

MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN VÀ TỒN TẠI CỦA VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PHÂN LẬP TỪ MẪU HÀU

Vũ Thị Thu Trà¹, Trương Hà Thái¹,
Cam Thị Thu Hà¹, Lưu Thị Hải Yến², Đồng Văn Hiếu^{1*}

*Tác giả liên hệ email: dvhieuvet@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ muối (NaCl) và tia tử ngoại đến khả năng tồn tại và phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ mẫu hải sản. Hai chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu hải sản được nuôi cấy trong môi trường APW ở các điều kiện nhiệt độ 4°C, 27°C, 37°C, 42°C, 47°C; đặt dưới tia tử ngoại và nuôi cấy trong môi trường APW có nồng độ NaCl lần lượt là 2%, 6% và 10%. Số lượng *V. parahaemolyticus* ở các điều kiện khác nhau được xác định theo thời gian. Phương pháp cấy nhỏ giọt trên thạch được sử dụng để định lượng *V. parahaemolyticus*. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ và nồng độ NaCl thích hợp nhất để hai chủng *V. parahaemolyticus* sinh trưởng là 37°C và 2% NaCl. Ở nhiệt độ 27°C và 42°C hay ở nồng độ muối 6% NaCl, *V. parahaemolyticus* vẫn có khả năng sinh trưởng nhưng kém hơn so với ở 37°C và 2% NaCl. Ở điều kiện lạnh 4°C, cả hai chủng *V. parahaemolyticus* không có khả năng nhân lên mà chỉ duy trì trạng thái ổn định về số lượng. Trong khi đó ở nhiệt độ 47°C, nồng độ 10% NaCl hoặc dưới tác động của tia tử ngoại, *V. parahaemolyticus* không có khả năng sinh trưởng, số lượng vi khuẩn giảm dần theo thời gian theo dõi.

Từ khóa: *Vibrio parahaemolyticus*, nhiệt độ, nồng độ muối NaCl, tia tử ngoại.

Factors affecting the growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oyster

Vu Thi Thu Tra, Truong Ha Thai,
Cam Thi Thu Ha, Luu Thi Hai Yen, Dong Van Hieu

SUMMARY

This study was performed to identify the effect of temperature, NaCl concentration and ultraviolet ray on the growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oyster. Two *V. parahaemolyticus* isolates were incubated in APW at 4°C, 27°C, 37°C, 42°C, 47°C; under ultraviolet light; and incubated in APW with 2%, 6%, and 10% NaCl. The number of *V. parahaemolyticus* at different conditions was determined over time. Drop planting method was used for *V. parahaemolyticus* quantitative. The studied results showed that the optimum temperature and NaCl concentration for the growth of two *V. parahaemolyticus* isolates were 37°C and 2% NaCl, respectively. At temperature of 27°C and 42°C, or at 6% NaCl, *V. parahaemolyticus* were able to growth but less than at 37°C and 2% NaCl. At 4°C, both *V. parahaemolyticus* isolates were not able to multiply, only maintaining stable numbers. Meanwhile, at 47°C, 10% NaCl concentration, or under influence of ultraviolet light, *V. parahaemolyticus* were unable to growth with decreasing numbers over time.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, temperature, NaCl concentration, ultraviolet light.

¹ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hầu cũng như nhiều loại hải sản khác được coi là nguồn thực phẩm có giá trị, giàu chất dinh dưỡng như protein, vitamin và khoáng chất (Oehlenschlager, 2012). Tuy nhiên, ăn hải sản hay hải sản sống hoặc chưa được nấu chín lại tiềm ẩn nguy cơ mắc bệnh truyền lây qua thực phẩm do có chứa các vi sinh vật gây bệnh (Baker-Austin và cs., 2018; Butt và cs., 2004; Tuševljak và cs., 2012). Trong số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm liên quan đến ăn hải sản, *Vibrio (V.) parahaemolyticus* là vi khuẩn phổ biến nhất với tỷ lệ lưu hành cao (Baker-Austin và cs., 2018; Odeyemi, 2016). Nghiên cứu của Vu và cs. (2022) cho biết tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm *V. parahaemolyticus* trong mẫu hải sản là 40%, với lượng *V. parahaemolyticus* dao động trong khoảng 0,56 - 1,63 Log₁₀ MPN/g.

