



GIA TĂNG TỐC ĐỘ PHÂN HỦY SINH HỌC HOẠT CHẤT PROPOXUR TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÔNG BẰNG VI KHUẨN *Paracoccus* SP. P23-7 CỐ ĐỊNH TRONG BIOCHAR

Nguyễn Khởi Nghĩa¹, Đỗ Hoàng Sang¹, Nguyễn Thị Kiều Oanh¹, Lâm Tử Lăng¹ và Dương Minh Viễn¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/12/2014

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

Title:

Enhancement of Propoxur biodegradation rate in liquid medium by *Paracoccus* sp. P23-7 immobilized in biochar

Từ khóa:

Biochar, sự cố định, vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7, phân hủy sinh học, Propoxur và dung dịch nuôi cấy

Keywords:

Biochar, immobilization, *Paracoccus* sp. P23-7, biodegradation, Propoxur, liquid culture

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effectiveness of different inoculation approaches in enhancing the biodegradation of the pesticide Propoxur in the liquid medium. Inoculation was conducted with the *Paracoccus* sp. P23-7 originally isolated from Propoxur contaminated soil as the key degrader organism. The bacterial strain was applied either via liquid medium or immobilized on solid municipal waste biochar. Bacterial cell numbers as well as Propoxur biodegradation measurement in liquid medium were used to investigate the bioaugmentation efficiency of the different approaches. *Paracoccus* sp. P23-7 cell numbers increased about 1.1-2.0 times during the incubation process in both inoculation approaches, indicating that the strain could survive and develop well in the new liquid medium. However, the bacterial cell numbers in both biochar supplement treatments were much higher than that in the treatment received only free cells of *Paracoccus* sp. P23-7. Liquid medium inoculated with the *Paracoccus* sp. P23-7 immobilized on biochar from the beginning of the experiment showed the highest Propoxur degradation rate per day, whereas the other inoculum approaches showed an increased but lower contaminant biodegradation. Thus, results indicated that the application of a key degrader-biochar-complex is the most promising approach for an accelerated biodegradation of organic chemicals in liquid medium.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả của một số phương pháp chủng vi khuẩn khác nhau lên khả năng phân hủy sinh học hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường lỏng. Vi khuẩn phân hủy chuyên biệt Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 được phân lập từ mẫu đất nhiễm Propoxur, được chủng vào môi trường nuôi cấy. Vi khuẩn được chủng vào môi trường qua hai dạng: 1) dạng vi khuẩn tự do trong dung dịch và 2) dạng vi khuẩn cố định trong biochar. Mật số vi khuẩn và nồng độ Propoxur được theo dõi theo thời gian thí nghiệm. Tổng mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 ở tất cả các nghiệm thức có chủng vi khuẩn tăng từ 1,1-2,0 lần trong thời gian thí nghiệm so với mật số ban đầu. Điều này chứng tỏ vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 có khả năng tồn tại và phát triển tốt trong môi trường lỏng mới. Tuy nhiên, mật số vi khuẩn ở hai nghiệm thức bổ sung biochar cao hơn rất nhiều so với nghiệm thức chủng *Paracoccus* sp. P23-7 dạng tự do. Môi trường lỏng chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar thể hiện tốc độ phân hủy Propoxur cao nhất, trong khi các phương pháp chủng khác có tốc độ phân hủy Propoxur thấp hơn. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này cho phép kết luận rằng, việc ứng dụng một thể phức hợp gồm biochar và dòng vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất nông được là phương pháp triển vọng nhất trong gia tăng tốc độ phân hủy sinh học đối với độc chất hữu cơ trong môi trường lỏng.

1 GIỚI THIỆU

Biochar được định nghĩa như là một sản phẩm giàu carbon thu được từ quá trình đốt vật liệu hữu cơ gồm: gỗ, phân chuồng, hoặc xác bã thực vật trong một hệ thống kín rất ít không khí (Lehmann và Joseph, 2009). Người dân bản địa vùng Amazon đã áp dụng những phương pháp như: rải xác bã thực vật sau mỗi mùa vụ lên trên mặt đất, sau đó đốt thành than, lấy tro hoặc than sau khi đốt bón cho đất canh tác nông nghiệp giúp tăng chất lượng đất (Steiner và *ctv.*, 2009). Biochar thường được sản xuất trong điều kiện nhiệt độ được kiểm soát và chứa một lượng rất ít khí oxy, sau đó, biochar được bón vào trong đất. Hiện tại biochar được xem như một công cụ quản lý đất canh tác do nó có thể lưu tồn trong đất trong thời gian rất lâu dưới dạng carbon cố định trong đất rất bền vững và rất khó bị phân hủy bởi yếu tố sinh học cũng như phi sinh học theo thời gian, giúp mang lại hiệu quả kinh tế và môi trường (Ippolito và *ctv.*, 2012).

