



PHÂN LẬP VI KHUẨN PHÂN GIẢI CHLORPYRIFOS TỪ ĐẤT NÔNG NGHIỆP

*Đoàn Thị Mộng Thắm, Trần Trung Hiếu, Lương Thị Mỹ Ngân**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TP HCM

Ngày nhận bài: 13-11-2017; ngày nhận bài sửa: 28-11-2017; ngày duyệt đăng: 20-12-2017

TÓM TẮT

Từ 50 mẫu đất thu thập được từ các nơi trồng lúa, rau màu và cây ăn quả ở một số tỉnh thành ở Việt Nam, chúng tôi đã phân lập được 107 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường muối khoáng (MSM) bổ sung 300 $\mu\text{g/mL}$ chlorpyrifos. Trong số các chủng phân lập, chủng *Burkholderia* spp. (16.3) biểu hiện khả năng phát triển mạnh nhất trên các môi trường có nồng độ chlorpyrifos khác nhau, với kích thước vòng phân giải đạt 7 – 11 mm. Chủng này có khả năng phân hủy chlorpyrifos trên môi trường có hoặc không có sự hiện diện của glucose, làm giảm lượng chlorpyrifos lần lượt là 189,22 và 173,13 $\mu\text{g/mL}$ sau 15 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: *Burkholderia* spp., chlorpyrifos, vi khuẩn phân giải thuốc trừ sâu.

ABSTRACT

Isolation of chlorpyrifos-degrading bacteria from agricultural soil

From 50 soil samples collected from growing plots of rice, vegetables and fruits in some provinces in Vietnam, we isolated 107 strains of bacteria that were capable of growing on mineral salt basal medium (MSM) supplemented with 300 $\mu\text{g/mL}$ chlorpyrifos. Among the isolated strains, the strain (16.3) that was identified as *Burkholderia* spp. exhibited the best growth on media supplemented chlorpyrifos at different concentrations with diameters of clear zones of degradation ranging from 7 to 11 mm. This strain was able to degrade chlorpyrifos on media with or without presence of glucose, causing to reduce chlorpyrifos amount of 189.22 and 173.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively, in 15 days of culture.

Keywords: *Burkholderia* spp., chlorpyrifos, pesticide-degrading bacteria.

1. Mở đầu

Thuốc trừ sâu từ lâu đã được ứng dụng trong các lĩnh vực nông nghiệp và được cho là một trong các nhân tố chính góp phần vào tăng cao sản lượng lương thực. Do được sử dụng phổ biến nên ảnh hưởng của các loại thuốc trừ sâu lên môi trường và sức khỏe con người là không nhỏ [1]. Một trong số các nhóm thuốc trừ sâu được sử dụng phổ biến trên thế giới và Việt Nam hiện nay là nhóm thuốc trừ sâu có gốc lân hữu cơ, đặc biệt là chlorpyrifos [1].

* Email: ltmngan@hcmus.edu.vn

Chlorpyrifos (O, O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) có dạng tinh thể màu trắng, có mùi thoảng như mùi của các hợp chất chứa nhóm thiol (-SH), tương tự như mùi của các hợp chất lưu huỳnh tìm thấy trong trứng, hành tây và tỏi thối [2]. Chlorpyrifos là một chất độc thần kinh, tác động lên hệ thần kinh côn trùng bằng cách cạnh tranh vị trí hoạt động với acetylcholine và ức chế không thuận nghịch enzyme acetylcholinesterase, ngăn enzyme này phân giải acetylcholine, làm rối loạn sự truyền tín hiệu thần kinh bình thường của côn trùng, dẫn đến côn trùng bị chết [3].

Chlorpyrifos được sử dụng rộng rãi để diệt sâu hại ở ruộng lúa, đất trồng rau và hoa quả. Tại Việt Nam, theo danh sách hóa chất bảo vệ thực vật được đăng ký sử dụng của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2009) cho thấy chlorpyrifos có số lượng sản phẩm nhiều nhất trong các loại hóa chất trừ sâu thuộc nhóm lân hữu cơ [1]. Trong đất, chlorpyrifos có chu kỳ bán rã dao động 10 – 120 ngày, có khả năng hòa tan trong nước tương đối thấp (2 mg/L), có thể xâm nhập vào cơ thể thông qua miệng, phổi và da và được xếp loại là một chất độc vừa phải đối với con người [4]. Trên các động vật thí nghiệm, liều gây chết trung bình (LD_{50}) qua đường miệng của chlorpyrifos ở chuột là 135 – 163 mg/kg và ở lợn guinea là 500 mg/kg, ở thỏ là 1000 mg/kg, ở gà là 32 mg/kg và ở cừu là 800 mg/kg [5].