V. parahaemolyticus là vi khuẩn gram âm, thuộc giống *Vibrio*, sống tự nhiên trong môi trường nước biển và vùng cửa sông (Huehn và cs., 2014). Lượng *V. parahaemolyticus* trong hải sản và các loại hải sản phụ thuộc vào mức độ ô nhiễm của nguồn nước sử dụng trong nuôi trồng, điều kiện thu hoạch, bảo quản, vận chuyển, phân phối và bày bán (Iwamoto và cs., 2010). *V. parahaemolyticus* được báo cáo là tác nhân gây ra các vụ ngộ độc do ăn hải sản tại nhiều nước trong đó có Úc, Mỹ, Canada (Harlock và cs., 2022; Taylor và cs., 2018; Haendiges và cs., 2016). Người bị ngộ độc do *V. parahaemolyticus* có các triệu chứng như tiêu chảy ra nước, đau quặn bụng, buồn nôn, nôn mửa, nhức đầu, sốt và ớn lạnh (Ndraha và cs., 2020). Liều gây ngộ độc thực phẩm do *V. parahaemolyticus* khoảng 2×10^5 - 3×10^7 tế bào vi khuẩn (Doyle và Buchanan, 2013).

Để đưa số lượng *V. parahaemolyticus* trong hải sản xuống mức an toàn cho người tiêu dùng, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc quản lý từ khâu sản xuất ban đầu đến tiêu dùng, cũng như nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến mật độ *V. parahaemolyticus* và thử nghiệm các biện pháp kiểm soát (Ndraha và cs., 2020). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xác định

ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ muối NaCl và tia tử ngoại đến khả năng tồn tại và phát triển của *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu hải sản.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Xác định ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng tồn tại và phát triển của *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu hải sản, gồm nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ muối NaCl và tia tử ngoại bước sóng 254 nm.

2.2. Nguyên liệu

2.2.1. Chủng *V. parahaemolyticus*

Hai chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu hải sản trong nghiên cứu trước đây của Vu và cs. (2022) được sử dụng trong nghiên cứu này, ký hiệu là chủng V1 và V2.

2.2.2. Môi trường sử dụng cho nghiên cứu

- Môi trường Alkaline Peptone Water (APW) (Merck, Đức)

- Môi trường Luria Bertani (LB) agar (Sigma - Aldrich, Mỹ)

- Môi trường Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, Đức)

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nuôi cấy *V. parahaemolyticus* trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Canh khuẩn *V. parahaemolyticus* sau khi ủ qua đêm được pha loãng rồi nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 10ml môi trường APW 2% NaCl ở 27°C, 37°C và 42°C. Ở điều kiện 4°C, ống môi trường được đặt trong tủ lạnh có kiểm soát nhiệt độ. Số lượng vi khuẩn được xác định tại các mốc thời gian 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 24 giờ. Ở điều kiện 47°C, canh khuẩn *V. parahaemolyticus* trong môi trường APW 2% NaCl sau khi nuôi cấy qua đêm được đặt trong bể ổn nhiệt. Số lượng vi khuẩn được xác định tại các mốc thời gian 0 phút, 20 phút, 40 phút và 60 phút. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.2. Nuôi cấy *V. parahaemolyticus* ở các nồng độ muối NaCl khác nhau

Canh khuẩn *V. parahaemolyticus* sau khi ủ qua đêm được pha loãng và nuôi cấy trong các ống nghiệm chứa 10ml môi trường APW với các nồng độ muối NaCl 2%, 6% và 10% ở 37°C. Số lượng vi khuẩn được xác định tại các mốc thời gian 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 24 giờ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.3. Thử nghiệm ảnh hưởng của tia tử ngoại đến khả năng tồn tại của *V. parahaemolyticus*

Canh khuẩn *V. parahaemolyticus* sau khi nuôi cấy qua đêm được chuyển sang đĩa petri nhựa vô trùng đường kính 9 mm. Các đĩa petri có chứa canh khuẩn được đặt dưới tia tử ngoại có bước sóng 254 nm. Số lượng vi khuẩn được xác định tại các mốc thời gian 0 phút, 10 phút, 20 phút, 30 phút. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.4. Định lượng *V. parahaemolyticus*