Đất bổ sung biochar được chứng minh là có khả năng giữ ẩm tốt, gia tăng khả năng trao đổi cation (CEC), gia tăng khả năng hấp phụ của đất và gia tăng pH đất (Ishii và Kadoya, 1994). Biochar có thể tồn tại trong đất trong thời gian rất lâu kéo dài đến hàng ngàn năm, có khả năng chống lại sự phân hủy sinh hóa, tuy nhiên, khả năng bền vững trong đất của biochar tùy thuộc vào quy trình sản xuất (Lehmann và Gaunt, 2006). Vì vậy, việc bón biochar vào trong đất được ứng dụng trong nông nghiệp, quản lý chất thải, thu hồi nguồn carbon và xử lý đất ô nhiễm đang được phát triển rộng rãi trên thế giới (Uchenna và Kirk, 2013).

Mặc dù, lĩnh vực nghiên cứu ứng dụng biochar nhằm giải quyết vấn đề môi trường và xử lý ô nhiễm mới được thực hiện trong những năm gần đây, tuy nhiên một số kết quả đạt được rất khả quan. Biochar được chứng minh là có hiệu quả trong việc loại bỏ kim loại nặng trong đó có Cu, Fe, Ni, Pd, Cd và As là những kim loại nặng rất độc cho sức khỏe con người. Biochar có khả năng hấp phụ các kim loại nặng này, làm chúng không hữu dụng nữa, nên có tác dụng loại bỏ các kim loại nặng trong môi trường nước, trầm tích và đất. (Mohan và *ctv.*, 2007; Cao và *ctv.*, 2009; Sneath và *ctv.*, 2009; Uchimiyi và *ctv.*, 2010; Beesley và *ctv.*, 2010). Ngoài kim loại nặng, biochar còn hấp phụ hiệu quả độc chất có nguồn gốc từ thuốc bảo vệ thực vật và các độc chất hữu cơ khác trong môi trường đất, nước và trầm tích như: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Smernik, 2009), thuốc trừ cỏ atrazine và simazine (Zheng và *ctv.*,

2010), diuron (Yu và *ctv.*, 2006), acetochlor (Spokas và *ctv.*, 2009), terbutylazine (Wang và *ctv.*, 2010a), MCPA (Hiller và *ctv.*, 2007), thuốc trừ sâu chlorpyrifos và carbofuran (Yu và *ctv.*, 2009), fipronil (Yang và *ctv.*, 2010), và thuốc trừ bệnh pyrimethanil (Yu và *ctv.*, 2010).

Biochar còn có chức năng như là một giá thể của sự sống nhằm bảo vệ vi sinh vật khỏi sự tấn công của các sinh vật khác (Pleasant, 2000). Do đó, biochar được đề nghị sử dụng như là chất mang dùng cho việc chủng vi sinh vật có lợi vào trong đất trong đó có vi sinh vật phân hủy hiệu quả thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên, hiện nay có rất ít nghiên cứu được công bố về vai trò của biochar như là chất mang nhằm vào việc chủng vi sinh vật có lợi để xử lý đất bị ô nhiễm (Chen và *ctv.*, 2012). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá hiệu quả của biochar như là chất mang dùng để cố định vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 giúp gia tăng phân hủy sinh học hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng để làm cơ sở và nền tảng cho việc ứng dụng và xử lý đất ô nhiễm với Propoxur.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Biochar và cách chuẩn bị biochar cho thí nghiệm

Biochar rác đô thị được dùng trong nghiên cứu này vì theo kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong biochar rác đô thị cao hơn trong các biochar thử nghiệm khác trong môi trường nuôi cấy lỏng (Nguyễn Khởi Nghĩa và *ctv.*, 2015). Biochar rác đô thị được cung cấp từ công ty sản xuất Biochar tại thành phố Hồ Chí Minh (Vina Energy Group). Trước khi sử dụng, biochar được tách ra thành những mảnh nhỏ bằng chày và được sàng qua rây có kích thước 2 x 2 mm. Sau đó, rửa sạch biochar với nước khử khoáng bằng cách cho biochar đã qua rây vào bình tam giác 500 mL chứa 250 mL nước khử khoáng, lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 100 rpm. Thay nước khử khoáng sau mỗi 8 giờ. Lặp lại quy trình rửa biochar đến khi biochar sạch hoàn toàn (không làm đen màu nước khử khoáng khi lắc trên máy lắc). Mục đích của việc rửa biochar trước khi bố trí thí nghiệm là nhằm loại bỏ màu đen của biochar khi cho vào trong nước và giúp cho việc quan sát sự phát triển vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng ở nghiệm thức bổ sung biochar dễ dàng hơn. Biochar sau khi rửa sạch với nước khử khoáng được sấy khô kiệt ở 105°C qua đêm. Cân 1,5 g trọng lượng khô của biochar vào đĩa petri thủy tinh, đem tiệt trùng trong nồi hấp tiệt trùng ở

