

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN TRONG ĐẤT TRỒNG LÚA CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY THUỐC TRỪ SÂU CHỨA HOẠT CHẤT FENOBUCARB

Bùi Nhi Bình¹ và Nguyễn Thị Phi Oanh^{2*}

¹Lớp Cao học Công nghệ Sinh học khóa 24, Trường Đại học Cần Thơ

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

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Phi Oanh (email: ntpoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/09/2019

Ngày nhận bài sửa: 25/10/2019

Ngày duyệt đăng: 25/12/2019

Title:

Isolation and identification of fenobucarb degrading bacteria in rice paddy soils

Từ khóa:

Burkholderia arboris, đất lúa, fenobucarb, *Micrococcus terreus*, phân hủy sinh học

Keywords:

Biodegradation, *Burkholderia arboris*, fenobucarb, *Micrococcus terreus*, rice paddy soil

ABSTRACT

Fenobucarb has been widely used to control insects in rice paddy fields. This insecticide is shown to pose toxic effects on aquatic animals due to its inhibition on the normal activity of cholinesterase. This study aimed to isolate, screen and identify indigenous bacteria capable of degrading fenobucarb in the rice paddy soils. Twenty bacterial isolates able to grow on minimal medium supplemented with fenobucarb 100 mg/L as sole carbon source were isolated from eight soil samples collected from rice paddy soils of Co Do and Vinh Thanh district, Can Tho. Two isolates CD5.2 and CD5.3 obtained from Co Do fields showed the higher fenobucarb degradation with the efficiency of 58.2% and 60.1%, respectively, after nine days of incubation. Based on 16S-rRNA gene sequence analysis and biochemical characterization including activities of gelatinase, urease, oxidase, citrate assimilation and sugar fermentation, isolates CD5.2 and CD5.3 were genetically identified as *Burkholderia arboris* CD5.2 and *Micrococcus terreus* CD5.3, respectively.

TÓM TẮT

Hoạt chất fenobucarb được sử dụng phổ biến để diệt rầy nâu trên ruộng lúa. Khi lưu tồn trong đất hoặc bị rửa trôi vào môi trường nước, fenobucarb gây độc đến các loài động vật thủy sinh do làm giảm hoạt tính của enzyme cholinesterase. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và nhận diện các dòng vi khuẩn bản địa trong đất trồng lúa có khả năng phân hủy hiệu quả fenobucarb. Hai mươi dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung fenobucarb 100 mg/L như nguồn carbon duy nhất đã được phân lập từ 8 mẫu đất tại huyện Cờ Đỏ và Vĩnh Thạnh, Cần Thơ. Hai dòng vi khuẩn CD5.2 và CD5.3 được phân lập từ đất trồng lúa ở Cờ Đỏ có khả năng phân hủy fenobucarb hiệu quả hơn so với các dòng còn lại, đạt 58,2% và 60,1% sau 9 ngày nuôi cấy. Dựa vào trình tự gen 16S-rRNA và các đặc điểm sinh hóa như hoạt tính gelatinase, urease, oxidase, đồng hóa citrate và lên men đường, hai dòng vi khuẩn CD5.2 và CD5.3 được định danh khoa học lần lượt là *Burkholderia arboris* CD5.2 và *Micrococcus terreus* CD5.3.

Trích dẫn: Bùi Nhi Bình và Nguyễn Thị Phi Oanh, 2019. Phân lập, tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn trong đất trồng lúa có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu chứa hoạt chất fenobucarb. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(6A): 9-17.

1 GIỚI THIỆU

Fenobucarb ($C_{12}H_{17}NO_2$) là hoạt chất thuộc nhóm carbamate được sử dụng làm thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) để trừ rầy nâu trên ruộng lúa. Ở người, khi bị phơi nhiễm thuốc BVTV nhóm carbamate dẫn đến gia tăng các bệnh liên quan đến sự thay đổi miễn dịch như quá mẫn cảm, bệnh tự miễn và ung thư. Nhóm carbamate ảnh hưởng đến con người qua nhiều cách khác nhau như ức chế hoạt động của enzyme acetyl cholinesterase xúc tác sự dẫn truyền xung động của tế bào thần kinh, kích thích gây oxy hóa hay tác động đến hệ nội tiết. Cơ chế chính gây ra rối loạn miễn dịch là sự oxy hóa và ức chế hoạt động của enzyme cholinesterase (Dhouib *et al.*, 2016). Các nghiên cứu xác định khả năng gây chết 50% (LC_{50}) của fenobucarb đối với một số loài cá ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) cho thấy fenobucarb gây độc với cá rô và cá chép, cực độc đối với cá lóc (Nguyen *et al.*, 2008; Nguyễn Trọng Hồng Phúc, 2009; Võ Thị Yên Lam, 2011).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn được phân lập từ đất nông nghiệp đã từng tiếp xúc với thuốc BVTV thuộc nhóm carbamate có khả năng phân hủy các loại thuốc này. Chẳng hạn, vi khuẩn *Novosphingobium* sp. KN65.2 được phân lập từ đất trồng rẫy có khả năng phân hủy carbofuran (Shin, 2012; Nguyen *et al.*, 2014), vi khuẩn *Pseudomonas* sp. CT-VT7, *Acinetobacter* sp. CT-VT9 và *Stenotrophomonas* sp. CT-VT13 được phân lập từ đất trồng lúa có khả năng phân hủy carbendazim (Le *et al.*, 2017). Theo Kim *et al.* (2014), vi khuẩn có khả năng phân hủy fenobucarb đã được phân lập từ đất trồng lúa thuộc các chi *Sphingobium* và *Novosphingobium*. Ngoài ra, enzyme carbaryl hydrolase liên quan đến sự phân hủy carbaryl ở vi khuẩn *Blastobacter* sp. M501, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter* sp. RC100 cũng đã được nghiên cứu (Chapalmadugu and Chaudhry, 1993; Hayatsu and Nagata, 1993; Hayatsu *et al.*, 2001).

