

**PBỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**NGUYỄN VĂN LỆ
MSNCS: P000027**

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ
NĂNG PHÂN HỦY DIAZINON TRONG CÁC MÔ HÌNH
CANH TÁC LUÂN CANH LÚA-MÀU VÀ CHUYÊN MÀU Ở
MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ
NGÀNH VI SINH VẬT HỌC
MÃ NGÀNH: 62 42 01 07**

2017

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

NGUYỄN VĂN LỆ

MSNCS: P000027

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ
NĂNG PHÂN HỦY DIAZINON TRONG CÁC MÔ HÌNH
CANH TÁC LUÂN CANH LÚA-MÀU VÀ CHUYỀN MÀU Ở
MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGÀNH VI SINH VẬT HỌC

MÃ NGÀNH: 62 42 01 07

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

Hướng dẫn chính: Ts. DƯƠNG MINH VIỄN

Hướng dẫn phụ: PGs.Ts. TRẦN NHÂN DŨNG

2017

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn:

Thầy TS. Dương Minh Viễn và Thầy PGS. TS. Trần Nhân Dũng đã dành thời gian quý báu tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận án

Chân thành cảm ơn quý Thầy Cô giảng dạy chương trình nghiên cứu sinh chuyên ngành Vi sinh vật học, trường Đại học Cần Thơ đã truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong thời gian học tập.

Xin cảm ơn cán bộ phòng thí nghiệm Sinh Học Đất của Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án.

Cám ơn gia đình và tất cả bạn bè đã động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và thời gian thực hiện đề tài!

Tác giả

Nguyễn Văn Lẹ

TÓM TẮT

Nông dược hữu cơ thường có xu hướng lưu tồn lâu dài trong hệ sinh thái, trong sinh quyển và thường gây độc cho con người và môi trường. Diazinon đã cấm sử dụng đối với nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, nông dân vẫn sử dụng thuốc trừ sâu chứa hoạt chất Diazinon để phòng trừ dịch hại cây trồng. Nhiều nghiên cứu về phân hủy sinh học Diazinon trong đất ở các vùng ôn đới, nhưng chưa có nghiên cứu về giảm thiểu ô nhiễm Diazinon trong đất vùng nhiệt đới bằng con đường sinh học. Vì thế đề tài được thực hiện nhằm các mục tiêu:

(1) phân lập và khảo sát khả năng phân hủy hoạt chất Diazinon của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập từ các mẫu đất được thu từ ruộng canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu ở ĐBSCL.

(2) đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH, nguồn carbon, nồng độ Diazinon đến sự gia tăng mật độ vi khuẩn và tốc độ phân hủy Diazinon của một số chủng vi khuẩn tuyển chọn.

(3) xác định ảnh hưởng của cơ cấu cây trồng lên khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon ở điều kiện thực tế ngoài đồng ruộng và trong điều kiện nhà lưới.

(4) xác định sự ảnh hưởng của cơ cấu cây trồng lên cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn trong điều kiện nhà lưới.

Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon từ các mẫu đất bằng phương pháp làm giàu mật độ vi khuẩn, trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm và tách dòng trên môi trường TSA. Xác định khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn bằng phương pháp theo dõi hàm lượng Diazinon còn lại sau 30 ngày nuôi ủ. Các dòng vi khuẩn phân hủy diazison, được định danh dựa vào trình tự gen 16Sr RNA so sánh với các trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn trên NCBI và đặc điểm sinh hóa. Xây dựng cây phả hệ mối quan hệ di truyền của các dòng vi khuẩn bằng phương pháp Maximun-Likelihood. Sự thay đổi của cấu trúc tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon, được xác định bằng kỹ thuật điện di biến tính tăng cấp (DGGE).