121°C trong 20 phút. Sau khi tiệt trùng, đĩa petri chứa biochar được sấy khô lần nữa ở 105°C trong hai giờ. Biochar đã sẵn sàng cho bố trí thí nghiệm.

2.2 Nguồn vi khuẩn

Dòng vi khuẩn phân hủy chuyên biệt và rất hiệu quả thuốc trừ sâu Propoxur, với tên định danh là *Paracoccus* sp. P23-7, phân lập từ mẫu đất trong kho bảo quản hành tím tại khu vực canh tác hành tím ở Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng (Đỗ Hoàng Sang, 2014) được chọn cho bố trí thí nghiệm. Trước tiên vi khuẩn được nuôi trong bình tam giác 100 mL chứa 25 mL dung dịch giàu dinh dưỡng (glucose yeast extract) trong 3 ngày trên máy lắc với tốc độ 100 rpm. Thành phần của môi trường GYM trong 1 L dung dịch bao gồm: 10 g glucose và 10 g yeast extract. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trên máy ly tâm. Lặp lại 4 lần việc rửa sinh khối vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng nhằm loại bỏ hoàn toàn dinh dưỡng và nguồn carbon còn sót lại trong môi trường nuôi cấy. Hiệu chỉnh độ đục của dung dịch chứa vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng bằng máy đo quang phổ về OD 600 nm = 0,7 ($0,20 \times 10^6$ CFUs/mL). Nguồn vi khuẩn đã sẵn sàng cho bố trí thí nghiệm. Xác định mật số vi khuẩn ban đầu sau khi hiệu chỉnh độ đục bằng phương pháp nhỏ giọt (Hoben và Somasegaran, 1982): tiến hành pha loãng dung dịch vi khuẩn theo hệ số 10 với các nồng độ pha loãng khác nhau. Hút 50 μ L dung dịch vi khuẩn của mỗi nồng độ pha loãng và nhỏ 5 giọt lên trên bề mặt môi trường TSB. Môi trường Tryptose Soybean Broth (TSB) gồm: 30g Tryptose Soybean Broth và 15g agar pha trong một lít nước cất. Các đĩa môi trường TSB chứa vi khuẩn được đặt vào túi nylon và ủ trong tủ ủ ở nhiệt độ 35°C trong ba ngày, sau đó, đếm mật số khuẩn lạc.

2.3 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện phòng thí nghiệm theo quy trình như sau: bình tam giác 100 mL chứa 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu chứa 40 ppm Propoxur (sản phẩm của Dr. Ehrenstorfer GmbH, Đức), 1 mL dung dịch vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 đã được chuẩn bị sẵn (mục 2.2) ($0,20 \times 10^6$ CFUs/mL) và 1,5 g biochar đã chuẩn bị sẵn (mục 2.1) ($0,22 \times 10^6$ CFUs/g biochar). Thành phần của môi trường khoáng tối thiểu trong 1 L dung dịch như sau: 3,75 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 , 0,25 g NaCl, 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 0,01 g $CaCl_2 \cdot H_2O$. Môi trường được khử trùng ở 121°C, 20 phút trong nồi hấp tiệt trùng sau đó bổ sung 10

mL dung dịch vi lượng. Thành phần vi lượng trong 1 L dung dịch như sau: 10 mg $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$, 25 mg H_2BO_3 , 15 mg $ZnCl_2$, 5 mg $CuCl_2$, 10 mg $FeCl_3$. Dung dịch vi lượng được lọc với màng lọc tiệt trùng (Minisart NY 25, Sartorius Stedim Biotech, GmHbH, Germany, đường kính 0,20 μ m). Thí nghiệm được thực hiện với 4 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức và được kéo dài trong 18 ngày. Tổng cộng có 5 nghiệm thức trong thí nghiệm và được liệt kê như sau:

