

ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM CHIẾT XUẤT TỪ CÂY DƯỢC LIỆU SIM VÀ BỒ CÔNG ANH TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH TIÊU CHẢY Ở GÀ

Nguyễn Thị Thanh Hà¹, Nguyễn Thị Thảo¹,
Nguyễn Văn Thanh¹, Nguyễn Thanh Hải²

TÓM TẮT

Nghiên cứu của chúng tôi nhằm chiết xuất chế phẩm từ cây dược liệu sim và bồ công anh để phòng trị bệnh tiêu chảy ở gà thay thế cho kháng sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai loại thảo dược này sau khi được chiết xuất bằng các dung môi khác nhau đều cho các sản phẩm có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*), trong đó sử dụng dung môi ethanol 70% đã cho dịch chiết có hiệu quả ức chế vi khuẩn *E. coli* tốt nhất (đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất = $27,31 \pm 2,08$ mm đối với dịch chiết từ cây sim và $29,21 \pm 2,28$ mm với dịch chiết từ cây bồ công anh). Kết quả thử nghiệm dùng 2 loại dịch chiết này để phòng và trị bệnh tiêu chảy ở gà cho thấy công thức phối trộn gồm 75% dịch chiết từ cây sim và 25% dịch chiết từ cây bồ công anh đã cho hiệu quả phòng trị bệnh cao nhất. Khi phối trộn dịch chiết từ cây sim và dịch chiết từ cây bồ công anh (theo công thức phối trộn nêu trên) vào thức ăn với hàm lượng 50 mg/1 kg thức ăn để thử nghiệm phòng bệnh cho gà đã cho kết quả là chỉ có 4% gà bị mắc tiêu chảy, thấp hơn nhiều so với tỷ lệ mắc tiêu chảy của gà (20%) ở lô đối chứng. Đối với điều trị bệnh, liều 2000 mg (dịch chiết sim, dịch chiết bồ công anh) /1 kg thức ăn cho gà đã cho tỷ lệ khỏi bệnh là 80%.

Từ khóa: Tiêu chảy gà, sim, bồ công anh, *E. coli*.

Applying pharmaceutical products derived from *Rhodomyrtus tomentosa* and *Lactuca indica* L. for diarrheal prevention and treatment in chicken

Nguyen Thi Thanh Ha, Nguyen Thi Thao,
Nguyen Van Thanh, Nguyen Thanh Hai

SUMMARY

This study was performed to produce pharmaceutical products from *Rhodomyrtus tomentosa* and *Lactuca indica* L. herbal plants, so as to replace antibiotics in diarrhea prevention and treatment in chickens. The studied results showed that 2 herbal plants were extracted by different solvents and obtained the products that could inhibit the development of *Escherichia coli* (*E. coli*). Among the solvents were used to extract the above herbal plants, ethanol 70% was the best as the product obtained from this solvent was the strongest in inhibiting *E. coli* (showing the largest inhibitory zone diameters: 27.31 ± 2.08 mm for *Rhodomyrtus tomentosa* extract product and 29.21 ± 2.28 mm for *Lactuca indica* L. extract product). In prophylactic and therapeutic experiments for diarrhea in chickens, combining 75% of *Rhodomyrtus tomentosa* extract product with 25% of *Lactuca indica* L. extract product had given the highest efficacy. For diarrheal prevention, mixing 50 mg (2 herbal extract products) in 1 kg of feed, to feed the experimental chickens was the best formula, due to only 4% of chickens in experimental group were infected with diarrhea, while 20% of chickens in the control group were infected with diarrhea. On trial treatment, the formula of mixing 2000 mg (2 herbal extract product) in 1 kg of feed, to feed the disease chickens, as a result, 80% of chickens were recovered.

