

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.142

PHÂN LẬP VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CHLORATE KALI TỪ ĐẤT TRỒNG NHÃN Ở QUẬN THỐT NỐT, CẦN THƠ

Trần Thị Diệu Nguyên¹, Nguyễn Thị Quỳnh Anh² và Nguyễn Thị Phi Oanh²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 25/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 06/06/2017

Ngày duyệt đăng: 29/11/2017

Title:

Isolation of potassium chlorate degrading bacteria from longan plantation soils in Thot Not, Can Tho

Từ khóa:

Đất trồng nhãn, hóa hướng động, vi khuẩn phân hủy chlorate kali

Keywords:

Chemotaxis, longan plantation soil, potassium chlorate-degrading bacteria

ABSTRACT

Potassium chlorate is widely used as a stimulator for off-season flowering of longan. Twenty four bacterial strains were isolated from soil samples collected in a longan orchard in Thot Not district, Can Tho city in which seven strains performed higher biomass growth in minimal salt medium with $KClO_3$ (0,1 g/L) and glucose (2 g/L) added in comparison to the others. These strains are all Gram-negative bacteria. In minimal salt medium supplemented with $KClO_3$ (0,1 g/L), all seven strains showed the highest efficiency of $KClO_3$ degradation (70.4% - 77.6%) after eleven days of incubation. In minimal salt medium with $KClO_3$ (0,1 g/L) and glucose (2 g/L) addition, the effectiveness of $KClO_3$ degradation was higher (65.8% - 78.6%) after seven days of growth. Without glucose amended, strain TN3 degraded 77.6% $KClO_3$ after eleven days, however, when glucose was added, the strain could degrade 78.6% $KClO_3$ after seven days of incubation. Strains TN3 and TN34 showed movement towards $KClO_3$ in the chemotaxis test. Above all, strain TN3 is a potential candidate for bioremediation of $KClO_3$ as it has the highest efficiency of degrading $KClO_3$ and the chemotaxis activity towards $KClO_3$.

TÓM TẮT

Chlorate kali được sử dụng để kích thích ra hoa nghịch mùa ở các vùng trồng nhãn. Hai mươi bốn dòng vi khuẩn được phân lập từ đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, thành phố Cần Thơ trong đó bảy dòng vi khuẩn có khả năng tạo sinh khối cao trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung $KClO_3$ (0,1 g/L) và glucose (2 g/L), các dòng này đều là vi khuẩn Gram âm. Trong môi trường khoáng tối thiểu bổ sung $KClO_3$, các dòng vi khuẩn đạt hiệu suất phân hủy $KClO_3$ cao nhất (70,4% - 77,6%) sau 11 ngày nuôi cấy. Trong môi trường có bổ sung $KClO_3$ và glucose, hiệu suất phân hủy $KClO_3$ của các dòng vi khuẩn cao hơn, đạt 65,8% - 78,6% sau 7 ngày nuôi cấy. Dòng TN3 có hiệu suất phân hủy $KClO_3$ cao nhất trong môi trường không bổ sung glucose (77,6% sau 11 ngày nuôi cấy) và trong môi trường có bổ sung glucose (78,6% sau bảy ngày nuôi cấy). Khảo sát khả năng hóa hướng động cho thấy hai dòng vi khuẩn TN3 và TN34 có khả năng di chuyển về phía có bổ sung $KClO_3$. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ dòng TN3 phân hủy $KClO_3$ cao nhất so với các dòng vi khuẩn khảo sát và có khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$ nên TN3 được xem là dòng vi khuẩn tiềm năng cho các nghiên cứu ứng dụng về phân hủy sinh học $KClO_3$ lưu tồn trong đất.

Trích dẫn: Trần Thị Diệu Nguyên, Nguyễn Thị Quỳnh Anh và Nguyễn Thị Phi Oanh, 2017. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate kali từ đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53a: 65-73.

1 GIỚI THIỆU

Các hợp chất có gốc chlorate (ClO_3^-) hiện diện trong môi trường có nguồn gốc từ thuốc diệt cỏ, chất khai hoang trong nông nghiệp, pháo hoa, diêm và thuốc nổ (Bergnor *et al.*, 1987). Hiện nay, chlorate kali (KClO_3) được sử dụng rộng rãi để kích thích cây nhãn ra hoa nghịch mùa ở một số quốc gia như Thái Lan, Trung Quốc và Việt Nam,... đặc biệt là vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nơi sản xuất nhãn lớn nhất Việt Nam với diện tích 53.900 ha (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2008). Nồng độ KClO_3 được khuyến cáo sử dụng từ 10 - 40 g/m đường kính tán tương ứng với 70 - 210 g/cây (Manochai *et al.*, 1999), cụ thể đối với nhãn tiêu da bò là 30 g/m đường kính tán (Bùi Thị Mỹ Hồng và *ctv.*, 2004) và nhãn xoàng com vàng là 24 g/m đường kính tán (Trần Văn Hâu và Lê Văn Chấn, 2009). Tuy nhiên, khảo sát thực tế cho thấy hầu hết các khu vực trồng nhãn ở ĐBSCL, đặc biệt là Cần Thơ, hàm lượng KClO_3 được sử dụng tăng đến 800 - 1200 g/cây, vượt rất nhiều lần so với hàm lượng khuyến cáo. Chlorate là một hợp chất oxy hóa mạnh, không tự phân hủy, với hàm lượng cao có thể tồn lưu trong đất dẫn đến ô nhiễm nguồn nước từ đó ảnh hưởng đến hệ sinh thái đất, nước và sức khỏe cộng đồng (Manochai *et al.*, 2005). Các nghiên cứu đã cho thấy KClO_3 ức chế quá trình cộng sinh giữa nấm rễ và cây trồng (Li *et al.*, 2008), ức chế hệ vi sinh vật đất có tác dụng chuyển hóa nitrate thành amon (Sutigoolabud *et al.*, 2008). Ở người, chlorate ảnh hưởng đến quá trình sản xuất hormone tuyến giáp, làm cho hemoglobin mất khả năng vận chuyển oxy (Alfredo *et al.*, 2015). Chlorate còn làm cho người bị tổn thương đường tiêu hóa, suy gan, thận (NAS, 1982).

