



PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ ĐỒNG VI KHUẨN BẢN ĐỊA PHÂN HỦY CHUYÊN BIỆT HOẠT CHẤT PROPOXUR TỪ NỀN ĐẤT BẢO QUẢN HÀNH TİM TẠI THỊ XÃ VĨNH CHÂU, TỈNH SÓC TRĂNG

Đỗ Hoàng Sang¹, Đỗ Thị Xuân¹, Dương Minh Viễn¹, Võ Thị Guơng¹ và Nguyễn Khởi Nghĩa¹
¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 17/06/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

Isolation and identification of specifically Propoxur degrading bacteria from soil samples in onion storage sites at the Vinh Chau town, Soc Trang Province

Từ khóa:

Propoxur, phân hủy, *Paracoccus* sp., vi khuẩn, Vĩnh Châu

Keywords:

Propoxur, degradation, *Paracoccus* sp., bacteria, Vinh Chau

ABSTRACT

Three soil samples from onion fields which had a history of intensive application of Propoxur at Vinh Chau, Soc Trang were collected for isolating bacteria being capable to degrade specifically Propoxur. Soil bacteria were enriched in mineral salt medium solution containing 30 ppm Propoxur as the only carbon source for bacterial growth. The whole procedure of isolation was established under the laboratory conditions on the shaker in dark with a total of 5 repeated generations. The results showed that two microbial communities coded as P1-2 and P2-3 degraded well Propoxur (90% of the initial Propoxur concentration was degraded after 10 experimental days). Seventy-eight bacterial strains were isolated in total from these 2 potentially applicable microbial communities. Two out of four selected strains which were coded as P23-7 and P23-26 degraded 100% initial Propoxur concentration in the liquid solution after 4 incubation days. According to the sequencing of gene 16S rRNA, these 2 Propoxur degrading bacterial strains were identified as a species specy of *Paracoccus* sp. P23-7 and *Paracoccus* sp. P23-26, respectively.

TÓM TẮT

Ba mẫu đất có lịch sử sử dụng hoạt chất Propoxur trong canh tác và bảo quản hành tím lâu năm tại khu vực trồng hành tím tại Vĩnh Châu, Sóc Trăng được thu thập để phân lập một số đồng vi khuẩn có khả năng phân hủy chuyên biệt Propoxur. Vi khuẩn được làm giàu mật số trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung 30 ppm Propoxur như là nguồn carbon duy nhất. Toàn bộ tiến trình phân lập được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm, trên máy lắc và trong tối với tổng số 5 lần cấy chuyển liên tục. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai hệ vi sinh vật ký hiệu P1-2 và P2-3 thể hiện khả năng phân hủy cao Propoxur (90% Propoxur sau 10 ngày nuôi cấy). Tổng cộng có 78 đồng vi khuẩn được phân lập từ hai hệ vi sinh vật này. Hai trong số bốn đồng vi khuẩn được chọn để đánh giá khả năng phân hủy Propoxur trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung 45 ppm trong 18 ngày ký hiệu P23-7 và P23-6 phân hủy 100% Propoxur sau 4 ngày thí nghiệm. Dựa vào trình tự gen 16S rRNA giải mã cho thấy hai đồng vi khuẩn này thuộc lớp Prokaryote, Bacteria, *Paracoccus* và được định danh lần lượt như loài *Paracoccus* sp. P23-7 và *Paracoccus* sp. P23-26.

1 GIỚI THIỆU

Thị xã Vĩnh Châu tỉnh Sóc Trăng được biết đến với nghề trồng hành tím và củ hành tím cung cấp không chỉ cho Đồng bằng sông Cửu Long mà còn cho cả nước. Sản lượng hàng năm khoảng 20.749 tấn năm 1994; đạt 83.603 tấn trong năm 2004 và khoảng 130.000 tấn vào năm 2012. Hiện nay, năng suất bình quân của củ hành tím là 14-15 tấn/ha. Diện tích trồng hành tím được qui hoạch giai đoạn 2016 – 2020 là 7.500 ha (Dương Vĩnh Hào, 2013). Trong quá trình canh tác và bảo quản hành giống người dân thường sử dụng nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật với liều cao để phòng trừ sâu bệnh trong đó có hoạt chất Propoxur (tên thương mại là Mipcin). Nông dân tại khu vực này thường bảo quản hành giống sau thu hoạch bằng cách trộn hỗn hợp bột Talc ($Mg_3(SiO_{10})(OH)_2$) và Mipcin hoặc Sherpa với liều lượng trung bình 60 kg Talc + 3-4 kg Mipcin hoặc 300-400 cc Sherpa để xử lý (Nguyễn Đức Thắng, 1999).

