

# TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NHANH CYPERMETHRIN TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC NHIỄM MẶN

## ISOLATION OF RAPID CYPERMETHRIN DEGRADING MICROORGANISMS FROM SALINE WATER

Đỗ Thị Hồng Thịnh<sup>1</sup>, Trần Hồng Anh\*<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Liên<sup>1</sup>, Võ Đình Quang<sup>1</sup>, Trương  
Nhật Minh<sup>2</sup>, Trần Thị Tường Linh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM

<sup>2</sup> Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM; <sup>3</sup>Trường ĐH Sư phạm TP. HCM

\*email: saomai6@yahoo.com

### TÓM TẮT

Từ 60 mẫu nước và bùn ao nuôi tôm, đất và nước trồng lúa, nước và bùn kênh rạch tại Sóc Trăng đã phân lập được 27 chủng vi sinh có khả năng phát triển trên môi trường Mineral salt medium (MSM) chứa cypermethrin như nguồn carbon duy nhất, trong đó 5 chủng có khả năng phát triển nhanh, ổn định gồm chủng NAT11, BAT1, ĐRL1, ĐRL8-1 và NKR1. Dựa vào khả năng sinh trưởng nhanh, thích ứng với độ mặn tốt và khả năng phân giải cypermethrin nhanh đã chọn ra 3 chủng ĐRL8-1, ĐRL1 và BAT1. Kết quả định danh các chủng vi sinh tuyển chọn cho thấy ĐRL8-1 là *Streptomyces parvulus*, ĐRL1 là *Mycobacterium vaccae* và BAT1 là *Ochrobactrum lupini*.

**TỪ KHÓA:** cypermethrin, phân hủy, vi sinh, vi khuẩn, xạ khuẩn.

### Abstract

From 60 samples of water and mud in shrimp farming, soils and water in rice fields, water and mud in canals in Soc Trang have isolated 27 strains of microorganisms capable of development on the Mineral salt medium (MSM) containing cypermethrin as the only carbon source, in which 5 strains have the ability to develop fast and stable been selected include NAT11, BAT1, DRL1, DRL8-1 and NKR1. Three strains DRL8-1, DRL1 and BAT1 were selected to identify based on the ability to grow fast, well adapt to salinity and rapid degradation of cypermethrin. The result showed that DRL8-1 is *Streptomyces parvulus*, DRL1 is *Mycobacterium vaccae* and BAT1 is *Ochrobactrum Lupini*.

**Key word:** cypermethrin, degradation, microorganism, bacteria, actinomycetes.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cypermethrin là một trong những loại thuốc bảo vệ thực vật có hoạt lực cao và giá rẻ nên được sử dụng rộng rãi với số lượng lớn để tiêu diệt côn trùng trong trồng trọt và tiêu diệt giáp xác, cải tạo ao nuôi thủy sản ở nước ta. Việc sử dụng ồ ạt hoạt chất này đã mang lại nhiều hệ lụy lớn đối với sức khỏe con người, gây ô nhiễm hệ sinh thái và làm tổn thất cho ngành nuôi tôm nói riêng và nền kinh tế nước ta nói chung.

Cypermethrin có khả năng gây ức chế thần kinh của người và động vật, tác động lên các chức năng khác nhau như quá trình sản xuất năng lượng của tế bào, quá trình vận chuyển các ion kim loại và sự co bóp cơ bắp, làm giảm sức đề kháng của cơ thể, có thể gây ung thư. Nếu cơ thể động vật và người nhiễm phải cypermethrin ở nồng độ cao thì sẽ có triệu chứng nôn mửa kéo dài kèm theo đau bụng, tiêu chảy sau khi ăn vài phút, co giật hôn mê và dễ dẫn đến tử vong sau 3 giờ. Cypermethrin tác động mạnh mẽ đến hệ sinh thái, không những tiêu diệt các loài côn trùng gây hại mà còn ảnh hưởng đến những sinh vật có lợi như ong, kiến, cá và động vật thủy sinh không xương sống. Thời gian bán phân hủy trong đất của cypermethrin khi có sự hiện diện của sinh vật hiếu khí khoảng từ 4,1 đến 56,4 ngày tùy thuộc vào mỗi loại đồng phân. Do có thời gian lưu như vậy, cypermethrin dễ gây độc cho động vật và gây ô nhiễm hệ sinh thái khi được sử dụng với số lượng lớn và thường xuyên. Đối với tôm, cypermethrin ở nồng độ 0,05 ppb gây chết cấp tính 100 % sau 10 ngày phơi nhiễm, và ở nồng độ 0,0001 ppb đã có thể gây ra các ảnh hưởng đến cơ quan

gan tụy (Nguyễn Thị Hiền, 2011)[1] tương tự với triệu chứng hoại tử do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Từ ngày 16/1/2012, cypermethrin được loại bỏ khỏi danh mục hóa chất, kháng sinh được sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản nhằm hạn chế việc sử dụng ô ạt. Tuy nhiên, nhiều nhà sản xuất vẫn cố tình sử dụng hoạt chất này dưới các hình thức khác để đưa vào ao tôm. Bên cạnh đó, cypermethrin vẫn được sử dụng trong trồng trọt và vẫn gây ra các hệ lụy kể trên.

Đã có một số nghiên cứu trên thế giới về các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cypermethrin, tuy nhiên có rất ít công trình nghiên cứu được công bố về việc sử dụng vi sinh để phân giải hoạt chất cypermethrin trong điều kiện sinh thái khí hậu của Việt Nam.

Được sự phê duyệt của Bộ Khoa học và Công nghệ, Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM đã tiến hành thực hiện đề tài: **“Tuyển chọn, xây dựng quy trình nhân sinh khối và ứng dụng một số chủng vi sinh có khả năng phân hủy nhanh hoạt chất cypermethrin cải thiện môi trường”**. Bài báo này trình bày kết quả tuyển chọn một số chủng vi sinh có khả năng phân hủy nhanh hoạt chất cypermethrin và định danh các chủng vi sinh tuyển chọn.

