

# BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CHỦNG VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÁT PHA NHIỀU MÙN CÓ KHẢ NĂNG THAM GIA QUÁ TRÌNH PHÂN HỦY THUỐC TRỪ SÂU CƠ PHỐT PHO CHỨA HOẠT CHẤT DIAZINON

LÊ THỊ TRINH

Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

Bài báo công bố các nghiên cứu ban đầu về ảnh hưởng của vi sinh vật đến khả năng phân hủy thuốc trừ sâu cơ photpho trong môi trường đất. Kết quả cho thấy, một số chủng vi sinh vật trong đất cát pha nhiều mùn đã thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy của thuốc trừ sâu cơ photpho chứa hoạt chất diazinon.

**Từ khóa:** Vi sinh vật, đất, diazinon.

PRELIMINARY STUDY  
OF MICRO-ORGANISMS  
IN LOAN SANDY SOIL  
WHICH ARE CAPABLE  
OF PARTICIPATING  
DECOMPOSITION  
PROCESS OF  
PHOSPHORUS INSECTICIDE  
CONTAINING DIAZINON

Summary

This paper reported some initial studies on the effect of microorganisms in soil on degradation of phosphorous pesticides. The results indicated that some microorganisms belong to *Bacillus* species which has promoted the degradation of diazinon in soil.

**Keywords:** microorganisms, soil, diazinon.

## Đặt vấn đề

Diazinon có tên khoa học O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl-phosphorothioate, là một sản phẩm tổng hợp không tồn tại trong tự nhiên [1]. Đối với nhóm cơ photpho, diazinon là thành phần chính của nhiều loại thuốc trừ sâu đã thương mại hoá, như Azinon, Basitox, Basudin, Cazinon, Diaphos, Diazon [1]. Các loại thuốc trừ sâu chứa diazinon thường được dùng để trị các loài rệp, sâu đục thân hại rau màu và cây ăn quả, trong đó hai loại phổ biến nhất là Basudin và Diaphos, được sử dụng chủ yếu để bảo vệ các loại rau xanh và lúa [1].

Tương tự như trong môi trường nước, diazinon có thể bị phân hủy trong môi trường đất do các phản ứng thủy phân, quang hóa và phân hủy sinh học dưới tác dụng của một số vi sinh vật. Nghiên cứu gần đây (năm 2009) của New Zealand trên đất phù sa nhiều mùn ở bề mặt (0-10 cm), tầng sâu (40-50 cm) và các điều kiện khác trong phòng thí nghiệm cho kết quả thời gian bán hủy ( $\tau_{1/2}$ ) của diazinon từ 7 đến 25 ngày [2]. Jianhang Lu và cộng sự (2006) đã nghiên cứu sự phân hủy của diazinon trong lớp trầm tích ở ao và đưa ra kết luận, sự phân hủy của diazinon trong điều kiện hiếu khí ( $\tau_{1/2} = 8$  đến 32 ngày) nhanh hơn trong điều kiện kỵ khí ( $\tau_{1/2} = 12$  đến 53 ngày) [3].

Một số nghiên cứu đã tìm thấy các vi khuẩn có thể tự phân hủy diazinon trong môi trường tự nhiên (đất, nước, không khí). Cụ thể các vi khuẩn có khả năng này được tìm thấy trong bùn là *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium* và *Pseudomonas*. Thí nghiệm với mẫu bùn tiết trùng ở pH 6,9,  $\tau_{1/2}$  của diazinon là 22,2 ngày, trong bùn có vi khuẩn, thời gian này là 15,3 ngày [4]. Một nghiên cứu khác đã xác định được sự có mặt của ba loại vi sinh vật tham gia vào quá trình phân hủy diazinon trong đất trồng lúa và nước mặt ở Iran là *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. và *Agrobacterium* sp. [5]. Cũng theo một nghiên cứu gần đây ở Iran, các tác giả tìm được các vi

khuẩn có khả năng phân hủy diazinon có trong trầm tích ở hồ là *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Salmonella*, *Citrobacter* và *Providencia*. Trong đó, *Pseudomonas* phát triển rất mạnh trong cả mùa đông, mùa hè, còn *Citrobacter* phát triển mạnh trong mùa thu [6]. Người ta cũng tìm thấy một số vi khuẩn có khả năng phân hủy diazinon khi có ảnh hưởng của vi khuẩn khác. Một mình *Arthrobacter* hoặc *Streptomyces* không thể phá hủy vòng pyrimidine trong phân tử diazinon, nhưng khi có mặt cả hai vi khuẩn này, chúng lại có khả năng đó [7]. Tuy nhiên, đa số các vi khuẩn tìm được trong các mẫu đất và nước tự nhiên không có khả năng phân hủy nhanh diazinon [3].