Keywords: Diarrhea, chicken, *Rhodomyrtus tomentosa*, *Lactuca indica* L., *E. coli*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy là một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây ra các thiệt hại về năng suất

trong chăn nuôi gà. Hiện nay, ngành chăn nuôi nói chung vẫn coi kháng sinh như là giải pháp chủ yếu với bệnh này. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh ngày càng bộc lộ nhiều nhược điểm, cụ thể như hiệu lực giảm do vi

¹ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

khuẩn kháng thuốc (Đỗ Ngọc Thúy, 2002; Nguyễn Bá Phước, 2014; Nguyễn Văn Thanh và Nguyễn Thanh Hải, 2014), tồn dư sang sản phẩm động vật gây ảnh hưởng lên sức khỏe người tiêu dùng (Nisha A.R., 2008), hay làm gen kháng thuốc lan tràn sang hệ vi khuẩn gây bệnh cho người (Emily K. Rousham *et al.*, 2018). Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết trong việc tìm kiếm một giải pháp mới thay thế cho việc chỉ sử dụng duy nhất kháng sinh trong phòng và trị các bệnh gây ra do vi khuẩn (Đặng Thị Lụa và cs., 2015; Huỳnh Kim Diệu, 2007; Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho, 2013). Nhiều công trình nghiên cứu đã được thực hiện với mục tiêu sử dụng cây thuốc thay thế cho kháng sinh trong phòng trị bệnh trên động vật, bao gồm cả bệnh tiêu chảy (Bùi Thị Tho, 1996).

Trong các loại thảo dược phổ biến trị chứng tiêu chảy, chúng tôi nhận thấy sim và bồ công anh là hai cây có nhiều tiềm năng, nhưng vẫn còn thiếu các nghiên cứu cụ thể để tìm cách ứng dụng chúng vào bệnh tiêu chảy của gà. Cây sim (tên khoa học *Rhodomlyrtus tomentosa* Wight) thường được biết đến với tác dụng kết tủa protein giúp chữa tiêu chảy, dùng trị viêm dạ dày-ruột cấp tính, đau dạ dày, ăn uống không tiêu và làm rượu bỏ (Bùi Thị Tho và Nguyễn Thị Thanh Hà, 2009). Cây bồ công anh (tên khoa học *Lactuca indica* L.) cũng thường được đông y ứng dụng để chữa đau dạ dày, phòng trị tiêu chảy, thanh nhiệt giải độc, tiêu viêm tán kết, chữa nhọt độc, sung vú do tắc tia sữa (Đỗ Tất Lợi, 1991). Nhằm tìm cách ứng dụng hai thảo dược trên vào thú y, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu “*Ứng dụng chế phẩm chiết xuất từ cây dược liệu sim và bồ công anh trong phòng trị bệnh tiêu chảy ở gà*”. Mục đích của nghiên cứu là nhằm khảo sát tác dụng của các cây này trên vi khuẩn *E. coli*, loại vi khuẩn đóng vai trò quan trọng trong bệnh tiêu chảy gà (Ashraf, A. Abd El Tawab *et al.*, 2014; Fantinatti F *et al.*, 1994; Gross WG, 1994), để từ đó hướng đến việc tạo ra các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược ứng dụng trong thú y một cách hiệu quả.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Dược liệu và chiết xuất dược liệu

Lá sim và thân lá bồ công anh khô đã qua sơ chế được thu mua từ các công ty dược liệu cổ truyền. Cây tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2 - 3 lần), sau đó được sấy hoặc phơi khô ở nhiệt độ 40°C và tránh ánh sáng mặt trời, nhằm đảm bảo giữ nguyên các thành phần hoạt chất của cây thuốc. Dược liệu đã qua làm khô tiếp tục được nghiền thành bột mịn (<0,05 mm), bảo quản bằng các túi nilong hút chân không để trong bình hút ẩm. Trong nghiên cứu này, việc chiết xuất dược thực hiện với các dung môi có độ phân cực khác nhau (bao gồm: ethanol 70%, methanol, nước cất, ethyl acetate, n-butanol, n-hexan), theo phương pháp ngâm chiết tại nhiệt độ thường, sử dụng tỷ lệ 1 g dược liệu/10 ml dung môi và thời gian ngâm 72 giờ. Dịch lọc sau đó được cô quay tại áp suất thấp để loại bỏ hết dung môi. Để thu được dịch chiết có nồng độ 100 mg/ml dùng cho các thử nghiệm với vi khuẩn, chúng tôi sử dụng 10 ml Dimethyl Sulfoxide (DMSO) cho mỗi 1 g cao khô dược liệu và dùng đũa thủy tinh, kết hợp với máy trộn Vortex, để khuấy và lắc cho cao tan hoàn toàn thành dung dịch đồng nhất.