## **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Nguồn mẫu để phân lập các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin được thu thập từ 15 điểm nuôi tôm, 10 điểm trồng lúa và 5 điểm kênh rạch ở các khu vực có khả năng bị ô nhiễm cypermethrin do sử dụng nhiều thuốc bảo vệ thực vật tại tỉnh Sóc Trăng.

### ***Phân lập các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin***

Môi trường phân lập là môi trường MSM (Mineral salt medium; Shaohua Chen và cộng sự, 2011) [9] bổ sung 50 mg/l cypermethrin, chọn lọc 10 chủng vi sinh tiềm năng có khả năng phát triển ổn định nhất.

### ***Tuyển chọn các chủng vi sinh có khả năng phân giải cypermethrin nhanh, thích ứng với độ mặn tốt, tốc độ sinh trưởng mạnh***

Tùng chủng vi sinh (mật độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml) được nuôi trong erlen 250 ml chứa 50 ml môi trường MSM lỏng bổ sung cypermethrin 50 mg/l và có độ mặn từ 5‰ đến 35‰. Điều kiện nuôi: nhiệt độ phòng, trên máy lắc vòng với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Dựa vào khả năng sinh trưởng và phân giải cypermethrin, chọn ra 3 chủng vi sinh có khả năng phân giải cypermethrin nhanh, thích ứng với độ mặn tốt và tốc độ sinh trưởng mạnh.

Cypermethrin trong môi trường được phân tích bằng phương pháp sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Sử dụng chất chuẩn  $\alpha$ -cypermethrin có độ tinh khiết 99,7% để lập đường chuẩn. Điều kiện sắc ký [4]: Pha động: ACN:H<sub>2</sub>O (85:15, v/v); pha tĩnh: cột C18; tốc độ dòng: 1ml/phút; lượng tiêm mẫu: 10 $\mu$ l; bước sóng phát hiện: 210 nm; nhiệt độ cột: 25 $\pm$ 0,8 $^{\circ}$ C.

### ***Định danh các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin***

Các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin được định danh dựa vào đặc điểm khuẩn lạc, đặc điểm vi học và các phản ứng sinh hóa.

### ***Xử lý số liệu***

Các số liệu ghi nhận được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One way anova) và phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 0,05.






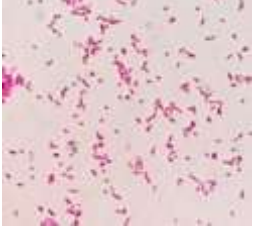
## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**






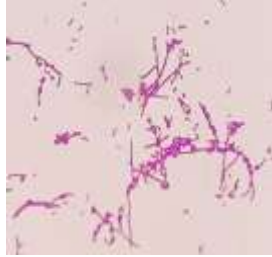






## Phân lập các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin


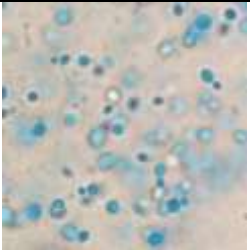
Từ 30 điểm ở các khu vực có khả năng bị ô nhiễm cypermethrin do sử dụng nhiều thuốc bảo vệ thực vật tại tỉnh Sóc Trăng đã thu thập được 27 chủng vi sinh có khả năng phát triển trên môi trường MSM chứa cypermethrin (nồng độ 50 mg/l) như nguồn carbon duy nhất.

Từ 27 chủng vi sinh phân lập được, sau 5 lần cấy chuyển trên môi trường MSM bổ sung cypermethrin 50 mg/l cho thấy có 10 chủng có khả năng phát triển nhanh và ổn định nhất gồm: NAT11, BAT1, BAT5-1, BAT5-2, BAT9, BAT14, ĐRL1, ĐRL8-1, ĐRL8-2, và NKR1. Kết quả về hình dạng, đặc điểm khuẩn lạc và kết quả nhuộm Gram của 10 chủng vi sinh trên được đối chiếu với hình ảnh, đặc điểm của các vi sinh đã được công bố [11] nhận thấy các chủng ĐRL8-2 (*Serratia* sp.), BAT5-1 (*Chryseobacterium* sp.), BAT5-2 (*Staphylococcus* sp.), BAT9 (*Pseudomonas* sp.), BAT14 (*Fusobacterium* sp.) có khả năng là các vi sinh vật gây bệnh cho người và động vật, không được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Những vi sinh còn lại có khả năng phát triển ổn định trên môi trường chọn lọc được lựa chọn để nghiên cứu tiếp theo gồm chủng NAT11, BAT1, ĐRL1, ĐRL8-1 và NKR1 (bảng 1).

Bảng 1. Định danh sơ bộ các chủng vi sinh có khả năng phát triển nhanh và ổn định nhất trên môi trường MSM bổ sung cypermethrin 50 mg/l.

T T	Ký hiệu	Khuẩn lạc	Nhuộm Gram	Kết quả sơ bộ	Dự đoán chủng
1	NAT 11			- Khuẩn lạc màu trắng đục, mép khuẩn lạc răng cưa không đều, bề mặt hơi nhăn, khô, có núm lồi ở giữa. -Gram (+), hình que ngắn, một số tế bào nối nhau tạo thành chuỗi, một số phân tán hoặc tạo thành đám.	<i>Bacillus</i> sp.
2	BAT 1			- Khuẩn lạc màu trắng, chảy nhầy màu be, đường kính 2-3mm. -Gram (-), hình que ngắn.	<i>Ochrobactrum</i> sp.
3	BAT 5-1			-Khuẩn lạc tròn, màu vàng. Đường kính 3-5mm. -Gram (-), tế bào hình que.	<i>Chryseobacterium</i> sp. <i>Chryseobacterium indologenes</i>

4	BAT 5-2			-Khuẩn lạc trắng đục, tròn. - Gram (+), cụm cầu khuẩn.	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i>
5	BAT 9			- Hình dạng khuẩn lạc: tròn, rìa hơi nhẵn. -Gram (-). -Có mùi đặc trưng trong ống nghiệm.	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
6	BAT 14			-Khuẩn lạc màu trắng, có chóp nhọn ở giữa, rìa khuẩn lạc nhẵn - Gram (-).	<i>Fusobacterium</i> sp. <i>Fusobacterium nucleatum</i> .
7	ĐRL 1			-2 dạng khuẩn lạc trên cùng môi trường nuôi cấy: tròn và khô. -Vi khuẩn hình que, kháng acid, không phân loại gram (+) hay (-).	<i>Mycobacterium</i> sp.
8	ĐRL 8-1			- Khuẩn lạc ban đầu tròn, lồi, màu vàng nhạt, sau đó chuyển sang màu xám với bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, có mùi đặc trưng của xạ khuẩn, tiết sắc tố màu nâu sẫm. -Gram (+), khuẩn ty khí sinh.	<i>Streptomyces</i> sp.
9	ĐRL 8-2			-Khuẩn lạc hình tròn, 2 dạng khuẩn lạc màu đỏ và vàng nhạt trên cùng một môi trường. Sinh sắc tố màu đỏ. - Gram (-), hình que	<i>Serratia</i> sp.

