

**TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT
CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HUỖ THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
TỪ ĐẤT TRỒNG RAU Ở TỈNH THỪA THIÊN HUẾ**

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG ANH
Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

NGÔ THỊ TƯỜNG CHÂU
Đại học Khoa Học, Đại học Huế

Rau xanh là loại cây trồng thời vụ dễ bị sâu, bệnh hại nên người trồng rau thường phải sử dụng nhiều thuốc bảo vệ thực vật (TBVTV). Hệ quả sử dụng quá nhiều thuốc làm cho dư lượng TBVTV bị rửa trôi vào nước mặt hay thấm vào đất, không những gây ô nhiễm nguồn nước, đất mà còn trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến sức khỏe môi trường và cộng đồng. Lượng tồn dư TBVTV trong đất trồng rau chủ yếu thuộc hai nhóm: nhóm carbamate và nhóm lân hữu cơ. Trong đó, nhóm lân hữu cơ chứa các hợp chất như Diazinon, chlorpyrifos, parathion, malathion, v.v. Nhóm này có thời gian bán phân huỷ dài hơn nhóm carbamate nhưng ngắn hơn so với nhóm chlor hữu cơ. Tuy nhiên, trũng độc hơn và được sử dụng rộng rãi.

Việc ứng dụng khả năng phân huỷ sinh học TBVTV của vi sinh vật (VSV) đã và đang trở thành một trong những giải pháp tốt để xử lý tồn dư TBVTV trong đất. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như: đơn giản, thân thiện với môi trường, chi phí đầu tư thấp và có thể thực hiện tại chỗ. Tuy nhiên, việc ứng dụng VSV vào mục đích này vẫn còn những hạn chế nhất định do khó khăn trong việc tuyển chọn các chủng VSV có khả năng phân huỷ TBVTV nhanh và xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình phân huỷ để sử dụng trong phục hồi sinh học hệ sinh thái đất trồng một cách hiệu quả.

Bài báo này giới thiệu kết quả bước đầu phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có tiềm năng phân huỷ dư lượng TBVTV trong đất tại một số vùng trồng rau ở Thừa Thiên Huế.

I. ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu đất: Được thu tại 5 vùng trồng rau ở Thừa Thiên Huế được ký hiệu từ S1 đến S5, trong đó: S1-Đất trồng xà lách ở Hương An (Huyện Hương Trà); S2- Đất trồng cải ở Quảng Thành (Huyện Quảng Điền); S3-Đất trồng xà lách ở Quảng Thành (Huyện Quảng Điền); S4-Đất trồng cải ở Phú Mậu (Huyện Phú Vang); S5-Đất trồng cải ở Tây Lộc (Thành phố Huế). Lấy mẫu đất, bảo quản và xử lý mẫu theo TCVN-5297-1995 và TCVN 6647-2000 hướng dẫn về mẫu đất phân tích dư lượng của hoá chất bảo vệ thực vật.

TBVTV: Được chọn cho thí nghiệm có tên thương phẩm là Vibasu thuộc nhóm lân hữu cơ với thành phần hoạt chất 10% Diazinon. Phân tích hàm lượng TBVTV trong đất theo phương pháp sắc ký khí dùng detector NPD.

Phân lập các chủng VSV khả năng phân huỷ Diazinon: Các chủng VSV có khả năng phân huỷ Diazinon được phân lập bằng phương pháp làm giàu môi trường sau đây:

- Môi trường muối khoáng (MS) được làm giàu với nồng độ 75mg/l Diazinon từ Vibasu, được sử dụng cho việc phân lập các chủng VSV phân huỷ Diazinon. Nguồn C trong MS được thay thế Diazinon. MS có thành phần (g/l): KNO₃ (2g); MgSO₄.7H₂O (0.2g); CaCl₂. 2H₂O (0.1g); NaCl (0.1g); FeCl₃.6H₂O (0.01g); Dung dịch muối khoáng 1ml; Nước cất vừa đủ 1000 ml;

pH 7.4. Dung dịch muối khoáng có thành phần (g/l): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (100 mg); $CoCl_2$ (20 mg); $CuSO_4$ (10 mg); Na_2MoO_4 (10 mg); $ZnCl_2$ (20 mg); $LiCl$ (5 mg); $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 mg); H_3BO_3 (10 mg); KBr (20 mg); $BaCl_2$ (5mg); $EDTA-Na-Fe^{3+}$ (8mg).

