

Đánh giá khả năng phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole của một số chủng vi khuẩn phân lập được tại Đà Lạt

Evaluation of degradability of triazole fungicide by bacteria strains isolated in Da Lat

Lương Thị Thấm^{a*}, Nguyễn Tiến Đạt^a, Nguyễn Thị Hồng Thắm^a, Nguyễn Việt Đức^a, Lê Văn Toàn^a, Nguyễn Thùy Hương Trang^a, Nguyễn Lê Hoài Bảo^a, Phạm Thị Hồng Trang^{bc}, Hồ Thanh Tâm^{bc*}, Lương Thị Tham^{a*}, Nguyễn Tiến Đạt^a, Nguyễn Thị Hồng Thắm^a, Nguyễn Việt Đức^a, Lê Văn Toàn^a, Nguyễn Thùy Hương Trang^a, Nguyễn Lê Hoài Bảo^a, Phạm Thị Hồng Trang^{bc}, Hồ Thanh Tâm^{bc*}

^aViện Nghiên cứu Hạt nhân, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

^aDa Lat Nuclear Research Institute, Lam Dong, Viet Nam

^bViện Sáng kiến Sức khỏe Toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^bInstitute for Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

^cKhoa Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^cFaculty of Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Viet Nam

(Ngày nhận bài: 25/8/2022, ngày phản biện xong: 28/9/2022, ngày chấp nhận đăng: 10/11/2022)

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và đánh giá các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy sinh học hiệu quả nhóm thuốc trừ nấm triazole trong đất canh tác nông nghiệp tại Đà Lạt. Mười sáu chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường muối khoáng tối thiểu có bổ sung ba loại thuốc trừ nấm thuộc nhóm triazole là hexaconazole, propiconazole và difenoconazole ở nồng độ 100mg/L như nguồn carbon duy nhất đã được phân lập từ mười mẫu đất lấy từ các ruộng trồng rau và hoa. Trong số các chủng phân lập, hai chủng vi khuẩn Đ5.2 và Đ9.1 biểu hiện khả năng phát triển mạnh nhất trên các môi trường có nồng độ hexaconazole, propiconazole và difenoconazole khác nhau. Hai chủng này có khả năng phân hủy trên 60% hàm lượng các hoạt chất hexaconazole, propiconazole và difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau 15 ngày. Kết quả giải mã trình tự gen 16S rRNA cho thấy 2 chủng vi khuẩn Đ5.2 và Đ9.1 được định danh lần lượt là *Klebsiella* spp. và *Pseudomonas aeruginosa*.

Từ khóa: Hexaconazole; propiconazole; difenoconazole; phân hủy sinh học; Đà Lạt.

Abstract

This study aims to isolate, select and evaluate the capable biodegradation of fungicides triazole groups by native bacteria strains, which were isolated from ten agricultural soil samples (from vegetable and flower fields) in Da Lat city. Sixteen bacteria strains capable grew on minimal mineral salt media supplemented with three fungicide types (hexaconazole, propiconazole and difenoconazole), which belong to the triazole group. The concentration of 100mg/L of fungicides was supplemented as the sole carbon source. Among the isolates, two strains D5.2 and D9.1 showed the strongest growth ability on media with different concentrations of hexaconazole, propiconazole and difenoconazole. These two strains degraded more than 60% of hexaconazole, propiconazole and difenoconazole added to the culture

* *Corresponding Author:* Lương Thị Tham, Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam;

Hồ Thanh Tâm, Viện Sáng kiến Sức khỏe Toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam; Khoa Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

Email: luongtham0710917@gmail.com; hothanhtam2@duytan.edu.vn

medium after 15 days. The results of 16S rRNA gene sequencing showed that two bacterial strains D5.2 and D9.1 were identified as *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

Keywords: Hexaconazole; propiconazole; difenoconazole; biodegradation; Da Lat.

1. Giới thiệu

Difenoconazole, hexaconazole và propiconazole là 3 hoạt chất trừ nấm thuộc nhóm thuốc diệt nấm triazole. Chúng là hoạt chất nội hấp, có phổ tác động rộng phòng trị được nhiều loại nấm bệnh khác nhau. Ba hoạt chất trừ nấm này được sử dụng rất nhiều để bảo quản hạt giống, trị bệnh nhiễm trùng trên các loại cây trồng như cây ngũ cốc, cây cảnh và cây ăn quả nhằm ngăn ngừa mất mùa và tăng năng suất cây trồng [1]. Nhóm thuốc diệt nấm triazole có tác dụng ức chế enzyme lanosterol 14 α -demethylase, đây là enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp ergosterol, một thành phần chính của màng tế bào nấm, do đó ức chế sự phát triển của nấm [2]. Tuy nhiên, do tính ổn định cao, tính ưa béo trung bình và có thời gian bán phân hủy hóa học và quang hóa dài, nhóm thuốc diệt nấm triazole có xu hướng dễ dàng di chuyển và tích lũy trong môi trường đất và nước. Vì vậy, nhóm thuốc diệt nấm này được coi là chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy [3]. Chúng không thể dễ dàng bị phân hủy trong môi trường và có độ bay hơi kém ngay cả ở điều kiện nhiệt độ tương đối cao. Nhiều loại thuốc trong số chúng có chu kỳ bán rã khá dài trong môi trường tự nhiên, gây ra các vấn đề sinh thái nghiêm trọng [4]. Vì vậy, chúng có thể gây độc cho nhiều loại sinh vật không phải mục tiêu và chúng còn tác động trực tiếp và gián tiếp đến hệ vi sinh vật trong đất [2]. Hơn nữa, triazole còn có thể ảnh hưởng đến sức khỏe con người bằng cách làm rối loạn chức năng nội tiết [3].

