

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các nội dung nghiên cứu trong luận văn “Tuyển chọn và đánh giá khả năng sử dụng chủng vi sinh vật xử lý dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ (Hợp chất Parathion) trong đất trồng chè” là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Hà Nội, ngày 30 tháng 9 năm 2022

Học viên

Lê Thị Hà Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS Nguyễn Phương Minh đã chỉ đạo, hướng dẫn tận tình sâu sát, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện cũng như hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo, các thầy cô tại Học Viện Khoa Học và Công Nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. bộ môn Công nghệ Môi trường đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian tham gia học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh, chị tại Viện Môi trường nông nghiệp đã giúp đỡ tôi rất nhiều về cơ sở vật chất, trang thiết bị thí nghiệm, các kỹ thuật phân tích, các kiến thức thực nghiệm,... để tôi hoàn thành chương trình nghiên cứu của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn Thủ trưởng Bình chủng Hóa học, Thủ trưởng Viện Hóa học Môi trường quân sự, các đồng nghiệp Phòng Công nghệ xử lý môi trường/Viện Hóa học Môi trường quân sự là nơi tôi công tác đã quan tâm, tạo điều kiện, hỗ trợ mọi mặt để tôi hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn động viên về mọi mặt để tôi có động lực trong công việc và nghiên cứu khoa học.

Mặc dù rất cố gắng trong quá trình thực hiện luận văn nhưng do trình độ và kinh nghiệm còn hạn chế nên không tránh khỏi những thiếu sót. Rất mong nhận được sự chỉ dẫn và đóng góp thêm của thầy cô và các bạn để tôi rút kinh nghiệm và hoàn chỉnh luận văn.

Hà Nội, ngày 30 tháng 9 năm 2022

Học viên

Lê Thị Hà Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ.....	3
1.2. Tác động của hóa chất BVTV gốc OP với môi trường, sinh vật và con người.....	8
1.2.1. Sự chuyển hóa của hợp chất OP trong cơ thể con người và sinh vật .	8
1.2.2. Tác động tới con người	9
1.2.3. Tác động tới môi trường và hệ sinh thái	12
1.3. Hiện trạng sử dụng hóa chất BVTV trên thế giới và tại Việt Nam	14
1.3.1. Hiện trạng sử dụng hóa chất BVTV trên thế giới.....	14
1.3.2. Tình hình sử dụng hóa chất BVTV tại Việt Nam	16
1.4. Tổng quan về ứng dụng vai trò của vi sinh vật trong nông nghiệp	20
1.5. Tình hình nghiên cứu, ứng dụng xử lý hóa chất BVTV nhóm OP trên thế giới và tại Việt Nam	22
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	22
1.5.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	23
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	25
2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.....	25

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	25
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu	25
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu [33] [36]	26
2.2.2. Phương pháp phân lập chủng VSV	26
2.2.3. Phương pháp nuôi cấy VSV.....	27
2.2.4. Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật.....	27
2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng phân giải OP	27
2.2.6. Phương pháp xác định trình tự gen 16s rRNA.....	28
2.2.7. Phương pháp đánh giá yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của VSV	29
2.2.8. Phương pháp đánh giá khả năng xử lý OP của các chủng VSV trong đất in vitro - phòng thí nghiệm.....	29
2.2.9. Phương pháp sắc kí khối phổ (GC-MS).....	30
2.2.10. Phương pháp xử lý, phân tích và thống kê số liệu.....	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	31
3.1. Phân lập vi sinh vật có khả năng phân giải hóa chất BVTV gốc OP (Parathion).....	31
3.2. Đánh giá khả năng phân giải OP.....	33
3.3. Xác định tên chủng VSV P1	35
3.4. Đặc điểm hình thái của chủng <i>Microbacterium paraoxydans P1</i>	37
3.5. Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng <i>Microbacterium paraoxydans P1</i>	39
3.5.1. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn Cacbon	39
3.5.2. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn Nito	40
3.5.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH.....	41
3.5.4. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ	42

3.6. Đánh giá khả năng phân giải Parathion của chủng <i>Microbacterium paraoxydans P1</i> trong đất in vitro.....	43
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
4.1. Kết luận	45
4.2. Kiến nghị.....	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	47

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

BVTV	:	Bảo vệ thực vật
NN&PTNT	:	Nông nghiệp và phát triển nông thôn
LB	:	Luria-Bertani
MSM	:	Minimal salt medium - Môi trường muối khoáng tối thiểu
OD	:	Độ hấp thụ quang
OP	:	Organophosphate - Lân hữu cơ
rpm	:	Revolutions per minute - Vòng trên phút
VSV	:	Vi sinh vật

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1: Phân loại theo công thức hóa học các chất BVTV nhóm OP [5]....	5
Bảng 1. 2: LD50 của 1 số hợp chất OP [13]	11
Bảng 3. 1: Vị trí các chủng VSV sống trong môi trường có chứa Parathion xuất hiện mẫu đất	31
Bảng 3. 2: Mật độ vi sinh vật theo thời gian.....	33
Bảng 3. 3: Dư lượng Parathion khi sử dụng các chủng VSV	33
Bảng 3. 4: Độ tương đồng của gen 16s rARN với các chủng VSV.....	36
Bảng 3. 5: Điều kiện nhân sinh khối của chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	43

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1: Hình ảnh 1 số loại hóa chất BVTV	3
Hình 1. 2: Công thức hóa học của hợp chất OP [4]	4
Hình 1. 3: Công thức hóa học của parathion [5]	4
Hình 1. 4: Những con đường hóa chất BVTV xâm nhập vào cơ thể con người [11]	10
Hình 1. 5: Chu trình phát tán hóa chất BVTV trong hệ sinh thái [12]	12
Hình 1. 6: Quy mô sử dụng thuốc bảo vệ thực vật tại 1 số nước đang phát triển [21]	15
Hình 1. 7: Hình ảnh phun thuốc trừ sâu trên cây chè	19
Hình 3. 1: Vị trí lấy mẫu đất	32
Hình 3. 2: Dư lượng Parathion trong các mẫu sau các khoảng thời gian	34
Hình 3. 3: Hình thái của khuẩn lạc trong môi trường LB	37
Hình 3. 4: Cây phát sinh chủng loại chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	38
Hình 3. 5: Chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử	38
Hình 3. 6: Ảnh hưởng của nguồn Cacbon tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	39
Hình 3. 7: Ảnh hưởng của nguồn Nito tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	40
Hình 3. 8: Ảnh hưởng của pH đến tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	41
Hình 3. 9: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng <i>Microbacterium paraoxydans</i> P1	42
Hình 3. 10: Đánh giá dư lượng Parathion khi thay đổi mật độ VSV	44

MỞ ĐẦU

Thuốc trừ sâu là một phần không thể thiếu trong việc canh tác nông nghiệp và tăng năng suất của cây trồng, đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng nhu cầu lương thực ngày càng tăng của nhân loại. Tuy nhiên, thời gian gần đây, việc đẩy mạnh sử dụng các loại phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật trong hoạt động nông nghiệp để giúp cây trồng phát triển nhanh, diệt trừ sâu bệnh và nâng cao sản lượng khiến cho đất đai bị bạc màu, thoái hóa, làm mất cân bằng sinh thái trong đất, ảnh hưởng tiêu cực tới môi trường và sức khỏe của con người. Trong số các loại hóa chất bảo vệ thực vật, hợp chất photpho hữu cơ, là một trong những chất độc hại nhất đã được biết tới và sử dụng nhiều trong sản xuất nông nghiệp. Sau thời dài tiếp xúc, các chất này có thể tích tụ trong mô mỡ của động vật và tham gia vào chuỗi thức ăn, và tích lũy sinh học. Có thể thấy những tác động nguy hại của OP ở những mắt xích cao nhất trong chuỗi thức ăn, có thể là các loài chim săn mồi hay con người. OP đã được nhiều nghiên cứu chứng minh rằng đây là loại chất độc nguy hiểm, nó không chỉ tác động đến một số loại côn trùng, động vật hoang dã, mà còn là mối nguy hại tiềm tàng đối với sức khỏe con người, đặc biệt là đối với trẻ nhỏ và phụ nữ có thai. Những tác động của OP lên con người và hệ sinh thái là nguyên nhân lý giải cho việc vì sao nhiều quốc gia trên thế giới, đặc biệt là các quốc gia phát triển việc sử dụng loại hóa chất BVTV này càng ngày càng bị ngăn cấm. Hầu hết các quốc gia đều hạn chế và cấm việc sản xuất và sử dụng các loại hóa chất này.

Tại nhiều tỉnh, thành phố ở Việt Nam, cây chè đã và đang dần trở thành loại cây công nghiệp phát triển ổn định, mang đến hiệu quả kinh tế cao, tạo ra nhiều việc làm và mang đến nguồn thu nhập ổn định cho nhiều người dân. Hiện nay, theo số liệu thống kê của Hiệp hội chè Việt Nam, nước ta đang đứng thứ 5 về diện tích và thứ 6 về sản lượng chè trên thế giới. Tính đến năm 2020, cả nước có 34 tỉnh, thành phố trồng chè, tổng diện tích lên tới 123.000 ha. Nhu cầu sử dụng các sản phẩm từ chè trên thế giới là rất lớn, và Việt Nam là quốc gia có thế mạnh về sản lượng chè. Tuy nhiên, chất lượng vệ sinh, an toàn thực phẩm của sản phẩm chè nước ta hiện nay vẫn chưa đáp ứng được các yêu cầu về chất lượng của thị trường quốc tế, đặc biệt là các quốc gia phát triển. Do quá trình trồng và chăm sóc cây chè, bà con lạm

dụng hóa chất BVTV, trong khi, các quy định về dư lượng hóa chất BVTV trong chè tại thị trường lớn ngày càng nghiêm ngặt hơn.

Hiện nay, việc ứng dụng khả năng phân huỷ sinh học của VSV đối với hóa chất BVTV đã và đang trở thành một trong những phương án hữu ích để xử lý dư lượng hóa chất BVTV trong đất.

Vì vậy, đề tài nghiên cứu **“Tuyển chọn và đánh giá khả năng sử dụng chủng vi sinh vật xử lý dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ (Hợp chất Parathion) trong đất trồng chè”** đã được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn chủng VSV có tác dụng phân giải và chuyển hóa hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ, giúp giảm thiểu ô nhiễm OP trong đất và giúp nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng, cải thiện chất lượng đất.

Mục tiêu và nội dung nghiên cứu:

Mục tiêu nghiên cứu:

Nghiên cứu tuyển chọn được chủng vi sinh vật có khả năng xử lý lượng hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ (Hợp chất Parathion) trong đất trồng chè, điều kiện cho sự sinh trưởng phát triển của chủng và khả năng sử dụng.

Nội dung nghiên cứu:

- Tuyển chọn được chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hóa chất BVTV có chứa gốc lân hữu cơ (hợp chất Parathion).

- Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi sinh vật.

- Đánh giá, xác định khả năng phân giải Parathion của các chủng VSV trong đất in vitro - phòng thí nghiệm.

Ý nghĩa khoa học của đề tài:

Luận văn này cung cấp thông tin, kết quả nghiên cứu về chủng vi sinh vật có khả năng xử lý dư lượng hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ trong đất trồng chè (Hợp chất Parathion) tại Nghệ An và đánh giá được tiềm năng ứng dụng chủng vi sinh vật này để xử lý các khu vực đất nhiễm OP.

CHƯƠNG 1.

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ

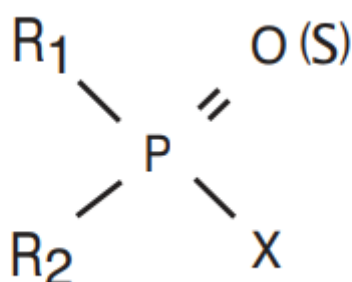
Hóa chất BVTV, là tên gọi của các loại hóa chất bảo vệ cây trồng hoặc các sản phẩm bảo vệ mùa màng, là những tác nhân có nguồn gốc hóa học, được tạo ra với mục đích kiểm soát, tiêu diệt sự xâm nhập, phát triển của sâu bệnh gây hại và hoặc vật mang mầm bệnh. Chúng cũng gồm các chất để tiêu diệt các loài sống cạnh tranh, nấm bệnh trên cây trồng. Ngoài ra, hóa chất BVTV cũng có nhiều dạng khác, đó là loại thuốc kích thích sinh trưởng, phát triển nâng cao năng suất cây trồng đạt. Hóa chất BVTV là một loại hóa chất độc, khi đi vào cơ thể có khả năng phá hủy tế bào, tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng, phát triển của sâu bệnh, cỏ dại và cây trồng, do đó, khi những hợp chất này đi vào môi trường, chúng sẽ có những ảnh hưởng xấu đến môi trường, đến những đối tượng tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp. Theo thống kê của Bộ NN&PTNT, đến năm 2020, cả nước sử dụng khoảng 41.870 tấn hóa chất BVTV hóa học (chiếm 82,59% tổng lượng hóa chất BVTV sử dụng), trung bình cứ 1 ha sẽ sử dụng khoảng 3,14 kg hóa chất BVTV [1]. Tuy nhiên, chỉ một phần của lượng thuốc này sẽ tiêu diệt được các mục tiêu: Sâu bọ, một số loại nấm, côn trùng, ..., lượng còn lại sẽ đi vào môi trường đất, nước gây nên các tác tiêu cực động đến hệ sinh thái, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và các loại động vật, thực vật khác.



Hình 1. 1: Hình ảnh 1 số loại hóa chất BVTV

Lân hữu cơ (hay phốt pho hữu cơ - organophosphate, OP), là các dẫn xuất este hữu cơ của phốt pho, thường là các dẫn xuất amit hoặc các dẫn xuất thiol của axit photphoric, photphonic, photphinic hoặc thiophosphoric [2] [3]. Bằng cách ngăn cản sự tạo thành men Cholinestaza trong hệ thần kinh của các loại côn trùng, các hợp chất OP khiến cho thần kinh hoạt động kém hơn, gây choáng váng và có thể dẫn tới cái chết.

Cấu trúc hóa học của các hợp chất OP được thể hiện trong hình 1.2 dưới đây:

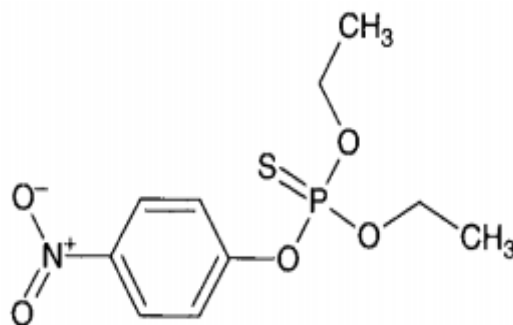


Hình 1. 2: Công thức hóa học của hợp chất OP [4]

Trong đó:

- X là gốc hữu cơ, nó nhạy cảm nhất với sự thủy phân;
- R1 và R2 là các nhóm alkoxy, một nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh cũng được gắn với phốt pho bằng một liên kết đôi để tạo nên công thức hóa học của OP [4].

Công thức hóa học của hợp chất Parathion được thể hiện trong hình 1.3 dưới đây:



Hình 1. 3: Công thức hóa học của parathion [5]

Các tính chất của Parathion:

- Tính chất hóa học: Hòa tan tốt trong xylen và butanol
- Tính chất vật lý: Khi ở dạng tinh khiết, parathion là chất rắn kết tinh màu trắng, ở điều kiện thường là dạng chất lỏng màu nâu có mùi tỏi. Parathion là chất khá bền vững.
- Thời gian bán phân hủy: 30 - 180 ngày.
- Ứng dụng trong nông nghiệp: Kiểm soát các loại bọ cánh cứng, bướm côn trùng, châu chấu và côn trùng khác, ấu trùng ăn lá, hoa quả, rau,... kiểm soát một số côn trùng trong đất như giun tròn, sâu bọ ăn rễ ,....

Việt Nam là đất nước có tỷ lệ sản xuất nông nghiệp cao, do đó, khối lượng hóa chất bảo vệ thực vật hàng năm sử dụng là rất lớn, trong đó, thuốc trừ sâu chiếm tỷ lệ cao nhất. Theo số liệu thống kê, Việt Nam đang có khoảng hơn 200 loại thuốc trừ sâu, với nhiều chủng loại và nhiều nhất là các nhóm photpho hữu cơ [6], [7]. Các loại hóa chất BVTV nhóm OP phổ biến hiện nay là Carbophos (Malathion), Thiophos (Parathion), Basudin (Diazinon), Wofatox (Metyl parathion), Diphterex (Chlorophos), Tamaron (Methamidophos).