1. Đối chứng, không chủng vi khuẩn
2. Đối chứng, không chủng vi khuẩn + 1,5 g biochar
3. Chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do ($0,20 \times 10^6$ CFUs/mL)
4. Chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do ($0,20 \times 10^6$ CFUs/mL) + 1,5 g biochar
5. Chủng 1,5 g biochar chứa sẵn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7

Ghi chú: Quy trình chuẩn bị biochar chứa vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cho nghiệm thức 5 như sau: 1,5 g biochar được cho bình tam giác tiệt trùng 100 mL chứa 24 mL dung dịch khoáng tối thiểu bổ sung 40 ppm Propoxur và 1 mL dung dịch vi khuẩn (đã được chuẩn bị ở mục 2.2) và được nuôi cấy 4 ngày trước khi bố trí thí nghiệm trên máy lắc với tốc độ 90 rpm trong tối. Vào thời điểm bố trí thí nghiệm, toàn bộ 1,5 g biochar đã chứa vi khuẩn được chuyển qua bình tam giác mới. Tuy nhiên, trước khi cho vào bình tam giác mới, biochar được rửa sạch nhằm loại bỏ vi khuẩn *Papacoccus* sp. P23-7 tự do không bị cố định bởi biochar. Quy trình rửa như sau: ngâm 1,5 g biochar trong 10 phút với nước khử khoáng tiệt trùng trong đĩa petri tiệt trùng, dùng kẹp tiệt trùng để rửa sạch biochar trong nước. Sau đó, thay nước khử khoáng tiệt trùng mới, tiếp tục lặp lại quy trình rửa biochar thêm 4 lần nữa.

2.4 Chỉ tiêu theo dõi

Tổng mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy (trong 25 mL môi trường nuôi cấy lỏng hoặc trong 25 mL môi trường nuôi cấy lỏng + trong 1,5 g biochar) và nồng độ hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng vào các thời điểm: 0, 1, 2, 3 và 11 ngày sau khi nuôi cấy.

Tham khảo mục 2.2 cho quy trình đếm mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng.

Quy trình đếm mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar được thực hiện như sau: Tại thời điểm thu mẫu, lấy 0,1 g biochar (trọng lượng khô) trong bình tam giác nuôi cấy chia làm hai phần dưới điều kiện tiệt trùng: 0,05 g biochar dùng cho việc xác định ẩm độ biochar cho phân tích toán số liệu, phần còn lại với trọng lượng 0,05 g dùng cho việc đếm mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar. Phần biochar này được rửa sạch với nước khử khoáng tiệt trùng (xem mục 2.3 cho quy trình rửa biochar để loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do không bị cố định bởi biochar). Sau đó, cho biochar đã rửa sạch vào trong ống Eppendorf 2 mL tiệt trùng, nghiền nhuyễn biochar bằng đũa thủy tinh tiệt trùng, hút 1 ml buffer phosphate tiệt trùng vào trong ống Eppendorf 2 mL chứa biochar đã nghiền, vortex trong 1 phút, pha loãng và chà trên đĩa agar TSB, đem ủ trong tủ cấy ở 30°C trong 3 ngày. Sau đó, đếm mật số vi khuẩn hiện diện trên đĩa. Thành phần 1 lít buffer phosphate như sau: 23,99 g NaH_2PO_4 và 15,59 g Na_2HPO_4 trong 1 lít nước khử khoáng.

Quy trình đo nồng độ Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography, viết tắt là HPLC) như sau: Vào thời điểm thu mẫu, hút 1mL môi trường nuôi cấy lỏng cho vào Eppendorf 2 mL, sau đó, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Hút lấy phần nước nằm bên trên cho vào lọ thủy tinh 1 mL và được đo trên máy HPLC (Shimazu-LC20A) với các thông số như sau: Sử dụng cột C18, tỷ lệ pha động acetonitrile:nước tương ứng là 45:55, bước sóng 214 nm, lưu lượng của pha động 100 μL /phút, thời gian xác định phổ của hoạt chất Propoxur ở phút thứ 7,5.

2.5 Xử lý số liệu

Số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm được tổng hợp, tính toán bằng phần mềm Excel và kiểm định thống kê với ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.2.