Hạn chế sự mất cân bằng hệ vi sinh vật trong đất và giải quyết nạn ô nhiễm môi trường cho đất nông nghiệp là một trong những vấn đề cấp thiết cần được quan tâm để bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Theo Singh và cs (2006), chlorpyrifos có thể bị phân giải bởi một số loài vi khuẩn và nấm có trong đất [6]. Vi sinh vật có thể phân hủy chlorpyrifos tạo các sản phẩm trung gian như 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) hoặc/và diethylthiophosphoric acid (DETP). Hơn nữa, một số vi sinh vật có thể chuyển hóa các sản phẩm trung gian TCP và DETP [7]. Sử dụng vi sinh vật phân giải các loại thuốc trừ sâu là biện pháp phân giải sinh học có nhiều tiềm năng, an toàn và thân thiện với môi trường. Nghiên cứu này nhằm phân lập các vi khuẩn từ các ruộng lúa, đất rau màu và cây ăn quả có khả năng phân giải chlorpyrifos.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hóa chất và môi trường nuôi cấy

Các mẫu đất (50 mẫu) được lấy từ 50 vùng canh tác trên 10 năm có phun thuốc trừ sâu ở quận Thủ Đức và quận Bình Thạnh TPHCM, và các tỉnh Bình Dương, Long An, Bến Tre, và Nghệ An. Mẫu đất (100 g) được lấy ở vị trí từ bề mặt tới 10 cm dưới mặt đất. Mẫu được giữ trong các túi nilon sạch và được bảo quản ở 4 °C cho đến khi tiến hành phân lập vi khuẩn.

Thuốc trừ sâu chlorpyrifos 99,5 % được cung cấp bởi Công ty Fluka (Sigma). Dung dịch stock chlorpyrifos 50 mg/mL trong DMSO được thêm vào môi trường nuôi cấy MSM với nồng độ cuối cùng là 100, 200 và 300 μ g/mL môi trường để phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorpyrifos.

Môi trường MSM (mineral salt medium) lỏng và MSM – Agar được bổ sung chlorpyrifos (như nguồn carbon duy nhất) với các nồng độ 100, 200, và 300 $\mu\text{g/mL}$ là môi trường tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chlorpyrifos. Môi trường PTIG (Peptone Tryptone Yeast Extract Glucose) agar làm môi trường tăng sinh và giữ giống. Cùng với các môi trường thử nghiệm sinh hóa dùng cho phân loại như Phenol Red Carbohydrate Broth (thử nghiệm lên men carbohydrate), môi trường Hugh Leifson (thử nghiệm lên men – oxi hóa), Nitrate Broth (thử nghiệm nitratase), Triple Sugar Iron Agar (thử nghiệm sinh H_2S), Simmons Citrate Agar (thử nghiệm biến dưỡng citrate), MR-VP Broth (thử nghiệm MR & V-P), môi trường khảo sát khả năng phân hủy gelatin (thử nghiệm gelatinase), Tryptone Broth (thử nghiệm sinh indol), môi trường Christensen's Urea agar (thử nghiệm urease).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phân giải chlorpyrifos bằng cách cấy chuyển nhiều lần các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường có nồng độ chlorpyrifos tăng dần

Cân 10 g đất cho vào hộp nhựa sạch. Sau đó thêm 1 mL thuốc trừ sâu chlorpyrifos nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ vào. Để trong vòng 2 tuần ở nhiệt độ phòng. Làm ẩm mẫu đất mỗi ngày. Sau 2 tuần, mẫu ủ được đồng nhất trong 30 mL dung dịch nước muối sinh lí 0,85 %. Tiến hành pha loãng bậc 10 cho đến 10^{-4} , trộn 0,1 mL mẫu sau pha loãng với 0,9 mL môi trường MSM bổ sung chlorpyrifos sao cho nồng độ cuối cùng đạt 200 $\mu\text{g/mL}$, ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Sau khi ủ qua đêm, hút 100 μL mẫu trải trên môi trường PTIG agar, ủ 24 h ở nhiệt độ phòng. Chọn khuẩn lạc đơn, và ria trên đĩa petri chứa môi trường PTIG để tạo chủng thuần. Tiến hành sàng lọc chủng phân hủy chlorpyrifos bằng cách cấy chuyển nhiều lần các chủng phân lập được trên MSM có bổ sung 300 $\mu\text{g/mL}$ chlorpyrifos. Sau đó các chủng vi khuẩn được sàng lọc lại bằng cách chấm khuẩn lạc trên môi trường MSM agar có bổ sung chlorpyrifos 300 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2. Phương pháp định danh dựa trên hình thái vi khuẩn và các chỉ tiêu sinh lí và sinh hóa