ĐBSCL là vùng sản xuất lúa trọng điểm của cả nước. Nhằm đáp ứng nhu cầu xuất khẩu lúa và an ninh lương thực cho vùng, việc thâm canh tăng vụ và sử dụng thuốc BVTV là không thể tránh khỏi. Mặc dù thuốc BVTV thuộc nhóm carbamate được sử dụng phổ biến ở ĐBSCL (Phạm Văn Toàn, 2013), cho đến nay chỉ có nghiên cứu về sự phân hủy sinh học thuốc trừ sâu carbofuran trong đất trồng rẫy (Nguyen *et al.*, 2014) và thuốc diệt nấm carbendazim trong đất trồng lúa (Le *et al.*, 2017), chưa có nghiên cứu nào về sự phân hủy sinh học

fenobucarb đã được công bố. Chính vì vậy, phân lập, tuyển chọn và nhận diện các dòng vi khuẩn bản địa trong đất trồng lúa ở Cần Thơ có khả năng phân hủy fenobucarb là cần thiết để làm tiền đề cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo về xử lý sinh học fenobucarb tồn lưu trong môi trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy fenobucarb

Tám mẫu đất được thu tại các ruộng lúa ở năm xã gồm Thới Xuân, Thới Đông, Đông Thắng, Đông Hiệp, Thạnh Phú thuộc huyện Cờ Đỏ và ở ba xã gồm Thạnh Lộc, Thạnh Tiến, Thạnh An thuộc huyện Vĩnh Thạnh, Cần Thơ. Ở mỗi xã, một ruộng lúa có lịch sử sử dụng fenobucarb hơn 5 năm được chọn để thu mẫu. Tại mỗi ruộng, năm mẫu đất được thu, trong đó bốn mẫu được thu ở bốn góc ruộng và một mẫu được thu ở giữa ruộng. Năm mẫu đất sau khi thu được trộn đều bằng bay (spatula) trong mâm sạch và sau đó thu lấy một mẫu đất đại diện để phân lập vi khuẩn. Các bước phân lập vi khuẩn được thực hiện như sau: cho 5 g mẫu đất vào bình tam giác 100 mL chứa 50 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) có bổ sung fenobucarb 100 mg/L (Sigma-Aldrich, 96,5%). Thành phần của môi trường MM gồm 1,4196 g Na_2HPO_4 ; 1,3609 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,0985 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5,75 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 3,2 mg Na_2 . EDTA; 2,75 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,7 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1,16 mg H_3BO_3 ; 1,15 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,24 mg $CuSO_4$; 0,24 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 mg MoO_3 ; 1000 mL nước cất. Mẫu được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau một tuần, chuyển 5 mL dung dịch đất sang môi trường MM mới có bổ sung 100 mg/L fenobucarb và tiếp tục nuôi cấy như trên trong một tuần (chọn lọc lần hai). Thí nghiệm được tiến hành tương tự cho lần chọn lọc thứ ba. Sau ba lần chọn lọc, 1 mL huyền phù vi khuẩn được pha loãng bằng dung dịch NaCl 9‰ đến độ pha loãng 10^{-4} . Sau đó trải 100 μ L mẫu của từng độ pha loãng lên các đĩa môi trường MM đặc có bổ sung 100 mg/L fenobucarb và ủ ở $32^\circ C$. Sau ba ngày nuôi cấy, chuyển từng khuẩn lạc phát triển riêng rẽ sang môi trường MM đặc có bổ sung fenobucarb (100 mg/L). Sau ba ngày, tuyển chọn những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái để phân lập thuần bằng phương pháp cấy ria trên môi trường Trypticase soy agar (TSA: 15g TSB (Himedia), 15g agar, 1000 mL nước cất). Vi khuẩn sau khi phân lập thuần được mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào sau ba ngày nuôi cấy trên môi trường TSA.

2.2 Xác định khả năng tạo sinh khối của vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung fenobucarb

Sau 48 giờ nuôi cấy, các khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện trên môi trường TSA. Chúng một khuẩn lạc riêng lẻ của mỗi dòng vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 4 mL môi trường Trypticase soy broth (15g TSB, 1000 mL nước cất). Mẫu được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 12 giờ. Sau đó, mật độ quang của từng dòng vi khuẩn được điều chỉnh về giá trị $OD_{600nm} = 0.8$. Chúng 10 μ L huyền phù của mỗi dòng vi khuẩn vào các ống nghiệm có chứa 4 mL môi trường MM lỏng có bổ sung fenobucarb 100 mg/L, nghiệm thức đối chứng có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung fenobucarb. Mẫu được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau bảy ngày nuôi cấy, ghi nhận sự tạo thành sinh khối của các dòng vi khuẩn từ đó tuyển chọn các dòng vi khuẩn có sự khác biệt về sinh khối (độ đục) giữa hai nghiệm thức có và không bổ sung fenobucarb để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.3 Khảo sát khả năng phân hủy fenobucarb của vi khuẩn

Chúng một khuẩn lạc (sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA) của mỗi dòng vi khuẩn đã được tuyển chọn từ kết quả của thí nghiệm ở Mục 2.2 vào 2 mL môi trường TSB. Vi khuẩn được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 12 giờ. Sau đó, mật độ quang của từng dòng vi khuẩn được điều chỉnh về giá trị $OD_{600nm} = 0.8$. Chúng 10 μ L huyền phù của mỗi dòng vi khuẩn vào các ống nghiệm có chứa 4 mL môi trường MM có bổ sung 100 mg/L fenobucarb. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mật độ quang (OD_{600nm}) của vi khuẩn và hàm lượng fenobucarb còn lại trong môi trường được xác định ở thời điểm 1, 3, 5, 7 và 9 ngày nuôi cấy.

