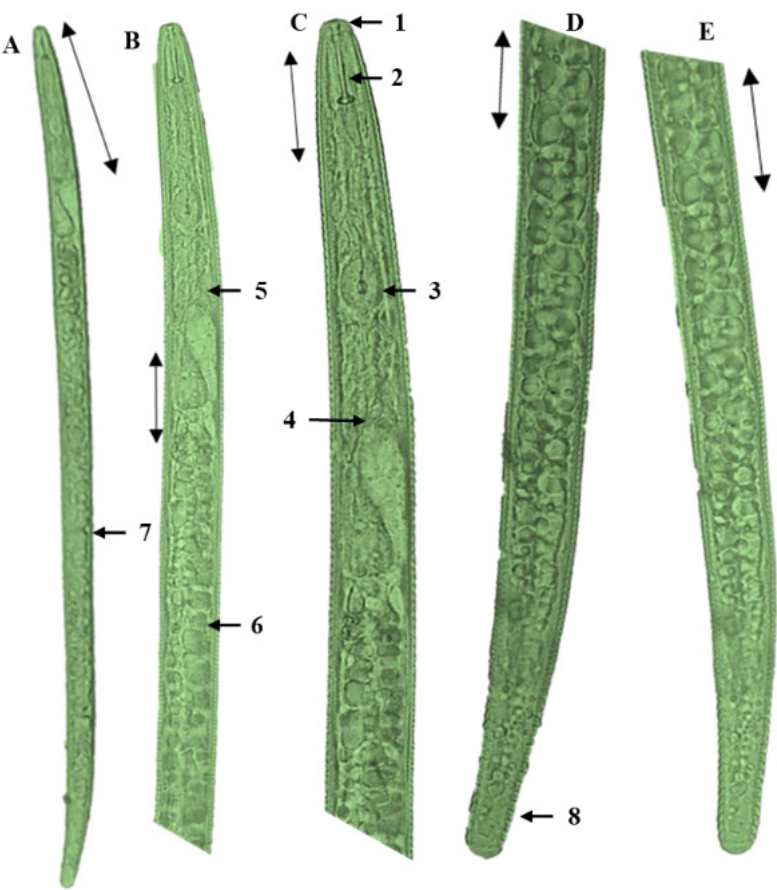
Hình 6. Hình thái con cái của *Tylenchorhynchus leviterminalis*: A, B: Cơ thể con cái; C: Vùng đầu, D: Hệ sinh dục; E - G: Vùng đuôi (1. Vùng môi; 2. Kim hút; 3. DGO, 4. Điều giữa, 5. Âm hộ, 6. Vòng cutin, 7. Hậu môn, 8. Phasmids). Scale: A: 100 μ m; B - E: 25

3.2.6. *Tylenchorhynchus nudus*

Loài *Tylenchorhynchus nudus* với các đặc điểm về hình thái học dựa theo mô tả của Handoo (2000); Chau & Thanh (2000) và chỉ số hình thái lượng được so sánh của chúng được mô tả như sau:

Con cái của loài này có kích thước tương đối lớn, hình dạng hình trụ và cân đối, thuôn hẹp ở phần đầu. Vùng môi dạng hình thang với hai vòng cutin. Kim ký sinh dài, mỏng và cân đối,

để kim tròn mà không vát về phía sau. Điều giữa dạng hình cầu và thực quản tuyến hình quả lê. Lỗ bài tiết nằm ngang phía trước của thực quản tuyến, gần eo thắt thực quản. Hệ sinh dục kép, đối xứng nhau qua âm đạo (vagina), cùng với hai túi chứa tinh hình oval hoặc cầu. Đuôi có dạng hình trụ chóp, tận cùng đuôi nhọn, tròn và rộng, vùng sáng (hyaline) tương đối. Phasmids nằm phía dưới hậu môn, với các lỗ hậu môn được bao quanh bởi 4 đến 6 vòng cutin (Hình 7).



Hình 7. Hình thái con cái của *Tylenchorhynchus nudus*: A. Cơ thể con cái; B, C: Phần đầu; D, E: Phần đuôi (1. Vùng môi, 2. Kim hút, 3. Điều giữa, 4. Van ruột - thực quản, 5. Thực quản tuyến, 6. Buồng trứng, 7. Âm hộ, 8. Đốt cutin); Scale: A: 100 μ m; B - E: 25 μ m.

Bảng 8. Số đo hình thái của quần thể loài *Tylenchorhynchus nudus*

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu	Tram & ctv. (2023)	Allen (1955)
Số mẫu (n)	5 ♀♀	11 ♀♀	2 ♀♀
L (μ m)	825,00 $\pm$ 10,41 (800 - 850)	832,7 $\pm$ 17,9 (810 - 860)	710
a	33,11 $\pm$ 1,30 (30,77 - 35,42)	29,4 $\pm$ 6 (22,1 - 37,3)	30
b	5,92 $\pm$ 0,08 (5,80 - 6,15)	5,7 $\pm$ 0,4 (5 - 6,5)	4,1 - 4,8
c	15,68 $\pm$ 0,24 (15,19 - 16,35)	14,1 $\pm$ 1,6 (12 - 16)	14 - 15
V (%)	56,22 $\pm$ 0,54 (54,88 - 57,50)	53 $\pm$ 2,8 (48,8 - 58,8)	54 - 56
Kim (μ m)	18,88 $\pm$ 0,55 (18,00 - 20,50)	18,2 $\pm$ 0,8 (17,5 - 20)	18 - 19

3.2.7. *Tylenchus* sp.

Dựa trên nghiên cứu của Siddiqi (2000) thì *Tylenchus* có những đặc điểm đáng chú ý sau đây: có cơ thể dạng sợi chỉ, dài từ 0,4 đến 1,3 mm, thường có một sự cong nhẹ về phía bụng khi được cố định. Vùng bên của cơ thể có 4 đường rõ ràng, đặc trưng cho giống này. Kim mảnh và phần conus thường chiếm hơn 1/3 chiều dài của kim, với đế kim có hình tròn hoặc hơi vát xuống. Điều giữa dạng oval, điều sau có hình dạng như quả lê, cardia rõ ràng và dễ nhận biết. Lỗ bài tiết nằm ngang với vị trí của điều sau, còn vulva nằm ở khoảng 60-70% chiều dài cơ thể. Đuôi dài và nhọn, Con đực có gai sinh dục nhọn, được mô tả có trợ gai đơn giản và cánh màng đuôi chỉ bao phủ vùng lỗ huyết của chúng.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã định danh được 4 giống tuyến trùng hiện diện trong rễ và vùng đất quanh rễ lúa thuộc 4 họ (Pratylenchidae, Meloidogynidae, Telotylenchidae và Tylenchidae) bao gồm giống *Hirschmanniella*, *Meloidogyne*, *Tylenchorhynchus* và *Tylenchus*. Đặc biệt, giống *Hirschmanniella* hiện diện rất phổ biến (100%) với mật độ cao trong cả mẫu đất (262 ± 66 cá thể/250 g) và mẫu rễ (516 ± 73 cá thể/5 g) trong nền đất lúa ngập nước tại tỉnh Sóc Trăng, điều này cho thấy cần có biện pháp theo dõi và xây dựng biện pháp phòng trừ cần thiết nhằm ngăn ngừa mật số của chúng gia tăng quá mức.

Định danh bằng đặc điểm hình thái học và chỉ số hình thái lượng đã xác định được 7 loài bao gồm *Meloidogyne graminicola*, *Hirschmanniella diversa*, *H. mucronata*, *H. oryzae*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *T. nudus* và *Tylenchus* spp. Qua đó, cho thấy thành phần tuyến trùng trên lúa tại tỉnh Sóc Trăng có sự kém đa dạng.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo này được thực hiện bởi nhóm tác giả và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài liệu tham khảo (References)

- AGROINFO (The Center for Agricultural and Rural Development Information). (2022). Rice report 2022. Retrieved April 5, 2022, from <https://agro.gov.vn/images/files/Bao%20cao%20thuong%20nien%20lua%20gao%202022.pdf>.
- Allen, M. W. (1955). A review of the nematode genus *Tylenchorhynchus*. *University of California Publications in Zoology* 61, 129-166.
- Beesa, N., Sasnarukkit, A., Jindapunnapat, K., Chinnasri, B., & Chairin, T. (2021a). Incidence and characterization of rice root nematodes, *Hirschmanniella mucronata*, from rice fields in Pathum Thani province, Thailand. *Trends in Sciences* 18(22), 486-486. <https://doi.org/10.48048/tis.2021.486>.
- Beesa, N., Sasnarukkit, A., Jindapunnapat, K., Tivet, F., Bellafore, S., & Chinnasri, B. (2021b). Species characterization and population dynamics of *Hirschmanniella mucronata* in lowland rice fields managed under conservation agriculture in Cambodia. *Journal of The Saudi Society of Agricultural Sciences* 20(3), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.12.009>.
- Bellafore, S., Jougla, C., Chapuis, E., Besnard, G., Suong, M., Vu, P. N., De Waele, D., Gantet, P., & Thi, X. N. (2015). Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies* 338(7), 471-483. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2015.04.002>.
- Bellé, C., Balardin, R. R., Nora, D. D., Schmitt, J., Gabriel, M., Ramos, R. F., & Antonioli, Z. I. (2019). First report of *Meloidogyne graminicola* (Nematoda: Meloidogynidae) on barley

- (*Hordeum vulgare*) in Brazil. *Plant Disease* 103(5), 1045-1045. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2010-PDN>.
- Bridge, J., Plowright, R. A., & Peng DeLiang, P. D. (2005). Nematode parasites of rice. In Luc, M., Sikora, R. A., & Bridge, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (87-130). Wallingford, UK: Cabi International.
- Chau N. N. (2003). *Plant nematodes and prevention facilities*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technology Publishing House.
- Chau, N. N. & Thanh, N. V. (2000). *Fauna of Vietnam, plant-parasitic nematodes*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technology Publishing House.
- Chen, D. Y., Ni, H. F., Yen, J. H., Chen, R. S., & Tsay, T. T. (2006). Distribution of rice root nematode *Hirschmanniella oryzae* and a new recorded *H. mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 15, 197-210.
- Cuc, N. T. (1982). New weed host of rice stem nematode identified in Vietnam. *International Rice Research Newsletter* 7(3), 15.
- Cuc, N. T. T., & Prot, J. C. (1992). Root-parasitic nematodes of deep-water rice in the Mekong Delta of Vietnam. *Fundamental and Applied Nematology* 15(6), 575-577.
- De Waele, D., & Elsen, A. (2007). Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology* 45(1), 45-485. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094438>.
- Eroshenko, A. S., Nguyen, N., Nguyen, V. T., & Doan, K. (1985). *Parasitic plant nematodes of North Vietnam*. Retrieved March 20, 2025, from https://books.google.com.vn/books/about/Paraziticheskie_fitonematody_severno%20C4%AD_c.html?id=dFdaAAAAIAAJ&redir_esc=y.
- Fortuner, R., & Merny, G. (1979). Root-parasitic nematodes of rice. *Revue de Nématologie* 2(1), 79-102.
- Handoo, Z. A. (2000). A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Tylenchorhynchus* Cobb, 1913 (Nematoda: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* 32(1), 20.
- Hollis, J. J., & Keoboonrueng, S. (1984). Nematode parasites of rice. In Luc, M., Sikora, R. A., & Bridge, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (69-108). Wallingford, UK: CAB International.
- Hooper, D. J. (1986). Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In Southey, J. F. (Ed.). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (39-54). London, UK: Stationery Office.
- Jain, R. K., Khan, M. R., & Kumar, V. (2012). Rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) infestation in rice. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(6), 635-645. <https://doi.org/10.1080/03235408.2011.588059>.
- Khan, M. R., & Ahamad, F. (2020). Incidence of root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) and resulting crop losses in paddy rice in northern India. *Plant Disease* 104(1), 186-193. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2154-RE>.
- Khun, K., Decraemer W., Couvreur, M., H., Karssen, G., Steel, G., & Bert, W. (2015). Deceptive morphological variation in *Hirschmanniella mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) and a polytomous key to the genus. *Nematology* 17, 377-400. <http://hdl.handle.net/1854/LU-6902128>.
- Khuong, N. B. (1987). *Hirschmanniella* spp. in rice fields of Vietnam. *Journal of Nematology* 19(1), 82.
- Luc, M. (1987). A reappraisal of *Tylenchina* (Nemata) in the family Pratylenchidae Thorne, 1949. *Revue de Nématologie* 10(2), 203-218.
- Mantelin, S., Bellafiore, S., & Kyndt, T. (2017). *Meloidogyne graminicola*: A major threat to rice agriculture. *Molecular Plant Pathology* 18(1), 3-15. <https://doi.org/10.1111/mpp.12394>.

- Netscher, C., & Erlan, E. (1993). A root-knot nematode, *Meloidogyne* cf *graminicola*, parasitic on rice in Indonesia. *Afro-Asian Journal of Nematology* 3(1), 90-95 <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.33243>.
- Nguyen, P. V. Nguyen, Tran, T. B., Nguyen, P. T., Nguyen, L., Nguyen, N.T., Bien, L.T., Ton, L. B., Le, T. T. H., Ton, A. T., Nguyen, Q. B., Huynh, B. V., Le, D. D., & Bellafore S. (2021). The response of rice varieties to *Meloidogyne graminicola* from the Mekong Delta, Vietnam. *Nematology* 23(10), 1153-1170. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.33243>.
- Nguyen, T. H., Masson, A. S., Moulin, L., Trinh, Q. P., Ha, V. C., & Bellafore, VC. (2020a). Root knot nematode infections promoted by agricultural practice modifications in Vietnam and the impacts on rice production. *Academia Journal of Biology* 42(3), 15036. <https://doi.org/10.15625/2615-9023/v42n3.15036>.
- Nguyen, V. S., Nguyen, P. T. K., Araki, M., Perry, R. N., Tran, L. B., Chau, K. M., Min, Y. Y., & Toyota, K. (2020b). Effects of cropping systems and soil amendments on nematode community and its relationship with soil physicochemical properties in a paddy rice field in the Vietnamese Mekong Delta. *Applied Soil Ecology* 156, 103683. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103683>.
- Nguyen, V. S., Nguyen, P. T. K., Araki, M., Perry, R. N., Tran, L. B., Chau, K. M., Min, Y. Y., & Toyota, K. (2020c). Seasonal variation and vertical distribution of nematode communities and their relation to soil chemical property and rice productivity under triple rice cultivation in the Mekong Delta, Vietnam. *Nematology* 23(1), 33-46. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10028>.
- Norton, D. C. (1978). *Ecology of plant-parasitic nematodes*. New York, USA: John Wiley & Sons Publishers.
- Pascual, M. L. D., Decraemer, W., De Ley, I. T., Vierstraete, A., Steel, H., & Bert, W. (2014). Prevalence and characterization of plant-parasitic nematodes in lowland and upland rice agro-ecosystems in Luzon, Philippines. *Nematropica* 44(2), 166-180.
- Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (2009). *Root-knot nematodes*. Wallingford, UK: CAB International.
- Seinhorst, J. W. (1966). Killing nematodes for taxonomic study with hot fa 4 : 1. *Nematologica* 12(1), 178-178a.
- Sher, S.A. (1968). Revision of the genus *Hirschmanniella* Luc & Goodey, 1963 (Nematoda: Tylenchoidea). *Nematologica* 14, 243-275.
- Shrestha, R., Uzzo, F., Wilson, M. J., & Price, A. H. (2007). Physiological and genetic mapping study of tolerance to root-knot nematode in rice. *New Phytologist* 176(3), 665-672. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02185.x>.
- Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: parasites of plants and insects* (2nd ed.). Wallingford, UK: CAB International.
- Southey, J. F. (1986). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London, UK: Her Majesty's Stationary Office.
- Takagi, M., Goto, M., Wari, D., Kashima, T., & Toyota, K. (2019). Seasonal occurrence and life cycle of lotus root nematode *Hirschmanniella diversa* (Tylenchida: Pratylenchidae) in lotus roots in paddy fields. *Applied Entomology and Zoology* 54, 465-471. <https://doi.org/10.1007/s13355-019-00644-y>.
- Takagi, M., Sekimoto, S., Mizukubo, T., Wari, D., Akiba, M., Perry, R. N., & Toyota, K. (2022). Geographical distribution and phylogenetic relationships of *Hirschmanniella diversa* Sher (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan. *Nematology* 25(1), 45-58. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10202>.
- Talavera, M., Watanabe, T., & Mizukubo, T. (2002). Description of *Tylenchorhynchus shimizui* n. sp. from Paraguay and notes on *T. leviterminalis* Siddiqi, Mukherjee

- & Dasgupta from Japan (Nematoda: Tylenchida: Telotylenchidae). *Systematic Parasitology* 51(3), 171-177. <https://doi.org/10.1023/A:1014550816738>.
- Tandingan, I. C., Prot, J. C., & Davide, R. G. (1996). Influence of water management on tolerance of rice cultivars for *Meloidogyne graminicola*. *Fundamental and Applied Nematology* 19(2), 189-192. <https://www.ukdr.uplb.edu.ph/journal-articles/3539>.
- Tram, T. T. T., Huy, N. G., & Phen, T. V. (2023). Survey on the population and composition of plant-parasitic nematodes parasitic on sugarcane in Phung Hiep district, Hau Giang province. *Journal of Plant Protection* 4, 36-45. <https://doi.org/10.31817/vjas.2024.7.1.02>.
- Win, P. P., Kyi, P. P., Maung, Z. T. Z., & De Waele, D. (2013). Population dynamics of *Meloidogyne graminicola* and *Hirschmanniella oryzae* in a double rice-cropping sequence in the lowlands of Myanmar. *Nematology* 15(7), 795-807. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002719>.
- Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G., Freckman, D. W., & Georgieva, S. S. (1993). Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25(3), 315-331.

Presence and genetic diversity of *Mycoplasma suis* group related to reproductive disorders in breeding pigs

Phat T. Tran¹, Luan M. Nguyen¹, Ngoc T. H. Nguyen¹, Linh N. M. Tran¹,
Tram T. N. Ngo¹, Phu H. Doan^{1,2}, Nam M. Nguyen³, & Duy T. Do^{1*}

¹Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University - Gia Lai Campus, Gia Lai, Vietnam

³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: January 02, 2025

Revised: February 06, 2025

Accepted: February 18, 2025

Keywords

16S rRNA

M. suis group

Porcine *Haemoplasma*

Reproductive disorders

Sows

*Corresponding author

Do Tien Duy

Email:

duy.dotien@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Porcine *Haemoplasma* (PH) is a group of bacteria that parasitize the surface of erythrocytes and cause infectious anemia in pigs of all ages and reproductive disorders in sows, in which *Mycoplasma suis* (*M. suis*) plays a major role. This study aimed to survey the presence and genetic diversity of *M. suis* group in farms with clinical reproductive disorders in sows. A total of 150 samples, including blood samples from sows with reproductive disorders and their fetuses/weak-born piglets were collected from 10 pig farms in 6 provinces in Vietnam. The presence of *M. suis* group was determined by PCR and the 16S rRNA gene was amplified and sequenced to analyze the genetic diversity of the pathogen. The DNA of *M. suis* group was identified in 137/150 (91.33%) of sow samples with reproductive disorders. Fourteen strains of *M. suis* group were successfully sequenced based on the 16S rRNA gene. The sequences showed a high percentage of genetic similarity, with 93.72% to 100% identity to *M. suis* and 97.1 to 100% to *M. parvum*. Through phylogenetic analysis, the sequences were identified as belonging to *M. suis* group that there were at least 4 nucleotide types. In conclusion, *M. suis* group is present at a high rate in pig breeding farms in Vietnam. This is the first report about the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *M. suis* group in Vietnam.

Cited as: Tran, P. T., Nguyen, L. M., Nguyen, N. T. H., Tran, L. N. M., Ngo, T. T. N., Doan, P. H., Nguyen, N. M., & Do, D. T. (2025). Presence and genetic diversity of *Mycoplasma suis* group related to reproductive disorders in breeding pigs. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 40-53.

Sự hiện diện và đa dạng di truyền của *Mycoplasma suis* group gây rối loạn sinh sản trên heo giống

Trần Tấn Phát¹, Nguyễn Minh Luân¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹, Trần Ngọc Mỹ Linh¹,
Ngô Thị Ngọc Trâm¹, Đoàn Hoàng Phú^{1,2}, Nguyễn Minh Nam³ & Đỗ Tiến Duy^{*}

¹Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Phân Hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM tại Gia Lai, Gia Lai

³Bộ Môn Kỹ Thuật Y Sinh, Khoa Y, Trường Đại học Khoa Học Sức Khỏe, Đại học Quốc Gia, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 02/01/2025

Ngày chỉnh sửa: 06/02/2025

Ngày chấp nhận: 18/02/2025

Từ khóa

16S rRNA

Heo nái

M. suis group

Porcine *Haemoplasma*

Rối loạn sinh sản

*Tác giả liên hệ

Đỗ Tiến Duy

Email:

duy.dotien@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Porcine *Haemoplasma* (PH) là nhóm vi khuẩn kí sinh trên tế bào hồng cầu gây tình trạng thiếu máu truyền nhiễm ở heo mọi lứa tuổi và rối loạn sinh sản trên heo nái, trong đó *Mycoplasma suis* (*M. suis*) là tác nhân chủ yếu. Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát sự hiện diện và phân tích đa dạng di truyền của *M. suis* tại các trang trại xuất hiện lâm sàng rối loạn sinh sản trên heo nái. Tổng cộng 150 mẫu bao gồm máu heo nái rối loạn sinh sản và mô thai/ heo con yếu của chúng đã được thu thập từ 10 trại heo công nghiệp trên 6 tỉnh thành tại Việt Nam. Xác định sự hiện diện của *M. suis* group bằng phương pháp PCR và gen 16S rRNA được chọn để khuếch đại và giải trình tự nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của *M. suis*. *M. suis* group đã được phát hiện trong 137/150 (91,33%) mẫu heo nái rối loạn sinh sản. Giải trình tự thành công 14 chủng dựa vào đoạn gen 16S rRNA *M. suis* group, các trình tự có độ tương đồng cao (93,72% - 100%) với *M. suis* và (97,1 - 100%) với *M. parvum*. Qua phân tích phát sinh loài, các trình tự được xác định thuộc nhóm *M. suis* group. Phân tích đa dạng di truyền cho thấy có ít nhất 4 kiểu nucleotide (ntST) của *M. suis* group. *M. suis* group hiện diện với tỉ lệ cao tại các trại heo giống ở Việt Nam. Lần đầu tiên, đặc trưng gen 16S rRNA của *M. suis* group được báo cáo tại Việt Nam.

1. Đặt Vấn Đề

Haemoplasma thuộc họ *Mycoplasmataceae* (Neimark & ctv., 2001; 2002). Hiện nay có ba loài lưu hành trong quần thể heo được xác định gồm có *M. suis*, *M. parvum*, *Candidatus Mycoplasma heamosuis* (*Ca. M. heamosuis*) và một loài mới được phát hiện tại Thái Lan (Fu & ctv., 2017; Seo & ctv., 2019; Thongmeesee & ctv., 2022). Trong đó, *M. suis* là tác nhân gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở heo (Infectious anemia in pig - IAP) với các biểu hiện lâm sàng đa dạng từ cấp tính như sốt cao, vàng da, da nhợt nhạt và có thể gây tử vong, đến dạng mãn tính gây suy dinh dưỡng, giảm khả năng sinh sản và rối loạn tiết sữa (Ade & ctv., 2024). *Ca. M. heamosuis* cũng được xác định là gây thiếu máu truyền nhiễm tương tự *M. suis*, nhưng tác động của chúng trên quần thể heo vẫn chưa rõ ràng (Fu & ctv., 2017; Stadler & ctv., 2019; Ade & ctv., 2022). Đối với *M. parvum*, các nghiên cứu trước đây xác định sự nhiễm trùng không gây thiếu máu nghiêm trọng và không gây hại đáng kể cho heo (Jansen, 1952; Do Nascimento & ctv., 2014; Ade & ctv., 2024).

Cho đến hiện tại đã có bộ gen hoàn chỉnh của *M. suis* chủng Illinois (Guimaraes & ctv., 2011) Bộ gen của cả hai loài chứa một lượng lớn các trình tự mã hóa chưa biết chức năng, khi so sánh chủng *M. suis* KI3806 và chủng *M. parvum* Indiana, cả hai đều có sự tương đồng tất cả các CDS với chức năng đã biết (Do Nascimento & ctv., 2014). Từ phân tích phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rRNA cho thấy *M. suis*,

M. parvum và loài mới tại Thái Lan cùng nằm chung một nhóm, đó là *M. suis*/*Haemominutum*, trong khi *Ca. M. heamosuis* nằm ở một nhóm khác là *M. haemofelis/haemofelis* (Thongmeesee & ctv., 2022)

Tại Việt Nam, thông tin khoa học về *M. suis* còn rất hạn chế trong khi tỷ lệ hiện diện của vi khuẩn này trong các đàn heo công nghiệp rất cao, theo các dữ liệu xét nghiệm của các phòng xét nghiệm trong nước (dữ liệu không xuất bản). Chính vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện và phân tích di truyền của *M. suis* tại các trang trại xuất hiện heo nái rối loạn sinh sản.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Thu thập và xử lý mẫu

Tổng cộng 150 mẫu bệnh phẩm được thu thập tại 10 trại heo giống có lâm sàng rối loạn sinh sản ở 6 tỉnh thành (Bình Thuận, Bình Phước, Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Dương, Đồng Nai và Thanh Hóa) (Bảng 1). Mẫu thu thập gồm 84 mẫu máu heo nái và mẫu mô cơ quan nội tạng (tim, gan, lách, phổi, thận, hạch) của 12 thai khô, 42 thai chết lưu, 12 heo con yếu. Mẫu máu được thu thập ở tĩnh mạch tai và kháng đông bằng EDTA; sau đó bảo quản ở -8°C cùng với mẫu mô cơ quan và tiến hành vận chuyển về phòng xét nghiệm trong 24 giờ. Mẫu mô tươi được xử lý với dung dịch PBS 1X tạo thành huyền dịch 10% và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Bảng 1. Số lượng mẫu thu thập ở các trại khảo sát

STT	Trại	Máu nai	Thai khô	Thai lưu	Heo con yếu	Tổng mẫu
1	A	7	8	5	0	20
2	B	5	0	2	0	7
3	C	3	0	1	0	4
4	D	8	2	0	0	10
5	E	3	1	2	0	6
6	F	28	0	13	7	48
7	G	17	0	7	5	29
8	H	2	0	2	0	4
9	I	4	0	4	0	8
10	K	7	1	6	0	14

*Ca bệnh là trường hợp heo nai có biểu hiện lâm sàng và được thu mẫu máu và thai sảy hoặc heo con yếu của chúng.

2.2. PCR phát hiện sự hiện diện của *M. suis*

Các mẫu sau khi thu thập về sẽ được tách chiết DNA bằng bộ kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ), thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó tiến hành xác định sự hiện diện của *M. suis* bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi trong nghiên cứu trước đó (Hoelzle & ctv., 2003): 5' GCATTGCCCAGTCCCCAAGGA 3', mồi ngược: 5' TGCGGGGAGTACGTGGGAAGG 3'. Thành phần phản ứng bao gồm: 10 µL SensiFAST™ Probe No-ROX (Bioline, Anh); 0,8 µL/ mỗi mồi (nồng độ cuối là 10 µM); 2 µL DNA mẫu và thêm nước nuclease-free để được thể tích cuối cùng là 20 µL. Chu trình luân nhiệt: 1 chu kỳ 94°C, 2 phút; 35 chu kỳ 94°C, 40 giây; 61°C, 40 giây và 72°C, 40 giây; 1 chu kỳ 72°C, 7 phút. Sản phẩm sau khi PCR có kích thước 782 bp được điện di trên gel Agarose 1,5% và đọc kết quả dưới đèn UV.

