



HIỆU QUẢ PHÂN HỦY SINH HỌC HOẠT CHẤT PROPOXUR TRONG ĐẤT BỒI DÒNG VI KHUẨN PHÂN LẬP *Paracoccus* SP. P23-7 CỐ ĐỊNH TRONG BIOCHAR

Nguyễn Khởi Nghĩa¹, Đỗ Hoàng Sang¹, Nguyễn Thị Kiều Oanh¹, Nguyễn Thị Tố Quyên¹, Lâm Tử Lăng¹ và Dương Minh Viễn¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 02/04/2015

Ngày chấp nhận: 28/10/2015

Title:

Biodegradation of the pesticide Propoxur in soil by *Paracoccus* sp. P23-7 immobilized on biochar

Từ khóa:

Phân hủy sinh học, Biochar, vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7, sự cố định vi khuẩn, đất và Propoxur

Keywords:

Biochar, *Paracoccus* sp. P23-7, Propoxur, immobilization, biodegradation and soil

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effectiveness of different inoculation approaches in enhancing the biodegradation of the pesticide Propoxur in soil medium. Inoculation was conducted with the *Paracoccus* sp. P23-7 originally isolated from Propoxur contaminated soil as the key degrader organism. The bacterial strain was applied either via free cells or immobilized on solid municipal waste biochar. Bacterial cell numbers, survival of *Paracoccus* sp. P23-7 at the end of the experiment as well as Propoxur biodegradation measurement in soil were used to investigate the bioaugmentation efficiency of the different approaches. Soil inoculated with the *Paracoccus* sp. P23-7 immobilized on biochar from the beginning of the experiment showed the highest Propoxur degradation, whereas the other inoculum approaches showed an increased but lower contaminant biodegradation. Regardless of the inoculum approaches, *Paracoccus* sp. P23-7 still survived properly in soil medium under the laboratory condition after 14 incubation days. This fact was indicated by a DGGE profile of the soil microbial community in different treatments and the pure culture of *Paracoccus* sp. P23-7 strain. Thus, our results allow the conclusion that the application of a key bacterial degrader-biochar-complex is the most promising approach for an accelerated biodegradation of organic chemicals in soil medium.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả của một số phương pháp chủng vi khuẩn khác nhau lên khả năng phân hủy sinh học hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường đất. Vi khuẩn phân hủy Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 phân lập từ mẫu đất nhiễm Propoxur, được chủng vào đất qua hai dạng: 1) dạng vi khuẩn tự do và 2) dạng vi khuẩn cố định trong biochar. Mật số vi khuẩn đất, khả năng sống sót của vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 và nồng độ Propoxur được theo dõi theo thời gian thí nghiệm. Nghiệm thức chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar thể hiện khả năng phân hủy Propoxur cao nhất, trong khi các phương pháp chủng khác có tốc độ phân hủy Propoxur thấp hơn. Dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 vẫn sống sót và phát triển trong đất ở điều kiện phòng thí nghiệm sau 14 ngày nuôi cấy ở tất cả các phương pháp chủng vi khuẩn. Điều này được chứng minh thông qua điện di đồ DGGE về hình thái hệ vi khuẩn đất của các nghiệm thức thí nghiệm và của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này cho phép kết luận rằng, việc ứng dụng một thể phức hợp gồm biochar và dòng vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất nông dược là phương pháp triển vọng nhất giúp gia tăng tốc độ phân hủy sinh học đối với độc chất hữu cơ trong môi trường đất.

1 GIỚI THIỆU

Biochar còn được gọi là than đen hay than sinh học được dùng cho những mục đích chuyên biệt, đặc biệt như là chất cải tạo đất. Giống với hầu hết những loại than khác, biochar được sản xuất từ quá trình nhiệt phân sinh khối và được ứng dụng để cố định nguồn carbon nhằm giảm thiểu khí CO₂ thải vào khí quyển (Lean, 2008). Vì vậy, biochar có tiềm năng trong việc làm giảm biến đổi khí hậu thông qua sự cố định nguồn carbon (Dominic và *ctv.*, 2010). Biochar giúp gia tăng dinh dưỡng của đất phèn (có pH đất thấp), tăng sản lượng nông nghiệp và hỗ trợ trong việc giúp cây trồng chống lại bệnh hại trên lá và trong đất. Thêm vào đó, biochar còn là một chất rắn bền, giàu carbon và có thể tồn tại trong đất hàng nghìn năm (Lean, 2008).

Bên cạnh những ứng dụng trên, biochar còn được dùng làm vật liệu chất mang để chủng vi sinh vật có lợi cho cây trồng và môi trường vào trong đất rất hiệu quả, thay thế cho những vật liệu chất mang khác đã được sử dụng phổ biến trước đây như than bùn và lignite vì những vật liệu chất mang được sử dụng trước đây là nguồn tài nguyên không tái tạo và chúng thải ra một lượng lớn CO₂ vào khí quyển gây ra hiệu ứng nhà kính. Bản thân biochar chứa những kẽ hở và những lỗ hổng giúp cho tiến trình hấp thụ, cầm giữ nước, dinh dưỡng cũng như những chất ô nhiễm hữu cơ hoặc vô cơ của biochar diễn ra một cách hiệu quả. Thêm vào đó, biochar còn có chức năng như là một giá thể của sự sống nhằm bảo vệ vi sinh vật khỏi sự tấn công của các sinh vật khác (Pleasant, 2000). Vì vậy, việc ứng dụng biochar như một vật liệu chất mang dùng để chủng vi sinh vật có lợi vào trong đất thay thế một số vật liệu chất mang khác là rất cần thiết giúp cải thiện chất lượng môi trường và sản phẩm nông nghiệp. Nghiên cứu của Saranyal và *ctv.* (2011) đã so sánh khả năng sống sót của dòng vi khuẩn cố định đạm *Azospirillum lipoferum* (AZ 204) và khả năng kích thích tăng trưởng cây trồng của dòng vi khuẩn này khi được cố định trong 3 vật liệu: 1) biochar từ xơ dừa, 2) biochar từ vỏ của trái bơ và 3) lignite sau 180 ngày thí nghiệm. Kết quả cho thấy mật số vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* (AZ 204) trong vật liệu biochar xơ dừa đạt cao nhất sau thời gian thí nghiệm (log 10 = 10,79 CFU/g) ở ẩm độ 25,22%, ngoài ra, khả năng kích thích sinh trưởng lên cây đậu xanh của dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* (AZ 204) cố định trong vật liệu biochar xơ dừa cao hơn so với trường hợp cố định trong biochar vỏ trái bơ và lignite. Tuy nhiên, thực tế cho thấy kết quả nghiên cứu về ứng dụng biochar như