Tuy nhiên, từ dữ liệu bán hàng cho thấy rằng, nhóm thuốc trừ nấm triazol chiếm hơn 25% doanh số bán thuốc diệt nấm trên toàn cầu [1]. Ở Việt Nam, theo kết quả điều tra về thực trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật tại vùng đồng bằng sông Cửu Long, cho thấy

hexaconazole, propiconazole và difenoconazole là 3 loại thuốc được nông dân sử dụng nhiều nhất, chiếm 11,8% [5]. Đà Lạt được biết đến là một trong những địa phương phát triển nông nghiệp công nghệ cao hàng đầu ở nước ta, nổi tiếng với những sản phẩm rau và hoa. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật cũng như tồn dư của chúng trong đất và các sản phẩm nông nghiệp là một vấn đề đáng quan tâm hiện nay [6]. Do đó, việc phát triển một phương pháp có tính hiệu quả để loại bỏ tồn dư thuốc diệt nấm triazole ra khỏi môi trường bị ô nhiễm có ý nghĩa rất lớn. Cho đến nay, các phương pháp hóa lý như hấp phụ, hấp thụ, khoáng hóa, quang xúc tác và oxy hóa đã được phát triển để phân hủy hoặc biến đổi triazole và các dẫn xuất của nó. Tuy nhiên, các phương pháp hóa lý đã được chứng minh là tốn kém và có những nhược điểm như tạo ra nhiều chất trung gian độc hại và khó phân hủy hơn. Cho nên, các phương pháp sinh học đã trở thành một giải pháp thay thế thuận lợi vì chúng có hiệu quả cao, có tính chọn lọc cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường. Phương pháp này dựa trên khả năng trao đổi chất vốn có của vi khuẩn, nấm mà qua đó các chất ô nhiễm có thể được chuyển đổi bằng enzyme của vi sinh vật thành các sản phẩm ít độc hại hoặc vô hại hơn [7]. Hiện nay, đã có một số chủng vi sinh như *Bacillus*, *Enterobacteria*, *Serratia*, *Kitasatospora*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* và *Shinella*... được báo cáo là có khả năng phân hủy các dẫn xuất của triazole, chẳng hạn như propiconazole, triazophos, tebuconazole và nicotine [4].

Mặc dù đã phân lập được một số các loài vi sinh vật có khả năng phân hủy thuốc trừ nấm trong môi trường, nhưng khả năng phân hủy của các loài vi sinh vật lại bị ảnh hưởng nhiều

bởi các yếu tố môi trường (như pH, nhiệt độ, độ ẩm, hàm lượng chất dinh dưỡng trong đất) [6]. Do đó, sự đa dạng về các loài vi sinh vật có khả năng phân hủy thuốc trừ nấm sẽ làm tăng tính khả thi trong việc phát triển công nghệ ứng dụng vi sinh trong xử lý đất ô nhiễm thuốc trừ nấm triazole. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập ra các chủng vi khuẩn hiếu khí bản địa tại Đà Lạt có khả năng phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole nhanh chóng và hiệu quả. Việc phân lập các chủng vi khuẩn bản địa để xử lý đất ô nhiễm thuốc trừ nấm triazole sẽ rất thuận lợi cho việc ứng dụng chúng vào xử lý đất nông nghiệp bị ô nhiễm hóa chất thuốc bảo vệ thực vật tại địa phương.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

10 mẫu đất được lấy từ 5 vùng canh tác trên 5 năm có phun thuốc trừ nấm ở các phường trồng nhiều rau và hoa trên địa bàn thành phố Đà Lạt (Bảng 1). Việc lấy mẫu được thực hiện theo TCVN 7538-6:2010 [8]. 200g mỗi mẫu đất được lấy ở vị trí từ bề mặt tới 10cm dưới mặt đất. Mẫu được giữ trong các túi nilon sạch và được bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập vi khuẩn.

Thuốc trừ nấm (hexaconazole, propiconazole và difenoconazole) 99,5% được cung cấp bởi công ty Fluka (Sigma). Dung dịch stock propiconazole 100mg/mL được hòa tan trong acetone, trước khi bổ sung vào môi

trường nuôi cấy được lọc bằng màng lọc Syringe 0,2µm tiệt trùng (Sartorius, Đức).

MSM (mineral salt medium - hãng Coleman Lab) lỏng và MSM - Agar được bổ sung hexaconazole, propiconazole và difenoconazole (như nguồn carbon duy nhất) với các nồng độ 100, 200, 300, 400 và 500mg/mL là môi trường tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole. Môi trường TSA (Tryptone Soya Agar - Merck) làm môi trường tăng sinh và giữ giống. Bộ dung dịch nhuộm gram (hãng Liofilchem), H₂O₂ - Merck (thử nghiệm Catalase), đĩa sinh học Oxidase - Merck (xét nghiệm Oxidase), môi trường TSI (Triple Sugar Iron) Agar - Merck (thử nghiệm lên men các loại đường, sinh H₂S), môi trường Urea Agar - Merck (thử nghiệm phản ứng Ureasa), thuốc thử Kovac - Merck (thử nghiệm sinh Indol), môi trường Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP) - Merck (phản ứng MR (methyl Red) và phản ứng VP (Voges - Proskauer)), môi trường Simmon's Citrate Agar - Merck (phản ứng citrate), môi trường thạch máu (Blood Agar) - Merck (thử nghiệm phản ứng tan máu) [9].

Các hóa chất dùng cho phân tích sắc ký bao gồm: N-hexane, toluene, acetone, Na₂SO₄ khan, than hoạt tính (hãng Merck, Đức); cột chiết pha rắn ENVI-florisil Supelclean (500mg/3 mL, Sigma Aldrich, Mỹ); giấy lọc sợi thủy tinh (47mm, cỡ lỗ 1,6µm, Whatman, Anh) [10].

