

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LÀM GIẢM DƯ LƯỢNG SHERPA, REGENT VÀ PEGASUS CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN TUYỂN CHỌN

NGUYỄN THỊ KIM CÚC, LÊ THỊ HỒNG MINH, PHẠM VIỆT CƯỜNG

1. MỞ ĐẦU

Hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) là tên gọi chung cho các chất diệt sâu bọ (pesticides), diệt côn trùng (insecticides), diệt nấm (fungicides) và diệt cỏ (herbicides). Phần lớn hoá chất BVTV thuộc nhóm hữu cơ khó phân huỷ. HCBVTV đã được sử dụng ở Việt Nam từ những năm 40 với số lượng ngày càng tăng.

Theo các báo cáo gần đây nhất cũng như các kết quả điều tra của Viện BVTV thì việc lạm dụng và sử dụng các thuốc BVTV có độ độc cao, thậm chí các loại thuốc hạn chế và thuốc cấm vẫn đang diễn ra. Trên rau họ thập tự, phát hiện 17 hoạt chất trừ sâu trong đó có 6 thuốc thuộc nhóm lân hữu cơ, 1 thuốc Cacbamate, 5 thuốc Pyrethroid, 2 thuốc điều hoà sinh trưởng, 1 hỗn hợp và 2 thuốc thuộc các nhóm khác. Hai trong số 17 thuốc thuộc **nhóm độc I**, 10 thuốc thuộc **nhóm II**, 1 thuốc **nhóm III** và 4 thuốc **nhóm IV**. Các thuốc này được sử dụng phổ biến nhất là, *Methamidophos* (80,4%), sau đó đến *Cypermethrin* (39,5%); CIDI-M (34,8%); *Cartap* (30,8%); *Triclorfol* (28,3%) và *Methylparathion* (25,4%).

Tại Hội nghị toàn quốc về công tác bảo đảm vệ sinh an toàn thực phẩm được tổ chức ngày 10/01/2007, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn thừa nhận mức độ tồn dư HCBVTV ở rau và quả là khá nghiêm trọng và đáng lo ngại. Rau cải đứng đầu với tỉ lệ mẫu có dư lượng TBVTV cao nhất năm 2004 là 63,9%. Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu có dư lượng thuốc vượt mức cho phép lại đứng sau đậu đỗ (4,2 - 10,18% so với 10 - 27,5%). Có đến 70% số mẫu rau ăn lá được tìm thấy có dư lượng Pyrethroid, số còn lại dành cho Fipronil, Dithiocarbamate, một số loại lân hữu cơ và Carbendazim [Báo KH & ĐS, 5 (1931), 18/1/2007].

Trong thiên nhiên, vi sinh vật đất được coi như một nhân tố tích cực tham gia vào chu trình vận chuyển của các nguyên tố hoá học và làm cân bằng trạng thái tự nhiên của môi trường. Rất nhiều chi vi sinh vật đã được phân lập và chứng minh có khả năng phân huỷ các hoá chất độc hại do con người thải vào môi trường như vi khuẩn thuộc chi *Flavobacterium* (Sethunathan & Yoshida 1973), *Pseudomonas* (Serdar et al. 1982), *Agrobacterium*, *Bacillus* (Horne et al. 2002). Việc khử độc HCBVTV bằng enzyme vi sinh vật trở thành tâm điểm của rất nhiều nghiên cứu, vì sự hiệu quả và kinh tế của phương pháp này.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng làm giảm dư lượng Pegasus, Sherpa hoặc Regent sử dụng trong Nông nghiệp.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất có sử dụng Pegasus, Sherpa hoặc Regent để phòng trừ bệnh hại cây

Môi trường phân lập (g/l): $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,33ml từ dung dịch pha sẵn (stock) 1%; KH_2PO_4 – 4,8; K_2HPO_4 – 1,2; $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ -1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,4 ml từ stock 10%; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ – 10 ml từ stock 10%; pH trung tính. Nguồn năng lượng và cacbon là HCBVTV với nồng độ gấp 2,5 -5 lần so với nồng độ thường được sử dụng (2,5 mg/ml cho Regent và Pegasus và 1,3 mg/ml cho Sherpa).