1 0	NK R 1			-Khuẩn lạc tròn, dạng giọt, đồng nhất, màu trắng đục, bề mặt trơn bóng. - Tế bào hình bầu dục, nảy chồi, kích thước lớn hơn nhiều so với vi khuẩn.	<i>Saccharomyces sp.</i>
--------	-----------	--	--	---	--------------------------

### Tuyển chọn các chủng vi sinh có khả năng phân giải cypermethrin nhanh, thích ứng với độ mặn tốt, tốc độ sinh trưởng mạnh

Vi cypermethrin có thể bị thủy phân một phần trong môi trường nước, nên để chắc chắn hàm lượng cypermethrin bị mất đi là do các vi sinh vật thêm vào, tỉ lệ phân giải cypermethrin trong môi trường MSM chứa 50 mg/l cypermethrin và không bổ sung vi sinh đã được theo dõi. Kết quả cho thấy ở nhiệt độ phòng (30°C), pH 6,7 – 6,8, độ mặn 20‰ thì tỉ lệ tự phân giải của cypermethrin không cao, chỉ 5,12% sau 1 ngày, 5,50% sau 2 ngày, 5,97% sau 3 ngày và 6,83% sau 7 ngày (bảng 2).

Bảng 2. Tỉ lệ cypermethrin tự phân giải trong môi trường MSM theo thời gian

	Tỉ lệ tự phân giải của cypermethrin theo thời gian				Điều kiện thí nghiệm
Thời gian	1 ngày	2 ngày	3 ngày	7 ngày	
Tỉ lệ tự phân giải (%)	5,12	5,50	5,97	6,83	Nhiệt độ phòng (khoảng 30°C) pH 6,7 – 6,8 Độ mặn 20‰

Theo tổng hợp của Ủy ban Châu Âu (phần D3 – hóa chất, chất gây ô nhiễm và thuốc trừ sâu), trong môi trường nước, ở điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian bán hủy của dạng đồng phân trans của cypermethrin là 923 ngày, 136 ngày, 5 ngày và 23 phút tương ứng với điều kiện pH là 3, 7, 8 và 11. Dạng đồng phân cis bền hơn nên có thời gian bán hủy là 1302 ngày, 221 ngày, 21 ngày và 38 phút, tương ứng với điều kiện pH là 3, 7, 8 và 11 [3]. Như vậy, thời gian bán hủy (DT<sub>50</sub>) của cypermethrin phụ thuộc vào dạng đồng phân và pH của môi trường. Ở nghiên cứu này, với pH môi trường dao động từ 6,7 – 6,8, ở điều kiện nhiệt độ phòng (30°C), khi bổ sung cypermethrin nồng độ 50 mg/l vào môi trường MSM độ mặn 20‰ và không có sự hiện diện của vi sinh, tỉ lệ tự phân giải của cypermethrin là 5,12% sau 1 ngày; 5,50% sau 2 ngày; 5,97% sau 3 ngày và 6,83% sau 7 ngày. Như vậy, cypermethrin tự phân giải trong môi trường nghiên cứu nhưng với tỉ lệ không cao.

Kết quả về sự sinh trưởng và phân giải cypermethrin của các chủng vi sinh được thể hiện qua bảng 3 và đồ thị 1.

Bảng 3 cho thấy mật độ của các chủng vi sinh nghiên cứu bị ảnh hưởng bởi độ mặn môi trường và thời gian nuôi cấy. Chủng NAT11 và ĐRL1 sau 3 ngày đã tăng ở tất cả các độ mặn và tăng mạnh nhất ở độ mặn 20‰. Tuy nhiên, đến thời điểm 7 ngày nuôi cấy thì mật độ chủng NAT11 giảm nhẹ ở độ mặn 5‰ – 15‰ và tiếp tục gia tăng ở độ mặn 20‰ – 35‰, trong khi đó chủng ĐRL1 lại có xu hướng giảm ở tất cả các nghiệm thức tại thời điểm 7 ngày nuôi cấy. Trong các độ mặn nghiên cứu, mật độ gia tăng cao nhất của chủng NAT11 ở độ mặn 20‰, trong khi chủng ĐRL1 lại ở độ mặn 15‰ tại các thời điểm theo dõi.

Bảng 3. Mật độ của các chủng vi sinh theo thời gian nuôi cấy trong môi trường MSM bổ sung cypermethrin 50 mg/l với độ mặn từ 5‰ đến 35‰