là vật liệu chất mang dùng để chủng vi sinh vật có lợi cho cây trồng và xử lý môi trường vào trong đất còn rất hạn chế cả ở Việt Nam và trên thế giới.

Sóc Trăng là tỉnh có diện tích trồng hành tím lớn nhất Đồng bằng sông Cửu Long. 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 Hảo, 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 và Baygon). Nông dân tại khu vực này thường bảo quản hành giống sau thu hoạch bằng cách trộn hỗn hợp bột Talc (Mg₃(SiO₁₀(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). Vì vậy, đất tại khu vực trồng hành tím ở Vĩnh Châu, Sóc Trăng ô nhiễm với Propoxur là điều không thể tránh khỏi.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: So sánh và đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường đất của dòng vi khuẩn phân lập *Paracoccus* sp. P23-7 thông qua hai phương pháp chủng vi khuẩn: 1) vi khuẩn được cố định trước và được bảo vệ trong biochar và 2) phương pháp chủng vi khuẩn vào trong đất ở dạng tế bào tự do. Kết quả nghiên cứu này giúp tìm ra phương pháp mới và hữu hiệu cho việc chủng vi khuẩn phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur vào trong môi trường đất nhằm mục đích xử lý sinh học đất ô nhiễm với Propoxur ở điều kiện thực tế ngoài đồng.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Biochar và cách chuẩn bị biochar cho thí nghiệm

Biochar rác đô thị có nguồn gốc từ công ty sản xuất Biochar (Vina Energy Group, thành phố Hồ Chí Minh). Trước khi sử dụng, biochar được nghiền thành những mảnh nhỏ bằng chày và được sàng qua rây có kích thước 2 x 2 mm. Sau đó, rửa sạch biochar với nước khử khoáng bằng cách cho biochar vào bình tam giác 500 mL chứa 250 mL nước khử khoáng, lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 100 vòng/phút. Thay nước sau mỗi 8 giờ. Lặp lại quy trình rửa đến khi biochar sạch hoàn toàn (không làm đen màu nước khử khoáng khi lắc trên máy lắc). Mục đích của việc rửa biochar trước khi bố trí thí nghiệm là nhằm loại bỏ màu đen của biochar khi cho vào trong nước và giúp cho việc

quan sát sự phát triển vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng ở nghiệm thức bổ sung biochar dễ dàng hơn. Biochar sau khi rửa sạch với nước khử khoáng được sấy khô kiệt ở 105°C qua đêm. Cho 1,5 g biochar (trọng lượng khô) vào đĩa petri thủy tinh, đem khử trùng trong nồi hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi tiệt trùng, đĩa petri chứa biochar được sấy khô lần nữa ở 105°C trong hai giờ. Biochar đã sẵn sàng cho bố trí thí nghiệm.

2.2 Nguồn vi khuẩn

2.2.1 Chuẩn bị nguồn vi khuẩn

Paracoccus sp. P23-7 là dòng vi khuẩn được phân lập từ nền đất kho bảo quản hành tím ở khu vực canh tác hành tím tại Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng có hiệu quả rất cao trong phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur (Đỗ Hoàng Sang, 2014) được chọn cho bố trí thí nghiệm. Trước tiên, vi khuẩn được nuôi trong bình tam giác 100 mL chứa 25 mL dung dịch giàu dinh dưỡng Glucose Yeast Extract (GYE) trong 3 ngày trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút. 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 bằng cách ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút. Lặp lại 4 lần việc rửa sinh khối vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng nhằm loại bỏ hoàn toàn dinh dưỡng và nguồn carbon còn sót lại trong môi trường nuôi cấy. 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 ($0,17 \times 10^8$ CFUs/mL). Xác định mật số vi khuẩn của dung dịch chứa vi khuẩn dùng để chủng vào trong đất bằng phương pháp đếm sống trên đĩa agar (Hoben và Somasegaran, 1982): Tiến hành pha loãng dung dịch vi khuẩn theo hệ số 10 với các nồng độ pha loãng khác nhau. Hút 50 μ L dung dịch vi khuẩn của mỗi nồng độ pha loãng và nhỏ 5 giọt lên trên bề mặt môi trường Tryptose Soybean Broth (TSB). Thành phần của môi trường TSB gồm: 30 g Tryptose Soybean Broth và 15 g agar trong một lít nước cất. Các đĩa môi trường TSB chứa vi khuẩn được đặt vào túi nylon và ủ ở nhiệt độ 35°C. Cuối cùng, mật số khuẩn lạc được đếm sau ba ngày.