2.2. Phương pháp

Các chủng vi khuẩn được phân lập theo phương pháp làm giàu: mẫu đất (0,5 g) được đưa vào môi trường tối thiểu (MM) có bổ sung HCBVTV và nuôi lắc trong 48 giờ ở 30°C. Cây chuyển 1 ml dịch nuôi cấy sang môi trường mới và tiếp tục nuôi tiếp trong 2 ngày. Pha loãng dịch nuôi cấy và cấy trải trên môi trường đặc (MM+HCBVTV). Chọn các khuẩn lạc phát triển tốt trên môi trường này sau 24 giờ nuôi cấy ở 30°C.

- Phương pháp xác định tồn dư HCBVTV: LC/DAD-FL (cho Pegasus) và GC/EDC (cho Sherpa và Regent) được thực hiện tại Nhóm Phân tích, Bộ môn Thuốc, viện Bảo vệ Thực vật.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên MM với các loại HCBVTV khác nhau

Các chủng vi khuẩn sau khi được làm giàu và tuyển chọn riêng rẽ trên môi trường tối thiểu có bổ sung Pegasus, Sherpa và Regent được kiểm tra khả năng sinh trưởng đồng thời trên môi trường MM với các loại HCBVTV khác nhau. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn sau 24 giờ nuôi cấy được trình bày trên bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sử dụng Pegasus, Sherpa và Regent của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Số TT	Tên chủng	Regent	Pegasus	Sherpa	Số TT	Tên chủng	Regent	Pegasus	Sherpa
1	P1	++	++	++	13	R10	++	++	+
2	P2	++	++	++	14	R11	++	++	++
3	P	++	++	++	15	S1	++	++	++
4	R1	++	++	++	16	S2	+	+	++
5	R2	++	++	+	17	S3	+	++	++
6	R3	++	++	++	18	S4	++	+	++
7	R4	++	++	++	19	S5	++	+	++
8	R5	++	++	+	20	S6	+	++	++
9	R6	++	++	++	21	S9	+	++	++
10	R7	++	++	+	22	S10	++	+	++
11	R8	++	++	++	23	S12	+	++	++
12	R9	++	++	++	24	S16	++	++	++

Ghi chú: ++: sinh trưởng tốt; +: sinh trưởng trung bình.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy các chủng tuyển chọn mặc dù được phân lập trên các nguồn cacbon khác nhau đều có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường tối thiểu có bổ sung các loại thuốc BVTV khác nhau. Ví dụ: các chủng được phân lập trên môi trường bổ sung Pegasus (kí hiệu P), sinh trưởng tốt trên môi trường tối thiểu bổ sung Regent và Sherpa. Ngược lại, các chủng phân lập trên môi trường với nguồn cacbon là Regent (kí hiệu R) và Sherpa (kí hiệu S) cũng có thể sinh trưởng tốt trên môi trường có Pegasus và Sherpa.

Đã kiểm tra ảnh hưởng của agar lên sự sinh trưởng của các chủng tuyển chọn bằng cách đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng nghiên cứu trong môi trường lòng với nguồn cacbon là HCBVTV. Kết quả nhận được cho thấy, trong môi trường lòng, một số chủng sinh trưởng kém hơn so với khi cấy trên môi trường đặc (kết quả không công bố).

Bốn chủng S1, S16, P1 và R1 sinh trưởng tốt cả trên môi trường đặc và môi trường lòng có bổ sung một trong 3 loại HCBVTV trên đã được chọn để đánh giá hoạt tính làm giảm dư lượng Pegasus, Sherpa và Regent.

3.2. Đánh giá hoạt tính giảm dư lượng HCBVTV của một số chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường tối thiểu bổ sung HCBVTV. Nồng độ thuốc BVTV bổ sung vào môi trường được tăng lên gấp 4 lần so với nồng độ thường được sử dụng ngoài đồng ruộng, cụ thể Pegasus 3 mg/ml; Regent 0,5 mg/ml và Sherpa 1.24 mg/ml. Bằng phương pháp phân tích LC/DAD-FL hoặc GC/ECD, đã xác định dư lượng thuốc còn lại trong môi trường sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả được trình bày trên bảng 2.