Hoạt chất Propoxur độc cho con người và động vật, hoà tan mạnh trong nước, khả năng hấp phụ trên keo đất là yếu và khả năng phân hủy của thuốc trong đất bởi vi sinh vật trong đất chậm (25 % trong vòng 100 ngày trong đất cát). Propoxur làm bất hoạt các enzyme acetylcholinesterase và làm tê liệt hệ thần kinh của côn trùng (Hayes, 1982; Berg, 1986). Các thí nghiệm nghiên cứu trên động vật cho thấy Propoxur gây giảm số lượng con và trọng lượng thai trên chó, một số có hiện tượng quái thai, gây ra khối u ở bàng quang và tử cung trên chuột khi nhiễm mãn tính ở liều cao (NCEA, 1999).

Trong đất, Propoxur có thể bị phân hủy bởi một số vi sinh vật như: *Arthrobacter* sp. (Nkedi-Kizza và ctv., 1992), *Pseudomonas* sp. (Karmanavalli và

Ninnerkar 2000), *Streptomyces* spp. (Rahmansyah và ctv., 2012). Mặc dù, việc ứng dụng công nghệ vi sinh trong xử lý độc chất ô nhiễm môi trường đặc biệt trong xử lý đất ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật được ứng dụng rộng rãi trên thế giới, nhưng ở Việt Nam vấn đề nghiên cứu này còn hạn chế. Ở ĐBSCL một số công trình nghiên cứu về lĩnh vực nghiên cứu này đã được công bố gồm: nghiên cứu về phân lập vi khuẩn phân hủy hoạt chất trừ cỏ 2,4-D (Nguyễn Thị Phi Oanh và ctv., 2011), hoạt chất thuốc trừ sâu Chlorpyrifos ethyl (Nguyễn Thị Lan Hương, 2012), hoạt chất thuốc trừ cỏ Pretilachlor (Nguyễn Thị Tố Quyên, 2013) và hoạt chất kích thích ra hoa cây ăn trái Paclobutrazol (Đặng Phạm Thu Thảo và ctv., 2014). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: Phân lập, tuyển chọn và định danh một số dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur từ nền đất bảo quản hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn vi khuẩn

Ba mẫu đất ký hiệu P1-2, P2-3 và VH-4 được thu thập từ nền đất canh tác và kho bảo quản hành tím tại Phường 1, Phường 2, xã Vĩnh Hải của thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng dùng để phân lập một số dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chuyên biệt Propoxur vì nông dân tại ba điểm lấy mẫu này sử dụng hoạt chất Propoxur mỗi năm để trồng và bảo quản hành tím. Mẫu đất được lấy với độ sâu 0-20 cm. Một số thông tin về 3 địa điểm thu mẫu đất được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Một số đặc điểm mô tả của 3 mẫu đất thí nghiệm

Mẫu đất	Nền đất	Địa điểm	Thời gian sử dụng Propoxur (năm)
P12	Bảo quản hành tím giống	Phường 1, Vĩnh Châu, Sóc Trăng	40
P23	Bảo quản hành tím giống	Phường 2, Vĩnh Châu, Sóc Trăng	Lâu năm
VH4	Canh tác hành tím	Vĩnh Hải, Vĩnh Châu, Sóc Trăng	30

2.2 Phân lập các dòng vi khuẩn bản địa có tiềm năng phân hủy hoạt chất Propoxur từ 3 mẫu đất thu thập

Một số vi sinh vật ban đầu trong các mẫu đất được xác định theo phương pháp hòa loãng của Ian và Charles (2004). Sau khi đã trải dịch vi khuẩn lên bề mặt, các đĩa môi trường nuôi cấy được đặt vào túi nylon và ủ ở nhiệt độ phòng. Số khuẩn lạc đếm được trên bề mặt đĩa sau 3 ngày ủ sẽ được quy đổi

theo hệ số pha loãng và thể tích để xác định mật số vi khuẩn ban đầu của các mẫu đất.

