

- Trương Quốc Phú và Trần Kim Tính**, 2012. Thành phần hóa học bùn đáy ao nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 2012: 22a: 290-299
- Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp**, 2011. Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 18a: 177-184.
- Stein, T.**, 2005. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology* 56(4): 845-857.
- Sjodahl J., Emmer A., Vincent J. and Roeraade J.**, 2002. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expression and Purification*, 26: 153-161.
- Thompson J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson**, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22(22): 4673-4680.
- Yuli Song, Chengxu Liu, Mauricio Bolaños, Julia Lee, Maureen McTeague, and Sydney M. Finegold**, 2005. Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant Bacteroides species. *Journal of clinical microbiology*, 43(4): 1531-1537.
- TRBA 466**. *Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, Ausgabe August 2015*. <http://www.gda-portal.de/VorschriftenRegeln/VorschriftenRegeln.html>.

Isolation and selection of catfish-sludge decomposing microorganism for organic fertilizer production

Tran Thi Lua, Nguyen Thi Nguyet, Nguyen Viet Hiep, Hoang Van Tam

Abstract

The study aims to select a collection of the microbial strains capable of composting cellulose, phosphate and protein to treat the sludge of catfish farming ponds for making organic fertilizers. Three bacterial strains, including X7KN, Pi71.3 and PO3 were selected from 23 strains isolated from samples of catfish pond sludge. The X7KN strain is capable of composting cellulose with the diameter of clear zone of 4.8 cm after 20 hours of culture; cellulase activity reached 15.4 U/mL. The Pi71.3 strain has P-solubilization activity with the diameter of 2.2 cm and increases available P- content of 4.5 folds in comparison to the control after 5 days of culture. The PO3 strain has proteolysis ability with the diameter of clear zone of 5.2 cm and proteolysis activity of 0.95 U/mL after 48 hours of culture. The selected bacterial strains were determined as *Bacillus tequilensis* X7KN, *Bacillus velezensis* PO3 and *Bacillus tequilensis* Pi71.3 and they were belonged to bacteria of biosafety level 1. Compost from catfish sludge complemented with cow manure at the ratio of 7:3 by using the selected microbial strains after 30 days of composting, had the quality meeting the microbial organic fertilizer of the national standard QCVN 01-189:2019/BNNPTNT.

Keywords: Catfish farming sludge, cellulolytic bacteria, proteolysis bacteria, phosphate solubilizing bacteria

Ngày nhận bài: 29/3/2021

Ngày phản biện: 19/4/2021

Người phản biện: GS. TS. Phạm Văn Toàn

Ngày duyệt đăng: 27/4/2021

TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA VÀ BẢO VỆ GAN CỦA CAO CHIẾT CÂY LAN GẮM (*Lusidia discolor*) TẠI AN GIANG

Nguyễn Công Kha¹, Đỗ Thị Hồng Tươi², Nguyễn Lê Thanh Tuyền¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết cây Lan gắm chống lại tổn thương gan do paracetamol gây ra. Cao chiết cồn, chiết nước từ cây Lan gắm bằng phương pháp ngâm dầm kết hợp sóng siêu âm. Chuột được gây tổn thương gan bằng paracetamol cho uống liều 400 mg/kg. Chuột cho uống cao chiết nước (liều 100 và 200 mg/kg thể trọng) và cao chiết cồn (liều 110 và 220 mg/kg thể trọng). Kết quả cho thấy, cao chiết cồn, cao chiết nước từ cây Lan gắm có khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH với giá trị EC₅₀ lần lượt là 531,09 µg/mL và 644,01 µg/mL. Cao chiết cồn, cao chiết nước từ cây Lan gắm làm giảm hàm lượng AST, ALT trong huyết tương, giảm mức độ tổn thương gan và cải thiện đáng kể cấu trúc mô gan so với nhóm chuột bị tổn thương gan không sử dụng thuốc và cao chiết.