2.2.2 Chủng vi khuẩn vào biochar

Việc chủng vi khuẩn vào biochar được thực hiện theo quy trình sau: Bốn bình tam giác 100 mL, mỗi bình chứa: 1) 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu chứa 40 ppm Propoxur (Ehrenstorfer GmbH, Đức), 2) 1 mL dung dịch vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 đã được chuẩn bị sẵn ($0,17 \times 10^8$ CFUs/mL; mục 2.2.1) và 3) 1,5 g biochar đã chuẩn bị sẵn

(mục 2.1). 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 0,01 g $CaCl_2 \cdot H_2O$. 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 dung dịch vi lượng (1 L) như sau: 10 mg $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$; 25 mg H_2BO_3 ; 15 mg $ZnCl_2$; 5 mg $CuCl_2$; 10 mg $FeCl_3$. Dung dịch vi lượng được lọc với màng lọc tiệt trùng (Minisart NY 25, Sartorius Stedim Biotech, GmHbH, Germany, đường kính 0,20 μ m). Sau đó, các bình tam giác chứa mẫu được lắc trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong tối trong 4 ngày ở điều kiện phòng thí nghiệm. Vào thời điểm bố trí thí nghiệm, toàn bộ 1,5 g biochar chứa vi khuẩn trong mỗi bình tam giác được rửa sạch nhằm loại bỏ vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do không được cố định trong biochar. Quy trình rửa được thực hiện bằng cách ngâm 1,5 g biochar trong 10 phút với nước khử khoáng tiệt trùng trong đĩa petri tiệt trùng, dùng kẹp tiệt trùng để rửa sạch biochar trong nước. Sau đó, thay nước mới, tiếp tục lặp lại quy trình rửa biochar thêm 4 lần nữa. Biochar chứa vi khuẩn cố định bên trong đã sẵn sàng cho bố trí thí nghiệm trong đất. Quy trình đếm mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar được thực hiện như sau: Lấy một lượng xác định biochar sau khi rửa sạch chia làm hai phần trong điều kiện tiệt trùng: một phần với trọng lượng xác định dùng cho việc xác định ẩm độ biochar, phần còn lại với trọng lượng xác định dùng cho việc đếm mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar. Sau đó, cho biochar đã rửa sạch vào trong ống Eppendorf 2 mL tiệt trùng, nghiền nhuyễn biochar bằng đũa thủy tinh tiệt trùng, cho 1 mL dung dịch đệm phosphate tiệt trùng (23,99 g NaH_2PO_4 và 15,59 g Na_2HPO_4 trong 1 lít nước khử khoáng) vào trong ống Eppendorf 2 mL chứa sẵn biochar đã nghiền, vortex trong 1 phút, pha loãng và chà trên đĩa agar TSB theo phương pháp nhỏ giọt, đem ủ trong tủ cấy ở 30°C trong 3 ngày. Sau đó, đếm mật số vi khuẩn hiện diện trên đĩa agar.

2.3 Bố trí thí nghiệm

2.3.1 Mẫu đất

Mẫu đất dùng cho bố trí thí nghiệm được thu thập từ nền đất có thời gian canh tác hành tím 30 năm tại xã Vĩnh Hải của thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Mẫu đất được lấy ở độ sâu 0-20 cm, lấy ngẫu nhiên 8 mẫu khoan, sau đó các mẫu được trộn đều thành một mẫu đại diện. Mẫu đất được phơi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sau đó lọc qua rây 2 mm. Đặc tính lý, hóa và sinh học đất như pH, ẩm

độ, thành phần sa cấu, hàm lượng hữu cơ trong đất, đạm tổng số (N_{ts}), lân tổng số (P_{ts}), kali tổng số (K_{ts}), và mật số vi khuẩn của mẫu đất thu thập

Bảng 1: Thành phần hóa học đất thí nghiệm

| Vật liệu | pH _{H2O} (1:2,5) | EC (mS/cm) | CHC (%) | N _{ts} (%) | P _{ts} (%) | K _{ts} (%) |
|----------|---------------------------|------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Đất | 7,00 | 0,21 | 0,63 | 0,04 | 0,15 | 0,37 |

Bảng 2: Thành phần sa cấu của đất thí nghiệm

| Cát (%) | Thịt (%) | Sét (%) |
|---------|----------|---------|
| 81,00 | 11,50 | 7,46 |

2.3.2 *Nghiệm thức thí nghiệm*

Thí nghiệm được bố trí với 4 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức và kéo dài trong 14 ngày. Nồng độ ban đầu của Propoxur là 75 ppm. Tổng mật số vi khuẩn của mẫu đất trước khi bố trí thí nghiệm là $0,64 \times 10^7$ CFUs/g đất. Tổng cộng có 5 nghiệm thức trong thí nghiệm và được liệt kê như sau:

1. Đất

2. Đất + 1% biochar (0,5 g, dựa vào trọng lượng khô của đất)

3. Đất + *Paracoccus* sp. P23-7 tự do ($0,5 \times 10^5$ CFU/g đất)

4. Đất + *Paracoccus* sp. P23-7 tự do ($0,5 \times 10^5$ CFU/g đất) + 1% biochar (0,5 g)

5. Đất + 1% biochar (0,5 g) cố định sẵn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 ($0,21 \times 10^8$ CFU/g biochar)

2.3.3 *Quy trình thực hiện thí nghiệm*

Thí nghiệm phân hủy sinh học hoạt chất Propoxur trong đất được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Cân 50 g đất (dựa vào trọng lượng khô kiệt) đã lọc qua rây 2 mm cho vào chai nắp xanh 250 mL đã tiệt trùng. Sau đó, một lượng 5 g đất trích ra từ 50 g đất ban đầu cho vào beaker đem sấy khô kiệt trong tủ sấy ở nhiệt độ 105°C. Sau khi sấy khô, dùng chày và cối nghiền nhuyễn đất. Hút một lượng xác định dung dịch Propoxur gốc (Propoxur được hòa tan với nước khử khoáng tiệt trùng với nồng độ 10.000 ppm) cho vào 5 g đất chứa trong beaker sao cho đạt được nồng độ Propoxur cuối cùng là 75 ppm, dùng spatula trộn đều đất trong 2 phút. Sau đó, chuyên toàn bộ 5 g đất khô kiệt đã chùng Propoxur vào trong bình nắp xanh chứa sẵn 45 g đất còn lại. Tiếp tục dùng spatula trộn đều đất trong 2 phút. Tiếp theo, chùng vi khuẩn và biochar được chuẩn bị ở mục 2.2 theo từng nghiệm thức riêng biệt. Mật số vi khuẩn chùng vào trong đất dưới dạng tự do là $0,5 \times 10^5$ CFU/g đất, trong khi vi khuẩn bị cố định trong