Ngày nay, bên cạnh công nghệ xử lý các chất ô nhiễm bằng phương pháp vật lý và hóa học, xử lý sinh học nhờ vào hoạt động của các vi sinh vật bản địa có nhiều ưu điểm vượt trội hơn như hiệu quả cao và thân thiện với môi trường. Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate đã được nghiên cứu như *Ideonella dechloratans* (Malmqvist *et al.*, 1994), *Azospira oryzae* GR-1 (Rikken *et al.*, 1996), *Wolinella succinogenes* HAP-1 (Wallace *et al.*, 1996) và *Dechlorimonas agitata* CKB (Bruce *et al.*, 1999) chủ yếu được phân lập từ bể xử lý nước thải. Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về các vi sinh vật có khả năng phân hủy chlorate từ đất, đặc biệt là đất trồng nhãn được công bố. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu là phân lập và khảo sát khả năng phân hủy KClO_3 của các dòng vi khuẩn từ đất trồng nhãn với thời gian sử dụng chlorate lâu năm ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ nhằm tìm ra các dòng vi sinh vật tiềm

năng để làm sạch KClO_3 trong môi trường bằng phương pháp sinh học.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thu mẫu đất

Mẫu đất mặt ở độ sâu 5 - 10 cm được thu tại vườn trồng nhãn có thời gian sử dụng KClO_3 trên 15 năm tại ấp Tân An, xã Thuận Hưng, quận Thốt Nốt, thành phố Cần Thơ. Vườn nhãn có diện tích 5.000 m² và được sử dụng KClO_3 để kích thích nhãn ra hoa với liều lượng 800 g/cây, với hai lần sử dụng trong năm. Vị trí thu mẫu được định vị bằng GPS-V, Garmin, USA với kinh độ và vĩ độ tương ứng là 1126879 và 0564335 theo hệ qui chiếu UTM, mảnh số 48P. Mẫu đất được thu ở năm điểm (bốn điểm ở bốn góc vườn và một điểm ở giữa vườn). Ở mỗi điểm, mẫu đất được thu quanh gốc nhãn trong bán kính 1 m với tâm là thân cây. Các mẫu đất được trộn đều để tiến hành thí nghiệm.

2.2 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy KClO_3

Vi khuẩn phân hủy KClO_3 được phân lập theo phương pháp chọn lọc trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO_3 (0,1 g/L). Thành phần của môi trường khoáng tối thiểu trong 1 L dung dịch gồm 1,4696 g Na_2HPO_4 ; 1,3609 g KH_2PO_4 ; 98,5 mg $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; 5,75 mg $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$; 3,2 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$; 2,75 mg $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; 1,7 mg $\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$; 1,16 mg H_3BO_3 ; 1,15 mg $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; 0,24 mg CuSO_4 ; 0,24 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2.6\text{H}_2\text{O}$ và 0,1 mg MoO_3 . Cho 5 g mẫu đất vào bình tam giác 100 mL tiệt trùng chứa 22,5 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO_3 để đạt nồng độ cuối cùng 0,1 g/L. Bình tam giác được thông khí bằng cách lắc với tốc độ 125 vòng/phút trong một tuần ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau đó, mẫu được để lắng trong 30 phút, chuyển 5 mL dung dịch mẫu từ bình sau khi lắng sang bình tam giác mới có môi trường tương tự và tiếp tục nuôi cấy như trên, quá trình này được lặp lại bốn lần (Breugelmanns and Uyttebroeck, 2004).

Ở lần chọn lọc thứ tư, dung dịch vi khuẩn được pha loãng đến nồng độ 10^{-5} (theo hệ số pha loãng 10), 50 μL dịch vi khuẩn ở từng nồng độ pha loãng được cấy trải trên môi trường tối thiểu đặc có bổ sung KClO_3 (0,1 g/L) và ủ ở 32°C trong bốn ngày. Khi các khuẩn lạc vi khuẩn phát triển, chọn những khuẩn lạc rời có đặc điểm hình thái và kích thước khác nhau để phân lập thuần bằng phương pháp cấy rìa. Độ thuần của các dòng vi khuẩn được kiểm tra bằng cách quan sát độ đồng nhất của khuẩn lạc trên môi trường tryptone soya agar (TSA). Tế bào của các dòng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học và nhuộm Gram.