Chủng vi sinh	Độ mặn môi trường (‰)	Mật độ ( $\times 10^6$ CFU/ml)		
		Sau khi cấy	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày
NAT11	5 ‰	1,00 <sup>ab</sup>	4,50 <sup>c</sup>	4,17 <sup>c</sup>
	15 ‰	1,07 <sup>ab</sup>	7,40 <sup>a</sup>	6,60 <sup>b</sup>
	20 ‰	0,93 <sup>b</sup>	8,27 <sup>a</sup>	11,0 <sup>a</sup>
	35 ‰	1,13 <sup>a</sup>	5,40 <sup>bc</sup>	9,30 <sup>a</sup>
BAT1	5 ‰	0,97 <sup>a</sup>	99,33 <sup>a</sup>	644,00 <sup>a</sup>
	15 ‰	1,00 <sup>a</sup>	97,00 <sup>a</sup>	614,67 <sup>a</sup>
	20 ‰	0,73 <sup>b</sup>	46,67 <sup>b</sup>	366,00 <sup>b</sup>
	35 ‰	1,07 <sup>a</sup>	51,67 <sup>b</sup>	86,67 <sup>c</sup>
ĐRL1	5 ‰	0,97 <sup>ab</sup>	20,33 <sup>c</sup>	19,67 <sup>b</sup>
	15 ‰	0,93 <sup>bc</sup>	72,67 <sup>a</sup>	58,67 <sup>a</sup>
	20 ‰	0,83 <sup>c</sup>	45,67 <sup>b</sup>	37,33 <sup>b</sup>
	35 ‰	1,07 <sup>a</sup>	49,33 <sup>b</sup>	32,33 <sup>b</sup>
ĐRL8-1	5 ‰	1,03 <sup>b</sup>	10,33 <sup>bc</sup>	11,33 <sup>b</sup>
	15 ‰	1,03 <sup>b</sup>	16,67 <sup>ab</sup>	17,67 <sup>a</sup>
	20 ‰	1,13 <sup>a</sup>	18,67 <sup>a</sup>	18,33 <sup>a</sup>
	35 ‰	1,17 <sup>a</sup>	5,00 <sup>c</sup>	2,17 <sup>c</sup>
NKR1	5 ‰	0,93 <sup>b</sup>	54,67 <sup>c</sup>	58,33 <sup>b</sup>
	15 ‰	0,97 <sup>ab</sup>	94,67 <sup>a</sup>	84,67 <sup>a</sup>
	20 ‰	1,10 <sup>a</sup>	77,33 <sup>b</sup>	89,00 <sup>a</sup>
	35 ‰	0,90 <sup>b</sup>	46,67 <sup>c</sup>	50,00 <sup>c</sup>

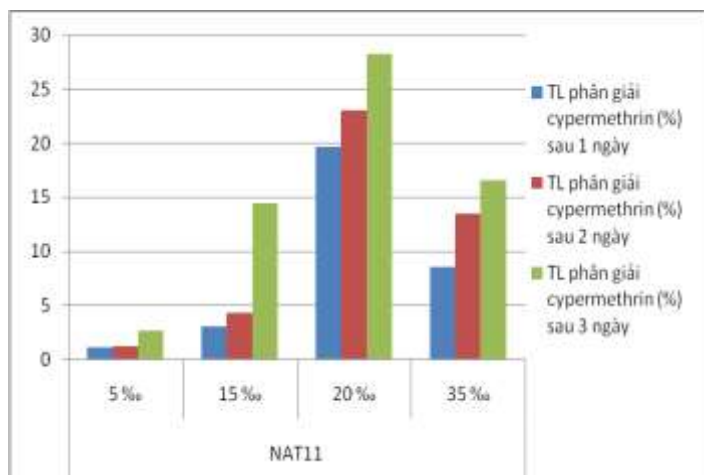
Các chữ cái khác nhau (theo cột) biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% (Duncan's test).

Khác với chủng NAT11 và ĐRL1, mật độ chủng BAT1 đều gia tăng ở tất cả các độ mặn sau 3 ngày nuôi cấy và sự gia tăng mạnh nhất sau 7 ngày nuôi cấy. Trong các độ mặn thí nghiệm, môi trường có độ mặn 5-15‰ đã kích thích sự gia tăng sinh khối chủng BAT1 cao và khác biệt so với trong môi trường có độ mặn 20‰ – 35 ‰.

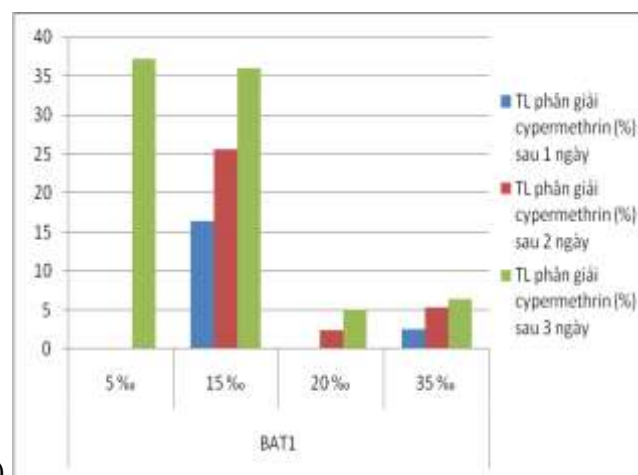
Đối với chủng ĐRL8-1 và NKR1 thì mật độ tăng dần khi độ mặn của môi trường tăng dần từ 5‰ đến 20‰ ở các thời điểm theo dõi. Tuy nhiên, khi độ mặn của môi trường tăng cao đến 35‰ thì khả năng sinh trưởng của chủng này đã bị ức chế. Sự gia tăng mật độ của chủng ĐRL8-1 và NKR1 cao nhất khi môi trường có độ mặn 15 - 20 ‰.

Tương tự như mật độ, sự phân giải cypermethrin của các chủng vi sinh nghiên cứu bị ảnh hưởng bởi độ mặn môi trường và thời gian nuôi cấy. Kết quả trình bày trong đồ thị 1a,c, d và e cho thấy các chủng NAT11, ĐRL1, ĐRL8-1 và NKR1 đã bắt đầu phân giải cypermethrin ở các độ mặn nghiên cứu và tỉ lệ phân giải cypemethrin đạt cao nhất ở môi trường có độ mặn 15- 20‰ ở các thời điểm theo dõi. Tại thời điểm 3 ngày sau khi cấy, chủng NAT11 phân giải cypemethrin trong môi trường có độ mặn từ 15 - 35‰ và không phân giải cypemethrin trong môi trường có độ mặn 5‰. Tỉ lệ phân giải cypermethrin tại thời điểm này dao động từ 14,44 – 28,30% tùy thuộc vào độ mặn của môi trường, trong đó tỉ lệ phân giải cypermethrin đạt cao nhất ở môi trường có độ mặn 20‰ và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các môi trường có độ mặn 5‰, 15‰ hay 35‰.