Phương pháp cấy nhỏ giọt trên thạch được sử dụng để định lượng *V. parahaemolyticus*

ở các thời điểm theo dõi. Canh khuẩn *V. parahaemolyticus* tại các thời điểm theo dõi được pha loãng theo hệ pha loãng thập phân $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} \dots$. Nhỏ 20µl dung dịch đã pha loãng mẫu ở các độ pha loãng liên tiếp lên thạch LB. Dùng que cấy nhựa vô trùng lúng đều mẫu trên mặt thạch. Đem các đĩa thạch ủ qua đêm trong tủ ấm ở 37°C. Sau thời gian ủ, đếm số khuẩn lạc mọc ở các độ pha loãng, từ đó tính toán xác định số lượng vi khuẩn.

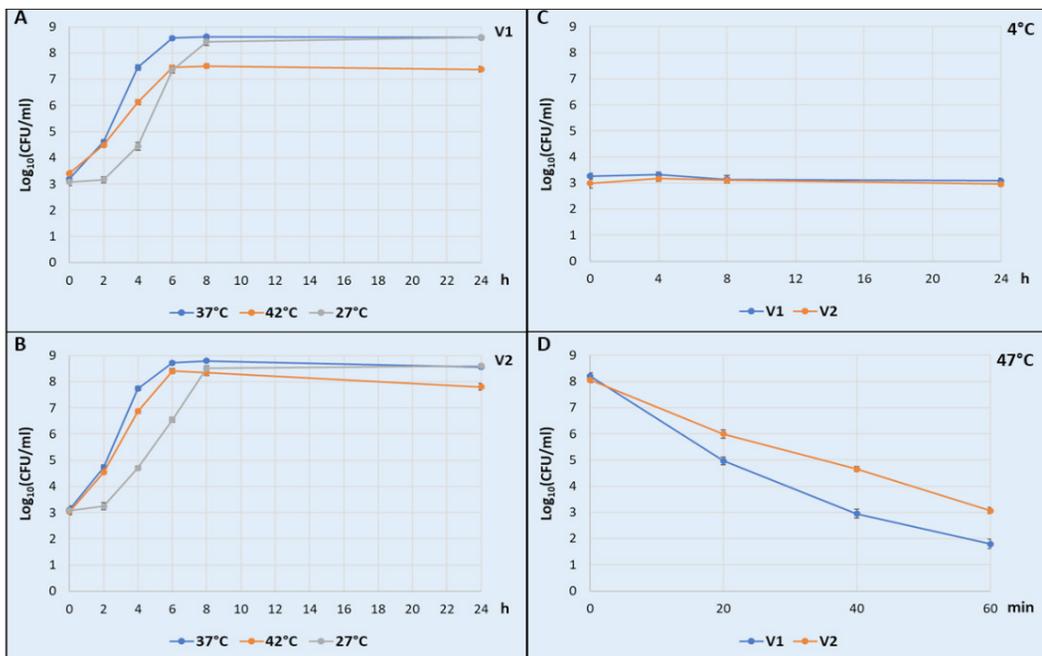
2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập trên Excel và phân tích bằng phần mềm SPSS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của *V. parahaemolyticus*

Kết quả xác định ảnh hưởng của các điều kiện nhiệt độ khác nhau đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của hai chủng *V. parahaemolyticus* V1 và V2 được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Khả năng sinh trưởng và tồn tại của *V. parahaemolyticus* ở 4°C, 27°C, 37°C, 42°C và 47°C

Đường cong sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* chủng V1 (A) và V2 (B) ở 27°C, 37°C, 42°C; Khả năng tồn tại của *V. parahaemolyticus* (chủng V1 và V2) ở 4°C (C) và ở 47°C (D); error bars - SD