Sau khi phân lập, tiến hành nhận diện và định danh sơ bộ các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chlorpyrifos dựa trên các chỉ tiêu hình thái, sinh lí, sinh hóa theo khóa phân loại Bergey (1994) [8] như: Hình dạng vi khuẩn, hình thái khuẩn lạc, Gram, khả năng di động, thử nghiệm catalase, thử nghiệm khả năng lên men các loại đường (glucose, sucrose, fructose, myo-inositol, galactose, xylose, arabinose), thử nghiệm khả năng lên men – oxi hóa (O-F), sinh H_2S , biến dưỡng citrate, thử nghiệm Voges-Proskauer (V-P), thử nghiệm Methyl red (MR), thử nghiệm gelatinase, thử nghiệm urease.

2.2.3. Tuyển chọn và khảo sát khả năng phân giải chlorpyrifos của chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn sau khi được làm thuần và tuyển chọn sơ bộ sẽ được khảo sát khả năng sinh trưởng và phân giải chlorpyrifos trên môi trường MSM – Agar có bổ sung chlorpyrifos ở các nồng độ 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp chấm khuẩn lạc, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Sau 10 ngày nuôi cấy, tiến hành đo vòng tan phân giải chlorpyrifos.

Chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chlorpyrifos mạnh được tuyển chọn từ thí nghiệm trên được nuôi cấy trong môi trường có chlorpyrifos ở nồng độ 300 $\mu\text{g/mL}$ với môi trường MSM và môi trường MSM có bổ sung glucose 1 g/L (kí hiệu là MSM – G). Nuôi lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.

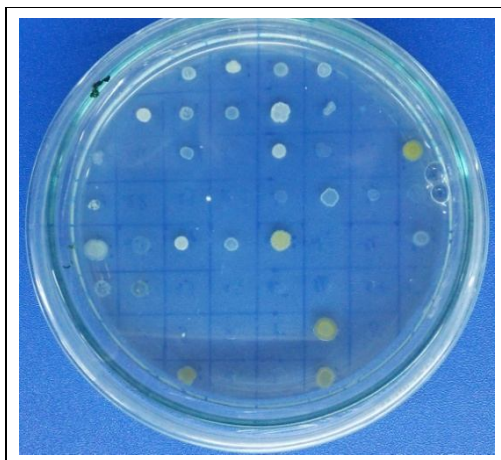
Theo dõi sự tăng trưởng của chủng vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc và sự phân giải chlorpyrifos dựa trên lượng chlorpyrifos còn lại sau mỗi 3 ngày trong vòng 15 ngày bằng phương pháp GC-ECD (Gas Chromatography - Electron Capture Detector). Dịch chiết được tách lớp với toluen, sau đó lấy phân đoạn toluen tiêm vào hệ thống GC 6890 N (Agilent) với các thông số như sau: Pha tĩnh là cột HP5-MS (30m x 0,25mm, lớp film dày 0,25 μm), khí mang N_2 với tốc độ dòng khí là 1 mL/phút, nhiệt độ buồng tiêm là 250 $^{\circ}\text{C}$, tỉ lệ chia dòng là 1: 100, nhiệt độ đầu dò ECD là 280 $^{\circ}\text{C}$. Chương trình nhiệt độ cột: nhiệt độ đầu là 150 $^{\circ}\text{C}$ giữ 1 phút, tăng lên 250 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}$ /phút) và giữ 2 phút, thể tích tiêm mẫu 1 μL .