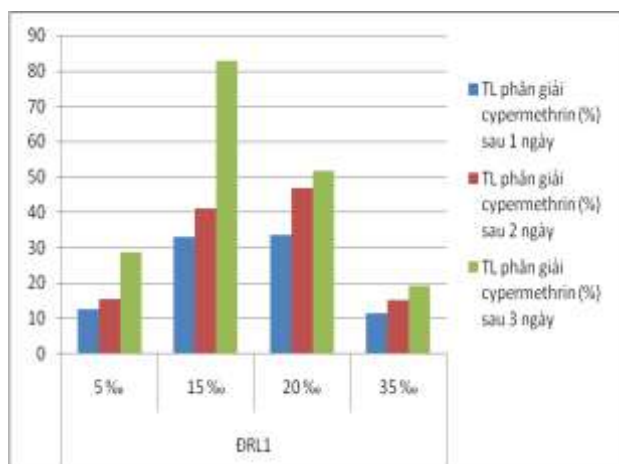




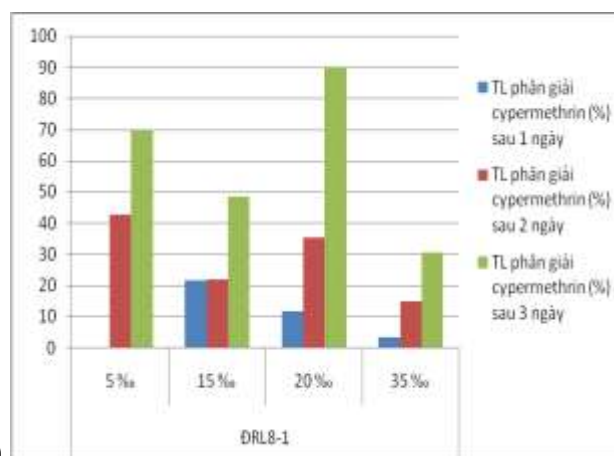
(a)



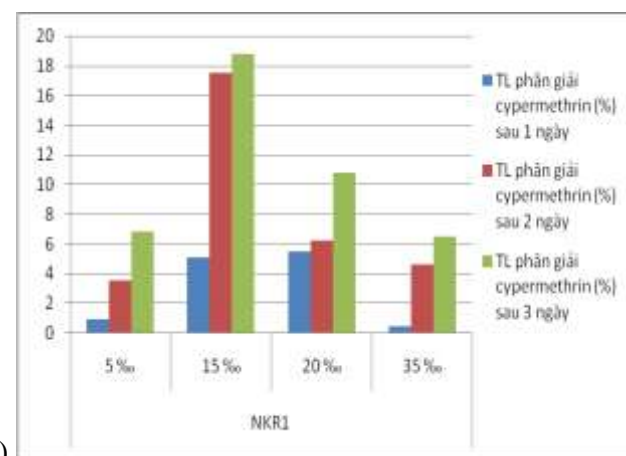
(b)



(c)



(d)



(e)

Đồ thị 1. Tỷ lệ phân giải cypermethrin (%) theo thời gian trong môi trường có độ mặn 5‰ - 35‰: (a): chủng NAT11, (b): chủng BAT1, (c): chủng ĐRL1, (d): chủng ĐRL8-1; (e): chủng NKR1.



Khả năng phân giải cypermethrin của chủng ĐRL1 cao khi môi trường có độ mặn từ 15‰ đến 20‰ và khả năng phân giải cypermethrin của chủng ĐRL1 giảm khi nồng độ muối trong môi trường cao hoặc thấp ở tất cả các thời điểm theo dõi. Tại thời điểm sau 3 ngày nuôi cấy, chủng ĐRL1 phân giải cypermethrin đạt cao nhất ở môi trường có độ mặn 15‰ và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các môi trường có độ mặn còn lại. Trong cùng một nồng độ muối, khả năng phân giải cypermethrin đã tăng dần theo thời gian ở tất cả các nghiệm thức, đặc biệt là ở độ mặn 15‰ sau 3 ngày nuôi cấy. Tại thời điểm này cũng nhận thấy mật độ vi sinh tăng cao nhất (đồ thị 1c). Như vậy, mật độ vi sinh tăng cao đã dẫn tới khả năng phân giải cypemethrin tăng cao.

Tương tự chủng ĐRL1, chủng ĐRL8-1 cũng đã bắt đầu phân giải cypermethrin trong môi trường có độ mặn 15 - 20‰ và chưa phân giải trong môi trường có độ mặn thấp (5‰) hoặc cao (35‰) (đồ thị 1d). Tỷ lệ phân giải cypermethrin của chủng ĐRL8-1 tại thời điểm 3 ngày ở môi trường có độ mặn 20‰ đạt 90,05%, tương ứng với hàm lượng cypermethrin được chủng ĐRL8-1 phân giải là 45,03 mg/l. So với tỷ lệ tự phân giải của cypermethrin là 5,12% sau 1 ngày, 5,50% sau 2 ngày và 5,97% sau 3 ngày), tỷ lệ phân giải cypermethrin của chủng ĐRL8-1 luôn cao hơn ở tất cả các độ mặn tại các thời điểm theo dõi chứng tỏ chủng ĐRL8-1 cũng có khả năng phân giải cypermethrin trong môi trường có độ mặn từ 5 - 35‰.

Khác với các chủng trên, chủng NKR1 chưa phân giải cypermethrin trong môi trường vì tỷ lệ phân giải khi nuôi cấy chủng NKR1 sau 1 ngày từ 0,47 – 5,49%, tương đương với tỷ lệ tự phân giải của cypermethrin khi không có vi sinh. Ở môi trường có nồng độ muối thấp (5‰) hoặc cao (35‰), chủng NKR1 chưa có biểu hiện phân giải cypermethrin sau 2 ngày nuôi cấy. Đến thời điểm sau 3 ngày nuôi cấy, chủng NKR1 phân giải cypemethrin ở tất cả các độ mặn nghiên cứu, trong đó tỷ lệ phân giải cypermethrin tại thời điểm 3 ngày ở môi trường có độ mặn 15‰ đạt 18,76%, tương ứng với hàm lượng cypermethrin được chủng NKR1 phân giải là 9,38 mg/l.