2.3. PCR khuếch đại, giải trình tự và phân tích phát sinh loài

Các mẫu dương tính với *M. suis* khi kiểm tra bằng phương pháp PCR sẽ được sử dụng để khuếch

đại gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR. Cặp mồi sử dụng được tham khảo từ nghiên cứu trước đây (Thongmeesee & ctv., 2022) gồm mồi xuôi HM_16SF1: 5' GAACAGCCGCAATGGGATTGAG 3' và mồi ngược HM_16SR1: 5' GACCTGGGAACGTATTCACCCTG 3'. Tổng thể tích phản ứng là 25µL, bao gồm: 12,5 µL SensiFAST™ Probe No-ROX (Bioline, Anh); 0,75 µL/mỗi mồi (nồng độ cuối là 10 µM); 2 µL DNA mẫu và thêm nước nuclease-free. Chu trình luân nhiệt: 1 chu kỳ 94°C, 2 phút; 40 chu kỳ 98°C, 10 giây; 60°C, 30 giây và 68°C, 45 giây; 1 chu kỳ 68°C, 10 phút. Sản phẩm khuếch đại có kích thước ~1000 bp được điện di trên gel Agarose 1,5% và đọc kết quả dưới đèn UV. Sản phẩm PCR, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit ExoSAP-IT® Express (Applied Biosystems®, Foster City, CA, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và gửi đến công ty Macrogen để giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Macrogen, Hàn Quốc).

Các trình tự gen được xử lý, căn chỉnh bằng phần mềm MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) (Tamura & ctv., 2021). Tất cả các trình tự tham chiếu của *Haemoplasma* được

thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Độ tương đồng giữa các trình tự trong nghiên cứu được thực hiện đánh giá bằng BLASTn (Nucleotide BLAST) có trong (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và công cụ Pairwise distance trên phần mềm MEGA11. So sánh và xây dựng cây phát sinh loài sử dụng phương pháp Neighbor-Joining, mô hình Tamura 3-parameter, giá trị bootstrap lặp lại 1000 lần. Sự đa dạng của các kiểu trình tự nucleotide (ntST) được phân tích bằng phần mềm DnaSP6 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Rozas & ctv., 2017). Mạng lưới ntST được xây dựng bằng phương pháp Median Joining Network trên phần mềm PopART 1.7 (<https://popart.maths.otago.ac.nz/>) (Leigh & Bryant, 2015).

2.4. Phân tích thống kê

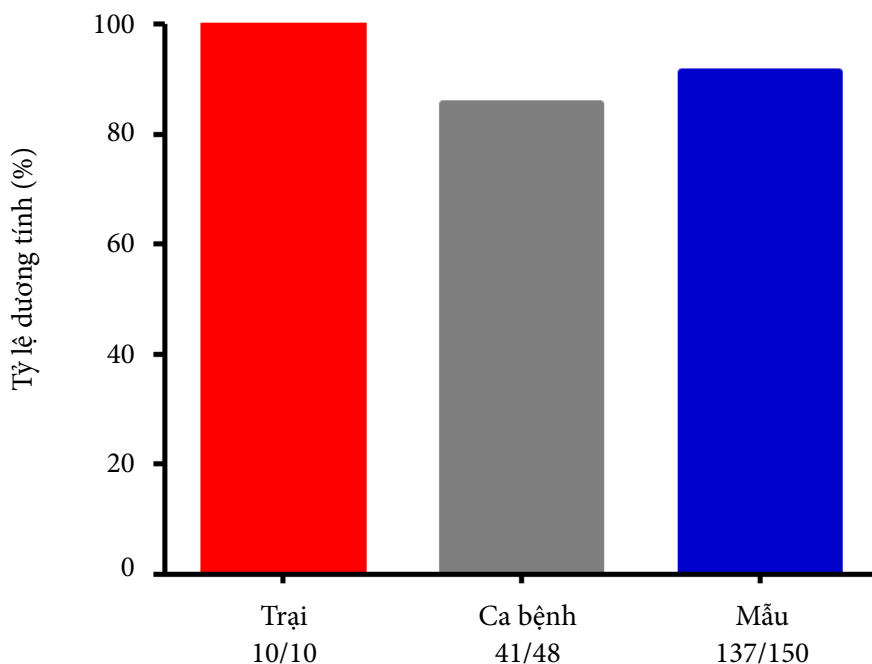
Dữ liệu của nghiên cứu này được lưu trữ và phân tích trên Excel 2021 (Microsoft Office, Washington, USA). Trại được xác định là dương

tính khi có ít nhất 1 ca bệnh dương tính được xác định khi có cả mẫu trên heo nái và mẫu mô thai hoặc heo con yếu của chúng dương tính. Tỷ lệ nhiễm theo mẫu, ca bệnh với khoảng tin cậy 95% (CI 95%) cùng kiểm định Fisher's exact test để kiểm chứng sự khác biệt của tỷ lệ nhiễm giữa các loại mẫu, với mức ý nghĩa thống kê được xác định là $P < 0,05$ được thực hiện bởi phần mềm Minitab 17.

3. Kết Quả

3.1. Sự hiện diện của *M. suis* group ở các trại heo giống

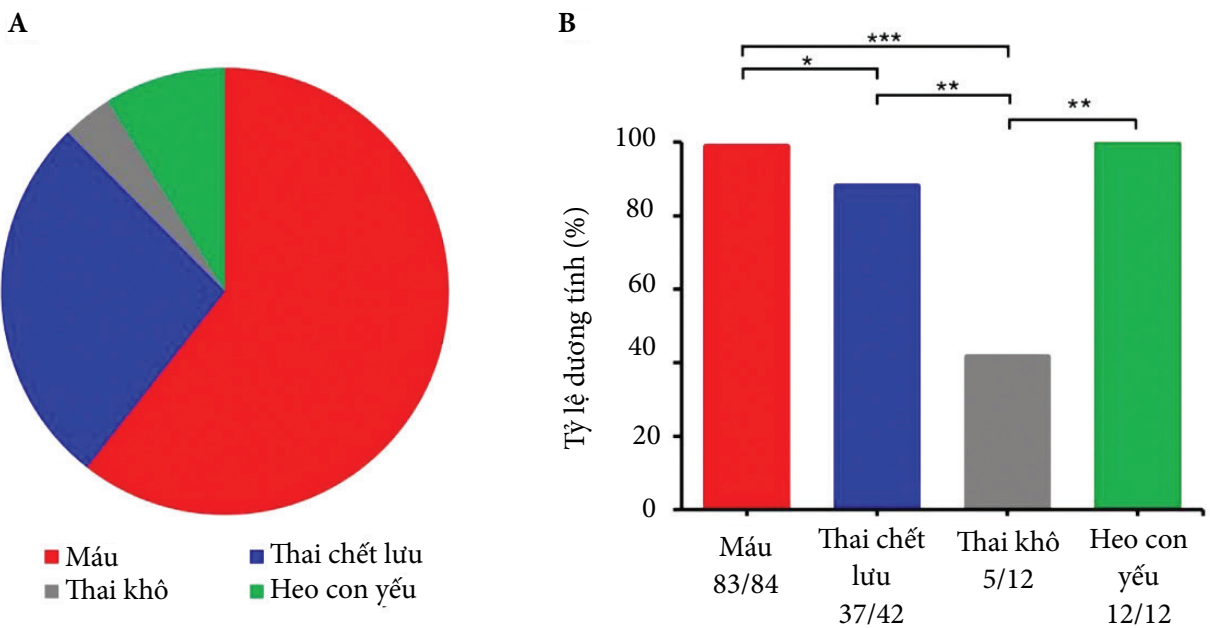
Tất cả 10/10 trại (100%) heo giống thu thập đều phát hiện mẫu dương tính với *M. suis* group. Theo ca bệnh, tỷ lệ dương tính *M. suis* group là 41/48 ca (85,42%, CI 72,24% - 93,93%) và 137/150 (91,33%, CI 85,64% - 95,30%) dương tính theo mẫu (Hình 1).



Hình 1. Tỷ lệ phát hiện mầm bệnh ở mức trại, ca bệnh và mẫu.

Trong tổng số 137 mẫu dương tính, mẫu máu chiếm 55,33% (83/150) và còn lại là các mẫu mô cơ quan thai và heo con yếu, trong đó thai chết lưu chiếm 24,66% (37/150) (Hình 2A). Tỷ lệ dương tính *M. suis* group trên các loại mẫu thu thập dao động từ 41,67 - 100%, bao gồm 98,81% (83/84) ở mẫu máu toàn phần heo nái, 88,7% (37/42) ở mẫu thai chết lưu, 41,67% (5/12) trên

mẫu thai khô và 100% (12/12) ở mẫu heo con yếu. Mẫu máu toàn phần có tỷ lệ phát hiện *M. suis* group cao hơn mẫu thai chết lưu và thai khô ($P < 0,05$) và tỷ lệ dương tính ở mẫu thai chết lưu cao hơn mẫu thai khô ($P < 0,05$). Mặc dù, tỷ lệ dương tính 100% nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$) giữa mẫu mô heo con yếu, máu toàn phần và mẫu thai lưu (Hình 2B).



Hình 2. Sự phân bố của các loại mẫu thu thập. (A) Mẫu dương tính với *M. suis* group; (B) Tỷ lệ dương tính với *M. suis* group theo các loại mẫu được thu thập. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.2. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của PH

Mười bốn chủng *M. suis* trong nghiên cứu được giải trình tự và phân tích đặc trưng cùng với ba bộ gen hoàn chỉnh của các chủng được thu thập từ GenBank gồm *Mycoplasma suis* Illinois (CP002525), *Mycoplasma suis* KI3806 (FQ790233) và *Mycoplasma parvum* Indiana

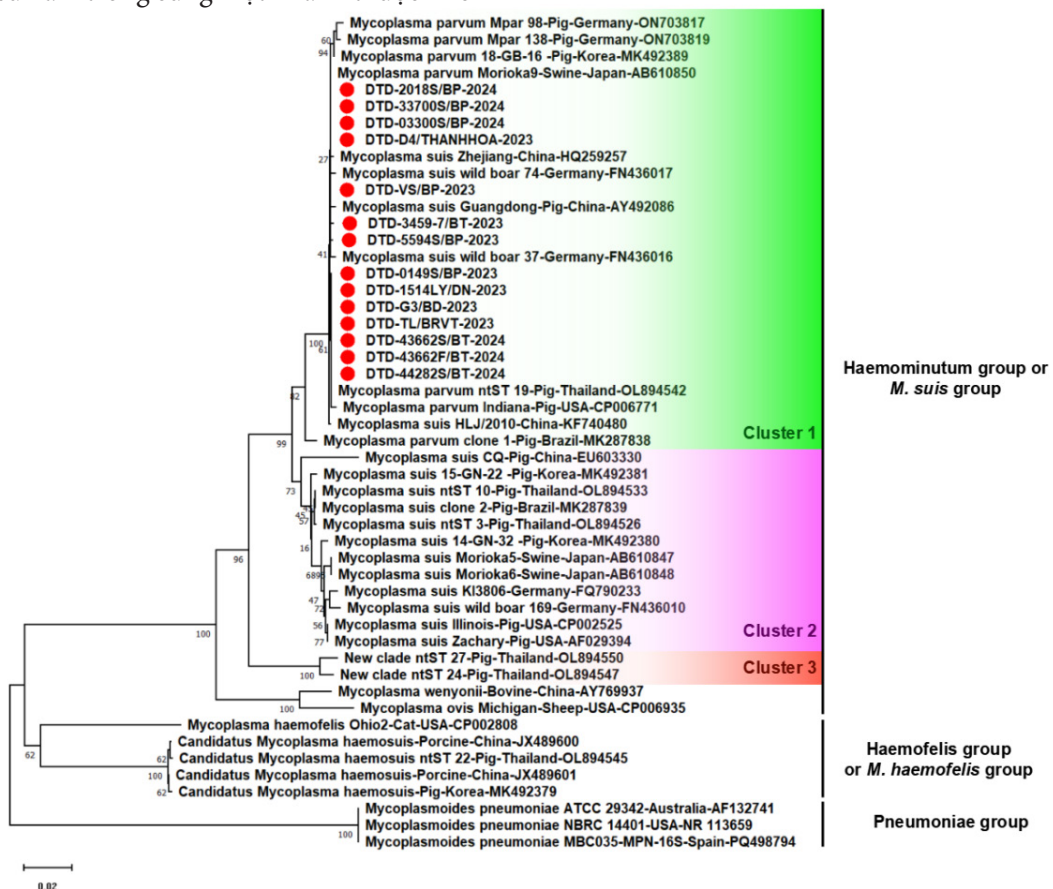
(CP006771). Sự tương đồng giữa chủng nghiên cứu với *Mycoplasma suis* Illinois từ 96,77% đến 96,88%, với *Mycoplasma suis* KI3806 từ 96,35% đến 96,56% và với *Mycoplasma parvum* Indiana từ 99,58% đến 99,79%. Ngoài ra, trình tự các mẫu trong nghiên cứu cũng được so sánh với trình tự tham chiếu của một số quốc gia trên toàn thế giới được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Sự tương đồng (%) so sánh giữa các chủng nghiên cứu với các chủng tham khảo

Nguồn gốc	<i>M. suis</i>	<i>M. parvum</i>	<i>Ca. M. haemosuis</i>
Thái Lan	96,57 - 97,45	97,88 - 100	81,03 - 81,44
Trung Quốc	95,04 - 99,90	99,90 - 100	81,30 - 81,57
Hàn Quốc	96,15 - 97,41	97,10 - 100	81,29 - 81,43
Đức	93,72 - 100	99,05 - 99,79	-
Mỹ	96,79 - 96,90	99,58 - 99,79	-
Nhật Bản	96,57 - 96,79%	99,90 - 100	-
Brazil	97,34 - 97,45	98,31 - 100	-

Cây phát sinh loài dựa vào trình tự một phần gen 16S rRNA của *Haemoplasma* được chia làm hai nhóm chính gồm *Haemominutum* hoặc *M. suis* group và *Haemofelis* hoặc *M. haemofelis*. Xác định mười bốn trình tự của chủng trong nghiên cứu đều nằm trong cùng một nhánh thuộc nhóm

Haemominutum (*M. suis* group), giống với các trình tự *Mycoplasma suis* được phân lập ở Đức, Trung Quốc và *Mycoplasma parvum* ở Đức, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Mỹ và Brazil, được trình bày cụ thể ở Hình 3.



Hình 3. Cây phát sinh loài của *Haemoplasma* được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA bằng phần mềm MEGA11, sử dụng phương pháp Neighbor-Joining, mô hình Tamura 3-parameter và giá trị bootstrap lặp lại 1000 lần.

Sau khi phân tích chúng tôi đã phát hiện ra 4 ntST khác nhau từ mười bốn chuỗi gen (chủng *M. suis* nghiên cứu; Bảng 2) với chỉ số khác biệt nucleotide (π) là $0,00086 \pm 0,00018$ và số lượng

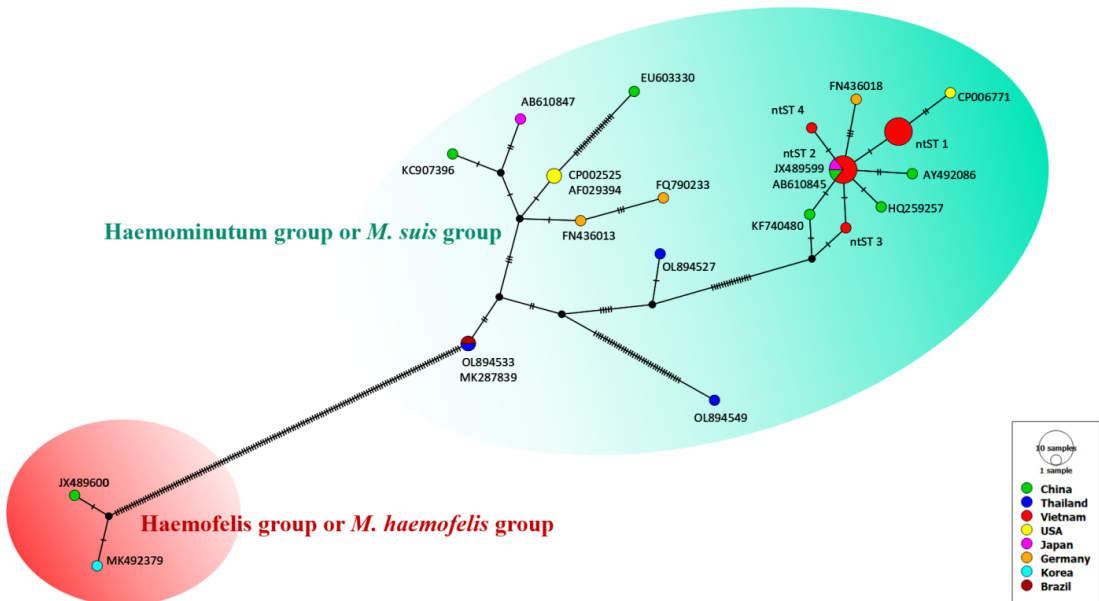
nucleotide khác biệt trung bình (k) là 0,824. Phổ biến nhất là ntST 1 với tỷ lệ là 50% tổng số lượng mẫu trong nghiên cứu này (Bảng 3).

Bảng 3. Các loại ntST của đoạn gen 16S rRNA trong nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm DnaSP6

ntST	Mẫu	Đối tượng	Loại mẫu	Vùng (tỉnh)
1	DTD-0149S/BP-2023	Heo	Máu	Bình Phước
	DTD-1514LY/DN-2023	Heo	Máu	Đồng Nai
	DTD-43662S/BT-2024	Heo	Máu	Bình Thuận
	DTD-43662F/BT-2024	Heo	Thai	Bình Thuận
	DTD-G3/BD-2023	Heo	Máu	Bình Dương
	DTD-TL/BRVT-2023	Heo	Máu	Bà Rịa-Vũng Tàu
	DTD-44282S/BT-2024	Heo	Máu	Bình Thuận
2	DTD-VS/BP-2023	Heo	Máu	Bình Phước
	DTD-D4/Thanhhoa-2023	Heo	Máu	Thanh Hóa
	DTD-03300S/BP-2024	Heo	Máu	Bình Phước
	DTD-33700S/BP-2024	Heo	Máu	Bình Phước
	DTD-2018S/BP-2024	Heo	Máu	Bình Phước
3	DTD-3459-7/BT-2023	Heo	Máu	Bình Thuận
4	DTD-5594S/BP-2023	Heo	Máu	Bình Phước

Mạng lưới ntST của các trình tự gen 16S rRNA được thể hiện ở Hình 4, bao gồm ntST_1 đến ntST_4 là các ntST đại diện cho mười bốn chủng *M. suis* nghiên cứu này và mười một trình tự *Haemoplasma* thu thập từ GenBank. Kết quả cho thấy cả bốn ntST tập trung lại trong một nhóm nhỏ cùng với các trình tự được phân lập từ Mỹ (CP006771), Trung Quốc (JX489599, AY492086, HQ259257, KF740480), Đức (FN436018) và

Nhật Bản (AB610845). Bên cạnh đó, có thêm hai nhóm nhỏ khác, một nhóm gồm các trình tự phân lập tại Mỹ (CP002525, AF029394), Brazil (MK287839), Đức (FQ790233, FN436013), Nhật Bản (AB610847) Trung Quốc (EU603330, KC907396) và Thái Lan (OL894533), và nhóm còn lại là trình tự được phân lập tại Thái Lan (OL894549). Cả ba nhóm này đều thuộc nhóm lớn là *Haemominutum* hoặc *M. suis* group.



Hình 4. Mạng lưới ntST của các trình tự gen 16S rRNA bao gồm 14 chủng trong nghiên cứu này (ntST_1 đến ntST_4) và các trình tự PH thu thập từ GenBank, được xây dựng bằng phần mềm PopART 1.7. Mỗi hình tròn ứng với ntST, kích thước hình tròn biểu thị tần suất của ntST và màu sắc đại diện cho quốc gia, các trình tự trong nghiên cứu này được kí hiệu màu đỏ là những trình tự đầu tiên tại Việt Nam.

4. Thảo Luận

Nghiên cứu cho thấy *M. suis* được tìm thấy tại 100% trại mắc rối loạn sinh sản được khảo sát. Theo ca bệnh và mẫu lần lượt có tỷ lệ nhiễm *M. suis* group là 85,42% và 91,33%. Các nghiên cứu tại Hàn Quốc và Đức ghi nhận tỷ lệ lưu hành dao động trong khoảng 0,2% đến 31,25% (Seo & ctv., 2019; Stadler & ctv., 2019), trong khi một nghiên cứu tại Brazil báo cáo 80% heo nái dương tính với *M. suis* (Guimaraes & ctv., 2007) và tỷ lệ này ở mức 80,2% tại một tỉnh của Trung Quốc (Fu & ctv., 2017). Sự chênh lệch trên có thể giải thích bằng một số yếu tố được cho là ảnh hưởng đến tỷ lệ lưu hành *M. suis* ở trang trại như: phân bố địa lý, thời gian lấy mẫu và bố trí nghiên cứu như đối tượng heo nái có lâm sàng. *Haemoplasma* ký sinh trên hồng cầu vật chủ, vì thế vi khuẩn này dễ dàng truyền qua vết thương hở giữa các vật chủ với nhau hoặc tình trạng vấy nhiễm khi tái

sử dụng kim tiêm cùng các dụng cụ y tế khác cho nhiều cá thể trong đàn (Arendt & ctv., 2024), đây có thể là tình trạng dễ gặp phải tại các trại không đảm bảo cơ sở vật chất và không chuẩn hóa kỹ thuật quản lý dẫn đến tỷ lệ nhiễm *M. suis* trong đàn tăng cao (Hoelzle, 2008; Toledo & ctv., 2016). Tỷ lệ nhiễm *Porcine Haemoplasma* tăng theo độ tuổi, do thú lớn tuổi có thời gian phơi nhiễm dài hơn (Song & ctv., 2014). Cùng với đó, khả năng mang trùng mãn tính dù sau khi được điều trị kháng sinh và sự suy giảm miễn dịch trong giai đoạn mang thai (Elbers & ctv., 1994; Luppi, 2003; Ade & ctv., 2022) làm cho công tác phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn này và điều trị gặp nhiều khó khăn (Messick, 2004; Gatto & ctv., 2019).

Trong nghiên cứu này, ngoài được phát hiện ở heo nái có biểu hiện rối loạn sinh sản, PH còn được tìm thấy trong một số mẫu heo con chết lưu, thai sảy và thai khô. Những nghiên cứu khác

trên thế giới cho biết: ở cấp độ trang trại chăn nuôi, trại xuất hiện ca nhiễm *M. suis* có nhiều heo con chết lưu hơn so với trại không nhiễm (Stadler & ctv., 2019); về cấp độ cá thể, tỷ lệ thai chết lưu được báo cáo tăng ở heo nái dương tính với *M. suis* (Brissonnier & ctv., 2020). Mặc dù biểu hiện lâm sàng của heo nái dương tính với *M. suis* có liên quan đến sự rối loạn sinh sản (Henderson & ctv., 1997; Brissonnier & ctv., 2020; Stadler & ctv., 2021) nhưng chưa có báo cáo cho thấy *M. suis* trực tiếp gây rối loạn sinh sản. Thai chết lưu còn có thể xảy ra do ảnh hưởng của các yếu tố khác vì chưa có kết luận nào được đưa ra chứng minh heo con chết lưu trong trường hợp này là do *M. suis* (Stadler & ctv., 2019). Hơn nữa, tình trạng đồng nhiễm cùng các mầm bệnh liên quan rối loạn sinh sản khác ngày càng gia tăng (Heinritzi, 2000; Messick, 2004; Wu & ctv., 2006) gây ra những khó khăn trong việc nghiên cứu khả năng gây bệnh của *M. suis* đến tình trạng rối loạn sinh sản trên heo nái.

Các trình tự gen 16S rRNA trong nghiên cứu với có độ tương đồng từ 93,72% đến 100% với trình tự *M. suis*, từ 97,10% đến 100% với trình tự *M. parvum* của các quốc gia như Trung Quốc, Đức, Thái Lan, Hàn Quốc, Nhật Bản và Brazil; từ 81,03% đến 81,57% với trình tự *Ca. M. haemosuis* của các quốc gia như Thái Lan, Trung Quốc, Hàn Quốc. Trong đó, các trình tự trong nghiên cứu thể hiện mức độ tương đồng cao nhất với *M. suis*, là trình tự có nguồn gốc từ Đức (FN391018) với độ tương đồng 100%. Tiếp theo, mức độ tương đồng rất cao với *M. parvum* (100%), được ghi nhận từ các quốc gia khác nhau gồm Trung Quốc (JX489599), Thái Lan (Thongmesee & ctv., 2022), Nhật Bản (Wantanabe & ctv., 2011), Hàn Quốc (Seo & ctv., 2019), Brazil (Sonaglio & ctv., 2021). Mức độ tương đồng cao nhất với *Ca. M. haemosuis* được ghi nhận tại Trung Quốc (JX489601) với độ tương đồng là 81,57%. Theo

Volokhov & ctv. (2012), nếu hai chủng trong cùng một nhóm có độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA trên 97% và ở cùng một nhánh thì chúng rất có thể là cùng một loài.

