

## Khảo sát khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn hiếu khí phân lập tại Đà Lạt

Investigation of chlorpyrifos degradation by 3 aerobic bacteria strains isolated in Da Lat city

Lương Thị Thắm<sup>a</sup>, Nguyễn Tiến Đạt<sup>a</sup>, Nguyễn Thị Hồng Thắm<sup>a</sup>, Nguyễn Thùy Hương Trang<sup>a</sup>,  
Tạ Thị Tuyết Nhung<sup>a</sup>, Đặng Trung Tín<sup>a</sup>, Lê Thành Đô<sup>b,c</sup>, Hồ Thanh Tâm<sup>b,c\*</sup>  
Luong Thi Tham<sup>a</sup>, Nguyen Tien Dat<sup>a</sup>, Nguyen Thi Hong Tham<sup>a</sup>, Nguyen Thuy Huong Trang<sup>a</sup>,  
Ta Thi Tuyen Nhung<sup>a</sup>, Dang Trung Tin<sup>a</sup>, Le Thanh Do<sup>b,c</sup>, Ho Thanh Tam<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

<sup>a</sup>Da Lat Nuclear Research Institute, Lam Dong, Viet Nam

<sup>b</sup>Viện Sáng kiến Sức khỏe Toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>b</sup>Institute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

<sup>c</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>c</sup>Faculty of Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

(Ngày nhận bài: 16/11/2020, ngày phản biện xong: 17/11/2020, ngày chấp nhận đăng: 14/12/2020)

### Tóm tắt

Nghiên cứu này trình bày kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy tối ưu nhằm kích thích sự sinh trưởng và khả năng phân hủy thuốc trừ sâu chlorpyrifos của các dòng vi khuẩn hiếu khí bản địa tại Đà Lạt. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ thuốc trừ sâu chlorpyrifos lên khả năng sinh trưởng và tốc độ phân hủy chlorpyrifos của 3 chủng vi khuẩn B2 (*Acinetobacter calcoaceticus*), T1 (*Bacillus megaterium*) và W3 (*Sphingomonas pseudosanguinis*) được tiến hành trong môi trường muối khoáng tối thiểu MSM (minimal salt medium) lỏng có bổ sung chlorpyrifos làm nguồn cacbon duy nhất. Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc, tốc độ 110 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng trong điều kiện không có ánh sáng. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng sinh trưởng và phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn đạt giá trị tối ưu khi được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, pH = 7, nồng độ chlorpyrifos bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy trong khoảng 10 - 40 mg/L. Kết quả này thể hiện tiềm năng sử dụng các dòng vi khuẩn hiếu khí trong việc xử lý tồn dư của chlorpyrifos trong đất nông nghiệp.

*Từ khóa:* Môi trường MSM; phân hủy chlorpyrifos; vi khuẩn hiếu khí.

### Abstract

This study presents the results of surveying optimal culture conditions to stimulate the growth and decomposition ability of chlorpyrifos of indigenous aerobic bacteria strains in Da Lat. The experiment surveyed the effects of the temperature, pH, and chlorpyrifos concentration on the growth and decomposition of chlorpyrifos of 3 bacteria strains B2 (*Acinetobacter calcoaceticus*), T1 (*Bacillus megaterium*) and W3 (*Sphingomonas pseudosanguinis*) in minimal salt medium (MSM) supplemented with chlorpyrifos as the sole carbon source. The experiments were carried out on a shaker at 110 rpm, room temperature, and in the dark condition. The results showed that the optimization culture

\* Corresponding Author: Ho Thanh Tam; Institute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam; Faculty of Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam.

Email: hothanhtam2@duytan.edu.vn

condition for 3 bacteria strain growth and decomposition of chlorpyrifos when cultured at 30°C, pH = 7, and ranged of chlorpyrifos in the culture medium from 10 - 40 mg/L. The results suggested a potential of using aerobic bacteria strains in the treatment of residues of chlorpyrifos in agricultural soils.

**Keywords:** MSM medium, chlorpyrifos degradation, Aerobic bacteria.

## 1. Giới thiệu

Thành phố Đà Lạt nằm trên độ cao 1500 mét so với mặt nước biển, có diện tích tự nhiên khoảng 393,29 km<sup>2</sup>, trong đó có khoảng 10.000 ha đất nông nghiệp. Ngành nông nghiệp tại Đà Lạt được xem là thế mạnh và nổi tiếng cả nước. Tuy nhiên, do ngày càng xuất hiện nhiều loại dịch hại trên cây trồng, nên phần lớn người dân ưu tiên sử dụng các nhóm thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) có độc tố cao với liều lượng tăng gấp 1,5 - 2 lần so với khuyến cáo làm cho dư lượng thuốc BVTV 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 [1].

Lượng tồn dư thuốc BVTV trong đất nông nghiệp tại Đà Lạt chủ yếu thuộc hai nhóm: nhóm carbamate và nhóm lân hữu cơ. Trong số những ca nhiễm độc hóa chất BVTV gây ra do lao động nông nghiệp, số liệu báo cáo tại Trung tâm Chống độc (Bệnh viện Bạch Mai) cho thấy nhóm lân hữu cơ (Organophosphate Insecticide - OP) chiếm tỷ lệ cao nhất so với các loại hóa chất BVTV khác [2].

Chlorpyrifos (O, O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) là một loại thuốc trừ sâu phổ rộng thuộc nhóm lân hữu cơ, được nông dân thường xuyên sử dụng để tiêu diệt nhiều loại côn trùng. Loại thuốc trừ sâu này được xếp vào nhóm độc loại II và được đề cập đến nhiều nhất do tác hại của nó đến sức khỏe người nông dân bị phơi nhiễm khi pha trộn, vận chuyển và phun rải chlorpyrifos [3,4,5]. Vì vậy thuốc đã bị cấm sử dụng ở nhiều nước trên thế giới. Tại Việt Nam, theo quyết định 501/QĐ-BNN-BVTV năm 2019, thuốc chỉ được phép buôn bán và sử dụng đến hết ngày 12 tháng 2 năm 2021.