Bảng 1: Danh sách các mẫu đất dùng cho thí nghiệm

STT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm	Loại cây trồng	Thời gian sử dụng thuốc BVTV (năm)
1	Đ1	Trần Anh Tông, Phường 8, TP. Đà Lạt	Hoa cúc	10
2	Đ2	Trần Anh Tông, Phường 8, TP. Đà Lạt	Khoai tây	7
3	Đ3	Tổ 2, Phường 7, TP. Đà Lạt	Bắp cải	10
4	Đ4	Tổ 2, Phường 7, TP. Đà Lạt	Hành parô	8
5	Đ5	Vạn Thành, Phường 5, TP. Đà Lạt	Hoa hồng	10
6	Đ6	Vạn Thành, Phường 5, TP. Đà Lạt	Hoa Ly	5

7	Đ7	Trịnh Hoài Đức, Phường 11, TP. Đà Lạt	Hoa Ly	10
8	Đ8	Trịnh Hoài Đức, Phường 11, TP. Đà Lạt	Xà lách	8
9	Đ9	Khu Lâm Viên, Phường 9, TP. Đà Lạt	Hoa cúc	9
10	Đ10	Thái Phiên, Phường 12, TP. Đà Lạt	Bắp cải	6

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole bằng cách cấy chuyển nhiều lần các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường có nồng độ hexaconazole, propiconazole và difenoconazole tăng dần. Mẫu đất sau khi trộn đều, cân 10g cho vào chai thủy tinh 250mL chứa 90mL dung dịch nước muối sinh lý và lắc với tốc độ 130rpm trong 1 giờ, để lắng 15 phút sau đó chuyển 1mL dung dịch trên sang bình tam giác dung tích 100mL chứa 24mL MSM có bổ sung hexaconazole, propiconazole và difenoconazole nồng độ 100mg/L. Bình tam giác trên được lắc ngang liên tục trên máy lắc với tốc độ 110 vòng/phút, trong tối ở điều kiện nhiệt độ phòng. Khi môi trường trở nên đục thì lại tiến hành cấy chuyển sang môi trường MSM có bổ sung hexaconazole, propiconazole và difenoconazole đạt 100mg/L. Số lần cấy chuyển được lặp lại 5 lần cho mỗi tổ hợp vi khuẩn [6].

Sau 5 lần cấy chuyển, 1mL huyền phù vi khuẩn được pha loãng bằng dung dịch NaCl 9‰ đến độ pha loãng 10^{-4} - 10^{-7} . Sau đó trải 100 μ L mẫu của từng độ pha loãng lên các đĩa môi trường MSM agar có bổ sung 100mg/L hexaconazole, propiconazole và difenoconazole và ủ ở 30°C. Sau 3 ngày nuôi cấy, tuyển chọn những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái để tạo chủng thuần bằng phương pháp cấy ria trên môi trường TSA [11]. Tiến hành sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole hiệu quả bằng cách cấy chuyển nhiều lần các chủng phân lập được trên MSM có bổ sung hexaconazole, propiconazole

và difenoconazole (như nguồn carbon duy nhất) với các nồng độ tăng dần 100, 200, 300, 400 và 500mg/L [9].

2.2.2. Định danh khoa học các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hiệu quả hexaconazole, propiconazole và difenoconazole

Phương pháp sinh hóa: Sau khi xác định được các chủng vi khuẩn phân hủy hiệu quả hexaconazole, propiconazole và difenoconazole, tiến hành nhận diện Gram và xác định hình thái tế, tính di động, phản ứng catalase, oxidase, thử nghiệm lên men các loại đường, sinh H₂S, sinh Indol, Ureasa, phản ứng MR (methyl Red), phản ứng VP (Voges - Proskauer), phản ứng citrate và hoạt động tan máu [6, 12, 13].

Phương pháp sinh học phân tử: Tiến hành giải trình tự sản phẩm với từng môi 27F/1492R có trình tự như sau: 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT riêng biệt cho sản phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger trên thiết bị ABI 3500 (ThermoFisher). Kết quả giải trình tự thu được dưới dạng file .ab1 sẽ được so sánh và dò tìm trên ngân hàng gene NCBI tại trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định mức độ tương đồng của các chủng vi khuẩn khảo sát với các trình tự đã lưu trữ trên NCBI. Nhận dạng ở cấp độ loài được xác định là trình tự rDNA 16S tương đồng $\geq 99\%$ với trình tự chủng nguyên mẫu trong ngân hàng gen; nhận dạng ở cấp độ chi được xác định là trình tự rDNA 16S tương tự $\geq 97\%$ với trình tự chủng nguyên mẫu trong ngân hàng gen [6].

2.2.3. Đánh giá khả năng phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole của 2 chủng vi khuẩn

Chủng 1mL dịch nuôi cấy từng loại vi khuẩn với mật độ 10^6 (CFU/ml) vào 99mL môi trường MSM có bổ sung hexaconazole, propiconazole và difenoconazole ở nồng độ 100mg/L làm nguồn cacbon duy nhất. Các mẫu được nuôi cấy trong tối và được thông khí bằng cách lắc với tốc độ 110 vòng/phút, ở nhiệt độ $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Khảo sát khả năng phân hủy hexaconazole,

propiconazole và difenoconazole dựa trên lượng hexaconazole, propiconazole và difenoconazole còn lại sau mỗi 6 ngày trong vòng 30 ngày bằng phương pháp GC-ECD (Gas Chromatography - Electron Capture Detector) trên thiết bị GC-2020 plus theo TCVN 11479:2016 [14]. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và mẫu đối chứng không bổ sung chủng vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Thành phần môi trường của thí nghiệm