Phân loại hóa chất BVTV nhóm OP

Theo hình 1.2, công thức hóa học được nêu của các hóa chất BVTV nhóm OP được chia thành các loại chính như sau:

Bảng 1. 1: Phân loại theo công thức hóa học các chất BVTV nhóm OP [5]

STT	Phân loại	Cấu trúc hóa học	Ví dụ
1	Phosphates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Chlorfenvinfos Dichlorvos Monocrotophos
2	Phosphonates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Trichlorfon

STT	Phân loại	Cấu trúc hóa học	Ví dụ
3	Phosphimates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Glufosinate
4	Phosphorothioates	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Diazinon Parathion
5	Phosphonothioates	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Leptophos
6	Phosphorothioates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Demeton-S-methyl Echothiophate
7	Phosphonothioates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	VX
8	Phosphorodithioates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{OR} \end{array} \quad \text{hoặc}$ $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Azinphos-ethyl Malathion

STT	Phân loại	Cấu trúc hóa học	Ví dụ
9	Phosphorotrithioates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{SR} \end{array}$	DEF
10	Phosphoramidates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{OR} \quad \text{R} \quad \text{R} \end{array}$	Fenamiphos
11	Phosphoramidothioates	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{OR} \quad \text{R} \quad \text{R} \end{array}$ <p>hoặc</p> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{N} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{OR} \quad \text{R} \quad \text{R} \end{array}$	Methamidophos Isofenphos
12	Phosphorofluoridates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Diisopropyl Phosphorofluoridates
13	Phosphonofluoridates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Cyclosarin Sarin

Nhóm lân hữu cơ dùng chủ yếu trong việc kiểm soát dịch hại như một chất thay thế cho nhóm clo hữu cơ do chu kỳ bán rã của nhóm này ngắn hơn so với nhóm clo hữu cơ [2] [8]. Khả năng phân hủy trong điều kiện tự nhiên của chúng khiến chúng trở thành một lựa chọn thay thế hấp dẫn cho các loại thuốc trừ sâu clo hữu cơ khó phân hủy, chẳng hạn như DDT, aldrin và dieldrin. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng thuốc trừ sâu OP phân hủy nhanh chóng bằng cách thủy phân khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời [2]. Bên cạnh

đó, một lượng nhỏ OP có thể được phát hiện trong thức ăn và nước uống. Mặc dù OP phân hủy nhanh hơn các loại hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ, nhưng chúng có độc tính cấp tính, do đó, gây rủi ro cho những người có thể tiếp xúc với một lượng lớn [2].

Đặc điểm chung của hóa chất BVTV nhóm OP

- Lân hữu cơ là các hợp chất hữu cơ dễ bị phân hủy khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, không khí, có chứa các liên kết Cacbon - Phốt pho [2]. Các este đơn giản hơn của axit phosphoric là sản phẩm thủy phân OP. Phản ứng phân hủy giúp chuyển hóa các hợp chất OP thành các sản phẩm trung gian có tính độc kém hơn so với sản phẩm ban đầu.

- Phản ứng hoạt hóa nhân phốt pho là một trong những tính chất quan của nhóm OP. Sản phẩm của phản ứng này là tạo thành chất ức chế enzym cholinesteraza mạnh hơn.

1.2. Tác động của hóa chất BVTV gốc OP với môi trường, sinh vật và con người

Các loại hóa chất BVTV nói chung và hóa chất BVTV nhóm OP nói riêng được xem là các sản phẩm có tác dụng lớn trong việc phòng ngừa và kiểm soát các loại dịch hại cho cây trồng. Tuy nhiên, những chất này lại được coi là những chất độc hại đối với các loại sinh vật có ích, các thiên địch, và đặc biệt nó còn tác động đến sức khỏe con người [9]. Bên cạnh đó, việc sử dụng hóa chất BVTV một cách bừa bãi, không đúng liều lượng, hướng dẫn sử dụng đã gây ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường và hệ sinh thái, phá vỡ tính bền vững của phát triển nông nghiệp.

1.2.1. Sự chuyển hóa của hợp chất OP trong cơ thể con người và sinh vật

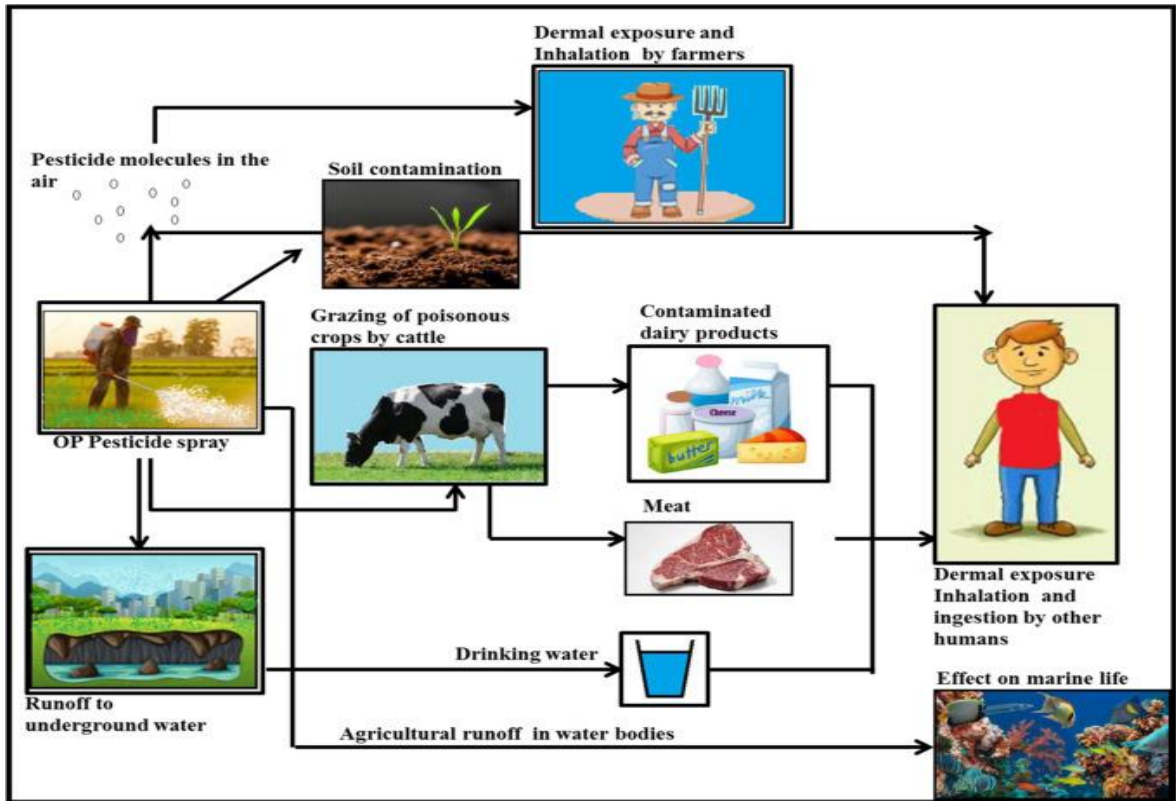
Con đường xâm nhập của OP vào cơ thể con người và các sinh vật khác của hóa chất BVTV gốc OP là qua đường ăn uống, không khí, nó có thể được hấp thụ bởi tất cả các con đường, bao gồm thông qua hô hấp, đường tiêu hóa và sự hấp thụ qua da [2]. Các hợp chất này dễ dàng được hấp thụ vào máu. Sự xuất hiện của dư lượng các chất BVTV gốc OP trong máu, sữa, mật ong, các mô của con người và động vật đã cho thấy khả năng tích lũy của các chất này. Điều này là nguyên nhân dẫn tới hàng ngàn ca tử vong và các ca bệnh nghiêm

trọng mỗi năm [2][4]. Sự hấp thụ ở niêm mạc đường tiêu hóa của các hợp chất OP diễn ra rất nhanh, các triệu chứng của việc nhiễm độc sẽ xuất hiện chỉ sau vài phút khi đi vào cơ thể. Sự hấp thụ qua da sẽ lâu hơn, sau thời gian khoảng 2 giờ tiếp xúc sẽ bắt đầu có những triệu chứng đầu tiên và những dấu hiệu này sẽ kéo dài khoảng 2 ngày.

Sản phẩm tạo thành của quá trình phân hủy các hóa chất BVTV nhóm OP có thể là các chất có độc tính thấp hơn, những chất này có thể hòa tan vào trong nước và đào thải ra khỏi cơ thể qua đường bài tiết nước tiểu. Ngoài ra, chúng cũng có thể chuyển hóa thành dạng khác, độc hơn, ức chế enzyme AChE mạnh hơn. Tại gan, quá trình oxy hóa các hợp chất OP xảy ra, tạo nên các chất dithiophosphoric và axit thiophosphoric. Bên cạnh đó, còn xảy ra quá trình thủy phân nhờ phản ứng photphatase, cacboxylamidase, cacboxylesterase. [10].

1.2.2. Tác động tới con người

Thông qua các hoạt động nghề nghiệp, nông nghiệp, công việc nhà, con người có thể tiếp xúc trực tiếp với hóa chất BVTV. Có 04 con đường xâm nhập vào cơ thể phổ biến của hóa chất BVTV: Da, hô hấp, mắt, hít thở. Qua nhiều nghiên cứu, đánh giá cho thấy, sau thời gian dài tiếp xúc với thuốc trừ sâu, có thể sẽ dẫn tới nhiều nguy cơ mắc các loại bệnh: Ung thư, ảnh hưởng tới hệ thần kinh, khả năng sinh sản, trao đổi chất và sự phát triển của con người. Bên cạnh đó, hóa chất BVTV còn có thể đi vào vào cơ thể một cách gián tiếp qua đường thức ăn, nước uống.



Hình 1. 4: Những con đường hóa chất BVTV xâm nhập vào cơ thể con người [11]

Đối với hóa chất BVTV gốc OP, khi đi vào cơ thể, mục tiêu chính của OP là acetylcholine esterase (AChE), một enzyme có vai trò thủy phân acetylcholine. Acetylcholine một chất dẫn truyền thần kinh chính trong hệ thần kinh ngoại vi và trung ương [4]. Acetylcholine được giải phóng từ dây thần kinh và nó chỉ có thể chỉ được thủy phân thành choline và acetyl-CoA bởi AChE. Tuy nhiên, sự có mặt của các liên kết P=O trong chất BVTV gốc OP đã làm xảy ra phản ứng phosphoryl hóa một nhóm hydroxyl của enzyme, enzyme lúc này bị ức chế không thể phục hồi. Sự ức chế của AChE gây ra sự tích tụ của acetylcholine tại các khớp thần kinh, dẫn đến các hiện tượng như tăng tiết mồ hôi, tăng tiết nước bọt, tiết nhiều dịch phế quản, co thắt phế quản, ngạt thở [4].

Nhiễm độc OP có thể là cấp tính hay mãn tính. Nó có thể xảy ra ngay cả ở liều lượng nhỏ. Thời gian phơi nhiễm càng lâu, liều lượng càng lớn thì càng độc. Phơi nhiễm OP nhẹ có thể có những dấu hiệu sau: Cay mắt, sổ mũi chảy nước mắt, tăng tiết nước bọt, đau đầu, choáng váng, buồn nôn, tiêu chảy... Nếu phơi nhiễm OP ở mức độ nặng sẽ xuất hiện các triệu chứng: Dễ mệt mỏi, giảm trí nhớ, ngủ không ngon, chán ăn, giảm nhịp tim, huyết áp,

khó thở, rối loạn tinh thần và trí tuệ, giật nhãn cầu, run rẩy tay chân, giảm sức đề kháng, dị tật thai nhi và một số triệu chứng rối loạn thần kinh khác. Ảnh hưởng nghiêm trọng nhất là tê liệt các cơ hô hấp và ức chế hô hấp trung tâm. Cuối cùng là dẫn tới tử vong tử vong là do liệt hô hấp [12] [13].

Parathion được hấp thu vào cơ thể qua nhiều con đường. Những dấu hiệu khi bị phơi nhiễm parathion thường xuất hiện trong vòng vài giờ sau khi tiếp xúc với da. Tỷ lệ hấp thu qua da ở thỏ được tìm thấy là 0,059mg/cm². Parathion được phân bố ưu tiên ở gan, thận và mô mỡ. Nó cũng tập trung khá cao trong thành dạ dày, ruột, tuyến giáp, lá lách, phổi. Nó có thể vượt qua hàng rào máu não vì bản chất không phân cực và tích tụ ở mức độ thấp hơn trong hệ thống thần kinh trung ương. Parathion được chuyển hóa ở gan và các vị trí ngoài gan khác bởi hệ thống enzym oxydase chức năng hỗn hợp thành paraoxon, chất này độc hơn đáng kể so với hợp chất gốc. Thời gian bán thải của parathion là 2,1 ngày. Theo báo cáo, sau khi uống parathion (1 hoặc 2 mg ngày⁻¹) ở người, 60% parathion được bài tiết trong vòng 4 giờ và 86% trong vòng 8 giờ dưới dạng p-nitrophenol [14].

Bên cạnh đó, cũng đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để xác định mối liên hệ giữa việc tiếp xúc của các hóa chất BVTV gốc OP tới khả năng mắc bệnh ung thư. Cơ quan nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC) kết luận rằng, diazinon và malathion là những chất có thể gây ung thư ở người (Nhóm 2A) (Hoppin và cộng sự, 2012). Parathion được phân loại là chất có thể gây ung thư ở người (Nhóm 2B) [15].

Nhiều loại hóa chất BVTV trong nhóm này đã bị cấm do có độc tính cao, ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người.

Dữ liệu độc tính của các hợp chất OP đối với một người đàn ông 70kg được trình bày trong bảng dưới đây:

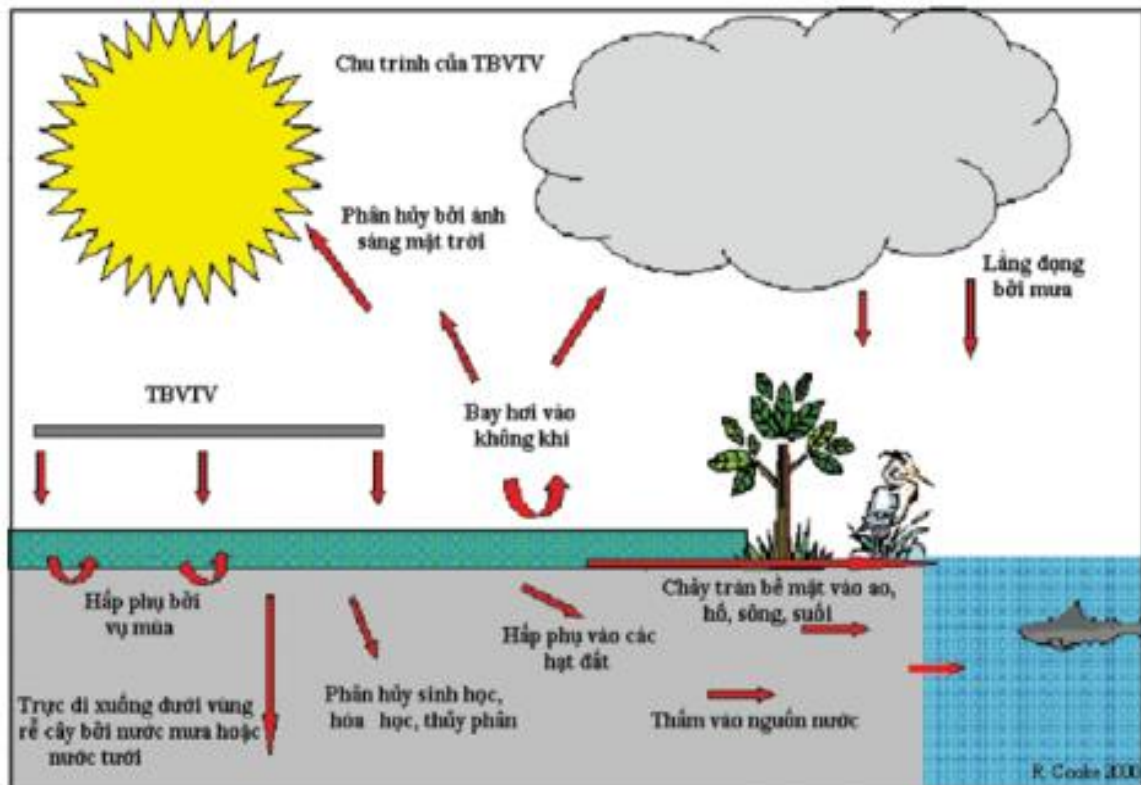
Bảng 1. 2: LD50 của 1 số hợp chất OP [13]

STT	Một số hợp chất OP	LD50 (qua da) (mg)	LD50 (đường miệng) (mg)
1	Malathion	> 25.000	400 - 40.000

STT	Một số hợp chất OP	LD50 (qua da) (mg)	LD50 (đường miệng) (mg)
2	Parathion	1.470	70
3	Methidathion	> 100.000	1.400
4	Fenthion	> 23.000	> 15.000
5	Mevinpos	> 300	> 250

1.2.3. Tác động tới môi trường và hệ sinh thái

Hóa chất BVTV không chỉ ảnh hưởng tới sức khỏe của con người mà còn tác động xấu đến môi trường và hệ sinh thái. Có thể thấy, hóa chất BVTV có tác dụng để tiêu diệt sâu bệnh, nấm, côn trùng,... nhưng nó cũng là tác nhân tiêu diệt cả những loại như thiên địch, các loại côn trùng ích hay những sinh vật khác.