- Phân lập các chủng VSV: Định lượng 5g mẫu đất hoà tan, tạo huyền phù trong bình tam giác (250 ml) chứa 100 ml. MS được bổ sung với 75 mg/l Diazinon đã vô trùng bằng màng lọc kích thước lỗ là 0,20 μm . Bình tam giác đối chứng cũng được chuẩn bị tương tự nhưng không bổ sung mẫu đất. Các bình tam giác được nuôi cấy trên máy lắc ở 150 vòng/phút, ở 30 °C trong 10 ngày. Sau 10 ngày, để lắng trong 1 giờ và hút phần chất lỏng chứa VSV cấy ria lên trên thạch muối khoáng được bổ sung 75 mg/l Diazinon và nuôi cấy tại 30 °C. Tiếp tục chọn các khuẩn lạc phát triển riêng rẽ để cấy lên môi trường thạch muối khoáng chứa Diazinon với cùng nồng độ cho đến khi đạt được các chủng VSV thuần khiết.

Tuyển chọn các chủng VSV có khả năng phân huỷ Diazinon cao: Môi trường muối khoáng (MS) tương tự như trong phân lập được bổ sung Diazinon với nồng độ 30 mg/l. Đối chứng cũng được chuẩn bị tương tự nhưng không bổ sung VSV. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng VSV bằng phương pháp đo mật độ quang của dịch cấy bước sóng 600 nm .

Định danh các chủng VSV: Dựa vào hình thái khuẩn lạc, độ cao, màu sắc, mép khuẩn lạc. Quan sát tế bào vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm đơn và nhuộm kép. Đánh giá đặc điểm sinh hoá bằng các thử nghiệm ONPG, decarboxylase, khả năng biến dưỡng citrate (CIT), khả năng sinh H_2S , khả năng phân giải urea (URE) và TDA (Trytophan Deaminase), khả năng sinh indol (IND), VP (Voges Proskauer), Gelatin (GEL) và khả năng lên men các loại đường, oxidase, catalase, tính di động.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc tính lý hoá và sinh học của đất trồng rau ở Thừa Thiên Huế

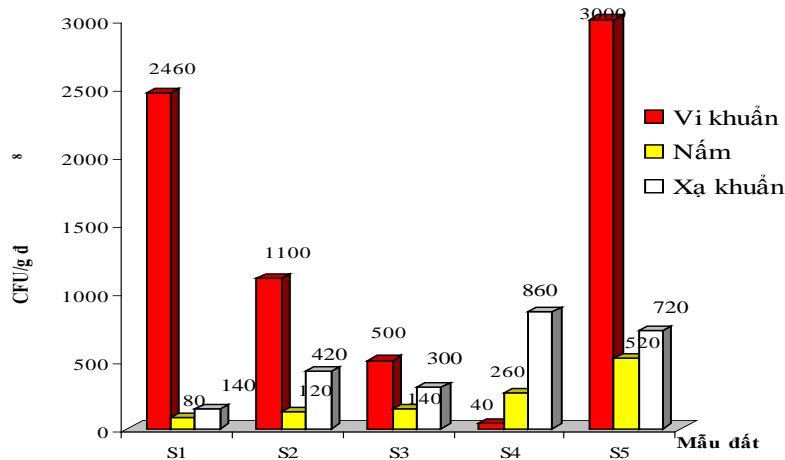
Đặc tính lý hoá: Số liệu phân tích được trình bày ở Bảng 1 cho thấy: giá trị pH thuộc loại chua ít đến trung bình; hàm lượng mùn tương đối nghèo (riêng mẫu S2 có hàm lượng mùn đạt mức trung bình - 2.38%); đạm tổng số nghèo và trung bình, lân tổng số rất nghèo, độ ẩm của đất thuận lợi cho sự phát triển các loài VSV. Tuy nhiên, ở 2 vùng trồng rau ở Hương An (S5) và Tây Linh (S1) độ ẩm của đất tương đối thấp.