2.2. Khảo sát tác dụng của dược liệu với vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gà bị tiêu chảy

2.2.1. Vi khuẩn thí nghiệm

9 mẫu *E. coli* được phân lập từ phân gà bị tiêu chảy và bảo quản trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Khảo sát tác dụng của dịch chiết với vi khuẩn

Chúng tôi tiến hành chiết xuất thử nghiệm với các loại dung môi phổ biến thường dùng trong chiết xuất thực vật, bao gồm: ethanol 70%, methanol, nước cất, ethyl acetate, n - butanol và n - hexan. Dịch chiết hòa loãng đến nồng độ 100 mg/ml, sau đó được sử dụng để khảo sát tác dụng kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán trên thạch của Kirby-Bauer. Khi mật độ vi khuẩn trong canh khuẩn đạt 10^8 tế bào/ml thì hút 100 μ l nhỏ vào giữa đĩa thạch và dùng que láng bằng thủy tinh dàn đều canh khuẩn trên bề mặt thạch. Sau đó, dùng ống khâu tạo các lỗ có đường kính 6mm trên thạch và

nhỏ vào đó 100µl dịch chiết rồi đem nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ. Tác dụng ức chế vi khuẩn phát triển của dịch chiết được xác định thông qua đo độ lớn đường kính vòng vô khuẩn xung quanh lỗ chứa dịch chiết.

2.3. Khảo sát hiệu quả của các chế phẩm cao dược liệu trong phòng trị tiêu chảy gà

Do các kết quả thí nghiệm cho thấy cao dược liệu được chiết xuất bằng ethanol 70% cho tác dụng ức chế vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy tốt nhất, nên chúng tôi quyết định sử dụng loại cao này trong các thí nghiệm *in vivo* khi đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh trên gà. Các công thức phối trộn 2 cao dược liệu dùng trong thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ các loại cao dược liệu trong các công thức thí nghiệm

Công thức	Tỷ lệ cao sim (%)	Tỷ lệ cao bồ công anh (%)
CT1	100	0
CT2	75	25
CT3	50	50
CT4	25	75
CT5	0	100

Đánh giá khả năng phòng bệnh: Gà ở độ tuổi từ 14 đến 28 ngày tuổi, khỏe mạnh, được tiêm phòng đầy đủ các vacxin theo đúng lịch được chia thành các lô 50 con, gồm lô đối chứng và lô bổ sung các công thức dược liệu 1, 2, 3, 4, 5 với tỷ lệ 50 mg cao/ 1 kg thức ăn. Tỷ lệ gà mắc tiêu chảy trong thời gian 4 tuần kể từ khi bổ sung được quan sát và so sánh giữa các lô để đánh giá tác dụng phòng bệnh.

Đánh giá khả năng điều trị bệnh: Gà ở độ tuổi từ 14 đến 28 ngày tuổi bị mắc tiêu chảy tự nhiên được chia thành các lô 25 con, gồm lô đối chứng âm không sử dụng thuốc, các lô thí nghiệm sử dụng dược liệu công thức 1, 2, 3, 4, 5 với tỷ lệ 2000 mg cao/ 1 kg thức ăn và lô đối chứng dương sử dụng kháng sinh. Chế phẩm kháng sinh chúng tôi sử dụng là chế phẩm có tên “Đặc trị tiêu chảy” của công ty thuốc thú y RTD, trong đó có chứa kháng sinh với hàm lượng 5 g oxytetracyclin và 3,675 g neomycin trên mỗi 100g thuốc. Sử dụng theo hướng dẫn của

nhà sản xuất, cụ thể là trộn vào thức ăn và với liều là 10g/ 20kg thể trọng. Việc điều trị được tiến hành trong thời gian 3 ngày liên tiếp, và tỷ lệ gà khỏi tiêu chảy trong các lô được sử dụng để đánh giá và so sánh hiệu quả điều trị bệnh.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel (2010). Các tham số tính toán gồm: dung lượng mẫu (n), giá trị trung bình (Mean), độ lệch chuẩn (SD). Việc so sánh các giá trị trung bình được thực hiện bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test hoặc hàm Chi-square.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát tác dụng kháng khuẩn của các cao khô dịch chiết thảo dược sử dụng các dung môi khác nhau

Kết quả đo đường kính vòng vô khuẩn được tập hợp tại bảng 2.