2.3 Khảo sát khả năng tạo sinh khối của vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung KClO₃ và glucose

Khuẩn lạc của từng dòng vi khuẩn được chủng vào 4 mL môi trường tryptone soya broth (TSB) và nuôi cấy qua đêm. Vi khuẩn được thông khí trên máy lắc với vận tốc 125 vòng/phút trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau đó, mật độ quang của vi khuẩn (OD_{600nm}) được điều chỉnh về cùng giá trị là 0,7. Khảo sát khả năng tạo sinh khối bằng cách chủng 50μL dịch vi khuẩn vào môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO₃ (0,1 g/L) và glucose (2 g/L), mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Vi khuẩn cũng được nuôi cấy trong điều kiện tương tự như trên. Mật độ quang của vi khuẩn (OD_{600nm}) được xác định sau 2 ngày nuôi cấy.

2.4 Khảo sát khả năng phân hủy KClO₃ của vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng

Khả năng phân hủy KClO₃ của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng được khảo sát trong 7 ngày nuôi cấy. Các dòng vi khuẩn được nuôi trong bình tam giác 100 mL chứa 30 mL môi trường TSB (20 g/L) để nhân mật số vi khuẩn trước khi bố trí thí nghiệm. Bình tam giác chứa mẫu được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 125 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, tiến hành thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Sinh khối vi khuẩn được trộn đều với dung dịch NaCl 0,9%. Mật độ quang (OD_{600nm}) của từng dòng vi khuẩn được điều chỉnh về cùng giá trị là 0,7. Khảo sát khả năng phân hủy KClO₃ (0,1 g/L) của các dòng vi khuẩn phân lập được bố trí trong ống nghiệm 15 mL tiệt trùng chứa 5 mL môi trường khoáng tối thiểu có hoặc không bổ sung glucose (2 g/L). Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên gồm bốn nghiệm thức, mỗi nghiệm thức với ba lần lặp lại.

– Nghiệm thức 1: Môi trường khoáng tối thiểu bổ sung KClO₃ (0,1 g/L)

– Nghiệm thức 2: Môi trường khoáng tối thiểu bổ sung KClO₃ (0,1 g/L) và vi khuẩn (50 μL)

– Nghiệm thức 3: Môi trường khoáng tối thiểu bổ sung KClO₃ (0,1 g/L) và glucose (2 g/L)

– Nghiệm thức 4: Môi trường khoáng tối thiểu bổ sung KClO₃ (0,1 g/L), glucose (2 g/L) và vi khuẩn (50 μL)

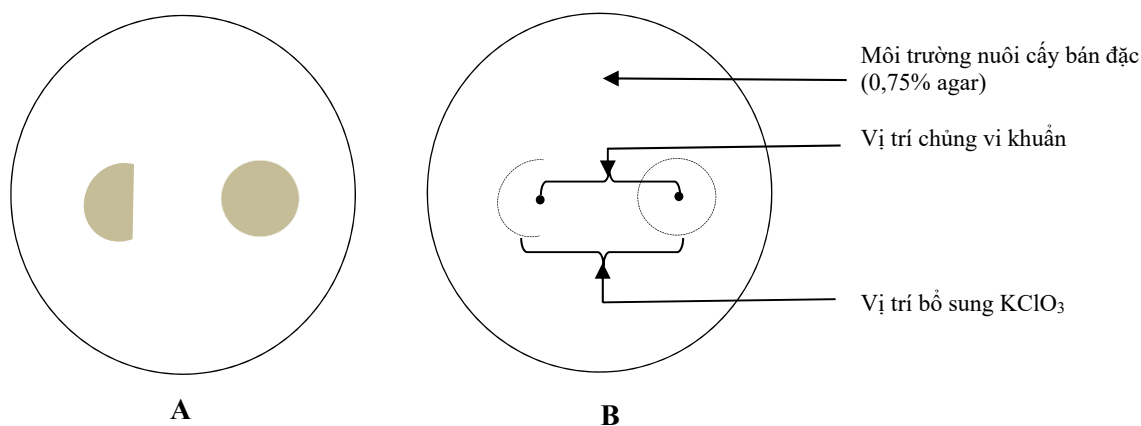
Hiệu suất phân hủy KClO₃ của các dòng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng thuốc thử indigo carmine để định lượng nồng độ KClO₃ còn lại trong môi trường nuôi cấy. Sau mỗi 48 giờ, 500 μL dịch vi khuẩn ở các nghiệm thức được thu và ly tâm với vận tốc 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Chuyển 50 μL dịch trong sau ly tâm sang eppendorf 2 mL có chứa sẵn hỗn hợp gồm 50 μL dung dịch indigo carmine, 500 μL HCl đậm đặc và 400 μL nước cất. Mẫu được trộn đều bằng cách vortex và để yên trong 30 phút. Hàm lượng KClO₃ còn lại được xác định dựa vào phản ứng giữa KClO₃ với thuốc thử indigo carmine theo nguyên tắc indigo carmine có màu xanh đậm, càng nhiều KClO₃ càng làm mất màu indigo carmine (Chiswell and Keller-Lehmann, 1993).

Phương trình đường chuẩn $y = -0,1249x + 1,2$ ($R^2 = 0,9994$) được thiết lập với nồng độ KClO₃ có giá trị từ 0 đến 9×10^{-4} M. Độ hấp thụ quang của indigo carmine (OD_{610nm}) tương ứng với các nồng độ KClO₃ được đo bằng máy quang phổ UV-VIS (Multiskan GO, Thermo Scientific).