Hình 1. 5: Chu trình phát tán hóa chất BVTV trong hệ sinh thái [12]

Hóa chất BVTV gốc OP được sử dụng để bảo vệ cây trồng khỏi sâu bệnh, tuy nhiên, khi sử dụng, chỉ một phần của nó tương tác với côn trùng mục tiêu, một phần bị rơi vãi xuống đất, gây ô nhiễm môi trường đất, làm giảm độ màu mỡ, axit hóa đất, rửa trôi nitrat, tăng sức chống chịu của cỏ dại và mất đa dạng sinh học [16]. Bên cạnh đó, phần rơi xuống đất được các hạt đất hấp phụ hoặc di chuyển từ các khu vực canh tác đến các hồ chứa theo dòng chảy hoặc hệ thống thoát nước sau đó thấm vào nguồn nước gây ô nhiễm.

Một phần khác của hóa chất BVTV sau quá trình phun tưới sẽ phát tán vào trong không khí, bị cuốn theo mưa, ngấm xuống đất, hay chảy tràn trên mặt đất rồi đổ ra ao hồ làm gia tăng nồng độ hóa chất BVTV trong nước. Các loại thủy sinh vật sống trong nước có thể bị tích tụ hóa chất BVTV trong cơ thể nếu trong nguồn nước có những chất này. Người ta đã xác định được OP trong các mẫu không khí và bề mặt các vật dụng sau các phun thuốc trong nông nghiệp ở California và Washington. Điều này đã chứng minh cho sự phát tán của các chất BVTV trong không khí [17].

Môi trường đất, nước, không khí có tác động qua lại và có sự ảnh hưởng với nhau, nếu một thành phần bị ô nhiễm, các thành phần khác cũng sẽ nguy cơ bị tác động.

Các loại hóa chất BVTV nói chung và hóa chất BVTV gốc OP nói riêng khi sử dụng trong thời gian dài, trên một diện tích lớn, nếu không tuân thủ đúng theo hướng dẫn sử dụng về liều lượng và thời gian phun thuốc, số cá thể và số loài trong quần thể sinh vật có nguy cơ bị suy giảm, đặc biệt là các loại côn trùng và những vi sinh vật có ích. Khi các loài sinh vật có ích bị tiêu diệt, sẽ là điều kiện thuận lợi cho nhiều loại dịch bệnh khác bùng phát mạnh hơn. Thiên địch đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát và điều hòa quần thể dịch hại. Tuy nhiên, việc tiêu diệt chúng bằng cách sử dụng thuốc trừ sâu sẽ làm nghiêm trọng thêm tình hình sâu bệnh và dẫn đến việc phun bổ sung hóa chất để kiểm soát những loài mục tiêu gây hại này. Một nguy cơ khác khi lạm dụng hóa chất BVTV đó là làm cho các loại sâu bệnh, nấm có khả năng kháng thuốc, từ đó làm trầm trọng thêm dịch bệnh. Thuốc trừ sâu còn ảnh hưởng đến các loài động vật không xương sống có ích trong đất như tuyến trùng, bọ ve, trùng roi, giun đất, nhện, động vật chân đốt, côn trùng và các vi sinh vật khác tạo thành lưới thức ăn trong đất, phân hủy các chất hữu

cơ như phân, lá, tàn dư thực vật, v.v., và cũng rất quan trọng để duy trì cấu trúc đất, sự biến đổi và khoáng hóa các hợp chất hữu cơ, do đó dẫn đến tác động bất lợi đối với một số liên kết trong lưới thức ăn [18].

Hóa chất BVTV gốc OP cũng đã được chứng minh rằng có ảnh hưởng xấu đến quá trình quang tổng hợp, chuyển hóa cacbon, phản ứng quang hóa, tổng hợp chất axit amin, chuyển hóa nito của thực vật [19].

1.3. Hiện trạng sử dụng hóa chất BVTV trên thế giới và tại Việt Nam

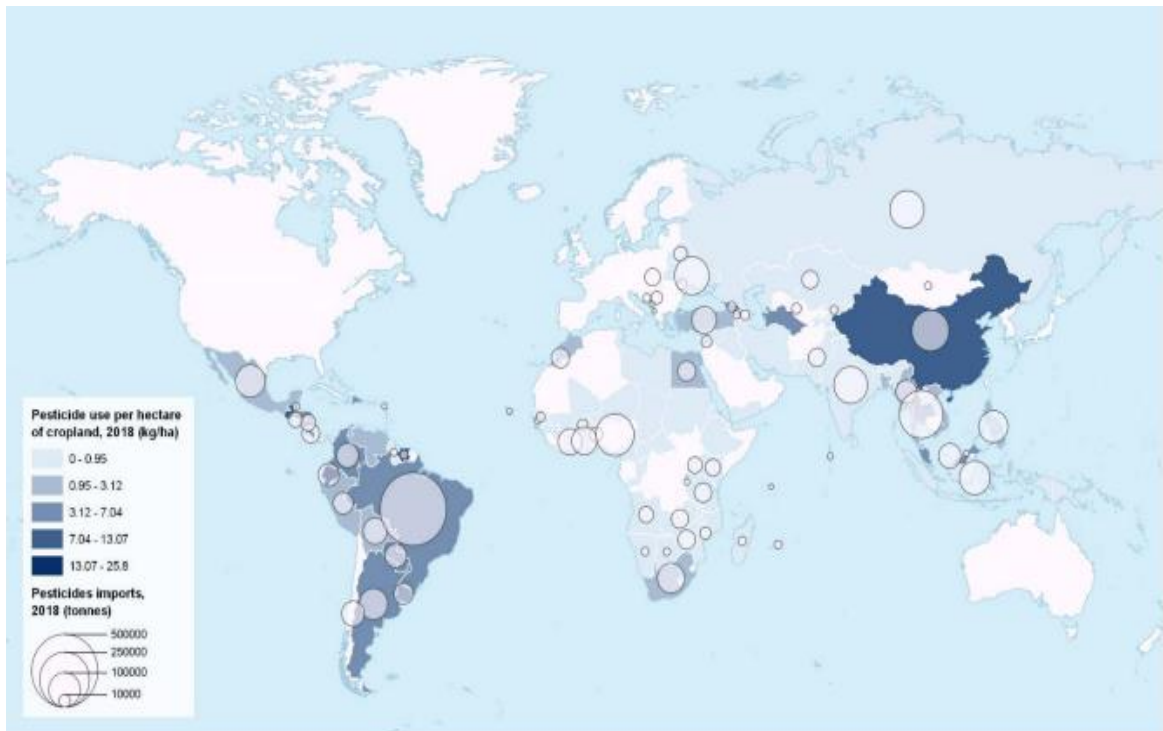
1.3.1. Hiện trạng sử dụng hóa chất BVTV trên thế giới

Hóa chất BVTV đang được sử dụng rộng rãi tại khắp các quốc gia trên thế giới với nhu cầu ngày càng tăng cao, mục đích là phòng ngừa các loại sâu bệnh, nâng cao năng suất chất lượng cây trồng, đảm bảo lương thực, thực phẩm. Người ta ước tính rằng, mỗi năm trên toàn cầu khoảng 38 tỷ đô la được chi cho hóa chất BVTV mỗi năm [17]. Nhiều nông dân ở các nước đang phát triển coi việc sử dụng thuốc trừ sâu là biện pháp tốt nhất để bảo vệ cây trồng của họ chống lại sâu bệnh. Theo các báo cáo, sự ra đời của các loại hóa chất BVTV vào những thập kỷ 70, 80, 90 của thế kỷ 20, đã góp phần rất lớn vào việc kiểm soát những dịch hại trong nông nghiệp, nếu không sử dụng hóa chất BVTV, từ 26 - 40% sản lượng cây trồng sẽ bị ảnh hưởng. Cũng trong thời gian này, hóa chất BVTV đã đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ và tăng khoảng 20 - 30% năng suất các loại cây trồng như lương thực, rau củ, hoa quả. Hiện nay, danh mục các hoạt chất BVTV trên thế giới đã lên đến hàng nghìn loại, thường là từ 400 - 700 loại ở mỗi nước. (Trung Quốc với 630 loại, Thái Lan với 600 loại) [20].

Theo báo cáo của FAO, năm 2018, khoảng 2 triệu tấn hóa chất BVTV được sử dụng trên toàn cầu mỗi năm, hầu hết trong số đó là thuốc diệt cỏ (50%), tiếp theo là thuốc trừ sâu (30%), thuốc diệt nấm (18%) và các loại khác như thuốc diệt loài gặm nhấm và thuốc diệt nấm mốc. Khu vực giáp biên giới trực tiếp với EU và Ukraine đã chứng kiến mức tiêu thụ thuốc trừ sâu tăng đến 47% từ năm 2015 - 2019, và sẽ có xu hướng tiếp tục tăng [21]. Các dự báo cũng chỉ ra rằng sản xuất nông nghiệp ở Brazil sẽ tiếp tục tăng, và các nhu cầu về thuốc bảo vệ thực vật cũng sẽ tăng theo. Đến năm 2020, con số này đã lên đến 3,5 triệu tấn. Mười quốc gia tiêu thụ thuốc trừ sâu nhiều nhất

trên thế giới là Trung Quốc, Mỹ, Argentina, Thái Lan, Brazil, Ý, Pháp, Canada, Nhật Bản và Ấn Độ. Việc sản xuất, tiêu thụ thuốc bảo vệ thực vật đang gia tăng nhanh chóng ở các nước đang phát triển, đặc biệt là ở Đông Nam Á [22].

Trong thập kỷ qua đã chứng kiến tỷ lệ sử dụng thuốc trừ sâu hữu cơ ngày càng gia tăng, đặc biệt là ở các nước châu Á. Hiện nay, có khoảng 13 loại thuốc trừ sâu khác nhau thuộc họ phân lân đang được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. [11].



Hình 1. 6: Quy mô sử dụng thuốc bảo vệ thực vật tại 1 số nước đang phát triển [21]

Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc lạm dụng hóa chất BVTV đang có nguy cơ gây hại cho cây trồng nhiều hơn, sự đóng góp của hóa chất BVTV vào việc tăng năng suất đang giảm dần. Tại các ở các nước châu Á trồng nhiều lúa, trong vòng từ năm 2000 đến năm 2010, lượng sử dụng phân bón tăng gấp đôi, lượng hóa chất BVTV tăng từ 2 - 3 lần, nhưng năng suất tăng không đáng kể. Có thể thấy rằng sản lượng của cây trồng không tỉ lệ thuận với lượng thuốc trừ sâu được phun.

Do những hệ lụy và tác động tiêu cực của việc lạm dụng hóa chất BVTV, ở nhiều quốc gia trên thế giới đã và đang thay đổi việc đổi sử dụng

hóa chất BVTV. Thay vì sử dụng hóa chất BVTV hiệu quả và an toàn, người ta đã hướng tới giảm thiểu những nguy cơ độc hại của hóa chất BVTV. Biện pháp để giảm thiểu những nguy cơ do hóa chất BVTV gây ra là: (1) Quản lý chặt chẽ việc đăng ký mới, xuất nhập khẩu, sản xuất kinh doanh hóa chất BVTV, (2) Sử dụng theo đúng liều lượng, thời gian được hướng dẫn, (3) Giảm thiểu lượng thuốc sử dụng, (4) Chuyển đổi sang sử dụng các loại hóa chất BVTV sinh học thân thiện với môi trường, (5) Tận dụng vai trò của các loại thiên địch, sinh vật có lợi khác.

1.3.2. Tình hình sử dụng hóa chất BVTV tại Việt Nam

Việt Nam là đất nước nông nghiệp nên nhu cầu trong việc sử dụng hóa chất BVTV ngày càng tăng về số lượng và chủng loại. Theo số liệu của Cục Bảo vệ thực vật, giai đoạn từ 2001 - 2010, trung bình mỗi năm nước ta tiêu thụ khoảng hơn 75 nghìn tấn hóa chất BVTV, con số này đã tăng lên 100 nghìn tấn hóa chất BVTV từ năm 2015, với khoảng 1.700 hoạt chất hóa chất BVTV và trên 4.000 sản phẩm thương mại với các tên gọi khác nhau. Theo các số liệu thống kê của Tổ chức Nông lương thế giới (FAO) về số lượng hóa chất BVTV, tại Việt Nam số lượng hóa chất BVTV trong bảng khoảng 10 % so với Trung Quốc (với khoảng hơn 41 nghìn sản phẩm), 30 % so với Thái Lan (khoảng hơn 13 nghìn sản phẩm), 40 % so với Australia (khoảng hơn 9 nghìn sản phẩm) và chỉ xấp xỉ bằng Nhật Bản (khoảng hơn 4 nghìn sản phẩm). Tính ra mỗi người dân trong 01 năm trung bình sẽ tiêu tốn khoảng khoảng 1 kg hóa chất BVTV [20], [23].

Theo khảo sát, dư lượng hóa chất BVTV trên các loại nông sản là chủ yếu và vẫn ở mức cao, đặc biệt là trong các loại rau củ, trái cây và chè,... Ở đồng bằng sông Cửu Long, khoảng 38 - 70% nông dân sử dụng hóa chất BVTV cao hơn mức khuyến cáo, gần 30% nông dân trộn nhiều loại hóa chất BVTV với nhau khi sử dụng. Mức độ sử dụng khoảng 5 - 6 lần cho mỗi vụ lúa [24]. Theo điều tra của tác giả Chau NDG và cộng sự, có tới 81% trong tổng số 290 mẫu rau được thu hoạch đã phát hiện thuốc trừ sâu. Có tới 23% mẫu có dư lượng thuốc trừ sâu nằm trên giá trị cho phép [25].

Việt Nam có khoảng 11 triệu hộ gia đình làm nông nghiệp, ước tính, mỗi năm có gần 5 nghìn vụ việc nhiễm độc thuốc trừ sâu, và hơn 100 người chết và 2,1 triệu người nhiễm độc mãn tính.

*** Tình hình sử dụng các hóa chất BVTV gốc OP**

Lúa, ca cao, ca phê, rau đậu thường được sử dụng các hóa chất BVTV nhóm OP như malathion với các liều lượng khác nhau, tùy vào giai đoạn phát triển của cây. Có tới 75 loại sản phẩm với các tên thương mại khác nhau của chlorpyrifos là sản phẩm cũng được đăng ký để sử dụng cho cà phê, các loại cây có múi, cây lúa, điều, đậu. Các loại thuốc thuộc nhóm lân hữu cơ như profenofos và chlorpyrifos ethyl, cũng được sử dụng khá thường xuyên. Có nhiều sản phẩm đã bị cấm tuy nhiên vẫn được người dân sử dụng quá trình canh tác. Trong số các hóa chất BVTV nhóm OP, thuộc nhóm độc số I là parathion, nhóm độc số II là chlorpyrifos và nhóm độc số III là malathion.

Parathion có tên thương mại là Alkexon, Othophos, Thiophos. Hiện nay, parathion đã bị cấm sử dụng tại Việt Nam theo Thông tư số 19/2021/TT-BNNPTNT ngày 18 tháng 12 năm 2021 về việc ban hành danh mục hóa chất BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam, danh mục hóa chất BVTV cấm sử dụng tại Việt Nam của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Tuy nhiên, tại nhiều khu vực, người dân vẫn sử dụng loại hóa chất BVTV có thành phần Parathion nhờ tác dụng mạnh của nó, giúp diệt trừ sâu bệnh một cách nhanh chóng, do đó dư lượng các loại hóa chất BVTV nhóm OP trong đất canh tác và trong các loại nông sản vẫn còn nhiều, vì vậy, xử lý ô nhiễm thuốc BVTC gốc OP vẫn đang là vấn đề được quan tâm, đặc biệt là trong bối cảnh hội nhập quốc tế và tăng cường xuất khẩu các sản phẩm nông sản của nước ta như hiện nay.

*** Hiện trạng sản xuất và sử dụng hóa chất BVTV trên cây chè tại Việt Nam**

- Tình hình sản xuất chè

Tại nhiều tỉnh thành trên khắp cả nước, cây chè đã và đang dần trở thành loại cây công nghiệp phát triển ổn định, mang đến hiệu quả kinh tế cao, tạo ra nhiều việc làm và mang đến nguồn thu nhập ổn định cho người dân.. Với các điều kiện khí hậu phù hợp, diện tích trồng chè lớn nhất của cả nước tập trung tại khu vực miền núi phía Bắc và Trung du, với diện tích trồng chè chiếm khoảng 70% diện tích trồng trên cả nước; thứ 2 là khu vực Tây

Nguyên, chiếm khoảng 19%; vùng Bắc Trung bộ và Duyên hải miền Trung chiếm 7,0% và khu vực đồng bằng Bắc bộ chiếm 4,0%. Một số địa phương có diện tích chè lớn, như: Thái Nguyên (khoảng 22 nghìn ha), Hà Giang (khoảng 21,5 nghìn ha), Phú Thọ (khoảng 16,1 nghìn ha), Lâm Đồng (khoảng 10,8 nghìn ha), Nghệ An (khoảng 8 nghìn ha)...