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết sim và bồ công anh chiết xuất bằng các dung môi khác nhau trên vi khuẩn *E. coli*

Dung môi	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	Bồ công anh	Sim
Ethanol 70%	27,31 ± 2,08 ^a	29,21 ± 2,28 ^{a,*}
Methanol	25,26 ± 3,01 ^b	27,16 ± 1,91 ^{b,*}
Nước cất	13,19 ± 1,79 ^e	15,16 ± 1,97 ^{e,*}
Ethyl Acetate	19,54 ± 2,29 ^c	21,24 ± 2,49 ^c
n-Butanol	18,05 ± 2,31 ^{c,d}	20,05 ± 2,51 ^{c,d,*}
n-Hexan	17,15 ± 2,12 ^d	18,75 ± 3,02 ^d

*Ghi chú: Các ký tự khác nhau, gồm a, b, c, d, e trong cùng một cột được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi xử lý bằng hàm one-way ANOVA và Tukey post hoc test. Trong cùng một hàng, dấu * được sử dụng để biểu đạt những khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi xử lý bằng hàm unpair t-test.*

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 5 loại cao của hai thảo dược khi chiết xuất với các dung môi khác

nhau đều có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn (có hình thành đường kính vòng vô khuẩn). Trong số các dung môi hữu cơ sử dụng, ethanol 70% cho hiệu quả ức chế sự phát triển của vi khuẩn tốt nhất, thể hiện ở đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất đối với cả dược liệu sim và bồ công anh ($29,21 \pm 2,28$ mm và $27,31 \pm 2,08$ mm). Ngược lại, nước cất cho hiệu quả kém nhất, đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất ($13,19 \pm 1,79$ mm và $15,16 \pm 1,97$ mm). Điều này được giải thích là do các hoạt chất có tính kháng khuẩn trong thực vật như polyphenols

thường kém tan trong nước hơn so với các dung môi hữu cơ (Nguyễn Văn Thanh và Nguyễn Thanh Hải, 2014). Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy sim có tác dụng kháng khuẩn tốt hơn bồ công anh, thể hiện ở xu hướng tạo đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn khi sử dụng cùng một loại dung môi chiết xuất.

3.2. Kết quả khảo sát tác dụng phòng trị bệnh tiêu chảy khi sử dụng các công thức phối trộn dược liệu khác nhau

Kết quả được trình bày ở bảng 3 và 4.

Bảng 3. Kết quả phòng bệnh tiêu chảy gà của các chế phẩm cao dược liệu gồm sim và bồ công anh (hàm lượng 50mg/ kg thức ăn)

	Số con theo dõi	Số con mắc tiêu chảy	Tỷ lệ (%)
Bổ sung công thức 1	50	4 ^a	8
Bổ sung công thức 2	50	2 ^a	4
Bổ sung công thức 3	50	7 ^b	14
Bổ sung công thức 4	50	6 ^{a,b}	12
Bổ sung công thức 5	50	5 ^a	10
Lô đối chứng	50	10 ^{b,c}	20

Ghi chú: Các ký tự a, b, c khác nhau được sử dụng để biểu đạt cho những sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi xử lý bằng hàm Chi-square

Bảng 4. Kết quả điều trị tiêu chảy gà của các chế phẩm cao dược liệu gồm sim và bồ công anh (hàm lượng 2000mg/ kg thức ăn)

	Số con điều trị	Số con khỏi sau 5 ngày	Tỷ lệ khỏi (%)
Bổ sung công thức 1	25	15 ^b	60
Bổ sung công thức 2	25	20 ^{a,b}	80
Bổ sung công thức 3	25	8 ^c	32
Bổ sung công thức 4	25	10 ^c	40
Bổ sung công thức 5	25	12 ^{b,c}	48
Lô đối chứng dương	25	25 ^a	100
Lô đối chứng âm	25	0 ^d	0

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, d khác nhau được sử dụng để biểu đạt cho những sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi xử lý bằng hàm Chi-square