Bảng 2. Khả năng làm giảm dư lượng thuốc BVTV trong môi trường nuôi cấy của một số chủng vi khuẩn tuyển chọn

STT	Tên chủng	Tên dư lượng	Kết quả (mg/l)	Phương pháp	% giảm so với ĐC
1	S16	Diafenthiuron (Pegasus)	846,21	LC/DAD-FL	11,88
			679,17		29,27
			623,49		35,07
			882,58		8,09
			960,27		
			ĐC		
2	S16	Cypermethrin (Sherpa)	80,13	GC/ECD	75,50
			146,82		55,10
			133,60		59,14
			54,31		83,39
			327,00		
			ĐC		
3	S16	Fipronil (Regent)	21,82	GC/ECD	76,76
			37,70		59,84
			64,03		31,80
			28,45		69,70
			93,88		
			ĐC		

Bảng 2 cho thấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu đã làm giảm lượng Pegasus, Regent và Sherpa trong môi trường sau 3 ngày nuôi cấy từ 8,09% đến 83,39%. Đặc biệt, hai chủng S16 và R1 có hoạt tính cao đối với Regent và Sherpa. Chủng S16 làm giảm 76,76% Regent và 75,5% Sherpa so với đối chứng; trong môi trường nuôi cấy có chủng R1, sau 3 ngày lượng Regent và Sherpa giảm so với đối chứng là 69,7% và 83,39% tương ứng. Như vậy, mặc dù sự sinh trưởng của các chủng tuyển chọn trên môi trường đặc có bổ sung HCBVTV tương đương, nhưng hoạt tính sinh học của chúng có sự khác biệt rõ rệt.

Bốn chủng vi khuẩn tuyển chọn mặc dù sinh trưởng tốt trong môi trường có Pegasus, nhưng chúng chỉ làm giảm Pegasus được từ 8,09% đến 35,07% so với đối chứng sau 3 ngày nuôi cấy. Vì vậy, một số chủng vi khuẩn trong bộ sưu tập giống của phòng Vi sinh phân tử có khả năng phân hủy 2,4- dichlorophenoxyacetic acid đã được sử dụng để xác định khả năng loại độc Pegasus.

3.4. Hoạt tính làm giảm nồng độ Pegasus của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Ba chủng vi khuẩn K5, NT64 và LT33 đã được chọn để xác định khả năng loại Pegasus. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường tối thiểu có bổ sung Pegasus nồng độ 3 mg/ml. Sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C, dư lượng Pegasus trong môi trường được xác định bằng phương pháp LC/DAD-FL. Kết quả được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính của 3 chủng vi khuẩn nghiên cứu

Tên chủng	Hàm lượng (mg/l)	% giảm so với ĐC	Khả năng sinh trưởng		
			Pegasus	Regent	Sherpa
K5	362.10	62,03	++	++	-
NT64	301.52	68,38	++	+	-
LT33	397.48	58,32	++	++	-
ĐC	953,62				

Kết quả nhận được cho thấy 3 chủng vi khuẩn nghiên cứu có thể sử dụng để loại bỏ dư lượng Pegasus trong thực tế.

Đã có nhiều nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới thông báo về việc phân lập và sử dụng vi sinh vật để loại độc HCBVTV. Smeijkal C. W. và cs (2001) đã phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân hủy hợp chất clo hữu cơ bằng môi trường đặc hiệu (Loos). Các tác giả nhận thấy một số chủng vi khuẩn phân hủy 2,4-D cũng có khả năng phân hủy một số hợp chất khác như MCPA, (R/S)-mecoprop, (R)-mecoprop (R/S)-2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4-DB và MCPB. N. T. K. Cúc và cs (2000) phân lập các chủng vi khuẩn phân hủy Methyl parathion trên môi trường tối thiểu với nguồn cacbon là Methyl parathion, các chủng này cũng có khả năng sinh trưởng trên môi trường tối thiểu với nguồn cacbon là các chất trừ sâu khác như Lindan và Kitazin. Bên cạnh đó, một số chủng vi khuẩn phân hủy thuốc trừ cỏ phenoxyalkanoic acid lại có cơ chất hạn chế. Được biết số lượng và vị trí thay thế của clo ảnh hưởng đến khả năng phân hủy của rất nhiều vi khuẩn. Ngoài ra, số lượng và vị trí halogen hóa cũng có ảnh hưởng đến điểm hoạt tính của permease enzymes cần thiết để hấp thu các hợp chất này (Alexander and Aleem 1961; Alexander 1999). Đã có những báo cáo cho thấy tính đặc hiệu cơ chất của những vi khuẩn