được xác định. Thành phần hóa và lý học của mẫu đất thí nghiệm được trình bày trong Bảng 1 và 2.

biochar có mật số là $0,21 \times 10^8$ CFU/g biochar, dùng spatula trộn đều đất sau khi chùng vi khuẩn/biochar trong 2 phút. Dùng spatula chuyên biệt để đưa đất về dung trọng bằng $1,3 \text{ g/cm}^3$, hiệu chỉnh ẩm độ đất về 60% khả năng giữ nước của đất (WHC) với nước khử khoáng tiệt trùng, đập nắp bình để tránh bốc thoát hơi nước, tuy nhiên phải bảo đảm không khí trao đổi cho hoạt động của vi sinh vật trong đất. Các bình nắp xanh chứa mẫu được đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 14 ngày.

2.4 **Chỉ tiêu theo dõi**

Trong thời gian thí nghiệm một số chỉ tiêu được theo dõi như sau:

1) Mật số vi khuẩn có khả năng nuôi cấy trên môi trường agar giàu dinh dưỡng: vào các thời điểm 0, 3, 7 và 14 ngày thí nghiệm. Mật số vi khuẩn đất thí nghiệm được xác định bằng phương pháp hòa loãng (Ian và Charles, 2004). Các đĩa môi trường sau khi cho vi khuẩn vào được ủ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau ba ngày ủ, tiến hành đếm mật số khuẩn lạc của vi khuẩn hiện diện trên bề mặt môi trường TSB. Số khuẩn lạc đếm được sẽ được quy đổi theo hệ số pha loãng để có kết quả mật số vi khuẩn trong đất tại các thời điểm thu mẫu.

2) Nồng độ hoạt chất Propoxur còn lại trong đất: vào các thời điểm 0, 3, 7 và 14 ngày thí nghiệm. Quy trình trích Propoxur và đo nồng độ Propoxur trên hệ thống HPLC được thực hiện bằng cách hút 5 mL dung môi Methanol cho vào lọ bi 10 mL chứa 1 g đất (dựa trên trọng lượng khô kiệt), đóng kín nắp lọ bi, vortex với tốc độ 2.500 vòng/phút trong 1 phút, sau đó, lọ bi chứa mẫu được lắc 24 giờ trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút, ly tâm lọ bi chứa mẫu trên máy ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 3 phút. Dùng pipette thủy tinh hút dung môi Methanol chứa Propoxur nằm bên trên lớp đất chuyên qua lọ bi mới 20 mL. Toàn bộ quy trình trích Propoxur trong đất với dung môi Methanol được lặp lại thêm 2 lần nữa. Sau 3 lần trích mẫu, toàn bộ lượng dung môi Methanol chứa Propoxur được chứa chung lại trong lọ bi 20 mL. Mẫu sau khi được cô đọng về thể tích 5 mL dưới vòi khí N₂ được đo trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp (High Performance

Liquid Chromatography, viết tắt là HPLC) (Shimazu-LC20A) với các thông số như sau: Sử dụng cột C18, tỷ lệ pha động acetonitrile:nước tương ứng là 45:55, bước sóng 214 nm, lưu lượng của pha động 100 μ L/phút, thời gian xác định phổ của hoạt chất Propoxur ở phút thứ 7,5.

3) Đánh giá khả năng sống sót của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong đất sau khi được chôn vào đất: Phương pháp điện di biến tính tăng cấp DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) được ứng dụng để xác định khả năng sống sót của dòng vi khuẩn chôn vào đất và đa dạng quần thể vi sinh vật trong đất. Quy trình thực hiện phản ứng DGGE được mô tả như sau: DNA của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 và của hệ vi khuẩn trong đất thí nghiệm được tách chiết bằng cách sử dụng CTAB 3% (Ihrmark và *ctv.*, 2012), sau đó thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 341F-GC/534R. Trình tự nucleotide của cặp mồi như sau:

341F_GC:GCCCCGCCGCGCGCGGGCGG GGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG và 534R:ATTACCGCGGCTGCTGG) nhằm vào đoạn gene 16S-rRNA. Các bước trong phản ứng PCR như sau: bước 1: 94°C trong 3 phút; bước 2: 94°C trong 20 giây; bước 3: 55°C trong 45 giây; bước 4: 72°C trong 45 giây; bước 5: lặp lại bước 2 thêm 29 chu kỳ; bước 6: 72°C trong 7 phút và bước 7: 4°C trong thời gian không xác định. Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 25 μ L như sau: 12,5 μ L GoTaq Green Master Mix; 0,5 μ L mồi xuôi (10 μ M); 0,5 μ L mồi ngược (10 μ M); 10,5 μ L nước không chứa DNA và 1 μ L DNA tinh sạch.

Gel DGGE 8% acrylamide được chuẩn bị với các nồng độ Urea từ 40% đến 60% nhằm phân tách các chuỗi DNA có trình tự khác nhau trong sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR được trộn đều với chất nhuộm 2X. Thành phần của chất nhuộm 2X trong 10 mL gồm: 0,25 mL Bromophenol Blue 2%; 0,25 mL Xylene Cyanol 2%; 7 mL Glycerol 100% và 2,5 mL nước khử khoáng. Sau đó đưa mẫu chứa sản phẩm PCR vào giếng của Gel Acrylamide trong dung dịch đệm Tris Base Aceate (TAE) 1X với mức điện thế 45V, ở nhiệt độ 60°C và thực hiện trong 16 giờ trên hệ điện di đứng Dcode (Biorad). Gel Acrylamide sau điện di được nhuộm với Ethium Bromide và được chụp hình trên máy Gel Logic 1500 (Kodak).