Nghiệm thức	Thành phần môi trường	
	(MSM + Hexaconazole (100mg/L), Propiconazole (100mg/L) và Difenoconazole (100mg/L), nhiệt độ $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$, pH 7)	Mật độ vi khuẩn (10^6 CFU/mL)
1	99mL môi trường	1mL chủng vi khuẩn Đ5-2-L1
2	99mL môi trường	1mL chủng vi khuẩn Đ10-3-L2
3	100mL môi trường	Không bổ sung chủng vi khuẩn

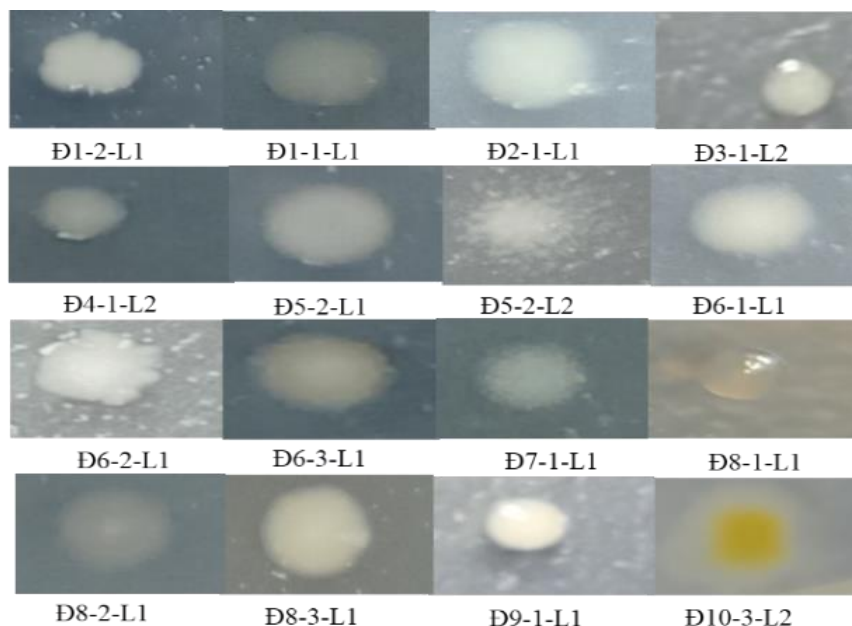
2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, ít nhất 3 lần lặp lại. Số liệu thống kê được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm SPSS (Version 25.0).

3. Kết quả

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole

Từ 10 mẫu đất thu thập chúng tôi đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn hiếu khí (VKHK) có khả năng sử dụng nhóm thuốc trừ nấm triazole (hexaconazole, propiconazole và difenoconazole) làm nguồn carbon duy nhất. Kết quả phân lập sơ bộ ban đầu dựa trên sự khác nhau về hình dạng, màu sắc, kích thước khuẩn lạc, cho thấy: các khuẩn lạc có dạng hình tròn, bờ đều hoặc không đều; độ nổi có các dạng phẳng, lồi; màu sắc bao gồm màu trắng đục, trắng trong, trắng sữa, vàng (Hình 1).



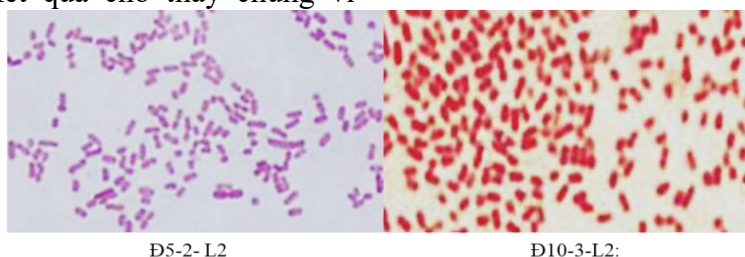
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc 16 chủng VKHK phân lập được trên môi trường MSM agar. Đ1-1-L1, Đ1-2-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ1; Đ2-1-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ2; Đ3-1-L2: được phân lập từ mẫu đất Đ3; Đ4-1-L2: được phân lập từ mẫu đất Đ4; Đ5-1-L1, Đ5-2-L2: được phân lập từ mẫu đất Đ5; Đ6-1-L1, Đ6-2-L1, Đ6-3-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ6; Đ7-1-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ7; Đ8-1-L1, Đ8-2-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ8; Đ9-1-L1: được phân lập từ mẫu đất Đ9; Đ10-3-L2: được phân lập từ mẫu đất Đ10.

Các chủng thuần sau khi được phân lập sẽ tiến hành sàng lọc để tìm ra chủng có khả năng phân hủy nhóm thuốc trừ nấm triazole hiệu quả. Kết quả đã chọn ra được 2 chủng có ký hiệu là Đ5-2-L1 (thu được trên mẫu đất trồng hoa hồng tại Vạn Thành, Phường 5, TP. Đà Lạt) và Đ10-3-L2 (thu được từ mẫu đất trồng bắp cải tại Thái Phiên, Phường 12, TP. Đà Lạt) có khả năng sinh trưởng rất tốt trong môi trường bổ sung lần lượt hexaconazole, propiconazole và difenoconazole với nồng độ lên đến 500mg/L.