Phương pháp xác định fenobucarb: Tại mỗi thời điểm khảo sát, các mẫu được trộn đều (vortex) với tốc độ 2.500 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, chuyển 500 μ L môi trường MM có chứa vi khuẩn vào eppendorf, ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. Chuyển phần dịch trong sau khi ly tâm sang eppendorf mới có bổ sung 500 μ L dichloromethane. Sau đó, vortex mẫu 2.500 vòng/phút trong 5 giây, dung dịch sau vortex được phân thành hai lớp. Sử dụng micropipet hút và loại bỏ phần dung dịch phía trên, thu lấy phần dung dịch bên dưới. Dung dịch thu được sau ly tâm được đặt trong tủ cấy vô trùng để dichloromethane bay hơi hoàn toàn, phần còn lại là fenobucarb. Hòa tan fenobucarb trong 200 μ L acetonitrile. Hàm lượng fenobucarb trong mẫu được định lượng bằng

phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC ULTIMATE 3000, Thermo Scientific). Các thông số phân tích bao gồm: cột sắc ký C_{18} , nhiệt độ lò 35°C, tốc độ dòng 1 mL/phút, pha động gồm acetonitrile và nước với tỉ lệ 50:50. Thời gian lưu của fenobucarb là 5,7 phút và được phát hiện ở bước sóng 210 nm (Kim *et al.*, 2014).

2.4 Định danh khoa học các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy hiệu quả fenobucarb

Phương pháp sinh học phân tử

Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy fenobucarb hiệu quả được cấy trên môi trường TSA, ủ ở 32°C trong 72 giờ. Khuẩn lạc của vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB. ADN của vi khuẩn được trích bằng phương pháp phenol-chloroform sử dụng bộ iVAaDNA Extraction Kit P (VA.A92-002A) của Công ty cổ phần Việt Á.

Cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGA-CTT-3') (Frank *et al.*, 2008) được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA. Thành phần của một phản ứng PCR 25 μ L gồm 12,5 μ L master mix; 0,25 μ L mỗi loại mồi (0,25 μ M); 5 μ L ADN; 7 μ L nước khử khoáng vô trùng. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR gồm 95°C (6 phút); 40 chu kỳ nhân số lượng DNA với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 5°C (30 giây), 55°C (30 giây), 72°C (30 giây); và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5% (Merck) và được giải trình tự tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc) bằng phương pháp Sanger. Trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm Geneious và được so sánh với gen tương ứng trong ngân hàng dữ liệu của NCBI sử dụng công cụ BlastN.

Phương pháp sinh hóa

Dựa vào sự tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn phân lập với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu, các dòng vi khuẩn được khảo sát một số đặc điểm sinh hóa đặc trưng dựa vào khóa phân loại của Bergey để làm cơ sở cho định danh khoa học đến bậc phân loại loài. Các đặc điểm sinh hóa được phân tích bao gồm: hoạt tính gelatinase, hoạt tính catalase, hoạt tính oxidase, lên men đường, thủy phân tinh bột và xác định Gram bằng phương pháp String test (Dash and Rajan; 2016).

2.5 Xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel 2013 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 16 được dùng để

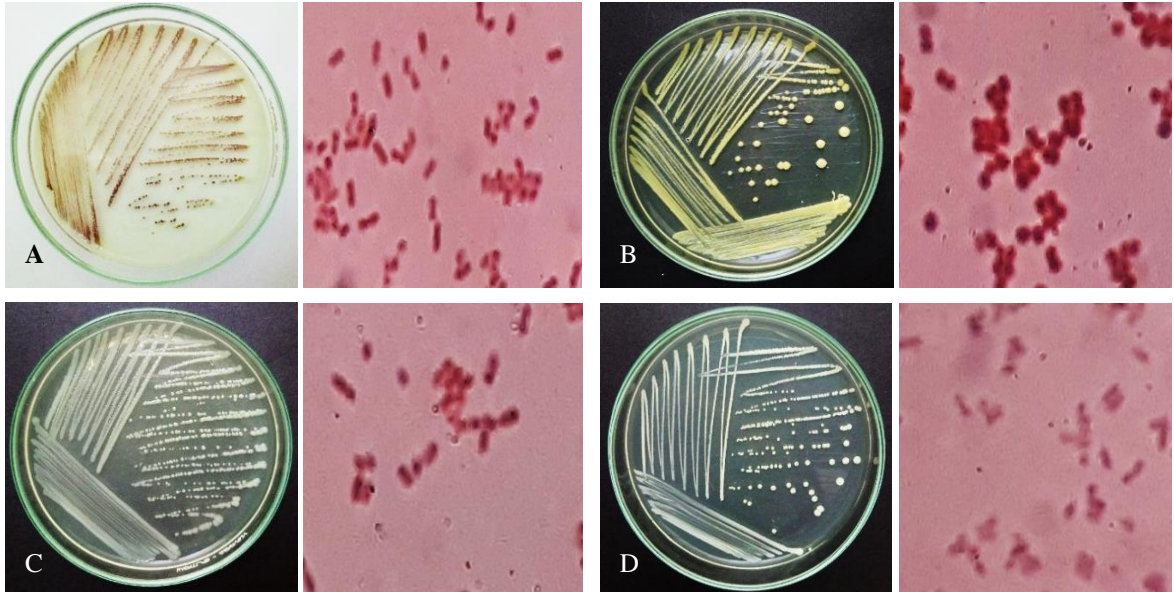
phân tích ANOVA và kiểm định trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định Tukey.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường có bổ sung fenobucarb