2.5 Khảo sát khả năng hóa hướng động theo KClO₃ của vi khuẩn

Khả năng hóa hướng động của vi khuẩn theo KClO₃ được khảo sát trên môi trường khoáng tối thiểu bán đặc (0,75% agar) có bổ sung tinh thể KClO₃. Giấy lọc Whatman được cắt thành vòng tròn và nửa vòng tròn bán kính 1 cm, khử trùng và sấy khô trước khi sử dụng. Tinh thể KClO₃ được rắc thành vòng tròn hoặc nửa vòng tròn quanh bia giấy lọc đã được đặt trên môi trường nuôi cấy (Hình 1A). Sau đó, dùng kẹp gấp giấy lọc ra khỏi môi trường và chủng vi khuẩn vào tâm của vòng tròn hoặc nửa vòng tròn đã bổ sung KClO₃ (Hình 1B).

Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không rắc KClO₃, mỗi nghiệm thức được thực hiện lặp lại ba lần. Vi khuẩn được ủ trong tủ ở 32°C, sự di chuyển và hình thành sinh khối của vi khuẩn được quan sát theo thời gian. Vi khuẩn biểu hiện khả năng hóa hướng động theo KClO₃ sẽ tạo sinh khối về phía môi trường có bổ sung tinh thể KClO₃ và không tạo sinh khối về phía không có sự hiện diện của tinh thể KClO₃ (Thí nghiệm được mô phỏng theo quy trình của phòng thí nghiệm Bộ môn quản lý Đất và Nước, Đại học Leuven, Bỉ).



Hình 1: Khảo sát khả năng hóa hướng động của vi khuẩn theo KClO₃

A. Tinh thể KClO₃ được rắc quanh bì giấy lọc được đặt trên môi trường bán đặc

B. Vi khuẩn được chủng vào tâm vòng tròn và nửa vòng tròn đã bổ sung KClO₃

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy KClO₃

Sau bốn lần chọn lọc, 24 dòng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO₃ (0,1 g/L), trong đó, bảy dòng vi khuẩn gồm TN2, TN3, TN5, TN6, TN7, TN9 và TN34 có mật độ quang (OD_{600nm}) cao hơn các dòng còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO₃ (0,1 g/L) và glucose (2 g/L) sau 2

ngày nuôi cấy (Bảng 1). Chính vì vậy, bảy dòng vi khuẩn có khả năng tạo sinh khối cao được sử dụng để khảo sát hiệu suất phân hủy KClO₃ và khả năng hóa hướng động theo KClO₃. Về đặc điểm hình thái, sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA, bảy dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng hoặc vàng, bìa nguyên, độ nổi mô, đường kính trung bình từ 0,5 - 2 mm. Tế bào của bảy dòng vi khuẩn đều có dạng que ngắn, Gram âm và có khả năng chuyển động.

Bảng 1: Mật độ quang (OD_{600nm}) của các dòng vi khuẩn sau 2 ngày nuôi cấy

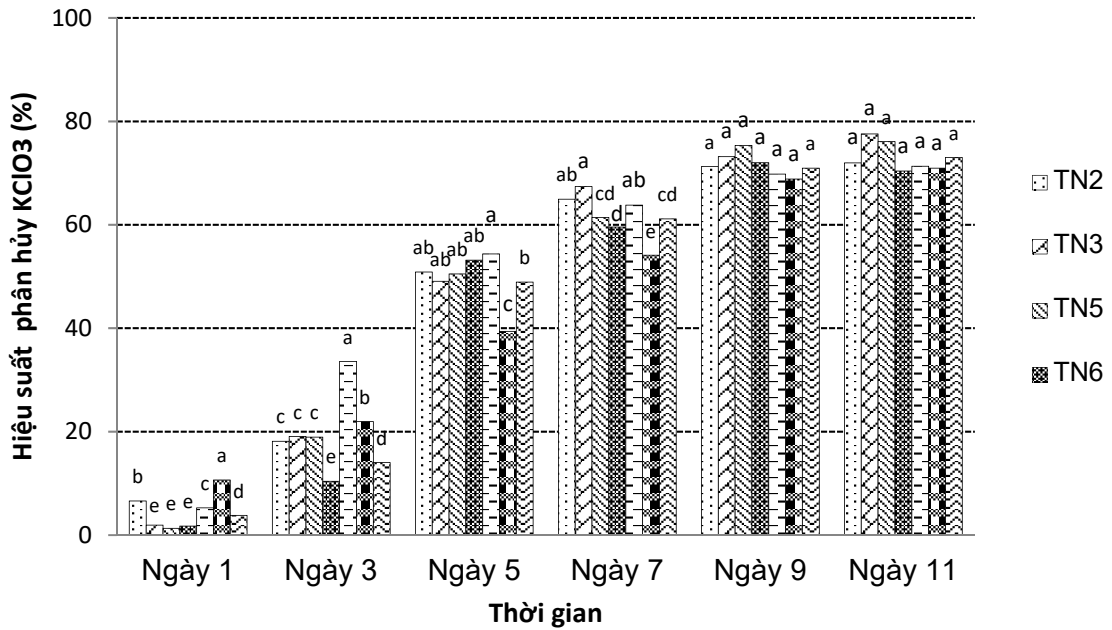
Vi khuẩn	TN2	TN3	TN5	TN6	TN7	TN9	TN34
OD _{600nm}	0,6 ± 0,14	0,56 ± 0,09	0,52 ± 0,08	0,47 ± 0,16	0,4 ± 0,02	0,6 ± 0,09	0,5 ± 0,09