Về kết quả của cây phát sinh loài, cả 14 chủng nghiên cứu đều tập trung trên cùng một nhánh cùng với những trình tự *M. suis* của Trung Quốc, Đức và còn có sự xuất hiện của trình tự *M. parvum* của Mỹ, Thái Lan, Nhật Bản, Hàn Quốc và Brazil. Nhánh thứ hai tập trung nhiều trình tự *M. suis* của các quốc gia như Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, Nhật Bản, Mỹ, Brazil và Đức. PH mới được ghi nhận tại Thái Lan nằm nhánh cụm thứ ba. Cả 3 nhánh này đều thuộc nhóm *Haemominutum* hoặc *M. suis* group. Đối với *Ca. M. haemosuis*, trình tự tập trung thành một nhánh gồm các trình tự của Thái Lan, Trung Quốc và Hàn Quốc thuộc nhóm *Haemofelis*. Phân tích mạng lưới ntST cũng cho kết quả tương tự khi 4 ntST được đại diện cho 14 trình tự trong nghiên cứu đều nằm chung một nhóm nhỏ cùng với trình tự tại Mỹ (CP006771), Trung Quốc (JX489599, KF740480, HQ259257, AY492086), Đức (FN436018) và Nhật Bản (AB610845) thuộc nhóm lớn *Haemominutum* hoặc *M. suis* group. Hoelzle & ctv. (2010) đã báo cáo rằng, các trình tự *M. suis* từ heo rừng có sự phân chia thành 2 nhánh, nhánh A gần với các trình tự ở Đức và Mỹ, nhánh B gần với các trình tự ở Trung Quốc với độ tương đồng so với nhánh A là 96,2%. Ngoài ra, các trình tự *M. suis* của Trung Quốc được chúng tôi sử dụng làm trình tự tham khảo gồm *M. suis* Zhejiang (HQ259257) được công bố năm 2010 và một trình tự khác được Hoelzle & ctv. (2003) sử dụng làm chủng tham khảo là *M. suis* GD (AY492086), trong khi các chủng *M. parvum* Indiana (CP006771), *M. suis* Illinois (CP002525) và *M. suis* KI3806 (FQ790233) được công bố lần lượt vào năm 2013, 2014 và 2015. Điều này cho thấy các trình tự *M. suis* của Trung Quốc được

sử dụng có thể đã cũ vì thời điểm chúng được công bố, chưa có nhiều dữ liệu hoặc nghiên cứu đầy đủ về những loài PH khác dẫn đến sự nhận diện chỉ tập trung vào *M. suis*. Do đó, các trình tự được công bố trước khi có dữ liệu về bộ gen hoàn chỉnh chưa đủ cơ sở để phân loại chính xác. Seo & ctv. (2019) cũng đã đề cập đến các chủng *M. suis* trước đây cần phải được đánh giá lại (Seo & ctv., 2019)

Hiện tại, *M. parvum* được cho là không gây bệnh vì không quan sát được biểu hiện lâm sàng rõ rệt nào trên heo bị nhiễm (Splitter, 1950; Do Nascimento & ctv., 2014). Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy mối liên hệ giữa sự hiện diện của *M. parvum* nói riêng và PH nói chung có liên quan đến việc gây ảnh hưởng đối với năng suất trong chăn nuôi heo (Petri & ctv., 2020; Sonalio & ctv., 2021) three porcine hemoplasmas (PH. Mối tương quan nghịch giữa tải lượng vi khuẩn (*M. suis* và *M. parvum*) với ADWG – trung bình tăng trọng ngày (Petri & ctv., 2020) three porcine hemoplasmas (PH, số lượng con đẻ/tuần, heo con cai sữa/tuần và trọng lượng giết mổ (Sonalio & ctv., 2021). Tuy nhiên, qua các nghiên cứu trên có thể nhận thấy, sự ảnh hưởng đến năng suất trong chăn nuôi heo được ghi nhận chung cho tác động của PH, chưa có báo cáo cụ thể là do hoạt động của riêng *M. parvum*.

Mức độ tương đồng cao giữa hai loài *M. suis* và *M. parvum* làm cho việc thiết kế các đoạn môi đặc hiệu cho từng loài rất khó khăn (Watanabe & ctv., 2011; Seo & ctv., 2019). Những nghiên cứu gần đây cũng đã áp dụng phân tích thêm các gen mục tiêu khác như 23S rRNA và rnpB (Petri & ctv., 2020; Sonalio & ctv., 2021; Thongmeesee & ctv., 2022) three porcine hemoplasmas (PH. Sử dụng thêm các gen mục tiêu trên để phân tích trong tương lai là cần thiết và giúp khắc phục được những hạn chế của gen 16S rRNA trong phân biệt *M. suis* và *M. parvum*.

5. Kết Luận

Nghiên cứu phát hiện sự hiện diện của *M. suis* group với tỷ lệ cao (91,33%) tại các trại heo giống mắc rối loạn sinh sản. Lần đầu tiên, các trình tự 16S rRNA của *M. suis* group được ghi nhận tại Việt Nam, đồng thời xác định có sự đa dạng di truyền của *M. suis* group trong các trang trại heo rối loạn sinh sản.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là nội dung của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV24-CNTY-01, được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Ade, J., Eddicks, M., Ritzmann, M., Hoelzle, K., Hoelzle, L. E., & Stadler, J. (2024). Haemotrophic *Mycoplasma* infecting pigs: A review of the current knowledge. *Microorganisms* 12(7), 1267. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071267>.
- Ade, J., Hoelzle, K., Stadler, J., Ritzmann, M., & Hoelzle, L. (2022). Occurrence of *Mycoplasma parvum* in german pigs of different age groups using a novel quantitative real-time PCR assay. *Pathogens* 11, 1374. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111374>.
- Arendt, M., Stadler, J., Ritzmann, M., Ade, J., Hoelzle, K., & Hoelzle, L. E. (2024). Hemotrophic *Mycoplasma* - Vector transmission in livestock. *Microorganisms* 12(7), 1278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071278>.

- Brissonnier, M., Normand, V., Lebre, A., Moalic, P. Y., Guyomard, A. S., Bachy, V., Berton, P., Auvin, V., Bouchet, F., & Boulbria, G. (2020). Frequency of infection with *Mycoplasma suis* in gestating sows using qPCR on ten commercial French herds, and impact of the infection on clinical, haematological and biochemical parameters. *Porcine Health Management* 6(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00152-4>.
- Do Nascimento, N. C., Dos Santos, A. P., Chu, Y., Guimaraes, A. M., Baird, A. N., Weil, A. B., & Messick, J. B. (2014). Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. *Veterinary Research* 45(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0086-7>.
- Elbers, A. R. W., Geudeke, M. J., van Rossem, H., Kroon, M. C., & Counotte, C. H. M. (1994). Haematology and biochemistry reference values for sows kept under modern management conditions. *Veterinary Quarterly* 16(2), 127-130. <https://doi.org/10.1080/01652176.1994.9694433>.
- Fu, Y., Shi, T., Xu, L., Wei, W., Lu, F., Zhang, X., Yuan, X., Li, J., Lv, J., & Fang, W. (2017). Identification of a novel *Hemoplasma* species from pigs in Zhejiang province, China. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79(5), 864-870. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0545>.
- Gatto, I. R. H., Sonálio, K., do Amaral, R. B., Morés, N., Dalla Costa, O. A., André, M. R., & de Oliveira, L. G. (2019). High frequency and molecular characterization of porcine hemotropic mycoplasmas in Brazil. *Veterinary Microbiology* 231, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.024>.
- Guimaraes, A. M. S., Biondo, A. W., Lara, A. C., & Messick, J. B. (2007). Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *Veterinary Record* 160(2), 50-53. <https://doi.org/10.1136/vr.160.2.50>.
- Guimaraes, A. M. S., Santos, A. P., SanMiguel, P., Walter, T., Timenetsky, J., & Messick, J. B. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. *Plos One* 6(5), e19574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019574>.
- Heinritzi, K. E. (2000). Eperythrozoonosis. In Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., & Taylor D. J. (Eds.). *Enfermedades del cerdo* (8th ed., 363-367). Buenos Aires, Argentina: Editorial Intermedica.
- Henderson, J. P., O'Hagan, J., Hawe, S. M., & Pratt, M. C. H. (1997). Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. *Veterinary Record* 140(6), 144-146. <https://doi.org/10.1136/vr.140.6.144>.
- Hoelzle, K., Engels, M., Kramer, M. M., Wittenbrink, M. M., Dieckmann, S. M., & Hoelzle, L. E. (2010). Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). *Veterinary Microbiology* 143(2), 405-409. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.015>.
- Hoelzle, L. E. (2008). Haemotropic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Veterinary Microbiology* 130(3-4), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.023>.
- Hoelzle, L. E., Adelt, D., Hoelzle, K., Heinritzi, K., & Wittenbrink, M. M. (2003). Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Veterinary Microbiology* 93(3), 185-196. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00040-3).
- Jansen, B. C. (1952). The occurrence of *Eperythrozoon parvum* Splitter, 1950 in South African swine. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 25(4), 1952.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9), 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.

- Luppi, P. (2003). How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* 21(24), 3352-3357. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00331-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00331-1).
- Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology* 33(1), 2-13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3), 891-899. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2002). Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(2), 683. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-683>.
- Oehlerking, J., Kube, M., Felder, K. M., Matter, D., Wittenbrink, M. M., Schwarzenbach, S., Kramer, M. M., Hoelzle, K., & Hoelzle, L. E. (2011). Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. *Journal of Bacteriology* 193(9), 2369-2370. <https://doi.org/10.1128/JB.00187-11>.
- Petri, F. A. M., Sonalio, K., de Souza Almeida, H. M., Ferraz, M. E. S., Storino, G. Y., de Souza, M. R., André, M. R., & de Oliveira, L. G. (2020). Porcine hemotrophic mycoplasmas infection associated with productive impact in intensive pig production. *Porcine Health Management* 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00171-1>.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Seo, M. G., Kwon, O. D., & Kwak, D. (2019). Prevalence and phylogenetic analysis of hemoplasma species in domestic pigs in Korea. *Parasites and Vectors* 12, 378. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3638-x>.
- Sonalio, K., Perles, L., Gatto, I. R. H., Amaral, R. B., Almeida, H. M. S., Galdeano, J. V. B., Vieira, R. F. C., André, M. R., & Oliveira, L. G. (2021). Genetic diversity of emerging hemotropic mycoplasmas in domestic pigs from Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases* 68(3), 1162-1174. <https://doi.org/10.1111/tbed.13767>.
- Song, Q., Zhang, W., Song, W., Liu, Z., Khan, M. K., He, L., Fang, R., Li, P., Zhou, Y., Hu, M., & Zhao, J. (2014). Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. *Preventive Veterinary Medicine* 117(1), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.pvetmed.2014.07.006>.
- Splitter, E. J. (1950). *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoonparvum* n. sp., two new blood parasites of swine. *Science* 111(2889), 513-514. <https://doi.org/10.1126/science.111.2889.513>.
- Stadler, J., Ade, J., Hermanns, W., Ritzmann, M., Wentzel, S., Hoelzle, K., & Hoelzle, L. E. (2021). Clinical, haematological and pathomorphological findings in *Mycoplasma suis* infected pigs. *BMC Veterinary Research* 17(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02919-5>.
- Stadler, J., Willi, S., Ritzmann, M., Eddicks, M., Ade, J., Hoelzle, K., & Hoelzle, L. E. (2019). Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a vertical transmission. *BMC Veterinary Research* 15(1), 252. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2001-y>.

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thongmeesee, K., Kamkong, P., Thanee, S., Wattanapansak, S., Kaewthamasorn, M., & Tiawsirisup, S. (2022). Molecular detection and genetic analysis of porcine hemoplasmas in commercial pig farms from Thailand reveal a putative novel species. *Transboundary and Emerging Diseases* 69, e2028-e2040. <https://doi.org/10.1111/tbed.14537>.
- Toledo, M. A., Leite, A. I., Gonçalves, L. R., Sousa, K. C. M. de, do Amaral, R. B., da Silva, G. C. P., Machado, R. Z., & André, M. R. (2016). High occurrence of *Mycoplasma suis* infection in swine herds from non-technified farms in Mossoró, state of Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 25, 414-417. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016084>.
- Volokhov, D. V., Simonyan, V., Davidson, M. K., & Chizhikov, V. E. (2012). RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(1), 515-528. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.002>.
- Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., & Harasawa, R. (2011). Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes. *Journal of Veterinary Medical Science* 73(12), 1657-1661. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0293>.
- Wu, J., Yu, J., Song, C., Sun, S., & Wang, Z. (2006). Porcine eperythrozoonosis in China. *Annals of The New York Academy of Sciences* 1081(1), 280-285. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.038>.

Probiotic potential and resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* of *Bacillus amyloliquefaciens*

Linh D. Nguyen*, Duong P. A. Nguyen, Nhi P. U. Le, Ngoc H. Le, Mai C. Duong, & Hien T. Le
Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: September 10, 2024

Revised: November 01, 2024

Accepted: November 08, 2024

Keywords

Bacillus amiloliquefaciens

Bacteriocin

Escherichia coli

Probiotic

Salmonella

*Corresponding author

Nguyen Duy Linh

Email:

nguyenduylinh3036@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus amyloliquefaciens is a Gram-positive spore-forming bacterium that has superior properties compared to other beneficial bacteria used in probiotic preparations. The purpose of this study was to determine the bacterial biological properties under harsh conditions such as high temperature, low pH, bile salts, artificial gastric juice and test the resistance to two types of gram-negative bacteria including *Escherichia coli* and *Salmonella*. The results showed that after 3 h of testing at 85°C, the bacterial density remained at 3.05 ± 0.06 log CFU/mL (corresponding to 35.58% of the initial density). Under pH = 2.5 condition and after 3 h, the bacterial density remained up to 5.34 ± 0.04 log CFU/mL (62.43%). With the bile salt concentration up to 0.6% after 3 h, the bacterial density remained at 5.24 ± 0.07 log CFU/mL (61.34%). Under the decomposition action of the enzyme pepsin and in the artificial gastric fluid environment of piglets (0.3% pepsin, pH = 4.5) at different levels, the bacterial density still remained at the level of 5.82 ± 0.15 log CFU/mL (63.66%), which was higher than that of the test of artificial stomach fluid of adult pigs (pepsin 0.3%, pH = 2.5) corresponding to 4.73 ± 0.04 log CFU/mL (55.21%) after 3 h of testing. In this study, *B. amiloliquefaciens* also showed resistance to gram-negative bacteria such as *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014, *E. coli* with F4 factor, *E. coli* with F18+Stx2e factor, field *Salmonella* Typhimurium, and field *Salmonella* Enteritidis.

Cited as: Nguyen, L. D., Nguyen, D. P. A., Le, N. P. U., Le, N. H., Duong, M. C., & Le, H. T. (2025). Probiotic potential and resistance to *Escherichia coli*, *Salmonella* of *Bacillus amyloliquefaciens*. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 54-65.

Tiềm năng probiotic và khả năng kháng *Escherichia coli*, *Salmonella* của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*

Nguyễn Duy Linh*, Nguyễn Phạm Ánh Dương, Lê Phương Uyên Nhi, Lê Hữu Ngọc, Đường Chi Mai & Lê Thanh Hiền

Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 10/09/2024

Ngày chỉnh sửa: 01/11/2024

Ngày chấp nhận: 08/11/2024

Từ khóa

Bacillus amyloliquefaciens

Bacteriocin

Escherichia coli

Probiotic

Salmonella

*Tác giả liên hệ

Nguyễn Duy Linh

Email:

nguyenduylinh3036@gmail.com

TÓM TẮT

Bacillus amyloliquefaciens là một vi khuẩn Gram dương sinh nội bào tử có khả năng vượt trội so với các lợi khuẩn khác được dùng trong các chế phẩm sinh học probiotic. Mục tiêu của nghiên cứu này là để đánh giá các đặc tính sinh học vi khuẩn này trong các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật, dịch dạ dày nhân tạo và kiểm tra khả năng kháng hai loại gây bệnh trên đường ruột: *Escherichia coli*, *Salmonella*. Kết quả thu được, sau 3 giờ thử nghiệm ở nhiệt độ 85°C, mật độ vi khuẩn còn duy trì là $3.05 \pm 0.06 \log \text{CFU/mL}$ (tương ứng 35,58% so với mật độ ban đầu). Trong điều kiện pH = 2.5 sau 3 giờ mật độ vi khuẩn duy trì lên đến $5.34 \pm 0.04 \log \text{CFU/mL}$ (62,43%). Với điều kiện nồng độ muối mật lên đến 0,6% sau 3 giờ mật độ vi khuẩn duy trì ở mức $5.24 \pm 0.07 \log \text{CFU/mL}$ (61,34%). Dưới sự tác động của enzyme phân hủy pepsin (0,3%), trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo của heo con pH 4,5 ở các mức độ khác nhau, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở mức $5.82 \pm 0.15 \log \text{CFU/mL}$ (63,66%) cao hơn thử nghiệm dịch dạ dày nhân tạo của heo trưởng thành (pepsin 0,3%, pH = 2.5) tương ứng $4.73 \pm 0.04 \log \text{CFU/mL}$ (55,21%) sau 3 giờ thí nghiệm. *B. amyloliquefaciens* còn cho thấy khả năng kháng lại các loại vi khuẩn gram âm trong nghiên cứu này như *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014, *E.coli* thực địa có yếu tố bám F4, *E.coli* thực địa có yếu tố bám F18+Stx2e, *Samonella* Typhimurium thực địa và *Samonella* Enteritidis thực địa. Kết quả này phần nào cho thấy khả năng sử dụng vi khuẩn này trong chăn nuôi nhất là khi những quy định về hạn chế sử dụng kháng sinh tại Việt Nam.

1. Đặt Vấn Đề

Hiện nay, việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi để phòng và kiểm soát bệnh hoặc làm chất kích thích tăng trưởng đã làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh trên thú và ảnh hưởng sức khỏe cộng đồng. Liên minh châu Âu (EU) đã thực hiện các bước cấm sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi để kích thích tăng trưởng từ năm 2006 và tiến đến hạn chế sử dụng kháng sinh trong phòng bệnh (Dibner & Richards, 2005). Tại Hoa Kỳ, các hạn chế được thực hiện từ năm 2017 (Centner, 2016) và tại Trung Quốc vào năm 2020 (Hu & Cowling, 2020). Cũng theo xu hướng này, kể từ năm 2018, việc bổ sung kháng sinh vào thức ăn chăn nuôi với mục đích kích thích tăng trưởng đã bị cấm hoàn toàn ở Việt Nam. Trên lộ trình giảm thiểu sử dụng kháng sinh của Việt Nam, việc sử dụng kháng sinh phòng bệnh trong ngành chăn nuôi cũng bị cấm vào năm 2026 (GOV, 2023).

Với tình hình đó, các giải pháp thay thế kháng sinh theo hướng hỗ trợ tăng trưởng và kháng bệnh rất được quan tâm, trong đó chế phẩm sinh học dạng men sống (probiotic) được cho là là một lựa chọn rất có tiềm năng về tăng trưởng (Dayan, 1993), cũng như hạn chế đề kháng kháng sinh (Kasimanickam & ctv., 2021). Một nghiên cứu đã cho thấy khả năng sống sót qua dịch dạ dày nhân tạo của bào tử *Bacillus subtilis* P223 (pH = 2,5, pepsin 0,3% trong 3 giờ; muối mật 0,3% trong 24 giờ) (Jeon & ctv., 2017). Gần đây những nghiên cứu cho thấy *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amylo.*) có tiềm năng tốt để dùng như probiotic (Du & ctv., 2022). Tuy nhiên, thông tin này chưa được nghiên cứu nhiều trên những sản phẩm probiotic lưu hành tại Việt Nam. Với mục tiêu làm cơ sở cho đánh giá khả năng sử dụng *B. amylo.* làm probiotic trước khi thử nghiệm thực địa, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tại phòng thí nghiệm chủng *B. amylo.* của một sản phẩm

thương mại về khả năng liên kháng một số loại vi khuẩn đường ruột, cũng như khả năng tồn tại trong các điều kiện mô phỏng môi trường dạ dày nhân tạo của heo từ đó làm rõ hơn về tác động của chúng trong đường ruột.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. amylo.* được phân lập từ sản phẩm probiotic, làm thuần chủng và xác nhận chủng bằng các phản ứng sinh hoá (Bergey & ctv., 2000) để sử dụng trong nghiên cứu. Các vi khuẩn đường ruột được dùng thử khả năng kháng khuẩn bao gồm *Salmonella* (*Sal.*) Typhimurium ATCC 14028, *Sal. Enteritidis* WHO 2014, *Sal. Infantis* (ATCC 1675) được cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. Các chủng vi khuẩn thực địa, bao gồm *Escherichia coli* có yếu tố bám mang gen F4, *Escherichia coli* mang gen F18 và độc tố Stx2e, *Sal. Typhimurium* thực địa và *Sal. Enteritidis*. Những chủng vi khuẩn này có nguồn gốc từ các mẫu sinh học thực địa, bao gồm mẫu phân từ heo và mẫu môi trường từ các trang trại chăn nuôi gà đã được phân lập, giải trình tự gen, lưu trữ bởi phòng thí nghiệm của Bộ môn Bệnh truyền nhiễm và Thú y cộng đồng, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Ngoài ra, thí nghiệm sử dụng các dụng cụ, hoá chất môi nuôi cấy vi sinh vật thường quy.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *B. amylo.*

Khuẩn lạc *B. amylo.* thuần được nuôi cấy tăng sinh trong 100 mL môi trường canh Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid, CM 0129B), lắc ở 150 rpm, 37°C/ 24 giờ. Hút 10 mL huyền phù *B. amylo.* sau khi nuôi cấy tăng sinh ly tâm 6000 vòng/15 phút ở 4°C, thu phần cặn loại bỏ phần dịch. Thêm 10 mL dung dịch đệm PBS (8,0 g

NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24g KH_2PO_4 , pH = 7,4), sử dụng huyền phù này cho các thí nghiệm sau đó.

2.2.2. Khảo sát khả năng tồn tại trong điều kiện nhiệt độ, pH, dịch dạ dày nhân tạo và muối mật

Điều kiện nhiệt độ: Hút 2 mL huyền phù *B. amylo.* được chuẩn bị trước đó cho vào các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch đệm PBS, ủ ở các nhiệt độ 37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C. Sau khi ủ 0, 1, 2 và 3 giờ, hút 10 μL dịch vi khuẩn kiểm tra mật độ vi khuẩn sống trong dịch ủ bằng phương pháp đếm nhỏ giọt trên môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM0131).

Điều kiện pH: Thực hiện hút 2 mL huyền phù vào các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS có pH = 2,5; pH = 3,5; pH = 4,5 và pH = 5,5 (Ioannis 2016). Ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ và kiểm tra mật độ vi khuẩn sống tương tự trên.

Trong điều kiện dịch dạ dày nhân tạo: Chuẩn bị các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS có mức pH = 2.5 và pH = 4.5 bổ sung thêm pepsin lần lượt ở các nồng độ 0%; 0,2% và 0,3% ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ ở 37°C. Điều kiện muối mật: thực hiện như trên, hút 2 mL huyền phù cho các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS bổ các nồng độ muối mật 0%, 0,3%, 0,6% ủ trong 0, 1, 2 và 3 giờ ở 37°C (Ioannis, 2016). Tất cả các điều kiện đều lặp lại 3 lần. Tương tự, kiểm tra mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đếm nhỏ giọt.

2.2.3. Chuẩn bị dịch chiết canh khuẩn

Khuẩn lạc thuần chủng được pha loãng thành hỗn dịch 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) vi khuẩn trong dung dịch NaCl 0,9%. Hút 1 mL hỗn dịch vi khuẩn tăng sinh trong 100 mL môi trường canh Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid,

CM 0129B), lắc ở 150 rpm, 37°C/48 giờ. Huyền phù sinh khối *B. amylo.* sau khi nuôi cấy được ly tâm 6000 vòng/15 phút ở 4°C, thu phần dịch lọc qua màng lọc cellulose 0,45 μm . Dịch chiết thu được tiến hành kiểm tra khả năng kháng khuẩn.

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

Cấy tăng sinh các vi khuẩn gồm *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* WHO 2014, *S. Infantis* (ATCC 1675), *E. coli* thực địa có yếu tố bám mang gen F4, *E. coli* thực địa có yếu tố bám mang gen F18 và độc tố Stx2e, *S. Typhimurium* thực địa, *S. Enteritidis* thực địa trên môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM 0129) ở 37°C/24 giờ. Tiến hành pha loãng các vi khuẩn này với nước muối sinh lý để đạt dịch khuẩn ở mức McFarland 0,5 tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tiếp tục lấy 100 μL dịch khuẩn này trải đều lên bề mặt môi trường Mueller Hinton Agar (MHA), đục lỗ thạch ($\phi = 6 - 8$ mm). Hút 100 μL dịch chiết *B. amylo.* trước đó cho vào lỗ thạch, hạn chế sự di chuyển để huyền dịch ngấm vào thạch. Sau 30 phút, các đĩa môi trường được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, đo đường kính vòng vô khuẩn (mm) để đánh giá khả năng kháng khuẩn (Lim & ctv., 2016). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. Kết Quả và Thảo Luận

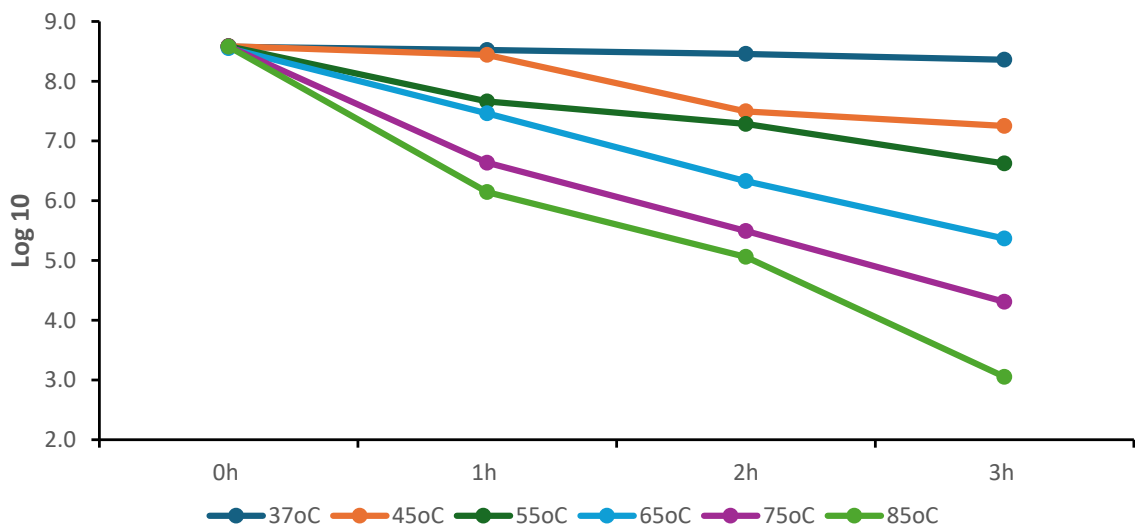
3.1. Tính ổn định ở nhiệt độ cao của *B. amylo.*

Bào tử vi khuẩn *Bacillus* chịu được nhiệt độ khá cao, *B. subtilis* cần phải được xử lý ở nhiệt độ lên đến 121 - 135°C trong thời gian dài mới có thể bất hoạt được bào tử vi khuẩn (Cho & Chung, 2020), tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tế bào sinh dưỡng để đánh giá khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được theo dõi theo thời gian thử nhiệt được trình

bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy mật độ vi khuẩn không có sự thay đổi đáng kể ở nhiệt độ 37°C với giá trị trung bình lần lượt là $8,36 \pm 0,05$ log CFU/mL (sau 3 giờ ủ, tương ứng với 97,47% so với mật độ vi khuẩn ban đầu $8,58 \pm 0,06$ log CFU/mL) và 45°C với giá trị trung bình $7,25 \pm 0,07$ log CFU/mL (xấp xỉ 84,45% so với mật độ vi khuẩn ban đầu $8,59 \pm 0,03$ log CFU/mL).