Khác với chủng các chủng trên, chủng BAT1 bắt đầu phân giải cypermethrin chỉ trong môi trường có độ mặn 15‰ sau 1 ngày và 2 ngày nuôi cấy, ở các độ mặn còn lại hầu như không phân giải. Đến thời điểm sau 3 ngày nuôi cấy, chủng BAT1 phân giải cypemethrin ở hầu hết các độ mặn nghiên cứu, trong đó tỷ lệ phân giải cypermethrin đạt cao nhất ở môi trường có độ mặn 5‰ và 15‰ và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các môi trường có độ mặn 20‰ hay 35‰. Tỷ lệ phân giải cypermethrin của chủng BAT1 tại thời điểm 3 ngày ở môi trường có độ mặn 5 - 15‰ đạt 36,02 – 37,14%, tương ứng với hàm lượng cypermethrin được chủng BAT1 phân giải là 18,01 – 18,57 mg/l. Như vậy, có thể kết luận rằng chủng BAT1 không có khả năng phân giải cypermethrin trong môi trường có độ mặn lớn hơn 20‰ (đồ thị 1b).

Căn cứ vào độ mặn thực tế của dịch canh trùng có thể kết luận chủng NKR1 có khả năng phân giải cypermethrin khi môi trường có độ mặn từ 16,59 đến 24,29‰, trong đó tỷ lệ phân giải cypermethrin cao nhất là 17,53% (tương ứng với 8,77 mg/l cypermethrin được chủng NKR1 phân giải) sau 2 ngày nuôi cấy trong môi trường có độ mặn 16,59 ‰ và tỷ lệ phân giải cypermethrin cao nhất là 18,76%, (tương ứng với 9,38 mg/l cypermethrin được chủng NKR1 phân giải) sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường có độ mặn 24,29‰.

Kết quả này cho thấy khi có bổ sung vi sinh mật độ  $1 \times 10^6$  CFU/ml, tỉ lệ phân giải cypermethrin đã cao hơn so với sự tự phân giải cypermethrin trong môi trường chứng tỏ rằng các vi sinh này đã góp phần vào việc phân giải cypermethrin trong môi trường. Trong 5 chủng vi sinh nghiên cứu thì chủng ĐRL8-1 và ĐRL1 đã thúc đẩy quá trình phân giải cypermethrin tốt nhất, khác biệt so với 3 chủng còn lại.

Theo dõi sự liên quan giữa tỉ lệ phân giải cypermethrin và mật độ của chủng các chủng vi sinh nghiên cứu ở thời điểm 3 ngày có thể nhận thấy rằng mật độ vi sinh càng tăng thì tỉ lệ phân giải cypermethrin càng tăng chứng tỏ trong môi trường MSM bổ sung 50 mg/l cypermethrin như là nguồn cacbon duy nhất, chủng ĐRL8-1 và ĐRL1 nói riêng và các chủng khác nói chung đã sử dụng cypermethrin làm nguồn dinh dưỡng để gia tăng sinh khối, vì thế hàm lượng cypermethrin trong môi trường giảm, dẫn đến tỉ lệ phân giải cypermethrin tăng.

Dựa vào chỉ tiêu tỉ lệ phân giải cypermethrin tại thời điểm 3 ngày có thể sắp xếp theo thứ tự giảm dần khả năng phân giải cypermethrin của 5 chủng tuyển chọn như sau: Chủng ĐRL8-1 (tỉ lệ phân giải cypermethrin 90,05%) > Chủng ĐRL1 (82,84 %) > Chủng BAT1 (36 – 37 %) > Chủng NAT11 (28,3%) > Chủng NKR1 (18,76%).

Như vậy, sau 3 ngày bổ sung, 2 chủng ĐRL1 và ĐRL8-1 có khả năng phân giải cypermethrin vượt trội so với 3 chủng còn lại, đặc biệt là ở môi trường có độ mặn từ 15% đến 20%.

### **Định danh các chủng vi sinh có khả năng phân giải nhanh cypermethrin tuyển chọn.**

#### **Định danh chủng ĐRL8-1**

##### ***Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch***

- Hình dáng và màu sắc khuẩn lạc: khuẩn lạc ban đầu tròn, lồi, đường kính khoảng 2-3mm, màu vàng nhạt, sau đó chuyển sang màu xám với bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, có nhân lồi ở giữa. Mép khuẩn lạc không đều. Khuẩn ty khí sinh phát triển mạnh mẽ và có màu từ trắng đến gio xám. Mặt dưới khuẩn lạc bám chặt vào môi trường.
- Không sinh giọt tiết.
- Có mùi đặc trưng của xạ khuẩn.
- Tiết sắc tố vàng.

##### ***Quan sát đặc điểm vi học***

Quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1000 lần cho thấy, chủng A bắt màu tím của thuốc nhuộm nên là gram dương, có cuống sinh bào tử thẳng, bào tử tròn.

##### ***Một số đặc điểm sinh hóa***

Chủng ĐRL8-1 có thể phát triển ở pH từ 7 – 10, nhiệt độ từ 25 – 40°C, độ mặn từ 5 - 50%; có khả năng sử dụng citrate, dương tính với các phản ứng thủy phân tinh bột, indole, catalase, urease, oxidase, khử nitrate. Chủng ĐRL8-1 có thể sử dụng các nguồn đường ribose, dextrose, fructose, không sử dụng các nguồn đường sucrose, galactose, mannose,...(bảng 4)

*Bảng 4. Các phản ứng sinh hóa thực hiện trên chủng ĐRL8-1*

STT	Tên thí nghiệm	Kết quả	STT	Tên thí nghiệm	Kết quả
1	pH 7 – 10	+	12.	Sinh acid từ các nguồn đường:	
2	Nhiệt độ 25 – 40°C	+	12.1	Ribose	+
3	Độ mặn 5 - 50%	+	12.2	Dextrose	+
4	Thủy phân tinh bột	+	12.3	Fructose	+

5	Thủy phân casein	-	12.4	Sucrose	-
6	Thủy phân indole	+	12.5	Galactose	-
7	Catalase	+	12.6	Mannose	-
8	Oxidase	+	12.7	Mannitol	-
9	Urease	+	12.8	Raffinose	-
10	Sử dụng citrate	+	12.9	Inositol	-
11	Khử nitrate	+			