Từ khóa: Lan gắm, kháng oxy hóa, bảo vệ gan, MDA, DPPH

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang; ²Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan là cơ quan thực hiện các chức năng tổng hợp protein, bài tiết các enzyme và giải độc. Tuy nhiên, chức năng gan thường bị suy yếu do hóa chất độc hại, thuốc hoặc nhiễm trùng mầm bệnh. Phơi nhiễm mãn tính hoặc quá mức với các loại hóa chất tổng hợp dẫn đến xơ gan hoặc tổn thương ác tính không thể điều trị được. Bên cạnh đó, cơ chế sinh bệnh gan cũng có liên quan đến stress oxy hóa. Để bảo vệ gan cũng như hạn chế những ảnh hưởng xấu đến gan, đã có nhiều nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ thực vật. Các hợp chất flavonoid và polyphenol ở nhiều loại thực vật đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa. Các dịch chiết từ thực vật được xem là có hiệu quả và an toàn để phòng ngừa hoặc điều trị các rối loạn chức năng gan (Srivastava and Choudhary, 2014). Việc nghiên cứu tìm ra các sản phẩm kháng oxy hóa và bảo vệ gan có nguồn gốc từ thực vật đã và đang là một trong những mối quan tâm hàng đầu hiện nay. Cây Lan gấm (*Anoectochilus* sp.) là một loại thảo dược quý hiếm, và có những tác dụng như tăng cường sức khỏe, chữa thần kinh suy nhược, cao huyết áp, suy thận, chữa các bệnh viêm khí quản, viêm gan mãn tính, bệnh tim mạch,... (Zhang *et al.*, 2013). An Giang là một tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long và là nơi có diện tích rừng, núi rộng lớn với vùng Thất Sơn bầy núi chúa rất nhiều cây dược liệu vừa đa dạng và phong phú, quý hiếm. Theo nghiên cứu của Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh và Trung tâm Công nghệ Sinh học An Giang đã điều tra và thu thập được khoảng 2 - 6 giống cây Lan gấm tại vùng Núi cấm An Giang. Trong đó, giống Lan gấm AG6 thu thập tại xã Cô Tô, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang cho hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học có hàm lượng cao nhất như phenolic (55,17 mg gallic acid/g), flavonoid (724,58 mg quercetin/g), polysaccharide (93,25 mg glucose/g) và kinsenoside (62,75 mg/g trọng lượng khô) (Nguyễn Công Kha và *ctv.*, 2019). Kết quả phân tích trình tự gene vùng 18S rRNA với cặp mỗi ITS cho thấy, giống Lan gấm AG6 có kết quả tương tự với mẫu Lan gấm *Lusidia discolor* MK451745.1 với độ tương đồng 99,84%. Trước khi nghiên cứu phát triển các sản phẩm từ cây dược liệu cần tiến hành nghiên cứu tính an toàn và hiệu quả trên các mô hình dược lý nhằm đánh giá tác dụng của các cây dược liệu. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết cây Lan gấm trong tổn thương gan do paracetamol ở chuột thông qua đánh giá một số chỉ tiêu sinh hóa và mô học.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Lan gấm AG6 (*Lusidia discolor* MK451745.1) thu thập tại xã Cô Tô, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang và được lưu giữ tại Nhà lưới và phòng Nuôi cấy mô, Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang (sau 4 tháng chăm sóc).

Hóa chất thí nghiệm: DPPH, MDA, Vitamin C, GSH, sylimarin, paracetamol (Merck, Mỹ),... và hóa chất cần thiết khác.

Chuột nhắt, chủng *Swiss albino*, đực và cái, 6 - 7 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 18 - 25 g, được cung cấp từ Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột sử dụng khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi trong lồng có kích thước 25 × 35 × 15 cm (6 chuột/lồng) ổn định trong môi trường thí nghiệm 5 ngày và được cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ trong thời gian thử nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tạo cao chiết cây Lan gấm

Cây Lan gấm tại Trung tâm Công nghệ Sinh học (sau 4 tháng chăm sóc), thu thập, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 96 giờ và nghiền thành bột mịn, độ ẩm của cây Lan gấm tươi là 80,19%. 300 g bột Lan gấm khô được chiết với ethanol 80% và nước cất theo tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1 : 10 (w/v), kết hợp với sóng siêu âm 12 giờ, ngâm trong 72 giờ và để trong tối để tránh oxy hóa. Sau 72 giờ, hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 20 phút, thu phần dịch và bỏ phần bã. Phần dịch lọc qua giấy lọc Whatman 0,45 μm, thu dịch lọc và tiến hành cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C và đông khô bằng máy đông khô chân không để thu cao chiết Lan gấm, bảo quản ở nhiệt độ -4°C và thực hiện thí nghiệm. Hiệu suất cao cồn và nước Lan gấm đạt 5,06% và 6,62%. Độ ẩm cao chiết cồn Lan gấm đạt 13,19% và cao chiết nước Lan gấm là 15,08%.

2.2.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết Lan gấm

Khả năng ức chế gốc tự do DPPH, theo Shekhar và Anju (2014): 100 μL dịch chiết ở các nồng độ phản ứng với 1 μL dung dịch DPPH 0,2 mM, phản ứng trong nhiệt độ phòng trong 30 phút và trong điều kiện tối để tránh hiện tượng oxy hoá. Sau đó, hỗn hợp được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng λ = 517 nm. Khả năng ức chế gốc tự do DPPH của cao chiết được xác định theo công thức sau:

$$AA\% = (A_0 - A_1/A_0) \times 100.$$

Trong đó, AA%: phần trăm ức chế gốc tự do DPPH; A₀: độ hấp thụ quang phổ của mẫu đối chứng;

A1: độ hấp thụ quang phổ của mẫu cao chiết. Vitamin C là chất chuẩn được thực hiện tương tự mẫu cao chiết. Xác định EC_{50} của mẫu thử.

Cách xác định EC_{50} : Tiến hành khảo sát hoạt tính của mẫu ở nhiều nồng độ khác nhau. Với những mẫu có hoạt tính biến thiên tuyến tính với nồng độ, vẽ một đường thẳng $y = ax + b$ qua tất cả các điểm (với y là % ức chế và x là nồng độ); Với những mẫu có hoạt tính không biến thiên tuyến tính với nồng độ, một cách gần đúng, chọn hai nồng độ ức chế trên và dưới 50% và cũng tiến hành vẽ đường thẳng $y = ax + b \rightarrow$ sẽ thu được phương trình $y = ax + b$ với hệ số a, b đã biết. Từ phương trình $y = ax + b$ đã biết, thay $y = 50\%$ vào phương trình sẽ thu được giá trị x , đó chính là nồng độ ức chế 50% gốc tự do (EC_{50}).

2.2.3. Khảo sát tác động bảo vệ gan *in vivo* của cao chiết Lan gấm

Dựa trên kết quả phân tích đánh giá độc tính cấp của cao chiết cồn, chiết nước của cây Lan gấm trên mô hình động vật. Cao chiết cồn, chiết nước của cây Lan gấm thể hiện tính an toàn và không độc ở liều lượng 30 g/kg thể trọng chuột (dựa trên độ ẩm cao chiết). Đồng thời, dựa trên các phương pháp thử tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược (Viện Dược liệu, 2006) và độ ẩm cao chiết. Từ đó, suy ra liều sử dụng của cao chiết cồn (110 và 220 mg/kg) và chiết nước (100 và 200 mg/kg) của Lan gấm trong thử nghiệm.