Trên mô hình chuyên màu, tổng số có 21 mẫu đất được thu tại một số địa điểm ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả bố trí thí nghiệm cho thấy có 10 tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả, giảm từ 14,3% đến 37,9% sau 14 nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu. Kết quả phân lập được 87 dòng vi khuẩn, trong đó có 15 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ

sung Diazinon có nồng độ 20 ppm. Tuy nhiên, chỉ có 4 dòng vi khuẩn ký hiệu HA7.4, TA3.2, TA4.17 và HA7.1 có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon hiệu quả, giảm từ 15,4% đến 27,9% sau 30 ngày nuôi cấy. Mật độ của bốn dòng vi khuẩn này đạt cao nhất trong điều kiện môi trường nuôi cấy như sau: ở 30°C, pH 7, có bổ sung thêm nguồn TSB và ở nồng độ Diazinon dao động từ 20 ppm–50 ppm. Các dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả nhất ở nhiệt độ 30°C với tốc độ phân hủy dao động từ 0,55-0,94%/ngày, pH 6-7 với tốc độ phân hủy từ 0,50-0,94%/ngày, ở nồng độ Diazinon 20 ppm với tốc độ phân hủy từ 0,56-0,93%/ngày và với mật độ vi khuẩn ban đầu đạt 10⁶ CFU/mL có tốc độ phân hủy 0,60-0,98%/ngày.

Trên mô hình canh tác luân canh lúa–màu, tổng số có 20 mẫu đất được thu tại một số địa điểm ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 13 tổ hợp vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy Diazinon, giảm từ 17,6% đến 97,8% sau 14 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, 27 trong tổng số 109 chủng vi khuẩn phân lập từ 13 tổ hợp vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm. Tuy nhiên, chỉ có 2 dòng vi khuẩn ký hiệu CL36_M4 và BT4_L1 phân hủy hiệu quả Diazinon lần lượt là 20,9% và 29,3% sau 30 ngày nuôi cấy. Mật độ của hai dòng vi khuẩn CL36_M4 và BT4_L1 đạt cao nhất ở điều kiện môi trường như: 30°C, pH 7, môi trường nuôi cấy bổ sung TSB và nồng độ Diazinon từ 20–50 ppm. Hai dòng vi khuẩn CL36_M4 và BT4_L1, phân hủy Diazinon hiệu quả nhất ở điều kiện môi trường như 30°C với tốc độ phân hủy từ 0,70-1,03 %/ngày, pH 7 với tốc độ phân hủy dao động từ 0,72-1,02 %/ngày, ở nồng độ Diazinon 20 ppm với tốc độ phân hủy từ 0,67-0,97 %/ngày và với mật độ vi khuẩn chủng vào ban đầu ở 10⁶ CFU/mL cho tốc độ phân hủy từ 0,74-1,18 %/ngày.

Dòng vi khuẩn HA7.1 thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả trong môi trường đất dưới điều kiện phòng thí nghiệm sau 30 ngày nuôi ủ. Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn HA7.1 làm giảm hàm lượng Diazinon và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức 4: Đất không tiệt trùng và bổ sung vi khuẩn HA7.1 có hàm lượng Diazinon giảm mạnh hơn so với nghiệm thức 2: Đất tiệt trùng và bổ sung vi khuẩn HA7.1, giảm tương ứng là 63,7% với tốc độ phân hủy Diazinon 2,11%/ngày và 48,6% với tốc độ 1,62%/ngày.

Trên mô hình luân canh lúa màu ngoài đồng ruộng, cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn hiếu khí phân hủy Diazinon trong đất vào vụ màu chứa 3 nhóm vi khuẩn khác nhau, trong khi vụ lúa chỉ chứa 2 nhóm vi khuẩn. Trong điều kiện nhà lưới, trên mô hình chuyên màu cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon trong đất được phân tách thành 6 nhóm vi khuẩn khác nhau. Trong mô hình luân canh lúa-màu cho thấy đất vụ

màu có chứa 4 nhóm vi khuẩn khác nhau, trong khi đất trong vụ lúa chứa 3 nhóm vi khuẩn khác nhau.