*Ghi chú: (+): dương tính/phát triển được; (-): âm tính/không phát triển được*

Như vậy, dựa vào các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, đặc điểm vi học, so sánh với khóa phân loại xạ khuẩn của Waksman (1961), và đối chiếu với kết quả báo cáo của Prakasham Reddy Shetty và cs (2014) [8] có thể phân loại chủng ĐRL8-1 như sau:

Giới: Xạ khuẩn

Ngành: Actinobacteria

Bộ: Actinomycetales

Họ: Streptomycineae

Chi: *Streptomyces*

Loài: *Streptomyces parvulus*

Loài *Streptomyces parvulus* phân lập và tuyển chọn được có khả năng phân giải cypermethrin nồng độ 50 mg/l trong môi trường MSM có pH 6,64 – 6,87, nhiệt độ phòng với tỉ lệ phân giải 21,46% sau 24 giờ ; 35,23% sau 48 giờ và 90,05% sau 72 giờ nuôi cấy. So với nghiên cứu của các tác giả Lin, Chen và cs. (2011) thì loài *Streptomyces parvulus* tuyển chọn có khả năng phân giải cypermethrin chậm hơn (loài *Streptomyces parvulus* phân lập từ nước thải từ nghiên cứu của Lin, Chen và cs. (2011) có khả năng phân giải 92,1% cypermethrin ở nồng độ 50 mg/l trong môi trường có nguồn tinh bột hoặc glucose sau 24 giờ, và phân hủy hoàn toàn cypermethrin trong vòng 30 giờ) [5]. Nguyên nhân có thể do trong điều kiện môi trường khác nhau về thành phần dinh dưỡng, pH và nhiệt độ nuôi cấy, khả năng phân giải cypermethrin của chủng *Streptomyces parvulus* đã có sự thay đổi.

### **Định danh chủng ĐRL1**

#### ***Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch***

Khuẩn lạc màu vàng, xuất hiện cả 2 dạng khô và trơn trên cùng một môi trường nuôi cấy. Sinh sắc tố màu vàng khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời.

#### ***Quan sát đặc điểm vi học***

- Chủng ĐRL1 là một vi khuẩn có khả năng sinh sắc tố màu vàng khi tiếp xúc với ánh sáng, có tính kháng acid do đó không phân biệt gram âm hay gram dương. Tế bào hình que mỏng, có 2 dạng khuẩn lạc (thô và trơn) cùng phát triển trên một môi trường.

#### ***Một số đặc điểm sinh hóa***

Chủng ĐRL1 có khả năng phát triển nhanh trong điều kiện nhiệt độ 25 – 37°C, không phát triển được ở 45°C, chịu được độ mặn 50‰, dương tính với catalase, urease, tween, có khả năng khử nitrate, hấp thu sắt, không phát triển được trong acid picric 0,2%, sử dụng được nguồn manitol, inositol, citrate (bảng 5).

*Bảng 5. Các phản ứng sinh hóa thực hiện trên chủng ĐRL1*

STT	Tên phản ứng	Kết quả	STT	Tên phản ứng	Kết quả
1	Nhiệt độ 25-37°C	+	11. Nguồn C sử dụng:		
2	Nhiệt độ 45°C	-	11.1	Mannitol	+
3	Độ mặn 5 – 50‰	+	11.2	Citrate	+
4	Di động	-	11.3	Inositol	+
5	Catalase	+			
6	Oxydase	-			
7	Thủy phân ure	+			
8	Hấp thu Fe	+			
9	Khử nitrate	+			
10	Acid picric 0,2%	-			

*Ghi chú: (+): dương tính/phát triển được; (-): âm tính/không phát triển được*

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào các phương pháp phân loại Mycobacteria của E. H. Runyon [7] và cuốn sách “Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria” của trường ĐH Federal de Saõo Paulo – Brasil (2004)[10] có thể phân loại chủng ĐRL1 như sau:

Giới: Bacteria

Ngành: Actinobacteria

Lớp: Actinomycetales

Bộ: Corynebacterineae

Họ: *Mycobacteriaceae*

Loài: *Mycobacterium vaccae*

Theo nghiên cứu của Burbach và cs. (1993), loài *Mycobacterium vaccae* là một vi khuẩn có khả năng phân giải nhiều chất hữu cơ là thành phần trong một số loại thuốc BVTV: thủy phân acetone, cyclohexane, styrene, benzene, ethylbenzene, propylbenzene, dioxane, và 1,2-dichloroethylene khi từng chất này được thêm vào môi trường, trong đó acetone và toluene ở nồng độ 100 mg/l bị thủy phân hoàn toàn bởi chủng này sau 48 giờ; các chất propylbenzene, 1,2-dichloroethylene, o-xylene, dioxane, styrene và cyclohexane ở nồng độ 100 mg/l bị thủy phân dưới 50% sau 48 giờ; ở nồng độ 50 mg/l, chlorobenzen bị thủy phân 65%, ethylbenzen bị thủy phân 80% và propylbenzene bị thủy phân hoàn toàn sau 48 giờ [2]. Theo kết quả của chúng tôi, chủng *Mycobacterium vaccae* tuyển chọn được có khả năng phân giải cypermethrin nồng độ 50 mg/l trong môi trường MSM. Tỷ lệ phân giải phân giải cypermethrin của chủng *Mycobacterium vaccae* tuyển chọn đạt 33,6% sau 24 giờ, 46,61% sau 48 giờ và 82,84% sau 72 giờ ở pH dao động từ 6,52 – 6,77.

### **Định danh chủng BAT1**

#### ***Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch***

- Hình dáng và màu sắc khuẩn lạc: khuẩn lạc tròn, đồng nhất, lồi, màu trắng sữa, đường kính khuẩn lạc khoảng 3-5mm. Mép khuẩn lạc tròn. Mặt dưới khuẩn lạc bám nhẹ vào môi trường. Chấy nhầy màu be.
- Có mùi đặc trưng của vi khuẩn.
- Không tiết sắc tố.