Kết quả cho thấy 37°C là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự phát triển của cả hai chủng *V. parahaemolyticus* V1 và V2. Ở 37°C, số lượng *V. parahaemolyticus* tăng lên nhanh chóng; từ 3,12 - 3,20 Log₁₀CFU/ml ở thời điểm ban đầu lên 8,57 - 8,72 Log₁₀CFU/ml sau 6 giờ nuôi cấy. Đồng thời sau 6 giờ nuôi cấy, có thể quan sát trên đường cong sinh trưởng, *V. parahaemolyticus* đã đạt đến pha ổn định. Ở nhiệt độ 27°C, *V. parahaemolyticus* phát triển chậm hơn, pha tiềm phát ban đầu (Lag phase) kéo dài khoảng 2 giờ, số lượng vi khuẩn trong khoảng 3,08 - 3,24 Log₁₀CFU/ml. Pha lũy thừa (Log phase, hay exponential phase) cũng kéo dài từ 2 giờ đến 8 giờ tính từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Sau 8 giờ là pha ổn định, số lượng vi khuẩn dao động từ 8,44 - 8,61 Log₁₀CFU/ml. Đối với nhiệt độ nuôi cấy 42°C, *V. parahaemolyticus* cũng phát triển chậm hơn, mặc dù số lượng vi khuẩn đạt cực đại (ở pha ổn định) sau khoảng 6 giờ nuôi cấy, tuy nhiên số lượng vi khuẩn nhỏ hơn so với số lượng vi khuẩn cực đại khi nuôi cấy ở 37°C ($p < 0,05$).

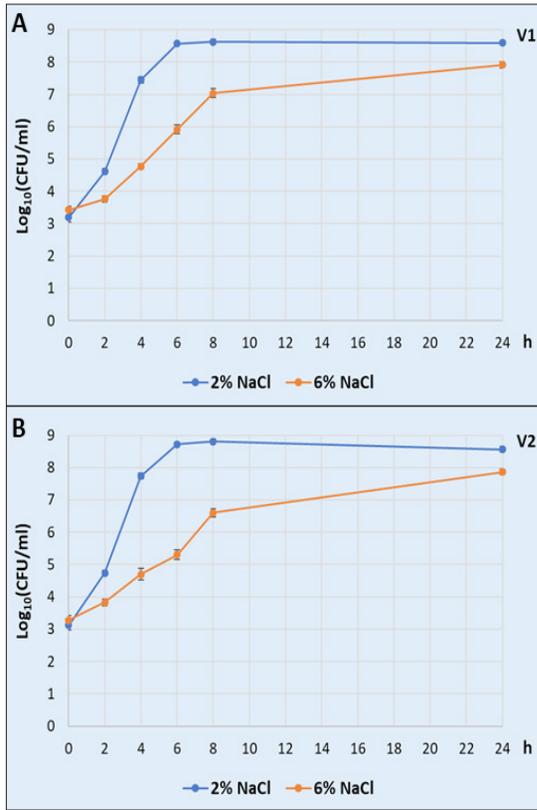
Ở điều kiện lạnh (4°C), cả hai chủng *V. parahaemolyticus* không có khả năng nhân lên mà chỉ duy trì trạng thái cân bằng, số lượng vi khuẩn ở thời điểm ban đầu, và sau khi nuôi cấy 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Ở 47°C, vi khuẩn này không có khả năng nhân lên, thậm chí số lượng còn giảm dần theo thời gian, từ 8,06 - 8,21 Log₁₀CFU/ml tại thời điểm ban đầu xuống còn 1,80 - 3,06 Log₁₀CFU/ml sau 60 phút.

Kết quả thu được trong nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Soto-Rodriguez và cs. (2019) đối với các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập trên tôm ở Mexico. Thí nghiệm nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau cho thấy các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập trên tôm có khả năng sinh trưởng tốt nhất ở 37°C, trong khi đó các chủng đều không phát triển ở 4°C (Soto-Rodriguez và cs., 2019). Ở điều kiện

lạnh 4°C, *V. parahaemolyticus* không có khả năng nhân lên, tuy nhiên nghiên cứu trước đây cho biết nếu duy trì trong thời gian dài khoảng 28 - 35 ngày, *V. parahaemolyticus* sẽ chuyển sang trạng thái tồn tại nhưng không nuôi cấy được (không mọc trên môi trường thạch) (trạng thái VBNC - viable but nonculturable) và ở trạng thái này, tế bào vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có sức đề kháng cao với nhiệt độ cao lên đến 47°C, vẫn sống được ở điều kiện 0% NaCl và ở pH 4,0 (Wong và Wang, 2004).