Việc ứng dụng khả năng phân hủy sinh học thuốc BVTV của vi sinh vật (VSV) đã và đang trở thành một trong những giải pháp tốt để xử lý tồn dư thuốc BVTV trong đất. 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 (DETP) acid [7]. 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 hủy thuốc BVTV nhanh và xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình phân hủy để sử dụng trong phục hồi sinh học hệ sinh thái đất trồng một cách hiệu quả. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng và khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn B2 (*Acinetobacter calcoaceticus*), T1 (*Bacillus megaterium*) và W3 (*Sphingomonas pseudosanguinis*) phân lập được trong đất canh tác nông nghiệp tại Đà Lạt. Đây cũng là những dòng vi khuẩn đã có nhiều nghiên cứu trong việc phân hủy tồn dư thuốc BVTV trong đất nông nghiệp [6,7].

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Nguồn vi khuẩn: 3 chủng vi khuẩn B2 (*Acinetobacter calcoaceticus*), T1 (*Bacillus megaterium*) và W3 (*Sphingomonas pseudosanguinis*) phân lập được trong đất canh tác nông nghiệp tại Đà Lạt và được lưu tại ngân hàng giống của Trung tâm phân tích, Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Đà Lạt.

Môi trường muối khoáng tối thiểu (MSM) có thành phần (g/L): KNO<sub>3</sub> (2 g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.2 g); CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (0.1 g); NaCl (0.1 g); FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0.01 g). Dung dịch muối khoáng 1 mL nước cất vừa đủ 1000 mL; pH 7.0. Dung dịch muối khoáng có thành phần (g/L): MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O (100 mg); CoCl<sub>2</sub> (20 mg); CuSO<sub>4</sub> (10 mg); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (10 mg); ZnCl<sub>2</sub> (20 mg); LiCl (5 mg); SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (5 mg); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (10 mg); KBr (20 mg); BaCl<sub>2</sub> (5mg); EDTA-Na-Fe<sup>3+</sup> (8 mg). Các hóa chất được cung cấp bởi Công ty Merk, Đức.

Thuốc trừ sâu chlorpyrifos 99,5% được cung cấp bởi Công ty Fluka (Sigma, USA). Dung dịch stock chlorpyrifos 20 mg/mL được hòa tan trong ethyl acetate, trước khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy được lọc bằng màng lọc Millipore (Millex, Pháp).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thử nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ (25, 30 và 37°C), pH (4, 5, 6 và 7) và nồng độ thuốc trừ sâu chlorpyrifos (10, 40 và 160 mg/L) lên khả năng sinh trưởng và phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn B2, T1 và W3. Chủng 100µL dịch nuôi cấy từng loại vi khuẩn vào 5 mL môi trường MSM có bổ sung chlorpyrifos làm nguồn cacbon duy nhất. Các mẫu nuôi cấy được thông khí bằng cách lắc với tốc độ 110 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Mật độ vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc vào thời điểm ban đầu và sau 5 ngày nuôi cấy. Sau 14 ngày nuôi cấy, mẫu nuôi được trích và phân tích để xác định hàm lượng chlorpyrifos còn lại. Hàm lượng thuốc chlorpyrifos còn lại trong môi trường nuôi được ly trích bằng dung môi ethyl acetate và phân tích hàm lượng chlorpyrifos trên thiết bị GC-2020 plus.

## 2.3. Xử lý số liệu

Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với

3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Số liệu thống kê được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm thống kê mô tả SPSS (Version 16.0).

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn hiếu khí (B2, T1 và W3)

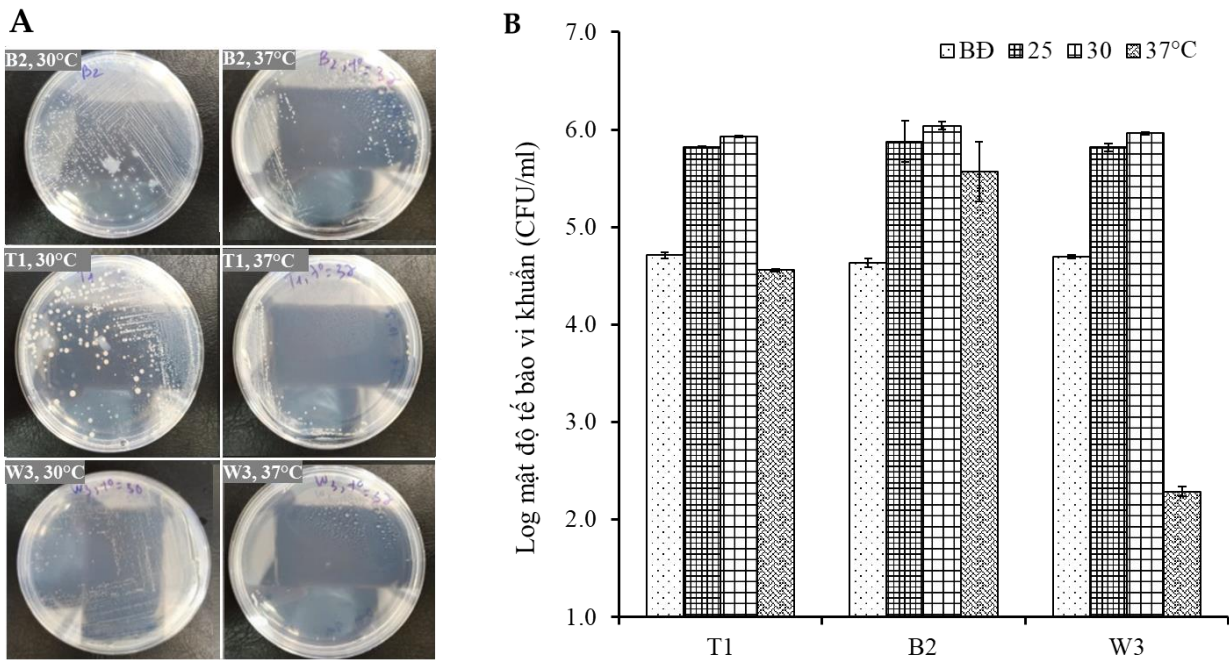
Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 3 loại nhiệt độ (nhiệt độ phòng (25°C), 30°C và 37°C) lên sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn T1, B2 và W3 cho thấy, cả 3 dòng vi khuẩn đều phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ từ 25 - 30°C. Mật độ vi khuẩn tăng cao nhất và có ý nghĩa thống kê ở 30°C với giá trị trung bình lần lượt là T1 (5,92), B2 (6,04) và W3 (5,96) (giá trị Log (CFU/mL)) sau 5 ngày nuôi cấy (p < 0,05) (Hình 1).