3 KẾT QUẢ

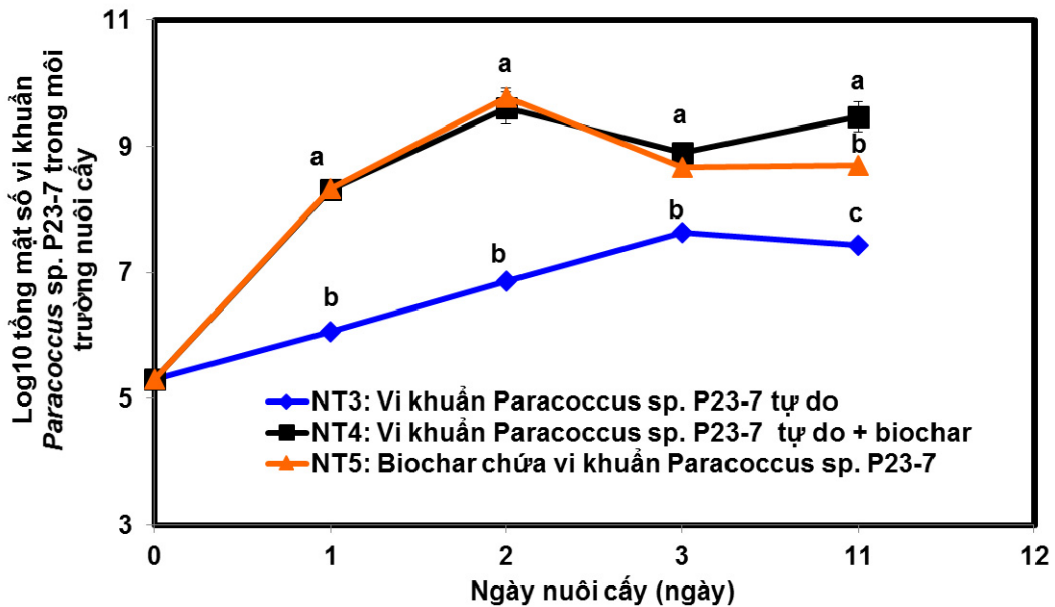
3.1 Sự phát triển tổng mật số vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy

Kết quả về sự phát triển tổng mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng của các nghiệm thức theo thời gian nuôi cấy được trình bày trong Hình 1. Tổng mật số vi khuẩn

Paracoccus sp. P23-7 ở hai nghiệm thức bổ sung biochar có xu hướng tăng nhanh trong giai đoạn từ 0 đến 2 ngày sau khi nuôi cấy, sau đó mật số giảm dần theo thời gian. Ở hai nghiệm thức này, tổng mật số vi khuẩn ở các thời điểm thu mẫu cao hơn gấp 1,5–2,0 lần so với tổng mật số vi khuẩn vào thời điểm bắt đầu bố trí thí nghiệm. Trong khi đó, ở nghiệm thức không bổ sung biochar, tổng mật số vi khuẩn trong 25 mL dung dịch nuôi cấy tăng chậm và đạt đỉnh cao nhất vào ngày thứ 3 sau khi bố trí thí nghiệm, sau đó, tổng mật số vi khuẩn giảm xuống theo thời gian nuôi cấy. Ở nghiệm thức này, tổng mật số vi khuẩn ở các thời điểm thu mẫu cao hơn gấp 1,1 - 1,4 lần so với tổng mật số vi khuẩn vào thời điểm bắt đầu bố trí thí nghiệm. Khi so sánh tổng mật số vi khuẩn giữa các nghiệm thức với nhau vào các thời điểm thu mẫu cho thấy, tổng mật số vi khuẩn ở hai nghiệm thức: Biochar chứa vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 từ ban đầu và nghiệm thức *Paracoccus* sp. P23-7 tự do có bổ sung biochar cao hơn và khác biệt thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức *Paracoccus* sp. P23-7 tự do không bổ sung biochar ở tất cả các thời điểm thu mẫu. Kết quả này cho thấy biochar đã giúp gia tăng sự phát triển mật số vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng. Điều này có thể giải thích là do biochar đã có khả năng làm gia tăng pH môi trường nuôi cấy (Aciego và Brookes, 2008), sự gia tăng pH môi trường đã giúp gia tăng mật số vi khuẩn, hoặc cũng có thể chính biochar đã cung cấp một lượng dinh dưỡng thiết yếu, đặc biệt là một số nguyên tố vi lượng như: Mo và Bo, giúp cho vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 sinh trưởng và phát triển tốt hơn, hoặc có thể biochar đã có khả năng hấp thu hay cô đặc dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy, điều này giúp cho vi khuẩn cố định trong biochar dễ dàng tiếp cận với nguồn dinh dưỡng này (Treseder và Allen, 2002).

Khi so sánh hai nghiệm thức bổ sung biochar với nhau cho thấy cả hai không khác biệt thống kê về tổng mật số vi khuẩn (trong 25 mL môi trường nuôi cấy và trong 1,5 g biochar) vào các thời điểm thu mẫu, ngoại trừ vào thời điểm 11 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tóm lại, biochar rác đô thị có khả năng cố định tốt vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng và biochar rác đô thị giúp gia tăng tổng mật số *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy.