2.5 Xử lý số liệu

Số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm được tổng hợp, tính toán bằng phần mềm Excel và kiểm định

thống kê với ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.2.

3 KẾT QUẢ

3.1 Diễn biến mật số vi khuẩn trong đất giữa các nghiệm thức trong thời gian thí nghiệm

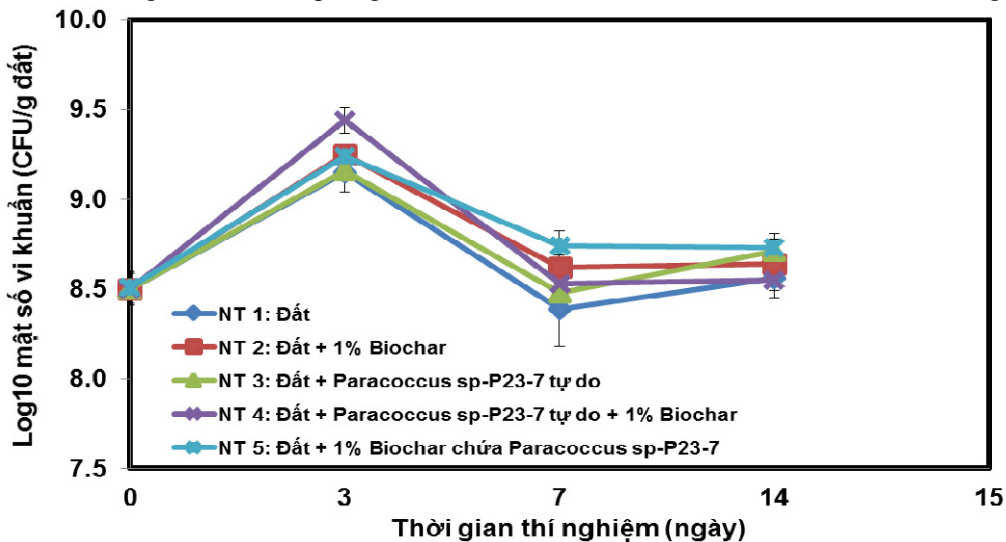
Kết quả diễn biến mật số vi khuẩn trong đất giữa các nghiệm thức trong 14 ngày bố trí thí nghiệm được trình bày ở Hình 1. Nhìn chung, mật số vi khuẩn đất ở tất cả các nghiệm thức vào tất cả thời điểm lấy mẫu khá cao. Tất cả các nghiệm thức có cùng một chiều hướng biến động mật số như: mật số vi khuẩn trong đất có xu hướng tăng nhanh vào giai đoạn 0 đến 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm, sau đó, ở giai đoạn 3 đến 7 ngày mật số có xu hướng giảm dần và cuối cùng mật số vi khuẩn trong đất đạt trạng thái ổn định trong giai đoạn từ 7 đến 14 ngày bố trí thí nghiệm.

Mật số vi khuẩn đất vào thời điểm 3 ngày bố trí thí nghiệm đều tăng cao ở tất cả nghiệm thức. Điều này có thể là do các điều kiện môi trường của thí nghiệm như nhiệt độ đất, ẩm độ đất và độ thoáng khí của đất được tối ưu vì vậy mật số vi khuẩn trong đất gia tăng nhanh ở tất cả các nghiệm thức sau khi thí nghiệm được bố trí. Nghiệm thức 4 (chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do + 1% biochar) có mật số vi khuẩn cao nhất ($\log_{10} = 9,44$ (CFU/1 g đất) và khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Trong khi đó, các nghiệm thức còn lại không khác biệt thống kê khi so sánh với nhau về mật số vi khuẩn đất tại thời điểm xác định này. Điều này cho thấy việc chủng dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do kết hợp với bổ sung 1% biochar (dựa theo trọng lượng đất) vào trong đất giúp gia tăng mật số vi khuẩn đất. Việc tăng mật số vi khuẩn đất ở nghiệm thức 4 có thể giải thích một phần là do vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do được bổ sung vào và thêm vào đó cũng có thể là do biochar có khả năng cải tạo một số đặc tính đất như gia tăng pH, bổ sung dinh dưỡng và đồng thời tăng độ thoáng khí trong môi trường đất. Do đó, mật số vi khuẩn trong đất tăng lên. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Sarah và *ctv.* (2013).

So sánh mật số vi khuẩn đất vào thời điểm 7 ngày thí nghiệm cho thấy mật số ở nghiệm thức 5 (bổ sung 1% biochar có chứa sẵn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7) có mật số cao hơn so với các nghiệm thức khác, nhưng chỉ thực sự khác biệt ý nghĩa thống kê với 2 nghiệm thức không bổ sung 1% biochar là: nghiệm thức 1 (đối chứng, không bổ sung biochar) và nghiệm thức 3 (chủng vi khuẩn

Paracoccus sp. P23-7 dạng tự do). Mật số vi khuẩn đất trước khi bố trí thí nghiệm là như nhau ở hai nghiệm thức 3 và 5 ($0,64 \times 10^7$ CFUs/g đất), nghiệm thức 3 có bổ sung vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 dạng tự do ($0,5 \times 10^5$ CFU/g đất) trong khi nghiệm thức 5 chỉ bổ sung 0,5 g biochar chứa $0,1 \times 10^8$ CFUs vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar. Do đó, việc tăng mật số vi khuẩn đất ở nghiệm thức 5 có thể giải thích là do một phần vi khuẩn cố định trong biochar được phóng thích ra

ngoài môi trường đất do đó mật số vi khuẩn đất gia tăng hoặc cũng có thể là do bản thân biochar có hiệu quả trong việc làm gia tăng mật số vi khuẩn trong đất. Tuy nhiên, vào thời điểm 14 ngày thí nghiệm, mật số vi khuẩn ở nghiệm thức 5 chỉ cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 1 (đối chứng, không bổ sung biochar, $p < 0,05$). Kết quả này cho thấy việc bổ sung 1% biochar vào trong đất có hiệu quả trong việc gia tăng mật số vi khuẩn đất vào thời điểm ban đầu của thí nghiệm.