3.2. Đặc tính sinh học của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2

Một số đặc tính sinh học của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2 được mô tả ở Bảng 3, Hình 2. Kết quả cho thấy chủng vi

khuẩn Đ5-2-L1 có dạng hình que, Gram âm, không có khả năng di động, catalase dương tính, oxidase âm tính, sinh indole, lên men các loại đường (glucose, sucrose, lactose) và không sinh khí H₂S, urease dương tính, phản ứng VP (Voges - Proskauer) dương tính, phản ứng MR (methyl Red) âm tính, phản ứng citrate dương tính và không làm tan máu; chủng vi khuẩn Đ10-3-L2 có dạng hình que, Gram âm, có khả năng di động, catalase dương tính, oxidase dương tính, không sinh indole, lên men các loại đường (glucose, sucrose) không lên men đường lactose và không sinh khí H₂S, urease âm tính, phản ứng VP (Voges - Proskauer) âm tính, phản ứng MR (methyl Red) âm tính, phản ứng citrate dương tính và không làm tan máu.



Hình 2. Hình nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn, chụp dưới kính hiển vi (X100).

Bảng 3. Một số đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn

Đặc tính	Chủng vi khuẩn ^z	
	Đ5-2-L1	Đ10-3-L2
Hình dạng tế bào	que	que
Gram	-	-
Di động	-	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	+
Sinh indole (IND)	+	-
Lên men Glucose (GLU)	+	+
Lên men Sucrose (SAC)	+	+
Lên men Lactose (LAC)	+	-
H ₂ S	-	-
Ureasa	+	+
Phản ứng VP (Voges - Proskauer)	+	-
Phản ứng MR (methyl Red)	-	-
Phản ứng citrat	+	+
Phản ứng tan máu	-	-

^z Dấu “-” thể hiện âm tính, dấu “+” thể hiện dương tính.

3.3. Giải mã trình tự gen 16S rRNA và xác định ở mức độ loài của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2

Kết quả so sánh trình tự gen của 2 chủng vi khuẩn với gene tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng BlastN cho thấy, chủng Đ5-2-L1 có trình tự nucleotide của gene 16S rRNA tương đồng 99.65% với trình tự gene của loài *Klebsiella oxytoca* chủng S1-2-2 (số đăng ký:

MT509939.1) và chủng Đ10-3-L2 có trình tự nucleotide của gene 16S-rRNA tương đồng 100% với gene của loài *Pseudomonas aeruginosa* chủng AB18 (số đăng ký: MT598026.1), đồng thời kết hợp với những đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn (Bảng 3) nên được định danh lần lượt là loài *Klebsiella oxytoca* và loài *Pseudomonas aeruginosa* (Hình 3-4).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?		
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella oxytoca strain S1-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella oxytoca	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1445	MT509939.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella oxytoca strain M1-3-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella oxytoca	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1437	MT509912.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella oxytoca strain G1-2-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella oxytoca	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1440	MT509881.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella sp. SPC06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella sp. SPC06	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1442	KF945683.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain X16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella pneumoniae	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1443	MZ389255.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella oxytoca strain D1921 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella oxytoca	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1433	MW990118.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella oxytoca strain T0-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella oxytoca	2590	2590	100%	0.0	99.65%	1424	MN330093.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella michiganensis strain XM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Klebsiella michigane...	2584	2584	100%	0.0	99.58%	1441	MT023382.1

Hình 3. Kết quả phân tích BLAST trong NCBI của chủng Đ5-2- L2

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

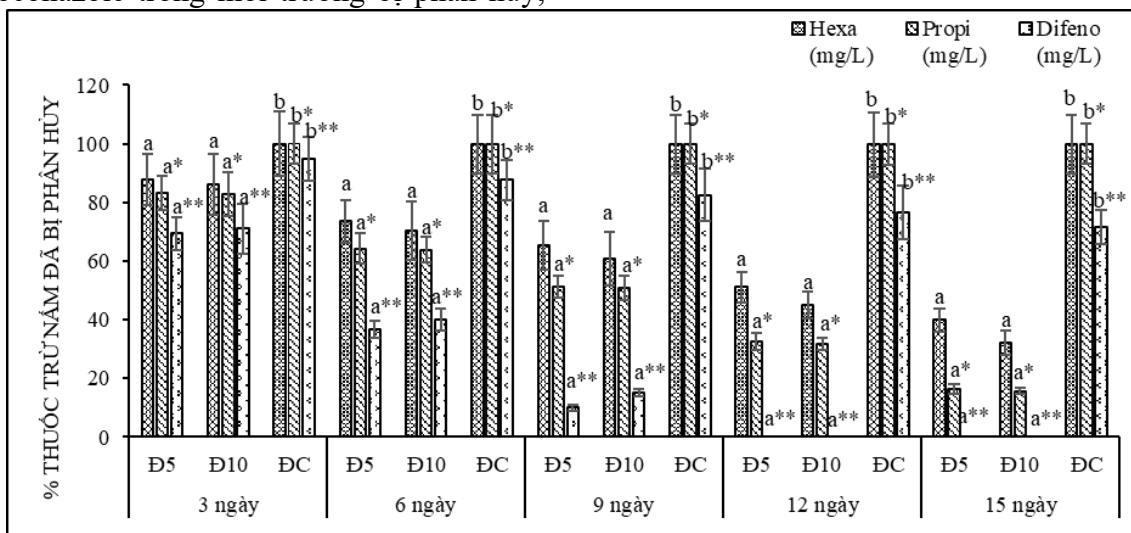
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pseudomonas aeruginosa strain AB18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	2584	2584	100%	0.0	100.00%	1446	MT598026.1
Pseudomonas aeruginosa strain M4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	2584	2584	100%	0.0	100.00%	1435	MT180543.1
Pseudomonas aeruginosa strain BD0603 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	2584	2584	100%	0.0	100.00%	1449	MT109313.1
Pseudomonas aeruginosa strain PA0504 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	2584	2584	100%	0.0	100.00%	1439	MK607451.1
Pseudomonas aeruginosa strain XS 21-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	2584	2584	100%	0.0	100.00%	1426	MT000025.1