Áp dụng mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol trên chuột nhắt. Khả năng chống oxy hóa, bảo vệ gan *in vivo* của các cao thử được đánh giá qua các thông số hoạt tính enzyme gan (ALT, AST), hàm lượng MDA, GSH và phân tích đại thể, vi thể gan trên mô hình chuột nhắt gây tổn thương bằng paracetamol cho uống liều 400 mg/kg thể trọng với thể tích 10 mL/kg (Maes *et al.*, 2016). Chuột đực, khỏe mạnh, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô ($n = 8 - 10$) như sau:

- Lô sinh lý: Cho chuột uống nước cất trong 14 ngày. Ngày thứ 15, cho chuột uống nước cất (thể tích cho uống 10 mL/kg).

- Lô chứng bệnh: Cho chuột uống nước cất trong 14 ngày. Ngày thứ 15, cho chuột uống nước cất (10 mL/kg).

- Lô đối chiếu: Cho chuột uống silymarin 100 mg/kg (pha trong nước cất) trong 14 ngày. Ngày thứ 15, cho uống paracetamol liều 400 mg/kg (pha trong nước cất).

- Lô thử cao LGC (2 lô): Cho chuột uống cao cồn Lan gấm pha trong nước cất liều lần lượt 110 và 220 mg/kg trong 14 ngày. Ngày thứ 15,

cho uống paracetamol liều 400 mg/kg (pha trong nước cất).

- Lô thử cao LGN (2 lô): Cho chuột uống cao nước Lan gấm pha trong nước cất liều lần lượt 100 và 200 mg/kg trong 14 ngày. Ngày thứ 15, cho uống paracetamol liều 400 mg/kg (pha trong nước cất).

Sau khi gây tổn thương gan bằng paracetamol 6 giờ, chuột được gây ngạt bằng đá CO_2 , mổ lấy máu tim và tách gan để tiến hành các xét nghiệm sinh hóa. Hoạt tính enzyme gan ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotransferase) được xác định bằng phương pháp đo động học enzyme tại Phòng khám Tao Đàn, Quận 1, Tp. Hồ Chí Minh. Phân tích cấu trúc vi thể gan: Tách lấy gan chuột, rửa sạch bằng NaCl 0,9% lạnh, thấm khô, cân và ghi nhận trọng lượng gan. Một phần gan được cố định trong formol 10% để làm xét nghiệm vi thể bằng phương pháp nhuộm hematoxylineosin (HE) tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quận 2 Thành phố Hồ Chí Minh.

Một phần gan được nghiền đồng thể trong dung dịch KCl 1,15% (v/v) theo tỉ lệ 1 : 10 (w/v) ở nhiệt độ 0 - 4°C. Hút 600 μ L dịch đồng thể cho vào eppendorf, thêm 300 μ L Tris-HCl 25 mM (pH 7,4). Trộn đều, ủ ở 37°C trong 60 phút. Thêm 300 μ L acid trichloroacetic (TCA) 10% vào eppendorf. Ly tâm lạnh ở nhiệt độ 4°C, 10.000 rpm trong 15 phút. Lấy 300 μ L dịch trong hoặc MDA chuẩn cho phản ứng với 150 μ L acid thiobarbituric 0,8% ở 100°C 15 phút, làm nguội và hút 200 μ L cho vào đĩa 96 giếng, đo OD ở 532 nM. Hàm lượng MDA (nM) tính theo phương trình biểu diễn mối quan hệ giữa OD và nồng độ MDA chuẩn (0,312 - 40 nM) được tiến hành song song.

Hút 100 μ L dịch đồng thể hoặc GSH chuẩn vào eppendorf, thêm 100 μ L TCA 10%, trộn đều. Ly tâm 15 phút ở 5.000 rpm, 0 - 4°C. Hút 50 μ L dịch nổi cho vào đĩa 96 giếng, thêm 200 μ L Tris-HCl (pH 8,9) và 20 μ L thuốc thử Ellman 150 μ M vào mỗi giếng. Lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Đo OD ở bước sóng 405 nM. Hàm lượng GSH (nM) được tính theo phương trình hồi quy của GSH chuẩn được tiến hành song song ở các nồng độ 6,25 nM - 200 nM.

2.2.4. Phương pháp thống kê

Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm SEM. Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm Kruskal-Wallis và Mann-Whitney đối với số liệu có phân phối không chuẩn và phép kiểm student t-test đối với số liệu có phân phối chuẩn trên phần mềm SPSS 22.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$ và $p < 0,01$.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 năm 2020 đến tháng 11 năm 2020 tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết Lan gấm

Vitamin C thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khảo sát bằng phương pháp DPPH với giá trị EC_{50} 5,70 ± 0,20 µg/mL (Bảng 1). Cao cồn Lan gấm cồn

(LGC) và cao nước Lan gấm (LGN) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khảo sát bằng phương pháp DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là 644,01 ± 12,48 µg/mL và 531,09 ± 19,80 µg/mL. Cao chiết cồn và nước Lan gấm có khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH là do cao chiết có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như flavonoid, alkaloid, tannin và phenol. Các nhóm hợp chất phenolic và flavonoid là các hợp chất oxy hóa mạnh bởi vì các hợp chất phenolic và flavonoid có khả năng hấp thụ và trung hòa các gốc tự do cũng như khử các phản ứng oxy hóa (Nimse and Pal, 2015).