Theo thống kê của Hiệp hội chè Việt Nam, tính đến hết năm 2020, nước ta có 34 tỉnh, thành phố trồng chè với tổng diện tích lên tới 123 nghìn ha, năng suất trung bình là xấp xỉ 95 tạ/ha, sản lượng khoảng hơn 1 triệu tấn chè búp tươi. Chè là một trong những mặt hàng nông sản xuất khẩu chủ lực của nước ta. Hiện nay, ngành chè không chỉ sản xuất đáp ứng nhu cầu ở trong nước mà còn vươn ra thế giới, mang tới những giá trị kinh tế lớn cho xã hội, tạo ra nhiều cơ hội việc làm, tăng nguồn thu nhập, nâng cao chất lượng cuộc sống cho người dân, góp phần thúc đẩy sự phát triển nền nông nghiệp. Trên thế giới, Việt Nam đang ở vị trí số thứ 5 trong xuất khẩu chè, và xếp thứ 6 về tổng sản lượng chè. Các sản phẩm từ chè của nước ta đã được xuất khẩu sang 74 quốc gia và vùng lãnh thổ.

- Thực trạng sử dụng hóa chất BVTV trên cây chè

Cũng như nhiều loại cây trồng khác, cây chè cũng phải đối mặt với tình trạng sâu bệnh, đặc biệt là các loại côn trùng và nhện. Để giải quyết tình trạng này, người nông dân đã sử dụng các loại hóa chất BVTV phun tưới nhằm phòng chống sâu bệnh. Trong thời gian qua, ngành chè Việt Nam đã và đang chịu nhiều thách thức trước tình trạng nhiều sản phẩm từ chè bị hoàn trả khi xuất khẩu, nguyên nhân chủ yếu là do tồn dư hóa chất BVTV, ảnh hưởng đến uy tín của Việt Nam trên thị trường quốc tế. Nhiều lô hàng xuất khẩu chè bị trả lại do trong sản phẩm có thành phần chất cấm hoặc nồng độ các chất BVTV trong chè vượt quá giới hạn quy định. Nguyên nhân chính do các công ty chưa có nơi cung cấp nguyên liệu ổn định về chất lượng và số lượng, nhiều công ty thu mua các sản phẩm trà xanh không rõ nguồn gốc, xuất xứ, chất lượng từ các cơ sở buôn bán và người trồng chè. Tại nhiều khu vực trồng chè, việc sử dụng bừa bãi, không tuân theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất, sử dụng không đúng loại thuốc, liều lượng và thời gian cách ly là vấn đề đáng lo ngại, là yếu tố quan trọng dẫn tới việc tồn dư hóa chất BVTV trên chè.



Hình 1. 7: Hình ảnh phun thuốc trừ sâu trên cây chè

(Nguồn: Internet)

Theo kết quả điều tra, khảo sát của Cục Bảo vệ Thực vật - Bộ NN&PTNT (2015), thành phần sâu bệnh hại chính trên cây chè gồm có bọ cánh tơ, rầy xanh, và nhện đỏ, bọ xít muỗi. Việc sử dụng một số loại hóa chất BVTV để tiêu diệt các loại sâu bệnh trên cây chè ngày càng phổ biến, trên diện tích ngày càng lớn. Tốc độ sản xuất các loại thuốc trừ dịch hại đang tăng nhanh không ngừng, đặc biệt ở các nước phát triển (các quốc gia này không chỉ sản xuất để phục vụ cho hoạt động trong nước mà còn xuất khẩu sang những quốc gia đang phát triển khác). Chỉ tính riêng nhóm thuốc lân hữu cơ ngày nay đã có đến cả trăm loại. Trong các năm qua, cây chè được sử dụng đa số là nhóm Carbamat và hóa chất BVTV lân hữu cơ. Trong suốt quá trình mở rộng diện tích đất trồng chè, cùng với việc canh tác tăng năng suất, sản lượng, sự cân bằng sinh học một phần đã bị phá vỡ, điều này làm xuất hiện các loại dịch hại trên chè, gây nên nhiều thiệt hại, từ đó dẫn tới việc gia tăng sử dụng hóa chất BVTV [26].

Năm 2015, cũng theo kết quả khảo sát của Cục Bảo vệ Thực vật - Bộ NN&PTNT, diện tích trồng chè bị nhiễm bọ cánh tơ trên 17 ngàn ha, nhiễm bọ xít muỗi là 20 ngàn ha, diện tích nhiễm nhện đỏ 7.500 ha, nhiễm rầy xanh trên 28 ngàn ha. Trước tình hình đó, do phần lớn nông dân canh tác chè ở nước ta chưa hiểu rõ tác hại của hóa chất BVTV, đã sử dụng nồng độ hóa chất BVTV cao hơn hướng dẫn. Trong đó, 64% nông dân hỗn hợp 2 loại thuốc khi phun, 14% nông dân hỗn hợp 3 loại thuốc khi phun và 49% người dân tự ý sử

dụng hóa chất BVTV với liều lượng cao hơn khuyến cáo. Theo báo cáo của Chi cục BVTV tỉnh Lâm Đồng (2015), đã phát hiện 117 loại thuốc thương phẩm (với 57 hoạt chất) chưa được đăng ký để sử dụng trên cây chè sau khi kiểm tra 57/168 đơn vị kinh doanh hóa chất BVTV trên toàn địa bàn. Trong 117 sản phẩm này, nhóm độc loại 2 chiếm đến 69,25% và nhóm độc loại 3 chiếm tới 27,35%. Trong suốt quá trình trồng, chăm sóc cây chè, nông dân trực tiếp canh tác là người sẽ phun hóa chất BVTV. Theo đó, số lần phun hóa chất BVTV co cây chè tại Thái Nguyên dao động từ 6,2 - 29,7 lần/năm. Phần lớn người dân cũng không được phổ biến kiến thức trong việc sử dụng hóa chất BVTV. Tiếp theo là việc sử dụng lượng thuốc vượt quá khuyến cáo của nhà sản xuất. Có tới 65,9 - 76,5% người dân sử dụng đúng nồng độ, 29,7% người dân tự ý pha trộn theo kinh nghiệm nhiều loại thuốc khi phun [26]. Tiếp theo là việc sử dụng hóa chất BVTV không tuân thủ thời gian cách ly. Phần lớn, thời gian cách ly sau khi phun hóa chất BVTV cho cây chè khoảng 7 - 14 ngày, tuy nhiên, có 25 - 43% hộ dân chỉ cách ly cho cây từ 1 - 3 ngày. Điều này vô cùng nguy hiểm, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người sử dụng.

Việc tự ý sử dụng hóa chất BVTV và sử dụng không đúng nồng độ, liều lượng khuyến cáo và không đảm bảo thời gian cách ly là nguyên nhân chính khiến cho các loại sâu bệnh kháng thuốc, từ đó làm bùng các đợt dịch mới, bên cạnh đó còn tác động xấu đến môi trường đất, nước không khí, không đáp ứng các yêu cầu về an toàn thực phẩm cho cây chè.

Như vậy, để khắc phục tình trạng lạm dụng hóa chất BVTV nói chung và tình trạng tồn dư hóa chất BVTV trên cây chè nói riêng, bên cạnh giải pháp tăng cường kiểm tra và quản lý chất lượng chè, tăng cường đào tạo và phổ biến kiến thức sử dụng thuốc cho người làm chè trên địa bàn cả nước, cần đẩy mạnh quá trình các nghiên cứu tạo ra các chế phẩm mới có tác dụng thay thế phân bón hóa học, cũng như khử độc và làm giảm tác hại của hóa chất BVTV trên sản phẩm chè tại Việt Nam.

1.4. Tổng quan về ứng dụng vai trò của vi sinh vật trong nông nghiệp

❖ Ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất phân bón

Một số vi sinh vật đã được nghiên cứu, đưa vào công nghệ sản xuất

phân bón như để kích thích tăng trưởng trên cây trồng như: Vi sinh vật phân giải lân (*Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp*, *A.polymixa*), vi sinh vật cố định đạm (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*), vi sinh vật kích thích sinh trưởng (*E.cloaceae*, *A.radiobacter*, *A.bejerinckii*, *E.Aerogenes*), vi sinh vật cố định nitơ tự do (*A.chroococcum*, *P.tinctorius*). Một số chủng vi sinh vật có lợi khác như cũng được sử dụng như: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiace* [27].

❖ Ứng dụng vi sinh vật để sản xuất hóa chất BVTV sinh học

Vi sinh vật cũng đã được nghiên cứu, ứng dụng để sản xuất các loại thuốc trừ sâu sinh học.

Thuốc trừ sâu vi sinh BT (*Bacillus Thuringiensis*) thuộc nhóm thuốc trừ sâu sinh học, có nguồn gốc từ vi khuẩn, có tác dụng với nhiều loại sâu bệnh: Sâu tơ, sâu cuốn lá, sâu ăn tạp, sâu khoang, sâu xanh, ... Khả năng tiêu diệt côn trùng của chủng này dựa trên sự tổng hợp các protein chứa tinh thể. Các loại sâu sẽ chết sẽ ngừng tấn công và cây trồng sau vài giờ, và chết trong vòng 1-3 ngày sau khi ăn phải thuốc này. Ở Việt Nam, chế phẩm Bt (*Bacillus thuringiensis*) được nghiên cứu và ứng dụng từ lâu. Hơn 20 chế phẩm Bt sau khi thử nghiệm đã mang lại kết quả tốt trong phòng thí nghiệm và trên thực tế, giúp tiêu diệt một số sâu hại chính trên đồng ruộng như sâu đo, sâu tơ, sâu xanh bướm trắng, sâu hại bông, sâu xám.

Hiện nay, trên thị trường khá nhiều loại hóa chất BVTV sinh học được ưa chuộng và tin dùng: Firibiotox C dạng dịch cô đặc, Vi-BT 32000WP, 16000WP, Firibiotox P dạng bột; BT Xentary 35WDG,... [28].

❖ Ứng dụng để phân hủy hóa chất BVTV gốc OP

Trong môi trường tự nhiên, hợp chất nhóm OP dễ bị phân hủy, với Parathion, thời gian bán rã ước tính khoảng từ 30 - 180 ngày, tuy nhiên, Parathion nói riêng và các loại hóa chất BVTV OP nói chung là những chất độc đối với con người và các sinh vật khác và làm thay đổi các đặc tính vốn có của đất. Các OP có chứa liên kết este có khả năng bị phân hủy bởi các vi sinh vật thông qua quá trình thủy phân liên kết P-O-alkyl và P-O-aryl được xem là bước quan trọng trong quá trình phân hủy.

Các vi sinh vật trong đất giúp phân hủy OP một cách hiệu quả, an toàn và chi phí rẻ, vì vậy chúng đã trở thành trọng tâm của nhiều nghiên cứu. Chúng thuộc các chi: *Cladosporium*, *Serratia*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Plesiomonas*, *Athrobacter* [29]. Theo tổng hợp của S. Kumar, một số vi sinh vật trong đất phân giải nhiều loại OP đã được tìm thấy: *Pseudomonas sp. WBC-3* (Phân giải MP, chlorpyrifos, ethyl parathion và sumithion), *P. aeruginosa* (Phân giải acephate, methamidophos, MP, dimethoate, malathion), *Flavobacterium sp.* (Phân giải diazinon và parathion), *S. marcescens* (Phân giải chlorpyrifos, fenitrothion và parathion), *Stenotrophomonas sp. G1* (Phân giải methyl paraoxon, diazinon, phoxim, parathion, chlorpyrifos, profenofos, triazophos) [29].

1.5. Tình hình nghiên cứu, ứng dụng xử lý hóa chất BVTV nhóm OP trên thế giới và tại Việt Nam

1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Một nghiên cứu đã xác định được sự có mặt của ba loại vi sinh vật tham gia vào quá trình phân hủy diazino trong đất trồng lúa và nước mặt ở Iran là *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.* và *Agrobacterium sp.* Cũng tại Iran, tác giả đã tìm thấy ở trầm tích hồ được các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy diazinon là *Providencia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Salmonella* [30].

Năm 2011, Sasikala C., cùng cộng sự đã khảo sát sự phân hủy sinh học của chlorpyrifos bằng các vi khuẩn được phân lập từ đất công nghiệp. Kết quả nghiên cứu đất ô nhiễm chlorpyrifos có 09 chủng vi khuẩn khác nhau về hình thái, 01 chủng xạ khuẩn và 02 chủng nấm được phân lập. Trong những chủng được phát hiện, có bốn chủng vi khuẩn hiệu quả hơn đã được phát triển thành tập đoàn. Bốn phân lập vi khuẩn là *Pseudomonas putida* (NII 1117), *Klebsiella sp.*, (NII 1118), *Pseudomonas stutzeri* (NII 1119), *Pseudomonas aeruginosa* (NII 1120) hiện diện trong quần thể được xác định trên cơ sở phân tích rDNA 16S. Các nghiên cứu phân hủy được thực hiện ở pH trung tính và nhiệt độ 37°C với sử dụng chlorpyrifos nồng độ 500 mg L⁻¹. Phân tích khối phổ LC cho thấy sự có mặt của các chất chuyển hóa chlorpyrifos-oxon và

Diethylphosphorothioate. Những kết quả này cho thấy tiềm năng sử dụng quan trọng của tổ hợp này để làm sạch chất thải thuốc trừ sâu nhiễm chlorpyrifos trong môi trường [31].

Các vi sinh vật đã được phân lập từ mẫu đất bằng kỹ thuật nuôi cấy làm giàu trong môi trường nơi diazinon đóng vai trò là nguồn cacbon duy nhất bởi M. Mahiuddin và các cộng sự (2014). Tổng số ba chủng vi khuẩn đã được sàng lọc và xác định bằng các nghiên cứu hình thái và sinh hóa là *Brevundimonas diminuta*, *Burkholderia caryophylli* và *Pseudomonas peli*. Những các chủng phân lập này có khả năng phân hủy lên tới 20mg/L diazinon trong môi trường muối khoáng tối thiểu (MSM) trong vòng 12 ngày sau khi ủ. Kết quả của quá trình phân hủy sinh học đối với diazinon chỉ ra rằng ngoài các quá trình hóa học, sự phân hủy của vi sinh vật là một trong những cơ chế chính để quá trình phân hủy diazinon diễn ra. Hơn nữa, các kết quả thu được có ý nghĩa đối với việc phát triển chiến lược xử lý sinh học đối với khu vực bị ô nhiễm diazinon [32].

1.5.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Nhóm lân hữu cơ dùng chủ yếu trong việc kiểm soát dịch hại như một chất thay thế cho nhóm clo hữu cơ do chu kỳ bán rã của nhóm này ngắn hơn so với nhóm clo hữu cơ. Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa có nhiều công trình nghiên cứu về việc sử dụng các biện pháp sinh học để khử độc chất OP. Một số nghiên cứu được tiến hành để phân lập các chủng vi sinh vật có tiềm năng trong phân giải OP và đã đạt một số kết quả nhất định. Sau đây là một số công trình nghiên cứu tiêu biểu:

Tác giả Lê Thị Trinh (2013) đã thực hiện các thí nghiệm để đánh giá tiềm năng của chủng vi sinh vật trong quá trình phân hủy thuốc trừ sâu lân hữu cơ có chứa hoạt chất diazinon. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy sự xuất hiện của 3 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu có chứa diazinon có mặt trong loại đất cát pha nhiều mùn của Việt Nam [33].

Nguyễn Văn Lệ và cộng sự (2015) đã nghiên cứu phân lập vi khuẩn phân giải diazinon ở đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả nhóm nghiên cứu đã phân lập được 15 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải diazinon (20 mg/L).

Trong số các chủng vi khuẩn được nghiên cứu, Diazinon đã bị phân hủy bởi 04 chủng, sau 30 ngày nuôi cấy, nồng độ Diazinon đã giảm từ 15,4-27%. Trong đó có 01 dòng sau 7 ngày nuôi cấy đã phân hủy được 19,7% lượng diazinon ban đầu và có mật độ tế bào vi khuẩn tăng cao nhất so với các chủng còn lại. Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của các điều kiện môi trường tới mật độ tế bào vi khuẩn trong dung dịch sau thời gian nuôi cấy tối thiểu 5 ngày cho các điều kiện tối ưu là: Nhiệt độ 30°C, tại pH = 7 với nguồn là Tryptone Soya Broth (TSB). Tuy nhiên, các dòng này chưa được miêu tả chi tiết cũng như hệ thống phân loại chưa được nghiên cứu [34].

Đoàn Thị Mộng Thắm và cộng sự (2017) đã nghiên cứu, phân lập vi khuẩn phân giải Chlorpyrifos từ đất nông nghiệp. Từ các mẫu đất được lấy tại khu vực trồng cây ăn quả, rau màu và trồng lúa, nhóm tác giả tiến hành nuôi cấy và phát hiện hơn 100 chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trong môi trường môi trường muối khoáng tối thiểu (MSM) có thêm chlorpyrifos với nồng độ 300µg/mL. Chủng *Burkholderia spp.* cho thấy khả năng phát triển thích nghi nhanh và phát triển tốt nhất ở các nồng độ khác nhau của Chlorpyrifos. Chủng này có khả năng xử lý Chlorpyrifos trong cả trong môi trường có glucozo và không có glucozo, làm nồng độ Chlorpyrifos giảm tới 43% trong vòng 15 ngày [35].