Hình 4. Kết quả phân tích BLAST trong NCBI của chủng Đ10-3-L2

3.4. Đánh giá khả năng phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2 trong MSM lỏng

Kết quả phân tích hàm lượng hexaconazole, propiconazole và difenoconazole còn lại trong các nghiệm thức sau 15 ngày nuôi cấy cho thấy, cả 2 chủng vi khuẩn đều có khả năng phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole và có khác biệt thống kê so với mẫu đối chứng (Hình 5). Cụ thể là, đối với hoạt chất thuốc trừ nấm difenoconazole, sau 12 ngày nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2 đã phân hủy được 100% hàm lượng difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy, trong khi đó mẫu đối chứng chỉ có 23,44% hàm lượng difenoconazole trong môi trường bị phân hủy;

đối với hoạt chất thuốc trừ nấm hexaconazole sau 15 ngày nuôi cấy chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 phân hủy được 60,06% hàm lượng hexaconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chủng vi khuẩn Đ10-3-L2 phân hủy được 67,87% hàm lượng hexaconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy, không phân tích thấy sự phân hủy hexaconazole đối với mẫu đối chứng; đối với hoạt chất thuốc trừ nấm propiconazole, sau 15 ngày nuôi cấy chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 phân hủy được 83,51% hàm lượng propiconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy, chủng vi khuẩn Đ10-3-L2 phân hủy được 84,35% hàm lượng propiconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy, không phân tích thấy sự phân hủy propiconazole đối với mẫu đối chứng.



Hình 5. Đánh giá khả năng phân hủy các hoạt chất thuốc trừ nấm triazole của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2 sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường MSM + 100mg/L (hexaconazole, propiconazole và difenoconazole). Đ5: chủng vi khuẩn Đ5-2-L1; Đ10: chủng vi khuẩn Đ10-3-L2; ĐC: đối chứng (không bổ sung vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy).

Kết quả phân tích Anova cho thấy, Sig. = (0,03-0,04) < 5%, chứng tỏ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hiệu suất phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole của 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1, Đ10-3-L2 và mẫu đối chứng, kết quả phân tích sâu anova một yếu tố (post-hoc One-way Anova) về hiệu suất phân hủy hexaconazole, propiconazole và difenoconazole giữa 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2 cho thấy Sig. = (0,65 - 0,97) > 5%, chứng tỏ không có sự khác biệt về hiệu suất phân hủy giữa 2 chủng vi khuẩn, tuy nhiên kết quả phân tích còn cho thấy có sự khác biệt về hiệu suất phân hủy giữa chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 với mẫu đối chứng và Đ10-3-L2 với mẫu đối chứng, thể hiện ở kết quả Sig. = (0,02 - 0,04) < 5%.

4. Thảo luận

Việc phân lập các loài có khả năng phân hủy triazole và các dẫn xuất của nó là khá quan trọng để xây dựng chiến lược hiệu quả cho việc xử lý sinh học các chất gây ô nhiễm triazole [4]. Một số loài đã được báo cáo là có khả năng phân hủy triazole và các dẫn xuất của nó, chẳng hạn như: Chủng B-3 của loài *Sphingobacterium multivorum* được phân lập từ đất có thể phân hủy 85,6% hàm lượng hexaconazole trong môi trường nuôi cấy ở nồng độ 50mg/L trong 6 ngày ở nhiệt độ 32,5°C, pH 6,31 [15]; chủng BTKU3 của loài *Lysinibacillus* sp. có khả năng phân hủy 9,1 µg/ml difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau ba ngày ở 35°C [16]; chủng C8-2 của loài *Sphingomonas* sp. có khả năng phân hủy 100mg/L difenoconazole trong MSM trong vòng 24 giờ [17]; chủng B2 của loài *Ensifer* sp. được phân lập từ bùn thu được từ một nhà sản xuất thuốc trừ sâu đã sản xuất difenoconazole trong nhiều năm có khả năng phân hủy 85% hàm lượng difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ 100mg/L trong vòng 24 giờ, ở điều kiện pH 7,0 và nhiệt độ trong khoảng 30-35°C [18]; chủng

PS-4 của loài *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng phân hủy 8µg/L propiconazole trong môi trường nuôi cấy sau 72 giờ ở 30°C và pH 7 [19]; chủng BBK_9 của loài *Burkholderia* sp. có khả năng phân hủy 8,89µg/ml propiconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở 30°C và pH 7,0 trong vòng 4 ngày [20]. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được 2 chủng là chủng Đ5-2-L1 thuộc loài *Klebsiella oxytoca* và chủng Đ10-3-L2 và thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng phân hủy đồng thời cả 3 hoạt chất thuốc trừ nấm hexaconazole, propiconazole và difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ 100mg/L.

Loài *Klebsiella oxytoca* là một loài vi khuẩn sống tự do thường được phân lập từ đất, thực vật, động vật và con người. Các chủng thuộc loài *Klebsiella oxytoca* có thể gây bệnh cho người và động vật, hoặc có lợi cho cây trồng. Loài này thường có vai trò là chất kích thích tăng trưởng thực vật và sản xuất ra một số hợp chất sinh hóa có giá trị [21]. Ngoài khả năng phân hủy 3 hoạt chất thuốc trừ nấm (hexaconazole, propiconazole và difenoconazole) trong thí nghiệm này loài *Klebsiella oxytoca* còn được phát hiện là có khả năng phân hủy nhiều loại thuốc diệt nấm và thuốc diệt cỏ khác nhau như: epoxyconazole, piraclostrobin, difenoconazole, fluazinam, streptomycin và glyphosate [7, 22] thành một dạng ít độc hơn. Ngoài khả năng phân hủy nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật khác nhau thì loài *Klebsiella oxytoca* còn có khả năng hòa tan photphat, cố định nitơ, sản xuất hormone tăng trưởng IAA, nên loài này thường được bổ sung vào các chế phẩm phân bón sinh học dùng trong sản xuất nông nghiệp [23, 24, 25, 26, 27].