Việt Nam là nước có tỷ lệ sản xuất nông nghiệp cao nên khối lượng hóa chất bảo vệ thực vật sử dụng hàng năm rất lớn, trong đó thuốc trừ sâu chiếm tỷ lệ cao nhất [8]. Theo thống kê, có khoảng hơn 200 loại thuốc trừ sâu đang được sử dụng, chủng loại các thuốc trừ sâu rất đa dạng, nhiều nhất là nhóm cơ phospho [8, 9]. Do vậy, việc nghiên cứu các chủng loại vi sinh vật trong các loại đất có khả năng phân hủy các thuốc trừ sâu nói chung và thuốc trừ sâu cơ phospho nói riêng để có các số liệu khuyến cáo về thời gian bán hủy của thuốc trừ sâu trong các loại đất là điều hết sức cần thiết. Bài báo trình bày các kết quả nghiên cứu về một số chủng loại vi sinh vật được tìm thấy trong đất cát pha được cho là có khả năng phân hủy diazinon trong đối tượng đất nghiên cứu.

### Thực nghiệm

#### Hóa chất

Diazinon chuẩn dùng cho xác định hàm lượng diazinon thực tế là sản phẩm thương mại của hãng Dr. Ehrenstorfer (Đức).

Thuốc trừ sâu chứa diazinon do Công ty Cổ phần bảo vệ thực vật Sài Gòn sản xuất, tên thương mại là Diaphos.

Các dung môi dùng cho sắc ký Methanol, Acetonitril, N-hexan, Diclometan (DCM), Silicagel hoạt hóa 100-200 mesh và một số hóa chất khác của hãng Merck.

#### Chuẩn bị mẫu thí nghiệm

Mẫu đất dùng trong các thí nghiệm này là loại đất cát pha nhiều mùn, dùng trồng lúa và đã không

sử dụng để canh tác trong nhiều năm. Địa điểm lấy mẫu: xã Nghiêm Xuyên, huyện Thường Tín, thành phố Hà Nội.

Mẫu đất được lấy ở tầng mặt (0-20 cm), nhặt sạch rác, đá... và xử lý sơ bộ theo TCVN 6647:2007 [10]. Mẫu để thực nghiệm bao gồm mẫu trắng, mẫu đất tươi và mẫu đất khử trùng:

- Mẫu trắng là mẫu đất cát pha nhiều mùn đã xử lý sơ bộ, chiết tách và định lượng trên thiết bị GC để khẳng định là đất sạch không nhiễm diazinon và các thuốc trừ sâu khác.

- Đất tươi: đất lấy về được nhặt sạch rác, đá... đập vỡ các cục to và sử dụng làm đất thí nghiệm ngay.

- Đất khử trùng: sấy đất tươi trong tủ sấy ở 100°C trong vòng 12 giờ [9]. Đất sấy xong, để nguội và bảo quản trong các bao nilon kín có dán nhãn.

Mẫu đất ở các chậu nghiên cứu được lấy theo quy tắc lấy mẫu hỗn hợp và xử lý mẫu sơ bộ theo TCVN 6647:2007 [10] theo các bước sau:

- Làm khô mẫu đất tươi trong không khí hoặc trong tủ sấy thông gió đến khi mẫu đất giảm không quá 5% khối lượng. Đập nhỏ các cục đất có kích thước lớn (> 15 mm) bằng búa gỗ, cối giã.

- Loại bỏ tạp chất bằng tay hoặc bằng rây.

- Nghiền mẫu bằng cối, chày sứ.

- Trộn đều mẫu.

- Lấy phần mẫu phân tích.

Khi thực hiện nghiên cứu định lượng, cần tiến hành xác định hệ số khô kiệt của mẫu song song với các thí nghiệm khác. Phương pháp xác định hệ số khô kiệt theo tài liệu [10].