Ở nhiệt độ 37°C tuy sự gia tăng mật độ tế bào của 3 dòng vi khuẩn không bằng ở khoảng nhiệt độ từ 25 - 30°C nhưng 2 dòng vi khuẩn T1 và B2 vẫn có khả năng phát triển tốt T1 (4,56), B2 (5,57) (giá trị Log (CFU/mL)), còn dòng vi khuẩn W3 ở nhiệt độ 37°C chúng gần như bị ức chế sự phát triển vì kết quả cho thấy mật độ của dòng W3 đã giảm hơn rất nhiều so mật độ ban đầu sau 5 ngày nuôi ở 37°C, W3 (2,28) (giá trị Log (CFU/mL)) (Hình 1).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cả 3 dòng vi khuẩn khá bảo thủ về khả năng thích nghi với điều kiện nhiệt độ khác nhau, các dòng chỉ có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ 25 - 30°C. Khi nhiệt độ tăng lên 37°C thì 3 dòng vi khuẩn này sinh trưởng yếu hoặc không sinh trưởng được. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các công bố trước đó, như nghiên cứu của Cai và cs. (2011) cho rằng nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chủng *Acinetobacter calcoaceticus* là ở nhiệt độ 30°C, chủng *Bacillus megaterium* phát triển tốt ở nhiệt độ 30°C và điều kiện tối ưu cho sự phát triển của chủng *Sphingomonas* sp. HYJ là ở khoảng nhiệt

độ 30 - 35°C [8, 9, 10]. Từ kết quả trên cho thấy nhiệt độ có vai trò quan trọng đối với quá trình sinh trưởng của 3 dòng vi khuẩn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ quá cao sẽ làm biến tính màng sinh chất trong tế bào vi khuẩn làm ức chế quá trình sinh trưởng. Khi nhiệt độ thấp thì

màng sinh chất của tế bào vi khuẩn bị kết đông lại và enzyme cũng ngừng hoạt động. Vì vậy, nếu nhiệt độ môi trường nuôi cấy của vi khuẩn vượt ra khỏi ngưỡng nhiệt độ cho phép của vi khuẩn thì quá trình sinh trưởng của chúng sẽ bị ức chế và thậm chí ngừng hẳn [11, 12].



**Hình 1.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào vi khuẩn. (A) Hình thái và sự phát triển của 3 dòng vi khuẩn ở nhiệt độ 30 và 37°C; (B) Sự gia tăng mật độ tế bào của 3 dòng vi khuẩn trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau. BD: Mật độ vi khuẩn ban đầu bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

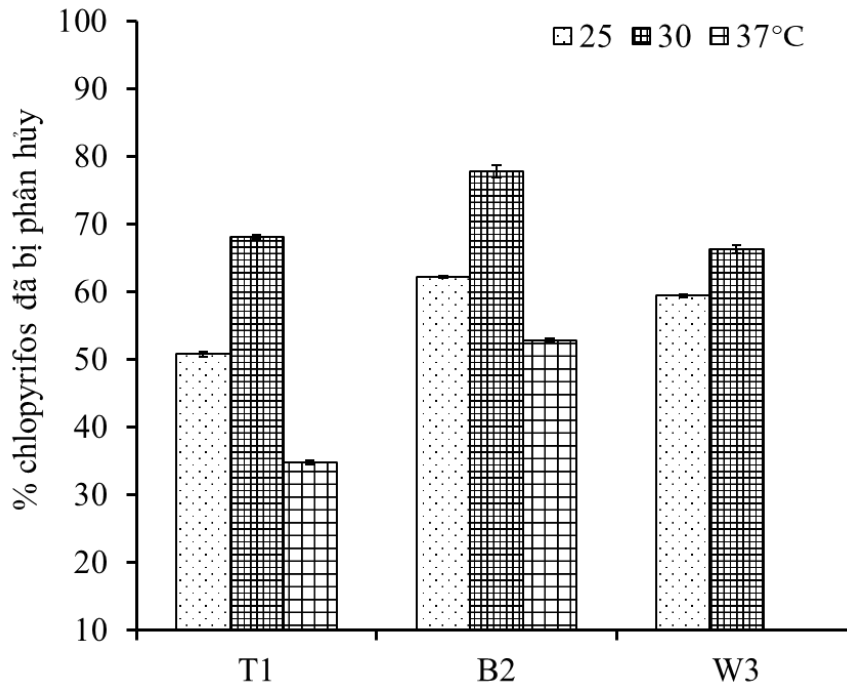
Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn được thể hiện ở Hình 2. Kết quả cho thấy, cả 3 dòng vi khuẩn đều thể hiện khả năng phân hủy chlorpyrifos tốt ở khoảng nhiệt độ 25 - 30°C, tuy nhiên hiệu quả phân hủy cao nhất và có ý nghĩa thống kê là ở nhiệt độ 30°C ( $p < 0,05$ ). Cụ thể, dòng T1 đã phân hủy được 68%, dòng B2 phân hủy được 78% và dòng W3 phân hủy được 66% hàm lượng chlorpyrifos khi nuôi cấy trong môi trường MSM bổ sung 20 mg/L chlorpyrifos, sau 14 ngày nuôi cấy.