Bảng 1. Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của vitamin C và các cao thử

Vitamin C		Cao LGC		Cao LGN	
Nồng độ (µg/mL)	HTCO (%) (Mean ± SD)	Nồng độ (µg/mL)	HTCO (%) (Mean ± SD)	Nồng độ (µg/mL)	HTCO (%) (Mean ± SD)
10	84,61 ± 1,60	1.000	73,34 ± 1,63	1000	80,90 ± 2,32
8	74,37 ± 2,79	800	61,93 ± 1,55	800	73,24 ± 1,41
6	58,20 ± 3,03	600	45,90 ± 1,59	600	60,06 ± 1,89
4	36,51 ± 2,81	400	32,93 ± 1,77	400	39,73 ± 1,69
2	17,65 ± 1,43	200	18,21 ± 1,35	200	21,58 ± 1,46
1	13,88 ± 1,81	100	18,77 ± 1,25	100	20,32 ± 0,79
0,5	3,90 ± 0,09	50	9,00 ± 1,32	50	11,40 ± 1,36
Y = 8,4457x + 1,8692 R ² = 0,9886		Y = 0,0661x + 7,421 R ² = 0,9897		Y = 0,0756x + 9,8781 R ² = 0,9832	
$EC_{50} = 5,70 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$		$EC_{50} = 644,01 \pm 12,48 \mu\text{g/mL}$		$EC_{50} = 531,09 \pm 19,80 \mu\text{g/mL}$	

3.2. Khảo sát tác động bảo vệ gan *in vivo* của cao chiết Lan gấm

Hiệu quả bảo vệ gan được đánh giá qua kết quả các chỉ tiêu sinh hóa bao gồm hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh, hàm lượng MDA và GSH trong gan. Nồng độ các enzyme transaminase

trong huyết thanh là dấu hiệu quan trọng để xác định mức độ nghiêm trọng của sự tổn thương gan. Chuột được gây tổn thương gan bằng paracetamol làm tăng đáng kể hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh cho thấy gan đã tổn thương (Kandimalla *et al.*, 2016).

Bảng 2. Số lượng chuột chết và hoạt tính enzyme AST, ALT của các lô thử nghiệm

Lô	Số chuột/Lô			AST (U/L)	ALT (U/L)
	Tổng	Chết	Sống		
Sinh lý	8	0	8	82,21 ± 7,37	43,61 ± 1,50
Chứng bệnh	10	2	8	1.806,19 ± 493,69**	2.096,53 ± 404,71**
Silymarin 100 mg/kg	10	2	8	320,46 ± 109,25*#	461,83 ± 199,00**#
Cao LGC 110 mg/kg	10	3	7	382,53 ± 224,16**#	449,86 ± 318,49**#
Cao LGC 220 mg/kg	10	2	8	394,46 ± 175,75*#	484,68 ± 233,70**#
Cao LGN 100 mg/kg	10	3	7	265,59 ± 122,15**#	329,69 ± 210,76**#
Cao LGN 200 mg/kg	10	3	7	512,86 ± 306,92**#	586,37 ± 400,99**#

Ghi chú: **p* < 0,05 và ***p* < 0,01 so với lô sinh lý; #*p* < 0,05 và ##*p* < 0,01 so với lô chứng bệnh. Phép kiểm Kruskal-Wallis và Mann-Whitney hoặc student *t*-test. Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± SEM.

Hoạt tính AST, ALT ở lô chứng bệnh tăng có ý nghĩa so với lô sinh lý ($p < 0,01$), cụ thể AST gấp khoảng 22,0 lần, ALT gấp khoảng 48,1 lần, chứng tỏ tế bào gan đã bị tổn thương làm phóng thích các enzym AST, ALT ra dịch ngoại bào, làm tăng hoạt tính AST, ALT huyết tương. Như vậy, mô hình đã gây tổn thương gan thành công bằng paracetamol sau 6 giờ. Tiếp tục theo dõi các chuột gây tổn thương gan trong 24 giờ nghiên cứu cho thấy, chuột ở các lô được gây bệnh bằng cách cho chuột nhất uống paracetamol liều 400 mg/kg bị chết trong vòng 24 giờ sau khi uống có hiệu suất tử vong trong khoảng 2/10 - 3/10 (20% - 30%).

Ở lô đối chứng được dự phòng bằng cách cho uống silymarin liều 100 mg/kg trong vòng 14 ngày, sự tăng hoạt tính enzym gan AST là ALT được hạn chế, cụ thể, hoạt tính AST giảm 82,3% và ALT giảm 78,0% so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Các lô chuột được cho uống cao chiết cồn Lan gấm liều 110 mg/kg và 220 mg/kg có hoạt tính AST giảm lần lượt 78,8% và 78,2%, hoạt tính ALT giảm lần lượt 78,5% và 76,9%, có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Đối với các lô chuột được cho uống cao chiết nước Lan gấm liều 100 mg/kg và 200 mg/kg, hoạt tính enzym gan giảm 70 - 85% so với lô chứng bệnh, cụ thể, hoạt tính AST giảm lần lượt 85,3% và 71,6%, hoạt tính ALT giảm lần lượt 84,3% và 72,0% ($p < 0,05$). Tác động làm giảm hoạt tính enzym gan

của các lô thử nghiệm khác biệt không đáng kể so với tác động ở lô đối chứng dương cho chuột uống silymarin ($p > 0,05$). Giữa 2 liều thử nghiệm của cùng cao thử, mức độ làm giảm hoạt tính enzym gan AST và ALT khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 2). Như vậy, cao chiết cồn Lan gấm liều 110 mg/kg và 220 mg/kg, cao chiết nước Lan gấm liều 100 mg/kg và 200 mg/kg thể hiện tác động bảo vệ gan, làm giảm sự tăng hoạt tính AST, ALT trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol tương tự đối chứng dương silymarin liều 100 mg/kg, nhưng chưa trở về mức sinh lý bình thường.