Chuẩn bị các chậu thủy tinh kích thước 10 cm x 20 cm, cho vào các chậu một lượng đất tương đương nhau. Thuốc trừ sâu Diaphos (TTS) được nghiền nhỏ trong cối sứ, cân chính xác một lượng TTS tương đương nhau (gấp khoảng 10 lần so với liều lượng phun thực tế), rải đều vào các chậu.

#### Xác định ảnh hưởng của chủng vi sinh vật đến sự phân hủy diazinon

Để khảo sát ảnh hưởng của vi sinh vật đến thời gian bán hủy của diazinon, thí nghiệm được thực hiện trên đối tượng đất cát pha nhiều mùn với hai chậu đất: đất tươi và đất khử trùng. Các thực nghiệm bao gồm:

**Xác định mật độ vi sinh vật:**

Các thí nghiệm xác định mật độ vi sinh vật được thực hiện tại Phòng thí nghiệm môi trường, Trường Đại học Tài Nguyên và Môi trường Hà Nội. Phương pháp phân tích theo quy trình của Trần Linh Thuộc [11] bằng phương pháp đếm gián tiếp số đơn vị hình thành khuẩn lạc trên đĩa thạch hay còn gọi là phương pháp CFU (Colony Forming Unit). Khuẩn lạc được nuôi cấy ở nhiệt độ 35-37°C trong 36 giờ.

**Xác định các chủng vi sinh vật trong mẫu đất cát pha nhiều mùn:**

Thí nghiệm này được thực hiện trên ba mẫu đất tươi 01, 02 và 03.

Các thí nghiệm phân lập vi sinh vật của mẫu đất được thực hiện tại Phòng thí nghiệm môi trường, Trường Đại học Tài Nguyên và Môi trường Hà Nội. Các thí nghiệm tách chiết ADN, PCR (lập bản đồ gen) được thực hiện tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học - vi sinh, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội. Thí nghiệm xác định trình tự được thực hiện tại Phòng thí nghiệm thuộc Công ty Bioneer, Hàn Quốc.

Phương pháp tách chiết ADN tổng số thực hiện theo Sambrook và cộng sự (1989) [12].

Phương pháp PCR thực hiện theo chương trình sau: 94°C trong 4 phút, sau đó là 35 chu kỳ gồm (94°C trong 30 giây, 50°C trong 40 giây, 72°C trong 60 giây) và 72°C trong thời gian 8 phút. Sử dụng cặp mồi: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492r (5'-TACCTTGTACGACTT).

**Kết quả và thảo luận**

**Kết quả xác định mật độ vi sinh vật**

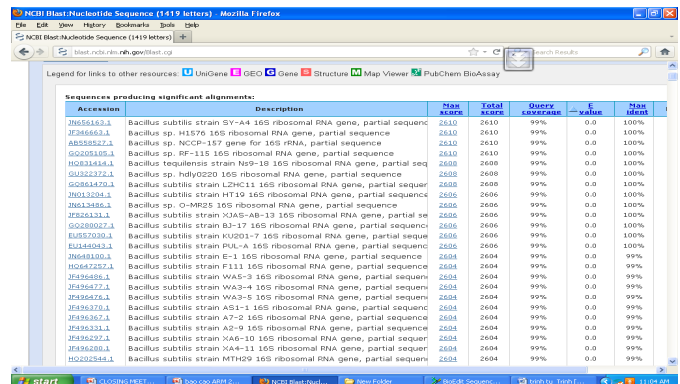
Kết quả mật độ vi sinh vật tổng số là:

- Mẫu đất tươi: 117 (CFU/g)
- Mẫu đất khử trùng: 11 (CFU/g)

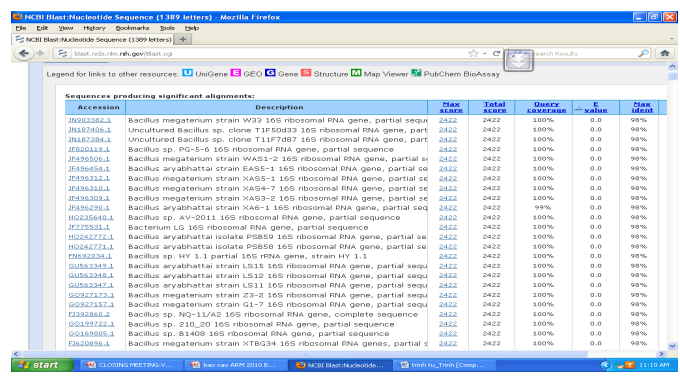
Như vậy, số lượng vi sinh vật trong mẫu đất khử trùng rất nhỏ so với mẫu đất tươi.