Từ tám mẫu đất được thu tại tám xã thuộc hai huyện Cờ Đỏ và Vĩnh Thạnh, 20 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường MM có bổ sung fenobucarb (100 mg/L) như nguồn cung cấp carbon duy nhất đã được phân lập. Năm dòng vi

khẩn được phân lập từ đất trồng lúa ở huyện Vĩnh Thạnh có khuẩn lạc tròn; bìa nguyên; màu tím sẫm, vàng hoặc trắng ngà; bề mặt trơn hoặc nhẵn. Mười tám dòng vi khuẩn được phân lập trong đất lúa ở huyện Cờ Đỏ có khuẩn lạc tròn; bìa nguyên; màu vàng tím, vàng, trắng sữa hoặc trắng ngà; bề mặt trơn hoặc nhẵn. Tế bào của các dòng vi khuẩn có hình que hoặc hình cầu. Hình thái khuẩn lạc đại diện của một số dòng vi khuẩn được trình bày ở Hình 1.



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc và tế bào của một số dòng vi khuẩn đại diện khi được nuôi cấy trên môi trường TSA sau 3 ngày

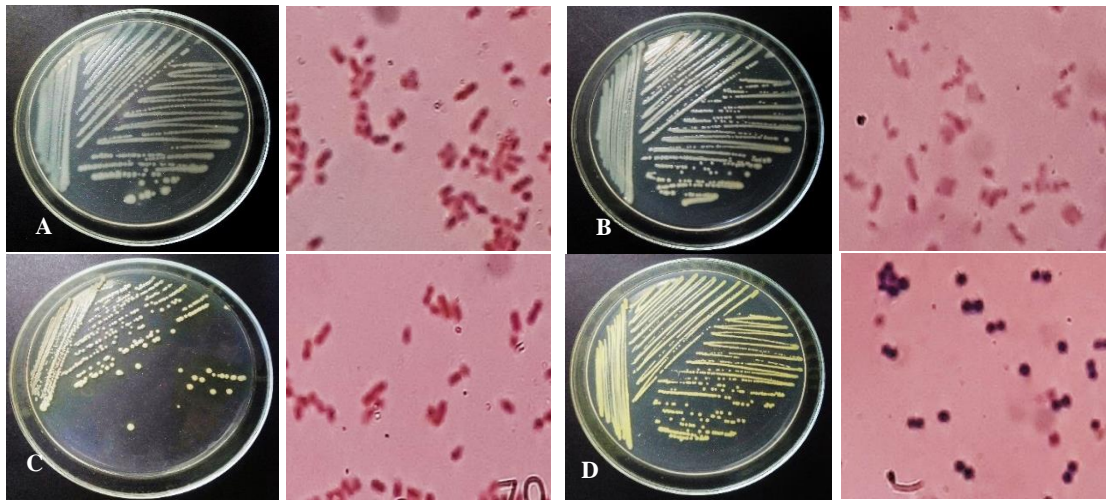
A: khuẩn lạc màu tím, tế bào hình que; B: khuẩn lạc màu vàng, tế bào hình cầu; C: khuẩn lạc màu trắng ngà, tế bào hình que; D: khuẩn lạc màu trắng sữa, tế bào hình que

3.2 Sự tăng trưởng của vi khuẩn trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb

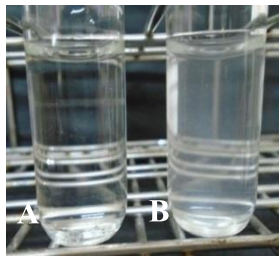
Trong 20 dòng vi khuẩn phân lập, bốn dòng vi khuẩn CĐ2.3, CĐ5.1, CĐ5.2 và CĐ5.3 được phân lập từ đất trồng lúa ở huyện Cờ Đỏ có khả năng sinh trưởng và tạo sinh khối trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb 100 mg/L, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung fenobucarb sau 7 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn được phân lập từ đất trồng lúa ở huyện Vĩnh Thạnh không tạo

sinh khối trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung fenobucarb, chứng tỏ các dòng vi khuẩn này không có khả năng sử dụng fenobucarb.

Hình thái khuẩn lạc của bốn dòng vi khuẩn tăng trưởng trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb được thể hiện ở Hình 2. Sự khác biệt về sinh khối của dòng vi khuẩn đại diện CĐ5.3 trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb so với nghiệm thức đối chứng không có bổ sung fenobucarb được thể hiện ở Hình 3.