Hình 1: Diễn biến mật số vi khuẩn trong đất giữa các nghiệm thức trong 14 ngày thí nghiệm (n=4, độ lệch chuẩn)

3.2 So sánh khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur trong đất giữa các nghiệm thức thí nghiệm

Kết quả về khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur trong môi trường đất của các nghiệm thức thí nghiệm được trình bày ở Hình 2. Nhìn chung, khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur trong môi trường đất rất khác nhau giữa các nghiệm thức tại các thời điểm thu mẫu và có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Nồng độ Propoxur của: Nghiệm thức 1 (đối chứng, không bổ sung biochar) và nghiệm thức 2 (bổ sung 1% biochar) không khác biệt thống kê khi so sánh với nhau ở tất cả các thời điểm thu mẫu, ngoại trừ vào ngày thứ 14. Vì vậy, biochar đã không hấp phụ Propoxur lên trên bề mặt hoặc bên trong các lỗ hổng của nó. Bên cạnh đó, nồng độ Propoxur còn lại trong đất ở hai nghiệm thức này ở thời điểm 7 và 14 ngày thí nghiệm đều cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với 3 nghiệm thức còn lại có chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7. Điều này cho thấy dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 thật sự là dòng vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur không những

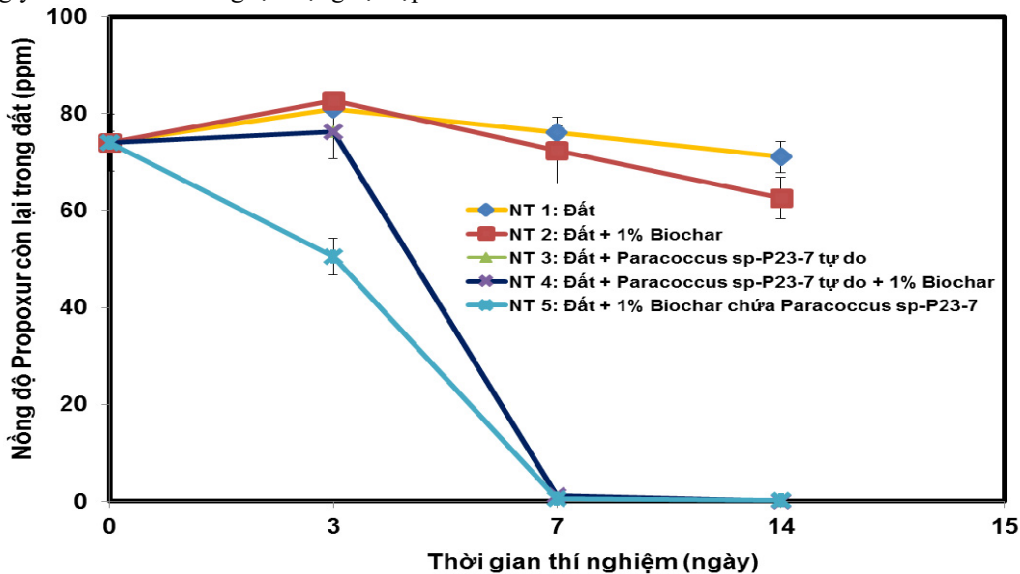
trong môi trường nuôi cấy lỏng mà còn trong môi trường đất.

Sau 3 ngày thí nghiệm chỉ duy nhất ở nghiệm thức 5 (chủng 1% biochar cố định sẵn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7) nồng độ Propoxur trong đất phân hủy còn lại là 50,46 ppm, chiếm 33% tổng nồng độ hoạt chất bị phân hủy sau 3 ngày thí nghiệm. Trong khi các nghiệm thức còn tiến trình phân hủy Propoxur trong đất chưa xảy ra. Kết quả này cho thấy việc chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 bằng cách cố định chúng bên trong biochar có hiệu quả trong phân hủy hoạt chất Propoxur trong môi trường đất và chức năng của biochar như là chất mang dùng để chủng vi sinh vật có lợi vào trong đất được chứng minh thông qua kết quả này. Việc phân hủy Propoxur trong đất không tương quan với mật số vi khuẩn trong đất ở ngày thứ 3 sau khi bố trí thí nghiệm là vì mặc dù mật số vi khuẩn ở các nghiệm thức hầu như tăng như nhau (Hình 1), nhưng chỉ duy nhất nghiệm thức 5 thể hiện khả năng phân hủy Propoxur cao. Kết quả này được giải thích là do khi vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 phân hủy chuyên biệt Propoxur bị cố định

trong biochar đã tạo ra một hệ vi sinh vật sống chung với nhau, giúp chúng tạo ra một lực tổng hợp tất cả các vi khuẩn cố định trong biochar lại với nhau để kéo Propoxur tự do trong dịch đất bằng lực hút khuếch tán nhằm chuyển khối lượng Propoxur hướng đến biochar, vì vậy, Propoxur hữu dụng di chuyển về phía biochar nhanh hơn so với từng tế bào vi khuẩn tự do trong môi trường đất và dẫn đến tốc độ phân hủy Propoxur ở nghiệm thức chúng vi khuẩn bằng cách cố định trong biochar (nghiệm thức 5) cao hơn rất nhiều so với các nghiệm thức khác. Điều này cũng được chứng minh bởi các nghiên cứu trước đây của Grundmann và ctv. (2007) và Wang và ctv. (2010). Ngoài ra, hệ vi khuẩn cố định trong biochar có thể đã hình thành biofilm, giúp bảo vệ vi khuẩn trong biochar sống sót tốt hơn trong những điều kiện bất lợi của môi trường như thiếu dinh dưỡng, thay đổi pH hoặc những yếu tố khác vì chúng tận dụng sự hợp tác và

cộng sinh lẫn nhau nhằm giúp nhau tồn tại và phát triển một cách bền vững trong hệ vi sinh vật (Wang và ctv., 2010).