Ở nhiệt độ 55°C và 65°C, sau khi ủ nhiệt 1 giờ, mật độ vi khuẩn giảm nhanh còn lại lần lượt là $7,66 \pm 0,14$ log CFU/mL (89,24%) và $7,46 \pm 0,04$ log CFU/mL (87,23%), khi thời gian ủ nhiệt tăng lên 3 giờ, thu được giá trị thấp hơn là $6,62 \pm 0,07$ log CFU/mL (77,15%) và $5,37 \pm 0,04$ log CFU/

mL (62,74%). Quan sát thấy tỷ lệ tế bào vi khuẩn sống sót khi ủ nhiệt 75°C chỉ còn lại 50,18% (tương đương $4,31 \pm 0,03$ log CFU/mL) so với mật độ ban đầu sau 3 giờ ủ. Mật độ vi khuẩn sụt giảm nhanh khi ủ nhiệt ở 85°C, sau 1 giờ là $6,14 \pm 0,06$ log CFU/mL (71,61%), sau 2 giờ là $5,06 \pm 0,10$ log CFU/mL (58,99%), sau 3 giờ chỉ còn lại $3,05 \pm 0,06$ (35,58%). Tuy nhiên, có thể thấy vi khuẩn *B. amilo*. có thể chịu được nhiệt độ lên đến 85°C trong 3 giờ, thể hiện được khả năng chịu nhiệt độ cao. Trong thực tế sản xuất, nhiệt độ phối trộn và bảo quản thức ăn gia súc không thể vượt quá nhiệt độ này và kéo dài thời gian quá lâu. Điều đó cho thấy được khả năng bền của *B. amilo*. đối với nhiệt.



Hình 1. Mật độ tế bào *Bacillus amyloliquefaciens* ở các nhiệt độ khác nhau theo thời gian.

3.2. *B. amilo*. trong các môi trường có pH khác nhau

Heo sơ sinh có độ pH dạ dày khá cao (5 - 6), tuy nhiên, pH này chỉ duy trì sau vài giờ bú đầu tiên khi mới sinh, pH sẽ giảm xuống khoảng còn 4 và ổn định ở mức này cho đến khi cai sữa (Ioannis, 2016), tuy nhiên cũng tiềm ẩn nguy cơ cao các vi sinh vật có hại xâm nhập và nhanh chóng tăng số lượng gây bệnh cho vật chủ. Khi heo trưởng thành, pH dạ dày có thể thấp hơn

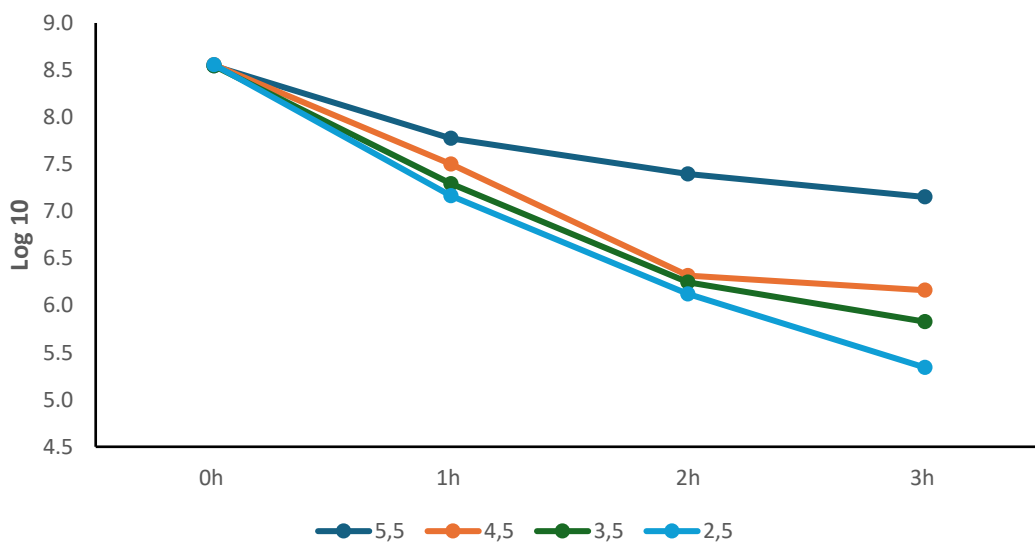
nửa khoảng 2 - 3 (Ioannis, 2016) thì nếu chủng *B. amilo* có khả năng sống sót trong điều kiện này sẽ là ưu điểm đáng kể cho chúng để được dùng như probiotic.

Mật độ tế bào sống sót sau 3 giờ ủ ở giá trị pH thấp duy trì ở mức 10^6 CFU/mL. Trong môi trường pH = 5,5, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở mức $7,15 \pm 0,08$ log CFU/mL (tương ứng 83,71% so với ban đầu) sau 3 giờ. Tại giá trị pH = 4,5 tỉ lệ tế bào sống sót sau 1 giờ lên đến $7,50 \pm 0,03$ log

CFU/mL (tương ứng 87,66%). Sau 3 giờ ủ, tỉ lệ sống giảm xuống còn 72,02% (tương ứng mật độ vi khuẩn $6,16 \pm 0,08 \log \text{CFU/mL}$) (Hình 2). Do đó cho thấy điều kiện tương đối cao ($\text{pH} = 4,5$ và $\text{pH} = 5,5$), hoàn toàn không gây trở ngại cho hoạt động của vi khuẩn *B. amylo*.

Heo từ cai sữa đến trưởng thành pH sẽ giảm dần (còn khoảng từ 2 - 3) (Ioannis, 2016) do đó *B. amylo* cần phải sống sót qua điều kiện pH thấp ở dạ dày heo trưởng thành mới tiếp tục di chuyển đến ruột non và thể hiện vai trò có lợi của mình. Do vậy, ở giá trị $\text{pH} = 3,5$ tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót có sự sụt giảm rõ rệt từ $7,29 \pm 0,05 \log \text{CFU/mL}$ (85,36%) sau 1 giờ ủ, còn $5,54 \pm 0,02$ (64,79%) sau 3 giờ ủ. Mật độ vi khuẩn *B. amylo*.

giảm đáng kể sau khi ủ trong môi trường có $\text{pH} = 2,5$, tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót giảm sau 2 và 3 giờ ủ lần lượt là 71,55% và 62,43%, tương ứng với mật độ vi khuẩn $6,12 \pm 0,07 (\log \text{CFU/mL})$ $5,34 \pm 0,04 (\log \text{CFU/mL})$ (Hình 2). Vi khuẩn giảm mật độ rõ rệt khi gặp điều kiện pH thấp như trong dạ dày heo trưởng thành. Tuy nhiên mật độ này cũng còn khá cao, dĩ nhiên là còn tùy thuộc vào số lượng vi khuẩn ban đầu và các thành phần chất hữu cơ khác và thời gian thực tế mà thức ăn tồn tại ở dạ dày. Theo nghiên cứu của Guerin & ctv. (2001) thức ăn có thể tồn tại trong dạ dày heo khoảng 2 đến 4 giờ, cho nên kết quả này phần nào cũng khẳng định khả năng bền của *B. amylo* trong pH dạ dày của heo khi được dùng như probiotic.



Hình 2. Mật độ tế bào *B. amylo* trong môi trường ở các mức pH khác nhau theo thời gian.

3.3. Khả năng chống chịu môi trường dạ dày nhân tạo của *B. amylo*.

Dịch dạ dày nhân tạo của heo con có $\text{pH} = 4,5$, heo trưởng thành có $\text{pH} = 2,5$ với các nồng độ enzyme pepsin khác nhau: 0%, 0,2%, 0,3%.

Những điều kiện nồng độ pepsin khác nhau của thí nghiệm này thể hiện sự thay đổi dịch tiêu hoá của dạ dày tùy thuộc vào sự nguyên vẹn của tế bào phân tiết pepsin, sự điều hoà thần kinh thể dịch (Fimmel & Blum, 1984).

Bảng 1. Mật độ tế bào *B.amylo.* trong dịch dạ dày nhân tạo heo con (pH 4,5) ở các nồng độ pepsin khác nhau theo thời gian (n = 3)

Thời gian (giờ)	Pepsin 0%		Pepsin 0,2%		Pepsin 0,3%	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,56 ± 0,06	100,00	8,56 ± 0,04	100,00	8,57 ± 0,05	100,00
1	7,50 ± 0,03	87,60	7,21 ± 0,06	84,24	6,96 ± 0,10	81,24
2	6,32 ± 0,08	73,78	6,12 ± 0,07	71,52	6,08 ± 0,06	70,90
3	6,16 ± 0,08	71,97	6,03 ± 0,11	70,47	5,82 ± 0,15	63,66

Mật độ vi khuẩn ở mức pepsin 0%, pH = 4,5 có giảm sau 2 và 3 giờ ủ ($6,32 \pm 0,08$ log CFU/mL và $6,16 \pm 0,08$ log CFU/mL). Ở môi trường có pepsin 0,2%, pH = 4,5 và môi trường pepsin 0,3%, pH = 4,5 cũng cho thấy mật độ vi khuẩn giảm dần sau 0, 1, 2 và 3 giờ ủ. Theo đó, mật độ vi khuẩn sau 3 giờ ủ lần lượt là 70,47% và 63,66% so với thời điểm ban đầu (Bảng 1). Có thể thấy mật độ vi khuẩn trong dịch dạ dày nhân tạo pH

= 4,5 ở cả 3 nồng độ pepsin 0%, 0,2%, 0,3% sau 3 giờ ủ đều đạt tiêu chuẩn 10^6 CFU/mL (ngoại trừ pepsin 0,3% pH = 4,5) nồng độ tối thiểu của một chế phẩm vi sinh để vi khuẩn phát huy tác dụng trong đường tiêu hoá (Kechagia & ctv., 2013). Tuy gặp trở ngại khi tăng nồng độ pepsin lên 0,3%, nhìn chung mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở ngưỡng tác động có lợi.

Bảng 2. Mật độ tế bào *B. amylo.* trong dịch dạ dày nhân tạo heo trưởng thành (pH = 2,5) ở các nồng độ pepsin khác nhau theo thời gian (n = 3)

Thời gian (giờ)	Pepsin 0%		Pepsin 0,2%		Pepsin 0,3%	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,56 ± 0,03	100,00	8,56 ± 0,06	100,00	8,56 ± 0,02	100,00
1	7,16 ± 0,06	83,73	7,05 ± 0,02	82,43	6,88 ± 0,09	80,32
2	6,12 ± 0,07	71,55	5,92 ± 0,08	69,13	5,38 ± 0,12	62,77
3	5,34 ± 0,04	62,43	5,09 ± 0,08	59,44	4,73 ± 0,04	55,21

Điều kiện dịch dạ dày nhân tạo pH = 2,5 kết hợp với 3 nồng độ pepsin lần lượt là 0%, 0,2%, 0,3% không lí tưởng cho nhiều loài vi khuẩn. Nhưng kết quả cho thấy chủng *B. amylo.* có khả năng sống sót trên 50% trong các điều kiện thí

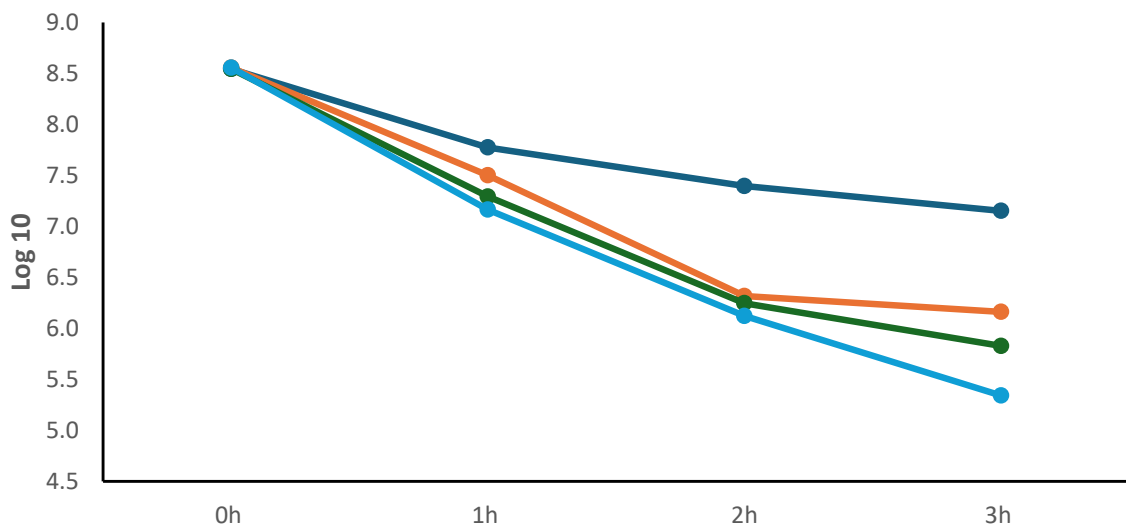
nghiệm khác nhau. Tỷ lệ sống sót giảm dần theo thời gian 0, 1, 2 và 3 giờ ủ. Trong môi trường pepsin 0%, pH = 2,5 quan sát thấy sự suy giảm mật độ vi khuẩn sau 1 giờ ủ là $7,16 \pm 0,06$ log CFU/mL (83,73%) sau 3 giờ ủ là $5,34 \pm 0,04$

log CFU/mL (62,43%). Sự suy giảm mật độ vi khuẩn tăng lên khi tăng nồng độ pepsin 0,2% pH = 2,5, cụ thể chỉ còn 59,44% sau 3 giờ. Tỷ lệ vi khuẩn sống sót ở nồng độ pepsin 0,3% pH = 2,5 duy trì khá tốt ở 80,32% sau 1 giờ ủ, tuy nhiên chỉ còn lại 55,21% sau 3 giờ ủ (Bảng 2). *Bacillus amyloliquefaciens* hoàn toàn có khả năng vượt qua được hàng rào dạ dày nhân tạo nhờ sức chống chịu của mình.

3.4. *Bacillus amyloliquefaciens* trong môi trường bổ sung muối mật

Muối mật lại có tác dụng kiểm soát thành phần đường ruột giúp cân bằng hệ vi sinh vật phong phú (Urdaneta & Casadesús, 2017) bị ức chế bởi muối mật, làm cho vi khuẩn không thể xâm lấn vào biểu mô hồi tràng (Prouty & Gunn, 2000). Muối mật cũng làm giảm sự biểu hiện gen gây bệnh trên tế bào ruột của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gây xuất huyết đường ruột (Hamner & ctv., 2013). Những tác động của muối mật lên vi khuẩn rất đa dạng, bao gồm cả sự phá vỡ màng tế bào vi khuẩn, gây tổn thương acid nucleic, biến tính protein, và tạo phức với sắt, canxi để ngăn sự phát triển của vi khuẩn. Các loài vi khuẩn

đường ruột ở động vật có vú chỉ tồn tại được khi chúng có khả năng kháng mật để có thể tự bảo vệ khỏi những thương tổn do mật gây ra (Urdaneta & Casadesús, 2017). Trong thí nghiệm này, mật độ vi khuẩn ở các nồng độ muối mật khác nhau được theo dõi theo thời gian ở Hình 3. Ở nồng độ muối mật 0%, mật độ vi khuẩn duy trì ổn định > 95%, sau 3 giờ ủ vẫn đạt mức $8,16 \pm 0,05$ log CFU/mL (95,43%). Trong điều kiện môi trường 0,3% muối mật, vi khuẩn *B. amylo.* vẫn thể hiện khả năng thích nghi khá tốt thông qua mật độ sau 1 giờ ủ là $7,91 \pm 0,12$ log CFU/mL (92,51%), sau 3 giờ, mật độ vi khuẩn giảm còn $6,33 \pm 0,05$ (74,07%). Khi tăng nồng độ muối mật lên 0,6%, sự giảm mật độ vi khuẩn thấy rõ sau 1, 2, 3 giờ ủ, tuy vậy vẫn đạt mức $5,24 \pm 0,07$ (log CFU/mL) tương đương 61,34% với tỉ lệ tế bào vi khuẩn sống sót này, vẫn đảm bảo số lượng vi khuẩn tối thiểu ($> 10^6$ CFU/mL) để phát huy công dụng của một chế phẩm vi sinh trên hệ tiêu hoá của heo. Trong một nghiên cứu khác, *B. amylo.* TL106 được phân lập từ lợn Tây Tạng cũng có khả năng sống sót lên đến 50% trong điều kiện invitro với muối mật 0,6% (Haitao, 2021). Có thể thấy rằng, *B. amylo.* đã thể hiện ưu điểm của mình thông qua việc duy trì mật độ vi khuẩn trong nồng độ muối mật cao.

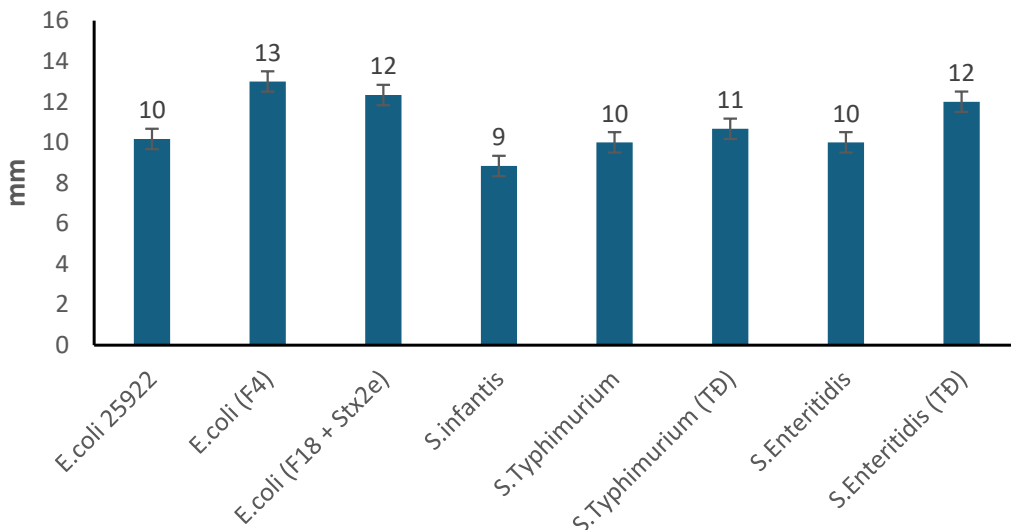


Hình 3. Mật độ tế bào *Bacillus amyloliquefaciens* ở các nồng độ muối mật khác nhau.

3.5. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của *B. amylo*.

Bacteriocin là peptide kháng khuẩn được tiết ra bởi một số loài vi khuẩn, có khả năng gây chết các vi khuẩn khác. Một số nghiên cứu cho rằng bacteriocin được tạo ra bởi một số loại vi khuẩn trong đường ruột, và đó là phương tiện để chúng cạnh tranh trong môi trường có hệ vi sinh vật đa dạng này (Joerger, 2003). *B. amyloliquefaciens* thể hiện khả năng kháng khuẩn đáng kể chống lại nhiều loại vi khuẩn và nấm so với chủng *Bacillus* khác (Kadaikunnan & ctv., 2015). Một

nghiên cứu cho thấy bacteriocin do vi khuẩn gram dương tạo ra chủ yếu có tác dụng ức chế đối với vi khuẩn gram dương và ít hiệu quả hơn đối với vi khuẩn gram âm (Gray & ctv., 2006). Tuy nhiên, một nghiên cứu khác chỉ ra rằng bacteriocin của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* RX7 ức chế sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn Gram dương khác nhau, bao gồm *B. cereus*, *S. aureus* và *L. monocytogenes*, vi khuẩn Gram âm như: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, và *S. gallinarum* (Lim & ctv., 2016). Trong nghiên cứu này, *B. amylo*. thể hiện khả năng kháng các vi khuẩn gram âm hiệu quả (Hình 4).

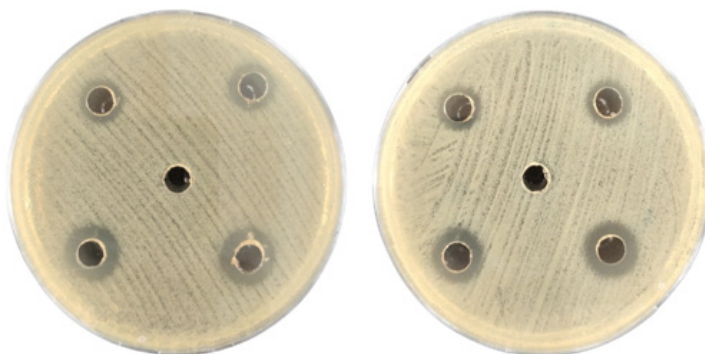


Hình 4. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ *Bacillus amyloliquefaciens*.

Thí nghiệm được thiết kế có mẫu đối chứng âm (không chứa tác nhân kháng khuẩn) và mẫu chứa dịch chiết canh khuẩn để kiểm tra khả năng kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, hoạt tính ức chế vi khuẩn tăng trưởng lớn nhất của *B. amylo*. được ghi nhận đối với *E. coli* thực địa có yếu tố bám F4, đường kính vòng vô khuẩn là $13 \pm 2,6$ mm. Tiếp theo là *E. coli* thực địa có yếu tố bám F18 + Stx2e và *Salmonella* Enteritidis thực địa với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là $12 \pm 2,1$ mm và $12 \pm 2,2$ mm. *Salmonella* Typhimurium thực địa có vòng vô khuẩn lần lượt là $11 \pm 0,6$ mm. Cho thấy rằng *B. amylo*. tạo ra vòng vô khuẩn lớn hơn

đối chứng âm, điều này củng cố khả năng kháng khuẩn từ hoạt động kháng khuẩn thực sự của nó.

Vòng vô khuẩn có giá trị là 10 mm được quan sát thấy với chủng vi khuẩn *E. coli* 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis WHO 2014 (Hình 5). Hoạt tính ức chế vi khuẩn *Salmonella* Infantis ở mức thấp nhất với vòng vô khuẩn là $9 \pm 1,4$ mm. Kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu về *B. amylo*. TL106, đường kính vùng ức chế vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* lần lượt là 15 mm và 14 mm (Haitao, 2021).



Hình 5. Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* (F4) (bên trái) và *Salmonella* Enteritidis (bên phải).

Đường kính các vòng vô khuẩn của *B.amylo.* trong thí nghiệm giao động từ 9 đến 13 mm tùy theo chủng vi khuẩn. Tuy nhiên, mức này cho thấy *B. amyloliquefaciens* có khả năng kháng khuẩn nhưng không mạnh (James, 2023). Có thể tăng nồng độ hoặc điều chỉnh môi trường để kiểm tra xem có thể cải thiện hiệu quả kháng khuẩn không.

Cho đến nay, sự phát triển của các loại kháng sinh mới vẫn chưa đủ nhanh để kiểm soát để kháng kháng sinh. Bacteriocin có thể là một giải pháp thay thế hữu hiệu. Tuy nhiên, cần tiến hành thêm các nghiên cứu để đánh giá lâm sàng, cơ chế hoạt động, tác động đến hệ thống miễn dịch của vật chủ và hệ vi sinh vật, chi phí sản xuất quy mô lớn cũng như sự xuất hiện của tình trạng kháng bacteriocin.

4. Kết Luận

Bacillus amyloliquefaciens có các đặc tính sinh học tốt với khả năng chịu đựng được các điều kiện giả định trong phòng thí nghiệm: nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật, dịch dạ dày nhân tạo. Mật độ vi khuẩn sau khi thử nghiệm vẫn đảm bảo trên 10^6 CFU/mL giúp vi khuẩn duy trì tác động tích cực lên hệ vi sinh vật đường ruột. Vi khuẩn có hoạt tính sinh học kháng vi khuẩn gram âm gây bệnh là *E. coli* và *Salmonella*. *Bacillus amyloliquefaciens* thể hiện tiềm năng trở

thành một chế phẩm vi sinh an toàn, hiệu quả, lựa chọn mới thay thế kháng sinh bổ sung vào thức ăn để phòng bệnh cho đàn vật nuôi thân thiện với sức khỏe con người.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Trân trọng cảm ơn phòng thí nghiệm Kiểm nghiệm Súc sản, Môi trường và Sức khỏe vật nuôi, Khoa Chăn nuôi Thú Y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã tạo điều kiện tốt nhất về trang thiết bị, cung cấp chủng giống vi khuẩn để hoàn thiện đề tài.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bergey, D. H., Holt, J. G., & Bergey, D. H. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Pennsylvania, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Centner, T. J. (2016). Recent government regulations in the United States seek to ensure the effectiveness of antibiotics by limiting their agricultural use. *Environment International* 94, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.018>.

- Cho, W. I., & Chung, M. S. (2020). Bacillus spores: A review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology* 29(11), 1447-1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>.
- Dayan, A. D. (1993). Allergy to antimicrobial residues in food: Assessment of the risk to man. *Veterinary Microbiology* 35(3-4), 213-226. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90146-x](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90146-x).
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science* 84(4), 634-643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>
- Du, H., Yao, W., Kulyar, M. F. A., Ding, Y., Zhu, H., Pan, H., Li, K., Bhutta, Z. A., Liu, S., & Li, J. (2022). Effects of bacillus amyloliquefaciens TL106 isolated from tibetan pigs on probiotic potential and intestinal microbes in weaned piglets. *Microbiology Spectrum* 10(1), e01205-01221. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01205-21>.
- Farias, B. C. S., Hissa, D. C., do Nascimento, C. T. M., Oliveira, S. A., Zampieri, D., Eberlin, M. N., Migueleti, D. L. S., Martins, L. F., Sousa, M. P., Moyses, D. N., & Melo, V. M. M. (2018). Cyclic lipopeptide signature as fingerprinting for the screening of halotolerant bacillus strains towards microbial enhanced oil recovery. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(3), 1179-1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8675-9>.
- Fimmel, C. J., & Blum, A. L. (1984). Pepsin secretion: Neurohumoral regulation and drug effects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement* 101, 39-46.
- GOV (Government of the Socialist Republic of Viet Nam). (2023). Decision No. 1121/QĐ-TTg of the Prime Minister dated on September 25, 2023. Approving the national strategy on prevention and control of antimicrobial resistance in Vietnam for the period 2023 - 2030, with a vision to 2045. Retrieved May 26, 2024, from <http://vanban.chinhphu.vn/?pageid=27160&doid=208701>.
- Gray, E. J., Lee, K. D., Souleimanov, A. M., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T. C., Driscoll, B. T., & Smith, D. L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain bacillus thuringiensis NEB17: Isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* 100(3), 545-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02822.x>.
- Haitao, D. (2021). *Effects of bacillus amyloliquefaciens TL106 isolated from tibetan pigs on probiotic potential and intestinal microbes in weaned piglets-PMC*. Retrieved May 26, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8791190/>.
- Hamner, S., McInnerney, K., Williamson, K., Franklin, M. J., & Ford, T. E. (2013). Bile salts affect expression of escherichia coli O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions. *Plos One* 8(9), e74647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074647>.
- Hu, Y. J., & Cowling, B. J. (2020). Reducing antibiotic use in livestock, China. *Bulletin of The World Health Organization* 98(5), 360-361. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.243501>.
- Ioannis, M. (2016). *How piglet gastric pH development affects gut health*. Retrieved May 26, 2024, from <https://www.wattagnet.com/broilers-turkeys/poultry-nutrition-formulation/article/15517867/how-piglet-gastric-ph-development-affects-gut-health-wattagnet>.
- James, S. L. II. (2023). *M100-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed.). Pennsylvania, USA: CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Jeon, H. L., Lee, N. K., Yang, S. J., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2017). Probiotic characterization of bacillus subtilis P223 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology* 26(6), 1641-1648. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0148-5>.

- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82(4), 640-647. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>.
- Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of bacillus amyloliquefaciens. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14, 9. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0069-1>.
- Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics use in food animal production: Escalation of antimicrobial resistance: Where are we now in combating AMR? *Medical Sciences* 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/medsci9010014>.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition* 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.
- Lim, K. B., Balolong, M. P., Kim, S. H., Oh, J. K., Lee, J. Y., & Kang, D. K. (2016). Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *BioMed Research International* 2016, e8521476. <https://doi.org/10.1155/2016/8521476>.
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M., & O'Byrne, C. (2020). Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in Microbiology* 11, 556140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>.
- Luo, Y., Ren, W., Smidt, H., Wright, A. D. G., Yu, B., Schyns, G., McCormack, U. M., Cowieson, A. J., Yu, J., He, J., Yan, H., Wu, J., Mackie, R. I., & Chen, D. (2022). Dynamic distribution of gut microbiota in pigs at different growth stages: composition and contribution. *Microbiology Spectrum* 10(3), e00688-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00688-21>.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: An alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology* 124(6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.13690>.
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2000). Salmonella enterica serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity* 68(12), 6763-6769.
- Stein, T. (2005). Bacillus subtilis antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
- Urdaneta, V., & Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in Medicine* 4, 163. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00163>.
- Zhu, J., Chen, Y., Imre, K., Arslan-Acaroz, D., Istanbulgil, F. R., Fang, Y., Ros, G., Zhu, K., & Acaroz, U. (2023). Mechanisms of probiotic bacillus against enteric bacterial infections. *One Health Advances* 1, 21. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00020-0>.

Safety and quick, long-lasting immune response of the ileitis vaccine in pigs with two schemes at 3 and 5 week-old

Thanh P. Nguyen¹, Thang D. Hoang¹, Duyen T. M. Pham¹, Tram T. N. Ngo¹,
Nghia D. Tran², Tuyen T. B. Nguyen², & Duy T. Do^{1*}

¹Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²MSD Animal Health Vietnam, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: September 14, 2024
Revised: November 01, 2024
Accepted: November 11, 2024

Keywords

Antibodies,
Ileitis
Lawsonia intracellularis
Pig
Safety

*Corresponding author

Do Tien Duy
Email:
duy.dotien@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Ileitis, or proliferative enteritis, is an important problem for industrial pig farming worldwide and in Vietnam. This study aimed to evaluate the safety and antibody response of the Porcilis[®]Ileitis inactivated vaccine using two vaccination schedules at 3 and 5 weeks of age in an industrial pig farm. The results showed that the vaccine was highly safe after vaccination at 3 and 5 weeks of age regarding both local and systemic reactions. The incidence of mild systemic reactions was less than 1% in the experimental groups V-3-A and V-3-B within two hours after injection. In vaccinated groups, antibody levels quickly reached positive (PI > 30%) two weeks after vaccination. Although the vaccination scheme was delayed at 5 weeks of age (V-5-A and V-5-B), the antibody titer after vaccination increased rapidly, reaching positive after only >1 week and increased higher than the group of pigs vaccinated at 3 weeks of age (groups V-3-A and V-3-B) at 11 weeks of age (6 weeks after vaccination). The antibody titer response after vaccination in experimental pigs remained high (PI = 70 - 80%) until slaughter. The antibody response did not peak during the observation period after vaccination. These findings indicate that the Porcilis[®]Ileitis inactivated vaccine provides high safety and a rapid, strong, and prolonged antibody response at both 3 and 5 weeks of age; particularly, achieving high titers during the post-weaning window in which pigs are particularly susceptible to *Lawsonia intracellularis*.

Cited as: Nguyen, T. P., Hoang, T. D., Pham, D. T. M., Ngo, T. T. N., Tran, N. D., Nguyen, T. T. B., & Do, D. T. (2025). Safety and quick, long-lasting immune response of the ileitis vaccine in pigs with two schemes at 3 and 5 week-old. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 66-75.

Sự an toàn và khả năng đáp ứng miễn dịch nhanh, kéo dài của vắc-xin phòng bệnh viêm hồi tràng trên heo theo hai quy trình tiêm 3 và 5 tuần tuổi

**Nguyễn Phương Thanh¹, Hoàng Đức Thắng¹, Phạm Thị Mỹ Duyên¹, Ngô Thị Ngọc Trâm¹,
Trần Đại Nghĩa², Nguyễn Thị Bích Tuyền² & Đỗ Tiến Duy^{1*}**

¹Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Công Ty MSD Animal Health Việt Nam, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 14/09/2024

Ngày chỉnh sửa: 01/11/2024

Ngày chấp nhận: 11/11/2024

Từ khóa

Heo

Kháng thể

Lawsonia intracellularis

Sự an toàn

Viêm hồi tràng

***Tác giả liên hệ**

Đỗ Tiến Duy

Email:

duy.dotien@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Viêm hồi tràng, thường được biết đến dưới dạng viêm ruột tăng sinh gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi heo công nghiệp của Thế giới và Việt Nam. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá sự an toàn và khả năng đáp ứng miễn dịch nhanh và kéo dài của vắc xin vô hoạt Porcilis[®]Ileitis theo hai quy trình tiêm lúc 3 và 5 tuần tuổi ở một trại chăn nuôi heo công nghiệp. Kết quả nghiên cứu cho thấy vắc-xin có độ an toàn cao (cục bộ và toàn thân) sau khi tiêm lúc 3 tuần tuổi và 5 tuần tuổi mỗi cá thể được tiêm 2 mL; tỷ lệ xuất hiện phản ứng toàn thân nhẹ (< 1%) ở heo tiêm lúc 3 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B) trong 2 giờ sau tiêm. Ở các lô tiêm phòng, hàm lượng kháng thể nhanh chóng đạt dương tính (PI > 30%) 2 tuần sau tiêm vắc xin. Mặc dù tiêm phòng trễ lúc 5 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-5-A và V-5-B), nhưng hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm tăng lên nhanh chóng đạt dương tính chỉ sau > 1 tuần và tăng cao hơn nhóm heo tiêm phòng lúc 3 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B) ở thời điểm 11 tuần tuổi (6 tuần sau tiêm phòng). Hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm phòng trên heo thí nghiệm kéo dài ở mức cao (PI = 70 - 80%) đến lúc xuất thịt, kháng thể đáp ứng chưa thấy đạt đỉnh trong thời gian quan sát sau tiêm phòng. Kết quả thí nghiệm cho thấy vắc xin vô hoạt Porcilis[®]Ileitis có sự an toàn cao, đáp ứng kháng thể nhanh, cao, kéo dài ở cả hai thời điểm tiêm phòng lúc 3 và 5 tuần tuổi; đặc biệt, hiệu giá kháng thể đạt mức cao ở tuần tuổi của heo có khả năng nhạy cảm cao với mầm bệnh.

1. Đặt Vấn Đề

Bệnh viêm ruột tăng sinh, viêm hồi tràng là một bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*) gây ra. Mầm bệnh gây viêm ruột tăng sinh làm lớp niêm mạc ruột dày lên bởi do sự nhân lên quá mức các tế bào mô tuyến ruột (McOrist & ctv., 1995), những tổn thương này thường xuất hiện ở hồi tràng nhưng cũng có thể lan rộng đến không tràng và kết tràng, tiêu chảy từ nhẹ đến nặng, hậu quả gây giảm trọng lượng. Hai dạng bệnh lý lâm sàng chính của viêm ruột tăng sinh đã được công bố từ rất sớm, cấp tính và mãn tính (Rowland, 1975). Biểu hiện lâm sàng của viêm hồi tràng thường được ghi nhận trong gia đoạn heo sau cai sữa (6 - 20 tuần), một số nghiên cứu xác định sự hiện diện của *L. intracellularis* trong phân heo sau cai sữa 10 đến 24 ngày tuổi, 12,9% dương tính trên heo thịt và 0,9% trên heo trưởng thành. Tỷ lệ nhiễm trong đàn có thể từ 30 - 50%. Ở các nước Châu Á ghi nhận tỷ lệ lưu hành khá cao Trung Quốc (40 - 100%), Nhật Bản (60%), Thái Lan (38%) và sự lưu hành ở Việt Nam là ghi nhận 35% (Do & ctv., 2023).

Giải pháp phổ biến để hạn chế tác động và thiệt hại đến năng suất đàn heo do viêm hồi tràng là sử dụng kháng sinh trong thức ăn (Wattanaphansak & ctv., 2009). Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi là vấn đề ngày càng đáng lo ngại, nhất là hiện trạng lạm dụng kháng sinh quá nhiều hoặc sử dụng kháng sinh không kê toa gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe con người, vật nuôi (Barton, 2000) antibiotic-resistant bacteria originating in animals are contributory factors, with some types of resistance in some species of bacteria. Antibiotics are added to animal feeds to treat and

prevent infections and to improve growth and production. Until recently, the major concerns about incorporation of antibiotics in animal feeds related to antibiotic residues in products from treated animals. Although, in 1969, the Swann (1969 và làm gia tăng các chủng vi sinh kháng thuốc. Điều này đòi hỏi cần có cách tiếp cận mới trong phòng chống bệnh cho vật nuôi khi việc sử dụng kháng sinh đang được khống chế, do đó chiến lược phòng ngừa bệnh hiệu quả và chủ động bệnh viêm hồi tràng là kích thích tạo miễn dịch đặc hiệu kéo dài bởi vắc xin phòng bệnh, kèm theo các biện pháp đảm bảo tốt về dinh dưỡng, chăm sóc và vệ sinh chuồng trại hiệu quả (Bronsvoot & ctv., 2001).

Hiện tại vắc xin nhược độc và vắc xin vô hoạt đã được thử nghiệm có hiệu quả và thương mại hoá tại các nước Châu Âu, Mỹ và một số nước Châu Á trong đó có Việt Nam. Trong một nghiên cứu năm 2018 tại Phần Lan ghi nhận việc sử dụng vắc xin sống nhược động giúp cải thiện năng suất đáng kể nhờ vào việc cải thiện tăng trọng bình quân trên ngày kết quả cũng được ghi nhận trong thử nghiệm trên môi trường trại tại Hàn Quốc. Đối với vắc xin vô hoạt cũng tạo ra sự bảo hộ đáng kể chống lại *L. intracellularis* thông qua các điểm số về lâm sàng, tăng trọng, giảm lượng vi khuẩn bài thải và giảm điểm tổn thương ở cả mức độ đại thể và vi thể ngoài ra còn giúp giảm tỷ lệ tử vong liên quan đến *L.intracellularis* (Peiponen & ctv., 2018). Vắc xin vô hoạt Porcilis[®]Ileitis được điều chế và cấp phép lưu hành tạo miễn dịch chủ động phòng bệnh viêm hồi tràng trên heo thịt vào các thời điểm có thể bị phơi nhiễm tự nhiên với *L. intracellularis* (Roerink & ctv., 2018). Quy trình khuyến cáo sử dụng vắc xin từ lúc 3 tuần tuổi để tạo miễn

dịch phòng viêm hồi tràng vào lúc sau cai sữa (Roerink & ctv., 2018; Jacobs & ctv., 2019); tuy nhiên, ở điều kiện thực tế chăn nuôi lúc 3 tuần tuổi có một số vắc xin phòng bệnh khác được ưu tiên sử dụng, thời điểm tiêm phòng gần ngày cai sữa (23 - 25 ngày) có thể gây tăng căng thẳng và áp lực lên quản lý trang trại, nên mối quan tâm của người chăn nuôi là nếu trì hoãn thời điểm tiêm phòng sau cai sữa (5 tuần tuổi) có mang lại hiệu quả cao (Blecha & ctv., 1983). Chính vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu đánh giá sự an toàn và khả năng đáp ứng miễn dịch nhanh, kéo dài của vắc xin vô hoạt Porcilis[®]Ileitis theo hai quy trình tiêm lúc 3 và 5 tuần tuổi.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Bố trí thí nghiệm

Tổng cộng 300 heo con khỏe mạnh, có sự đồng đều về giống (lai 3 máu Yorkshire x Landrace x Duroc) các heo con được đảm bảo sức khỏe ổn định với trọng lượng trung bình

đạt 7 kg. Để kiểm tra tình trạng sức khỏe của đàn, phương pháp lấy mẫu gộp được áp dụng, trong đó mẫu gộp được tạo bằng cách trộn mẫu từ nhiều cá thể, các mẫu này là mẫu máu lấy đại diện các cá thể trong các nghiệm thức (15 mẫu/nghiệm thức). Sau khi thu thập, mẫu gộp được dùng để xét nghiệm các bệnh quan trọng như CSFV, PRRSV, PCV2 và PEDV, giúp đánh giá tình trạng sức khỏe tổng quát của đàn heo một cách hiệu quả. Heo thí nghiệm được bố trí theo nguyên tắc đồng đều vào sáu lô thí nghiệm, mỗi lô thí nghiệm ở một ô chuồng ở cùng một dãy chuồng. Những ô chuồng có sự phân bố theo không gian xen kẽ để đảm bảo tính lặp lại và tương đồng (Bảng 1a & 1b). Thí nghiệm được lặp lại 2 lần ở 2 dãy chuồng với cùng một kiểu bố trí thí nghiệm. Tất cả heo thí nghiệm được chăm sóc, nuôi dưỡng và đối xử theo cùng điều kiện như nhau. Các chỉ tiêu đánh giá gồm sự an toàn sau tiêm, đáp ứng kháng thể và sự hiện diện *L. intracellularis* trong phân.

Bảng 1a. Bố trí thí nghiệm

Lô	Số heo	Porcilis [®] Ileitis	Liều lượng (mL/con)	Thời điểm thu mẫu
V-3-A	50	X, 3 tuần tuổi	2	3, 5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
V-5-A	50	X, 5 tuần tuổi	2	5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
V-3-B	50	X, 3 tuần tuổi	2	3, 5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
V-5-B	50	X, 5 tuần tuổi	2	5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
KV-3	50	O		3, 5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
KV-5	50	O		5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần
TỔNG	300			

X: có tiêm; O: không tiêm.

Bảng 1b. Bố trí các lô thí nghiệm trong dãy chuồng kín có điều hòa

Lối vào	Hệ thống làm mát (cooling pad)						Lối vào
Hành lang		Lối đi		Lối đi		Lối đi	Hành lang
	V-3-A		KV-3		V-5-A		
	V-5-B		KV-5		V-3-B		
Lối ra	Hệ thống quạt hút						Lối ra

2.2. Thu mẫu và xét nghiệm

Tổng cộng 195 mẫu phân và 585 mẫu huyết thanh được thu thập từ 2 lượt thí nghiệm. Trong đó, 5 mẫu phân được thu thập bằng tăm bông theo không gian phân bố ở 5 góc chuồng của nền chuồng trên mỗi lô của heo thí nghiệm. Ngoài ra, 15 mẫu máu trên mỗi lô thí nghiệm được lấy từ tĩnh mạch cổ với thể tích 2 mL và để đông tự nhiên trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Thời điểm thu thập mẫu và số lượng mẫu dựa trên bố trí thí nghiệm (Bảng 1a). Mẫu sau khi thu thập được đánh dấu, đóng gói và vận chuyển trong điều kiện nhiệt độ từ 4 - 8°C về phòng xét nghiệm.

2.3. Đánh giá sự an toàn

Theo dõi biểu hiện cục bộ và toàn thân sau tiêm phòng trên từng heo thí nghiệm vào các thời điểm ngay sau tiêm, 2, 6, 24 và 48 giờ sau tiêm, tất cả các con heo được quan sát hàng ngày để ghi nhận các dấu hiệu lâm sàng của bệnh viêm hồi tràng, bao gồm tình trạng cơ thể, mức độ sốt, cảm giác thèm ăn và điểm phân. Tất cả các bất thường cục bộ hay toàn thân đều được ghi nhận trong thí nghiệm (Roerink & ctv., 2018).

2.4. Kỹ thuật Enzyme-linked immunosorbent assay blocking (ELISA)

Phương pháp xét nghiệm xác định kháng thể kháng *L. intracellularis* được sử dụng trong

nghiên cứu theo hướng dẫn của bộ kit thương mại Svanovir *L. intracellularis*/Ileitis-Ab (Svanova, Thụy Điển), đọc kết quả ở bước sóng 450 nm trên máy ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific, USA). Hàm lượng kháng thể được xác định dựa theo giá trị PI (percent inhibition), âm tính khi giá trị PI < 30 và dương tính khi giá trị PI ≥ 30.

$$PI \% = \frac{OD \text{ đối chứng âm} - OD \text{ đối chứng dương}}{OD \text{ đối chứng âm}}$$

2.5. Kỹ thuật Realtime PCR

Mẫu phân được xử lý với dung dịch PBS 1X theo nghiên cứu trước đây của Pedersen & ctv. (2014). DNA tổng số được tách chiết theo hướng dẫn của bộ kit thương mại GeneJET™ Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lithuania). Sản phẩm DNA sau đó được bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng. Cặp mỗi đặc hiệu bao gồm mỗi xuôi (5'-GCGCGCGTAGGTGGTTATAT-3'), mỗi ngược (5'-GCCACCCTCTCCGATACTCA-3'), đoạn dò (5'-FAM-CACCGCTTAACGGTGGAACAGCCTT-TAMRA-3') và quy trình luân nhiệt được tham khảo từ nghiên cứu trước đây (Lindecrona & ctv., 2002).

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được quản lý bằng phần mềm MS Excel 2019 (Microsoft, USA) và được xử lý

thống kê bằng phần mềm Minitab 17.1 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, PA, USA). Cụ thể, phân tích phương sai và độ lệch chuẩn xử lý bằng mô hình ANOVA, giá trị trung bình của các kết quả tại cùng một thời điểm được so sánh với nhau bằng với trắc nghiệm Tukey. Các tỷ lệ được so sánh bằng trắc nghiệm χ^2 . Sự khác biệt của các kết quả được xem là có ý nghĩa về mặt thống kê khi $P < 0,05$.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Sự an toàn của vắc xin trên heo

Kết quả đánh giá cho thấy vắc xin có độ an toàn cao cả về khía cạnh cục bộ và toàn thân sau khi tiêm lúc 3 tuần tuổi và 5 tuần tuổi. Đánh giá biểu hiện Cục bộ và Toàn thân sau tiêm phòng qua theo dõi biểu hiện ở các thời điểm 0, 2, 6, 24 và 48 giờ sau tiêm, các tiêu chí đánh giá độ an toàn bao gồm phản ứng cục bộ tại chỗ tiêm (sưng, đỏ, và đau), biểu hiện toàn thân (sốt, trạng thái hoạt động, và hành vi ăn uống), và các phản ứng nghiêm trọng khác như sốc phản vệ. Các tiêu chí này được sử dụng để đánh giá mức độ an toàn của vắc xin thông qua việc quan sát và ghi nhận các biểu hiện cụ thể trong các khoảng thời gian quy định (Roerink & ctv., 2018). Tỷ lệ xuất hiện phản ứng toàn thân nhẹ rất thấp ($< 1\%$) ở heo tiêm lúc 3 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B) trong 2 giờ sau tiêm. Sau khi tiêm vắc xin, đột ngột xuất hiện cá thể heo có triệu chứng co giật và khó thở trong thời gian ngắn, ngay khi phát hiện, chúng được xử lý bằng cách tạt nước để hạ nhiệt, và các triệu chứng này nhanh chóng giảm bớt. Heo hồi phục và trở lại trạng thái bình thường mà không gặp vấn đề gì lâu dài.

Tuy nhiên, ở nhóm heo tiêm vắc xin thời điểm 5 tuần tuổi (V-5-A/B) không ghi nhận bất kỳ phản ứng nào, thông số này cho thấy phản ứng có thể chỉ xảy ra ở heo nhỏ tuổi và tỷ lệ rất

thấp nằm trong ngưỡng cho phép của một vắc xin phòng bệnh. Ở nghiên cứu của Roerink năm 2018, trong thí nghiệm đánh giá vắc xin bất hoạt phòng bệnh viêm hồi tràng không ghi nhận phản ứng cục bộ ở vị trí tiêm hay toàn thân nào ở heo thí nghiệm 3 tuần tuổi (Roerink & ctv., 2018). Phản ứng sau tiêm có thể xảy ra trên heo khi việc cầm giữ, thời tiết, thao tác kỹ thuật, vị trí tiêm hay chất lượng kim tiêm chưa được tối ưu gây ra một số biểu hiện hồi hộp, mệt mỏi một thời gian ngắn sau tiêm.

3.2. Đáp ứng kháng thể sau tiêm phòng

Kết quả đánh giá kháng thể giữa lô heo tiêm phòng lúc 3, 5 tuần và heo đối chứng ở các thời điểm thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 1. Ở các lô tiêm phòng, hàm lượng kháng thể nhanh chóng đạt dương tính ($PI > 30\%$) 2 tuần sau tiêm vắc xin. Ở nhóm heo tiêm phòng lúc 3 tuần tuổi, hai lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B không có sự khác nhau đáng kể về đáp ứng kháng thể ở các thời điểm 3, 5, 7, 11 tuần tuổi, nhưng rất khác biệt so với nhóm heo đối chứng không tiêm phòng từ 2 tuần sau khi tiêm, sự khác biệt giữa heo của nhóm tiêm và không tiêm ở thời điểm 7, 11, 15, 19 và 22 tuần tuổi với $P < 0,001$. Tương tự, với nhóm heo tiêm phòng lúc 5 tuần tuổi (hai lô thí nghiệm V-5-A và V-5-B), mặc dù ở thời điểm tiêm phòng lúc 5 tuần tuổi hàm lượng kháng thể có khác biệt ($P < 0,05$) nhưng từ 2 tuần sau tiêm (tuần tuổi 7) trở đi hàm lượng kháng thể này không còn sự khác biệt giữa hai nhóm. Sự khác biệt hàm lượng kháng thể giữa hai lô tiêm phòng lúc 5 tuần có rất ý nghĩa ($P < 0,001$) so với heo ở lô đối chứng ở các thời điểm 7, 11, 15, 19 và 22 tuần tuổi. Sự đáp ứng kháng thể giữa các lô heo tiêm phòng lúc 3 tuần tuổi và 5 tuần tuổi dường như không khác biệt kể từ thời điểm 11, 15, 19 và 22 tuần tuổi ở heo thí nghiệm. Mặc dù tiêm phòng trễ lúc 5 tuần tuổi

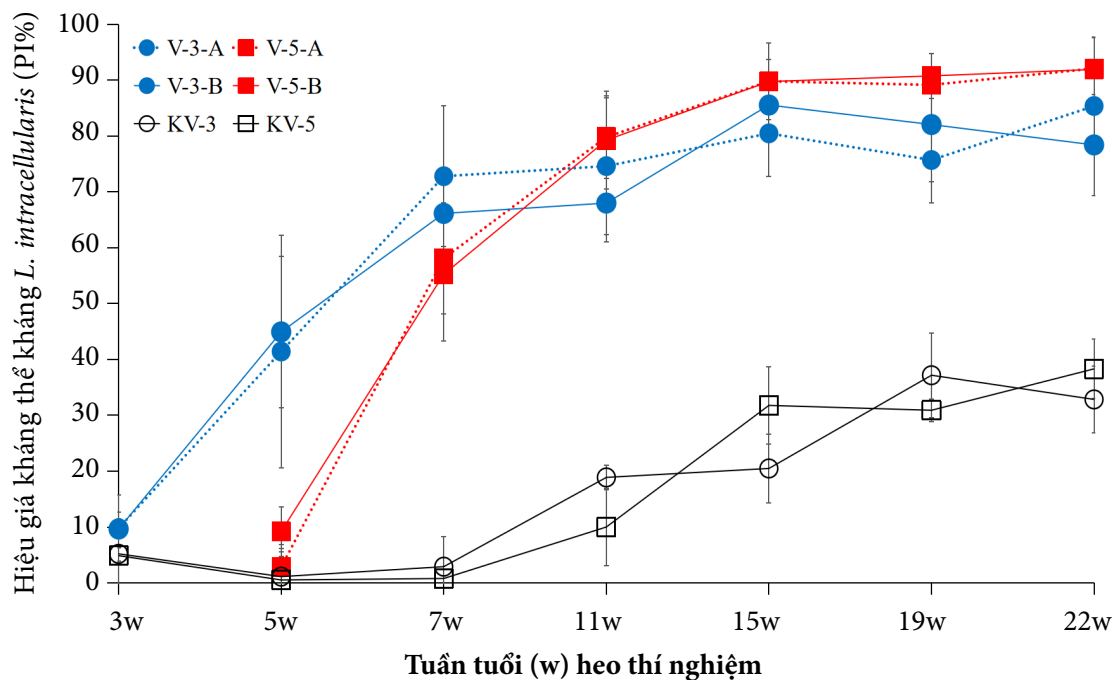
(Lô thí nghiệm V-5-A và V-5-B), nhưng hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm tăng lên nhanh chóng đạt dương tính chỉ sau >1 tuần và tăng cao hơn nhóm heo tiêm phòng 3 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B) ở thời điểm 11 tuần tuổi (6 tuần sau tiêm phòng). Việc tiêm phòng

heo 3 tuần tuổi có thể do sự can thiệp kháng thể mẹ truyền (Karuppannan & ctv., 2023). Hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm phòng trên heo thí nghiệm kéo dài ở mức cao (PI = 70 - 80%) đến lúc xuất thịt, kháng thể đáp ứng chưa thấy đạt đỉnh trong thời gian quan sát sau tiêm phòng.

Bảng 2. Hiệu giá kháng thể kháng *L. intracellularis* (PI%) ở các thời điểm

Lô	Tuần tuổi						
	3	5	7	11	15	19	22
V-3-A	9,8±5,9 ^a	41,4±20,8 ^a	72,8±12,6 ^a	74,6±12,2 ^{ab}	80,5±7,7 ^a	75,7±7,7 ^c	85,4±5,9 ^a
V-5-A	-	2,9±4,1 ^a	58,1±9,9 ^{bc}	79,8±7,4 ^a	89,8±6,9 ^a	89,2±5,6 ^{ab}	92,1±5,5 ^a
V-3-B	9,6±3,0 ^{ab}	44,9±13,6 ^a	66,2±6,7 ^{ab}	68,0±6,9 ^b	85,6±4,9 ^b	82,1±10,2 ^{bc}	78,4±9,1 ^b
V-5-B	-	9,2±4,5 ^b	55,3±11,9 ^c	79,1±8,7 ^a	89,8±3,9 ^a	90,7±4,0 ^a	91,9±5,8 ^a
KV-3	5,2±6,3 ^{bc}	1,1±4,5 ^b	2,9±5,4 ^d	18,8±2,2 ^c	20,5±6,2 ^d	37,2±7,6 ^d	32,9±5,9 ^c
KV-5	-	0,5±5,7 ^b	0,8±3,7 ^d	10,0±6,9 ^d	31,8±6,9 ^c	30,9±2,0 ^d	38,3±5,3 ^d

Kí hiệu a, b, c, d trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.



Hình 1. So sánh đáp ứng kháng thể ở các lô heo thí nghiệm theo các tuần tuổi khảo sát. Thời điểm tiêm phòng lúc 3 tuần tuổi (Lô V-3-A và V-3-B), lúc 5 tuần tuổi (Lô V-5-A và V-5-B) và không tiêm phòng (Lô KV-3 và KV-5).

Trong nghiên cứu này, việc so sánh hiệu quả của vắc xin được ghi nhận các khác biệt ở các thời điểm đáp ứng miễn dịch. Thời điểm trước khi tiêm tất cả mẫu kiểm tra kháng thể kháng *L. intracellularis* đều âm tính, tuy nhiên sau tiêm phòng cả hai thời điểm tiêm đều cho thấy đáp ứng miễn dịch tăng rõ rệt sau 2 tuần, hầu hết các heo thu mẫu đều chuyển dương đạt chỉ số phần trăm ức chế (PI%) cao hơn 30. Sự đáp ứng kháng thể đặc hiệu với *L. intracellularis* có thể tăng lên đáng kể 3-4 tuần sau khi gây nhiễm (Roerink & ctv., 2018; Obradovic & Wilson, 2020; Campillo & ctv., 2021).