Kết quả cho thấy có mối quan hệ giữa sự gia tăng mật độ tế bào và hiệu suất phân hủy chlorpyrifos trong môi trường nuôi cấy. Mật độ tế bào càng nhiều thì tốc độ phân hủy chlorpyrifos diễn ra càng nhanh. Theo Mallick

và cs. (1999) nguyên nhân có thể là do chlorpyrifos đã được các chủng vi khuẩn này sử dụng để làm chất nền cho sự phát triển để gia tăng mật độ tế bào [13]. Ngoài ra sự gia tăng nhiệt độ cũng làm tăng tốc độ phân hủy của chlorpyrifos [14,15]. Đã có nhiều báo cáo về vai trò của nhiệt độ đối với quá trình phân hủy của chlorpyrifos, như báo cáo của Yang và cs. (2005) cho biết dòng *Alcaligenes faecalis* phân hủy chlorpyrifos nhanh nhất ở nhiệt độ 30°C [16]. Liu và cs. (2012) chỉ ra rằng *Bacillus cereus* phân hủy chlorpyrifos nhanh nhất ở 30°C, và sự phân hủy chlorpyrifos bởi enzyme của vi khuẩn này sẽ bị hạn chế ở nhiệt độ  $< 5^{\circ}\text{C}$  [17]. Hay nghiên cứu của Yang và cs. (2006) cho rằng dòng vi khuẩn *Stenotrophomonas* có khả năng phân hủy chlorpyrifos trong khoảng

nhiệt độ 15 - 37°C nhưng tốc độ phân hủy chlorpyrifos nhanh nhất ở nhiệt độ 30°C [18]. Edwards (1964) kết luận rằng nhiệt độ tăng làm tăng tốc độ phân hủy thuốc trừ sâu [19]. Khi

nhiệt độ tăng lên, tốc độ phản ứng của các enzyme trong tế bào vi khuẩn cũng tăng lên làm cho các hoạt động trao đổi chất trong tế bào vi khuẩn diễn ra nhanh hơn [11].

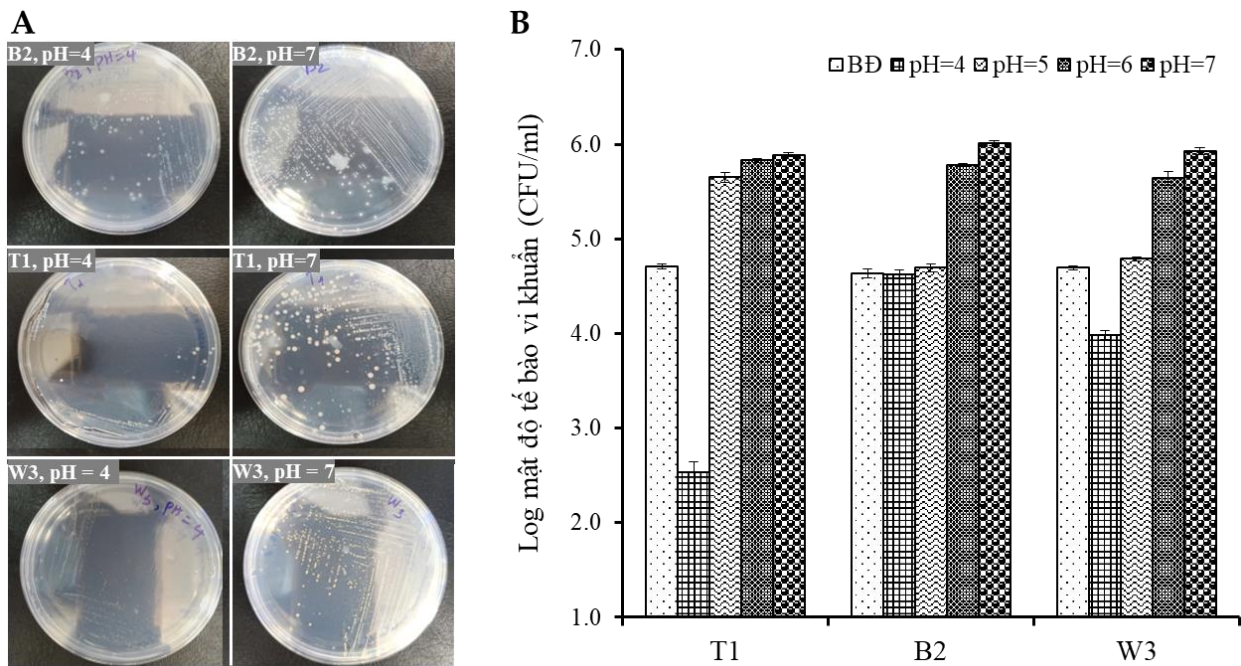


**Hình 2.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất phân hủy chlorpyrifos của các dòng vi khuẩn. % chlorpyrifos đã bị phân hủy: Hàm lượng chlorpyrifos đã mất đi sau 14 ngày nuôi cấy so với đối chứng (không thêm chủng vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy).

### 3.2. Ảnh hưởng pH đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn hiếu khí (B2, T1 và W3)

Khảo sát sự phát triển của 3 dòng vi khuẩn W3, T1 và B2 ở các điều kiện pH môi trường khác nhau (pH = 4, 5, 6 và 7) cho thấy cả 3 dòng đều sinh trưởng và phát triển mạnh ở pH từ 6 - 7, trong đó sự gia tăng mật độ cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) của 3 chủng là ở pH = 7 với giá trị trung bình lần lượt là T1 (5,88), B2 (6,01) và W3 (5,92) (giá trị Log (CFU/mL)) (Hình 3). Đối với giá trị pH = 4, mật độ tế bào của các dòng vi khuẩn không tăng hoặc tăng ít T1 (2,53), B2 (4,63) và W3 (3,99) (giá trị Log (CFU/mL)). Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy pH = 7 là pH môi trường tối ưu cho sự phát triển của 3 dòng vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu trùng hợp với các nghiên cứu của