Tác giả Trương Quốc Tất cùng cộng sự (2020) đã nghiên cứu làm giàu, phân lập và đánh giá khả năng phân hủy ethyl chlorpyrifos trong đất phèn và đất phù sa của các quần xã vi khuẩn hiếu khí. Kết quả đã tuyển chọn được 4 quần xã từ đất phèn và đất phù sa ở điều kiện tự nhiên và 3 quần xã từ đất phù sa ở điều kiện nhà lưới có khả năng phân hủy ethyl chlorpyrifos mạnh. Kết quả phân tích sự đa dạng di truyền của các quần xã vi khuẩn phân hủy ethyl chlorpyrifos cho thấy, 2 quần xã vi khuẩn thu thập từ đất phèn chuyên lúa có độ tương đồng khoảng 15%; hai quần xã vi khuẩn thu thập từ đất phù sa chuyên màu và luân canh lúa - màu (mẫu đất ở vụ màu) có độ tương đồng khoảng 55%; ba quần xã vi khuẩn thu thập từ đất phù sa ở nhà lưới có cấu trúc tương đồng 57 - 85% [36].

CHƯƠNG 2.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu đất được thu tại vùng trồng chè tại xã Hùng Sơn huyện Anh Sơn tỉnh Nghệ An.

- Chúng vi sinh vật phân giải lân hữu cơ (OP) được phân lập từ đất trồng chè.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

- Thiết bị, máy móc sử dụng:

+ Buồng cấy vi sinh vật BestLab;

+ Máy lắc ổn nhiệt KS 4000;

+ Máy ly tâm Hettich;

+ Máy sắc kí khí ghép nối khối phổ GC-MS với thiết bị sắc ký Trace 1300 và ISQ LT của hãng Thermo Scientific (Mỹ).

- Dụng cụ sử dụng:

+ Bình tam giác;

+ Túi nilon;

+ Ống nghiệm;

+ Đĩa petri;

+ Que cấy;

+ Đèn cồn;

+ Cồn 70°;

- Hóa chất sử dụng:

+ Hoạt chất thuốc trừ sâu Parathion - Hãng Dr.Ehrensorfer, độ tinh khiết 99%.

+ Môi trường muối khoáng tối thiểu MSM gồm 870 mL nước khử khoáng được khử trùng ưót tại 121°C với thời gian 20 phút, sau khi hạ nhiệt

độ xuống còn 70°C thêm tiếp 25 mL dung dịch đậm, 100 mL dung dịch muối khoáng và 5 mL dung dịch.

+ Môi trường Luria-Bertani (LB) Agar gồm 20 gram Peptone, 10 gram NaCl, 5 gram Cao nấm men và 15 gram Agar trong một lít nước khử khoáng được khử trùng ước ở 121°C trong 20 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu [33] [36]

Các mẫu đất dùng để phân lập VSV được thu tại 5 vị trí trên cùng một luống chè theo hình ziczac, thu ở độ sâu 20cm.

Tiến hành:

- Mẫu đất sau khi lấy được trộn đều các mẫu lại và lấy 1 mẫu đại diện với trọng lượng 2kg. Đất đã thu xong sẽ cho vào bao nylon màu nâu sẫm (2 lớp), ký hiệu mẫu và trữ lạnh ở 4°C ± 2°C.

- Khi về đến phòng thí nghiệm, mẫu được chia làm nhiều phần khác nhau để làm giàu trên môi trường chứa hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ dùng cho phân lập VSV phân hủy OP.

2.2.2. Phương pháp phân lập chủng VSV

Từ các mẫu đất đã được xử lý ở trên, tiến hành các bước phân lập chủng vi sinh vật được thực hiện như sau:

- Làm giàu mẫu đất: Lấy 5g mẫu đất chuyển vào 95 mL môi trường MSM chứa hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ (20 mg/L Parathion) và lắc 120 rpm trong điều kiện nhiệt độ 25 - 28°C, thời gian 5 ngày [34].

- Quá trình làm giàu lặp lại ít nhất 3 lần. 5mL dịch nuôi cấy được bổ sung vào 95mL môi trường có chứa 20 mg/L Parathion.

- Dung dịch làm giàu lần cuối được pha loãng đến các nồng độ pha loãng khác nhau, sau đó lấy 50µl ở các nồng độ 10^{-3} - 10^{-5} cấy trên các đĩa môi trường MSM chứa hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ (sử dụng parathion) và không chứa hóa chất BVTV lân hữu cơ (Parathion) để đối chứng.

- Sau khi ủ ở 25°C, các khuẩn lạc mọc trên đĩa petri chứa Parathion mà không thấy xuất hiện khuẩn lạc tương tự trên đĩa petri đối chứng thì được cấy

ria tinh sạch trên môi trường MSM có chứa cơ chất parathion cho tới khi các khuẩn lạc đồng nhất (có cùng hình dáng, màu sắc...).

2.2.3. Phương pháp nuôi cấy VSV

Nuôi cấy vi sinh vật, là phương pháp nhân lên các vi sinh vật bằng cách cho chúng sinh sản, phát triển trong môi trường nuôi cấy đã được xác định, kiểm soát về nhiệt độ, độ ẩm, oxy, nồng độ các chất dinh dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm..

Tiến hành: Các chủng sau khi phân lập được nuôi cấy trong môi trường LB dịch thể có bổ sung cơ chất 20 mg/L Parathion [37].

2.2.4. Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật

Mật độ vi sinh vật được xác định dựa trên phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa, tính toán số lượng vi sinh vật trên mililit hoặc trên gram mẫu thông qua xác định số lượng khuẩn lạc phát triển trong các đĩa môi trường.

Tuyển chọn, xác định một số đặc điểm sinh học và ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến mật độ của các chủng vi sinh vật được xác định theo các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật thông thường [38].

2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng phân giải OP

Xác định khả năng phân giải OP của các chủng đã phân lập trên môi trường dịch thể. Quá trình thực hiện như sau:

- Nhân nuôi sinh khối các chủng cần đánh giá trên môi trường giàu dinh dưỡng như LB.

- Thu hoạch tế bào ở cuối pha sinh trưởng (khoảng sau 48 giờ nuôi cấy), rửa tế bào 3 lần bằng môi trường MSM đã khử trùng.

- Sau khi rửa, cho tế bào vi khuẩn vào môi trường MSM có Parathion ở nồng độ 20mg/L sao cho mật độ OD ban đầu là 0,5.

- Tiến hành xác định mật độ vi sinh vật để xác định khả năng tăng sinh của từng chủng tại thời điểm ngày 1, ngày 2, ngày 3, ngày 4.

- Thu mẫu sau tại thời điểm ngày 0, ngày 3, ngày 6, ngày 10 để phân tích nồng độ Parathion trong mẫu sử dụng phương pháp sắc kí khối phổ.

2.2.6. Phương pháp xác định trình tự gen 16s rRNA

Các bước tách chiết DNA tổng số của chủng vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp CTAB/NaCl của Ausubel FM và cộng sự [39].

- Vi sinh vật được nuôi trong thời gian 24 giờ, trong môi trường thạch để thu sinh khối bão hòa trong 1,5mL nước đã được khử trùng.

- Thu sinh khối bằng cách lấy cặn tế bào thu được, ly tâm lạnh ở tốc độ 5000rpm, thời gian là 5 phút.

- Hòa tan đều cặn tế bào trong 567 μ l TE, 5 μ l lysozym, ủ ở 37°C trong thời gian 20 phút. Thêm proteaza K (3 μ l) và sodium dodecyl sulfate 10% (30 μ l) vào dung dịch nêu trên, tiếp tục giữ ở 37°C trong thời gian 30 phút.

- Bổ sung thêm NaCl 5M (100 μ l), trộn đều, sau đó cho thêm 80 μ l dung dịch CTAB/NaCl (gồm 0.7 M NaCl và 10% cetyltrimethylammonium bromide) giữ ở 65°C trong 10 phút.

- Chiết hỗn hợp chloroform : isoamyl (tỷ lệ 24 : 1), vortex.

- Ly tâm tốc độ 12.000rpm để thu dịch nổi.

- Thêm 10 μ l CH₃COONa nồng độ 3M, trộn đều, rồi bổ sung tiếp 2V cồn 100 % (lạnh).

- Để ít nhất trong 4 giờ ở -20°C.

- Ly tâm thu cặn tốc độ 12.000 vòng trong 20 phút.

- Rửa phần kết tủa bằng cồn 70° (sử dụng 500 μ l), ly tâm tốc độ 12.000 vòng trong 10 phút, sau đó thu cặn và làm khô

- Hòa tan cặn trong 40 ÷ 60 μ l TE - ARNaza, ủ ở 37°C trong 01 giờ.

- Kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng máy đo quang phổ, sử dụng bước sóng 260 nm và 280 nm. CADN (protein) = A₂₆₀ (280) x 50 x độ pha loãng mẫu. Nếu tỉ lệ ADN/protein > 1,8, là mẫu sạch.

- Điện di kiểm tra trên gel agarosa 0.8% sử dụng điện thế 100V. Nhuộm bản gel trong dung dịch 1% ethidium bromide (C₂₁H₂₀BrN₃) trong thời gian 10 phút [39].

- Trình tự ADN sẽ được xác định bằng kit Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Weiterstadt, Đức), sản phẩm được phân tích trên máy đọc trình tự tự động ABI 377 (Perkin-Elmer, Mỹ).

- Chuỗi nucleoit được xử lý bằng chương trình Bioedit.

- Truy cập dữ liệu ngân hàng gen EMBL để so sánh, bằng chương trình GENDOC 2.5 (Nicholas, 1999).

- Sử dụng chương trình phân tích phả hệ và tiến hóa MEGA 2.1 để xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng phân tích.

2.2.7. Phương pháp đánh giá yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của VSV

2.2.7.1. Nguồn Cacbon

Sử dụng môi trường MSM có bổ sung nguồn Cacbon và Nitơ khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau gồm Glucozo, Lactozo, Saccarozo và Mantozo trong các thời gian khác nhau. Mật độ vi sinh vật sẽ được xác định sau các khoảng thời gian 12 giờ. Đánh giá nguồn Cacbon tối ưu thông qua mật độ vi sinh vật.

2.2.7.2. Nguồn Nito

Sử dụng môi trường MSM có sử dụng nguồn Cacbon tối ưu và bổ sung nguồn Nitơ từ cao nấm men, cao chiết thịt, pepton trong các khoảng thời gian khác nhau. Mật độ vi sinh vật sẽ được xác định sau các khoảng thời gian 12 giờ. Đánh giá nguồn Nito tối ưu thông qua mật độ vi sinh vật.

2.2.7.3. Yếu tố pH

Sử dụng môi trường có giá trị pH là 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 với các nguồn Cabon và Nito tối ưu trong các khoảng thời gian. Mật độ vi sinh vật sẽ được xác định sau các khoảng thời gian 12 giờ. Xác định pH tối ưu thông qua mật độ vi sinh vật.

2.2.7.4. Yếu tố nhiệt độ

Thay đổi nhiệt độ môi trường nuôi cấy trong cùng điều kiện nhân sinh khối để đánh giá sự sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Mật độ vi sinh vật sẽ được xác định sau các khoảng thời gian 12 giờ. Xác định nhiệt độ phù hợp nhất thông qua mật độ vi sinh vật.

2.2.8. Phương pháp đánh giá khả năng xử lý OP của các chủng VSV trong đất in vitro - phòng thí nghiệm

- Đất thử nghiệm được sấy khô ở 100°C trong 24h, sau đó được nghiền

và rây qua lưới (no. 125) để thu đất mịn, sau đó tiếp tục được sấy lại (100°C, 12h) để khử trùng.

- Trộn cơ chất Parathion với lượng tương đương 100 mg/kg đất. Đất sau khi trộn để qua một ngày cho cơ chất ngấm đều lên đất.

- Chủng VSV được lên men trên môi trường giàu dinh dưỡng đến mật độ 10^7 CFU/mL sau đó tưới dịch nuôi cấy lên đất nhiễm OP với mật độ vi sinh vật 10^6 CFU/g, 10^5 CFU/g, 10^4 CFU/g có sử dụng mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng là mẫu đất không được tưới dịch nuôi cấy chủng vi sinh có khả năng phân giải OP.

2.2.9. Phương pháp sắc kí khối phổ (GC-MS)

Các mẫu được phân tích xác định thành phần các chất có trong các mẫu phản ứng tham chiếu theo USEPA 8280B sử dụng thiết bị thiết bị sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC-MS) với thiết bị sắc ký Trace 1300 và ISQ LT của hãng Thermo Scientific (Mỹ).

Chương trình sắc ký: Nhiệt độ ban đầu là 100 °C; gia nhiệt với tốc độ 15°C/phút đến nhiệt độ 160 °C, gia nhiệt với tốc độ 5 °C/phút đến nhiệt độ 270°C giữ trong 10 phút. Chế độ chạy đẳng dòng, khí mang Heli với lưu lượng dòng 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu là 1 µL, sử dụng chế độ không chia dòng.

Khối phổ: Sử dụng nguồn ion hóa kiểu va chạm điện tử EI; nhiệt độ nguồn ion hóa 220 °C.

2.2.10. Phương pháp xử lý, phân tích và thống kê số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để tính toán phần trăm phân hủy, quản lý số liệu, vẽ đồ thị và tính toán, so sánh các giá trị [33].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi sinh vật có khả năng phân giải hóa chất BVTV gốc OP (Parathion)

Để phân lập, tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân giải hóa chất BVTV gốc OP, đề tài đã tiến hành lấy mẫu đất tại khu vực trồng chè thâm canh ở tỉnh Nghệ An. Tại đây, việc sử dụng hóa chất BVTV gốc OP chiếm đa số, chiếm trên 60% các chủng loại thuốc sử dụng.

Các mẫu đất nghiên cứu được làm giàu VSV phân giải OP trong môi trường MSM có chứa loại hóa chất BVTV phot pho hữu cơ theo phương pháp được nêu tại Chương 2. Sau đó, các mẫu được lắc ở nhiệt độ 25 - 28°C, với tốc độ 120 rpm. Sau khi cấy, tiến hành chuyển làm giàu ít nhất 3 lần, dung dịch làm giàu lần cuối được pha loãng ở các nồng độ khác nhau. Lấy 50µl các nồng độ 10^{-3} - 10^{-5} để cấy trên các đĩa có môi trường chứa Parathion và không chứa Parathion để làm cơ sở đối chứng. Các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa petri chứa Parathion mà các khuẩn lạc tương tự không thấy xuất hiện trên đĩa đối chứng sẽ được cấy rìa tinh sạch trong môi trường LB. Các chủng sau đó sẽ được sàng lọc lại bằng cách chấm khuẩn lạc trên môi trường MSM chứa cơ chất Parathion.

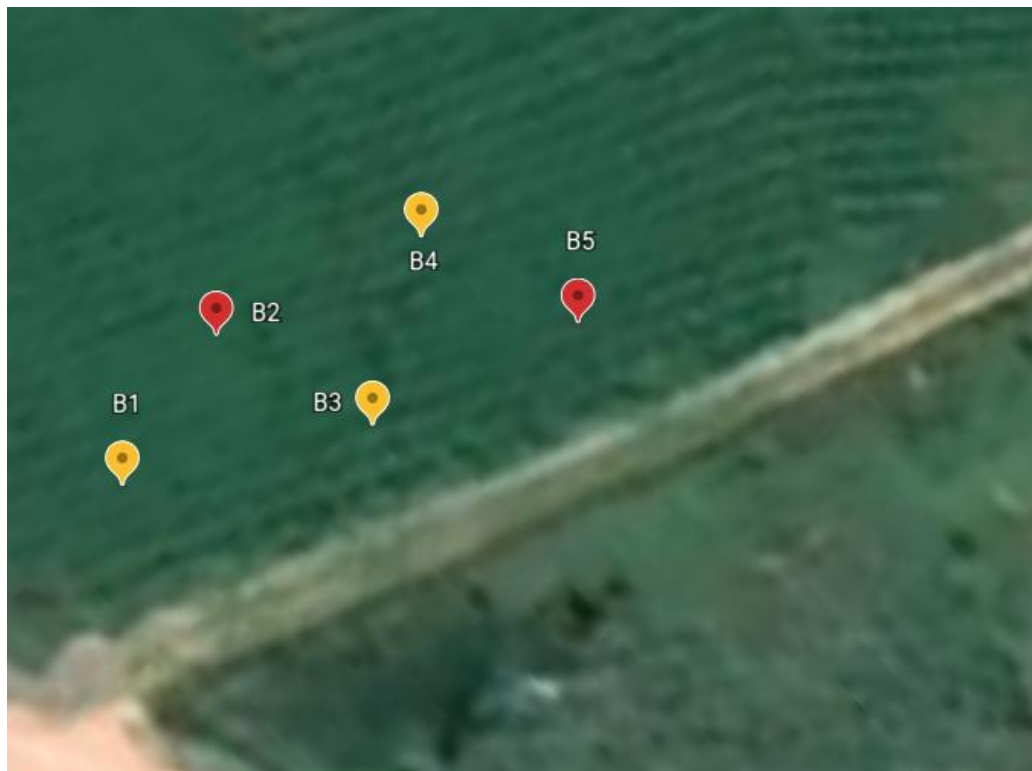
Bảng 3. 1: Vị trí các chủng VSV sống trong môi trường có chứa Parathion xuất hiện mẫu đất

Tên mẫu đất			Tên mẫu đất		
Khu vực	Vị trí		Khu vực	Vị trí	
A	1	+	B	1	-
	2	-		2	+
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	+

Ghi chú: A, B : Kí hiệu các khu vực lấy mẫu đất.