Cân 1 g đất (trọng lượng khô kiệt) cho vào bình tam giác tiệt trùng chứa 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung 30 ppm Propoxur. Thành phần của môi trường khoáng tối thiểu trong 1 L dung dịch như sau: 3,75 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 , 0,25 g NaCl, 0,1 g $MgSO_4.7H_2O$ và 0,01 g $CaCl_2.H_2O$. Môi trường được khử trùng ở 121°C, 20 phút trong

nồi hấp tiệt trùng sau đó bổ sung 10 mL dung dịch vi lượng. Thành phần vi lượng trong 1 L dung dịch như sau: 10 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 mg H_2BO_3 , 15 mg ZnCl_2 , 5 mg CuCl_2 , 10 mg FeCl_3 . Các mẫu nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 90 rpm (nhằm tạo khả năng trao đổi oxy tốt cho dung dịch) ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Đây được xem là thể hệ nuôi cấy đầu tiên. Sau 7-10 ngày nuôi cấy, hút 1 mL dung dịch nuôi cấy và lọc qua màng lọc tiệt trùng, sau đó, xác định nồng độ Propoxur trong mẫu trên hệ thống HPLC (Shimazu-LC20A) với các thông số như sau: sử dụng cột C18, tỉ lệ pha động acetonitrile : nước tương ứng là 45:55, bước sóng 214 nm, lưu lượng của pha động 1 ml/phút, thời gian xác định phổ Propoxur là phút thứ 7,5. Việc nuôi và chuyển sang thể hệ mới chỉ thực hiện khi nồng độ Propoxur trong mẫu giảm hơn 50%. Toàn bộ qui trình nuôi cấy được lặp lại trong 5 lần liên tục. Sau lần nuôi cấy thứ 5, 100 μL môi trường nuôi cấy vi khuẩn với các nồng độ pha loãng khác nhau được trải lên trên bề mặt môi trường agar TSB (gồm 30g Tryptone soya broth và 15g agar cho 1 L nước cất) để phân lập các dòng thuần và tiến hành khảo sát các đặc tính về hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào, Gram và đặc tính oxidase.

2.3 Đánh giá khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur của 2 hệ vi sinh vật ký hiệu P1-2 và P2-3 trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng

Trong quá trình phân lập ở mục 2.2 qua quan sát cho thấy hệ vi sinh vật ký hiệu VH-4 đã không thể hiện khả năng phân hủy tốt hoạt chất Propoxur nên hệ vi sinh vật này đã được loại ra và chỉ còn lại 2 hệ vi sinh vật ký hiệu: P1-2 và P2-3 được sử dụng cho việc phân lập các dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy Propoxur. Khả năng phân hủy Propoxur của 2 hệ này được đánh giá trước khi tiến hành phân lập dòng vi khuẩn trên đĩa agar. Thí nghiệm được thực hiện như sau: hút 1 mL dịch vi khuẩn ở thể hệ nuôi cấy thứ năm cho vào bình tam giác 100 mL có chứa 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 30 ppm Propoxur. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại cho mỗi hệ vi sinh vật và nghiệm thức đối chứng được tiến hành tương tự nhưng không chủng hệ vi sinh vật. Các mẫu được lắc trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, trong tối và trong 10 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi trong thời gian bố trí thí nghiệm bao gồm: 1) Nồng độ Propoxur vào các thời điểm: 0, 1, 5 và 10 ngày sau bố trí thí nghiệm;

2) Mật số vi khuẩn trong dung dịch môi trường nuôi cấy vào các thời điểm: 1, 5 và 10 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhỏ giọt trên môi trường TSB. Đĩa chứa vi khuẩn được đặt vào túi nylon và ủ trong tủ ủ với nhiệt độ 30°C trong ba ngày. Sau đó, đếm mật số khuẩn lạc hiện diện trên bề mặt đĩa và tính mật số vi khuẩn vào các thời điểm thu mẫu.

2.4 Đánh giá và so sánh khả năng phân hủy Propoxur của 4 dòng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng

Bốn trong tổng số 78 dòng vi khuẩn phân lập ký hiệu: P12-3; P23-7; P23-19 và P23-26 được tuyển chọn để tiến hành đánh giá khả năng phân hủy Propoxur của chúng. Bốn dòng vi khuẩn này được làm giàu mật số trong môi trường GYE (glucose yeast extract) trong 3 ngày trên máy lắc. Thành phần của môi trường GYM trong 1 L dung dịch bao gồm: 10 g glucose và 10 g yeast extract. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được thu hoạch. Hiệu chỉnh độ đục của dung dịch chứa vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng bằng máy đo quang phổ về OD 600 nm = 0,7. Hút 1mL dịch vi khuẩn đã hiệu chỉnh độ đục cho vào bình tam giác 100 mL chứa 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung 45 ppm Propoxur. Thí nghiệm được tiến hành với 4 lặp lại. Các mẫu được lắc trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, trong tối và trong 18 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi trong thời gian bố trí thí nghiệm bao gồm: nồng độ Propoxur và mật số dòng vi khuẩn vào các thời điểm: 0; 1; 4 và 18 ngày bố trí thí nghiệm (tham khảo mục 2.2 và 2.3 cho phương pháp xác định nồng độ Propoxur trong mẫu nuôi cấy và xác định mật số vi khuẩn).