Gây tổn thương gan bằng paracetamol làm giảm GSH trong gan và các chất bảo vệ gan hiệu quả sẽ làm phục hồi hàm lượng GSH trong mô gan (Lu *et al.*, 2017). Đồng thời, MDA là sản phẩm peroxide hóa lipid, được hình thành bởi các gốc tự do tấn công màng tế bào và được sử dụng rộng rãi như là một dấu chuẩn sinh học về sự tổn thương peroxide hóa lipid (Simeonova *et al.*, 2014). Tác nhân bảo vệ gan hiệu quả sẽ làm giảm được hàm lượng MDA trong mô gan (Tsai *et al.*, 2017). Ở lô chứng bệnh, paracetamol liều 400 mg/kg làm tăng 121,8% hàm lượng MDA có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và làm giảm 19,6% hàm lượng GSH trong mô gan so với lô sinh lý. Như vậy, paracetamol cho chuột nhất uống liều 400 mg/kg đã gây ra tình trạng stress oxy hóa, làm tăng quá trình peroxid hóa lipid trong mô gan (Bảng 3).

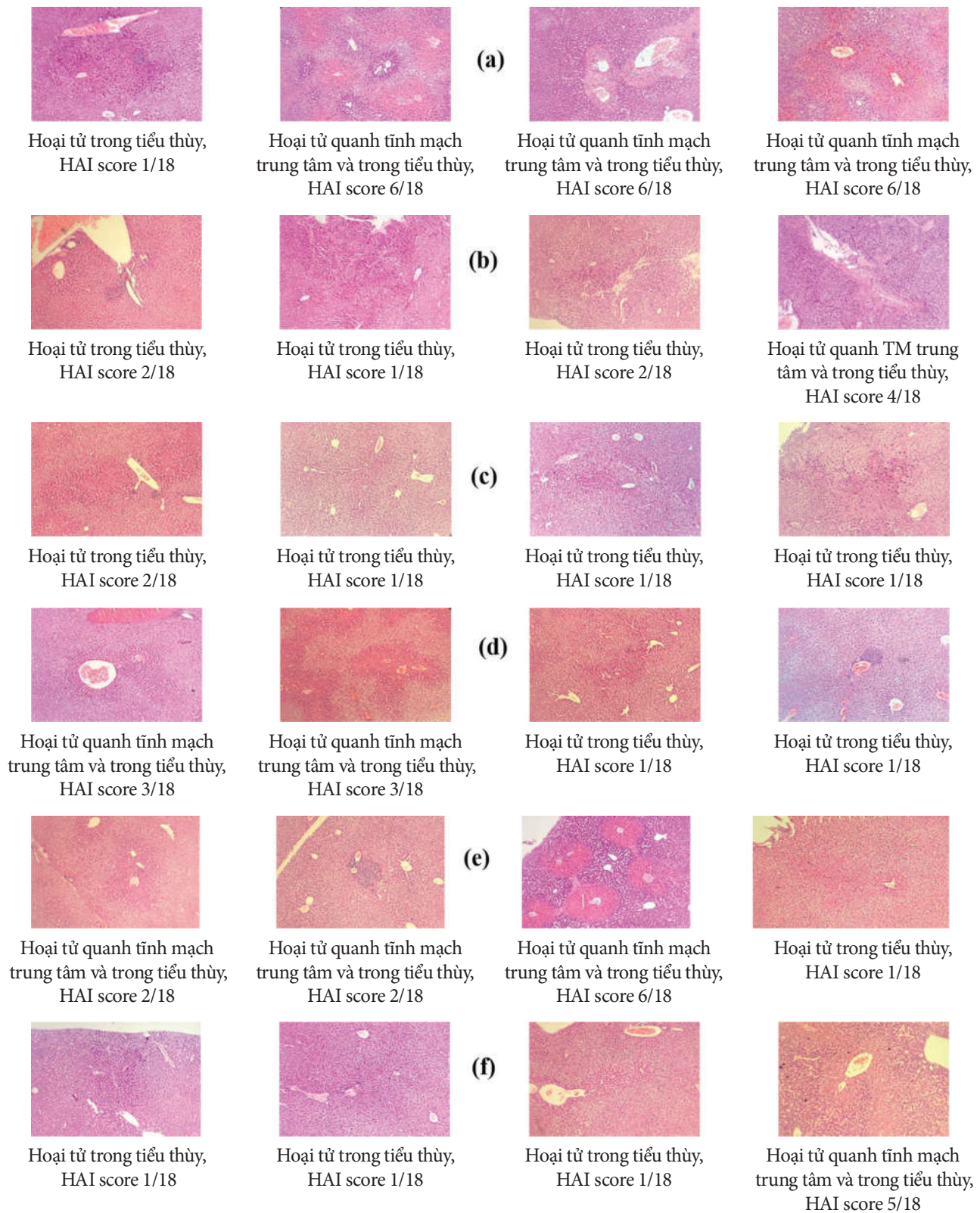
Bảng 3. Hàm lượng MDA, GSH trong mô gan của các lô chuột thử nghiệm

Lô	Chuột TN (n)	MDA (nmol/g protein)	GSH (nmol/g protein)
Sinh lý	8	135,67 ± 24,21	8.580,25 ± 1.159,58
Chứng bệnh	8	301,11 ± 67,94*	6.901,05 ± 765,02
Silymarin 100 mg/kg	8	213,32 ± 21,97*	7.085,53 ± 598,14
Cao LGC 110 mg/kg	7	258,09 ± 31,59**	8.111,55 ± 1.049,80
Cao LGC 220 mg/kg	8	328,49 ± 52,15**	9.903,21 ± 1.505,81
Cao LGN 100 mg/kg	7	191,58 ± 16,74	6.446,54 ± 399,34
Cao LGN 200 mg/kg	7	288,79 ± 14,06**	7.326,96 ± 227,71

Ghi chú: * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ so với lô sinh lý; n: số lượng chuột thí nghiệm. Phép kiểm Kruskal-Wallis và Mann-Whitney hoặc student t-test. Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± SEM.