Hình 1: Sự phát triển tổng mật số vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng giữa các nghiệm thức

* Lưu ý: Các chữ số hiển thị khác biệt thống kê trong hình chỉ dùng để so sánh các số liệu giữa các nghiệm thức với nhau trong cùng 1 ngày lấy mẫu, không so sánh các ngày lấy mẫu khác nhau trong cùng một nghiệm thức (n=4, độ lệch chuẩn)

3.2 Nồng độ hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng giữa các nghiệm thức theo thời gian nuôi cấy

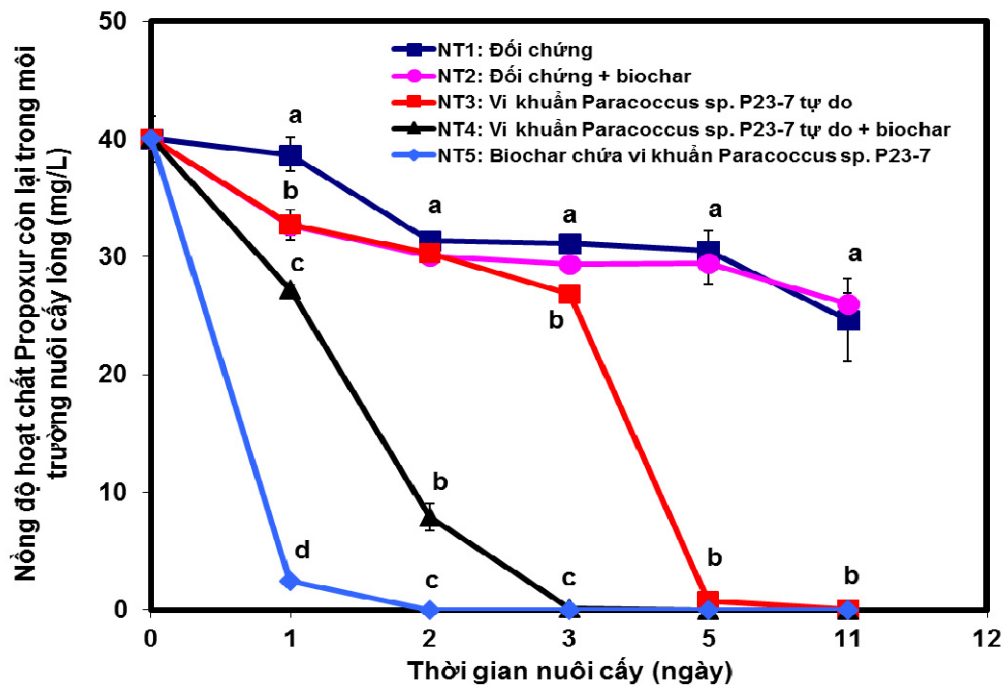
Khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng của các nghiệm thức được trình bày trong Hình 2. Nhìn chung, nồng độ Propoxur ở tất cả các nghiệm thức có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi cấy, kể cả nghiệm thức đối chứng. Nồng độ hoạt chất Propoxur trong hai nghiệm thức đối chứng không chứa vi khuẩn được giải thích là do Propoxur có thể bị thủy phân (1,5%/ngày) trong môi trường nước có pH =7 (Hartley và Kidd, 1983). Nồng độ Propoxur của hai nghiệm thức đối chứng (có bổ sung biochar và không bổ sung biochar) tương đối bằng nhau, không khác biệt nhau ở tất cả các thời điểm thu mẫu. Điều này cho thấy biochar đã không hấp phụ Propoxur lên trên bề mặt hoặc bên trong các lỗ hổng của nó. Bên cạnh đó, nồng độ Propoxur còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng của hai nghiệm thức đối chứng ở tất cả các thời điểm thu mẫu đều cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 3 nghiệm thức có chứa vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7. Điều này cho thấy dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 thật sự là dòng vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur.