2.5 Giải mã trình tự gen 16S rRNA và xác định ở mức độ loài của hai dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 và P23-26

DNA của 2 dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 và P23-26 thể hiện phân hủy cao hoạt chất Propoxur trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng (mục 2.4) được trích theo quy trình của Ihrmark và ctv., 2012. Sau đó, sản phẩm trích DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với với bộ mồi 27F-907R (Xuan và ctv., 2012) có trình tự như sau:

27F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
907R 5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3'

Hai đoạn mồi này nhắm vào đoạn gene 16S

rRNA của vi khuẩn. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn sơ khởi 94°C (3 phút), 25 chu kỳ: 92°C (30s)-50°C (45s)-72°C (30s), 72°C (7 phút); trừ sản phẩm ở 4°C (Xuan và *ctv.*, 2012). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% trước khi giải trình tự.

Các hóa chất để thực hiện phản ứng PCR bao gồm (thể tích/1 phản ứng): 4μL Dream taq buffer (5x); 0,4 μL mỗi xuôi 27F (10 μM); 0,4 μL mỗi ngược 907R (10 μM); 6 – 10 μL DNA tinh sạch; 2,5 μL mQ-H₂O, 0,4 μL dNTP (10mM); 2,2 μL MgCl₂ (25 mM); 0,1 μL Dream taq (5 U/μL). Kết quả giải trình tự được so sánh và dò tìm trên ngân hàng gene thế giới trên trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định mức độ loài của hai dòng vi khuẩn khảo sát.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

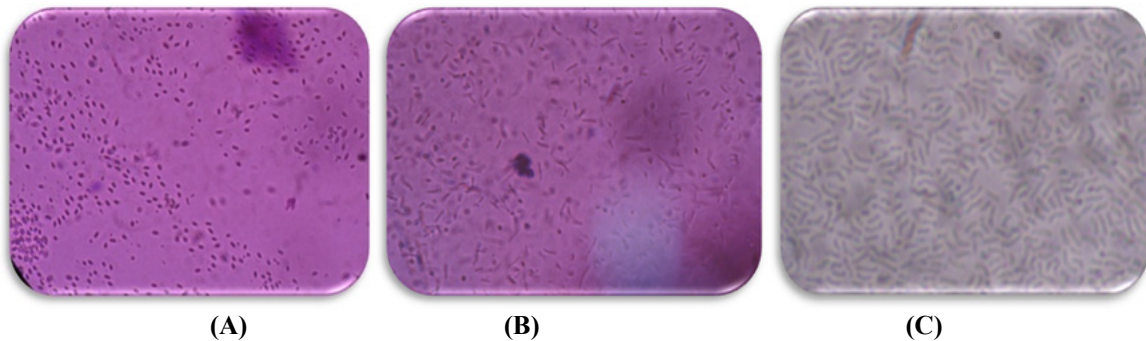
3.1 Phân lập các dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy Propoxur từ 2 hệ vi sinh vật thể hiện khả năng phân hủy tốt Propoxur

Kết quả mật số vi khuẩn ban đầu của 3 mẫu đất thí nghiệm được trình bày trong Bảng 2. Có sự khác nhau về mật số vi khuẩn ban đầu của 3 mẫu đất thu thập. Mật số vi khuẩn cao nhất ở mẫu đất P1-2, kế đến là P2-3 và thấp nhất ở mẫu VH-4.