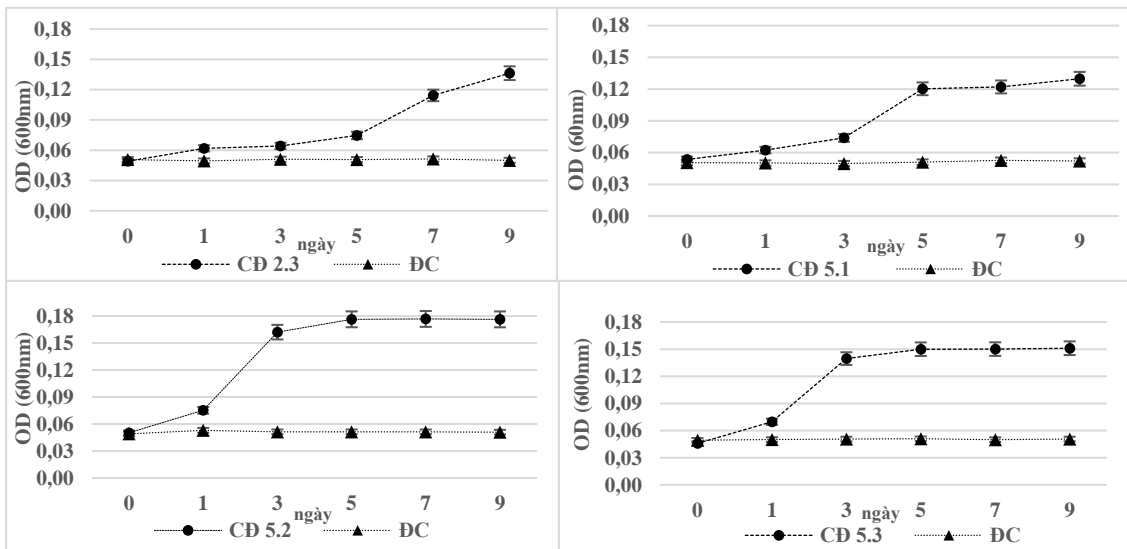
Hình 2: Hình thái khuẩn lạc trên môi trường TSA sau 3 ngày nuôi cấy của các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy fenobucarb A: dòng CD2.3, B: dòng CD5.1, C: dòng CD5.2, D: dòng CD5.3



Hình 3: Sự khác nhau về độ đục của dòng vi khuẩn CD5.3 sau 7 ngày nuôi cấy trong môi trường MM không bổ sung fenobucarb (A) so với nghiệm thức có bổ sung fenobucarb (B)

3.3 Khả năng phân hủy fenobucarb của vi khuẩn

Bốn dòng vi khuẩn CD2.3, CD5.1, CD5.2 và CD5.3 được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb 100 mg/L như là nguồn carbon duy nhất. Sau 9 ngày nuôi cấy, cả bốn dòng đều tạo sinh khối khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) chứng tỏ cả bốn dòng vi khuẩn đều có khả năng sử dụng fenobucarb để tăng trưởng. Kết quả phân tích cho thấy hai dòng vi khuẩn CD5.2 và CD5.3 có khả năng tạo sinh khối nhanh hơn so với hai dòng vi khuẩn còn lại (Hình 4), do đó hai dòng vi khuẩn CD5.2 và CD5.3 được tuyển chọn để khảo sát khả năng phân hủy fenobucarb theo thời gian.

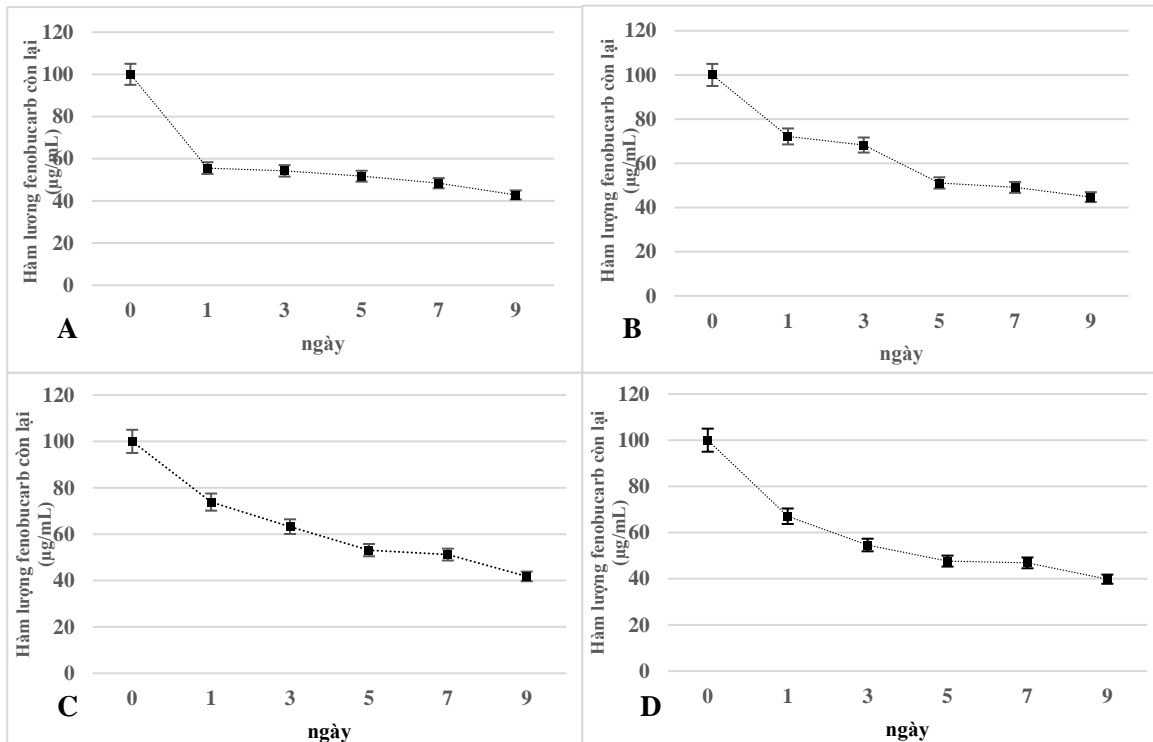


Hình 4: Mật độ quang của vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb (100 mg/L) theo thời gian