Khi so sánh ba nghiệm thức chủng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 (nghiệm thức 3, nghiệm thức 4 và nghiệm thức 5) với nhau về khả năng phân hủy Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng cho thấy, ở tất cả các thời điểm thu mẫu nồng độ Propoxur còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng ở 3 nghiệm thức được xếp hạng như sau: nghiệm thức 5: Biochar chứa dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 < nghiệm thức 4: Dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do + biochar < nghiệm thức 3: Dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do. Nồng độ Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng bị phân hủy hoàn toàn ở ba nghiệm thức 5, 4 và 3 lần lượt sau: 2, 3 và 5 ngày sau khi nuôi cấy. Đặc biệt khi so sánh hai nghiệm thức 3 và 4 với nhau cho thấy như sau: mặc dù hai nghiệm thức này có cùng điều kiện thí nghiệm và mật số vi khuẩn ban đầu như nhau, nhưng nghiệm thức có bổ sung biochar dẫn đến tốc độ phân hủy Propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng (nghiệm thức 4) xảy ra nhanh hơn so với nghiệm thức không bổ sung biochar (nghiệm thức 3). Kết quả này cho thấy vi khuẩn phân hủy chuyên biệt Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 có khả năng gia tăng tốc độ phân hủy hoạt chất Propoxur trong môi trường lỏng khi bị cố định trong biochar. Nghiệm thức 4: vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do + biochar có tốc độ

phân hủy Propoxur thấp hơn so với nghiệm thức 5: Biochar chứa vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 có thể là do ở nghiệm thức 4, vi khuẩn cần phải có một khoảng thời gian nhất định để được cố định trong biochar và sau đó tiến trình phân hủy Propoxur mới bắt đầu xảy ra, trong khi ở nghiệm thức 5, vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 đã được cố định sẵn từ ban đầu, do đó, khi được chủng vào môi trường nuôi cấy thì tiến trình phân hủy hoạt chất Propoxur có thể xảy ra ngay lập tức. Việc bổ sung biochar giúp gia tăng tốc độ phân hủy hoạt chất Propoxur của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy lỏng so với nghiệm thức không bổ sung biochar có thể được giải thích là do khi vi khuẩn phân hủy chuyên biệt hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur bị cố định trong biochar có thể tạo ra một hệ vi sinh vật sống cộng sinh với nhau, điều này giúp chúng tạo ra một lực tổng hợp gồm tất cả các vi khuẩn cố định trong biochar lại với nhau dùng để lấy Propoxur tự do

trong môi trường lỏng mạnh hơn so với lực riêng lẻ của từng tế bào vi khuẩn, do đó, dòng di chuyển của Propoxur trong môi trường lỏng đến biochar chứa vi khuẩn cố định nhanh hơn so với sự di chuyển của Propoxur đến từng vi khuẩn riêng lẻ sống tự do trong môi trường nuôi cấy lỏng và điều này được chứng minh bởi Grundmann và ctv (2007). Ngoài ra, vi khuẩn cố định trong biochar có thể đã hình thành biofilm, giúp bảo vệ chúng sống sót tốt hơn trong những điều kiện bất lợi của môi trường như thiếu dinh dưỡng, thay đổi pH hoặc những nhân tố khác (Wang và ctv, 2010b).

Tóm lại, biochar rác đô thị có chức năng như là chất mang giúp cố định và bảo vệ vi khuẩn phân hủy hoạt chất Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7. Vi khuẩn cố định trong biochar có khả năng gia tăng tốc độ phân hủy đối với Propoxur so với vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do trong môi trường nuôi cấy.



Hình 2: Nồng độ hoạt chất Propoxur còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng giữa các nghiệm thức theo thời gian nuôi cấy

* Lưu ý: Các chữ số hiển thị khác biệt thống kê trong hình chỉ dùng để so sánh các số liệu giữa các nghiệm thức với nhau trong cùng 1 ngày lấy mẫu, không so sánh các ngày lấy mẫu khác nhau trong cùng một nghiệm thức (n=4, độ lệch chuẩn)

4 KẾT LUẬN

Biochar rác đô thị có khả năng cố định vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường lỏng, đồng thời, biochar

còn giúp gia tăng tổng mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường nuôi cấy.

Biochar rác đô thị không có khả năng hấp phụ hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur. Biochar rác đô

thị chứa vi khuẩn phân hủy chuyên biệt Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 cố định từ ban đầu giúp gia tăng tốc độ phân hủy và giảm thời gian lưu tồn hoạt chất Propoxur trong môi trường lỏng.