Hàm lượng MDA trong gan của lô cho chuột nhất uống silymarin 100 mg/kg, cao LGC 110 mg/kg và cao LGN 100 mg/kg giảm lần lượt 29,1%; 14,3%; 36,4% so với lô chứng bệnh nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) có thể do sự chênh lệch giữa các cá thể trong cùng lô lớn. Đối với hàm lượng GSH gan, các lô có hàm lượng GSH khác biệt không đáng kể

so với lô chứng bệnh cũng như lô sinh lý ($p > 0,05$); điều này có thể giải thích do mức độ làm giảm hàm lượng GSH gan của lô chứng bệnh giảm không đáng kể so với lô sinh lý. Kết quả bước đầu gợi ý silymarin liều 100 mg/kg, cao LGC liều 110 mg/kg và cao LGN liều 100 mg/kg có thể tác động làm giảm quá trình peroxid hóa lipid trong mô gan.



Hình 1. Kết quả vi phẫu gan, (a) chứng bệnh; (b) Silymarin 100 mg/kg; (c) cao chiết cồn 110 mg/kg thể trọng; (d) cao chiết cồn 220 mg/kg thể trọng; (e) cao chiết cồn 100 mg/kg thể trọng và (f) cao chiết cồn 200 mg/kg thể trọng

Ghi chú: HAI (Histologic Activity Index): chỉ số hoạt tính mô học.

Kết quả phân tích vi thể cho thấy 8/8 mẫu gan chuột ở lô sinh lý xuất hiện tình trạng hoại tử nhẹ trong tiểu thùy, viêm gan mức độ tối thiểu (1/18 và 2/18). Chuột ở lô chứng bệnh sau khi cho uống paracetamol 400 mg/kg có 2/8 mẫu có tình trạng viêm gan nhẹ (1/18 và 3/18), 6/8 mẫu có mức độ viêm gan trung bình (6/18) với tình trạng hoại tử tĩnh mạch trung tâm và hoại tử trong tiểu thùy, cho thấy paracetamol gây tổn thương cấu trúc vi thể tế bào gan. Khi cho chuột uống silymarin 100 mg/kg có sự cải thiện tình trạng tổn thương gan ở cấp độ cấu trúc tế bào gan, cụ thể, có 4/8 mẫu viêm gan mức độ nhẹ (1/18 - 3/18) và 4/8 mẫu có mức độ viêm gan trung bình (4/18 - 8/18) (Hình 1). Ở các lô dự phòng tổn thương gan do paracetamol bằng cách cho uống cao chiết từ Lan gấm, đa số các mẫu có mức độ tổn thương nhẹ (1/18 - 3/18). Số lượng mẫu viêm gan mức độ trung bình (4/18 - 8/18) giảm so với lô chứng bệnh; cụ thể: lô LGC 110 mg/kg có 1/7 mẫu, lô LGC 220 mg/kg có 0/8 mẫu, lô LGN 100 mg/kg có 2/7 mẫu và lô LGN 200 mg/kg có 3/7 mẫu.

Silymarin là một flavonoid thực vật hiện diện trong Kế sữa (*Silybum marianum*), một loài cây có nguồn gốc từ khu vực Địa Trung Hải, thuộc họ Asteraceae. Cây được đặc trưng bởi các nhánh gai và nhựa cây màu trắng đục. Silymarin là một hỗn hợp các flavolignan trong đó chiếm phần lớn là silybin (50 - 70%), silydianin và silychristin. Cơ chế tác động của silymarin có thể kể đến 4 cơ chế: (1) silymarin có khả năng trung hòa các gốc tự do, ức chế peroxyd hóa lipid và tăng hàm lượng GSH; (2) silymarin có khả năng điều hòa tính thấm màng tế bào, giúp ổn định màng dưới sự tác động của chất độc ngoại sinh; (3) silymarin có khả năng tăng cường tổng hợp ARN ribosom, giúp sự tổng hợp protein, thúc đẩy phục hồi các tế bào gan bị tổn thương và kích thích sự phát triển các tế bào gan mới; (4) silymarin ức chế sự biến đổi tế bào hình sao thành tổ chức xơ, giảm sự hình thành các sợi collagen đưa đến xơ gan. Nhờ vào hoạt tính bảo vệ gan và cơ chế tác động đã được biết rõ, silymarin thường được lựa chọn là chất đối chứng dương trong nhiều nghiên cứu đánh giá tác động bảo vệ gan của các dược liệu đối với tác nhân gây độc gan (Singh *et al.*, 2013).