Vào thời điểm 7 và 14 ngày thí nghiệm nồng độ hoạt chất Propoxur trong đất không còn được phát hiện ở các nghiệm thức có chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 ở cả nghiệm thức chúng vi khuẩn ở dạng tế bào tự do hoặc bằng biochar, trong khi cả hai nghiệm thức đối chứng (nghiệm thức 1 và 2) nồng độ hoạt chất Propoxur trong đất vẫn còn cao, nồng độ thấp nhất ở nghiệm thức 2 (bổ sung 1% biochar) là 62,62 ppm vào ngày 14 sau thí nghiệm. Kết quả này cho thấy việc chúng dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 vào trong đất thật sự có hiệu quả rất cao trong việc làm gia tăng tốc độ phân hủy hoạt chất Propoxur trong đất, tuy nhiên hiệu quả sẽ gia tăng cao hơn nữa khi vi khuẩn được chúng bằng chất mang biochar.



Hình 2: Khả năng phân hủy hoạt chất Propoxur trong môi trường đất của các nghiệm thức thí nghiệm (n=4, độ lệch chuẩn)

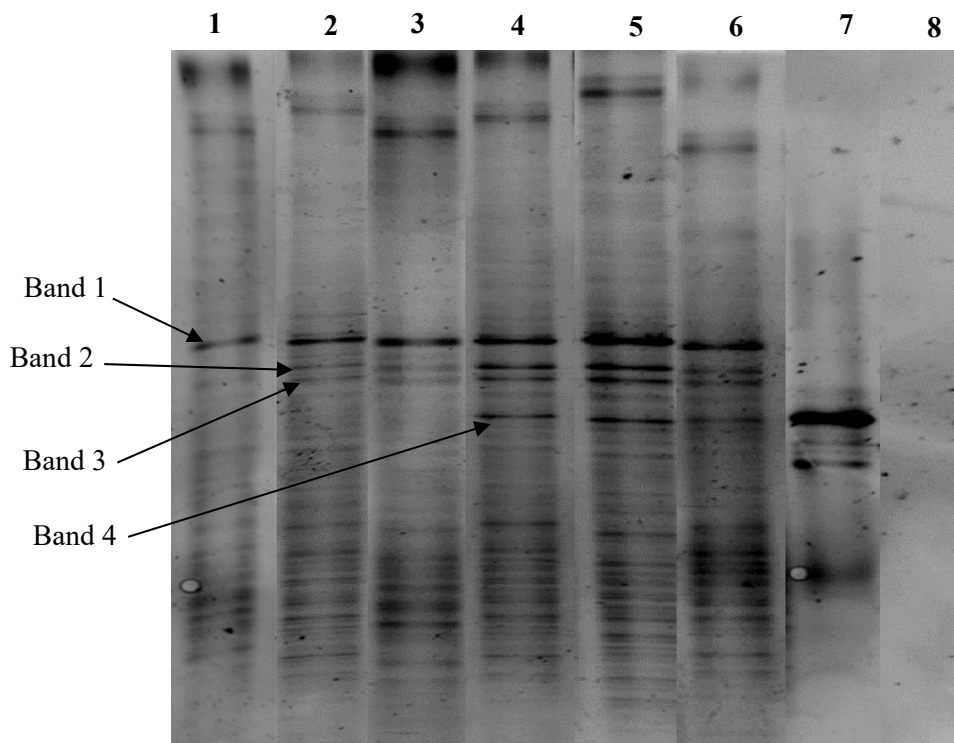
3.3 Đánh giá khả năng sống sót của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong đất thí nghiệm

DGGE là một kỹ thuật được sử dụng cho việc tách rời các đoạn DNA dựa theo sự di chuyển của chúng dưới những điều kiện biến tính tăng cấp (thường sử dụng nồng độ formamide/urea). Với kỹ thuật chuyên sâu về công nghệ sinh học phân tử này giúp cung cấp thông tin liên quan đến thành phần của hệ vi khuẩn trong môi trường đất hoặc ứng dụng để nhận dạng xem có sự hiện diện của loài vi khuẩn trong môi trường đất thông qua việc sử dụng gene chuẩn 16S của các loài đã biết trước. Trong phần nghiên cứu này, mục đích chính là

đánh giá khả năng sống sót của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 vào thời điểm kết thúc thí nghiệm trong môi trường đất. Kết quả phân tích về cấu trúc của hệ vi khuẩn trong mỗi nghiệm thức thí nghiệm được trình bày ở Hình 3. Kết quả cho thấy mẫu đất ban đầu không có sự hiện diện của dòng vi khuẩn phân hủy hoạt chất Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 (Lane 1), do không có sự hiện diện của band 4 trong Lane 1. Việc bổ sung 75 ppm hoạt chất Propoxur vào trong đất thí nghiệm giúp gia tăng sự phát triển của nhóm vi khuẩn thuộc band 1, band 2 và band 3, đặc biệt là band 1 (do cường độ màu của band 1, 2 và 3 đậm hơn ở các Lane 2, 3, 4,