3.2 Khả năng phân hủy KClO₃ của vi khuẩn

3.2.1 Trong môi trường nuôi cấy không bổ sung glucose

Khả năng phân hủy KClO₃ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO₃ (0,1 g/L) của bảy dòng vi khuẩn được khảo sát trong 11 ngày nuôi cấy. Sau một ngày, hiệu suất phân hủy KClO₃ của các dòng vi khuẩn còn thấp, trong đó dòng TN9 phân hủy KClO₃ đạt 10,6%, khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Sau ba ngày, dòng TN7 phân hủy KClO₃ cao nhất (33,6%). Ở ngày thứ năm, hiệu suất phân hủy KClO₃ của tất cả bảy dòng tăng cao (39,4% - 54,4%), trong đó dòng

TN7 phân hủy KClO₃ cao nhất (54,4%) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Khả năng phân hủy KClO₃ của các dòng vi khuẩn tiếp tục tăng sau bảy ngày nuôi cấy, trong đó dòng TN3 có hiệu suất phân hủy cao nhất (67,4%). Đến ngày thứ chín, sự phân hủy KClO₃ vẫn tăng, tuy nhiên hiệu suất phân hủy giữa các dòng khác biệt không có ý nghĩa thống kê (68,8% - 75,4%). Sau thời điểm này, sự phân hủy KClO₃ tăng không đáng kể. Sau 11 ngày nuôi cấy, các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy KClO₃ từ 70,4% - 77,6%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%, trong đó dòng TN3 phân hủy KClO₃ cao nhất, đạt 77,6% (Hình 2).

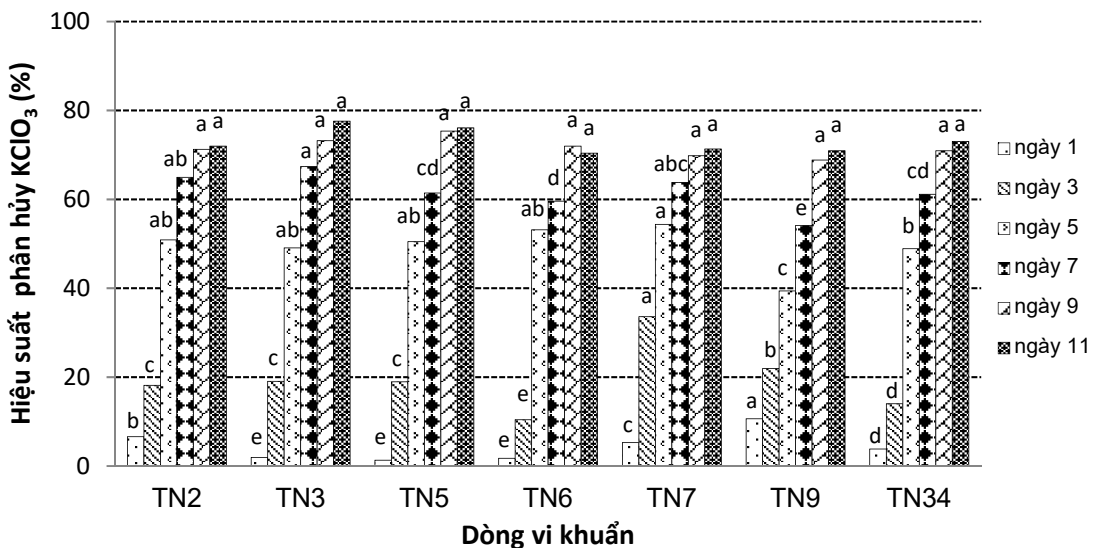


Hình 2: Hiệu suất phân hủy KClO₃ theo thời gian trong môi trường không bổ sung glucose

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Kết quả nghiên cứu cho thấy cả bảy dòng vi khuẩn đều có hiệu suất phân hủy KClO₃ tăng theo thời gian. Trong đó, dòng TN3 có khả năng phân

hủy KClO₃ cao hơn các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 3).



Hình 3: Hiệu suất phân hủy KClO₃ của các dòng vi khuẩn trong môi trường không bổ sung glucose

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%

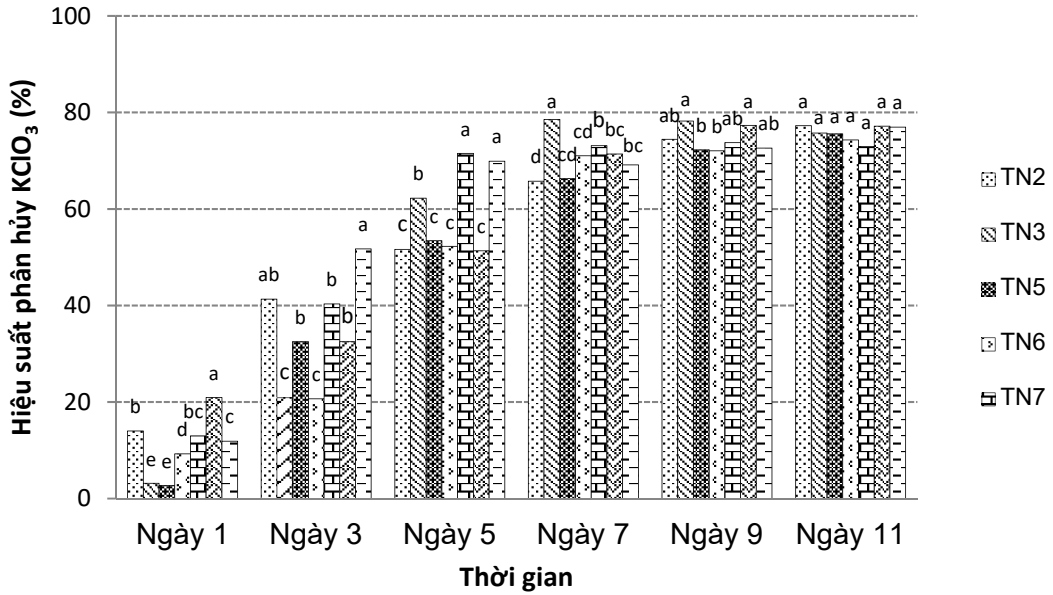
3.2.2 Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung glucose

Trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO₃ và glucose, khả năng phân hủy KClO₃ của

các dòng vi khuẩn còn thấp sau một ngày nuôi cấy, trong đó dòng TN9 phân hủy KClO₃ cao hơn các dòng còn lại (20,9%). Sau ba ngày, dòng TN34 đạt hiệu suất phân hủy KClO₃ cao nhất (51,7%) khác

biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Đến ngày năm, hiệu suất phân hủy $KClO_3$ tăng (51,3% - 71,5%), cao nhất là dòng TN7 (71,5%) và dòng TN34 (69,9%). Hiệu suất phân hủy $KClO_3$ của các dòng vi khuẩn tăng cao sau bảy ngày nuôi cấy, trong đó dòng TN3 phân hủy cao nhất (78,6%)

khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Từ ngày 9 đến ngày 11, hiệu suất phân hủy $KClO_3$ tăng không đáng kể. Sau 11 ngày nuôi cấy, sự phân hủy $KClO_3$ ở các dòng vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Hình 4).

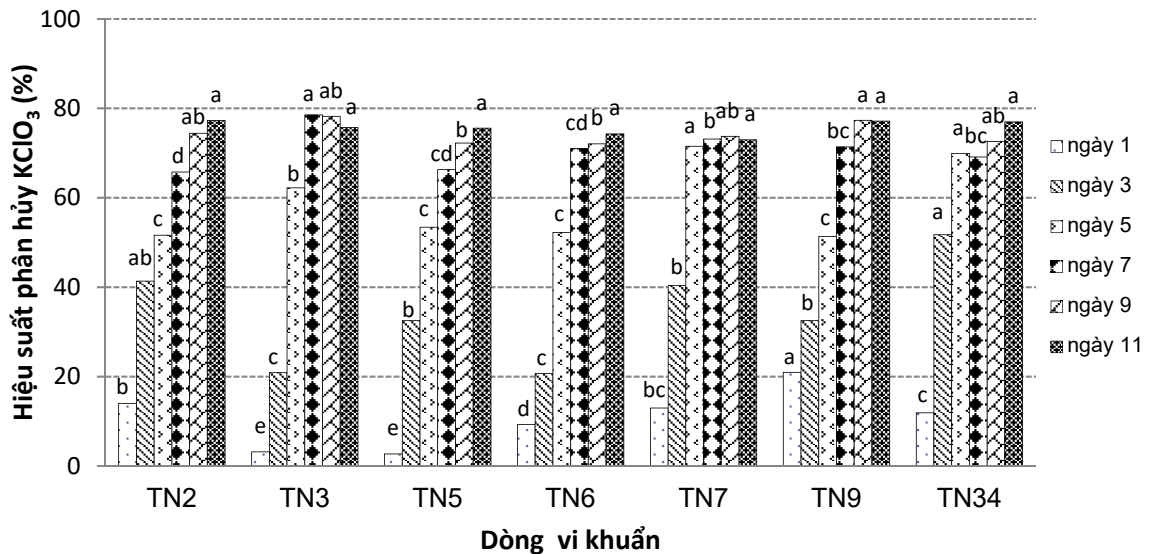


Hình 4: Hiệu suất phân hủy $KClO_3$ theo thời gian trong môi trường có bổ sung glucose

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Nhìn chung, hiệu suất phân hủy ở hầu hết bảy dòng vi khuẩn đều tăng sau 11 ngày nuôi cấy. Trong đó, dòng TN3 có khả năng phân hủy $KClO_3$

cao nhất sau 7 ngày nuôi cấy (78,6%) so với các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 5).



Hình 5: Hiệu suất phân hủy $KClO_3$ của các dòng vi khuẩn trong môi trường có bổ sung glucose