này đối với các loại thuốc trừ cỏ phenoxyalkanoic acid không bị khống chế bởi bước phân hủy enzym đầu tiên, vì vậy, có khả năng bản chất và vị trí của các gốc thay thế xác định sự hấp thu hợp chất vào trong tế bào (Smejkal et al, 2001). Những nghiên cứu của Leveau và cs. (1998) cho thấy protein phụ trợ chính (MFS-major facilitator protein) tham gia vào sự hấp thu đặc hiệu của 2,4-D của chủng *Ralstonia eutropha* JMP134. Những vi khuẩn khác cũng có thể có protein vận chuyển cơ chất đặc hiệu.

Aso Yuji và cs (2006) đã thiết kế chủng *Sphingomonas wittchii* RW1 tái tổ hợp, làm tăng khả năng phân hủy dibenzofuran của chủng gốc. Chủng tái tổ hợp được tiếp nhận plasmid pBE11 mang các gen *aly*, *ccpA*, *algS*, *algM1*, *algM2*, *algQ1*, *algQ2* và *al-IV*, và được nuôi trong hệ 2 pha lỏng, 4 ngày trong môi trường W có bổ sung dibenzofuran nồng độ 10 mM. Lượng dibenzofuran được thêm vào đã hoàn toàn biến mất. Chủng RW1 cũng được nuôi trong môi trường có dibenzofuran với nồng độ 100 mM và lượng dibenzofuran này cũng mất hoàn toàn sau 7 ngày nuôi cấy. Trong khi đó chủng RW1 đại phát triển kém hơn và loại dibenzofuran chậm hơn so với chủng tái tổ hợp. Chủng RW1(pBE11) đã được sử dụng để loại bỏ dibenzofuran trong môi trường một cách hiệu quả.

Harcourt RL và cs (2002) đã phát triển phương pháp đơn giản để phân lập vi khuẩn phân hủy coumaphos. Ruifu Zhang và cs (2005, 2006) đã nghiên cứu cụm gen mã hóa cho protein phân hủy thuốc trừ sâu nguồn gốc photpho hữu cơ và chỉ ra rằng chúng cấu thành transposon di hóa và góp phần phân tán gen giữa các vi khuẩn bản địa trong vùng bị ô nhiễm.

Có thể thấy rằng, việc sử dụng vi sinh vật để xử lý dư lượng thuốc BVTV là một phương pháp khả thi, hiệu quả và kinh tế. Phương pháp này không những làm giảm dư lượng HCBVTV trên rau quả, mà còn không gây ô nhiễm môi trường.

Với những kết quả nhận được ở trên có thể thấy các chủng P và S16 có phổ cơ chất rộng hơn so với các chủng S1, P1. Các chủng tuyển chọn đều có khả năng sử dụng để tạo chế phẩm xử lý dư lượng HCBVTV ngoài đồng ruộng.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất có tiền sử sử dụng thuốc BVTV đã phân lập và tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn (S16, S1, P1 và R1) có khả năng làm giảm Regent và Sherpa từ hơn 30% đến hơn 80%; 3 chủng khác (K5, LT33 và NT64) làm giảm Pegasus từ 58,3% đến 68,3% trong môi trường so với đối chứng sau 3 ngày nuôi cấy. Như vậy các chủng vi khuẩn tuyển chọn hoàn toàn có tiềm năng sử dụng trong xử lý dư lượng Regent, Sherpa và Pegasus ngoài thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alexander M. - Biodegradation and Bioremediation, 2nd edition, Academic Press, NY, USA, 1999.
2. Alexander M. and Aleem M. I. H. - Effect of chemical structure on microbial decomposition of aromatic herbicides, *Agricultural and Food Chemistry* 9 (1961) 44±47.
3. Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Tuyết Mai - Một số tính chất của vi khuẩn phân hủy Methyl Parathion phân lập từ các mẫu đất tại Hà Nội, Báo cáo Khoa học hội nghị Sinh học Quốc gia : " Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 8/2000, 29-34.