So sánh kết quả đáp ứng kháng thể giữa nhóm heo tiêm 3 và 5 tuần có sự tương đồng cao từ tuần tuổi 11 trở đi, tức là 6 tuần sau tiêm phòng của nhóm heo tiêm 5 tuần và 8 tuần ở nhóm heo tiêm 3 tuần. Mặc dù tiêm phòng trễ lúc 5 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-5-A và V-5-B), nhưng hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm tăng lên nhanh chóng đạt dương tính chỉ sau >1 tuần và tăng cao hơn nhóm heo tiêm phòng 3 tuần tuổi (Lô thí nghiệm V-3-A và V-3-B) bắt đầu từ tuần 11 đến khi kết thúc thí nghiệm. Sự đáp ứng kháng thể nhanh sau tiêm có thể do ở thời điểm 5 tuần hàm lượng kháng thể mẹ truyền thấp nên không gây ảnh hưởng đến đáp ứng của vắc xin (Lawhorn & ctv., 1994; Hodgins & ctv., 2004), từ đó tạo ra đáp ứng miễn dịch cao tối ưu. Hiệu giá kháng thể đáp ứng sau tiêm phòng trên heo thí nghiệm kéo dài ở mức cao (PI=70-80%) đến lúc xuất thịt, chưa thấy đạt đỉnh trong thời gian quan sát sau tiêm phòng cho thấy khả năng phòng bệnh kéo dài của kháng thể cho đến khi heo trưởng thành. Kết quả này có ý nghĩa cho người chăn nuôi lựa chọn chương trình tiêm phòng hiệu quả lúc 3 hoặc 5 tuần tuổi trên heo.

Theo Walter & ctv. (2004), thời điểm tối ưu cho việc tiêm phòng viêm hồi tràng là ở khoảng 5 - 8 tuần tuổi. Kết quả từ các nghiên cứu và

nghiên cứu này làm nổi bật được tầm quan trọng của việc xác định thời điểm tiêm chủng để tối ưu hoá hiệu quả của vắc xin, mặt khác sự hiện diện kháng thể mẹ truyền đặc biệt ở những tuần đầu sau sinh, có thể ảnh hưởng đến sự đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng đặc biệt đối tượng heo trong 3 tuần tuổi (Karuppannan & ctv., 2023). Tiêm chủng thời điểm sau cai sữa *muộn có thể hạn chế được ảnh hưởng do kháng thể mẹ truyền và hiệu quả đáp ứng sẽ mạnh mẽ, kéo dài hơn.* Tuy nhiên, trong một số trường hợp cần tiêm phòng sớm khi áp lực nhiễm trùng “cửa sổ nhạy cảm” của mầm bệnh ngay vào lúc sau cai sữa, mặc dù thời điểm nhạy cảm chính với *L. intracellularis* lúc sau 10 tuần tuổi, nhất là lúc > 16 tuần tuổi (Rowland, 1975; Kroll & ctv., 2005; Campillo & ctv., 2021).

3.3. Sự hiện diện *L. intracellularis* trên heo

Phân tích bán định lượng *L. intracellularis* trong mẫu phân thu thập từ các lô heo thí nghiệm tại các mốc thời gian cụ thể là 3, 5, 7, 11, 15, 19 và 22 tuần tuổi cho kết quả âm tính ở cả heo đối chứng và heo tiêm phòng. Tuy nhiên, thời điểm tuần 11 trở đi heo ở hai lô đối chứng (KV-3, KV-5) có sự chuyển dương kháng thể và đạt dương tính vào tuần tuổi 15, 19 và 22 trong thí nghiệm.

Thí nghiệm được thực hiện tại trại thịt thương phẩm mới, có áp dụng an toàn sinh học tốt “cùng vào-cùng ra” trong thời gian thí nghiệm, đã giúp cho trại an toàn với nhiều mầm bệnh trong đó có *L. intracellularis*. Kết quả theo dõi lâm sàng tiêu chảy, tình trạng phân và xác định mầm bệnh bởi Realtime PCR có thể cho thấy đàn heo thí nghiệm không bộc phát nhiễm trùng *L. intracellularis*. Tuy nhiên, sự chuyển dương kháng thể ở giai đoạn vỗ béo là bằng chứng của hiện tượng nhiễm trùng cận lâm sàng mầm bệnh này mặc dù không biểu hiện lâm sàng. Sự chuyển đổi huyết thanh ở các lô đối chứng

nhưng vi khuẩn không được phát hiện qua kỹ thuật Realtime PCR có thể giải thích được bởi do giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp có thể là nguyên nhân không phát hiện được mầm bệnh ở tải lượng nhiễm thấp. Theo ghi nhận ở một nghiên cứu (Smith & McOrist, 1997) cho thấy được sự bài thải *L. intracellularis* từ 2 đến 10 tuần sau nhiễm trong khoảng dao động từ 510^4 đến 710^8 vi khuẩn/gram phân và phương pháp Realtime PCR sử dụng trong nghiên cứu này có LOD là 410^4 vi khuẩn/gram phân. Ngoài ra, chất lượng mẫu và sự hiện diện của các yếu tố ức chế trong phân được ghi nhận trong nghiên cứu khác (Nathues & ctv., 2009) cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả Realtime PCR, làm giảm khả năng phát hiện của phương pháp.

4. Kết Luận

Các chỉ tiêu nghiên cứu cho thấy vắc xin vô hoạt Porcilis[®]Ileitis có sự an toàn cao, đáp ứng kháng thể nhanh, cao, kéo dài ở cả hai quy trình tiêm phòng lúc 3 và 5 tuần tuổi; đặc biệt, hiệu giá kháng thể đạt mức cao để có đáp ứng miễn dịch tốt cho heo ở tuần tuổi có khả năng nhạy cảm với mầm bệnh.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan nghiên cứu do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* 13(2), 279-299. <https://doi.org/10.1079/095442200108729106>.
- Blecha, F., Pollmann, D. S., & Nichols, D. A. (1983). Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *Journal of Animal Science* 56(2), 396-400. <https://doi.org/10.2527/jas1983.562396x>.
- Bronsvort, B., Norby, B., Bane, D., & Gardner, I. (2001). Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *Journal of Swine Health and Production* 9(6), 285-290.
- Campillo, M., Smith, S. H., Gally, D. L., & Opriessnig, T. (2021). Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33(4), 621-631. <https://doi.org/10.1177/10406387211003551>.
- Do, D. T., & Nguyen, N. H. (2023). *Textbook of swine infectious diseases*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Hodgins, D. C., Shewen, P. E., & Dewey, C. E. (2004). Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 12(1), 10-16.
- Jacobs, A. A. C., Harks, F., Hazenberg, L., Hoeijmakers, M. J. H., Nell, T., Pel, S., & Segers, R. P. A. M. (2019). Efficacy of a novel inactivated *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. *Vaccine* 37(15), 2149-2157. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.067>.
- Karuppannan, A. K. (2023). Editorial: *Lawsonia intracellularis*: a problem well understood is a problem half solved. *Frontiers in Veterinary Science* 10, 1203702. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1203702>.
- Kroll, J. J., Roof, M. B., Hoffman, L. J., Dickson, J. S., & Harris, D. L. H. (2005). Proliferative enteropathy: A global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews* 6(2), 173-197. <https://doi.org/10.1079/ahr200>.
- Lawhorn, B., McConnell, S., Kit, M., & Kit, S. (1994). Vaccination of newborn pigs in the presence of low levels of pseudorabies colostral antibodies. *Vaccine* 12(7), 601-606. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)90263-1](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)90263-1).

- Lindecrona, R. H., Jensen, T. K., Andersen, P. H., & Møller, K. (2002). Application of a 5' nuclease assay for detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal samples from pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 40(3), 984-987. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.984-987.2002>.
- McOrist, S., Gebhart, C. J., Boid, R., & Barns, S. M. (1995). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. Nov., sp. Nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(4), 820-825. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-820>.
- Obradovic, M. R., & Wilson, H. L. (2020). Immune response and protection against *Lawsonia intracellularis* infections in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 219, 109959. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109959>.
- Pedersen, K. S., Johansen, M., Jorsal, S. E., Nielsen, J. P., Bækbo, P., & Angen, O. (2014). Pooling of porcine fecal samples for quantification of *Lawsonia intracellularis* by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26(3), 42-345. <https://doi.org/10.1177/1040638714524572>.
- Peiponen, K. S., Tirkkonen, B. T., Junnila, J. J. T., & Heinonen, M. L. (2018). Effect of a live attenuated vaccine against *Lawsonia intracellularis* in weaned and finishing pig settings in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 60(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0374-8>.
- Roerink, F., Morgan, C. L., Knetter, S. M., Passat, M.-H., Archibald, A. L., Ait-Ali, T., & Strait, E. L. (2018). A novel inactivated vaccine against *Lawsonia intracellularis* induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. *Vaccine* 36(11), 1500-1508. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.049>.
- Rowland, A. C. (1975). Porcine intestinal adenomatosis: A possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. *The Veterinary Record* 97(10), 178-181. <https://doi.org/10.1136/vr.97.10.178>.
- Smith, S. H., & McOrist, S. (1997). Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Research in Veterinary Science* 62(1), 6-10. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(97\)90171-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90171-5).
- Walter, D., Gebhart, C., Kroll, J., Holck, J. T., & Chittick, W. (2004). Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production* 12(6), 310-313.
- Wattanaphansak, S., Singer, R. S., & Gebhart, C. J. (2009). In vitro antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. *Veterinary Microbiology* 134(3/4), 305-310.

Evaluation of the antibacterial activity of *Garcinia mangostana* L. peel extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from canine wounds

Xuan N. T. Nguyen*, Hieu M. Bui, Hau T. H. Tran, Trung M. Nguyen, & Yen T. H. Tran

Department of Infectious Diseases and Veterinary Public Health, Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Research Paper Received: September 08, 2024 Revised: November 07, 2024 Accepted: November 14, 2024 Keywords Antibacterial activity Antibiotic resistance <i>Garcinia mangostana</i> L. peel extract <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> *Corresponding author Nguyen Ngoc Thanh Xuan Email: xuan.nguyennngocthanh@hcmuaf.edu.vn	<i>Garcinia mangostana</i> L. (mangosteen) peel extract was prepared using a rotary evaporator with 95% ethanol as a solvent and evaluated for its antibacterial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains isolated from canine wounds. In total, 52 wound samples from 52 dogs were collected, with 32 bacterial strains isolated, including 20 strains of <i>Staphylococcus aureus</i> and 12 strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Most strains in the study were resistant to penicillin and ampicillin (80 - 100%). The resulting extract was a fine, reddish-brown powder with a pungent odor and an extraction yield of 10.17%. Its activity against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> was tested by agar diffusion method. Diameters of inhibition zones ranged from 19.60 mm to 23.10 mm for <i>Staphylococcus aureus</i> and from 10 mm to 17.37 mm for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> at different concentrations of 50 - 200 mg/mL. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of the extract were 1.25 mg/mL and 2.5 mg/mL for <i>Staphylococcus aureus</i>, and 50 - 70 mg/mL and 150 mg/mL for <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, respectively. The results of this study indicate that mangosteen peel extract inhibits both Gram positive and Gram negative bacteria and has potential applications in the development of biomedical products.

Cited as: Nguyen, X. N. T., Bui, H. M., Tran, H. T. H., Nguyen, T. M., & Tran, Y. T. H. (2025). Evaluation of the antibacterial activity of *Garcinia mangostana* L. peel extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from canine wounds. *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 76-88.

Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết vỏ măng cụt (*Garcinia mangostana* L) trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* phân lập trên vết thương của chó

Nguyễn Ngọc Thanh Xuân*, Bùi Minh Hiếu, Trần Thị Hải Hậu, Nguyễn Minh Trung & Trần Thị Hải Yến
Bộ Môn Bệnh Truyền Nhiễm và Thú Y Cộng Đồng, Khoa Chăn Nuôi Thú Y,
Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 08/09/2024

Ngày chỉnh sửa: 07/11/2024

Ngày chấp nhận: 14/11/2024

Từ khóa

Cao chiết vỏ quả măng cụt

Để kháng kháng sinh

Hoạt tính kháng khuẩn

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

*Tác giả liên hệ

Nguyễn Ngọc Thanh Xuân

Email:

xuan.nguyennngocthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Cao vỏ quả măng cụt (MG) được chiết xuất bằng phương pháp cô quay chân không với dung môi là ethanol 95° và kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn trên *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* phân lập trên vết thương của chó. Trong tổng 52 mẫu bệnh phẩm trên 52 con chó, xác định được 32 chủng vi trong đó bao gồm 20 chủng *S. aureus* và 12 chủng *P. aeruginosa*. Đa số các chủng vi khuẩn phân lập được đều kháng kháng sinh penicillin và ampicillin (tỷ lệ từ 80 - 100%). MG có dạng bột mịn màu nâu đỏ, mùi hắc với hiệu suất chiết đạt 10,17%. Hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* của cao chiết được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ khoảng 19,60 mm đến 23,10 mm đối với *Staphylococcus aureus* và từ 10 mm đến 17,37 mm đối với *Pseudomonas aeruginosa* ở nồng độ cao chiết từ 50 mg/mL đến 200 mg/mL. Giá trị MIC và MBC của cao chiết lần lượt là 1,25 mg/mL và 2,5 mg/mL trong trường hợp *Staphylococcus aureus*, 50 - 70 mg/mL và 150 mg/mL đối với *Pseudomonas aeruginosa*. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng ức chế cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm của cao chiết từ vỏ quả măng cụt và tiềm năng ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm y sinh.

1. Đặt Vấn Đề

Các vết thương trên chó có thể xuất phát từ nhiều nguyên nhân như cắn nhau, triệt sản, hoặc thậm chí bị chích điện, và xu hướng này ngày càng gia tăng, gây nhiều phiền toái cho chủ nuôi. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) và *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) là hai loài vi khuẩn thường trực nhất trên da. Khi gặp điều kiện thuận lợi, chúng dễ dàng trở thành một trong những tác nhân gây nhiễm trùng vết thương. Một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phân lập của hai vi khuẩn này từ các ca bệnh ngoài da ở chó khá cao, với *P. aeruginosa* chiếm 33,93% và *S. aureus* chiếm tới 56,4%. Việc lạm dụng kháng sinh đã khiến hai chủng vi khuẩn này ngày càng trở nên kháng thuốc dẫn đến khó khăn trong điều trị các bệnh nhiễm trùng, kéo dài thời gian điều trị, tăng nguy cơ tử vong, và tạo gánh nặng cho hệ thống y tế. Cũng theo các nghiên cứu trên, *S. aureus* cho thấy tỷ lệ đề kháng cao đối với các kháng sinh nhóm beta-lactam (81,8%), nhóm fluoroquinolones (56,4%). Nghiên cứu về sự nhạy cảm của kháng sinh đối với *P. aeruginosa* cho thấy, vi khuẩn này ít nhạy cảm nhất đối với polymyxin B (1,72%), tobramycin (8,62%) và ciprofloxacin (17,24%). Do đó, việc thúc đẩy tìm kiếm các giải pháp thay thế, đặc biệt là các hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ tự nhiên trở nên cấp thiết.

Cao chiết từ thảo dược, với lịch sử ứng dụng lâu đời trong y học cổ truyền, đang được quan tâm đặc biệt nhờ tiềm năng kháng khuẩn đa dạng và khả năng hạn chế sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc. Nghiên cứu này không chỉ hướng đến công nghệ xanh mà còn muốn cải thiện tình trạng lạm dụng kháng sinh trong điều trị - một trong những nguyên nhân làm đề kháng

kháng sinh xảy ra nhanh và nghiêm trọng. Măng cụt (*Garcinia mangostana* Linn.) chứa nhiều thành phần hóa học có giá trị như các hợp chất phenolic, bao gồm xanthones, procyanidins, flavonoid và anthocyanin trong nhiều bộ phận như lá, vỏ, lõi gỗ và quả. Từ lâu măng cụt đã được sử dụng như một bài thuốc quý trong điều trị đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, và các bệnh lý về da (loét, chàm, tăng sừng, bệnh vẩy nến). Vỏ quả măng cụt chứa nhiều hoạt chất kháng khuẩn như xanthone, α -, β - và γ -mangostin... Xuất phát từ thực tiễn đề tài này được thực hiện với mục đích đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ vỏ quả măng cụt để cho thấy tiềm năng có thể dùng hỗ trợ hoặc thay thế kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10/2023 đến tháng 09/2024 tại phòng thực hành Kiểm nghiệm thú sản và Môi trường sức khỏe vật nuôi, Khoa CNTY, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, phòng thí nghiệm CT121 Bộ Môn Hợp Chất Thiên Nhiên- Khoa Công Nghệ Kỹ Thuật Hóa Học và Thực Phẩm.

2.2. Vật liệu

Quả măng cụt tươi được mua tại một nhà vườn tỉnh Đồng Nai trong tháng 8 năm 2023, phần vỏ được trữ đông ở -20°C và được dùng để thu vỏ chiết cao. Các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* được phân lập từ vết thương chó đến khám tại phòng khám thú y Pet POLA, TP. Thủ Đức từ tháng 10/2023 đến 11/2023.

2.3. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và định danh vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* trên vết thương của chó

- Thực hiện kháng sinh đồ để chọn chủng vi khuẩn đa đề kháng

- Chiết cao từ vỏ quả măng cụt

- Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết trên các chủng vi khuẩn phân lập được

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* từ vết thương của chó

Lấy mẫu: Dùng tăm bông vô trùng phết trên bề mặt vết thương bị nhiễm trùng ($n = 52$). Sau đó được đựng trong ống eppendorf và bảo quản bằng đá khô chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 12 giờ để tiến hành phân lập, định danh. Các mẫu tăm bông được ủ trong môi trường Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India) trong 24 giờ ở 37°C. Mẫu sau khi tăng sinh trong

môi trường canh BHI sẽ được cấy ria sang môi trường chuyên biệt Mannitol Salt Agar (MSA, Himedia, Ấn Độ) cho *S. aureus* và cetrinide agar (Himedia, India) cho *P. aeruginosa*. Những mẫu dương tính trên hai môi trường này sẽ tiến hành nhuộm gram và định danh bằng phương pháp phản ứng chuỗi Polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR: DNA của vi khuẩn được ly trích bằng phương pháp sốc nhiệt (Nguyen & ctv., 2019; Abed & ctv., 2020). Các primer đặc trưng cho *S. aureus* và *P. aeruginosa* được trình bày ở Bảng 1. Vi khuẩn *S. aureus* được định danh bằng kỹ thuật PCR dựa trên đoạn gen Sa442 (Martineau & ctv., 1998). Định danh *P. aeruginosa* sử dụng đoạn mã dựa trên gen O-antigen acetylase được mô tả trong nghiên cứu của Choi & ctv. (2013). Chu trình nhiệt tham khảo theo Khudiar & ctv. (2016) cho *S. aureus* và Choi & ctv. (2013) cho *P. aeruginosa*. Mỗi mẫu dương tính sẽ chọn một chủng đã được phân lập trên môi trường chọn lọc để thực hiện các bước tiếp theo của đề tài.

Bảng 1. Primer sử dụng trong phương pháp PCR để định danh vi khuẩn

Vi khuẩn	Gen	Primer	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
<i>S. aureus</i>	Sa442	Forward	AATCTTTGTCGGTACACGATATT	108
		Reverse	CACG CGTAATGAGATTTCAGTAGA- TAATACAACA	
<i>P. aeruginosa</i>	O-antigen acetylase	Forward	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGT-	232
		Reverse	TATC GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC	

2.4.2. Thực hiện kháng sinh đồ trên các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* phân lập được

Kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn *S. aureus* (n = 20) và *P. aeruginosa* (n = 12) được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch Mueller-Hinton (MHA, Himedia, India). Vi khuẩn được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% và đo OD₆₀₀ = 0,3 (mật độ 1-3 x 10⁸ CFU/mL) dùng tấm bông phết đều trên môi trường thạch đĩa MHA và đặt các đĩa kháng sinh tham khảo theo nghiên cứu của Nguyen & Nguyen (2016) gồm: penicillin (Pn), ampicillin (Am), amoxicillin (Ax), streptomycin (Sm), gentamicin (Ge), norfloxacin (Nr), colistin (Co) - nồng độ 10 µg/đĩa; neomycin (Ne), kanamycin (Kn), amikacin (Ak), tetracyclin (Te), doxycyclin (Dx) - nồng độ 30 µg/đĩa; ofloxacin - nồng độ 5 µg/đĩa và trimethoprim/sulfamethoxazol (Bt) với nồng độ là 1,25/23,75 µg/đĩa được mua tại công ty Nam Khoa. Mẫu được ủ ở 37°C trong 18 giờ đến 24 giờ, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh các đĩa giấy kháng sinh theo tiêu chuẩn CLSI (2020). Thí nghiệm này sẽ chọn 3 chủng *S. aureus* và 3 chủng *P. aeruginosa* đa đề kháng kháng sinh để thực hiện các thí nghiệm về sau (Bảng 4).

2.4.3. Phương pháp chiết cao vỏ quả măng cụt

Quả măng cụt tươi được mua tại nhà một vườn tỉnh Đồng Nai tại thời điểm tháng 8/2023 sẽ được tách riêng vỏ. Sau đó, phần vỏ sẽ được rửa sạch và xay nhuyễn trong ethanol 95° với tỉ lệ 1:10, tiếp tục ngâm trong 3 ngày tại nhiệt độ phòng. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 (kích thước lỗ 11 µm), và cô đuổi dung môi để thu cao chiết. Cao được bảo quản ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm đánh giá khả năng kháng khuẩn (Nguyen & ctv., 2023).

Hiệu suất chiết cao: H (%) = [Khối lượng cao thu được sau cô quay (g)/Khối lượng mẫu khô (g)] x 100

2.4.4. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết vỏ quả măng cụt

Vi khuẩn sau khi chọn lựa ở thí nghiệm 2.4.2 gồm 3 chủng *S. aureus*, 3 chủng *P. aeruginosa* đa đề kháng kháng sinh và chủng *S. aureus* ATCC 25923 (*S.ATCC* 25923), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (*P.ATCC* 27853) được dùng làm chủng đối chứng. Huyền dịch vi khuẩn được pha loãng trong dung dịch NaCl 0.85% và đo OD₆₀₀ = 0,3. Tiếp theo canh khuẩn được trải đều trên môi trường MHA có đục các giếng đường kính d = 6 mm, nhỏ lần lượt 100 µL cao chiết pha trong DMSO 5% vào các giếng với các nồng độ được tham khảo theo theo tác giả Janardhanan & ctv. (2017) và Andani & ctv. (2021) có điều chỉnh với nồng độ từ 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL, đến 200 mg/mL và DMSO 5% vô trùng được dùng làm đối chứng âm. Tất cả các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được biểu thị bằng đường kính trung bình của vùng vô khuẩn tính bằng mm ± độ lệch chuẩn (SD).

2.4.5. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của MG đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa*

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được thực hiện trên đĩa nuôi cấy tế bào polystyrene 96 giếng chứa môi trường MHB (Razani & ctv., 2024) các nồng độ chọn lựa dựa theo nghiên cứu Janardhanan & ctv. (2017) có sự điều chỉnh nồng độ từ 0,625 mg/mL; 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL; 10 mg/mL; 15 mg/mL; 20 mg/mL; 30 mg/mL; và đến 40 mg/mL đối với *S. aureus* và từ 70 mg/mL; 80 mg/

mL; 90 mg/mL; 100 mg/mL; 110 mg/mL; 120 mg/mL; 130 mg/mL; 140 mg/mL; 150 mg/mL đối với *P. aeruginosa*. Mật độ vi khuẩn sau khi đo $OD_{600} = 0,3$ được pha loãng 100 lần trong từng giếng sao cho tổng thể tích mỗi giếng đạt 200 μ L. Đối chứng dương gồm dịch khuẩn và môi trường, đối chứng âm gồm môi trường và cao chiết và giếng kiểm soát nhiễm khuẩn chỉ chứa môi trường. Nồng độ MIC và MBC xác định theo công thức của Sultanbawa & ctv. (2009).

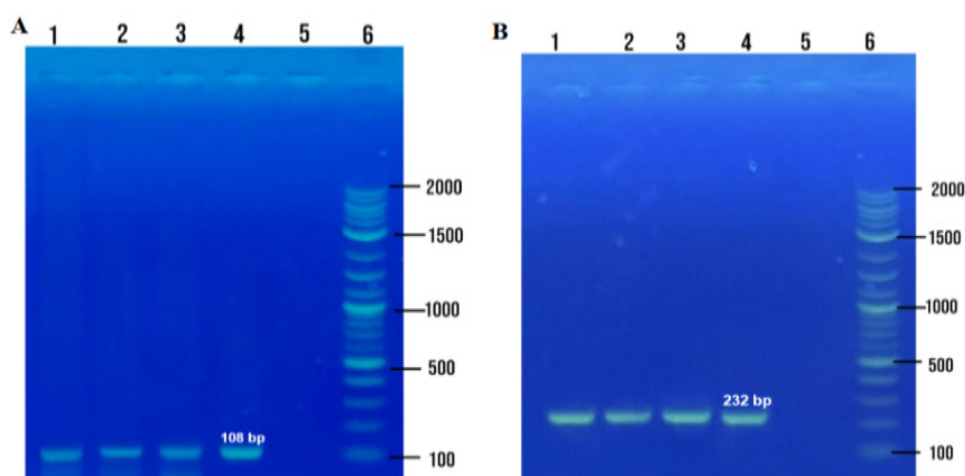
2.5. Xử lý thống kê

Phần mềm Minitab 17.0 và test Tukey 1 yếu tố được sử dụng để so sánh sự khác biệt về mặt thống kê của các số liệu trong đề tài với độ tin cậy 95%.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* trên vết thương của chó

Trong tổng 52 mẫu bệnh phẩm lấy từ 52 con chó, chúng tôi đã xác định được 32 chủng vi khuẩn trong đó bao gồm 20 chủng *S. aureus* và 12 chủng *P. aeruginosa* bằng phương pháp PCR (Hình 1) sau khi phân lập vi khuẩn qua hai môi trường chuyên biệt. Từ kết quả trên 20 chủng *S. aureus* và 12 chủng *P. aeruginosa* được thực hiện làm kháng sinh đồ để chọn các chủng đa đề kháng.



Hình 1. Kết quả PCR định danh vi khuẩn *S. aureus* (A) và *P. aeruginosa* (B). Giếng 1,2,3: sản phẩm PCR, Giếng 4: đối chứng dương, Giếng 5: đối chứng âm, Giếng 6: ladder.