Kết quả giải mã trình tự gen 16S rRNA của sáu dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 cho thấy chúng lần lượt được định danh như là *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp. CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1.

Từ khóa: Tổ hợp vi khuẩn, chuyên màu, hệ thống luân canh lúa- màu, hoạt chất Diazinon, vi khuẩn phân hủy hoạt chất Diazinon.

SUMMARY

Organic agricultural pesticides are so stable in ecosystems and biosphere. These compounds affect human health and environment. Diazinon, a toxic substance, has been banned or restricted in most countries. However, some places farmers still continue using this substance in their farm as a pesticide to control the pest. Diazinon degrading bacteria have been extensively studied in temperate soils, but information on behaviour in tropical soils is limited.

The aim of this study was

(1) to isolate and characterize Diazinon degrading bacteria from upland crop-rice and continuous upland cropping system soils in the Mekong Delta of Vietnam.

(2) to specify the effects of temperature, pH, carbon sources and Diazinon concentration on the growth of some selected bacterial isolates, and to find out the optimal conditions of inoculation environment such as temperature, pH, inoculation density and Diazinon concentration to enhance the biodegradation rate of Diazinon.

(3) to evaluate the effects of two different cropping systems (continuous upland crop and upland crop-rice) on Diazinon degradation under greenhouse condition and in the actual fields.

(4) to test the effects of different cropping systems on the Diazinon degrading bacterial community structure under greenhouse condition.

The isolation of Diazinon degrading bacteria was performed with soil collected from continuous upland crop and upland crop-rice cropping systems. Soil bacteria were enriched in mineral salt medium solution containing 20 ppm Diazinon as the only carbon source for bacterial growth. Tryptic Soya Agar (TSA) was used for the step of purification of bacterial strains. Diazinon degrading bacteria were identified based on the sequencing of 16S rRNA gene, and these sequences were aligned with published sequences in NCBI BLAST nucleotide database and biochemical characteristics of bacteria. Then phylogenetic trees were established based on the 16S rRNA sequences by the Maximum-Likelihood method. The Diazinon degrading bacterial community structure analysis was examined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

Twenty one soil samples were collected from continuous upland crop cropping system in the Mekong Delta of Vietnam. Results showed that 10 out of 21 bacterial communities showed their degradation capacity toward Diazinon from 14.3% to

37.9% of the initially applied Diazinon concentration within 14 incubation days and percentage of the remained Diazinon in the liquid culture of these communities was significantly lower than that of the control treatment. Fifteen out of 87 bacterial strains which were isolated from these 6 bacterial communities showed a well growing capacity through the turbidity index in minimal salt medium containing 20 ppm of Diazinon. Four bacterial strains which were coded namely as HA7.4, TA3.2, TA4.17 and HA7.1 showed efficiently in degradation of Diazinon. The degradation capacity of these single strains varied from 15.4% to 27.9% of the initially applied Diazinon concentration in 30 incubation days and was significantly different from the control treatment.

The experiments were established under the laboratory conditions to test the effects of environmental conditions such as temperature, pH and carbon source on the growth of some selected strains in minimal salt medium in 5 days. Results showed that bacterial cell numbers were obtained at the highest numbers when grown under the conditions of 30°C, pH 7 of the medium (except the strain HA7.1 at pH 6), tryptic soya broth (TSB) as a carbon source and Diazinon concentration of 20 ppm-50 ppm. The tested bacterial strains showed their higher degradation of Diazinon when environmental conditions was at 30°C (the degradation rate of 0,55-0,94% day⁻¹), pH 6-7 (the degradation rate of 0,50-0,94% day⁻¹), the Diazinon concentration of 20 ppm (the degradation rate of 0,56-0,93% day⁻¹) and the ininitial inoculation density of 10⁶ CFU/mL (the degradation rate of 0,60-0,98% day⁻¹).