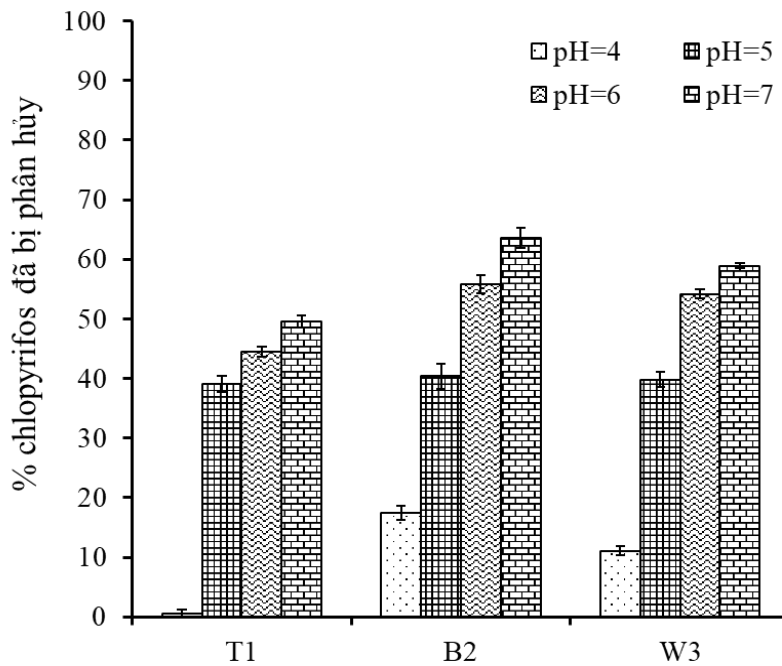
Cai và cs. (2011), Zhu và cs. (2011), Yu và cs. (2017), họ cũng chỉ ra rằng môi trường pH = 7 là điều kiện tối ưu cho quá trình sống và phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium* và *Sphingomonas pseudosanguinis* [8, 9, 10]. Nghiên cứu của Xin và cs. (2012) cũng chỉ ra rằng dòng vi khuẩn *Bacillus cereus* bị ức chế sự phát triển trong môi trường pH < 6 hoặc pH > 8 [20]. Các nghiên cứu trước đây của Singh và cs. (2006) cũng đã chứng minh rằng môi trường kiềm có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn phân hủy chlorpyrifos [6]. Theo Mohd và cs. (2019), sự phát triển của vi sinh vật được kiểm soát chủ yếu bởi pH [21]. Từ đó cho thấy pH là yếu tố môi trường rất quan trọng, nó ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp enzyme của vi khuẩn [11, 12].



**Hình 3.** Ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn. (A) Hình thái và sự phát triển của 3 dòng vi khuẩn ở pH = 4 và 7; (B) Sự gia tăng mật độ tế bào của 3 dòng vi khuẩn trong các điều kiện pH khác nhau. BD: Mật độ vi khuẩn ban đầu bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Hiệu suất phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn thể hiện tốt nhất trong môi trường pH = 7, tuy nhiên chúng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nuôi cấy trong điều kiện môi trường pH = 6. Cụ thể, trong môi trường MSM bổ sung 20 mg/L chlorpyrifos, sau 14 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH = 7, dòng T1 đã phân hủy được 49%, dòng B2 phân hủy được 63.6% và dòng W3 phân hủy được 58% hàm lượng chlorpyrifos có trong môi trường (Hình 4). Ngược lại tại điều kiện môi trường pH = 4 - 5, 3 dòng vi khuẩn thể hiện hiệu suất phân hủy chlorpyrifos thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với hiệu suất phân hủy trong điều kiện môi trường pH = 6 - 7. Kết quả nghiên cứu của đề tài tương tự với các kết quả nghiên cứu trước đó, như nghiên cứu của Greenhalgh và cs. (1980) đã phát hiện thấy tốc độ phân hủy của các loại thuốc trừ sâu nhóm lân hữu cơ thường cao nhất trong môi trường pH > 7,0 [22, 23]. Theo Lu và cs. (2013), pH tối ưu cho sự phân hủy

chlorpyrifos bởi dòng vi khuẩn *Cupriavidus* sp. DT-1 là ở giá trị pH = 7 [24]. Nghiên cứu của Yu và cs. (2017) đã báo cáo rằng tốc độ phân hủy chlorpyrifos của chủng *Sphingomonas* sp. HJY trong môi trường MSM cao nhất ở điều kiện môi trường pH = 6 - 7 và thấp nhất trong điều kiện pH = 4 [10]. Nghiên cứu của Cai và cs. (2011), nghiên cứu của Zhu và cs. (2019) cũng chỉ ra rằng pH = 7 là pH tối ưu cho quá trình phân hủy chlorpyrifos của 2 dòng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* và *Bacillus megaterium* [8, 9]. Theo báo cáo của Yu và cs. (2017), trong môi trường đất có pH cao hơn họ đã tìm thấy số lượng bản sao các gen phân giải chlorpyrifos nhiều hơn trong môi trường đất có pH thấp hơn [10]. Hơn nữa, môi trường kiềm thích hợp cho hoạt động của nhiều enzyme phân giải, dẫn đến tốc độ phân hủy diễn ra nhanh hơn, ở giá trị pH thấp (pH = 4 - 5), làm hạn chế hoặc ức chế quá trình hoạt động của các enzyme dẫn đến tốc độ phân hủy diễn ra chậm [25].