Bảng 2: Mật số ban đầu của 3 mẫu đất thí nghiệm

Mẫu đất	CFU.g ⁻¹
P1-2	2,1x10 ⁶
P2-3	2,2x10 ⁵
VH-4	9,5x10 ⁴

Sau thời gian làm giàu mật số và phân lập vi khuẩn có tiềm năng phân hủy Propoxur trong môi trường lỏng và agar từ 2 hệ vi sinh vật ký hiệu P1-2 và P2-3, tổng cộng 78 dòng vi khuẩn đã được phân lập. Trong tổng số 78 dòng vi khuẩn được phân lập có 38 dòng từ hệ vi sinh vật ký hiệu P12 và 40 dòng từ hệ vi sinh vật ký hiệu P23. Từ 78 dòng vi khuẩn phân lập, được nhóm lại thành 15 nhóm dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc. Hình dạng tế bào của 15 dòng vi khuẩn đại diện cho 78 dòng phân lập được quan sát dưới kính hiển vi và kết quả ghi nhận có 3 dạng hình như sau: que ngắn, que dài và hình cầu (Hình 1). Nhóm 1: dạng tế bào hình que ngắn gồm có 8 dòng ký hiệu: P12-7, P12-17, P12-27, P12-37, P23-7, P23-20, P23-26 và P23-29 (8/15 dòng, chiếm 53%). Nhóm 2: dạng tế bào hình que dài gồm 2 dòng ký hiệu: P12-24b' và P23-18 (2/15 dòng, chiếm 13%) và Nhóm 3: dạng tế bào hình cầu gồm có 5 dòng ký hiệu: P12-3, P12-34, P23-25, P23-27 và P23-35 (5/15 dòng, chiếm 34%).



Hình 1: Ba hình dạng tế bào vi khuẩn điển hình được quan sát trên kính hiển vi (A): Hình cầu; (B): Hình que ngắn và (C): Hình que dài (quan sát ở E100)

Kết quả kiểm tra về gram vi khuẩn cho thấy như sau: 9 trên tổng số 15 dòng vi khuẩn được phân loại như là vi khuẩn gram dương (60%), còn lại 6/15 dòng vi khuẩn được phân loại như là gram âm (40%). Cuối cùng, kiểm tra khả năng oxidase của vi khuẩn để xác định vi khuẩn có enzyme cytochrome oxidase hay không. Vi khuẩn thể hiện phản ứng dương tính (positive) khi test oxidase có thể sử dụng oxi tham gia vào chuỗi dẫn truyền điện tử, sinh ATP trong quá trình hô hấp, kết quả kiểm tra khả năng oxidase của 15 dòng vi khuẩn đại diện cho thấy như sau: 8/15 dòng vi khuẩn thể hiện dương tính với phản ứng oxidase và còn lại 7/15

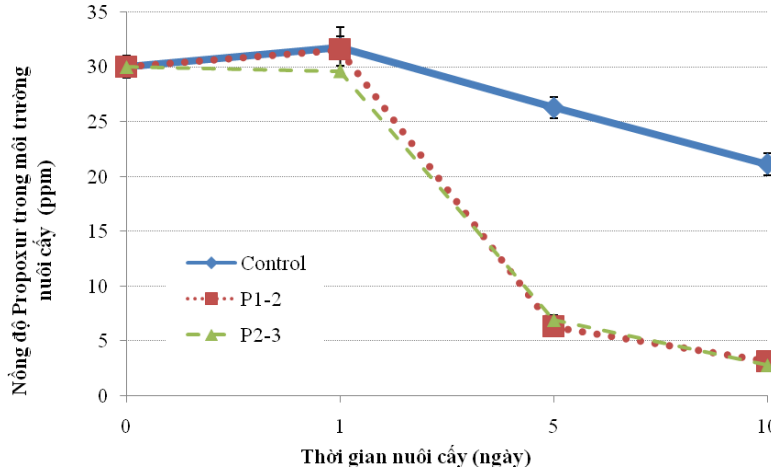
dòng vi khuẩn thể hiện âm tính với phản ứng oxidase.

3.2 Đánh giá khả năng phân hủy Propoxur trong dung dịch khoáng tối thiểu của 2 hệ vi sinh vật ký hiệu: P1-2 và P2-3

Kết quả về khả năng phân hủy Propoxur của 2 hệ vi sinh vật ký hiệu P1-2 và P2-3 trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng được trình bày trong Hình 2. Nhìn chung, nồng độ Propoxur ở các nghiệm thức, bao gồm cả nghiệm thức đối chứng giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Khả năng phân hủy Propoxur của cả 2 hệ vi sinh vật khác biệt

không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) tại các thời điểm thu mẫu. Tuy nhiên, nồng độ Propoxur trong cả 2 hệ vi sinh vật thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Nồng độ Propoxur giảm nhanh vào thời điểm 5 ngày sau khi nuôi cấy, từ 30 ppm xuống còn 7 ppm ở cả 2 hệ vi sinh vật. Sau 10 ngày nuôi cấy, nồng