A: dòng CD2.3; B: dòng CD5.1; C: dòng CD5.2; D: dòng CD5.3; ĐC: đối chứng không bổ sung fenobucarb

Kết quả phân tích sắc ký lỏng cao áp cho thấy khi nuôi cấy các dòng vi khuẩn CĐ2.3, CĐ5.1, CĐ5.2 và CĐ5.3 trong môi trường MM có bổ sung 100 mg/L fenobucarb, hàm lượng fenobucarb giảm đáng kể ở thời điểm 1 ngày nuôi cấy với hiệu suất phân hủy tương ứng là 44,4%, 27,8%, 26,2% và 32,9%. Trong thời gian từ 3 đến 9 ngày nuôi cấy, khả năng phân hủy fenobucarb của bốn dòng vi

khảo giảm dần. Ở thời điểm 9 ngày nuôi cấy, hai dòng vi khuẩn CĐ5.2 và CĐ5.3 có hiệu suất phân hủy fenobucarb cao hơn hai dòng còn lại, đạt 58,2% và 60,1%, theo thứ tự. Dòng vi khuẩn CĐ2.3 phân hủy 57,2% và dòng CĐ5.1 phân hủy 55,3% fenobucarb. Tuy nhiên, khả năng phân hủy fenobucarb của bốn dòng vi khuẩn không khác biệt có ý nghĩa thống kê (Hình 5).



Hình 5: Hàm lượng fenobucarb còn lại trong môi trường MM có bổ sung fenobucarb (100 mg/L) sau 9 ngày nuôi cấy

A: dòng CĐ2.3; B: dòng CĐ5.1; C: dòng CĐ5.2; D: dòng CĐ5.3

Theo Kim *et al.* (2014), dòng vi khuẩn *Sphingobium lactosutens* DS20^T được phân lập từ đất trồng lúa ở Anseong, Gyeonggi-do, Hàn Quốc có khả năng phân hủy hoàn toàn fenobucarb (100 mg/L) trong 27 giờ và mật độ quang của vi khuẩn tăng dần trong thời gian này. Trong nghiên cứu này, hai dòng vi khuẩn CĐ5.2 và CĐ5.3 có khả năng phân hủy 58,2%-60,1% (với nồng độ ban đầu là 100 mg/L) fenobucarb trong 9 ngày nuôi cấy. Như vậy, hai dòng vi khuẩn bản địa CĐ5.2 và CĐ5.3 có khả năng phân hủy fenobucarb chậm hơn và cần thời gian phân hủy dài hơn so với dòng vi khuẩn DS20^T được phân lập từ đất trồng lúa ở Hàn Quốc.

3.4 Định danh khoa học các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy fenobucarb hiệu quả

Hai dòng vi khuẩn phân hủy fenobucarb hiệu quả là CĐ5.2 và CĐ5.3 được giải trình tự gen 16S-

rRNA kết hợp với các đặc điểm sinh hóa để định danh đến cấp độ loài.

Đoạn gen 16S-rRNA của dòng CĐ5.2 (1027 nucleotide) được so sánh với gen tương ứng của các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI và có độ tương đồng trên 97% với các loài vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* như *B. contaminans*, *B. cepacia*, *B. territorii*, *B. metallica*, *B. seminalis*, *B. anthina*, *B. arboris*, *B. puraquae*, *B. ambifaria*, *B. diffusa*, *B. vietnamiensis*, *B. cenocepacia*, *B. latens*, *B. stabilis*, *B. multivorans*, *B. pyrrocinia*, *B. catarinensis*, *B. stagnalis*, và *B. dolosa*. Dựa vào các đặc điểm hình thái và sinh hóa, dòng CĐ5.2 có khuẩn lạc màu vàng khi nuôi cấy trên môi trường TSA, sau 4-5 ngày sẽ chuyển sang màu tím, Gram âm, có hoạt tính gelatinase, hoạt tính oxidase, có khả năng lên men đường sucrose, glucose và lactose, không phát triển ở nhiệt độ 42°C, không có hoạt tính urease. Các đặc điểm này tương đồng với

các đặc điểm của loài *B. arboris* như mô tả của Vanlaere *et al.* (2008) (Bảng 1). Trên cơ sở tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA, đặc điểm hình thái

và đặc điểm sinh hóa, dòng vi khuẩn CĐ5.2 được xác định thuộc loài *B. arboris* và được định danh khoa học là *B. arboris* CĐ5.2.