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của *V. parahaemolyticus*

Kết quả nuôi cấy hai chủng *V. parahaemolyticus* ở các nồng độ muối NaCl cho thấy *V. parahaemolyticus* sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ 2% NaCl. Sau 6 giờ nuôi cấy, *V. parahaemolyticus* đã đạt đến pha ổn định với số lượng vi khuẩn đạt 8,57 - 8,72 Log₁₀CFU/ml. Ở nồng độ 6% NaCl, vi khuẩn này phát triển kém hơn, pha lũy thừa kéo dài hơn so với ở nồng độ 2% NaCl. Số lượng vi khuẩn sau khi nuôi cấy 24 giờ đạt 7,87 - 7,91 Log₁₀CFU/ml, thấp hơn so với số lượng vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy ở nồng độ 2% NaCl (8,56 - 8,59 Log₁₀CFU/ml) ($p < 0,05$) (hình 2). Ở nồng độ 10% NaCl, *V. parahaemolyticus* không sinh trưởng, số lượng vi khuẩn giảm theo thời gian, từ 3,20 - 3,25 Log₁₀CFU/ml ở thời điểm ban đầu xuống 1,80 - 1,90 Log₁₀CFU/ml sau khi nuôi cấy được 4 giờ. Khuẩn lạc của *V. parahaemolyticus* không còn mọc trên thạch LB sau khi nuôi cấy 6 giờ, 8 giờ và 24 giờ (số liệu không thể hiện trên hình). Nghiên cứu của Soto-Rodriguez và cs. (2019) cũng cho biết các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập trên tôm khi nuôi cấy trong môi trường có nồng độ NaCl từ 6% trở lên có quá trình sinh trưởng chậm hơn so với ở nồng độ 3% hay 4%, và ở nồng độ 9% hay 10% NaCl các chủng *V. parahaemolyticus* không có khả năng nhân lên.

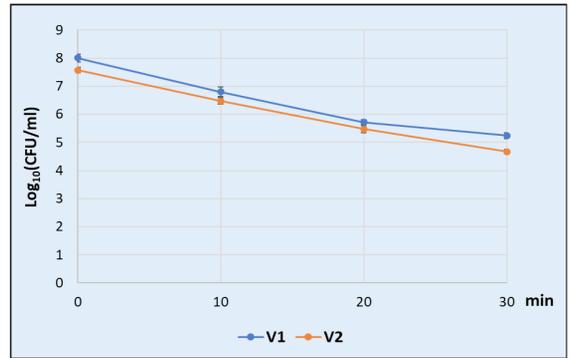


Hình 2. Đường cong sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* khi nuôi cấy ở nồng độ muối NaCl 2% và 4%

Ghi chú: Đường cong sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* chủng V1 (A) và V2 (B) ở nồng độ muối NaCl 2% và 4%; error bars - SD

3.3. Khả năng tồn tại của *V. parahaemolyticus* dưới tác động của tia tử ngoại

Tia tử ngoại UV-C với bước sóng 200 - 280 nm được sử dụng để vô hoạt các vi sinh vật gây bệnh, trong đó bước sóng 254 nm được sử dụng phổ biến nhất (Ha và cs., 2016; Turtoi, 2013). Kết quả nghiên cứu cho thấy dưới tác động của tia tử ngoại bước sóng 254 nm, số lượng *V. parahaemolyticus* giảm dần theo thời gian; cụ thể là giảm từ 8,01 Log₁₀CFU/ml ở thời điểm ban đầu xuống 5,24 Log₁₀CFU/ml đối với chủng V1 và giảm từ 7,57 Log₁₀CFU/ml ở thời điểm ban đầu xuống 4,67 Log₁₀CFU/ml đối với chủng V2 sau khi đặt dưới tia tử ngoại 30 phút.