3.2. Sự nhạy cảm đối với kháng sinh đối với các chủng *S. aureus* và *P. aeruginosa*

Kết quả kháng sinh đồ được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3 cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được vẫn còn nhạy cảm với norfloxacin và ofloxacin với tỉ lệ lần lượt là 80 đến 85% đối *S. aureus* và từ 75 đến 83,33% đối với *P. aeruginosa*. Kết quả cũng cho thấy hai kháng sinh bị đề kháng mạnh là penicillin và ampicillin với tỉ lệ lần lượt

trên *S. aureus* là 90%, 80% và đề kháng hoàn toàn trong trường hợp của *P. aeruginosa*. Trong khảo sát của Moerer & ctv. (2018) về tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây bệnh trên chó mèo tại Đức qua các năm nhận thấy các chủng *S. aureus* phân lập từ chó với tỷ lệ kháng penicillin G đạt mức cao nhất trong năm 2015 (86%), trong khi tỷ lệ kháng ampicillin là 83% ở năm 2018. Trong nghiên cứu của Eliasi & ctv. (2020), các chủng *P. aeruginosa* được phân lập từ những

con chó nhập viện tại một bệnh viện thú y ở Nam Phi trong khoảng thời gian từ tháng 1 năm 2007 đến tháng 12 năm 2013. Kết quả cho thấy gần như toàn bộ các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu đề kháng với penicillin-G (96%) và amoxicillin/ampicillin (92%). Sự gia tăng đề kháng kháng sinh của hai chủng vi khuẩn này có thể bắt nguồn từ việc lạm dụng kháng sinh trong phòng và điều trị bệnh thú y. Ngoài ra, một số cơ chế nội tại cũng góp phần vào khả năng kháng thuốc của chúng, chẳng hạn như việc sản xuất enzyme β -lactamase AmPc và sự hiện diện của

các hệ thống bơm ngoại màng như MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN, và MexX-MexY-OprM. Những yếu tố này giúp vi khuẩn chống lại nhiều loại kháng sinh, khiến việc điều trị trở nên khó khăn hơn. (Morita & ctv., 2001; Morita & ctv., 2013) khiến cho việc điều trị nhiễm trùng ngày càng trở nên khó khăn hơn. Trong đó, các chủng vi khuẩn kháng 8 đến 12 loại kháng sinh gồm: 3 chủng *S. aureus* được kí hiệu S.PL1, S.PL2, S.PL3, và 3 chủng *P. aeruginosa* kí hiệu là P.PL1, P.PL2, P.PL3 được thể hiện tại Bảng 4.

Bảng 2. Kết quả kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn *S. aureus* phân lập được

Số lượng mẫu (n =20)		Đề kháng		Trung gian		Nhạy cảm	
STT	Kháng sinh	n	%	n	%	n	%
1	Penicillin (Pn)	18	90	2	10	0	0
2	Ampicillin (Am)	16	80	0	0	3	15
3	Amoxicillin (Ax)	13	65	4	20	5	25
4	Streptomycin (Sm)	12	60	6	30	4	20
5	Neomycin (Ne)	5	25	6	30	9	45
6	Gentamycin (Ge)	6	30	2	10	12	60
7	Kanamycin (Kn)	5	25	5	25	10	50
8	Amikacin (Ak)	4	20	4	20	12	60
9	Tetracyclin (Te)	9	45	3	15	8	40
10	Doxycyclin (Dx)	12	60	4	20	3	15
11	Norfloxacin (Nr)	2	10	2	10	16	80
12	Ofloxacin (Of)	2	10	1	5	17	85
13	Colistin (Co)	5	25	4	20	11	55
14	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (Bt)	9	45	5	25	6	30

Bảng 3. Kết quả kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* phân lập được

Số lượng mẫu (n = 12)		Đề kháng		Trung gian		Nhạy cảm	
STT	Kháng sinh	n	%	n	%	n	%
1	Penicillin (Pn)	12	100	0	0	0	0
2	Ampicillin (Am)	12	100	0	0	0	0
3	Amoxicillin (Ax)	10	83,33	0	0	2	16,67
4	Streptomycin (Sm)	9	75	2	16,67	1	8,33
5	Neomycin (Ne)	5	41,67	2	16,67	5	41,67
6	Gentamycin (Ge)	1	8,33	2	16,67	9	75
7	Kanamycin (Kn)	2	16,67	2	16,67	8	66,67
8	Amikacin (Ak)	2	16,67	3	25	7	58,33
9	Tetracyclin (Te)	11	91,67	1	8,33	0	0
10	Doxycyclin (Dx)	10	83,33	1	8,33	1	8,33
11	Norfloxacin (Nr)	1	8,33	1	8,33	10	83,33
12	Ofloxacin (Of)	1	8,33	2	16,67	9	75
13	Colistin (Co)	7	58,33	3	25	2	16,67
14	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (Bt)	9	75	1	8,33	2	16,67

Bảng 4. Các loại kháng sinh đề kháng của 06 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* được chọn để thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết

Loài	Chủng	Kháng sinh đề kháng
<i>S. aureus</i>	S.PL1	PnAmAxNeTeDxOfBt
	S.PL2	PnAmAxSmKnAkTeDxCoBt
	S.PL3	PnAmAxSmKnAkTeDxNrCoBt
<i>P. aeruginosa</i>	P.PL1	PnAmAxSmNeKnTeDxCoBt
	P.PL2	PnAmAxSmNeAkTeDxOfCoBt
	P.PL3	PnAmAxSmNeKnAkTeDxNrCoBt

3.3. Hiệu suất thu cao chiết vỏ quả măng cụt

Ethanol là một dung môi phổ biến và hiệu quả trong chiết xuất dược liệu thực vật nhờ vào khả năng tan cao đối với các hoạt chất như alkaloid và flavonoid (Nguyen & ctv., 2015). Theo nghiên cứu của Kusmayadi & ctv. (2018), khi so sánh hiệu quả chiết của các loại dung môi khác nhau gồm ethanol, acetone, ethyl acetate,... ghi nhận hiệu quả chiết xanthone cao nhất đối với acetone và ethanol. So với acetone, ethanol không có tính độc và giá thành rẻ phù hợp với quy mô công

nghiệp (Tiwari & ctv., 2011), do đó ethanol được chọn là dung môi chiết cao trong nghiên cứu này. Khối lượng cao trung bình đạt 4,07 gram sau khi cô đuổi, với hiệu suất chiết đạt 10,17% (Bảng 5). Cao thu được có màu nâu đỏ, mùi hắc. Trong một nghiên cứu khác cũng sử dụng ethanol là dung môi chiết, tại cùng nhiệt độ cho thấy hiệu quả chiết cao đạt 12,43% (Nguyen & ctv., 2023). Sự khác biệt so với nghiên cứu này có thể đến từ đặc điểm thời tiết và thổ nhưỡng ở các vùng thu hoạch vỏ quả măng cụt. Do đó kết quả phù hợp so với các nghiên cứu trên.

Bảng 5. Khối lượng và hiệu suất chiết cao vỏ măng cụt

Mẫu cao	Khối lượng bột dược liệu (g)	Tổng dung môi chiết (mL)	Khối lượng cao đặc (g)	Hiệu suất (%)
1	100	900	4,12	10,3
2	100	900	3,95	9,87
3	100	900	3,91	9,78
4	100	900	4,21	10,52
5	100	900	4,15	10,38
Trung bình $\pm$ SD			4,07 $\pm$ 0,13	10,17 $\pm$ 0,33

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết vỏ quả măng cụt đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa* trên môi trường thạch đĩa MHA

Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết được trình bày trong Bảng 6, Bảng 7, và Hình 2. DMSO 5% không thể hiện tính kháng khuẩn đối với cả *S. aureus* và *P. aeruginosa*, do đó trong các thí nghiệm về sau DMSO 5% sẽ được sử dụng làm dung môi pha cao chiết mà không làm ảnh hưởng đến kết quả kháng khuẩn. Trong đó, ở nồng độ 200 mg/mL có kích thước vòng kháng khuẩn lớn nhất và sự khác biệt này rất có ý nghĩa về mặt thống kê đối với các nồng độ còn lại (với $P < 0,01$). Kích thước vòng vô khuẩn tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cho thấy mối quan hệ liều lượng - đáp ứng. Đặc biệt, hiệu quả ức chế của chiết xuất đối với các chủng vi khuẩn S.PL1,

S.PL2, S.PL3 (dao động từ 19,60 mm đến 23,10 mm) đồng đều hơn so với chủng dùng làm đối chứng là S.ATCC 25923 (16,67 mm đến 21,38 mm), cho thấy sự nhạy cảm với cao chiết cao hơn ở các chủng phân lập. Đối với *P. aeruginosa* cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tốt của cao chiết với đường kính vòng vô khuẩn từ 10 mm đến 17,37 mm (Bảng 7). Đường như kích thước vòng kháng khuẩn trên chủng *P. aeruginosa* ở các nồng độ đều thấp hơn so với trên chủng *S. aureus* (Bảng 6 và Bảng 7). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Narasimhan & ctv. (2017), cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của α -mangostin có trong chiết xuất MG đối với vi khuẩn Gram dương hiệu quả hơn so với vi khuẩn Gram âm, mở ra khả năng sử dụng MG như một hợp chất tự nhiên có khả năng kháng khuẩn, đặc biệt trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ngoài da hoặc các bệnh nhiễm khuẩn khác.

Bảng 6. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của cao vỏ măng cụt đối với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

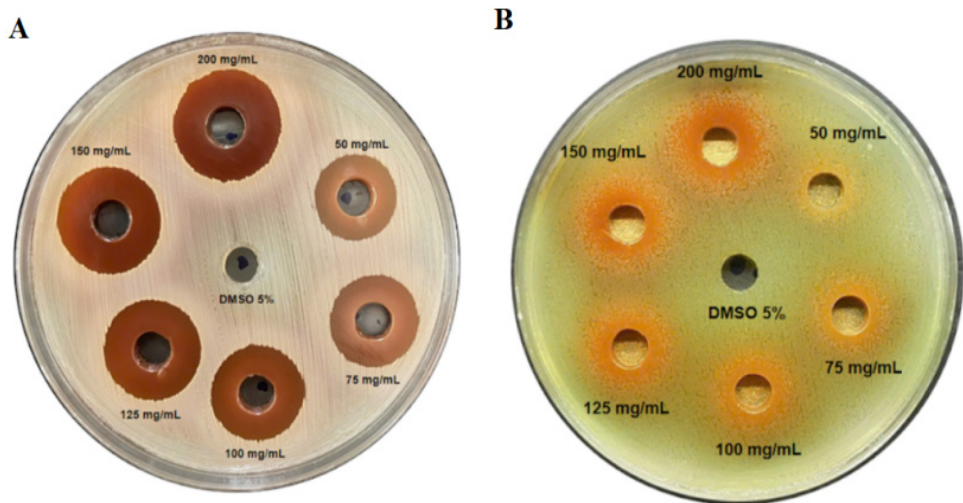
STT	Nồng độ (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (trung bình $\pm$ SD)			
		S.ATCC 25923	S.PL1	S.PL2	S.PL3
1	50	16,67 ^d $\pm$ 0,76	19,60 ^c $\pm$ 0,27	20,57 ^d $\pm$ 0,23	20,43 ^d $\pm$ 0,4
2	75	16,67 ^d $\pm$ 0,58	19,87 ^c $\pm$ 0,31	21,00 ^d $\pm$ 0,20	20,77 ^d $\pm$ 0,21
3	100	17,50 ^{cd} $\pm$ 0,62	20,60 ^{bc} $\pm$ 0,79	21,57 ^c $\pm$ 0,05	21,53 ^c $\pm$ 0,25
4	125	18,60 ^{bc} $\pm$ 0,66	21,60 ^{ab} $\pm$ 0,79	22,10 ^{bc} $\pm$ 0,27	22,07 ^{bc} $\pm$ 0,21
5	150	19,30 ^b $\pm$ 0,27	21,67 ^{ab} $\pm$ 0,29	22,5 ^b $\pm$ 0,10	22,57 ^{ab} $\pm$ 0,21
6	200	21,38 ^a $\pm$ 0,32	22,70 ^a $\pm$ 0,27	23,10 ^a $\pm$ 0,27	23,00 ^a $\pm$ 0,00
DMSO 5%		0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c, d) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Bảng 7. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của MG đối với các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

STT	Nồng độ (mg/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (trung bình $\pm$ SD)			
		P.ATCC 27853	P.PL1	P.PL2	P.PL3
1	50	10,00 ^e $\pm$ 0,3	8,2 ^e $\pm$ 0,26	11,33 ^e $\pm$ 0,30	10,47 ^d $\pm$ 0,45
2	75	11,17 ^d $\pm$ 0,38	12,23 ^d $\pm$ 0,25	12,87 ^d $\pm$ 0,31	12,13 ^c $\pm$ 0,35
3	100	12,20 ^c $\pm$ 0,2	12,83 ^{cd} $\pm$ 0,15	14,27 ^c $\pm$ 0,25	12,97 ^c $\pm$ 0,35
4	125	13,03 ^b $\pm$ 0,35	13,10 ^c $\pm$ 0,36	15,27 ^b $\pm$ 0,25	14,37 ^b $\pm$ 0,32
5	150	15,27 ^a $\pm$ 0,25	14,10 ^b $\pm$ 0,26	15,77 ^b $\pm$ 0,25	15,23 ^{ab} $\pm$ 0,25
6	200	16,00 ^a $\pm$ 0,20	15,27 ^a $\pm$ 0,31	17,37 ^a $\pm$ 0,32	16,10 ^a $\pm$ 0,26
DMSO 5%		0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Ghi chú: Những chữ cái (a, b, c, d, e) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.



Hình 2. Vòng vô khuẩn của MG trên môi trường MHA. A: Vi khuẩn *S. aureus*; B: Vi khuẩn *P. Aeruginosa*.

3.5. Xác định MIC, MBC của cao chiết vỏ quả măng cụt đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa*

Kết quả thí nghiệm (Bảng 8) cho thấy MG thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với cả hai vi khuẩn *S. aureus* và *P. aeruginosa*. Giá trị MIC và

MBC của cao chiết đối với *S. aureus* rất thấp, chỉ 1,25 mg/mL và 2,5 mg/mL. Điều này cho thấy cao chiết từ vỏ măng cụt có khả năng tiêu diệt loại vi khuẩn này một cách hiệu quả. Tuy nhiên, đối với *P. aeruginosa* hoạt tính kháng khuẩn của cao thấp hơn, MIC và MBC lần lượt là 50 - 70 mg/mL và 150 mg/mL.

Bảng 8. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao vỏ măng cụt (MG) đối với *S. aureus* và *P. aeruginosa*

Chủng		Nồng độ MG (mg/mL)	
		MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	S.ATCC 25923	1,25	2,5
	S.PL1	1,25	2,5
	S.PL2	1,25	2,5
	S.PL3	1,25	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P.ATCC 27853	70	150
	P.PL1	50	150
	P.PL2	50	150
	P.PL3	50	150

Hoạt tính kháng khuẩn có thể đến từ các hợp chất xanthone có trong MG. Khi sử dụng α -mangostin - một dẫn xuất có trong xanthone làm tác nhân kháng khuẩn, giá trị MIC và MBC trong khoảng 1,57 - 12,5 μ g/mL trên *S. aureus* (Iinuma & ctv., 2011) và 100 μ g/mL trên *P. aeruginosa* (Ragasa & ctv., 2010). Điều này cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất vỏ măng cụt cao hơn trên *S. aureus*. Sự khác biệt có thể do cấu tạo thành tế bào khác nhau của vi khuẩn Gram dương và Gram âm (Breijyeh & ctv., 2020). Nghiên cứu của Tatiya-Aphiradee & ctv. (2016) về giá trị MIC, MBC của chiết xuất thô từ măng cụt đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus* trong khoảng 0,78 - 1,25 mg/mL (MIC) và 0,78 - 5 mg/mL (MBC) và kết quả này tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi.

4. Kết Luận và Đề Nghị

Cao vỏ măng cụt thể hiện tính kháng khuẩn mạnh đối với các chủng *S. aureus* đa kháng kháng sinh được kháng sinh được phân lập với giá trị MIC và MBC lần lượt là 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL. Hiệu quả kháng khuẩn của cao chiết MG của cao chiết MG thấp hơn trên các chủng *P. aeruginosa* (MIC và MBC lần lượt là 50 - 70 mg/mL, 150 mg/mL). Nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng MG vào sản xuất các sản phẩm y sinh trong điều trị vết thương nhiễm trùng. Tuy vậy, để đảm bảo hiệu quả tối ưu của cao chiết, cần tiến hành nghiên cứu sâu hơn để xác định các hoạt chất kháng khuẩn trong cao, cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến hạn sử dụng và điều kiện bảo quản của cao chiết trong thực tế.

Lời Cam Đoan

Nhóm tác giả thực hiện không có xung đột về lợi ích.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu thực hiện từ nguồn kinh phí của Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, có mã số CS-SV23-CNTY-12. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ các Khoa và Thầy Cô đã tạo điều kiện thực hiện đề tài này.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abed, S., Assie, A., Abu-Elteen, K., Dheeb, B., & Abu-Qatouseh, L. (2020). Molecular characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates obtained from human-skin samples in Iraq. *Biomedical and Pharmacology Journal* 13(2), 737-746. <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1939>.
- Andani, R., Fajrina, A., Asra, R., & Eriadi, A. (2021). Antibacterial activity test of mangosteen plants (*Garcinia mangostana* L.): A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* 9(1), 164-171. <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v9i1.927>.
- Brejijeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
- Choi, H. J., Kim, M. H., Cho, M. S., Kim, B. K., Kim, J. Y., Kim, C., & Park, D. S. (2013). Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(8), 3643-3651. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4709-0>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (30th ed.). Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Eliasi, U. L., Sebola, D., Oguttu, J. W., & Qekwana, D. N. (2020). Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine clinical cases at a veterinary academic hospital in South Africa. *Journal of The South African Veterinary Association* 91(0), e1-e6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v91i0.2052>.
- Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., & Miyauchi, K. (1996). Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48(8), 861-865. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb03988.x>.
- Janardhanan, S., Mahendra, J., Girija, A. S., Mahendra, L., & Priyadharsini, V. (2017). Antimicrobial Effects of *Garcinia Mangostana* on cariogenic microorganisms. *Journal of Clinical and diagnostic research: JCDR* 11(1), ZC19-ZC22. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22143.9160>.
- Khudiar, M., Jessim, A., Azeez, A., Fakhry, S., Alwash, S., Farhan, Y., & Abdulbaqi, A. (2020). Biofilm formation by *Staphylococcus spp.* isolated from local food markets at Baghdad city. *World Journal of Experimental Biosciences* 4(2), 87-92. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17266.25287>.
- Kusmayadi, A., Adriani, L., Abun, A., Muchtaridi, M., & Tanuwiria, U. H. (2018). The effect of solvents and extraction time on total xanthone and antioxidant yields of mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.) extract. *Drug Invention Today* 10, 2572-2576.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 36(3), 618-623.
- Moerer, M., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Merle, R., & Bäumer, W. (2023). Occurrence of antimicrobial resistance in canine and feline bacterial pathogens in Germany under the Impact of

- the TÄHAV amendment in 2018. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 12(7), 1193. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071193>.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of General and Applied Microbiology* 47(1), 27-32. <https://doi.org/10.2323/jgam.47.27>.
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2014). Responses of *pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* 4, 422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>.
- Narasimhan, S., Maheshwaran, S., Abu-Yousef, I., Majdalawieh, A., Rethavathi, J., Das, P., & Poltronieri, P. (2017). Anti-bacterial and anti-fungal activity of xanthonones obtained via semi-synthetic modification of α -mangostin from *Garcinia mangostana*. *Molecules* 22(2), 275. <https://doi.org/10.3390/molecules22020275>.
- Nguyen, H. T., & Nguyen, T. V. (2016). Study on in vitro bacterial inhibition of medicinal plant extracts for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., and *E. coli* isolated from the metritis in dogs and experimental treatment. *Journal of Veterinary Science and Technology* 23(4), 26-36.
- Nguyen, T. L., Luong, T. H., & Cao, N. K. L. (2019). Study of molecular identification using multiplex PCR in *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* diagnostics causing food poisoning diseases. *Journal of Food Science and Technology* 18(1), 23-35.
- Nguyen, T. T. H., Tran, H. T. T., Nguyen, N. T. H., Vu, T. H., & Nguyen, L. T. (2023). Evaluation of the influence of several factors in the extraction process of mangosteen rind (*Garcinia mangostana* L.). *Journal of Medical Research, TCNCYH* 163(2), 2023.
- Ragasa, C., Crisostomo, C., Garcia, K., & Shen, C. (2010). Antimicrobial xanthonones from *Garcinia mangostana* L. *The Philippine Scientist* 47, 53-75.
- Razani, S., Farhadpour, M., Hemmat, M. A., Alamdaran, F. S., Taha, M. F., Khonakdar, H. A., & Mahmoudifard, M. (2024). Bioassay-guided fractionation of *Verbascum thapsus* extract and its combination with polyvinyl alcohol in the form electrospun nanofibrous membrane for efficient wound dressing application. *Heliyon* 10(12), e32717. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32717>.
- Sultanbawa, Y., Cusack, A., Currie, M., & Davis, C. (2009). An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 17(4), 519-534. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2009.00187.x>.
- Tatiya-aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., & Jarukamjorn, K. (2016). In vivo antibacterial activity of *Garcinia mangostana* pericarp extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse superficial skin infection model. *Pharmaceutical Biology* 54, 1-10. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1172321>.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia* 1, 98-106.

**Assessment of the effectiveness of pectinase treatment on cocoa mesocarp
(*Theobroma cacao* L.)**

Dieu M. T. Nguyen, Phuong H. T. Vo, Do N. Nguyen, Nghi N. Duong, & Phuong H. Le*

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Food Technology, Nong Lam
University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: September 10, 2024

Revised: November 14, 2024

Accepted: November 18, 2024

Keywords

Mesocarp cocoa

Pectinase

Treatment efficiency

Viscosity

***Corresponding author**

Le Hong Phuong

Email:

phuonghle@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the use of pectinase to degrade pectin in cocoa mesocarp. A completely randomized design with two factors was used: enzyme concentration (0.5, 1, & 3%) and treatment time (30, 60, 90, and 120 min). The results showed that increasing both enzyme concentration and treatment time significantly decreased the pectin content in cocoa mesocarp, from 4.86 to 0.08%. Similarly, viscosity decreased with increasing enzyme concentration and treatment time. Pectin was greatly degraded when treated with a 3% enzyme concentration for 120 min. These findings underscore the potential of pectinase to modify the properties of cocoa pod husk, which can be used to develop high-value products, contributing to maximize the utilization of this agricultural by-product.

Cited as: Nguyen, D. M. T., Vo, P. H. T., Nguyen, D. N., Duong, N. N., & Le, P. H. (2025). Assessment of the effectiveness of pectinase treatment on cocoa mesocarp (*Theobroma cacao* L.). *The Journal of Agriculture and Development* 24(4), 89-98.

Đánh giá hiệu quả sử dụng pectinase để xử lý thịt vỏ quả cacao (*Theobroma cacao* L.)

Nguyễn Mai Thị Diệu, Võ Hoàng Trúc Phương, Nguyễn Nam Đô, Dương Ngọc Nghi & Lê Hồng Phương*
Khoa Công Nghệ Hóa Học và Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 10/04/2024

Ngày chỉnh sửa: 13/06/2024

Ngày chấp nhận: 27/06/2024

Từ khóa

Độ nhớt

Hiệu quả xử lý

Pectinase

Thịt vỏ quả cacao

*Tác giả liên hệ

Lê Hồng Phương

Email:

phuonghle@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nguyên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của pectinase đến quá trình xử lý thịt vỏ quả cacao. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên với hai yếu tố là nồng độ enzyme (0,5; 1 và 3%) và thời gian xử lý (30, 60, 90 và 120 phút). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, việc tăng nồng độ enzyme và thời gian xử lý làm giảm đáng kể hàm lượng pectin có trong vỏ quả cacao, từ 4,86% xuống còn 0,08%. Tương tự, độ nhớt của mẫu giảm khi tăng nồng độ enzyme và thời gian xử lý. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, sử dụng pectinase ở nồng độ 3% và thời gian xử lý 120 phút là điều kiện để đạt được hiệu quả xử lý pectin cao nhất. Kết quả nghiên cứu này mở ra triển vọng ứng dụng pectinase để làm thay đổi đặc tính của vỏ quả cacao, từ đó ứng dụng để phát triển các sản phẩm có giá trị cao, góp phần tận dụng tối đa nguồn nguyên liệu phụ phẩm này.

1. Đặt Vấn Đề

Cây cacao (*Theobroma cacao* L.) có nguồn gốc từ các vùng nhiệt đới ở Trung và Nam Mỹ (Afoakwa, 2014). Ở Việt Nam, cây cacao được trồng rộng rãi tại một số khu vực như Tây Nguyên và một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long (Nguyen & Luu, 2014). Tuy nhiên, ngành công nghiệp cacao hiện nay đang đối mặt với thách thức lớn trong việc xử lý lượng lớn phụ phẩm phát sinh trong quá trình chế biến, ước tính chiếm 85% sản lượng quả cacao (Handoyo & ctv., 2019). Những phụ phẩm này bao gồm vỏ quả, lớp nhầy và vỏ hạt cacao (Barišić & ctv., 2020). Trong đó, thịt vỏ chiếm khối lượng lớn trong quả cacao, xấp xỉ 50% (Sobamiwa & Longe, 1994). Nhiều nghiên cứu gần đây đã tìm cách tận dụng vỏ quả cacao để ứng dụng trong thực phẩm, chẳng hạn như sử dụng chất xơ hòa tan từ thịt vỏ quả cacao làm chất thay thế chất béo trong bánh nướng xốp sô cô la (Martínez & ctv., 2011), làm giàu chất dinh dưỡng cho sản phẩm bánh ép đùn (Jozinović & ctv., 2019).

Pectin là polysaccharides có trong tự nhiên ở thực vật, bao gồm các đơn vị acid galacturonic được liên kết bởi các liên kết α - (1 $\rightarrow$ 4) (Chan & Choo, 2013). Thịt vỏ quả cacao được coi là nguồn cung cấp hàm lượng pectin đáng kể (Blakemore & ctv., 1966) và có tiềm năng làm thành phần trong chế biến mứt. Do độ nhớt của pectin khá cao đã làm ảnh hưởng giá trị cảm quan của sản phẩm (Oddoye & ctv., 2013) nên việc loại bỏ pectin trước khi chế biến cũng là một công đoạn cần thiết trong sản xuất mứt cacao. Để phân giải pectin người ta thường sử dụng pectinase giúp làm giảm độ nhớt và giải phóng các phân tử đường đơn (Mulluye & Atnafu, 2022) và nhờ đó phần thịt vỏ sau khi xử lý enzyme được ứng dụng làm mứt cacao.

Nghiên cứu này tập trung vào việc ứng dụng pectinase để xử lý pectin có trong thịt vỏ quả cacao. Qua đó, đánh giá hiệu quả của pectinase trong việc phân huỷ pectin và mở ra những ứng dụng tiềm năng của thịt vỏ quả cacao sau khi xử lý.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu: Quả cacao (*Theobroma cacao* L.) giống *Trinitario* được mua tại vườn của tỉnh Trà Vinh.

Pectinase được cung cấp bởi NJDULY của Trung Quốc, dạng bột, màu nâu vàng nhạt, được chiết xuất bởi *Aspergillus niger* và được bảo quản ở 2 - 8°C. Điều kiện tối ưu của Pectinase là pH 2 - 5; nhiệt độ từ 30 đến 50°C và hoạt độ ≥ 35 u/mg. Acid citric và ethanol được cung cấp bởi công ty Xilong Scientific của Trung Quốc.