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn

Từ 50 mẫu đất thu thập (17 mẫu đất ruộng lúa, 17 mẫu đất cây ăn quả và 16 mẫu đất rau màu) đã phân lập được 107 chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng chlorpyrifos làm nguồn carbon duy nhất. Kết quả phân lập cho thấy các mẫu được lấy từ ruộng lúa có số lượng chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng chlorpyrifos nhiều và đa dạng hơn (61 chủng) các mẫu đất còn lại. Việc sử dụng các loại thuốc trừ sâu, rầy ở ruộng lúa nước có hoạt chất chlorpyrifos có thể là nguyên nhân cho sự đa dạng nguồn vi sinh vật có khả năng phân giải chlorpyrifos. Ở đồng bằng sông Cửu long, việc sử dụng nhóm thuốc lân hữu cơ trên cây lúa chiếm 5,9 % [1]. Sau khi được sử dụng, phần lớn hộp, chai và vỏ thuốc bảo vệ thực vật, người dân vứt trực tiếp tại nơi sử dụng. Khoảng 70 % nông hộ vứt bỏ vỏ thuốc sau khi sử dụng ngay tại nơi phun thuốc. Chỉ một phần nhỏ nông hộ (17 %) giữ lại các chai lọ thuốc nhằm bán phế liệu. Tuy nhiên, chúng thường được thu gom và cất giữ không an toàn tại ruộng, vườn hay xung quanh nhà. Phần không bán phế liệu được thường đốt hoặc chôn lấp một cách không an toàn ngay tại ruộng, vườn. Khoảng 88 % nông dân được điều tra đã rửa bình phun thuốc ngay trong kênh nội đồng hoặc trong các mương, ao trong ruộng. Thói quen này có thể là nguyên nhân đưa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật vào trong đất và nước [1].

Các chủng thuần sau khi được cấy chuyển nhiều lần trong môi trường lỏng, tiến hành kiểm tra lại khả năng sinh trưởng trong môi trường MSM agar có nồng độ chlorpyrifos 300 $\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp chấm khuẩn lạc. Sau 3 ngày, kiểm tra và chọn những chủng có khuẩn lạc với kích thước từ 2 - 6 mm (Hình 1). Kết quả đã chọn được 20 chủng có khả năng tăng trưởng nhanh trên môi trường này.



Hình 1. Vi khuẩn sinh trưởng trên môi trường MSM agar có bổ sung chlorpyrifos 300 $\mu\text{g/mL}$

3.2. Kết quả định danh

Hình thái đại thể, hiển vi, và đặc điểm sinh lí, sinh hóa của 20 chủng vi khuẩn tuyển chọn được ghi nhận ở Bảng 1. Kết quả cho thấy, trong 20 chủng phân lập, các chủng thuộc chi *Pseudomonas* (5 chủng) và *Burkholderia* (5 chủng), *Bacillus* (3 chủng) chiếm phần lớn. Theo Fulekar (2008), các loài thuộc chi *Pseudomonas*, nhất là *P. aeruginosa* chiếm phần lớn trong hệ vi sinh vật đất, và chúng là một trong những vi sinh vật có khả năng phân giải chlorpyrifos mạnh [9]. Các loài thuộc chi *Burkholderia* có khả năng phân bố rộng, phổ biến nhất là ở đất quanh vùng rễ thực vật [10]. Kim và Ahn (2008) đã phân lập và tuyển chọn chủng *Burkholderia cepacia* có khả năng phân giải chlorpyrifos trong môi trường MSM + 300 mg/L [11]. Sự phân hủy chlorpyrifos cũng được ghi nhận ở các chủng thuộc chi *Bacillus* như *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. cereus* [7]. Shweta và cộng sự (2017) đã phân lập chủng *Bacillus megaterium* có khả năng phân giải chlorpyrifos ở nồng độ lên đến 600 mg/L [12]. Ngoài ra, sự phân hủy chlorpyrifos cũng được ghi nhận ở các chủng thuộc *Klebsiella* [2], *Ochrobactrum* [13], *Pantoea* [14] và *Paenibacillus* [15].

Bảng 1. Đặc điểm của 20 chủng có khả năng phân giải chlorpyrifos

Chủng		2.8	3.6	5.1	5.2	5.4	6.2	6.3	8.2	13.1	13.3
Đặc điểm											
Hình dạng khuẩn lạc		tròn, 0,5-1mm, trắng đục	không đều, vàng chuyển sang nâu	trong, bóng, trong hoặc vàng nhạt, lồi	1-3 mm, mọc lan, màu trắng sữa	bóng, màu vàng nâu	tròn, màu trắng xám, ~ 2mm	màu vàng, trong mờ, 1 - 2,5 mm	màu trắng, 1 - 3 mm, lồi.	tròn, màu vàng, trong mờ, 1 - 2,5 mm	màu vàng, 2 - 3 mm
Hình dạng tế bào		Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que
Gram		-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Di động		+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Glucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sucrose		-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Manitol		+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Myo-inositol		+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Galactose		+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Xylose		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose		+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Maltose		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lactose		+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Citrate		+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
H ₂ S		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
O		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P		-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
M-R		-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase		+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Indol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chủng đoán	dự	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Pantoea</i> spp.	<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.