(+): Mẫu đất có xuất hiện chủng vi sinh vật phân giải Parathion

(-): Mẫu đất không xuất hiện chủng vi sinh vật phân giải Parathion



Hình 3. 1: Vị trí lấy mẫu đất



: Vị trí xuất hiện chủng vi sinh vật phân giải Parathion



: Vị trí không xuất hiện chủng vi sinh vật phân giải Parathion

Kết quả của thí nghiệm nhận thấy, từ các mẫu đất thu về, tại 03/10 vị trí lấy mẫu đã phân lập được chủng vi sinh vật xuất hiện khuẩn lạc trong môi trường MSM có chứa Parathion là nguồn cacbon duy nhất mà không thấy xuất hiện trên các đĩa đối chứng. Kí hiệu các chủng vi sinh vật này lần lượt là P1, P2, P3.

3.2. Đánh giá khả năng phân giải OP

Các chủng sau quá trình phân lập và được làm tinh khiết, sẽ được đánh giá khả năng phân giải OP.

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong trường MSM có chứa cơ chất Parathion để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của từng chủng. Mật độ vi sinh vật được trình bày trong bảng dưới đây:

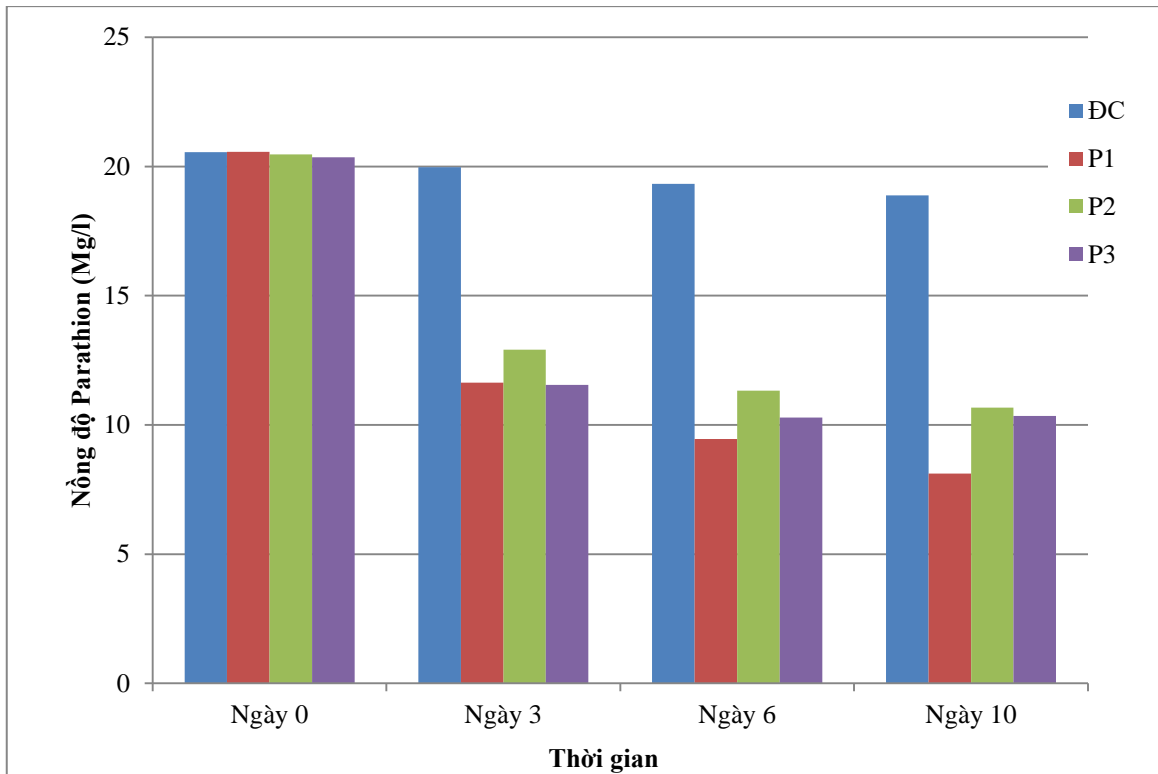
Bảng 3. 2: Mật độ vi sinh vật theo thời gian

Chủng VSV	CFU/mL			
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
P1	$6,9 \times 10^6$	$6,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$
P2	$5,4 \times 10^6$	$5,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$
P3	$4,8 \times 10^6$	$4,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$

Hàm lượng Parathion sau các khoảng thời gian được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3. 3: Dư lượng Parathion khi sử dụng các chủng VSV

Chủng VSV	Dư lượng Parathion (mg/l)			
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 10
Đối chứng	20,55	19,97	19,32	18,88
P1	20,56	11,64	9,45	8,12
P2	20,46	12,91	11,33	10,67
P3	20,35	11,55	10,28	10,35



Hình 3. 2: Dư lượng Parathion trong các mẫu sau các khoảng thời gian

Từ bảng 3.3 và hình 3.2 cho thấy, sau khoảng thời gian 10 ngày, các chủng P1, P2, P3 đã phân hủy được 50 - 60% hàm lượng Parathion trong môi trường nuôi cấy. Đối với mẫu đối chứng, sau 10 ngày, hàm lượng Parathion giảm khoảng 8,1%. Từ các kết quả đó cho thấy các chủng P1, P2, P3 có khả năng phân hủy Parathion.

Một số công trình nghiên cứu trên thế giới cũng đã tìm ra được chủng vi sinh vật có khả năng phân giải Parathion trong đất. Santanu Pailan và cộng sự (2015) đã nghiên cứu sự phân hủy thuốc trừ sâu OP bởi chủng vi khuẩn được phân lập từ đất ruộng nông nghiệp ở Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu cho thấy có một dòng vi khuẩn mới được gọi là *SanPS1* có khả năng sử dụng chlorpyrifos và parathion là nguồn thức ăn và chuyển hóa chúng. Chủng này hình thành nội bào tử Gram dương mới này được xác định là *Bacillus aryabhatai* dựa trên giải trình tự 16S rDNA. Chủng có thể phân hủy khoảng 56% parathion trong môi trường khoáng lỏng trong vòng 24 giờ ở 37° C [40]. Tác giả Lê Thị Huệ và cộng sự (2021) đã nghiên cứu về sự phân hủy sinh học của thuốc BVTV gốc lân hữu cơ đối với methyl parathion bởi chủng vi sinh vật đất. Trong thí nghiệm đã tìm thấy 06 chủng vi sinh vật phân giải OP được phân lập từ đất nông nghiệp tại Hà Nam. Trong đó, *Priestia aryabhatai* và

Klebsiella variicola phân lập tốt methyl parathion và diazinon. Việc tìm thấy các chủng này cho thấy tiềm năng của phương pháp xử lý sinh học với các thuốc trừ sâu OP nói riêng và giải quyết các điểm ô nhiễm thuốc BVTV nói chung [41]. Có nhiều nghiên cứu đã cho thấy khả năng phân giải Parathion của các chủng vi sinh vật.

Qua so sánh với các kết quả nghiên cứu trên thế giới và số liệu thu được từ quá trình thí nghiệm cho thấy, cả 03 chủng vi sinh vật phân lập được từ các mẫu đất trồng chè đều có khả năng phân giải Parathion, trong đó, chủng VSV P1 có khả năng phát triển mạnh và ổn định hơn so với 2 chủng VSV P2 và P3 trong môi trường MSM.

Do vậy, đề tài sẽ sử dụng chủng VSV P1 để phục vụ cho các quá trình nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Xác định tên chủng VSV P1

Trình tự gene 16s rARN của chủng VSV P1 như sau:

```
CTCCACAAGGGTTAGGCCACCOGCTTCAGGTOTTACCGACTT
TCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCA
CCGCAGCGTTGCTGATCTGOGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGA
GGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAAGTGGGACCGGCTTTTTGGG
ATTCOCTCCACCTCACGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGT
AGCATCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC
ATCCCCACCTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCC
CACCATTACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTTTACGAGTGTCCAAAGAGTTGACCATTTCTGGCCC
GTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG
AATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCC
TTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTTAA
TGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCCACTA
GTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTT
TGCTCCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGAT
CTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGC
TACACCAGGAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCCGT
```

ACCCACTGCAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGAC
 GCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGATA
 ACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC
 CGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTAA
 AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGC
 TGCATCAGGCTTCCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACC
 CTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCCTTGGTGAGCCATTACCTCA
 CCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCGAAAAATCT
 TTCCAAACGCAGACCATGCGGTCACGTCACATATCCAGTATTAGAC
 GCCGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGT
 GTTACTCACCCGTTTCGCCACTGATCCCACAGAGCAA.

Dựa theo đoạn gen 16S rARN của các chủng VSV, kết hợp với dữ liệu tại Ngân hàng GenBank, vị trí phân loại của các chủng VSV nghiên cứu được xác định dưới đây.

Bảng 3. 4: Độ tương đồng của gen 16s rARN với các chủng VSV

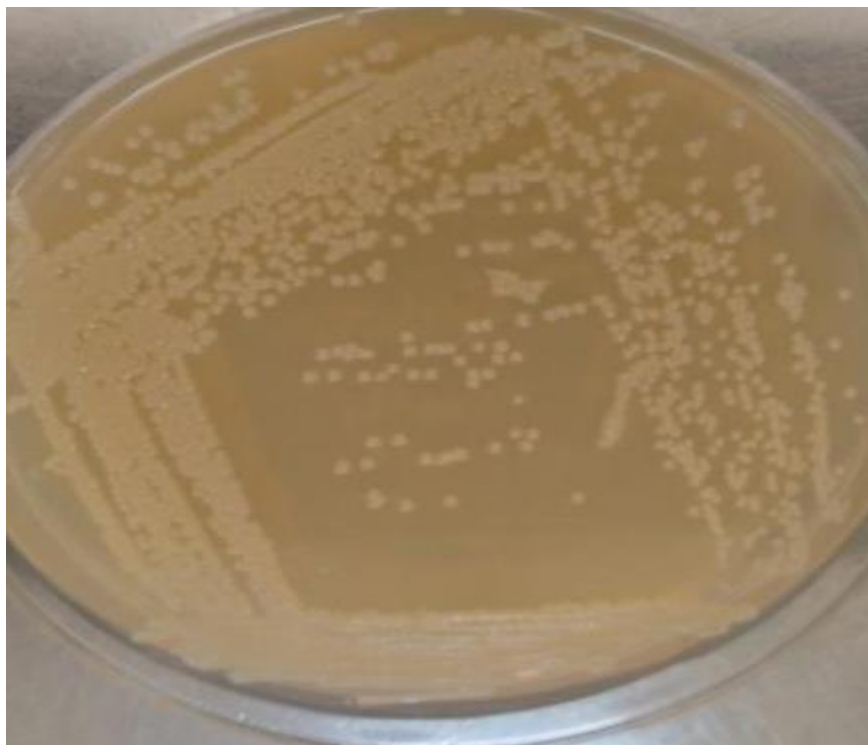
STT	Mã	Thông tin chung	% tương đồng
1	MK875470.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> AN2	99,2
2	MK559995.1	<i>Microbacterium</i> sp.5	98,5
3	KY565402.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> Pesticide resistant	98,6
4	KX350116.1	<i>Microbacterium</i> sp.BAB-4338	97,1
5	KP780213.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> SMV195#22	97,5
6	KJ854553.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> AO20b2	97,3

Từ bảng 3.4 cho thấy, chủng VSV P1 có độ tương đồng gen 16s rARN 99,2% với chủng *Microbacterium paraoxydans* AN2. Do đó, đề tài đặt tên chủng VSV P1 là *Microbacterium paraoxydans* P1.

3.4. Đặc điểm hình thái của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1

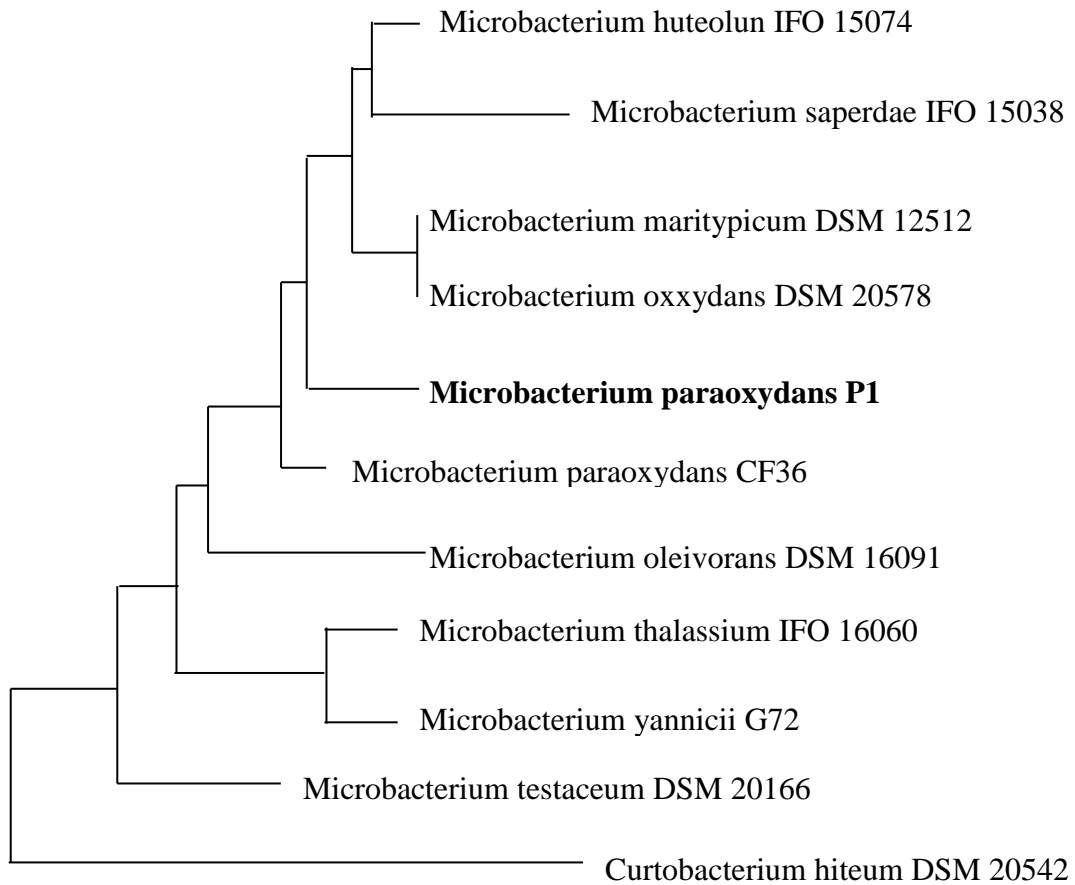
Chủng vi sinh vật sau khi được chọn lọc sẽ được quan sát đặc điểm hình thái. Đặc điểm này được quan sát sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường LB ở 30°C.

+ Hình thái của khuẩn lạc trong môi trường LB: Khuẩn lạc đều đặn, bóng, màu ngà vàng, đường kính khoảng 1 - 3 mm, không sinh sắc tố.

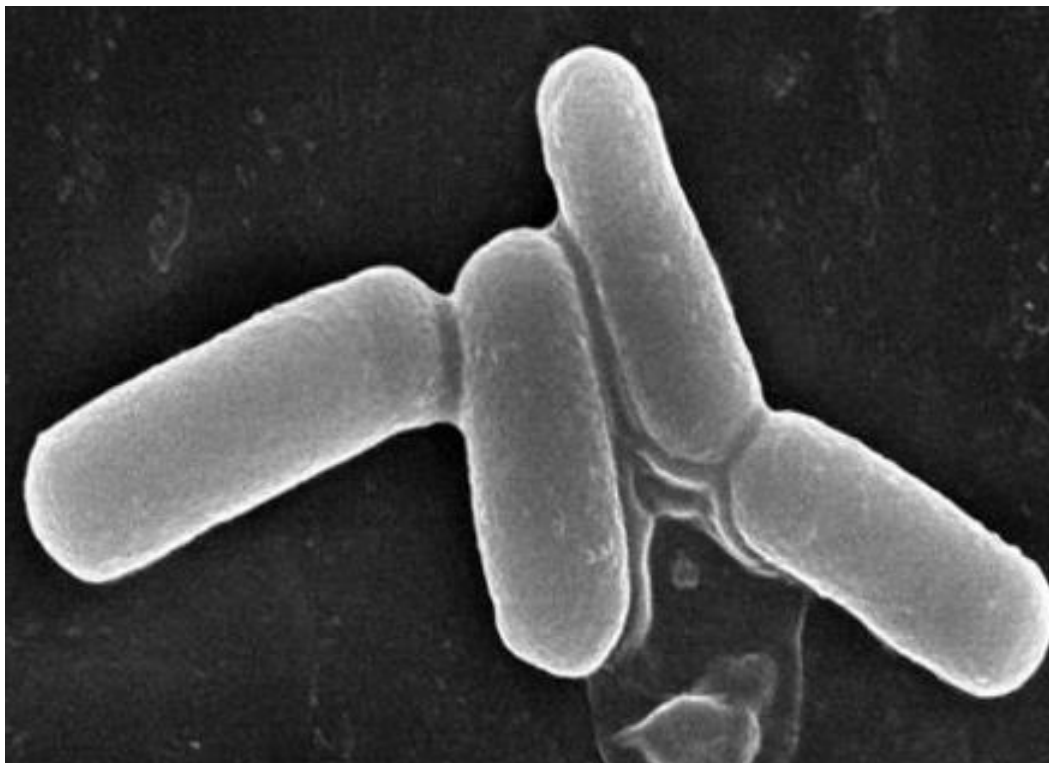


Hình 3. 3: Hình thái của khuẩn lạc trong môi trường LB

+ Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử: Tế bào có kích thước 0,5 x 1,0µm, dạng hình que, đứng đơn.