Bảng 1

Một số đặc tính lý hoá trong các mẫu đất trồng rau ở Thừa Thiên Huế

Mẫu đất	pH _{KCl}	Mùn (%)	Đạm tổng số (%)	Lân tổng số (%)	Độ ẩm (%)
S1	4.39	1.14	0.063	0.021	15
S2	4.27	2.38	0.084	0.015	37
S3	5.74	1.97	0.140	0.026	34
S4	4.10	1.24	0.126	0.020	30
S5	4.65	0.72	0.056	0.027	17

Hệ vi sinh vật: Kết quả phân tích cho thấy tổng số vi khuẩn hiện diện trong mỗi mẫu đất nghiên cứu là lớn hơn rất nhiều so với tổng số nấm và xạ khuẩn. Điều này thể hiện khả năng thích nghi cao của vi khuẩn trong điều kiện có sự tồn tại của TBVTV trong đất.



Hình 1: Biểu đồ phân bố vi sinh vật trong các mẫu đất

2. Phân lập các chủng VSV có khả năng phân huỷ Diazinon

Kết quả phân lập VSV từ 5 mẫu đất nghiên cứu, đã phân lập 20 chủng vi khuẩn có khả năng đồng hoá Diazinon, trong đó, mỗi mẫu đất phân lập được 4 chủng vi khuẩn (Bảng 2).

Bảng 2

Kết quả phân lập các chủng VSV có khả năng phân huỷ Diazinon

TT	Kí hiệu chủng	Nguồn gốc	Hình dạng và màu sắc khuẩn lạc	CFU (x 10 ⁵)/g
1.	HA1	S1	Trắng trong, tròn lồi, nhẵn bóng, có tâm	550
2.	HA2		Trắng trong, lồi tròn, nhẵn bóng	
3.	HA3		Trắng sữa, vô định hình, mép nhẵn bóng	
4.	HA4		Trắng đục, vô định hình, dẹt, gồ gề	
5.	QT11	S2	Trắng đục, dẹt bóng, vô định hình, gợn sóng	366
6.	QT12		Trắng đục, dẹt bóng, mép nhẵn bóng	
7.	QT13		Trắng đục, tròn lồi, nhẵn bóng	
8.	QT14		Trắng sữa, tròn lồi, nhẵn bóng	
9.	QT21	S3	Trắng đục, hình tròn, nhẵn bóng	438
10.	QT22		Trắng trong, hình tròn, lồi bóng	
11.	QT23		Trắng đục, hình tròn, nhẵn bóng	
12.	QT24		Trắng trong, lồi, nhẵn bóng, có tâm	
13.	PM1	S4	Trắng đục, nhẵn, dẹt, tròn	264
14.	PM2		Trắng trong, lồi, nhẵn bóng, cầu	
15.	PM3		Trắng sữa, lồi, nhẵn bóng, cầu	
16.	PM4		Trắng đục, lồi, nhẵn bóng, cầu	
17.	TL1	S5	Trắng đục, dẹt, tròn có tâm, mép nhẵn	630
18.	TL2		Trắng trong, tròn lồi, nhẵn bóng	
19.	TL3		Trắng đục, vô định hình, mép nhẵn bóng	
20.	TL4		Trắng đục, vô định hình, mép nhẵn bóng	

3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ Diazinon cao

Kết quả thí nghiệm cho thấy có 2 chủng TL1 từ mẫu đất S5 và HA2 từ mẫu đất S1 có khả năng sinh trưởng mạnh nhất trong môi trường MS chứa 30 mg/l Diazinon (Bảng 3), trong khi đó, ở mẫu đối chứng đã không phát hiện thấy dấu hiệu sinh trưởng của các vi khuẩn. Dựa trên khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua việc đo mật độ quang học (OD_{600nm}) của dịch môi trường sau nuôi cấy, chúng tôi chọn 2 chủng TL1 và chủng HA2 cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng VK trong môi trường chứa Diazinon

TT	Kí hiệu chủng	$OD_{600\text{ nm}}$			TT	Kí hiệu chủng	$OD_{600\text{ nm}}$		
		0 giờ	48 giờ	72 giờ			0 giờ	48 giờ	72 giờ
1.	HA1	0.175	0.318	0.278	12	QT24	0.181	0.304	0.310
2.	HA2	0.182	0.256	0.379	13	PM1	0.175	0.269	0.258
3.	HA3	0.178	0.210	0.232	14	PM2	0.173	0.282	0.298
4.	HA4	0.175	0.270	0.259	15	PM3	0.174	0.291	0.278
5.	QT11	0.173	0.275	0.295	15	PM3	0.174	0.291	0.278
6.	QT12	0.175	0.258	0.253	16	PM4	0.182	0.263	0.260
7.	QT13	0.177	0.189	0.222	17	TL1	0.177	0.474	0.456
8.	QT14	0.184	0.218	0.211	18	TL2	0.175	0.295	0.335
9.	QT21	0.182	0.265	0.253	19	TL3	0.178	0.274	0.270
10.	QT22	0.175	0.295	0.304	20	TL4	0.176	0.271	0.289
11.	QT23	0.173	0.275	0.271	21	ĐC	0.172	0.173	0.171