**Kết quả xác định các chủng vi sinh vật trong mẫu đất cát pha nhiều mùn**

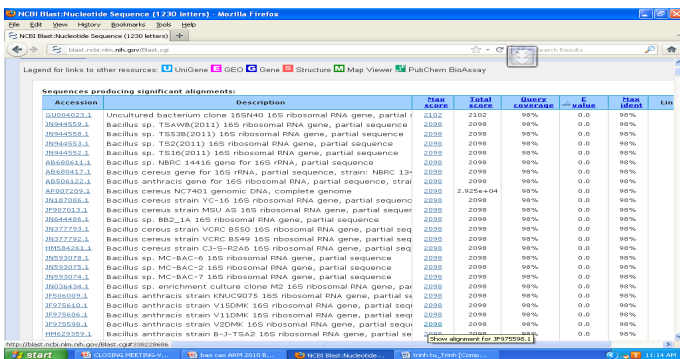
Sau khi phân tích trình tự các mẫu và thực hiện xác định trình tự gen, kết quả giải trình tự tương ứng ở hình 1, 2, 3.



Hình 1: kết quả giải trình tự mẫu 01



Hình 2: kết quả giải trình tự mẫu 02



Hình 3: kết quả giải trình tự mẫu 03

Kết quả phân tích trình tự cho thấy, đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn trong mẫu đất nghiên cứu, chúng đều thuộc chi *Bacillus*.

**Kết quả xác định thời gian bán hủy của diazinon trong đất tiết trùng và chưa tiết trùng**

Thục nghiệm được thực hiện trên 2 chậu:

- Chậu đất tươi, tưới nước cất C1.
- Chậu đất khử trùng, tưới nước cất C2.
- Duy trì độ ẩm, nhiệt độ hai chậu tương đương nhau.

Các điều kiện thí nghiệm được ghi trong bảng 1.

Bảng 1: điều kiện chuẩn bị mẫu thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của vi sinh vật đến quá trình phân hủy diazinon

| Ký hiệu chậu | Mẫu đất                      | Khối lượng đất (kg) | Khối lượng thuốc (g) | Độ ẩm trung bình (%) |
|--------------|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| C1           | Đất tươi, tưới nước cất      | 2,20                | 0,490                | 20                   |
| C2           | Đất khử trùng, tưới nước cất | 2,20                | 0,4859               | 20                   |

Tiến hành lấy mẫu đất ở các ngày khác nhau và định lượng diazinon còn lại trong đất. Kết quả hàm lượng diazinon trong các chậu thí nghiệm dùng đất tươi (chậu C1), đất khử trùng được làm ẩm bằng nước cất (chậu C2) với các độ ẩm tương đương nhau (20%) thu được ở bảng 2.

Bảng 2: hàm lượng diazinon trong đất tươi và đất khử trùng theo thời gian

| Thời gian lấy mẫu (ngày) | C1 (mg diazinon/kg đất khô kiệt) | C2 (mg diazinon/kg đất khô kiệt) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0                        | 18,565                           | 19,012                           |
| 3                        | 16,951                           | 18,940                           |
| 7                        | 12,243                           | 18,303                           |
| 10                       | 9,504                            | 17,176                           |
| 13                       | 8,840                            | 15,302                           |
| 20                       | 5,785                            | 11,885                           |
| 23                       | 3,641                            | 10,641                           |
| 27                       | 2,975                            | 8,540                            |
| 30                       | 1,804                            | 7,704                            |
| 37                       | 1,568                            | 5,722                            |
| 43                       | 0,644                            | 4,968                            |

Thời gian bán hủy của diazinon trong đất ở hai chậu C1 và C2 được thống kê ở bảng 3.