Hình 3. Số lượng *V. parahaemolyticus* giảm dần theo thời gian dưới tác động của tia tử ngoại

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, có thể thấy rằng khả năng sinh trưởng và tồn tại của hai chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ hải sản chịu ảnh hưởng của các yếu tố như nhiệt độ, nồng độ muối NaCl và tia tử ngoại. Nhiệt độ và nồng độ NaCl thích hợp nhất để *V. parahaemolyticus* phân lập từ hải sản sinh trưởng là 37°C và 2% NaCl. Ở nhiệt độ 27°C và 42°C hay ở nồng độ muối 6% NaCl, *V. parahaemolyticus* vẫn có khả năng sinh trưởng nhưng kém hơn. Trong khi đó, ở nhiệt độ 47°C, nồng độ muối 10% NaCl hoặc dưới tác động của tia tử ngoại, *V. parahaemolyticus* không có khả năng sinh trưởng, số lượng vi khuẩn giảm dần theo thời gian. Nghiên cứu này là kết quả bước đầu, cần tiếp tục nghiên cứu tìm ra các điều kiện để tiêu diệt, ức chế sự nhân lên của *V. parahaemolyticus* trong hải sản, giúp cho việc kiểm soát và giảm thiểu nguy cơ ngộ độc thực phẩm do *V. parahaemolyticus* gây ra do ăn hải sản sống hay chưa được nấu chín.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., and Martinez-Urtaza, J., 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 8.
2. Butt, A. A., aldridge, K. E. and sanders, C. V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, 4, 201-212.

3. Doyle, M. P. and Buchanan, R. L., 2013. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 4th edition, American Society for Microbiology Press.
4. Ha, J. W., Back, K. H., Kim, Y. H., and Kang, D. H., 2016. Efficacy of UV-C irradiation for inactivation of food-borne pathogens on sliced cheese packaged with different types and thicknesses of plastic films. *Food microbiology*, 57, 172-177.
5. Haendiges, J., Jones, J., Myers, R. A., Mitchell, C. S., Butler, E., Toro, M., and Gonzalez-Escalona, N., 2016. A nonautochthonous U.S. strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Chesapeake Bay oysters caused the outbreak in Maryland in 2010. *Applied and environmental microbiology*, 82(11), 3208-3216.
6. Harlock, M., Quinn, S., and Turnbull, A. R., 2022. Emergence of non-cholerae *Vibrio* infections in Australia. *Communicable diseases intelligence* (2018), 46.
7. Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C., Oberheitmann, B., Gunzer, F., Brennholt, N., Boer, S., Appel, B., Dieckmann, R. & Strauch, E., 2014. Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 843-850.
8. Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E. and Swerdlow, D. L., 2010. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 399-411.
9. Ndraha, N., Wong, H. C., and Hsiao, H. I., 2020. Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(3), 1187-1217.
10. Odeyemi, O. A., 2016. Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: A systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus*, 5, 464.
11. Oehlenschläger, J., 2012. Seafood: nutritional benefits and risk aspects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 82, 168-176.
12. Taylor, M., Cheng, J., Sharma, D., Bitzikos, O., Gustafson, R., Fyfe, M., Greve, R., Murti, M., Stone, J., Honish, L., Mah, V., Punja, N., Hexemer, A., McIntyre, L., Henry, B., Kendall, P., Atkinson, R., Buenaventura, E., Martinez-Perez, A., Galanis, E., and Team, T. O. I., 2018. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* associated with consumption of raw oysters in Canada, 2015. *Foodborne pathogens and disease*, 15(9), 554-559.
13. Turtoi, M., 2013. Ultraviolet light potential for wastewater disinfection. *Annals Food Science and Technology*, 14(1), 153-164.
14. Tuševljak, N., Rajić, A., Waddell, L., Dutil, L., Cernicchiaro, N., Greig, J., Wilhelm, B. J., Wilkins, W., Totton, S., Umland, F. C., Avery, B., and McEwen, S. A., 2012. Prevalence of zoonotic bacteria in wild and farmed aquatic species and seafood: a scoping study, systematic review, and meta-analysis of published research. *Foodborne pathogens and disease*, 9(6), 487-497.
15. Vu, T. T. T., Hoang, T. T. H., Fleischmann, S., Pham, H. N., Lai, T. L. H., Cam, T. T. H., Truong, L. O., Le, V. P., and Alter, T., 2022. Quantification and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in retail seafood in Hanoi, Vietnam. *Journal of food protection*, 85(5), 786-791.
16. Wong, H. C., and Wang, P., 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of applied microbiology*, 96(2), 359-366.

Ngày nhận: 20-6-2023

Ngày phản biện: 21-8-2023

Ngày đăng: 1-7-2024