4. Yuji Aso, Yukiko Miyamoto, Karen Mine Harada, Keiko Momma, Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami & Kousaku Murata - Engineered membrane superchannel improves bioremediation potential of dioxin- degrading bacteria, *Nature Biotechnology* **24** (2) (2006) 188-189.
5. Harcourt R. L., I. Horne, T. D. Sutherland, B. D. Hammock¹, R. J. Russell and J. G. Oakeshott - Development of a simple and sensitive fluorimetric method for isolation of coumaphos-hydrolysing bacteria, *Letters in Applied Microbiology* **34** (2002) 263–268
6. Horne I., Sutherland T. D., Harcourt R. L., Russell R. J. and Oakeshott J. G. - Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate, *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2002) 3371–3376.
7. Leveau J. H. J., Zehnder A. J. B. and Van der Meer J. R. - The tfdK gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), *Journal of Bacteriology* **180** (1998) 2237-2243.
8. Serdar C. M. and Gibson D. T. - Enzymatic hydrolysis of organophosphates: cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*, *Bio/Technology* **3** (1985) 567-571.
9. Sethunathan N. and Yoshida T. - A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion, *Canadian Journal of Microbiology* **19** (1973) 873-875.
10. Smejkal C. W., T. Vallaey S. K. Burton¹, and H. M. Lappin-Scott - A rapid method to screen degradation ability in chlorophenoxyalkanoic acid herbicide-degrading bacteria, *Letters in Applied Microbiology* **32** (2001) 273-277
11. Ruifu Zhang; Zhongli Cui; Jiandong Jiang; Jian He, Xiangyam Gu, and Shunpeng Li - Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes, *Canadian Journal of Microbiology* **51** (4) (2005) 337-343.
12. Ruifu Zhang, Zhongli Cui, Xiaozhou Zhang, Jiandong Jiang, Ji-Dong Gu, and Shunpeng Li - Cloning of the organophosphorus pesticide hydrolase gene clusters of seven degradative bacteria isolated from a methyl parathion contaminated site and evidence of their horizontal gene transfer, *Biodegradation*, DOI 10.1007/s10532-005-9018-6.

SUMMARY

ASSESSMENT OF REGENT, SHERPA AND PEGASUS DEGRADING CAPACITY OF SOME ISOLATED BACTERIA

The use of pesticides has become an integral part of modern agricultural techniques, but has also been developed for domestic and governmental purposes. Increased use of these chemicals might have caused (or is strongly suspected to create) environmental pollution with impact on ecosystems or, possibly, human health.

Pesticides are used widely in Vietnam with increasing quantity. According to reports of Plant Protection Institute, the use and abuse of pesticides with high toxicity and even prohibited ones in Vietnam lead to high residues of those in fruits and vegetables.

In nature, microorganisms are regarded as active factor in transformation cycle of chemical elements and balance environment. Adaptation of indigenous soil microbial populations occurs as a result of contact with xenobiotics. Many bacterial strains can degrade human made

xenobiotics belonging to the genera *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*. Detoxification of pesticides by bacterial enzymes became focus of many investigations owing to its efficacy and economization.

The goal of this study was isolation and screening bacteria capable of decreasing Sherpa, Pegasus, Regent concentrations in order to develop a bacterial formula for treatment pesticide's residues in vegetables.

Four bacterial strains have been selected for treatment of Sherpa and Regent and 3 strains for Pegasus. Strain R1 had the highest activity against Sherpa, it eliminated 83.39% Sherpa in culture medium after 3 days. Strain S16 reduced Regent up to 76.76% comparing with control after 3 days culture in minimal medium supplemented with 0.5 mg/ml Regent. Under the conditions used, strain NT64 removed 68,38% Pegasus in culture medium.

The received results showed that R1 and S16 had wider substrate spectrum than S1 and P1.

Địa chỉ:

Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCN Việt Nam.

Nhận bài ngày 5 tháng 1 năm 2008