Biochar rác đô thị có chức năng như là chất mang hữu hiệu giúp bảo vệ vi khuẩn sống sót trong điều kiện bất lợi của môi trường và được ứng dụng trong xử lý sinh học đất ô nhiễm với hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beesley, L., Moreno-Jimenez, E., Gomez-Eyles, J.L., 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution* 158, 2282-2287.
2. Cao, X.D., Ma, L.N., Gao, B., Harris, W., 2009. Dairy manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine. *Environmental Science & Technology* 43, 3285-3291.
3. Chen, B., Yuan, M and Qian, L., 2012. Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residues and biochar as carriers. *Journal of Soil and Sediments*. DOI 10.1007/s11368-012-0554-5.
4. Đỗ Hoàng Sang., 2014. Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur của dòng vi khuẩn phân lập từ nền đất bảo quản hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Luận văn tốt nghiệp đại học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.
5. Grundmann, S., Fuß, R., Schmid, M., Laschinger, M., Ruth, B., Schulin, R., Munch, J.C., Schroll, R., 2007. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* 68, 511-517.
6. Hartley, D. and Kidd, H., 1983. *The Agrochemicals Handbook*. Nottingham, England: Royal Society of Chemistry.
7. Hiller, E., Fargasova, A., Zemanova, L., Bartal, M., 2007. Influence of wheat ash on the MCPA immobilization in agricultural soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 478-481.
8. Ippolito, J.A., Laird, D.A., Busscher, W.J., 2012. Environmental benefits of biochar. *Journal of Environmental Quality* 41, 967-972.
9. Ishii, T., Kadoya, K., 1994. Effects of charcoal as a soil conditioner on citrus growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal development. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 63, 529-535.
10. Lehmann, J., Gaunt, J., Rondon, M., 2006. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems—A review. *Journal of Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 11, 403-427.
11. Mohan, D., Pittman, C.U., Bricka, M., Smith, F., Yancey, B., Mohammad, J., Steele, P.H., Alexandre-Franco, M.F., Gomez-Serrano, V., Gong, H., 2007. Sorption of arsenic, cadmium, and lead by chars produced from fast pyrolysis of wood and bark during bio-oil production. *Journal of Colloid and Interface Science* 310, 57-73.
12. Pleasant, B., 2000. Make biochar-This ancient technique will improve our soils. <http://www.motherearthnews.com/Organic-Gardening/Make-Biochar-To-Improve-Your-Soil.aspx>.
13. Smernik, R.J., 2009. Biochar and sorption of organic compounds (Chapter 16). In: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), *Biochar for environmental management: Science and Technology*. Earthscan, London, UK, p. 289.
14. Spokas, K.A., Koskinen, W.C., Baker, J.M., Reicosky, D.C., 2009. Impacts of woodchip biochar additions on greenhouse gas production and sorption/degradation of two herbicides in a Minnesota soil. *Chemosphere* 77, 574-581.
15. Treseder, K.K., Allen, M.F., 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* 155, 507-515.
16. Uchenna, O., Kirk, T.S., 2013. Impact of Biochar on Organic Contaminants in Soil: A Tool for Mitigating Risk?-A review. *Journal of Agronomy* 3, 349-375. www.mdpi.com/journal/agronomy.
17. Uchimiya, M., Lima, I.M., Klasson, K.T., Chang, S.C., Wartelle, L.H., Rodgers, J.E., 2010. Immobilization of heavy metal ions (Cu-II, Cd-II, Ni-II, and Pb-II) by broiler litter-derived biochars in water and soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 5538-5544.

18. Wang, F., Dörfler, U., Schmid, M., Fischer, D., Kinzel, L., Scherb, H., Munch, J.C., Jiang, X., Schroll, R., 2010. Homogeneous inoculation vs. microbial hot spots of isolated strain and microbial community: What is the most promising approach in remediating 1,2,4-TCB contaminated soils?. *Journal of Soil Biology and Biochemistry* 42, 331–336.
19. Wang, H.L., Lin, K.D., Hou, Z.N., Richardson, B., Gan, J., 2010a. Sorption of the herbicide terbuthylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars. *Journal of Soils and Sediments* 10, 283-289.
20. Yu, X., Ying, Y., Kookana, R.S., 2006. Sorption and desorption behaviors of diuron in soils amended with charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8545.
21. Yu, X.Y., Pan, L.G., Ying, G.G., Kookana, R.S., 2010. Enhanced and irreversible sorption of pesticide Pyrimethanil by soil amended with biochars. *Journal of Environmental Sciences China* 22, 615-620.
22. Zhang, H.H., Lin, K.D., Wang, H.L., Gan, J., 2010. Effect of *Pinus radiata* derived biochars on soil sorption and desorption of phenanthrene. *Environmental Pollution* 158, 2821-2825.
23. Zheng, W., Guo, M.X., Chow, T., Bennett, D.N., Rajagopalan, N., 2010. Sorption properties of greenwaste biochar for two triazine pesticides. *Journal of Hazardous Materials* 181, 121-126.