2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian xử lý của Pectinase đến thịt vỏ quả cacao

Thịt vỏ quả cacao được xay nhuyễn với nước (1:2, v/w), trong 2 phút như thí nghiệm thăm dò đã thực hiện trước đó. Sau đó, mẫu được khảo sát với nồng độ enzyme 0,5; 1 và 3% so với nguyên liệu (v/w) và thời gian xử lý là 30, 60, 90 và 120 phút. Trong suốt quá trình xử lý thì mẫu được giữ ổn định ở nhiệt độ 50°C trong bể điều nhiệt (Mai & ctv., 2016). Sau quá trình thủy phân, mẫu được bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút (Hoang & ctv., 2020).

2.3. Các phương pháp phân tích các chỉ tiêu

Màu sắc: Được xác định bằng máy đo màu Colorimeter Cs - 10 (Trung Quốc) theo hệ L^* , a^* , b^* .

Độ Brix: Được xác định bằng khúc xạ kế HI96800 (Mỹ).

Ấm độ: Được xác định theo phương pháp AOAC (Horwitz, 2010).

Hàm lượng pectin: Được xác định bằng phương pháp thủy phân sử dụng acid citric với một số hiệu chỉnh (Dos Santos & ctv., 2021). Mẫu được sấy khô ở nhiệt độ 60°C và được nghiền thành bột. Ban đầu, bột vỏ được hydrat hóa bằng nước cất trong 10 phút đồng thời khuấy bằng máy khuấy từ (WH220-HT). Sau đó, axit citric ở nồng độ 0,1% được thêm vào (1:50, w/v) và

dung dịch được đun nóng trên bếp điện trong khi khuấy ở nhiệt độ 90°C trong 60 phút. Tiếp theo, dung dịch được làm nguội đến 30°C trong bể nước đá rồi lọc bằng giấy lọc để thu được phần nổi phía trên. Sau đó, pectin được kết tủa bằng cách thêm ethanol 96% (1:2, v/v) vào phần nổi phía trên trong 30 phút ở nhiệt độ lạnh. Cuối cùng, kết tủa được sấy khô trong lò ở 40°C trong khoảng 12 giờ để thu được pectin. Phần trăm pectin được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng pectin (\%)} = \frac{\text{Khối lượng pectin thu được}}{\text{Khối lượng mẫu sử dụng}} \times 100\%$$

Độ nhớt: Được xác định bằng máy đo độ nhớt Brookfield Viscometer DV2T extra (Mỹ). Mẫu được rót vào ống chứa khi mẫu ổn định ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, mẫu được đo với đầu đo V-73 ở tốc độ cắt 0,11; 0,21; 0,42; 1,05; 2,10; 4,20; 6,30; 10,50; 21,01; 33,61 và 42,02 1/s (Potanin & Maron, 2021).

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Statistic 20 và Microsoft Excel 2016. Phân tích ANOVA cho thí nghiệm 2 yếu tố với độ tin cậy 95% được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các

yếu tố khảo sát. Trắc nghiệm Tukey được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ấm độ và độ Brix

Ấm độ và độ Brix là 2 chỉ tiêu có thể liên quan đến hiệu quả xử lý pectinase đối với thịt vỏ quả cacao. Việc đánh giá tác động của nồng độ và thời gian xử lý pectinase từ đó tìm ra được điều kiện xử lý pectinase phù hợp để ứng dụng vào thực phẩm. Kết quả xử lý enzyme đến ấm độ và Brix của sản phẩm được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ enzyme đến ấm độ và độ Brix của mẫu

Thời gian (phút)	Ấm độ			Độ Brix		
	Nồng độ (%)			Nồng độ (%)		
	0,5	1	3	0,5	1	3
30	90,14 ± 0,29	93,52 ± 1,47	94,13 ± 0,24	2 ± 0,02 ^{xx}	2 ± 0,01 ^{xy}	3 ± 0,01 ^{xz}
60	93,11 ± 1,25	94,21 ± 0,22	94,40 ± 0,12	2 ± 0,01 ^{xx}	2 ± 0,05 ^{xy}	3 ± 0,01 ^{xz}
90	93,56 ± 0,07	94,26 ± 0,54	94,65 ± 0,074	2 ± 0,04 ^{yx}	3 ± 0,01 ^{yy}	3 ± 0,01 ^{yz}
120	94,53 ± 0,82	94,79 ± 0,21	95,05 ± 0,37	2 ± 0,01 ^{yx}	3 ± 0,01 ^{yy}	3 ± 0,02 ^{yz}

Các giá trị đi kèm chữ cái viết nhỏ x, y thể hiện sự khác biệt của độ Brix trong cùng một thời gian xử lý enzyme ở $P < 0,05$. Các giá trị đi kèm chữ cái viết lớn X, Y, Z thể hiện sự khác biệt của độ Brix trong cùng một nồng độ xử lý enzyme ở $P < 0,05$.

Kết quả phân tích ANOVA từ Bảng 1 cho thấy khi sử dụng enzyme ở các nồng độ và thời gian khác nhau ảnh hưởng không có ý nghĩa đến ẩm độ ($P > 0,05$) nhưng ảnh hưởng có ý nghĩa đến độ Brix của sản phẩm ($P < 0,05$). Cụ thể, khi kéo dài thời gian xử lý từ 30 phút đến 120 phút thì ẩm độ của mẫu càng nhiều từ 90,14 đến 94,53% tại nồng độ 0,5%, và khi tăng nồng độ pectinase lên 3% thì ẩm độ của mẫu tăng lên đến 95,05% ở thời gian 120 phút. Điều này có thể giải thích, việc tăng thời gian xử lý làm tăng khả năng pectinase cắt các liên kết glucoside nối giữa các axit galacturonic với nhau, ảnh hưởng đến khả năng giữ nước, khiến cho hàm lượng nước luôn thay đổi. Thật vậy, trong cấu trúc phân tử, pectin sẽ tạo thành mạng lưới không gian ba chiều gian giữ các phân tử nước bên trong hoặc liên kết với các phân tử nước nhờ vào các nhóm -OH. Khi tăng nồng độ pectin hoặc kéo dài thời gian xử lý, cấu trúc pectin bị phân cắt dẫn đến mạng không gian ba chiều bị phá hủy sẽ giải phóng các phân tử nước thành dạng tự do. Do vậy, xác định ẩm độ nước có thể dễ dàng hơn.

Bên cạnh đó, kết quả từ bảng 1 cho thấy, độ Brix của mẫu dao động từ 2 đến 3. Khi tăng nồng độ enzyme từ 0,5 lên 3% thì độ Brix tăng lên 3, trong trường hợp này có thể kết luận là pectinase phân giải pectin tạo ra các nguồn

monosaccharide làm tăng hàm lượng chất khô. Các monosaccharide thường có vị ngọt. Do đó, việc tăng độ Brix có thể tăng vị ngọt của sản phẩm, góp phần hạn chế lượng đường trong quá trình chế biến. Thật vậy, sự gia tăng về độ Brix này có thể được giải thích do pectinase phân giải protopectin không hòa tan trong thịt quả thành dạng pectin hòa tan, tạo điều kiện để dịch bào thoát ra nhiều hơn, đồng thời làm tăng lượng chất khô hòa tan trong dịch quả (Tapre & Jain, 2014).

3.2. Màu sắc

Màu sắc là một nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến hình thức cuối cùng của sản phẩm. Theo kết quả từ Bảng 2, phân tích ANOVA cho thấy nồng độ và thời gian xử lý enzyme ảnh hưởng có ý nghĩa ($P < 0,05$) đến màu sắc của sản phẩm. Cụ thể, khi tăng nồng độ enzyme 0,5; 1 và 3% trong cùng thời gian 30 phút thì giá trị L^* của sản phẩm giảm lần lượt là $6,40 \pm 0,45$; $2,77 \pm 0,29$ và $1,72 \pm 0,04$; điều này cho thấy khi tăng nồng độ enzyme thì màu sắc của sản phẩm đậm hơn so với ban đầu. Tương tự như vậy, khi kéo dài thời gian xử lý từ 30 lên 120 phút tại nồng độ 0,5% thì giá trị L^* cũng giảm lần lượt là $6,40 \pm 0,45$; $6,39 \pm 0,05$; $3,67 \pm 0,84$ và $0,08 \pm 0,01$; điều này cũng cho thấy màu sắc của sản phẩm cũng đậm dần khi kéo dài thời gian.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ enzyme đến màu sắc của sản phẩm

Thời gian (phút)	Nồng độ (%)	Màu sắc		
		L*	a*	b*
30	0,5	6,40 ± 0,45 ^{cB}	0,41 ± 0,08 ^{aAB}	21,84 ± 1,81 ^{cB}
	1	2,77 ± 0,29 ^{cA}	-1,87 ± 0,10 ^{aB}	21,79 ± 1,63 ^{cC}
	3	1,72 ± 0,04 ^{cA}	-1,61 ± 0,21 ^{aA}	20,91 ± 0,08 ^{cA}
60	0,5	6,39 ± 0,05 ^{cB}	-1,94 ± 0,33 ^{bAB}	14,20 ± 2,70 ^{bB}
	1	1,72 ± 0,04 ^{cA}	-0,46 ± 0,83 ^{bB}	18,01 ± 1,92 ^{bC}
	3	1,58 ± 0,16 ^{cA}	4,24 ± 0,81 ^{bA}	16,38 ± 0,38 ^{bA}
90	0,5	3,67 ± 0,84 ^{bB}	1,57 ± 0,26 ^{cAB}	13,90 ± 0,23 ^{bB}
	1	0,15 ± 0,10 ^{bA}	4,24 ± 0,81 ^{cB}	18,78 ± 0,17 ^{bC}
	3	1,80 ± 0,16 ^{bA}	0,40 ± 0,37 ^{cA}	9,92 ± 0,46 ^{bA}
120	0,5	0,08 ± 0,01 ^{aB}	1,33 ± 0,04 ^{abAB}	11,00 ± 1,33 ^{aB}
	1	1,64 ± 0,24 ^{aA}	3,10 ± 0,66 ^{abB}	16,11 ± 0,01 ^{aC}
	3	1,14 ± 0,08 ^{aA}	-4,51 ± 1,73 ^{abA}	-2,74 ± 1,34 ^{aA}

Các giá trị đi kèm chữ cái viết lớn A, B, C thể hiện sự khác biệt của màu trong cùng một nồng độ xử lý enzyme ở $P < 0,05$. Các giá trị đi kèm chữ cái nhỏ a,b,c thể hiện sự khác biệt của màu trong cùng một thời gian xử lý enzyme ở $P < 0,05$.

Việc kéo dài thời gian xử lý và tăng nồng độ pectinase làm giảm độ nhớt sản phẩm, nhưng khi kéo dài thời gian xử lý như vậy thì sản phẩm tiếp xúc ngoài không khí càng lâu. Điều này, thúc đẩy quá trình oxy hoá và làm thay đổi màu sắc của sản phẩm. Thật vậy, giá trị L* bị giảm đi cho thấy việc cắt mạch pectin xảy ra đồng thời với phản ứng oxy hoá làm thay đổi màu sắc của sản phẩm.

3.3. Hàm lượng pectin

Pectin là một polysaccharide phức tạp có chứa axit D-galacturonic liên kết với nhau

bằng liên kết β -1,4 glycosidic (Nguyen & ctv., 2022). Khi tăng nồng độ và thời gian xử lý của pectinase, pectin có thể bị thủy phân, enzyme lúc này có thể cắt các liên kết glycosidic nối giữa các axit galacturonic với nhau. Cụ thể, ở nồng độ enzyme cao và thời gian xử lý lâu hơn, pectin càng dễ bị thủy phân thành các monosaccharide và oligosaccharide. Thật vậy, điều này thống nhất với kết quả đã được trình bày ở Bảng 3, hàm lượng pectin giảm khi tăng nồng độ enzyme và kéo dài thời gian xử lý.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý enzyme đến hàm lượng pectin

Thời gian (phút)	Nồng độ (%)		
	0,5	1	3
30	4,86 ± 0,12 ^{aA}	0,24 ± 0,02 ^{aB}	0,20 ± 0,02 ^{aB}
60	1,67 ± 0,63 ^{bA}	0,34 ± 0,01 ^{bB}	0,18 ± 0,01 ^{bB}
90	1,39 ± 0,03 ^{bA}	0,52 ± 0,01 ^{bB}	0,13 ± 0,03 ^{bB}
120	0,3 ± 0,02 ^{cA}	0,26 ± 0,01 ^{cB}	0,08 ± 0,01 ^{cB}

Các giá trị đi kèm chữ cái viết lớn A, B, C thể hiện sự khác biệt của pectin trong cùng một nồng độ xử lý enzyme ở $P < 0,05$. Các giá trị đi kèm chữ cái viết nhỏ a,b,c thể hiện sự khác biệt của pectin trong cùng một thời gian xử lý enzyme ở $P < 0,05$.

Khi sử dụng nồng độ là 0,5% và thời gian xử lý 30 phút, thì hàm lượng pectin còn lại sau khi thủy phân là $4,86 \pm 0,12\%$, sau đó kéo dài thời gian xử lý lên 120 phút thì nồng độ còn lại là $0,3 \pm 0,02\%$. Khi tăng nồng độ enzyme lên 6 lần, nếu thời gian xử lý 30 phút thì pectin hầu như bị phá hủy hết, hàm lượng còn lại là $0,20 \pm 0,02\%$.

Theo kết quả ở Bảng 3, phân tích ANOVA cho thấy nồng độ và thời gian xử lý enzyme ảnh hưởng có ý nghĩa ($P < 0,05$) đến hàm lượng pectin trong việc xử lý thịt vỏ quả cacao. Do vậy, thời gian xử lý enzyme được chọn là 120 phút, khi đó hàm lượng pectin là $0,3 \pm 0,02\%$ tại nồng

độ 0,5% và giảm còn $0,08 \pm 0,01\%$ khi tăng nồng độ lên 3%.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý pectinase đến độ nhớt của thịt vỏ quả cacao

Trong vỏ quả cacao, hàm lượng pectin chứa 6,0 - 12,6% khối lượng chất khô (Lu & ctv., 2018) là nguyên nhân tạo nên độ nhớt cao, làm cản trở đáng kể quá trình chế biến tạo ra sản phẩm mứt cacao. Việc sử dụng pectinase để thủy phân pectin là một giải pháp hiệu quả nhằm giảm độ nhớt của sản phẩm.

Bảng 4. Ảnh hưởng độ nhớt của thịt vỏ quả cacao bởi nồng độ và thời gian xử lý enzyme

Thời gian (phút)	Nồng độ (%)	Tốc độ cắt (1/s)											
		0,11	0,21	0,42	1,05	2,1	4,2	6,3	10,5	21,01	33,61	42,02	
30	0,5	223,43	150,69	71,24	25,61	7,94	3,71	2,76	1,89	1,21	0,88	0,76	
	1	215,27	147,84	70,53	23,29	6,76	3,63	2,54	1,80	1,14	0,83	0,69	
	3	210,08	129,83	66,88	19,40	6,72	3,85	2,82	1,84	1,16	0,81	0,69	
60	0,5	186,54	141,24	65,09	21,97	7,06	3,66	2,73	1,89	1,23	0,86	0,75	
	1	174,77	134,46	66,07	24,29	7,49	3,83	2,81	1,94	1,15	0,80	0,70	
	3	163,71	122,69	60,37	16,91	6,33	3,55	2,74	1,90	1,22	0,90	0,74	
90	0,5	181,54	137,32	71,33	26,54	8,06	3,84	2,88	2,00	1,29	0,94	0,82	
	1	157,44	121,98	55,37	15,76	6,62	3,66	2,72	1,97	1,21	0,86	0,70	
	3	149,65	120,02	51,18	15,16	6,74	3,81	2,94	2,03	1,18	0,80	0,66	
120	0,5	141,24	110,92	50,56	14,62	5,78	3,48	2,62	1,85	1,12	0,83	0,72	
	1	142,67	105,57	46,81	12,52	6,10	3,76	2,82	2,02	1,26	0,88	0,77	
	3	141,24	108,43	50,56	13,02	6,03	3,54	2,71	1,87	1,16	0,78	0,67	

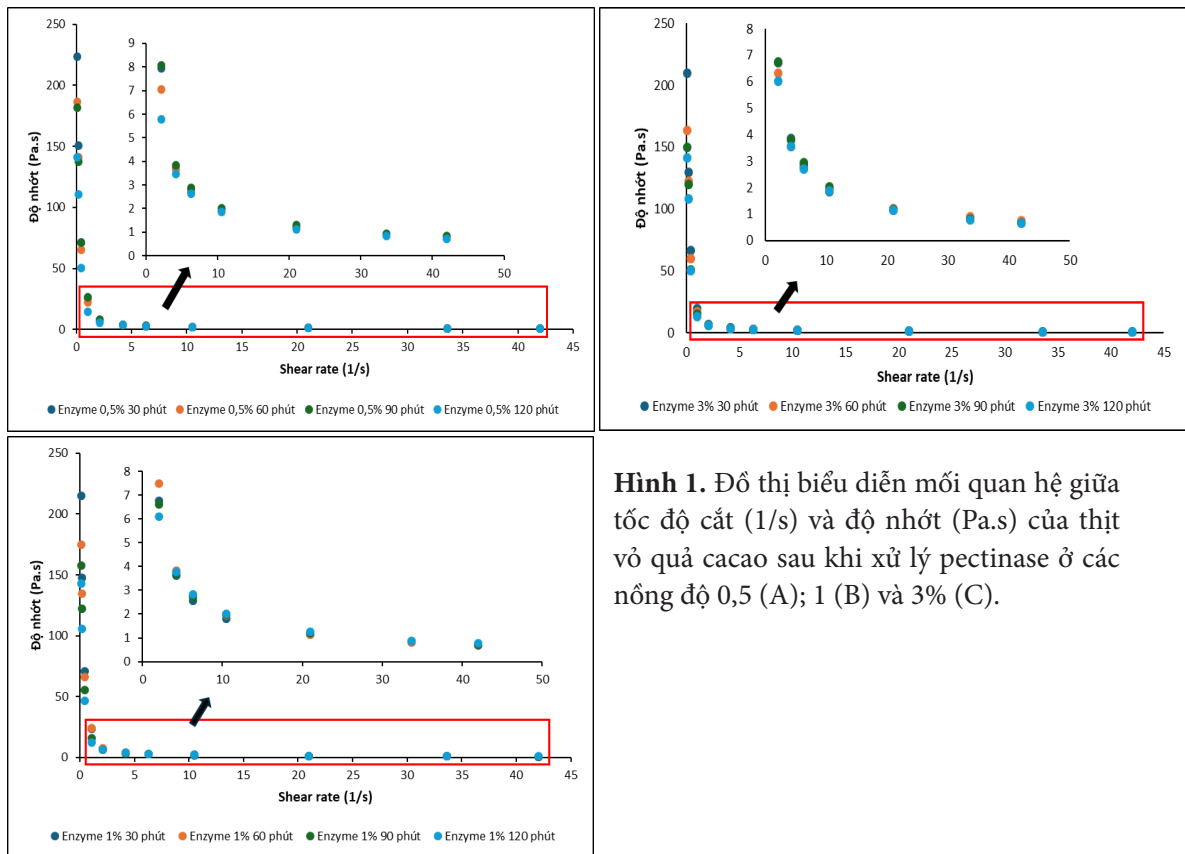
Phân tích ANOVA cho thấy các yếu tố thời gian xử lý và nồng độ enzyme có tác động đáng kể ($P < 0,05$; Bảng 4) đến quá trình thủy phân pectin cũng như độ nhớt của thịt vỏ quả cacao. Cụ thể theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 4, khi tăng

thời gian xử lý từ 30 phút lên 120 phút với nồng độ 0,5% và tốc độ cắt 0,11 1/s thì độ nhớt của thịt vỏ quả cacao giảm từ 223,43 xuống còn 141,24 Pa.s. Tương tự, khi tăng nồng độ enzyme từ 0,5 lên 3% ở thời gian xử lý 30 phút và tốc độ cắt 0,11

1/s, thì quá trình thủy phân pectin diễn ra càng nhanh, dẫn đến độ nhớt của thịt vỏ quả cacao càng giảm với giá trị từ 223,43 xuống còn 210,08 Pa.s. Tuy nhiên, độ nhớt đạt ổn định khi ở thời gian 120 phút tại các nồng độ 0,5; 1 và 3% với giá trị lần lượt là 141,24; 142,67 và 141,24 Pa.s, điều này cho thấy các liên kết pectin có khả năng đã bị thủy phân gần như hoàn toàn trong khoảng thời gian khảo sát này. Bên cạnh đó, thí nghiệm tiến hành xác định độ nhớt của thịt vỏ quả cacao dựa vào tốc độ cắt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tốc độ cắt càng lớn thì độ nhớt tương ứng càng bé.

Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó, trong đó pectin thường thể hiện tính chất giả dẻo hoặc làm loãng do tác động của lực cắt, tuân theo tính chất của chất lỏng phi Newton ở tốc độ cắt cao (Pinkaew & ctv., 2024). Tính chất dòng chảy tương tự cũng được quan sát thấy trong dung dịch pectin sầu riêng (Jong & ctv., 2023).

Số liệu trên Bảng 4 được thể hiện rõ hơn thông qua Hình 1. Đồ thị minh họa sự khác biệt rõ ràng mối quan hệ giữa tốc độ cắt và độ nhớt thông qua sự giảm độ nhớt khi càng tăng tốc độ cắt.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa tốc độ cắt (1/s) và độ nhớt (Pa.s) của thịt vỏ quả cacao sau khi xử lý pectinase ở các nồng độ 0,5 (A); 1 (B) và 3% (C).

Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng ở điều kiện thời gian xử lý ngắn, nồng độ enzyme thấp và tốc độ cắt nhỏ, độ nhớt của mẫu đạt giá trị cao nhất 223,43 Pa.s. Ngược lại, ở điều kiện thời gian xử lý lâu, nồng độ enzyme cao và tốc độ cắt lớn, độ nhớt giảm xuống mức thấp nhất 0,67 Pa.s.

4. Kết Luận

Nghiên cứu đã cho thấy việc điều chỉnh nồng độ và thời gian xử lý pectinase là yếu tố quyết định trong việc điều chỉnh hàm lượng pectin trong thịt vỏ quả cacao, với tác dụng của pectinase làm giảm pectin trong mẫu đáng kể.

Cụ thể, ở nồng độ 0,5% và thời gian xử lý 30 phút hàm lượng pectin còn 4,86%, sau khi tăng nồng độ lên 3% và thời gian xử lý 120 phút giảm còn 0,08% hàm lượng pectin còn lại trong mẫu. Đồng thời, việc sử dụng pectinase cũng làm gia tăng hàm lượng chất khô hòa tan có trong mẫu với nồng độ 3% và thời gian xử lý 120 phút đạt độ Brix là 3. Bên cạnh đó, việc sử dụng pectinase để phân hủy pectin làm thay đổi độ nhớt của thịt vỏ quả cacao giúp mở rộng khả năng ứng dụng của vỏ quả để chế biến các sản phẩm, góp phần nâng cao giá trị và đa dạng hóa sản phẩm từ phụ phẩm vỏ quả cacao.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Công trình này được tài trợ bởi Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM với mã số đề tài CS-SV23-HHTP-04.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa production and processing technology* (1st ed.). London, England: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16546>.
- Barišić, V., Jozinović, A., Flanjak, I., Šubarić, D., Babić, J., Miličević, B., Doko, K., & Ačkar, Đ. (2020). Difficulties with use of cocoa bean shell in food production and high voltage electrical discharge as a possible solution. *Sustainability* 12(10), 3981. <https://doi.org/10.3390/su12103981>.
- Blakemore, W. R., Dewar, E. T., & Hodge, R. A. (1966). Polysaccharides of the cocoa pod husk. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 17(12), 558-560. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740171208>.
- Chan, S. Y., & Choo, W. S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry* 141(4), 3752-3758.
- Dos Santos, E. S. B., Leal, I. L., & Nery, T. B. R. (2021). Extraction of pectin from epicarp and mesocarp fractions of cocoa shell. *Journal of Bioengineering, Technologies and Health* 4(2), 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.097>.
- Handojo, L., Triharyogi, H., & Indarto, A. (2019). Cocoa bean shell waste as potential raw material for dietary fiber powder. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8, 485-491. <https://doi.org/10.34178/JBTH.V4I2.160>.
- Hoang, B. Q., Duong, D. T. N., Le, N. T., & Mai, T. T. (2020). Study on hydrolysis conditions of red-fleshed dragon fruit juice (*Hylocereus polyrhizus*) and alcohol fermentation testing. *Can Tho University Journal of Science* 56(3): 86-92. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.057>.
- Horwitz, W. (2010). *Official methods of analysis of AOAC International. Agricultural chemicals, contaminants, drugs* (Volume I). Maryland, USA: AOAC International.
- Jong, S. H., Abdullah, N., & Muhammad, N. (2023). Optimization of low-methoxyl pectin extraction from durian rinds and its physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 5, 100263. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100263>.
- Jozinović, A., Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Babić, J., Pajin, B., Miličević, B., Guberac, S., Vrdoljak, A., & Šubarić, D. (2019). Cocoa husk application in the enrichment of extruded snack products. *Journal of Food Processing and Preservation* 43(2), e13866. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13866>.
- Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Van Damme, I., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., Warren, G., Chatzifragkou, A., McQueen, M. S., Gomez, L., Faas, L., Balcombe, K., Srinivasan, C., Picchioni, F., Hadley, P., & Charalampopoulos, D. (2018). Valorization strategies for cocoa pod

- husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 14, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>.
- Mai, T. T. N., Nguyen, V. V. T., Nguyen, H. C & Le, D. N. D. (2016). Study on factors affecting the ability to extract acerola fruit juice (*Magnolyophyta glabra*) by enzyme. *Can Tho University Journal of Science* (42), 11-18. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2016.011>.
- Martínez, C. S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., & Fiszman, S. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology* 44(3), 729-736. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.035>.
- Mulluye, K., & Atnafu, Y. (2022). Biotechnological application of pectinase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 13(8), 3069-3077. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(8\).3069-77](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(8).3069-77).
- Nguyen, Q. N., Tran, K. T., & Vu, D. X. (2022). Research on the production and testing of the ability to preserve some fruits of pectin-carboxymethyl cellulose film supplemented with herbal essential oils. *Hung Vuong University Journal of Science and Technology* 26(1), 28-37.
- Nguyen, T. H., & Luu, H. Đ. T. (2014). Research on cocoa product value chain in Ben Tre province. *Can Tho University Journal of Science* (35), 8-15.
- Oddoye, E. O., Agyente-Badu, C. K., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and its by-products: Identification and utilization. *Chocolate in Health and Nutrition* 7, 23-37. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-03>.
- Pinkaew, T., Inthachai, W., Khemthong, C., Kemsawasd, V., On-Nom, N., & Temviriyankul, P. (2024). High pectin recovery from cocoa husks using an autoclave approach: An analysis of its physicochemical, structural, and genotoxicity properties. *Foods* 13(5), 669. <https://doi.org/10.3390/foods13050669>.
- Potanin, A., & Marron, G. (2021). Rheological characterization of yield-stress fluids with Brookfield viscometer. *De Gruyter* 31, 1-9.
- Sobamiwa, O., & Longe, O. (1994). Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology* 47(3-4), 237-244. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90127-9).
- Tapre, A. R., & Jain, R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal* 21(2), 447-453.