(-): âm tính, (+): dương tính

Bảng 1. Đặc điểm của 20 chủng có khả năng phân giải chlorpyrifos (tt)

Chủng		13.4	15.3	16.2	16.3	18.1	26.1	27.2	30.1	2.10	49.1
Đặc điểm											
Hình dạng khuẩn lạc	tròn, 0.5 – 1mm, trắng đục	không đều, có màu vàng chuyển sang nâu	0.5 – 1 mm, màu vàng nâu, trong mờ.	~ 1 mm, màu vàng nâu, trắng đục	tròn, lồi, 2 – 3 mm, màu trắng đục	tròn, 0.5 – 1 mm, màu trắng đục.	mọc lan, bề mặt nhẵn, mượt	tròn, màu trắng đục, 3 – 4 mm.	tròn, bóng, lồi, 3 – 4 mm, màu trắng đục	tròn, bóng, lồi, 3 – 4 mm, màu trắng đục	
Hình dạng tế bào	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que	Que
Gram	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Di động	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Mio-inositol	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Galactose	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Arabinose	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Citrate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
F	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
V-P	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
M-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatinase	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chủng đoán	dự	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Ochrobactrum</i> spp.	<i>Ochrobactrum</i> spp.

(-): âm tính, (+): dương tính

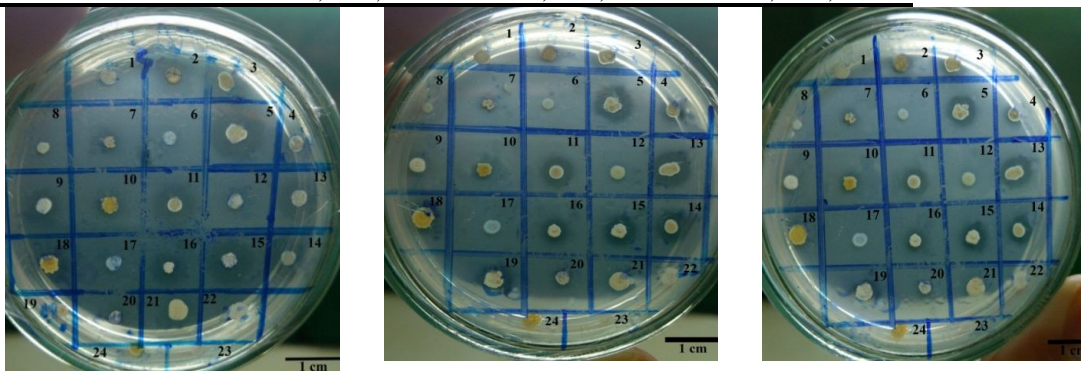
3.3. Kết quả khảo sát khả năng phân giải chlorpyrifos của chủng tuyển chọn

Các chủng có khả năng phân giải chlorpyrifos được cấy trên 3 loại môi trường MSM – Agar có bổ sung chlorpyrifos ở các nồng độ 100, 200, 300 µg/mL. Kết quả cho thấy rằng, các chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng sinh trưởng và phân giải chlorpyrifos. Tuy nhiên, khả năng phân giải chlorpyrifos ở các chủng thì khác nhau, đường kính vòng phân giải đạt từ 4,5 – 11 mm trên môi trường có nồng độ chlorpyrifos 100 µg/mL sau 10 ngày nuôi cấy (Bảng 2). Trong đó, các chủng *Pseudomonas* spp. (13.1), *Bacillus* spp. (15.3), *Burkholderia* spp. (16.2) và *Burkholderia* spp. (16.3) có khả năng phân giải mạnh hơn so với các chủng còn lại (đường kính vòng phân giải sau 10 ngày nuôi cấy đạt từ 8,5 – 11 mm ở nồng độ chlorpyrifos 100 µg/mL, 7,5 – 9,1 mm ở nồng độ 200 µg/mL, 7,0 – 8,0 mm ở nồng độ 300 µg/mL). Đặc biệt, chủng *Burkholderia* spp. (16.3), chủng phân lập được từ ruộng lúa, tỉnh Bình Dương, có đường kính vòng phân giải lớn nhất (Hình 2) ở cả 3 nồng độ. Vì thế, chủng *Burkholderia* spp. 16.3 được tuyển chọn để khảo sát khả năng phân giải chlorpyrifos trong môi trường MSM lỏng.