5 và 6 so với Lane 1). Việc bổ sung dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 vào trong đất giúp gia tăng sự phát triển nhóm vi khuẩn thuộc band 1, 2 và 3, đặc biệt là band 2 và 3 (do cường độ màu của band 2 và 3 đậm hơn ở các Lane 4, 5 và 6 so với Lane 1, 2 và 3). Dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 được chứng minh là đã phát triển và sống sót cho đến thời điểm kết thúc thí nghiệm (14 ngày thí nghiệm) ở tất cả các nghiệm thức có chủng dòng vi khuẩn này vào đất (chủng dạng tế bào tự do hoặc cố định trong biochar) thông qua sự hiện diện band 4 trong mẫu ở các Lane 4, 5 và 6 khi so sánh và đối chiếu với đối chứng dương: DNA của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 (Lane 7). Tuy nhiên, cường độ màu của band 4 ở nghiệm thức 5 (bổ sung 1%

biochar chứa sẵn vi khuẩn, Lane 6) nhạt hơn so với các Lane khác: 4, 5 và 7. Điều này cho thấy vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 mặc dù bị cố định trong biochar nhưng chúng vẫn có thể được phóng thích ra ngoài môi trường đất với một số lượng nhỏ, và chúng vẫn có khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển bên ngoài biochar trong môi trường đất cho đến thời điểm kết thúc thí nghiệm. Tóm lại, kết quả nghiên cứu này cho thấy dòng vi khuẩn phân hủy Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 có khả năng thích nghi, sống sót, sinh trưởng, phát triển và đủ sức cạnh tranh với hệ vi sinh vật đất bản địa khi chúng được chủng vào trong đất dưới dạng tế bào tự do hoặc bị cố định trong biochar.



Hình 3: Điện di trên gel gradient biến tính (DGGE) của sản phẩm PCR 16S rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA được trích từ trong đất

Lane 1: 0 ngày thí nghiệm, Lane 2: 14 ngày thí nghiệm, nghiệm thức 1 (đối chứng, không bổ sung biochar), Lane 3: 14 ngày thí nghiệm, nghiệm thức 2 (đối chứng, bổ sung 1% biochar), Lane 4: 14 ngày thí nghiệm, nghiệm thức 3 (bổ sung vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 dạng tự do), Lane 5: 14 ngày thí nghiệm, nghiệm thức 4 (bổ sung vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 dạng tự do + 1% biochar), Lane 6: 14 ngày thí nghiệm, nghiệm thức 5 (bổ sung 1% biochar chứa sẵn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7), Lane 7: DNA của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 và Lane 8: đối chứng âm

4 KẾT LUẬN

Việc chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 vào trong môi trường đất bằng chất mang biochar có hiệu quả rất cao trong việc gia tăng tốc

độ phân hủy Propoxur và rút ngắn thời gian xử lý đất ô nhiễm với Propoxur trong đất.

Dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 vẫn có khả năng sống sót và phát triển tốt trong môi

trường đất trong điều kiện phòng thí nghiệm sau 14 ngày khi được chùng vào đất dưới dạng tế bào tự do hoặc phương pháp dùng chất mang biochar.

Biochar có chức năng như là chất mang rất hữu hiệu dùng để chùng vi khuẩn có khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 vào trong môi trường đất, biochar còn giúp bảo vệ vi khuẩn cố định bên trong sống sót trong điều kiện bất lợi của môi trường, và một số vi khuẩn có thể phóng thích và du nhập ra ngoài môi trường đất từ biochar để thích nghi, sinh trưởng, phát triển và tham gia vào chức năng phân hủy Propoxur trong môi trường đất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Hoàng Sang, Dương Minh Viễn, Đỗ Thị Xuân và Nguyễn Khởi Nghĩa., 2014. Phân lập và định danh một số dòng vi khuẩn bản địa phân hủy chuyên biệt hoạt chất propoxur từ nền đất bảo quản hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 34: 92-99.

Dominic, W; James, E; Amonette, F; Alayne, S. P; Johannes, L; Stephen, J; Amonette, S.Pt; Lehmann, J., 2010. "Sustainable biochar to mitigate global climate change". Nature Communications 1 (5): 1–9.

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)

Grundmann, S., Fuß, R., Schmid, M., Laschinger, M., Ruth, B., Schulin, R., Munch, J.C., Schroll, R., 2007. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. Chemosphere 68: 511–517.

Hoben, H.J., Somasegaran, P., 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. Appl. Environ. Microbiol., 44 (5), 1246-1247.

Ian, L.P; Charles, P.G., 2004. Environmental microbiology. Elsevier Academic Press.

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. FEMS Microbiol. Ecol., 82 (3): 666-677.

Lean, G., 2008. "Ancient skills 'could reverse global warming'". The Independent.
<http://www.rainforestportal.org/shared/reader/welcome.aspx?linkid=112433>

Nguyễn Đức Thắng., 1999. Điều tra hiện trạng canh tác, cách tồn trữ và bước đầu thử nghiệm hiệu quả một số nông dực 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.

Pleasant, B., 2000. Make biochar-This ancient technique will improve our soils.
<http://www.motherearthnews.com/Organic-Gardening/Make-Biochar-To-Improve-Your-Soil.aspx>.

Sarah, C; Simon, S; Saran, S; Tan, B.S; Stephan, H., 2013. The Impact of Biochar Application on Soil Properties and Plant Growth of Pot Grown Lettuce (*Lactuca sativa*) and Cabbage (*Brassica chinensis*). Journal of Agronomy. 3: 404-418.

Saranya1, K; Santhana, K.P; Kumutha, K; John, F., 2011. Potential for Biochar as an Alternate Carrier to Lignite for the Preparation of Biofertilizers in India. Int. Jr. of Agril., Env. and Biotech., 4 (2): 167-172.

Wang, F., Dörfler, U., Schmid, M., Fischer, D., Kinzel, L., Scherb, H., Munch, J.C., Jiang, X., Schroll, R., 2010. Homogeneous inoculation vs. microbial hot spots of isolated strain and microbial community: What is the most promising approach in remediating 1,2,4-TCB contaminated soils?. Jr. of Soil Biol. and Biochem., 42: 331–336.