Khả năng phòng ngừa oxy hóa, bảo vệ gan của cao chiết Lan gấm có thể gợi ý với sự hiện diện của các hợp chất phenolic, flavonoid, polysaccharide và kinsenoside,... Hợp chất nhóm phenolic có hoạt tính chống oxy hóa và đã được chứng minh qua hai cơ chế: cơ chế trực tiếp - trung hoà gốc tự do và cơ chế

gián tiếp - tăng các enzym chống oxy hóa, sản xuất các enzym giải độc pha II (Singh *et al.*, 2013). Bên cạnh đó, khả năng kháng oxy hóa thường liên quan đến hiệu quả bảo vệ gan (Morisco *et al.*, 2008), nên kết quả đạt được trong nghiên cứu này là phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây. Trong các nghiên cứu y dược hiện đại các hợp chất phenolic, alkaloid, flavonoid và terpenoid sẽ là nguồn cung cấp các chất có tiềm năng cho các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học ứng dụng trong phòng và điều trị các bệnh ở người (Mekem *et al.*, 2001). Như vậy, cao chiết từ Lan gấm thể hiện tác động bảo vệ gan, giúp làm giảm tổn thương cấu trúc vi thể gan trên chuột nhắt gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol.

IV. KẾT LUẬN

Cao chiết cồn, chiết nước cây Lan gấm có khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH. Cao chiết cồn (liều lượng 110 và 220 mg/kg thể trọng) và cao chiết nước (liều 100 và 200 mg/kg thể trọng) cây Lan gấm có khả năng làm giảm hàm lượng AST, ALT, MDA và tăng GSH trong huyết tương và giảm mức độ tổn thương gan bằng paracetamol.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học An Giang và Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện và hỗ trợ nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Thị Gấm, Hà Việt Hải, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc**, 2017. Khảo sát một số đặc điểm hóa học và tác dụng chống oxy hóa (antioxydant) của các hợp chất Flavonoid chiết xuất từ một số loài lan Kim tuyến của Việt Nam. *Tạp chí Khoa học, ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, tập 33, Số 1S: 104-113.
- Nguyễn Công Kha, Nguyễn Phạm Tuấn, Lâm Bảo Như Phương, Nguyễn Phạm Tú**, 2019. Phân tích hàm lượng flavonoid, phenolic, polysaccharide và kinsenoside của cây Lan gấm thu thập ở vùng Thất sơn, An Giang và tỉnh Lâm Đồng. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc năm 2019*.
- Viện Dược liệu**, 2006. *Phương pháp thử tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*. Nhà xuất Bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Kandimalla, R., Kalita, S., Saikia, B.**, 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *Randia dumetorum* Lam. Leaf and bark via inhibition of oxidative stress and inflammato cytokines. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 205.

- Lu, Y., Chen, J., Zhao, Y.,** 2017. Hepatoprotective effects of phloretin against CCl₄-induced liver injury in mice. *Food and Agricultural Immunology*, 28 (2): 211-222.
- Maes, M., Mathieu, V. and Hartmut, J.,** 2016. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290: 86-97.
- Mekem S.M., Konig W.A.,** 2001. Study of essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochem*, 58: 799-801.
- Morisco F., Vitaglione P., Amoroso D., Russo B., Fogliano V., Caporaso N.,** 2008. Food and liver health. *Mol. Asp. Med.*, 29: 144-150.
- Shekhar, T.C. and Anju, G.,** 2014. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4): 244-249.
- Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., and Mitcheva, M.,** 2014. Review Article: Some in vitro/ in vivo chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats. *BioMed Research International*, 2014, 706302: 1-6.
- Singh S., Thomas M.B., Singh S.P., & Bhowmik D.,** 2013. Plants used in hepatoprotective remedies in traditional Indian medicine. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(1): 58.
- Srivastava, S., and Choudhary, G.P.,** 2014. Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3 (1): 194-197.
- Tsai, J.C., Chiu, C.S., Chen, Y.C.,** 2017. Hepatoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* flowers against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17(1): 139.
- Wang S.Y., Y.H.Kuo, H.N. Chang, P.L. Kang, K.F. Lin, L.F. Shyur,** 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* hayata. *J. Agric. Food Chem.*, 27; 50(7): 1859-1865.
- Zhang, F.S., Ly, Y.L., Zhao, Y. and, Guo, S.X.,** 2013. Promoting role of an endophyte on the growth and contents of kinsenosides and flavonoids of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a rare and threatened medicinal orchidaceae plant. *J. Zhejiang University Science B*, 14 (9): 785-792.
- Nimse, S.B. and Pal, D.,** 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, 5 (35): 27986-28006.

Antioxidant and hepatoprotective activity of *Lusidia discolor* extract in An Giang

Nguyen Cong Kha, Do Thi Hong Tuoi, Nguyen Le Thanh Tuyen

Abstract

The study was conducted to evaluate the antioxidant and hepatoprotective activity of *L. discolor* MK451745.1 extract against paracetamol liver injury. *L. discolor* extract was extracted by combining the immersion method combined with ultrasonic waves. Mice were damaged by paracetamol (400 mg/kg body weight). Mice were treated with *L. discolor* ethanol extract (dose of 110 mg/kg and 220 mg/kg body weight) and *L. discolor* aqueous extract (dose of 100 mg/kg and 200 mg/kg body weight). The results showed that the aqueous and ethanol extracts of *L. discolor* had antioxidant ability by DPPH method with EC₅₀ value of water and ethanol 531.09 µg/mL and 644.01 µg/mL, respectively. *L. discolor* aqueous and ethanol extracts effectively reduced the level of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in serum and the malondialdehyde (MDA) level, increased the activity of reduced glutathione (GSH) and had significant improvement in liver tissue compared to the non-treated control group by drug and extract.