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải chlorpyrifos (mm) của các chủng vi khuẩn trên các môi trường có nồng độ chlorpyrifos khác nhau sau 10 ngày nuôi cấy

Tên chủng	Nồng độ chlorpyrifos (µg/mL)		
	100	200	300
2.8	8,6 ± 0,5	9,0 ± 0,5	6,0 ± 0,0
3.6	6,0 ± 1,0	5,0 ± 0,0	4,0 ± 0,5
5.1	5,5 ± 0,5	4,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2
5.2	7,3 ± 0,5	5,6 ± 0,5	4,0 ± 0,5
5.4	6,0 ± 1,1	6,0 ± 1,0	5,0 ± 0,5
6.2	4,0 ± 0,0	2,8 ± 0,2	2,0 ± 0,5
6.3	7,0 ± 0,5	7,5 ± 0,5	4,0 ± 0,0
8.2	8,0 ± 0,5	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0
13.1	9,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5	7,0 ± 0,0
13.3	6,3 ± 1,1	5,1 ± 0,7	3,0 ± 0,0
13.4	10,0 ± 0,8	9,0 ± 0,5	6,5 ± 0,5
15.3	9,0 ± 0,0	7,5 ± 0,5	7,0 ± 0,0
16.2	8,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5	7,0 ± 0,5
16.3	11,0 ± 0,8	9,1 ± 0,2	8,0 ± 0,5
18.1	6,0 ± 1,3	4,8 ± 0,2	3,0 ± 0,0
21.1	6,0 ± 0,0	4,1 ± 1,0	4,0 ± 0,0
26.1	9,1 ± 0,7	8,3 ± 1,1	6,5 ± 0,5
27.2	4,5 ± 0,5	3,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2

30.1	$5,0 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,0$
2.10	$6,0 \pm 0,0$	$5,0 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,8$
49.1	$8,0 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,0$	$5,0 \pm 0,5$



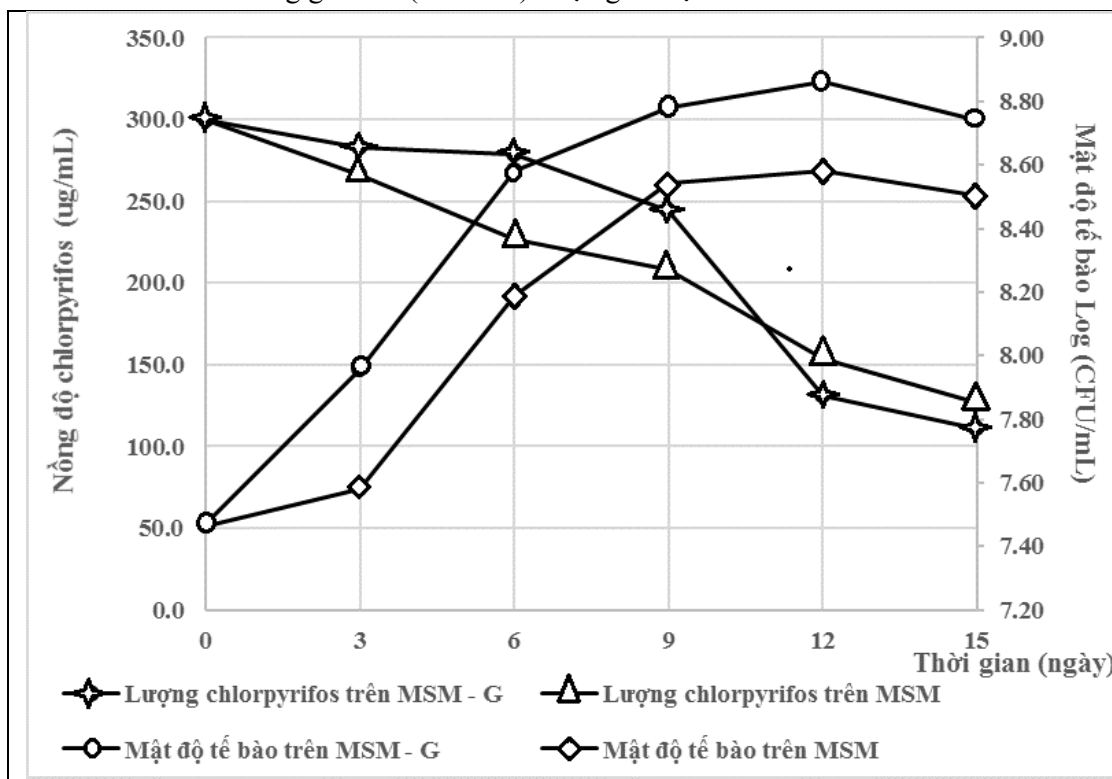
(a)