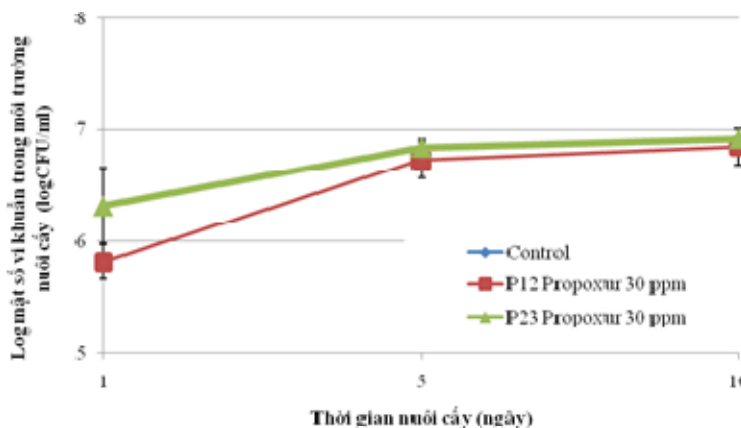
độ Propoxur ở cả 2 hệ vi sinh vật giảm xuống dưới 5 ppm. Sự giảm nồng độ Propoxur trong nghiệm thức đối chứng được giải thích là do Propoxur có thể bị thủy phân (1,5%/ngày) trong môi trường nước có pH trung tính (pH=7.0) (Hartley và Kidd, 1983).



Hình 2: Khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur của 2 hệ vi sinh vật ký hiệu: P1-2 và P2-3 trong dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 30 ppm Propoxur sau 10 ngày nuôi cấy (n=3 và sai số chuẩn)

Kết quả thể hiện sự phát triển mật số vi khuẩn theo thời gian nuôi cấy được trình bày trong Hình 3. Nhìn chung, mật số vi khuẩn có xu hướng tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Giai đoạn từ 1 đến 5 ngày mật số vi khuẩn tăng nhanh nhất, sau đó ổn định về sau. Không có sự khác biệt thống kê về mật số vi khuẩn giữa 2 hệ vi sinh vật ký hiệu P1-2 và P2-3 ở tất cả các thời điểm thu mẫu. Sự không khác biệt về mật số vi khuẩn giữa 2 hệ vi sinh vật vào các thời lấy mẫu là cơ sở phù hợp để giải thích cho hiện tượng không khác biệt về khả năng phân

hủy Propoxur của 2 hệ vi sinh vật vào các thời điểm thu mẫu. Giai đoạn 1-5 ngày sau khi bố trí thí nghiệm mật số vi khuẩn tăng lên rất mạnh, đồng thời, nồng độ Propoxur trong môi trường nuôi cấy cũng giảm một lượng rất đáng kể, điều này chứng tỏ, vi sinh vật đã sử dụng nguồn carbon từ Propoxur cho sinh trưởng và phát triển mật số. Ở nghiệm thức đối chứng không có bất cứ vi khuẩn nào tìm thấy trên đĩa agar, điều này cho thấy các thao tác về tiệt trùng trong quá trình bố trí thí nghiệm đã được bảo đảm và đáng tin cậy.

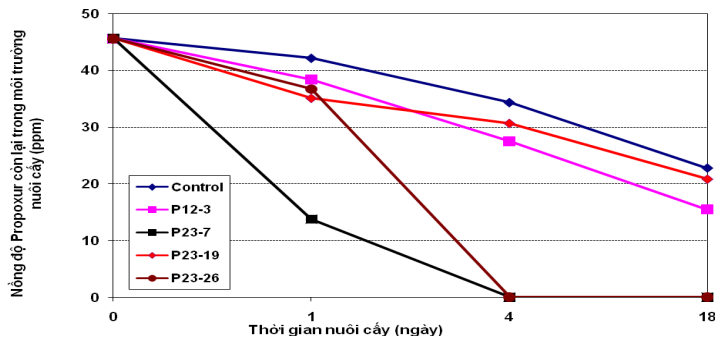


Hình 3: Sự phát triển mật số vi khuẩn trong dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 30 ppm Propoxur trong 10 ngày nuôi cấy (n=3 và sai số chuẩn)

3.3 Đánh giá khả năng phân hủy Propoxur trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng của 4 dòng vi khuẩn được tuyển chọn

Kết quả đánh giá khả năng phân hủy Propoxur trong môi trường lỏng sau 18 ngày thí nghiệm của 4 dòng vi khuẩn ký hiệu: P12-3, P23-7, P23-19 và P23-26 được trình bày ở Hình 4. Kết quả cho thấy trong 4 dòng vi khuẩn thử nghiệm thì chỉ có 2 dòng ký hiệu: P23-7 và P23-26 là thể hiện khả năng phân hủy rất tốt Propoxur trong dung dịch khoáng tối thiểu khi so sánh với nghiệm thức đối chứng,