Bảng 3: giá trị  $k$  và  $\tau_{1/2}$  của diazinon trong đất tươi và đất khử trùng theo thời gian

| Châu                       | C1     | C2     |
|----------------------------|--------|--------|
| $k$ (ngày <sup>-1</sup> )  | 0,0695 | 0,0291 |
| $\tau_{1/2}$ (ngày)        | 10,0   | 23,8   |
| Hệ số tương quan ( $R^2$ ) | 0,9832 | 0,9516 |

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng diazinon trong chậu đất đã khử trùng giảm chậm hơn so với chậu đất tự nhiên, cụ thể là giá trị  $\tau_{1/2}$  của chậu đất khử trùng C2 là 23,8 ngày; của chậu không khử trùng C1 là 10 ngày.

Từ các kết quả trên cho thấy, hoạt động của các vi sinh vật nói chung trong loại đất nghiên cứu có ảnh hưởng rất lớn đến thời gian bán hủy của diazinon trong đất. Kết quả phân tích giải trình tự của 3 chủng vi khuẩn phân lập được đều thuộc chi *Bacillus*. Như vậy bước đầu có thể kết luận vi sinh vật thuộc chi *Bacillus* có mặt trong đất cát pha nhiều

mùn của Việt Nam (tại địa điểm nghiên cứu) có khả năng tham gia quá trình phân hủy thuốc trừ sâu chứa diazinon. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yaghoob và cộng sự (2010) [6] là chi *Bacillus* có khả năng phân hủy diazinon trong trầm tích một số hồ ở Iran.

## Kết luận

Sự có mặt của 3 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trong loại đất nghiên cứu có ảnh hưởng rất lớn đến thời gian bán hủy của diazinon trong đất. Ở nước ta, đất cát pha nhiều mùn là loại đất trồng trọt có tỷ lệ cao ở Đồng bằng Bắc Bộ và đây cũng là vùng có tỷ lệ sử dụng thuốc trừ sâu cơ phốt pho cao. Do đó, cần có các nghiên cứu sâu hơn nữa về khả năng phân hủy thuốc trừ sâu bởi các vi sinh vật trong đất để khuyến cáo người dân về cách thức sử dụng thuốc trừ sâu đối với các loại cây trồng trên từng địa phương ■

## Tài liệu tham khảo

- Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng ở Việt Nam, Phụ lục ban hành kèm theo Quyết định số 22/2005/QĐ-BNN ngày 22.4.2005 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
- Ajit K. Sarmah, Murray E. Close and Norman W.H. Mason, Dissipation and sorption of six commonly used pesticides in two contrasting soils of New Zealand, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2009, 44, 325-336.
- Jianhang Lu, Laosheng Wu, Julie Newman, Ben Faber, Donald J. Merhaut and Jianying Gan, Sorption and Degradation of Pesticides in Nursery Recycling Ponds, *J. Environ. Qual.*, 2006, 35, 1795-1802.
- J. Kanazawa, Biodegradability of pesticides in water by microbes in activated sludge, soil and sediment, *Environ. Monitoring and Assessment*, 1987, 9 (1), 57-70.
- Alireza Ghasempour et al., Monitoring of the Pesticide Diazinon in soil, stem and surface water op rice fields, *Analytical Sciences*, 2002, 18, 779-783.
- Yaghoob Tahery, Farshid Kafizadeh, Mehdi Dehdashi, Amir Ashkan Mahjoor, Siamak Mahmoodi Sivand and Hazandy Abdul, Isolation and identification of Diazinon Degrading bacteria from fresh water: a case study on the sediments of lake Parishan in Iran, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2010, 2(3), 240-245.
- Gunner H.B. and Zuckerman B.M., Degradation of Diazinon by synergistic microbial action, *Nature*, 1968, 217, 1183-1184.
- Lê Huy Bá (chủ biên), Độc học môi trường - Chương 2: Độc học thuốc bảo vệ thực vật, Tập 2 (Phần chuyên đề), NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 2006, 82-133.
- Báo cáo Môi trường Quốc gia năm 2010, Tổng quan môi trường Việt Nam - "Chương 3: Môi trường đất", Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2010, 49-64.
- TCVN 6647:2007. Chất lượng đất. Xử lý sơ bộ mẫu để phân tích lý hoá.
- Trần Linh Thuốc, Phương pháp phân tích vi sinh vật, NXB Giáo dục, 2002.
- Sambrook J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.