Từ bảng 3 và 4 chúng tôi nhận thấy công thức phối trộn 2 (gồm 75% cao sim và 25% cao bồ công anh) cho tác dụng tốt nhất trong cả việc phòng và điều trị bệnh tiêu chảy gà. Khi sử dụng trộn vào thức ăn với hàm lượng 50 mg/ kg thức ăn, gà chỉ mắc tiêu chảy với tỷ lệ 4%, thấp hơn nhiều so với lô không bổ sung là 20% (bảng 3). Với tác dụng điều

trị, khi được sử dụng ở liều 2000 mg/ kg thức ăn, chế phẩm cũng cho tỷ lệ khỏi đạt tới 80% (bảng 4). Tuy hiệu quả này là thấp hơn so với kháng sinh (tỷ lệ khỏi đạt 100%), nhưng vì trong thử nghiệm này, chúng tôi mới chỉ sử dụng các cao dược liệu thô và chưa ứng dụng các kỹ thuật hoặc phương pháp bào chế nào khác, nên kết quả 80% này vẫn là rất

triển vọng và tương đương với kết quả nghiên cứu trước đây về hiệu quả của cây thuốc (Bùi Thị Tho, 1996). Bên cạnh đó, chúng tôi cũng nhận thấy việc bổ sung dược liệu không tạo ra bất cứ độc tính hay ảnh hưởng tiêu cực nào trên sức khỏe gà.

IV. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy dược liệu sim và bồ công anh có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli*, trong đó dịch chiết sử dụng dung môi ethanol 70% cho có tác dụng tốt nhất. Khi thí nghiệm trên gà, sản phẩm phối chế của 75% cao sim và 25% cao bồ công anh cũng cho tác dụng cao trong phòng trị bệnh tiêu chảy. Tại liều 50 mg/kg thức ăn, chế phẩm có hiệu quả phòng bệnh tốt, giúp giảm tỷ lệ gà mắc tiêu chảy từ 20% xuống còn 4%. Trong thử nghiệm điều trị bệnh tiêu chảy, việc sử dụng chế phẩm tại liều 2000 mg/kg thức ăn cũng cho hiệu quả cao, tỷ lệ khỏi đạt 80%.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số: 09/2019/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashraf, A. Abd El Tawab, Ahmed, A. A. Maarouf, Samir, A. Abd El Al, 2014. Detection of some virulence genes of avian pathogenic *E. coli* by polymerase chain reaction. *Benha Veterinary medical Journal*. 2014;26(2):159-176.
2. Bùi Thị Tho và Nguyễn Thị Thanh Hà, 2009. *Giáo trình dược liệu thú y*. NXB Nông nghiệp.
3. Bùi Thị Tho, 1996. Nghiên cứu tác dụng của một số thuốc hóa học trị liệu và phytocid đối với *E. coli* phân lập từ bệnh lợn con phân trắng. *Tạp chí đại học Nông nghiệp Hà Nội*.
4. Đặng Thị Lua, Lại Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thanh Hải, 2015. Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 13(7): 1101-1108.
5. Đỗ Ngọc Thúy, 2002. Tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con tiêu chảy ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. 9: 21-27.
6. Đỗ Tất Lợi, 1991. *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
7. Emily K. Rousham, Leanne Unicomb, and Mohammad Aminul Islam, 2018. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proc Biol Sci*. 285(1876): 20180332.
8. Fantinatti F, Silveira WD, Castro AFP, 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.*, 41(1-2):75-86.
9. Gross WG., 1994. *Diseases due to Escherichia coli in poultry*. CAB International, Wallingford 1994; 237-259.
10. Huỳnh Kim Diệu, 2007. Hiệu quả điều trị bệnh tiêu chảy heo con của các chế phẩm từ lá xuân hoa so với kháng sinh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*. 14(5): 56-59.
11. Nguyễn Bá Phước, 2014. *Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết lá cây Huyền diệp (Polyalthia longifolia var. pendula Hort.) trên vi khuẩn E. coli, Salmonella spp. phân lập từ phân chó tiêu chảy và thử nghiệm điều trị*. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Mã số: 60.64.01.01.
12. Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho, 2013. Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với *E.coli* gây bệnh và *E.coli* kháng Ampicillin, Kanamycin. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 11(6): 804-808.
13. Nguyễn Văn Thanh và Nguyễn Thanh Hải, 2014. Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết cây Mò hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) trên vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp. phân lập từ phân lợn con theo mẹ mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy và thử nghiệm điều trị. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 12(5): 683-689.
14. Nisha A.R., 2008. Antibiotic residues - A global health hazard. 2008. *Veterinary World*. 1(12): 375-377

Ngày nhận 24-1-2021

Ngày phản biện 25-5-021

Ngày đăng 1-7-2021