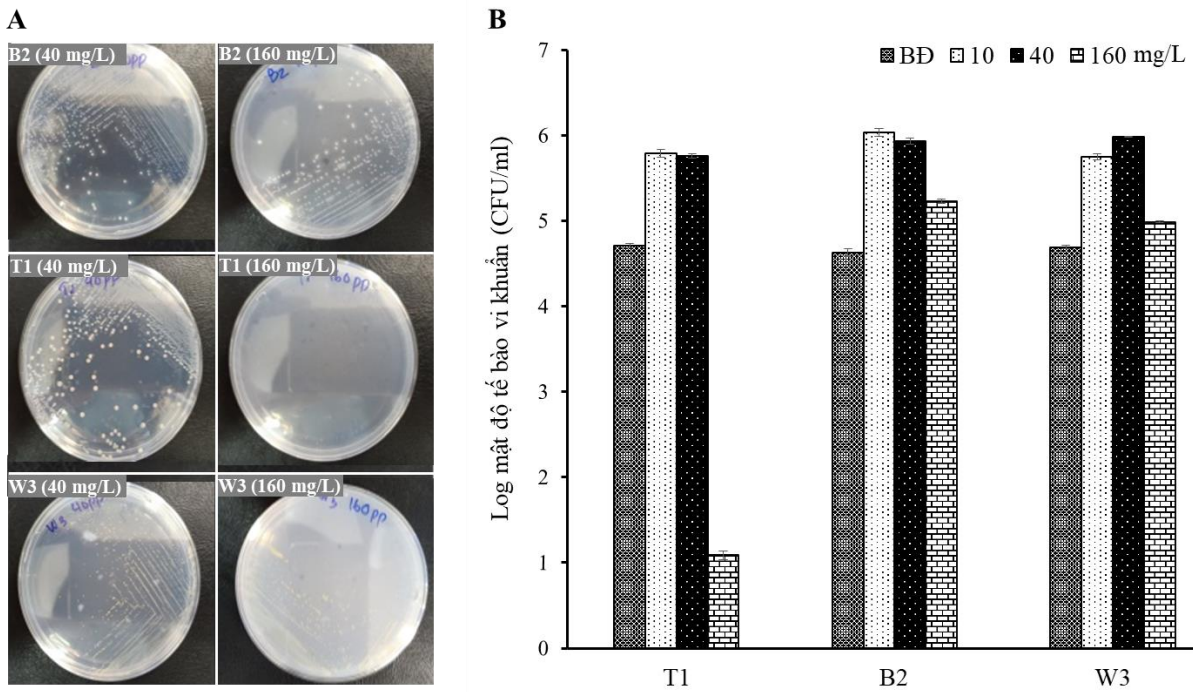


**Hình 4.** Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phân hủy chlorpyrifos của các dòng vi khuẩn. % chlorpyrifos đã bị phân hủy: Hàm lượng chlorpyrifos đã mất đi sau 14 ngày nuôi cấy so với đối chứng (không thêm chủng vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy).

### 3.3. Ảnh hưởng nồng độ chlorpyrifos đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn hiếu khí (B2, T1 và W3)

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 3 các dòng vi khuẩn (B2, T1 và W3) với mật độ ban đầu bổ sung vào là B2 (4,63), T1 (4,71) và W3 (4,69) (giá trị Log (CFU/mL)), thể hiện sự gia tăng mật độ tế bào tốt nhất trong môi trường muối khoáng tối thiểu (có bổ sung 10, 40 mg/L chlorpyrifos) sau 5 ngày nuôi cấy. Cụ thể là, ở nồng độ 10 mg/L: T1 (5,79), B2 (6,03) và W3 (5,75); ở nồng độ 40 mg/L: T1 (5,76), B2 (5,93) và W3 (5,99); ở nồng độ 160 mg/L: T1 (1,09), B2 (5,23) và W3 (4,99) (giá trị Log (CFU/mL)). Mật độ tế bào của 3 dòng vi khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường muối khoáng tối thiểu (có bổ sung 10, 40 mg/L chlorpyrifos) không thể hiện sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Với nồng độ chlorpyrifos 160 mg/L trong môi trường đã làm ức chế sự phát triển của dòng vi khuẩn T1, còn với 2 dòng vi khuẩn B2 và W3 chúng vẫn có

khả năng phát triển tốt (Hình 5). Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng nồng độ chlorpyrifos có ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy. Nghiên cứu của Singh và cs. (2009) báo cáo rằng số lượng *Pseudomonas sp.* tăng khi tăng nồng độ chlorpyrifos từ 10 mg/L đến 50 mg/L trong môi trường không có bất kỳ nguồn carbon nào khác [26]. Theo Fulekar và cs. (2008), dòng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phát triển tốt trong môi trường bổ sung 50 - 70 mg/L chlorpyrifos, nhưng khi nuôi cấy trong môi trường có nồng độ chlorpyrifos cao hơn sẽ làm ức chế sự phát triển của dòng vi khuẩn này [27]. Nguyên nhân có thể là do một trong những sản phẩm phụ được tạo ra trong quá trình phân hủy chlorpyrifos bởi hệ vi sinh vật hiếu khí là TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol). TCP là có tính chất kháng khuẩn, ngăn chặn sự gia tăng mật độ tế bào của vi sinh vật [28]. Khi nồng độ chlorpyrifos trong môi trường càng cao, thì nồng độ TCP tạo ra trong môi trường nuôi cấy càng nhiều, gây ức chế tế bào vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy [29, 30].

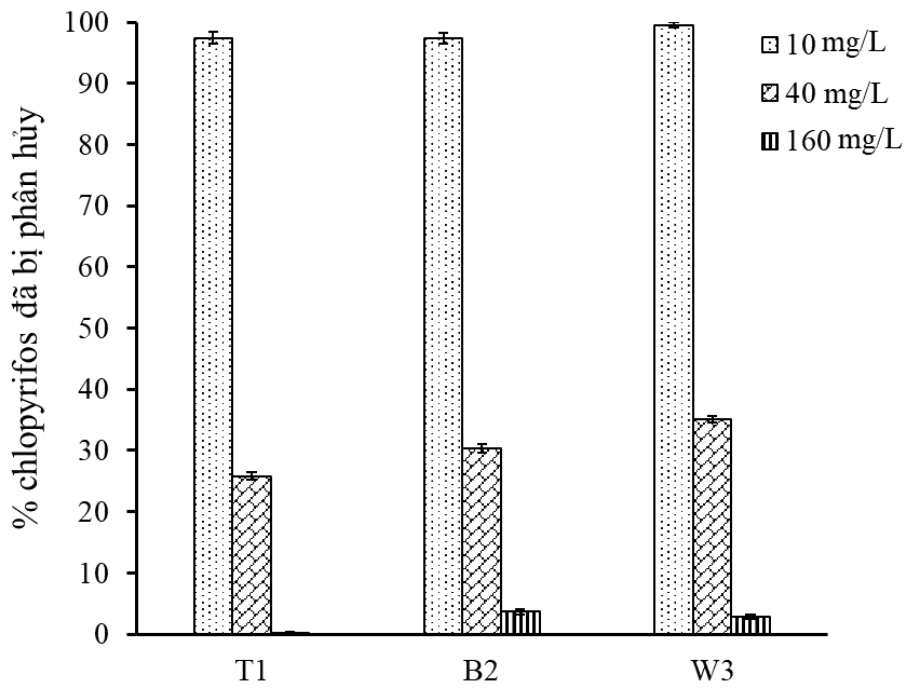


**Hình 5.** Ảnh hưởng của nồng độ chlorpyrifos đến sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn. (A) Hình thái và sự phát triển của 3 dòng vi khuẩn B2, T1 và W3 trong môi trường bổ sung 40 và 160 mg/L chlorpyrifos; (B) Sự gia tăng mật độ tế bào của 3 dòng vi khuẩn. BD: Mật độ vi khuẩn ban đầu bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