(b)

(c)

Hình 2. Vòng phân giải chlorpyrifos của các chủng vi khuẩn ở nồng độ (a) 100 µg/mL (b) 200 µg/mL và (c) 300 µg/mL sau 10 ngày nuôi cấy. Số 5: chủng 16.3, số 13: chủng 13.1, số 14: chủng 16.2 và số 15: chủng 15.3.

Khả năng phân giải chlorpyrifos của chủng *Burkholderia* spp. **16.3** trên môi trường MSM và MSM bổ sung glucose (MSM-G) được ghi nhận ở Hình 3.



Hình 3. Sự tăng trưởng của chủng *Burkholderia* spp. 16.3 và hàm lượng chlorpyrifos còn lại theo thời gian nuôi cấy

Kết quả ở Hình 3 cho thấy, đường cong tăng trưởng của chủng *Burkholderia* spp. 16.3 có sự khác biệt trên hai môi trường MSM và MSM – G. Ở môi trường MSM, sau 3 ngày đầu tiên, mật độ vi khuẩn tăng không đáng kể, tế bào đang ở giai đoạn pha lag, lượng chlorpyrifos giảm không đáng kể. Từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6, mật độ tế bào bắt đầu tăng mạnh, lượng chlorpyrifos ở môi trường MSM đã giảm được 73,78 µg/mL. Tuy nhiên, ở môi trường MSM – G thì lượng chlorpyrifos giảm chỉ 21,67 µg/mL. Từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 15, mật độ tế bào tiếp tục tăng mạnh, đạt cao nhất vào ngày thứ 12, ở môi trường MSM – G đạt $7,3 \times 10^8$ CFU/mL và MSM đạt $3,8 \times 10^8$ CFU/mL, lượng chlorpyrifos giảm mạnh. Sau đó mật độ tế bào hầu như không tăng nữa. Tế bào bước vào giai đoạn pha cân bằng và suy vong, lượng chlorpyrifos ở cả hai môi trường MSM và MSM – G giảm ít. Mật độ tế bào trên hai loại môi trường của chủng *Burkholderia* spp. 16.3 có sự chênh lệch, ở môi trường MSM – G tế bào vi khuẩn tăng trưởng mạnh hơn ở môi trường MSM, đồng thời khả năng sử dụng chlorpyrifos của chủng vi khuẩn trên môi trường MSM – G cao hơn trên môi trường MSM, với lượng chlorpyrifos giảm trên từng môi trường lần lượt là 189,22 và 173,13 µg/mL sau 15 ngày nuôi cấy.

Kết quả trong nghiên cứu này tương tự với báo cáo của Singh và cộng sự (2004) [6]. Hợp chất carbon dễ tiêu thụ như glucose hay succinate có thể làm chậm quá trình phân hủy chlorpyrifos của vi khuẩn ở thời gian đầu sau nuôi cấy. Trong giai đoạn đầu, vi khuẩn sử dụng nguồn glucose cho tăng sinh mạnh, khi nguồn glucose hay succinate cạn kiệt (sau 3 ngày nuôi cấy) thì chlorpyrifos được sử dụng. Một số chủng vi sinh vật nếu được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường có bổ sung nguồn carbon dễ tiêu thụ có thể mất đi khả năng phân hủy chlorpyrifos, nhưng một số chủng khác thì không [6]. Trong môi trường ngoài tự nhiên, nguồn carbon rất đa dạng, vì thế chủng vi sinh vật có khả năng phân giải chlorpyrifos với sự hiện diện của nhiều nguồn carbon dễ tiêu thụ là một sự chọn lựa tốt trong việc chế tạo chế phẩm xử lý các chất độc hại trong môi trường.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và làm thuần được 20 chủng có khả năng phát triển trong môi trường chứa hàm lượng cao chlorpyrifos. Các chủng phân lập thuộc 7 chi *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Paenibacillus* và *Klebsiella*. Trong các chủng phân lập, 4 chủng *Pseudomonas* spp. 13.1, *Bacillus* spp. 15.3, *Burkholderia* spp. 16.2 và *Burkholderia* spp. 16.3 có khả năng phân giải chlorpyrifos trên môi trường MSM – Agar chứa 100 – 300 µg/mL chlorpyrifos, độ lớn vòng phân giải đạt 7 - 11 mm. Khả năng phân giải mạnh nhất được ghi nhận ở chủng *Burkholderia* spp. 16.3, chủng phân lập được từ ruộng lúa, tỉnh Bình Dương. Chủng này có khả năng phát triển và phân giải chlorpyrifos trong môi trường MSM lỏng có hoặc không có sự hiện diện của glucose, với lượng chlorpyrifos bị phân hủy lên tới 189,22 µg/mL sau 15 ngày. Nhằm sử dụng các chủng vi khuẩn phân lập vào sản xuất các chế phẩm sinh học cho xử lý môi