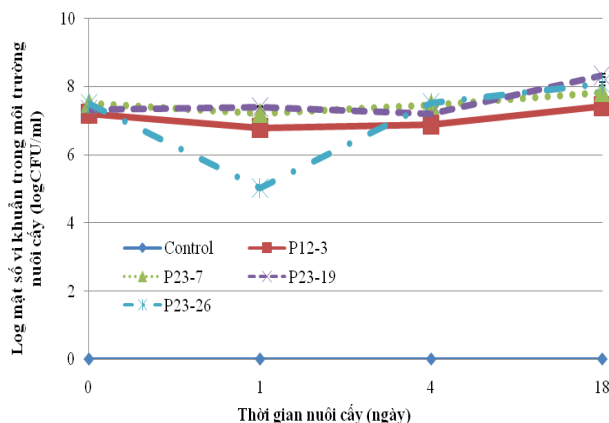
trong khi đó các dòng vi khuẩn còn lại khả năng phân hủy Propoxur kém hơn hai dòng này và phân hủy Propoxur không đáng kể so với nghiệm thức đối chứng. Dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 phân hủy được 30 ppm Propoxur trong môi trường lỏng sau 1 ngày thí nghiệm và sau 4 ngày nuôi cấy nồng độ Propoxur trong môi trường đã bị phân hủy hoàn toàn. Trong khi đó, dòng vi khuẩn ký hiệu P23-26 chỉ phân hủy 10 ppm Propoxur sau 1 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, vào ngày thứ 4 dòng vi khuẩn này đã phân hủy hoàn toàn Propoxur.



Hình 4: Khả năng phân hủy Propoxur của 4 dòng vi khuẩn tuyển chọn trong dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 45 ppm Propoxur sau 18 ngày nuôi cấy (n=4 và sai số chuẩn)

Kết quả về sự phát triển mật số của 4 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường nuôi cấy khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 45 ppm Propoxur trong 18 ngày được trình bày trong Hình 5. Kết quả cho thấy như sau: Mật số của tất cả các dòng vi khuẩn thử nghiệm đều có xu hướng tăng theo thời gian. Mật số vi khuẩn dòng P23-26 ở ngày thứ nhất thấp hơn so với dòng P23-7. Đồng thời, khả năng phân hủy thuốc Propoxur của dòng P23-26 cũng thấp hơn rất nhiều so với dòng P23-7 vào ngày 1. Tuy nhiên, ở ngày thứ 4, mật số vi khuẩn dòng

P23-26 tăng lên mạnh và không khác biệt thống kê so với mật số dòng P23-7. Bên cạnh đó, kết quả phân tích nồng độ Propoxur trong môi trường lỏng của 2 dòng vi khuẩn này đều bằng 0 ppm vào ngày thứ 4. Điều này rõ ràng cho thấy, sự gia tăng mật số của 2 dòng này là nguyên nhân dẫn đến sự giảm nồng độ thuốc Propoxur trong môi trường nuôi cấy và 2 dòng vi khuẩn này đã sử dụng Propoxur như là nguồn carbon cho việc tăng mật số, sinh trưởng và phát triển.



Hình 5: Sự phát triển mật số của 4 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 45 ppm Propoxur sau 18 ngày nuôi cấy (n=4 và sai số chuẩn)

Tóm lại, kết quả thí nghiệm cho thấy 2 dòng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này ký hiệu P23-7 và P23-26 thể hiện khả năng phân hủy chuyên biệt Propoxur trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng và cả 2 dòng này có tiềm năng ứng dụng cao trong việc xử lý đất bị ô nhiễm với Propoxur và nên được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.4 Giải mã trình tự gen 16S rRNA và xác định ở mức độ loài của hai dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 và P23-26

Hai dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 và P23-26 29 được giải mã trình tự và so sánh trình tự đoạn gene

16S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gene thế giới. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của vi khuẩn P23-7 và P23-26 lần lượt tương đồng với đoạn gene 16S rRNA của loài *Paracoccus* sp. dòng Y3B-1 (số đăng kí: HM018693.1) và *Paracoccus* sp. SMIC-4 (số đăng kí: FJ877155.1) với độ tương đồng lần lượt là 100% và 99%. Như vậy, 2 dòng vi khuẩn ký hiệu: P23-7 và P23-26 được sắp xếp theo bậc phân loại như sau: Prokaryote, Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, *Paracoccus*, *Paracoccus* sp. (Bảng 3).