* Ghi chú: ĐC - Mẫu đối chứng

4. Định danh các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Đặc điểm hình thái: Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn, chúng tôi lập bảng nhận dạng 2 chủng VK có khả năng phân huỷ Diazinon cao trình bày ở Bảng 4 và Hình 3-4 dưới đây.

Bảng 4

Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn

Đặc điểm hình thái	Chủng TL1	Chủng HA2
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn to, đều	Tròn, đều
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng đục	Trắng trong
Rìa khuẩn lạc	Nhẵn	Nhẵn
Bề mặt	Trơn, bóng, dẹt	Trơn, láng, lồi
Hình dạng tế bào	Hình que	Hình ovan
Kích thước khuẩn lạc	2.0 – 4.0 mm	2.0 – 2.5 mm
Nhuộm Gram	-	-

Đặc điểm sinh hoá: Các đặc điểm sinh hoá được xác định bằng hệ thống API -20E và các thử nghiệm bổ sung như oxidase, catalase, tính di động của các chủng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 5.

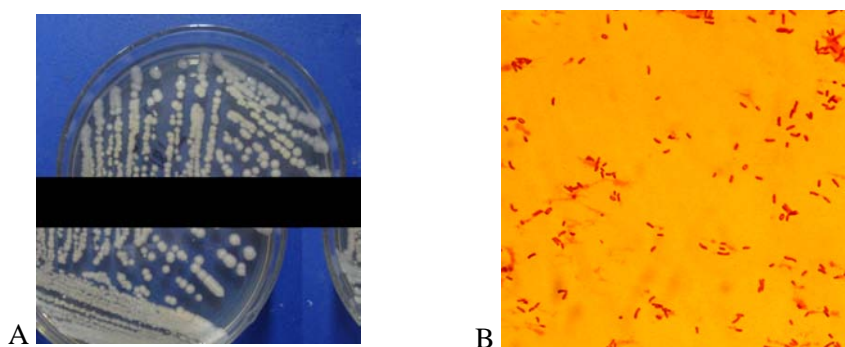
Dựa vào các đặc điểm về hình thái và sinh hoá, trước đây xác định chủng vi khuẩn kí hiệu chủng TL1 thuộc loài *Acinetobacter baumannii*, còn chủng HA2 thuộc loài *Chryseobacterium meningoseptium*.

Bảng 5

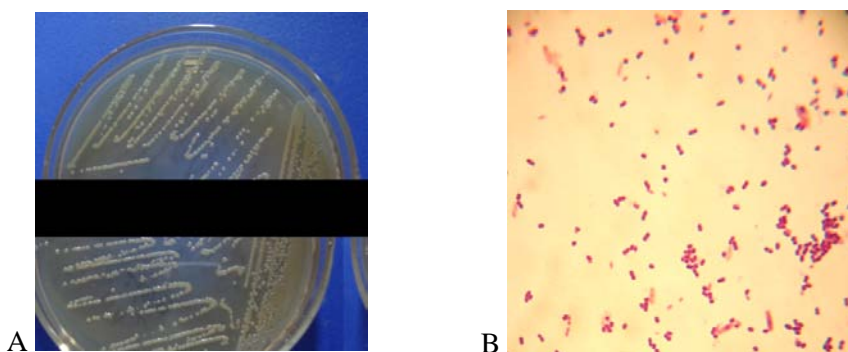
Đặc điểm sinh hoá các chủng vi khuẩn

TT	Đặc điểm hoá sinh	Chủng TL1	Chủng HA2	TT	Đặc điểm hoá sinh	Chủng TL1	Chủng HA2
1.	ONPG	-	+	13.	MAN	-	-
2.	ADH	-	-	14.	INO	-	-
3.	LCD	-	-	15.	SOR	-	-
4.	ORC	-	-	16.	RHA	-	-
5.	CIT	+	-	17.	SAC	+	-
6.	H ₂ S	-	-	18.	MEL	-	-
7.	URE	-	-	19.	AMY	+	-
8.	TDA	-	-	20.	ARA	-	+
9.	IND	-	-	21.	OXIDASE	-	+
10.	VP	+	-	22.	CATALASE	+	+
11.	GEL	-	+	23.	TÍNH DI ĐỘNG	-	-
12.	GLU	+	-				