trường, các nghiên cứu về sự an toàn của các chủng vi khuẩn đối với sức khỏe con người và môi trường cần được thực hiện.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

❖ **Lời cảm ơn:**

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ trẻ trong khuôn khổ đề tài mã số 194/HĐ – SKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Văn Toàn, “Thực trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và một số giải pháp giảm thiểu việc sử dụng thuốc không hợp lí trong sản xuất lúa ở đồng bằng sông Cửu Long,” *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol.28, pp. 47-53, 10/2013.
- [2] I. Ghanem, M. Orfi, M. Shamma, “Biodegradation of Chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. Isolated from an Activated Sludge Sample of Waste Water Treatment Plant in Damascus,” *Folia Microbiologica*, vol. 52, Issue 4, pp. 423–427, Jul. 2007.
- [3] V. Tougu, “Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition,” *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents*, vol. 1, Issue 2, pp. 155–170, Aug. 2001.
- [4] Q. Zhang, B. Wang, Z. Cao, Y. Yu, “Plasmid-mediated bioaugmentation for the degradation of chlorpyrifos in soil,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 221, pp. 178–184, Jun. 2012.
- [5] H. D. Kidd, D. R. James, The Agrochemicals handbook, 3rd ed. *Royal Societi of Chemistry Information Service*. Cambridge, UK, pp. 5-14, 1992.
- [6] B. K. Singh, A. Walker, “Microbial degradation of organophosphorus compounds,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 30, Issue 3, pp. 428–471, 2006.
- [7] A. E. S. A. Ishag, A. O. Abdelbagi, A. M. A. Hammad, E. A. E. Elsheikh, O. E. Elsaid, J. H. Hur, M. D. Laing, “Biodegradation of Chlorpyrifos, Malathion, and Dimethoate by Three Strains of Bacteria Isolated from Pesticide-Polluted Soils in Sudan,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, Issue 45, pp. 8491–8498, Nov. 2016.
- [8] D. H. Bergey, J. G. Holt, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition, Baltimore, Md: Williams and Wilkins Co, 1994.
- [9] M. H. Fulekar, M. Geetha, “Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique,” *Journal of Applied Bioscience*, vol. 12, pp. 657-660, 2008.
- [10] W. Achouak, R. Christen, M. Barakat, M. H. Marte, T. Heulin, “*Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique,” *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 49, pp. 787–794, 1999.

- [11] J. R. Kim, Y. J. Ahn, "Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100," *Biodegradation*, vol.20, Issue 4, pp. 487–497, 2009.
- [12] N. Shweta, S. K. Jadhav, Keshavkant, "*Bacillus megaterium*: A potential swimmer and an efficient bio-degrader of an organophosphorus pesticide," *Journal of Ecosystem and Ecography*, V. 7, Issue 2 (Suppl.), International Conference on Ecology and Ecosystems, Toronto, Canada, Sep. 18-20, 2017.
- [13] J. Abraham, S. Silambarasan, "Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 126, pp. 13–21, Jan. 2016.
- [14] A. B. Salem, S. Azzouz, A. Mougou, R. Salghi, H. Chaabane, S. Fattouch, "Biochemical characterisation and bioremediation study of dimethoate and chlorpyrifos tolerant bacterial strains isolated from an agricultural soil," *Journal of New Sciences*, vol. 33, Issue 3, pp. 1901–1909, Sep. 2016.
- [15] F. F. da Mota, E. A. Gomes, E. Paiva, L. Seldin, "Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel rpoB-based PCR-DGGE method," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 53, Issue 2, pp. 317–328, Jul. 2005.