Hình 3. 4: Cây phát sinh chủng loại chủng *Microbacterium paraoxydans* P1



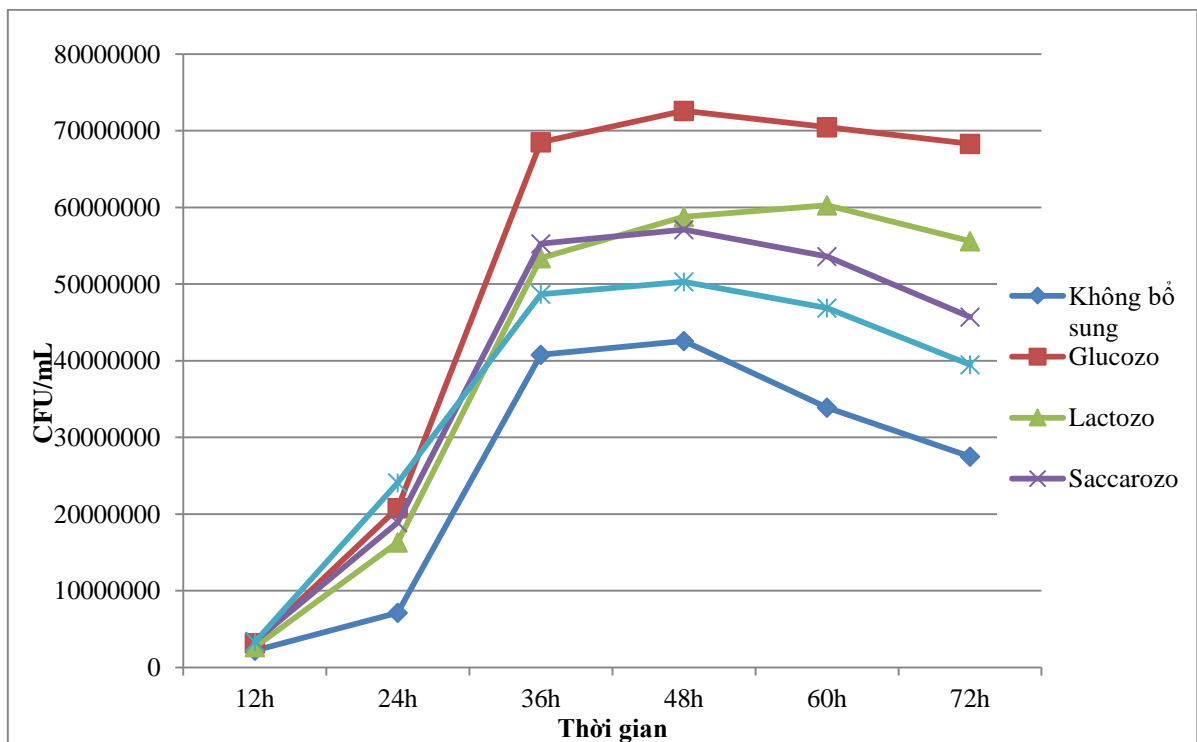
Hình 3. 5: Chủng *Microbacterium paraoxydans* P1 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử

3.5. Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1

Từ các kết quả sàng lọc, tuyển chọn từ các chủng VSV được lựa chọn, chủng VSV *Microbacterium paraoxydans* P1 được xác định là có khả năng phân giải Parathion tốt nhất.

3.5.1. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn Cacbon

Nguồn Cacbon là một trong những yếu tố có tác động đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật và quá trình phân hủy Parathion. Ở thí nghiệm này, sử dụng nguồn Cacbon từ các chất: Glucozo, lactozo, mantozo, saccharose. Bổ sung các loại đường này tới nồng độ 1% vào môi trường MSM với 0,1% cao nấm men cung cấp yếu tố sinh trưởng, có sử dụng mẫu đối chứng. Kết quả ảnh hưởng của nguồn Cacbon lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1 được thể hiện trong hình dưới đây:



Hình 3. 6: Ảnh hưởng của nguồn Cacbon tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1

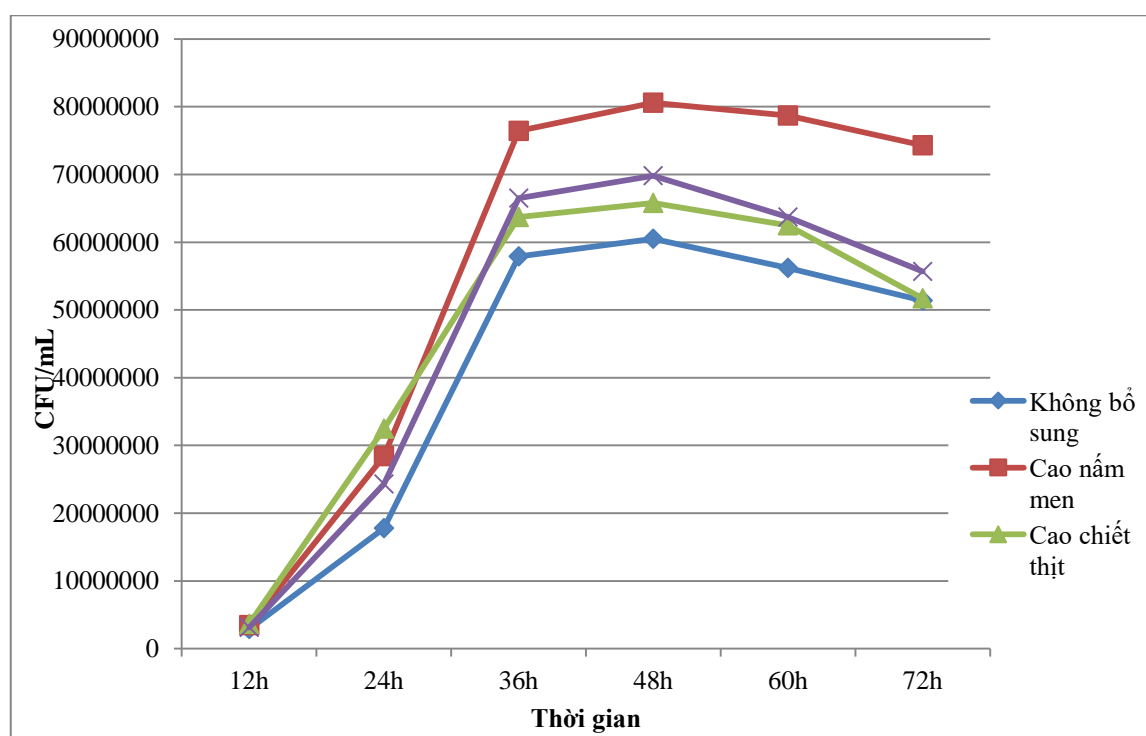
Từ hình 3.6 nhận thấy, tại môi trường bổ sung Glucozo, Saccarozo, Mantozo tế bào bắt đầu quá trình sinh trưởng, phát triển nhanh sau 12 - 48 giờ khi nuôi cấy, đối với môi trường bổ sung Lactozo, tế bào phát triển nhanh sau

12 - 60 giờ nuôi cấy, thể hiện ở việc mật độ vi sinh vật tăng nhanh trong thời gian này. So sánh mật độ của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1 sau khi thêm các nguồn Cacbon cho thấy, glucozo là nguồn phù hợp nhất cho quá trình phát triển của chủng. Tại thời điểm sau 48 giờ, mật độ của chủng là $7,3 \times 10^7$ CFU/mL (đối với nguồn Cacbon là glucozo). Các nguồn Cacbon còn lại đều có mật độ vi sinh vật thấp hơn ở các thời điểm khác nhau.

Sau thời gian 72 giờ, mật độ của chủng vi sinh vật này không tăng và có xu hướng đạt đến trạng thái cân bằng sau đó suy giảm. Điều này là do các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy chủng vi sinh vật đã giảm dần, do đó, số tế bào trong quần thể giảm dần.

3.5.2. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn Nito

Để đánh giá vai trò của các nguồn Nito đến quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1 sử dụng các nguồn Nito sau: Pepton, cao chiết thịt, cao nấm men. Sử dụng các nguồn này ở nồng độ 0,5% trong môi trường MSM có nguồn Cacbon là glucozo 1%, có sử dụng mẫu đối chứng. Kết quả quá trình khảo sát, đánh giá vai trò của nguồn Nito được trình bày trong hình dưới đây:

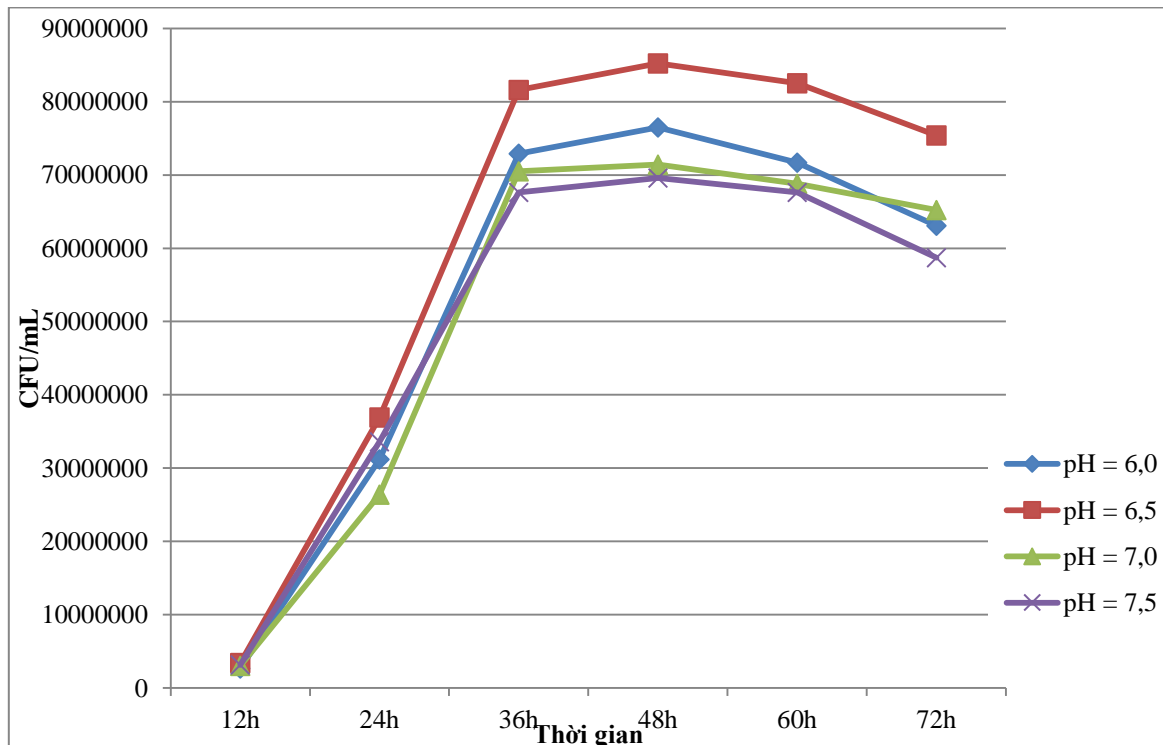


Hình 3. 7: Ảnh hưởng của nguồn Nito tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans* P1

Từ hình 3.7 nhận thấy, mật độ của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* tăng nhanh sau thời gian từ 12 - 48 giờ nuôi cấy. So sánh 03 nguồn Nito cung cấp cho quá trình nuôi cấy chủng này và mẫu đối chứng, nhận thấy, cao nấm men là nguồn có tác dụng tốt nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans P1*. Giá trị mật độ vi sinh vật cao nhất là $8,1 \times 10^7$ CFU/mL, tại thời điểm sau 48 giờ nuôi cấy (đối với nguồn Nito là cao nấm men). Sau 48 giờ, quá trình phát triển của chủng chậm lại và bắt đầu có xu hướng đạt đến trạng thái cân bằng và suy giảm.

3.5.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH

Để đánh giá, xác định giá trị pH phù hợp cho quá trình nhân sinh khối của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* có khả năng phân hủy Parathion, tiến hành đánh giá tại các giá trị pH = 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 trong môi trường MSM có bổ sung nguồn Nito từ cao nấm men nồng độ 0,5%, nguồn Cacbon từ glucozo 1%. Kết quả quá trình khảo sát, đánh giá được trình bày trong hình dưới đây:

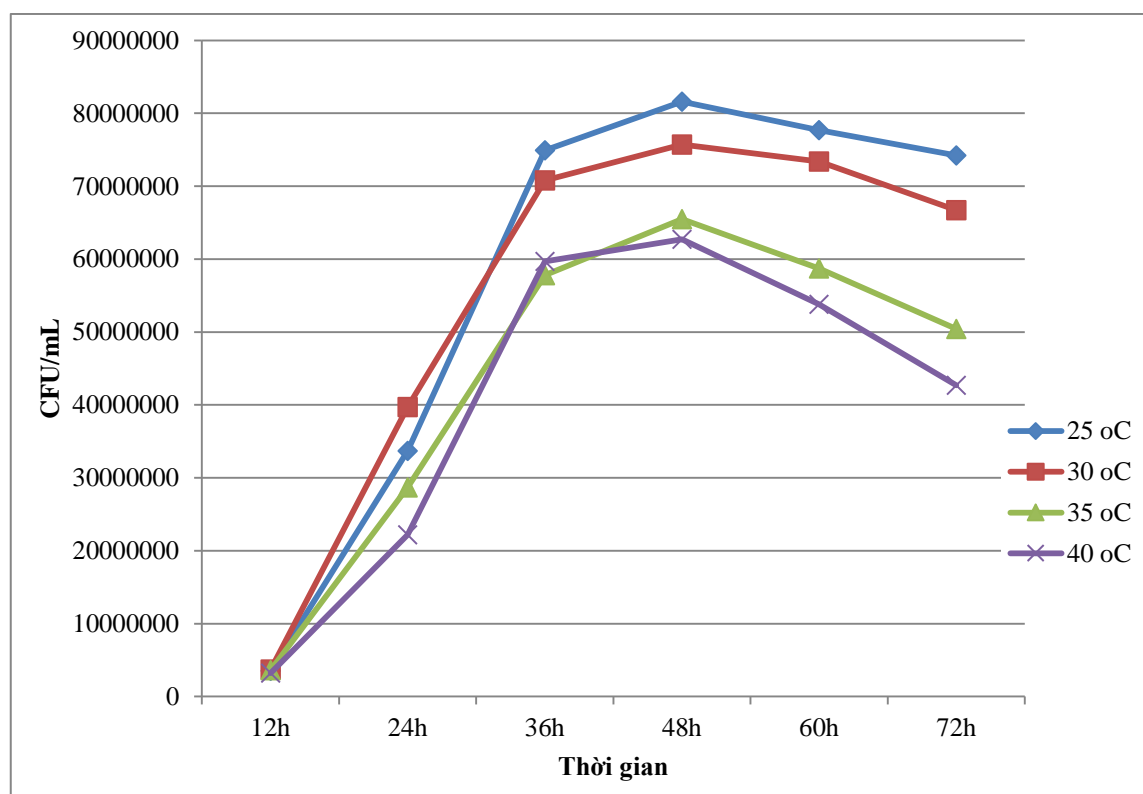


Hình 3. 8: Ảnh hưởng của pH đến tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans P1*

Từ bảng 3.8 nhận thấy, trong thời gian từ 12 - 48 giờ sau khi nuôi cấy, mật độ của chủng VSV tăng nhanh. Qua đánh giá, so sánh mật độ của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* tại các giá trị nhận thấy, pH = 6,5 là giá trị phù hợp nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng này. Tại các giá trị pH = 6,0; pH = 7,0 và pH = 7,5, quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng này chậm hơn.