Keywords: *L. discolor* MK451745.1, antioxidant, hepatoprotective, MDA, DPPH

Ngày nhận bài: 04/3/2021
Ngày phản biện: 18/3/2021

Người phản biện: TS. Nghiêm Tiến Chung
Ngày duyệt đăng: 27/4/2021

ẢNH HƯỞNG CỦA MẬT ĐỘ LÊN TĂNG TRƯỞNG VÀ TỶ LỆ SỐNG CỦA TÔM CÀNG XANH (*Macrobrachium rosebergii*) NUÔI THEO CÔNG NGHỆ BIOFLOC

Châu Tài Tào¹, Nguyễn Văn Hòa¹, Trần Ngọc Hải¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tìm ra ảnh hưởng của mật độ lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và năng suất của tôm càng xanh nuôi theo công nghệ biofloc. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với các mật độ khác nhau là (i) 480 con/m³, (ii) 640 con/m³, (iii) 800 con/m³, và (iv) 960 con/m³. Sau mỗi tháng nuôi giảm mật độ còn 50% của tháng trước đó, thời gian nuôi là 6 tháng, bể nuôi tôm có thể tích 1 m³, độ mặn 5‰, tôm giống có khối lượng 0,03 ± 0,01 g/con, sử dụng rỉ đường để tạo biofloc với tỷ lệ C/N = 15. Kết quả nghiên cứu sau 180 ngày nuôi, các chỉ tiêu môi trường và biofloc nằm trong khoảng thích hợp cho tôm sinh trưởng và phát triển tốt. Tăng trưởng về khối lượng của tôm ở nghiệm thức 1 (22,9 ± 0,84 g/con) cao nhất khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên tỷ lệ sống và năng suất trung bình của tôm sau 6 tháng nuôi ở nghiệm thức 3 tốt nhất. Từ đó có thể kết luận rằng nuôi tôm càng xanh theo công nghệ biofloc ở 800 con/m³ là tốt nhất.

Từ khóa: Tôm càng xanh, mật độ, biofloc

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm càng xanh là một trong những đối tượng quan trọng của nghề nuôi trồng thủy sản. Đối với Đồng bằng sông Cửu Long, nghề nuôi tôm càng xanh trước đây được chú trọng ở vùng nước ngọt. Tuy nhiên, thời gian gần đây, tôm càng xanh trở thành đối tượng đặc biệt quan trọng cho nuôi ở vùng nước lợ. Theo Huỳnh Kim Hường (2016), kết quả khảo sát cho thấy có 15.270 ha nuôi tôm càng xanh, đạt sản lượng 5.770 tấn, trong đó các tỉnh vùng nước lợ ven biển chiếm 90,1% tổng diện tích nuôi và 64,8% tổng sản lượng tôm nuôi. Đã có một số mô hình nuôi thâm canh tôm càng xanh trong ao đất ở Long An, mật độ nuôi 40 con/m² và năng suất đạt 3,25 tấn/ha (Dương Nhật Long và *ctv.*, 2006); nuôi tôm càng xanh thâm canh trong ao đất ở Bến Tre, với mật độ thả nuôi 40 con/m² và năng suất 3,53 tấn/ha (Dương Nhật Long và Đặng Hữu Tâm, 2006). Cùng với sự tăng nhanh về diện tích và sản lượng thì môi trường ngày càng bị ô nhiễm dẫn đến tình hình dịch bệnh xảy ra nhiều hơn. Vì thế, việc tìm giải pháp để hạn chế rủi ro do mầm bệnh là vấn đề cấp bách hiện nay. Biofloc có tác dụng như là chế phẩm sinh học và có nhiều vai trò quan trọng trong việc ổn định môi trường nước, an toàn sinh học, ngăn ngừa mầm bệnh, làm thức ăn trực tiếp cho tôm (McIntosh *et al.*, 2000), mặt khác nuôi tôm càng xanh nhiều giai đoạn nhằm cải thiện tỷ lệ sống và năng suất của tôm. Tuy nhiên, để xác định mật độ nuôi thích hợp của từng giai đoạn lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và năng suất của tôm càng xanh áp dụng công nghệ biofloc là rất cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn nước thí nghiệm

Nguồn nước thí nghiệm được lấy từ nguồn nước ngọt (nước máy thành phố) và nước ót độ mặn 90‰. Nước ót pha với nước ngọt tạo thành nước có độ mặn 5‰, sau đó được xử lý bằng chlorine với nồng độ 50 g/m³. Sục khí đến khi hết lượng chlorine trong nước, sử dụng sodium bicarbonate để nâng độ kiềm đạt 120 mg CaCO₃/L rồi cấp nước đã xử lý vào bể nuôi qua túi lọc 5 μm.

2.1.2. Nguồn tôm giống

Tôm càng xanh giống có khối lượng 0,03 ± 0,01 g/con được ương tại trại thực nghiệm nước lợ Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ. Tôm giống có chất lượng tốt.

2.1.3. Tạo biofloc

Biofloc được tạo bằng nguồn carbon từ rỉ đường tỷ lệ C/N = 15. Hàm lượng carbohydrate trong rỉ đường là 46,7%. Rỉ đường được hòa vào nước rồi ủ 24 giờ sau đó bổ sung trực tiếp vào bể nuôi, lượng rỉ đường được bổ sung 1 ngày/lần. Phương pháp bổ sung rỉ đường dựa theo lượng thức ăn mỗi ngày cho tôm ăn. Lượng rỉ đường được bổ sung vào bể nuôi tôm dựa theo lượng thức ăn nhân tạo sử dụng có 40% protein được tính theo công thức của Avnimelech (2015).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức

¹ Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