Pseudomonas là một chi lớn với hơn một trăm loài khác nhau. Chi *Pseudomonas* thuộc phân lớp gamma của vi khuẩn proteobacteria. Vi khuẩn proteobacteria có thể phát triển mạnh trong nhiều môi trường khác

nhau, bao gồm cả hệ sinh thái nước ngọt, trên cạn và biển. Chúng cũng có mối liên hệ chặt chẽ với các dạng sống cao hơn, và nó là một trong những loài vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất [28]. Con đường phân hủy nhóm thuốc diệt nấm triazole của *Pseudomonas aeruginosa* chủ yếu thông qua hoạt động của enzyme monooxygenase CYP P450. Các báo cáo *in vitro* khác cho thấy rằng monooxygenase CYP P450 là enzyme chính để phân hủy bất kỳ hoạt chất độc hại nào. Do đó, *Pseudomonas aeruginosa* có thể phân hủy nhiều loại thuốc diệt nấm triazole khác làm nguồn thức ăn và do đó có thể ứng dụng *Pseudomonas aeruginosa* để làm sạch đất bị ô nhiễm [19]. Chi *Pseudomonas* hiện diện phong phú trong sinh quyển và thường được biết đến với các đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật nổi bật của chúng, chẳng hạn như sản xuất ra các enzyme và chất chuyển hóa, hòa tan các chất dinh dưỡng trong đất, tổng hợp axit indole acetic (IAA) và sản xuất siderophore, nhiều loài *Pseudomonas* sp. trong đất hoạt động như một tác nhân kiểm soát sinh học và tạo ra sức đề kháng chống lại bệnh tật cho cây trồng [28]. *Pseudomonas aeruginosa* là vi khuẩn được thương mại đầu tiên trong việc ứng dụng để sản xuất phân bón vi sinh giúp tạo ra sức đề kháng để chống lại các bệnh sinh ra từ đất, giúp tăng sinh khối lá và đường kính thân trên cây trồng [13, 29]. Difenoconazole có phổ tác dụng rộng tuy nhiên mức độ nguy hại cao nhất trong nhóm thuốc triazole do có độc đối với các động vật, thực vật thủy sinh và các loại côn trùng bất mồi. Điều này gây ảnh hưởng đến hệ sinh thái. Đặc biệt là vấn đề cân bằng sinh học của vùng đất chứa tồn dư nhiều. Thời gian bán rã (DT50) của difenoconazole là 50 - 150 ngày, do đó dư lượng của nó có thể tồn tại đến vụ sau, nguy cơ dư lượng kép ở mùa vụ tiếp theo là rất lớn. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, lượng Difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy MSM đã được phân hủy hoàn toàn

100% sau 12 ngày, điều này cho thấy vai trò sinh thái quan trọng của 2 chủng vi khuẩn đã phân lập trên (Đ5-2-L1 và Đ10-3-L2).

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 2 chủng vi khuẩn S1-2-2 thuộc loài *Klebsiella oxytoca* và chủng AB18 thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* từ đất trồng hoa màu trên địa bàn thành phố Đà Lạt. Hai chủng này có khả năng phân hủy trên 60% hàm lượng hexaconazole, propiconazole và đến 100% hàm lượng difenoconazole bổ sung vào môi trường nuôi cấy (MSM) ở nồng độ 100mg/L, trong 15 ngày ở điều kiện hiếu khí, nhiệt độ $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0. Ngoài ra, 2 chủng này không biểu hiện bất kỳ hoạt động tán huyết nào trong môi trường thạch máu, cho thấy chúng không có khả năng gây bệnh cho người. Hơn nữa, ngoài khả năng phân hủy thuốc bảo vệ thực vật thì với khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật, kiểm soát sinh học và tạo ra sức đề kháng chống lại bệnh tật cho cây trồng, 2 chủng vi khuẩn Đ5-2-L1 thuộc loài *Klebsiella oxytoca* và Đ10-3-L2 thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* có thể đóng một vai trò như ứng cử viên sinh học quan trọng để làm sạch các vùng đất bị ô nhiễm bởi hóa chất thuốc bảo vệ thực vật.

Lời cảm ơn: "Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài cơ sở Viện Nghiên cứu Hạt nhân. Mã số CS/22/01-01"

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Toda, K.D. Beer, K.M. Kuivila, T.M. Chiller, B.R. Jackson (2021), *Trends in agricultural triazole fungicide use in The United States, 1992–2016 and possible implications for antifungal-resistant fungi in human disease*. Environ Health Perspect, 129(5):055001.
- [2] D.L. Roman, D.I. Voiculescu, M. Filip, V. Ostafe, A. Isvoran (2021), *Effects of triazole fungicides on soil microbiota and on the activities of enzymes found in soil: A review*. Agriculture, 11(9):893.
- [3] T. Huang, X. Tang, K. Luo, Y. Wua, X. Hou, S. Tang (2021), *An overview of graphene-based nanoadsorbent materials for environmental*