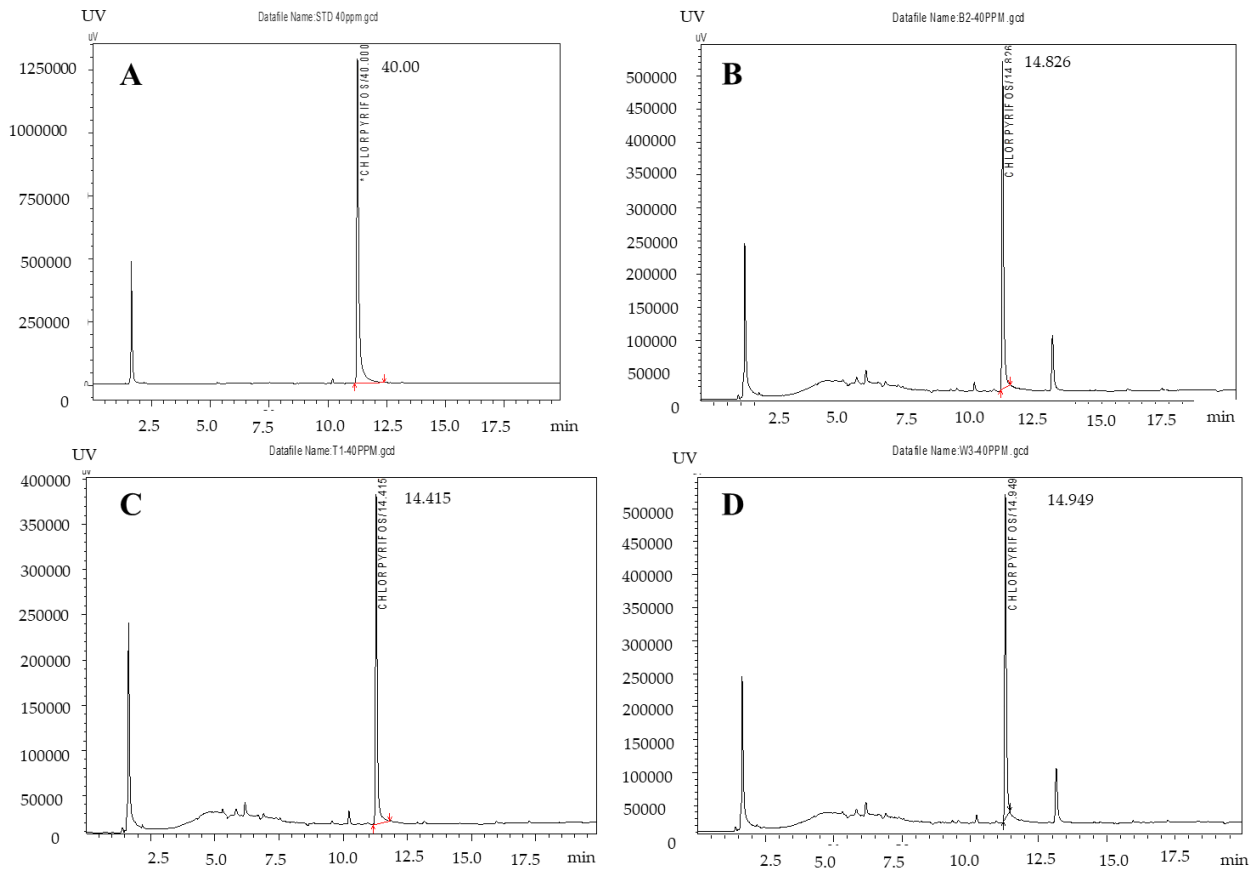
Hiệu suất phân hủy của 3 dòng vi khuẩn sau 14 ngày nuôi cấy trong môi trường bổ sung 10 mg/L chlorpyrifos, cả 3 chủng gần như phân hủy hoàn toàn lượng chlorpyrifos có trong môi trường nuôi cấy: T1 (97,4%), B2 (97,3%), W3 (99,6%); ở nồng độ 40 mg/L chlorpyrifos trong môi trường T1 phân hủy 25,8%, B2 phân hủy 30,4%, W3 phân hủy 35,1%; ở nồng độ 160 mg/L chlorpyrifos trong môi trường T1 phân hủy 0,2%, B2 phân hủy 3,7%, W3 phân hủy 2,8% (Hình 6, 7). Khác biệt về hiệu suất phân hủy chlorpyrifos của các dòng vi khuẩn trong điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau về nồng độ chlorpyrifos có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Từ kết quả trên cho thấy tốc độ phân hủy chlorpyrifos của vi khuẩn giảm dần khi tăng

nồng độ chlorpyrifos trong môi trường nuôi cấy (Hình 6). Kết quả nghiên cứu này cũng trùng hợp với nghiên cứu của Zhu và cs. (2019) [9]. Nghiên cứu của Liu và cs. (2012) chỉ ra rằng tốc độ phân hủy chlorpyrifos của dòng *Bacillus cereus* DH giảm dần khi tăng nồng độ chlorpyrifos từ 100 mg/L đến 150 mg/L trong môi trường nuôi cấy [17]. Nghiên cứu của Fogg và cs. (2003) cho thấy nếu nồng độ chlorothalonil trong đất  $< 57$  mg/kg sẽ bị suy giảm nhanh chóng bởi hoạt động của hệ vi sinh vật trong đất, tuy nhiên khi nồng độ chlorothalonil trong đất  $> 57$  mg/kg thì hoạt động của hệ vi sinh vật trong đất bị ức chế, dẫn đến tốc độ phân hủy diễn ra chậm [31].





**Hình 6.** Ảnh hưởng của nồng độ chlorpyrifos đến hiệu suất phân hủy chlorpyrifos của các dòng vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy. % chlorpyrifos đã bị phân hủy: Hàm lượng chlorpyrifos đã mất đi sau 14 ngày nuôi cấy so với đối chứng (không thêm chủng vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy).



**Hình 7.** Phổ sắc ký khí chlorpyrifos trong các điều kiện môi trường khác nhau. (A) MSM + 40 mg/L chlorpyrifos không có vi khuẩn; (B) MSM + 40 mg/L chlorpyrifos bổ sung thêm chủng B2; (C) MSM + 40 mg/L chlorpyrifos bổ sung thêm chủng T1; (D) MSM + 40 mg/L chlorpyrifos bổ sung thêm chủng W3.