* Ghi chú: (+) phản ứng dương tính ; (-) phản ứng âm tính



Hình 3: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng TL1



Hình 4: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng HA2

III. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích thành phần lý hoá của đất trồng rau cho thấy môi trường đất khá thích hợp cho sự phát triển của hệ vi khuẩn, trong đó có vi khuẩn phân giải hoá chất bảo vệ thực vật. Đã phân lập 20 vi khuẩn từ 5 mẫu đất trồng rau VK để đánh giá khả năng phân huỷ Diazinon. Kết quả đánh giá bước đầu đã tuyển chọn 2 chủng TL1 và HA2 với năng lực sinh trưởng mạnh nhất trong môi trường MS chứa 30 mg/l Diazinon. Dựa vào các đặc điểm về hình thái và sinh hoá, bước đầu xác định chủng vi khuẩn kí hiệu chủng TL1 thuộc loài *Acinetobacter baumannii*, còn chủng HA2 thuộc loài *Chryseobacterium meningoseptium*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ghasempour A., A. Mohammadkhah, F. Najafi, M. Rajabzdeh**, 2002: The Japan Society for Analytical Chemistry, pp. 779-783.
2. **Trần Linh Thuớc**, 2008: Phương pháp phân tích Vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm. NXB. Giáo dục, Hà Nội.
3. **Viện Nông hoá Thổ nhưỡng**, 2000: Sổ tay Phân tích đất, nước, phân bón và cây trồng. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
4. **Yao B., N. Wu, M. Deng, X. Shi, G. Liang, Y. Fan**, 2004: *The Chinese Science Bulletin*, 49(3): 268-272.
5. **Yasouri F.N.**, 2006: *Asian Journal of Chemistry*, 18(4): 2437-2444.

SELECTING MICROORGANISM STRAINS WITH CAPABILITY OF BIODEGRADATION OF PESTICIDES FROM VEGETABLE PLANTED SOIL IN THUA THIEN HUE PROVINCE

NGUYEN THI PHUONG ANH, NGO THI TUONG CHAU

SUMMARY

In this research, 5 soil samples were collected from cultured vegetable areas in Thua Thien Hue Province. The pesticide chosen has the commercial name as Vibasu with active ingredient being 10% Diazinon, which belongs to organophosphorus pesticides. Results have shown that physical and chemical properties of soil samples promote development of microorganisms, especially bacteria. Most soil samples have the numerous quantity of bacteria. The research has subdivided microorganisms with capability of biodegradation of Diazinon by enrichment method in mineral salt (MS) and supplemented 75mg/l Diazinon of Vibasu. Carbon source was replaced by Diazinon. Mineral salt (MS) medium contained the following ingredients: KNO₃ 2g, MgSO₄ . 7 H₂O 0.2g; CaCl₂ . 2 H₂O 0.1 g , NaCl 0.1g , FeCl₃ . 6 H₂O 0.01g and 1ml of trace elements, 100mg of MnCl₂ .4H₂O, 20mg of CoCl₂ , 10 mg of CuSO₄ , 10 mg of NaMoO₄ . 2H₂O , 20 mg of ZnCl₂, 5mg of LiCl , 5mg of SnCl₂ .2H₂ O , 10 mg of H₃Bo₃, 20mg of KBr, 5 mg BaCl₂ and 8 mg of EDTA-Na-Fe³⁺; 1000 ml distilled water. The pH was adjusted to 7.4 and 75 mg/L of Diazinon was added. This enriched environment was incubated 10 days at 30°C in a shaker incubator at 150 rpm. There are 20 bacterial strains in studied samples which utilize Diazinon as a sole source of carbon. In total, each of soil samples isolated 4 bacterium strains. From isolates , selected bacterium strains in MS medium and supplemented 30 mg/l Diazinon we can assess the growth capability of bacterial strains by measurement of turbidity at 600nm. Result shown that 2 strains TL1 and HA2 were capable of the strongest growth. Based on complex and biochemical characteristics, we initially identified TL1 strain as *Acinetobacter baumannii* and HA2 strain as *Chryseobacterium meningoseptium*.