3.5.4. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ

Để xác định nhiệt độ tối ưu cho quá trình nhân sinh khối chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu, tiến hành đánh giá ở các khoảng nhiệt độ từ 25 - 40°C trong các khoảng thời gian khác nhau trong môi trường MSM có bổ sung nguồn Nitơ từ cao nấm men nồng độ 0,5%, nguồn Cacbon từ glucozo 1%, pH = 6,5. Kết quả quá trình khảo sát, đánh giá được trình bày trong hình dưới đây:



Hình 3. 9: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng *Microbacterium paraoxydans P1*

Từ hình 3.9 cho thấy, nhiệt độ tốt nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển chủng *Microbacterium paraoxydans P1* phân hủy Parathion là ở

25°C. Khi nhiệt độ càng tăng cao, quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng này sẽ càng giảm đi.

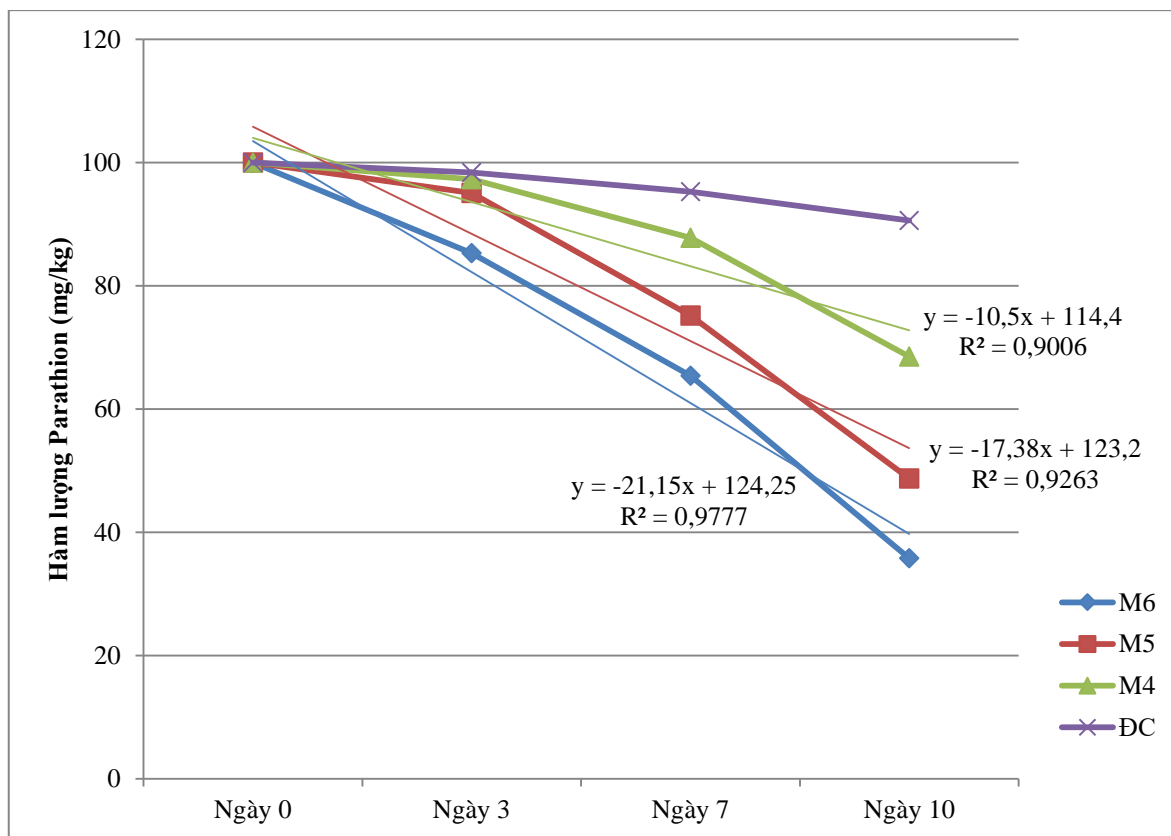
Như vậy, điều kiện nhân sinh khối cũng chủng *Microbacterium paraoxydans P1* được trình bày trong bảng dưới đây

Bảng 3. 5: Điều kiện nhân sinh khối của chủng *Microbacterium paraoxydans P1*

STT	Điều kiện nhân sinh khối	Chủng <i>Microbacterium paraoxydans P1</i>
1	Nguồn Cacbon	Glucozo
2	Nguồn Nito	Cao nấm men
3	pH môi trường	6,5
4	Nhiệt độ môi trường	25°C

3.6. Đánh giá khả năng phân giải Parathion của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* trong đất in vitro

Chủng *Microbacterium paraoxydans P1* sau khi được lựa chọn sẽ lên men trong môi trường MSM có bổ sung nguồn Nito từ cao nấm men nồng độ 0,5%, nguồn Cacbon từ glucozo 1%, pH = 6,5, nhiệt độ 25°C trong 48 giờ, thu sinh khối, mật độ vi sinh vật đạt được lúc này khoảng 10^7 CFU/mL. Tưới lần lượt 100g, 10g, 1g sinh khối vào lần lượt 900g, 990g và 999g đất vô trùng đã bổ sung cơ chất Parathion với liều lượng tương đương là 100 mg/kg đất, mật độ vi sinh trong đất lúc này là 10^6 CFU/g, 10^5 CFU/g, 10^4 CFU/g. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong hình dưới đây:



Hình 3. 10: Đánh giá dư lượng Parathion khi thay đổi mật độ VSV

Ghi chú:

M6: Mẫu đất bổ sung chủng *Microbacterium paraoxydans P1* mật độ 10^6 CFU/g.

M5: Mẫu đất bổ sung chủng *Microbacterium paraoxydans P1* mật độ 10^5 CFU/g.

M4: Mẫu đất bổ sung chủng *Microbacterium paraoxydans P1* mật độ 10^4 CFU/g.

ĐC: Mẫu đối chứng không bổ sung chủng *Microbacterium paraoxydans P1*.

Từ kết quả tại hình 3.10 nhận thấy, chủng *Microbacterium paraoxydans P1* có tiềm năng phân giải Parathion và ứng dụng xử lý Parathion trong môi trường đất. Ở mật độ vi sinh vật 10^6 CFU/g, Parathion bị phân hủy nhanh hơn và nhiều hơn so với 2 mật độ còn lại. Với mật độ này, phương trình đường chuẩn cũng cho giá trị R^2 là lớn nhất ($R^2 = 0,9777$). Khi mật độ vi sinh vật tưới vào đất càng giảm, quá trình phân hủy Parathion càng giảm. Lượng Parathion trong đất đã bị phân giải đạt khoảng 64% sau 10 ngày kể từ khi nuôi cấy trong môi trường đất (Đối với mẫu đất bổ sung chủng *Microbacterium paraoxydans P1* ở mật độ 10^6 CFU/g). Trong đó, đối với mẫu đối chứng, lượng Parathion bị phân hủy sau thời gian 10 ngày chỉ đạt khoảng 10%.

CHƯƠNG 4.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Từ các mẫu đất thu thập được trên đất trồng chè, đề tài đã tiến hành phân lập và xác định được 03 chủng VSV lần lượt là P1, P2, P3 có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường chứa Parathion với khả năng phân hủy Parathion từ 50 - 60% trong thời gian 10 ngày. Chủng VSV có khả năng phân giải tốt nhất được lựa chọn là chủng P1 với khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường có chứa Parathion.

- Chủng P1 đã được định danh tên chủng là *Microbacterium paraoxydans* sau khi sử dụng kỹ thuật phân tích trình tự 16s rARN, với tỉ lệ tương đồng là 99,2%.

- Chủng *Microbacterium paraoxydans P1* có điều kiện sinh trưởng và phát triển phù hợp là:

- + Nguồn Carbon: Glucozo;
- + Nguồn Nito: Cao nấm men;
- + pH của môi trường: 6,5;
- + Nhiệt độ nuôi cấy: 25°C.

- Đánh giá khả năng phân giải Parathion của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* cho thấy, khi chủng này có mật với mật độ 10^6 CFU/g trong đất in vitro chủng này có với khả năng phân hủy đạt khoảng 64% lượng Parathion ban đầu.

4.2. Kiến nghị

Việc sử dụng vi sinh vật để phân giải lân hữu cơ (Parathion) nhằm mục đích xử lý dư lượng hóa chất BVTV trong môi trường đất có nhiều ưu điểm: Không gây hại cho con người và động vật, thân thiện với môi trường, sử dụng các nguồn VSV có sẵn từ đất phù hợp đặc điểm của loại cây trồng, giúp duy trì một nền nông nghiệp bền vững.

Tuy nhiên, quá trình tiến hành thí nghiệm, nghiên cứu còn gặp phải nhiều khó khăn, hạn chế:

- Nghiên cứu mới chỉ áp dụng trong một phạm vi hẹp, tại một địa phương và một loại cây trồng.

- Quá trình khảo sát mới chỉ khảo sát được 1 trong số nhiều loại hóa chất BVTV thuộc nhóm lân hữu cơ.

- Số lượng chủng VSV được phân lập ra chưa đa dạng, mới chỉ phát hiện được 01 chủng có khả năng phân giải Parathion.

Do vậy, để tăng tính ứng dụng của nghiên cứu này, một số kiến nghị được đưa ra để tiếp tục quá trình nghiên cứu, gồm:

- Tiếp tục tiến hành nghiên cứu khả năng phân giải của chủng *Microbacterium paraoxydans P1* với các loại hóa chất BVTV khác. Tìm ra các điều kiện tối ưu khác để nâng cao hiệu quả xử lý của chủng này.

- Tiến hành nghiên cứu trên nhiều loại cây trồng tại nhiều loại đất khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cảnh Kỳ, 2021, Vùng ĐBSCL sử dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật quá mức, *Báo Tiền phong*.
- [2] Shardendu Kumar & Garima Kaushik & Juan Francisco Villarreal-Chiu, 2016, Scenario of organophosphate pollution and toxicity in India: A review, *Environ Sci Pollut Res*.
- [3] WHO, Organophosphorus insecticides: a general introduction.
- [4] Lucio G.Costa, 2006, Current issues in organophosphate toxicology, *Clinica Chimica Acta 366*, tr. 1- 13.
- [5] Ramesh C.Gupta, 2006, Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds, chapter 2: Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates
- [6] Lê Huy Bá, 2006, *Độc học môi trường - Chương 2: Độc học thuốc bảo vệ thực vật, tập 2*, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [7] Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2010, *Báo cáo Môi trường quốc gia năm 2010, Tổng quan môi trường Việt Nam - Chương 3: Môi trường đất*, Hà Nội.
- [8] Nguyễn Thị Phương Anh, Ngô Thị Tường Châu, Tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy thuốc bảo vệ thực vật từ đất trồng rau ở tỉnh Thừa thiên huế, *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, tr. 1389-1394.
- [9] 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), tr. 47-53.
- [10] ILO, 2000, Safe and health in used chemical agriculture, *Labuor Publish Geneva*
- [11] Kaushal Jyoti; Khatri Madhu; Arya Shailendra Kumar, 2021, A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination, *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

- [12] Tổng cục Môi trường, 2015, *Hiện trạng ô nhiễm môi trường do hóa chất bảo vệ thực vật tồn lưu thuộc nhóm chất hữu cơ khó phân hủy tại Việt Nam*, Hà Nội.
- [13] Stoytcheva, Margarita, 2011, Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis: Organophosphorous Compounds - Toxicity and Detection Approach, Chapter 13.
- [14] Jason R. Richardson, 2005, Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), pp. 331-333.
- [15] Lucio G. Costa, 2018, Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues, *Toxicological Sciences*, 162(1), pp. 24-35.
- [16] Saxena, Gaurav; Bharagava, Ram Naresh, 2020, Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety (Volume I: Industrial Waste and Its Management): Organophosphate Pesticides: Impact on Environment, Toxicity, and Their Degradation, Chapter 13), pp. 265–290.
- [17] Harsimran Kaur Gill, Harsh Garg, 2014, Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies, pp.187-230
- [18] Maurya, P.K., Malik, D.S., 2016, Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: a critical review, *Journal of Industrial Pollution Control*, 32 (2).
- [19] Sidhu Gurpreet Kaur, Singh Simranjeet, Kumar Vijay, Dhanjal Daljeet Singh, Datta Shivika, Singh Joginder, 2019, Toxicity, monitoring and biodegradation of organophosphate pesticides: A review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*.
- [20] Danh Nguyen Tan, 2021, Current situation and awareness of pesticide abuse in agriculture in Vietnam, *ICIES 2020*
- [21] Policy Department, Directorate-General for External Policies, 2021, The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food.
- [22] Sharma Anket, Kumar Vinod, Shahzad Babar, Tanveer Mohsin, Sidhu Gagan Preet Singh, Handa Neha, Kohli Sukhmeen Kaur, Yadav Poonam, Bali Aditi Shreeya, Parihar Ripu Daman, Dar Owias Iqbal, Singh Kirpal, Jasrotia Shivam, Bakshi Palak, Ramakrishnan M., Kumar Sandeep, Bhardwaj Renu,

Thukral Ashwani Kumar, 2019, Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem, *SN Applied Sciences*, 1(11).

[23] Phong Nguyễn, 2020, Trên 100.000 tấn thuốc bảo vệ thực vật nhập khẩu mỗi năm: Có kiểm soát được chất lượng, *Báo Lao động*.

[24] World bank, 2017, An Overview of Agricultural Pollution in Vietnam: The Crops Sector.

[25] Chau Nguyen Dang Giang, Dang Bao Chau Le, Van Hop Nguyen, Thai Long Hoang, Thi Van Thi Tran, Thi Phuong Linh Huynh, Thi Quynh Trang Nguyen, 2022, Assessment of pesticide use and pesticide residues in vegetables from two provinces in Central Vietnam, *Plos One*.

[26] Phúc Nguyễn, 2016, Vẫn còn tình trạng lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật trong sản xuất chè, *Thời báo Tài chính*.

[27] Sở Khoa học và công nghệ TPHCM, Trung tâm Thông tin khoa học và công nghệ, 2017, Xu hướng nghiên cứu và sử dụng phân bón thế hệ mới.

[28] Sở Khoa học và công nghệ TPHCM, Trung tâm Thông tin khoa học và công nghệ, 2017, Sử dụng chế phẩm sinh học trong canh tác cây trồng.

[29] Kumar Shardendu, Kaushik Garima, Dar Mohd Ashraf, Nimesh Surendra, López-Chuken Ulrico Javier, Villarreal-Chiu Juan Francisco, 2018, Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review, *Pedosphere*, 28(2), pp. 190-208.

[30] Yaghoob Tahery, Farshid Kafilzadeh, Mehdi Dehdashi, Amir Ashkan Mahjoor, Siamak Mahmoodi Sivand and Hazandy Abdul, 2010, Isolation and identification of Diazinon Degrading bacteria from fresh water: a case study on the sediments of lake Parishan in Iran, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(3), pp. 240-245

[31] Chitrabalam Sasikala, Sonia Jiwal, Pallabi Rout, Mohandass Ramya, 2012, Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil, *World J Microbiol Biotechnol*, 28(3), pp.1301-1308.

[32] M. Mahiuddin, A. N. M. Fakhrudin, Abdullah-Al-Mahin, M. A. Z. Chowdhury, M. A. Rahman, M. K. Alam, 2014, Degradation of the organophosphorus insecticide diazinon by soil bacterial isolate, *The International Journal of Biotechnology*, pp.12-23

- [33] Lê Thị Trinh, 2013, Bước đầu nghiên cứu chủng vi sinh vật trong đất cát pha nhiều mùn có khả năng tham gia quá trình phân hủy thuốc trừ sâu cơ photpho chứa hoạt chất Diazinon, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, (15), tr. 47-50.
- [34] Nguyễn Văn Lẹ, Dương Minh Viễn, Đỗ Thị Xuân, 2015, Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu diazinon trên đất chuyên màu ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long, *Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, kỳ 2, tr. 56-61.
- [35] Đoàn Thị Mộng Thắm, Trần Trung Hiếu, Lương Thị Mỹ Ngân, 2017, Phân lập vi khuẩn phân giải chlorpyrifos từ đất nông nghiệp, *Tạp chí Khoa học trường ĐHSP TPHCM*, 14(12), tr. 127-138.
- [36] Trương Quốc Tất, Dương Minh Viễn, 2020, Tuyển chọn và đánh giá sự đa dạng của các quần xã vi khuẩn hiếu khí phân hủy Chlorpyrifos ethyl trong đất canh tác nông nghiệp ở Đồng bằng sông Cửu Long, *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2020*, tr. 390-395.
- [37] Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003), Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Letters in applied microbiology*, 36(2), 83 - 87.
- [38] TCVN 4884-2:2015 - Tiêu chuẩn kỹ thuật quốc gia về vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Đếm khuẩn lạc 30°C cấy bề mặt.
- [39] FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl, Wiley CJ, RD Allison, M Bittner, S Blackshaw, 2003, Unit 2.4 - Basic protocol - Preparation of Genomic DNA from Bacteria - *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
- [40] Pailan Santanu, Gupta Debdoot, Apte Snehal, Krishnamurthi Srinivasan, Saha Pradipta, 2015, Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhattai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, pp. 191-195.
- [41] Thi Hue Le, Quang Cuong Hoang, Dinh Duy Vu and Thi Hoai Thu Vo, 2021, Biodegradation of organophosphorus insecticide methyl parathion by soil microorganisms, *E3S Web of Conferences*.