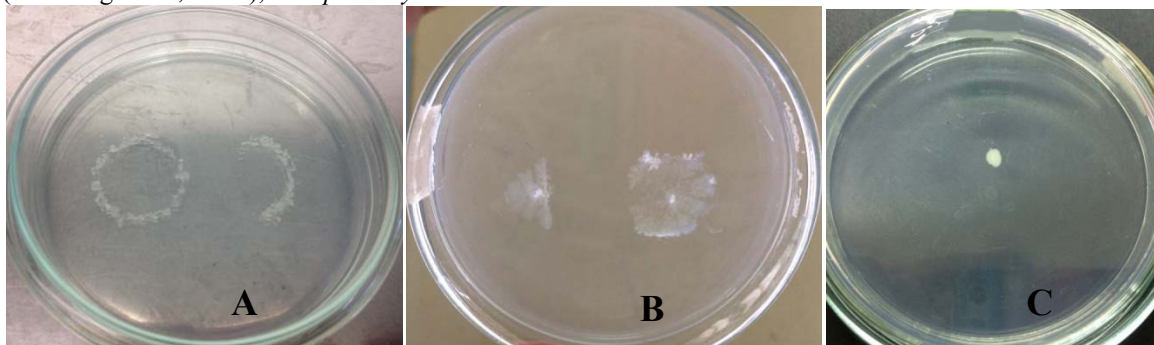
Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glucose, các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy $KClO_3$ nhanh hơn (78,6% sau bảy ngày nuôi cấy) so với nghiệm thức không bổ sung glucose (77,6% sau 11 ngày nuôi cấy). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sutigoolabud *et al.* (2004), glucose có thể tăng cường khả năng phân hủy chlorate trong môi trường bằng cách làm tăng số lượng và hoạt tính của các vi sinh vật phân hủy chlorate. Ở các dòng vi khuẩn này, chlorate đóng vai trò là chất nhận điện tử trong khi glucose là chất cho điện tử trong quá trình hô hấp tế bào của vi khuẩn phân hủy chlorate (Van Ginkel *et al.*, 1995). Sự dồi dào về nguồn cung cấp điện tử (glucose) làm cho chất nhận điện tử ($KClO_3$) hoạt động hiệu quả hơn nhờ vào chuỗi dẫn truyền điện tử hiện diện trong tế bào vi khuẩn. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh vi khuẩn *Azospira* sp. KJ và *Pseudomonas* sp. PDA có thể phân hủy chlorate ở nồng độ 10 mM (Steinberg *et al.*, 2005), *Azospira oryzae* GR-1 có

thể phân hủy 18,8 mM chlorate (Kengen *et al.*, 1999), thậm chí vi khuẩn *Dechlorimonas agitata* CKB có thể phát triển trong môi trường có nồng độ chlorate lên đến 80 mM (Bruce *et al.*, 1999). Trong nghiên cứu này, các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate kali ở nồng độ 1 mM, thấp hơn nhiều so với các nghiên cứu trước đây. Vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate kali ở nồng độ rất thấp là những dòng vi khuẩn tiềm năng cho các nghiên cứu ứng dụng để xử lý $KClO_3$ tồn lưu trong đất.

3.3 Khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$ của vi khuẩn

Trong bảy dòng vi khuẩn khảo sát, TN3 và TN34 có khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$. Cả hai dòng vi khuẩn đều tạo sinh khối về phía $KClO_3$ khi $KClO_3$ được bổ sung ở nửa vòng tròn và cả vòng tròn (Hình 6B). Ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung $KClO_3$, các dòng vi khuẩn chỉ tạo sinh khối tại vị trí chủng ban đầu (Hình 6C).



Hình 6: Khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$ của dòng vi khuẩn TN34

- A. Môi trường có bổ sung $KClO_3$ ở nửa vòng tròn và cả vòng tròn trước khi chủng vi khuẩn
- B. Sau khi chủng, vi khuẩn tạo sinh khối về phía có bổ sung $KClO_3$
- C. Đối chứng không có $KClO_3$, vi khuẩn chỉ tạo sinh khối tại vị trí chủng ban đầu

Trong đất, các hợp chất hóa học thường phân bố không đều do chúng ít tan trong nước và bám vào các phân tử đất làm cho vi sinh vật khó tiếp xúc và phân hủy. Chính vì vậy, hóa hướng động là một đặc tính thuận lợi giúp vi sinh vật có thể di chuyển về phía các hợp chất mà chúng có khả năng phân hủy (Grimm and Harwood, 1997). Pandey and Jain (2002) đã chứng minh các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy các hợp chất ô nhiễm như hydrocarbon một vòng và đa vòng thơm, alkan, nitroaromatics và các loại thuốc trừ sâu gốc chlor cũng thể hiện khả năng hóa hướng động theo các hợp chất này. Chẳng hạn, vi khuẩn *Novosphingobium* sp. KN65.2 có khả năng phân hủy hiệu quả và hóa hướng động theo chất diệt côn trùng carbofuran (Nguyễn Thị Phi Oanh *et al.*, 2014). Ngoài ra, các dòng vi khuẩn như *Pseudomonas stutzeri* E1, *Pseudomonas* sp. E7 và

Novosphingobium subarcticum E6 có khả năng phân hủy phenanthrene cũng được chứng minh có khả năng hóa hướng động theo hydrocarbon đa vòng thơm này (Bijdekerke, 2004; Sniegowski, 2005). Trong nghiên cứu này, dòng TN3 và TN34 có khả năng phân hủy và hóa hướng động theo $KClO_3$, trong đó dòng TN3 phân hủy $KClO_3$ hiệu quả nhất. Chính vì vậy, dòng vi khuẩn TN3 có thể xem là dòng vi khuẩn tiềm năng cho các nghiên cứu ứng dụng về xử lý $KClO_3$ trong đất.

4 KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất thu tại vườn nhãn có sử dụng $KClO_3$ để kích thích nhãn ra hoa trái vụ thuộc quận Thốt Nốt, Cần Thơ, 24 dòng vi khuẩn được phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung $KClO_3$, trong đó bảy dòng vi khuẩn tạo sinh khối cao trong môi trường có bổ sung $KClO_3$ và glucose