Bảng 1: Các đặc điểm sinh hóa và hình thái của các loài vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng trên 97% so với gen tương ứng của dòng vi khuẩn CĐ5.2**

Loài	Tăng trưởng 42°C	Gelatinase	Lên men sucrose	Màu sắc khuẩn lạc	Đồng hóa citrate	Oxidase	Urease	Lên men glucose	Lên men lactose
<i>B. contaminans</i>	+								
<i>B. territorii</i>	+								
<i>B. metallica</i>	+								
<i>B. ambifaria</i>	+								
<i>B. diffusa</i>	+								
<i>B. vietnamiensis</i>	+								
<i>B. cenocepacia</i>	+								
<i>B. latens</i>	+								
<i>B. multivorans</i>	+								
<i>B. pyrrocinia</i>	+								
<i>B. stagnalis</i>	+								
<i>B. dolosa</i>	+								
<i>B. seminalis</i>	+								
<i>B. anthina</i>	-	-							
<i>B. stabilis</i>	-	-							
<i>B. catarinensis</i>	-	+	-						
<i>B. cepacia</i>	-	+	+	vàng					
<i>B. puraquae</i>	-	+	+	vàng					
<i>B. arboris</i>	-	+	+	tím	+	+	-	+	+
Dòng CĐ5.2	-	+	+	tím	+	+	-	+	+

+: dương tính; -: âm tính

* Các đặc điểm sinh hóa của các loài thuộc chi *Burkholderia* được mô tả theo Vanlaere *et al.* (2008); Spilker *et al.* (2015); Bach *et al.* (2017); Martina *et al.* (2018).

B. arboris là loài mới của chi *Burkholderia* trong đó *B. arboris* R-24201 được phân lập từ đất ở Mỹ (Vanlaere *et al.*, 2008). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ như methyl parathion, fenitrothion và dicaphton thuộc nhóm thuốc trừ sâu organophosphorus (Fernández-López *et al.*, 2017; Mìn *et al.*, 2017); thuốc diệt cỏ quinclorac (Lü *et al.*, 2003); các hydrocarbon đa vòng thơm như naphthalene, phenanthrene, pyrene (Kim *et al.*, 2003) và thuốc diệt cỏ 2,4-D (Suwa *et al.*, 1996; Jacobsen, 1997; Nguyen *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, dòng *B. arboris* CĐ5.2 thuộc chi *Burkholderia* lần đầu tiên được chứng minh có khả năng phân hủy thuốc diệt cỏ trùng fenobucarb thuộc nhóm carbamate. Như vậy, kết quả nghiên cứu này đã bổ sung thông tin về khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ khác nhau của chi *Burkholderia*.

Tương tự, đoạn gen 16S-rRNA của dòng CĐ5.3 (1014 nucleotide) được so sánh với gen 16S-rRNA của các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI và có độ tương đồng trên 97% với các loài vi khuẩn thuộc chi *Micrococcus* như *M. yunnanensis*, *M. luteus*, *M. endophyticus*, *M. antarcticus*, *M. flavus*, *M. lylae*, và *M. terreus*. Dựa vào các đặc điểm về hình thái và sinh hóa, dòng CĐ5.3 có khuẩn lạc màu vàng khi được nuôi cấy trên môi trường TSA, Gram dương, có hoạt tính catalase, hoạt tính gelatinase, không có hoạt tính oxidase, không có

khả năng phân hủy tinh bột, có khả năng lên men đường sucrose, đồng hóa citrate, không có hoạt tính methyl red và hoạt tính urease. Các đặc điểm này tương đồng với các đặc điểm của loài *M. terreus* như mô tả của Zhang *et al.* (2010) (Bảng 2). Trên cơ sở tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA, các đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa dòng vi khuẩn CĐ5.3 được xác định thuộc loài *M. terreus* và được định danh khoa học là *M. terreus* CĐ5.3.

Bảng 2: Các đặc điểm sinh hóa và hình thái của các loài vi khuẩn thuộc chi *Micrococcus có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng trên 97% so với gen tương ứng của dòng vi khuẩn CĐ5.3**

Loài	Màu sắc khuẩn lạc	Gelatinase	Oxidase	Catalase	Thủy phân tinh bột	Lên men sucrose	Đồng hóa citrate	Methyl red	Urease
<i>M. lylae</i>	trắng								
<i>M. yunnanensis</i>	vàng	-							
<i>M. antarcticus</i>	vàng	-							
<i>M. flavus</i>	vàng	-							
<i>M. luteus</i>	vàng	+	+						
<i>M. endophyticus</i>	vàng	+	+						
<i>M. terreus</i>	vàng	+	-	+	-	+	+	-	-
Dòng CĐ5.3	vàng	+	-	+	-	+	+	-	-

+: dương tính; -: âm tính

* Các đặc điểm sinh hóa của các loài thuộc chi *Micrococcus* được mô tả theo Zhao et al., (2009); Zhang et al. (2010).

M. terreus cũng là loài mới của chi *Micrococcus*, trong đó, dòng *M. terreus* V3M1 được phân lập từ đất rừng ở Trung Quốc (Zhang et al., 2010). Theo Doddamani and Ninnekar (2001), vi khuẩn thuộc chi *Micrococcus* có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu carbaryl thuộc nhóm carbamate. Trong nghiên cứu này, dòng *M. terreus* CĐ5.3 cũng có khả năng phân hủy thuốc diệt côn trùng thuộc nhóm carbamate là fenobucarb. Như vậy, kết quả của nghiên cứu đã bổ sung thông tin về khả năng phân hủy các loại thuốc BTVT khác nhau thuộc nhóm carbamate của vi khuẩn *Micrococcus*.