#### ***Quan sát đặc điểm vi học***

Chủng BAT1 là vi khuẩn hiếu khí, không di động, không sinh bào tử và không lên men. Tế bào chủng BAT1 bắt màu hồng của thuốc nhuộm (gram âm), hình que.

**Một số đặc điểm sinh hóa**

Chủng BAT1 sinh trưởng tốt trên môi trường chứa cao nấm men – manitol agar ở 25-35°C, có khuẩn lạc màu trắng, dương tính với oxidase và catalase, có khả năng thủy phân urê, không di động và không có khả năng khử nitrate. Nguồn carbon sử dụng: L- arabinose, citrate, D- fucose, L- fucose, gluconate, glucose, lactose, D- mannose, maltose, mannitol và L- xylose (bảng 6).

Bảng 6. Các phản ứng sinh hóa thực hiện trên chủng BAT1

STT	Tên phản ứng	Kết quả	STT	Tên phản ứng	Kết quả
1	Nhiệt độ 25-35°C	+	9. Nguồn C sử dụng:		
2	pH 10	+	9.1	L- arabinose	+
3	Độ mặn 5 – 35‰	+	9.2	D- fucose	+
4	Di động	-	9.3	L- fucose	+
5	Catalase	+	9.4	Citrate	+
6	Oxydase	+	9.5	D- mannose	+
7	Thủy phân ure	+	9.6	Maltose	+
8	Khử nitrate	-	9.7	Gluconate	+
			9.8	Glucose	+
			9.9	Lactose	+
			9.10	D- mannose	+
			9.11	Maltose	+
			9.12	Mannitol	+

Ghi chú: (+): dương tính/ phát triển được; (-): âm tính/không phát triển được

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào báo cáo của Martha E. Trujillo và cs. [6] có thể phân loại chủng BAT1 như sau:

Giới: Bacteria

Ngành: Proteobacteria

Lớp: Alpha Proteobacteria

Bộ: Rhizobiales

Họ: Brucellaceae

Chi: *Ochrobactrum*

Loài: *Ochrobactrum lupini*

Năm 2011, Shaohua Chen và cs. đã phân lập được loài *Ochrobactrum lupini* từ bùn hoạt tính, loài này có khả năng phân giải hơn 90%  $\beta$ -cypermethrin có nồng độ 50 mg/l trong môi trường MSM chỉ sau 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ 30°C và pH 7. Hơn nữa, chủng này còn có khả năng phân giải  $\beta$ -cyfluthrin, fenprothrin, cyhalothrin và deltamethrin [9]. Loài *Ochrobactrum lupini* tuyển chọn được phân lập từ bùn ao tôm có khả năng phân giải 37,14%  $\alpha$ -cypermethrin (nồng độ ban đầu 50 mg/l) sau 3 ngày ở điều kiện hiếu khí, nhiệt độ phòng và pH dao động từ 6,58 – 6,82. Sự khác nhau về cơ chất, điều kiện môi trường nuôi cấy cho thấy khả năng phân giải cypermethrin của *O.lupini* cũng có sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu.

## KẾT LUẬN

Trong số 27 chủng vi sinh có khả năng phát triển trên môi trường chứa cypermethrin như nguồn carbon duy nhất phân lập được đã phát hiện được 5 chủng có khả năng phát triển nhanh, ổn định và không có nguy cơ gây bệnh cho người và động vật là NAT1, BAT1, ĐRL1, ĐRL8-1 và NKR1.

Khả năng phân giải cypermethrin của 5 chủng vi sinh tuyển chọn theo thứ tự giảm dần: ĐRL8-1>ĐRL1>>BAT1>NAT1>NKR1, trong đó 2 chủng ĐRL8-1 và ĐRL1 có khả năng phân giải cypermethrin vượt trội (tỷ lệ phân giải cypermethrin đạt 82,84 – 90,05% sau 3 ngày trong môi trường có cypermethrin nồng độ 50 mg/l).

Kết quả định danh các chủng vi sinh tuyển chọn cho thấy ĐRL8-1 là *Streptomyces parvulus*, ĐRL1 là *Mycobacterium vaccae* và BAT1 là *Ochrobactrum lupini*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Hiền và cs. (2011). *Đánh giá ảnh hưởng của cypermethrin ở các nồng độ khác nhau lên tỷ lệ sống và hiện tượng hoại tử cơ quan gan tụy trên tôm sú nuôi trong điều kiện thực nghiệm trong nhà kính*. Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II.
2. Burbach B. L. and J J Perr J. J. (1993). *Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by Mycobacterium vaccae*. *Appl. Environ. Microbiol.* April 1993 vol. 59 no. 4 1025-1029.
3. European Commission, Health & Consumer protection directorate-general (2005). *Review report for the active substance cypermethrin*.
4. Hansa Boricha and MH Fulekar (2009). *Pseudomonas plecoglossicida as a novel organism for the bioremediation of cypermethrin*. *Biology and Medicine*, Vol 1 (4), 2009, pages 1-10.
5. Lin Q. S., Chen S.H., M. Y. Hu, M. R. Ul Haq, L. Yang, H. Li (2011). *Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated Actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge*. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (1), 45-56, Winter 2011.
6. Martha E. Trujillo (2005), *Nodulation of Lupinus albus by Strains of Ochrobactrum lupini sp. nov.*, *Appl Environ Microbiol.* Mar 2005; 71(3): 1318–1327.
7. Pahl B, & Opitz H (1999). *The effects of cypermethrin (Excis) and azamethiphos (Salmosan) on lobster Homarus americanus H. Milne Edwards larvae in a laboratory study*. *Aquaculture research*, 30(9), 655–665.
8. Prakasham et al. (2014). *Production of polypeptide antibiotic from Streptomyces parvulus and its antibacterial activity*.
9. Shaohua Chen, Meiyang Hu, Jingjing Liu, Guohua Zhong, Liu Yang, Muhammad Rizwan-ul-Haq, Haitao Han (2011). *Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel Ochrobactrum lupini DG-S-01*. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 187, Issues 1-3, 15 March 2011, pages 433-440.
10. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil (2004). *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*.
11. <http://www.bacteriainphotos.com>