so với các dòng còn lại đã được tuyển chọn. Trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung $KClO_3$, bảy dòng vi khuẩn đạt hiệu suất phân hủy $KClO_3$ cao nhất sau 11 ngày nuôi cấy (70,4% - 77,6%). Khi môi trường nuôi cấy có bổ sung $KClO_3$ và glucose, hiệu suất phân hủy $KClO_3$ của các dòng vi khuẩn cao nhất sau bảy ngày nuôi cấy (65,8% - 78,6%). Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng TN3 có khả năng phân hủy $KClO_3$ cao hơn so với các dòng vi khuẩn còn lại trong môi trường có hoặc không có bổ sung glucose đồng thời có khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alfredo, K., Stanford, B., Roberson, J.A. and Eaton, A., 2015. Chlorate challenges for water systems. *Journal AWWA*, 107(4): E187.
- Bergnor, E., Germgard, U., Kolar, J.J. and Lindgren, B.O., 1987. Formation of chlorate in chlorine dioxide bleaching. *Cellulose chemistry and technology*, 21(3): 307-314
- Bijdekerke, K., 2004. Pollutant driven motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria in soil. MSc thesis. Laboratory of soil and water management and Centre of microbial and plant genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, KULeuven.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn - Cục Trồng trọt, 2008. Báo cáo hiện trạng và giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn quả các tỉnh phía Nam trong thời gian tới. Hội nghị đánh giá hiện trạng và bàn giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn quả các tỉnh phía Nam, trang 138-157.
- Bruegelmans, P. and Uyttebroeck, M., 2004. Protocol for DNA extraction and purification. Laboratory of soil and water management, KULeuven.
- Bruce, R. A., Achenbach, L.A. and Coates, J.D., 1999. Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from paper mill waste. *Environmental Microbiology*, 1(4): 319-329.
- Bùi Thị Mỹ Hồng, Trần Nguyễn Liên Minh và Nguyễn Minh Châu, 2004. Ảnh hưởng của biện pháp khoan vô và chlorate kali đến sự ra hoa trên cây nhãn tiêu da bò. Báo cáo tổng kết thí nghiệm Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam.
- Chiswell, B. and Keller-Lehmann, B., 1993. Spectrophotometric method for the determination of chlorite and chlorate. *Analyst*, 118(11): 1457-1459.
- Grimm, A.C. and Harwood, C.S., 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 4111-4115.
- Kengen, S.W., Rikken, G.B., Hagen, W.R., Van Ginkel, C.G. and Stams, A.J., 1999. Purification and characterization of (per)chlorate reductase from the chlorate-respiring strain GR-1. *Journal of Bacteriology*, 181(21): 6706-6711.
- Li, H., Zhang, X., Lin, C. and Wu, Q., 2008. Toxic effects of chlorate on three plant species inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3): 700-705.
- Malmqvist, A., Welander, T., Moore, E., Ternstrom, A., Molin, G. and Stenstrom, I.M., 1994. *Ideonella dechloratans* gen. nov., sp. nov., a new bacterium capable of growing anaerobically with chlorate as an electron acceptor. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(1): 58-64.
- Manochai, P., Srumsiri, P., Wiriya-Alongkorn, W., Naphrom, D., Hegele, M. and Bangerth, F., 2005. Year around off season flower induction in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) trees by $KClO_3$ applications: potentials and problems. *Scientia Horticulturae*, 104(4): 379-390.
- Manochai, P., Suthon, W., Wiriya-alongkom, W., Ussahatanonta, S. and Jarassamrit, N., 1999. Effect of potassium chlorate on flowering of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) cv. E-daw and Sri-Chompoo. Seminar report on plant regulators, off-season crop production. National Research Council of Thailand, pp. 1-8.
- NAS (National Academy of Sciences), 1982. Drinking water and health, Vol. 4. National Academies Press, Washington.
- Nguyen Thi Phi Oanh, Helbling D.E., Bers K., Fida T.T., Wattiez R., Kohler H.P.E., Springael D. and De Mot R., 2014. Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65.2. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98(19): 8235-8252.
- Pandey, G. and Jain, R.K., 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 5789-5795.
- Rikken, G.B., Kroon, A.G.M. and Van Ginkel, C.G., 1996. Transformation of (per)chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3): 420-426.
- Sniegowski, K., 2005. Motility of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading bacteria in soil: role of chemotaxis. MSc thesis. Laboratory of Soil and water management and Centre of microbial and plant genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, KULeuven.
- Steinberg, L.M., Trimble, J.J. and Logan, B.E., 2005. Enzymes responsible for chlorate reduction by *Pseudomonas* sp. are different from those used for perchlorate reduction by *Azospira* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 247(2): 153-159.
- Sutigoolabud, P., Mizuno, T., Ongprasert, S., Karita, S., Takahashi, T., Obata, H. and Senoo, K., 2008. Effect of chlorate on nitrification in longan plantation soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(3): 387-392.

- Sutigoolabud, P., Senoo, K., Ongprasert, S., Mizuno, T., Tanaka, A., Obata, H. and Hisamatsu, M., 2004. Decontamination of chlorate in longan plantation soils by bio-stimulation with sugar amendment. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(2): 249-256.
- Trần Văn Hâu và Lê Văn Chấn, 2009. Ảnh hưởng của chlorate kali và biện pháp khoan canh đến sự ra hoa và năng suất nhân xuống com vàng (*Dimocarpus longan* L.) tại Châu Thành - Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 11: 432-441.
- Van Ginkel, C.G., Plugge, C.M. and Stroo, C.A., 1995. Reduction of chlorate with various energy substrates and inocula under anaerobic conditions. *Chemosphere*, 31(9): 4057-4066
- Wallace, W., Ward, T., Breen, A. and Attaway, H., 1996. Identification of an anaerobic bacterium which reduces perchlorate and chlorate as *Wolinella succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(1): 68-72.