#### 4. Kết luận

Khả năng sinh trưởng và tốc độ phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Sphingomonas pseudosanguinis* đạt giá trị cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường MSM ở nhiệt độ là 30°C, pH =7, nồng độ chlorpyrifos bổ sung vào trong môi trường từ 10 mg/L – 40 mg/L. Kết quả này cho thấy tiềm năng cao trong việc sử dụng các chủng vi khuẩn hiếu khí để loại bỏ tồn dư thuốc trừ sâu chlorpyrifos trong đất nông nghiệp. Các thí nghiệm tiếp theo sẽ khảo sát khả năng phân hủy chlorpyrifos của các loài vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Sphingomonas pseudosanguinis* ngoài đồng ruộng, đồng thời nghiên cứu các sản phẩm phân hủy chlorpyrifos, cũng như đánh giá tác động của các dòng vi khuẩn này đối với môi trường và con người. Từ đó, ứng dụng để nghiên cứu sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh giúp xử lý dư lượng chlorpyrifos tồn dư trong đất và kích thích sự phát triển của cây trồng.

#### Thông tin tài trợ

Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cơ sở Viện Nghiên cứu Hạt nhân, mã số CS/20/01-01.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Cuc V. Nâng cao ý thức của người dân trong thu gom, xử lý bao bì, vỏ thuốc bảo vệ thực vật ở Lâm Đồng. *Tạp chí môi trường*. 2018; 7.
- [2] Hung HT, Du NT, Hojer J. The first poison control center in Vietnam: Experiences of Its Initial Years. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2008; 39(2): 310-317.
- [3] Aponso ML. Exposure and risk assessment for farmers occupationally exposed to chlorpyrifos. *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture*. 2000; 4:33-44.
- [4] Rodriguez T, Younglove L, Lu C, Funez A, Weppner S, Dana BB, Richard AF. Biological monitoring of pesticide exposures among applicators and their children in Nicaragua. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 2006; 1(4):31-30.
- [5] Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Thavornnyuthikarn P, Montesano Ralph DW, Dana BB. Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai Province, Thailand. *Science of The Total Environment*. 2008; 407:655-668.
- [6] Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006; 30(3):428-471.
- [7] Das S, Adhya TK. Degradation of chlorpyrifos in tropical rice soils. *Journal of Environmental Management*. 2015; 152:36-42.
- [8] Cai T, Chen L, Xu J, Cai S. Degradation of bromoxynil octanoate by strain *Acinetobacter* sp. xb2 isolated from contaminated soil. *Current Microbiology*. 2011; 63:218-225.
- [9] Zhu J, Zhao Y, Ruan H. Comparative study on the biodegradation of chlorpyrifos-methyl by *Bacillus megaterium* CM-Z19 and *Pseudomonas aeruginosa* CM-Z6. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019; 91(3).
- [10] Yu X, Feng F, Li Y, Ge J, Chen J, Jiang W, He S, Liu X. Degradation of chlorpyrifos by an endophytic bacterium of the *Sphingomonas* genus (strain HJY) isolated from Chinese chives (*Allium tuberosum*). *Journal of Environmental Science and Health B*. 2017; 52(10):736-744.
- [11] Canh NX, Truong NX, Đào TD, Chi NTK, Trung NT. Xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng chuyển hóa urê của các chủng vi khuẩn phân lập từ chất thải chăn nuôi lợn. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. 2019.
- [12] Huyen NTT, Yen DT, Hien LT. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh khí hydro của chủng vi khuẩn *Clostridium* sp. Tr2 trong điều kiện lên men vi hiếu khí với nguồn cơ chất ri đường. *Tạp chí sinh học*. 2013; 35(3):66-72.
- [13] Mallick K, Bharati K, Banerji A, Shakil NA, Sethunathan N. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999; 62:48-54.
- [14] Liu X., You M, Wei Y, Liao J, Ye L, Chen J. Isolation of Chlorpyrifos degrading *Aspergillus* sp. Y and measurement of degradation efficiency. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*. 2003; 9:78-80.
- [15] Wang X, Chu XQ, Yu YL, Fang H, Chen J, Song FM. Characteristics and function of *Bacillus laterosporus* DSP in degrading chlorpyrifos. *Acta Pedologica Sinica*. 2006; 43:648-654.
- [16] Yang L, Zhao YH, Zhang BX, Yang CH, Zhang X. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1):67-73.

- [17] Liu ZY, Chen X, Shi Y, Su ZC. Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research*. 2012; 356:676–680.
- [18] Yang C, Liu N, Guo X, Qiao C. Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos degrading Bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiology Letters*. 2006; 265(1):118–125.
- [19] Edwards CA. *Soils and Fert*. 1964; 27:451-454.
- [20] Xin C , Zhiyuan L, Yi S, ZhenCheng S. Bacterial Degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research*. 2012; 356-360:676-680.
- [21] Mohd AD, Garima K, Juan FVC. Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review. *Journal of Environmental Management*. 2019; 239:124-136.
- [22] Greenhalgh R, Dhavan K L, Weinberger P. Hydrolysis of fenitrothion in model and natural aquatic system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980; 28:102-105.
- [23] Singh BK, Walker A, Morgan JA, Wright DJ. Effects of Soil pH on the Biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(9):5198–5206.
- [24] Lu P, Li Q, Liu H, Feng Z, Yan X, Hong Q, Li S. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresources. Technolgy*. 2013; 127:337–342.
- [25] Acosta-Martínez V, Tabatabai MA. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2000; 31:85–91.
- [26] Singh PB, Sharma S, Saini HS, Chadha BS. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Letters in Applied Microbiology*. 2009; 49(3):378–383.
- [27] Fulekar MH, Geetha M. Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique. *Journal of Applied Biosciences*. 2008; 12:657–660.
- [28] Racke KD, Laskowski DA, Schultz MR. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990; 38(6):1430–1436.
- [29] Cáceres T, He W, Naidu R, Megharaj M. Toxicity of Chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: the influence of microbial degradation in natural water. *Water Research*. 2007; 41(19):4497-4503.
- [30] Cink HJ, Coats JR. Effect of concentration, temperature, and soil moisture on the degradation of chlorpyrifos in an Urban Iowa soil. *Pesticides in Urban Environments*. 1993; 522.
- [31] Fogg P, Boxall ABA, Walker A. Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticides mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51:5344-5349