4 KẾT LUẬN

Từ tám mẫu đất được thu tại hai huyện Cờ Đỏ và Vĩnh Thạnh, Cần Thơ, 20 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung fenobucarb 100 mg/L đã được phân lập. Trong đó, bốn dòng vi khuẩn CĐ2.3, CĐ5.1, CĐ5.2 và CĐ5.3 có khả năng tạo sinh khối nhanh sau 7 ngày nuôi cấy. Hai dòng vi khuẩn CĐ5.2 và CĐ5.3 có khả năng phân hủy fenobucarb hiệu quả hơn, đạt 58,2% và 60,1% ở thời điểm 9 ngày nuôi cấy. Dựa vào kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA kết hợp với các đặc điểm hình thái và chỉ tiêu sinh hóa, hai dòng vi khuẩn CĐ5.2 và CĐ5.3 được định danh khoa học lần lượt là *Burkholderia arboris* CĐ5.2 và *Micrococcus terreus* CĐ5.3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bach, E., Sant'Anna, F.H., Magrich dos Passos, J.F., et al., 2017. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov.. Pathogens and Disease. 75(6): 1-8.
- Chapalmadugu, S., and Chaudhry, G.R., 1993. Isolation of a constitutively expressed enzyme for hydrolysis of carbaryl in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology. 175(20): 6711-6716.
- Dash, C., and Rajan, J.P., 2016. KOH string and vancomycin susceptibility test as an alternative method to Gram staining. Journal of International Medicine and Dentistry. 3(2): 88-90.
- Dhouib, I., Annabi, A., Jallouli, M., et al., 2016. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. Journal of Applied Biomedicine. 14(2): 85-90.
- Doddamani, H.P., and Ninnekar, H.Z., 2001. Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species. Current Microbiology. 43(1): 69-73.
- Fernández-López, M.G., Carolina, P.U., Enrique, S.S., et al., 2017. Enhancing methyl parathion degradation by the immobilization of *Burkholderia* sp. isolated from agricultural soils. Microbiology Open. 6(5): e507.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., and Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology. 74(8): 2461-2470.
- Hayatsu, M., Mizutani, A., Hashimoto, M., Sato, K., and Hayano, K., 2001. Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100. FEMS Microbiology Letters. 201(1): 99-103.
- Hayatsu, M., and Nagata, T., 1993. Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Blastobacter* sp. strain M501. Applied and Environmental Microbiology. 59(7): 2121-2125.
- Jacobsen, C.S., 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. Plant and Soil. 189:139-144.
- Kim, I., Kim, D.U., Kim, N.H., and Ka, J.O., 2014. Isolation and characterization of fenobucarb-

- degrading bacteria from rice paddy soils. *Biodegradation*. 25(3): 383-394.
- Kim, T.J., Kim, Y.J., Cho, K.S., and Ryu, H.W., 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 19(4): 411-417.
- Le, H.P., Le, T.K., and Nguyen, T.P.O., 2017. Isolation and characterization of carbendazim-degrading bacteria in rice paddy soil in Can Tho, Vietnam. *International Journal of Advanced Research*. 5(6): 863-870.
- Lü, Z., Min, H., Wu, S., and Ruan, A., 2007. Phylogenetic and degradation characterization of *Burkholderia cepacia* WZ1 degrading herbicide quinclorac. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 38(6): 771-782.
- Martina, P., Leguizamón, M., Prieto, C.I., et al., 2018. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68(1): 14-20.
- Min, J., Wang, B., and Hu, X., 2017. Effect of inoculation of *Burkholderia* sp. strain SJ98 on bacterial community dynamics and para-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, and 2-chloro-4-nitrophenol degradation in soil. *Scientific Reports*. 7(1): 5983.
- Nguyễn Trọng Hồng Phúc, 2009. Ảnh hưởng của fenobucarb lên các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính men cholinesterase (ChE) và tăng trưởng của cá Chép (*Cyprinus carpio*). Luận văn cao học. Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên. Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyen, T.P.O., Damian, E.H., Karolien, B., et al., 2014. Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65.2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (19): 8235-8252.
- Nguyen, T.P.O., Hansen, M.A., Hansen, L.H., Horemans, B., Sørensen, S.J., De, M.R., and Springael, D., 2019. Intra- and inter-field diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids and their *tfd* catabolic genes in rice fields of the Mekong delta in Vietnam. *FEMS Microbiology Ecology*. 95(1). doi: 10.1093/femsec/fiy214.
- Nguyen, V.C., Nguyen, T.P., and Bayley, M., 2008. Brain cholinesterase response in the snakehead fish (*Channa striata*) after field exposure to diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 314-318.
- Phạm Văn Toàn, 2013. Thực trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và một số giải pháp giảm thiểu việc sử dụng thuốc không hợp lý trong sản xuất lúa ở đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 28: 47-53.
- Shin, D.H., 2012. Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(4): 448-456.
- Spilker, T., Ginther, J.L., Currie, B.J., et al., 2015. *Burkholderia sternalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65(7): 2265-2271.
- Suwa, Y., Wright, A.D., Fukimori, F., et al., 1996. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(7): 2464-2469.
- Vanlaere, E., LiPuma, J.J., Baldwin, A., et al., 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(7): 1580-1590.
- Võ Thị Yến Lam, 2011. Sử dụng enzyme cholinesterase ở cá Lóc đồng (*Channa striata*) cỡ giống để đánh dấu nhiễm độc fenobucarb phun cho lúa ở Hậu Giang. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Zhang, J.Y., Liu, X.Y., and Liu, S.J., 2010. *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(8): 1897-1903.
- Zhao, G.Z., Li, J., Qin, S., et al., 2009. *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(10): 2383-2387.