- contaminants detection. TrAC-Trend Anal Chem 139:116255.
- [4] H. Wu, J. Shen, R. Wu, X. Sun, J. Li, W. Han, L. Wang (2016), *Biodegradation mechanism of 1H-1,2,4-triazole by a newly isolated strain Shinella sp. NJUST26*. Sci Rep 6(1):29675.
- [5] P.V. 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.
- [6] L.T. Thắm, N.T. Đạt, N.T.H. Thắm, N.T.H. Thảo, T.T.T. Nhung, Đ.T. Tín, N. Giàng, H.T. Tâm (2020), *Phân lập các chủng vi khuẩn hiếu khí có khả năng phân hủy chlorpyrifos trong đất trồng rau màu ở tỉnh Lâm Đồng*. Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Trái đất và Môi trường 129(44):19-33
- [7] F.M. Lopes, K.A. Batista, G.L.A. Batista, S. Mitidieri, L.A.M Bâtus, K.F. Fernandes (2010), *Biodegradation of epoxyconazole and piraclostrobin fungicides by Klebsiella sp. from soil*. World J Microbiol Biotechnol 26: 1155-1161
- [8] TCVN 7538-6:2010 (ISO 10381-6:2009) về chất lượng đất - Lấy mẫu - Phần 6: *Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm*.
- [9] Đ.T.M. Thắm, T.T. Hiếu, L.T.M. Ngân (2017), *Phân lập vi khuẩn phân giải chlorpyrifos*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh 14(12):127-138.
- [10] N.T.M. Duyên, T.T.L. Anh, N.Đ.G. Châu (2020), *Nghiên cứu xác định dư lượng một số hóa chất bảo vệ*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học, ĐH Huế 15(2): 27.
- [11] B.N. Bình, N.T.P. 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.
- [12] TCVN5287:1994 *Thủy sản đông lạnh - phương pháp thử vi sinh vật*.
- [13] P. Radhapriya, A. Ramachandran, R. Anandham, S. Mahalingam (2015), *Pseudomonas aeruginosa RRALC3 enhances the biomass, nutrient and carbon contents of Pongamia pinnata seedlings in degraded forest soil*. PLoS ONE 10(10): e0139881.
- [14] TCVN 11479 *Nước uống - Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật chứa Nitơ và phospho - phương pháp sắc ký khí*.
- [15] X. An, C. Tian, J. Xu, F. Dong, X. Liu, X. Wu, Y. Zheng (2020), *Characterization of hexaconazole-degrading strain Sphingobacterium multivorum and analysis of transcriptome for biodegradation mechanism*. Sci Total Environ 722.
- [16] S. Jogaiah, P. Satapute (2022), *A biogenic microbial biosurfactin that degrades difenoconazole fungicide with potential antimicrobial and oil displacement properties*. Chemosphere 286(1).
- [17] J.H. Ahn, Y.M. Ro, G.H. Lee, I. Park, W.G. Kim, B.H. Byeong, J. You (2016), *Isolation and characterization of soil bacteria degrading a fungicide defenoconazole*. Korean J Pesticide Sci 20(4): 349-354.
- [18] J. Zheng, H. Jian, W. Zhe, N. Yingying, L. Shunpeng (2009), *Isolation, identification and characteristics of a difenoconazole-degrading bacterial strain B2*. China Environ Sci 29(1):42-46.
- [19] P. Satapute, B. Kaliwal (2016), *Biodegradation of the fungicide propiconazole by Pseudomonas aeruginosa PS-4 strain isolated from a paddy soil*. Annal Microbiol 66(4):1355-1365
- [20] P. Satapute, B. Kaliwal (2016), *Biodegradation of propiconazole by newly isolated Burkholderia sp. strain BBK_9*. 3 Biotech 6(1): 110.
- [21] G. Gallo, L. Presta, E. Perrin, M. Gallo, D. Marchetto, A.M. Puglia, R. Fani, F. Baldi (2018), *Genomic traits of Klebsiella oxytoca DSM 29614, an uncommon metalnanoparticle producer strain isolated from acid mine drainages*. BMC Microbiol 18(1):198
- [22] M.K. Sabullah, M.F. Rahman, S.A. Ahmad, M.R. Sulaiman, M.S. Shukor, N.A. Shamaan, M.Y. Shukor (2016), *Isolation and characterization of a molybdenum-reducing and glyphosate-degrading Klebsiella Oxytoca strain saw-5 in soils from Sarawak*. Agrivita 38(1): 1-13.
- [23] B.C. Walpola Buddhi, M.J. Keum, M.H. Yoon (2013), *Effect of fungicides on phosphate solubilization by Klebsiella oxytoca and Enterobacter ludwigii*. Korean J Soil Sci Fert 46(2):112-116.
- [24] R.D. Souza, A. Ambrosini, L.M.P. Passaglia (2015), *Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils*. Genet Mol Biol 38(4):401-419.
- [25] S. Suliasih, S. Widawati (2019), *The application of Klebsiella sp. and Rhizobium radiobacter as biofertilizer and Palm Oil Mills Effluent (POME) as organic fertilizer on growth of Paraserianthes falcataria*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 308(1):012057.
- [26] N.T.H. Nhu, N.L. Chuen, N. Riddech (2018), *The effects bio-fertilizer and liquid organic fertilizer on the growth of vegetables in the pot experiment*. Chiang Mai J Sci. 45(3):1257-1273.
- [27] P. Elavarasi, M. Yuvaraj, P. Gayathri P (2020), *Application of bacteria as a prominent source of biofertilizers*. Biostimulants Plant Sci 10.5772.
- [28] P. Singh, R.K. Singh, Y. Zhou, J. Wang, Y. Jiang, N. Shen, Y. Wang, L. Yang, M. Jiang (2022), *Unlocking the strength of plant growth promoting Pseudomonas in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review*. J Plant Interac 17(1):220-238.
- [29] S.P. Sandilya, P.M. Bhuyan, V. Nageshappa, D. Gogoi, D. Kardong (2017), *Impact of Pseudomonas aeruginosa MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of Samia ricini*. J Soil Sci Plant Nutr 17(2): 499-515