Bảng 3: Định danh các dòng vi khuẩn thể hiện sự phân hủy Propoxur theo độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA

STT	Dòng	Nguồn gốc	Độ tương đồng (%)	Các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu		Định danh
				Vi khuẩn	Số đăng kí	
1	P23-7	Phường 2, Vĩnh Châu, Sóc Trăng	100%	<i>Paracoccus</i> sp. Y3B-1	HM018693.1	<i>Paracoccus</i> sp. P23-7
2	P23-26	Phường 2, Vĩnh Châu, Sóc Trăng	99%	<i>Paracoccus</i> sp. SMIC-4	FJ877155.1	<i>Paracoccus</i> sp. P23-26

4 KẾT LUẬN

Hai mẫu đất ký hiệu: P1-2 và P2-3 thu thập từ nền đất trong kho bảo quản hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng có chứa nguồn vi khuẩn có khả năng phân hủy rất cao và chuyên biệt Propoxur. Hai dòng vi khuẩn ký hiệu P23-7 và P23-26 thể hiện khả năng phân hủy rất hữu hiệu Propoxur trong dung dịch khoáng tối thiểu và được xem như là 2 dòng có tiềm năng ứng dụng cao nhất trong việc xử lý đất ô nhiễm với hoạt chất Propoxur và cả 2 được định danh lần lượt như là loài *Paracoccus* sp. P23-7 và *Paracoccus* sp. P23-26.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Berg, G. L., 1986. Farm Chemicals Handbook. Willoughby, Ohio: Meister Publishing Co.
2. Dương Vĩnh Hào., 2013. Trồng và tiêu thụ củ hành tím Vĩnh Châu. (http://www.soctrang.gov.vn/wps/wcm/connect/ed00168040ca0aa0bc7cfd66b90c36b8/03-2013_Bai...7)
3. Đặng Phạm Thu Thảo, Đỗ Thị Xuân, Dương Minh Viễn và Nguyễn Khởi Nghĩa, 2014. Phân lập và định danh các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy thuốc kích thích ra hoa Paclotbutrazol từ đất vườn trồng cây ăn

trái ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí khoa học Trường đại học Cần Thơ, phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường: 32 (2014): 80-86.

4. Hayes, W. J. 1982. *Pesticides studied in man*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
5. Hartley, D; Kidd, H., 1983. The Agrochemicals Handbook. Nottingham, England: Royal Society of Chemistry.
6. Ian, L.P; Charles, P.G., 2004. Environmental microbiology. Elsevier Academic Press.
7. Ihrmark, K; Inga, T.M; Bödeker, K.C.M; Hanna, F; Ariana, K; Jessica, S; Ylva, S; Jan S; Mikael, B.D; Karina, E.C; Björn, D.L, 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. Article first published online: 27 JUL 2012.DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
8. Kamanavalli, C.V., and Ninnekar, H.Z., 2000. Biodegradation of Propoxur by *Pseudomonas* sp. C.M. Department of biochemistry, Karnatak University Dharwad, India.
9. Nkedi-Kizza, P; Ou, L.T ; Cisar, J.L ; Snyder, G.H., 1992. Microbial degradation

- of Propoxur in turfgrass soil. J. Environ. Sci. Health B. Soil Science Department, University of Florida.
10. Nguyễn Thị Lan Hương., 2012. Khảo sát lưu tồn và phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl trên mô hình canh tác màu. Luận văn Thạc Sĩ chuyên ngành Sinh thái học. Trường Đại học Cần Thơ.
 11. Nguyễn Thị Phi Oanh., 2011. Vi khuẩn phân hủy 2,4-D trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng. Tạp chí khoa học 2011:18a 65-70. Trường Đại học Cần Thơ.
 12. Nguyễn Thị Tố Quyên., 2013. Khảo sát lưu tồn và phân hủy sinh học Pretilachlor trên một số ruộng chuyên canh lúa tại đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học. Trường đại học Cần Thơ.
 13. Nguyễn Đức Thắng., 1999. Điều tra hiện trạng canh tác, cách tồn trữ và bước đầu thử nghiệm hiệu quả một số nông dược trong việc bảo quản hành tím (*Allium cepa* group *aggregatum*) tại Sóc Trăng. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Nông học. Trường Đại học Cần Thơ.
 14. Rahmansyah, M; Dwi, A; Heddy, J; Tirta, K.D., 2012. Growth and adaptation of four *Streptomyces* isolates in the media containing Propoxur. Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences Cibinong Science Center, Jalan Raya Jakarta Bogor, Cibinong, Indonesia.
 15. U.S. Environmental Protection Agency (NCEA)., 1999. Integrated Risk Information System (IRIS) on Baygon. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
 16. Xuan, D.T; Guong, V.T; Rosling, A; Alström, S; Chai, B; Högberg, N., 2012. Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. Biology and Fertility of Soils. 48 (2): 217- 225.