Twenty soil sample were collected from upland crop-rice cropping systems in the Mekong Delta of Vietnam. The results showed that 13 out of 20 bacterial communities showed their degrading capacity toward Diazinon. Degradation of Diazinon by these bacterial communities varied between 17,6% and 97,8% after 14 day of incubation. However, only 2 bacterial strains revealed good degradation for Diazinon, namely CL36_M4 and BT4_L1 and their degradation capacity was 20,9% and 29,3% of the initial applied concentration after 30 days of incubation, respectively. Two strains CL36_M4 and BT4_L1 achieved the highest cell numbers when grown under conditions of 30°C, pH 7 of the medium, TSB as a carbon source and Diazinon concentration of 20-50 ppm. These two bacterial strains showed their most effectiveness in degradation of Diazinon when grown under the environmental conditions of 30°C (the degradation rate of 0,70-1,03% day⁻¹), pH 7 (the degradation rate 0,72-1,02% day⁻¹), the Diazinon concentrations of 20 ppm (the degradation rate of

0,67-0,97% day⁻¹) and the initial inoculation density of 10⁶ CFU/mL (the degradation rate of 0,74-1,18% day⁻¹).

The bacterial strains HA7.1 showed its better degradation of Diazinon in soil, under the laboratory conditions within 30 incubation days. The concentration of Diazinon was reduced in treatments inoculated this strain and significantly higher than the control treatment. Treatments of non-sterilized soil in combination with HA7.1 inoculation degraded more Diazinon than that of sterilized soil, about 63,7% of the initially applied concentration (the degradation rate of 2,11% day⁻¹) and 48,6% (the degradation rate of 1,62% day⁻¹), respectively.

According to the numbers of bands showed on the profile of DGGE gels the Diazinon degrading bacterial community structure in upland crop cropping system had 3 bands whereas the continuous rice cropping system had only two bands. It means that the bacterial communities in the upland crop cropping system was more diversified than that of the continuous rice cropping system and similarly under the nethouse condition, the continuous upland crop cropping systems had six bands on the DGGE gel while the DGGE gel profiles of soil bacterial communities in the upland-rice crop rotation cropping system showed four bands and three bands for upland crop soil samples and rice crop soil samples, respectively. It means also that the bacterial communities in the upland crop cropping system was more diversified than that of the upland crop-rice rotation cropping systems.

According to 16s RNA gene sequencing of six Diazinon degrading bacterial strains, coded namely as HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 and BT4_L1, were identified as species of *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp. CL36_M4 and *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1, respectively.

Key words: *Bacterial communities, continuous upland crop cropping system, upland-rice crop rotation cropping system, Diazinon, Diazinon degrading bacteria.*

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của NCS. Nguyễn Văn Lẹ với sự hướng dẫn của thầy TS. Dương Minh Viễn và thầy PGS.TS. Trần Nhân Dũng. Các số liệu trong nghiên cứu này hoàn toàn trung thực và chưa được dùng cho bất cứ luận án cùng cấp nào khác.

Cần Thơ, ngày tháng năm 2017

Tác giả

Nguyễn Văn Lẹ

MỤC LỤC

Trang

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	XX
Chương 1: GIỚI THIỆU	1
1.1 Đặt vấn đề.....	1
1.2 Mục tiêu đề tài	3
1.3 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	3
1.4 Những đóng góp mới, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án	4
Chương 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
2.1 Tổng quan về thuốc bảo vệ thực vật.....	5
2.1.1 Định nghĩa thuốc bảo vệ thực vật.....	5
2.1.2 Phân loại thuốc bảo vệ thực vật.....	6
2.1.3 Vai trò của thuốc bảo vệ thực vật	8
2.1.4 Tác hại của thuốc bảo vệ thực vật.....	9
2.2 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới và ở Việt Nam	10
2.2.1 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới	10
2.2.2 Tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam.....	13
2.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lưu tồn thuốc bảo vệ thực vật trong đất và nước.....	14
2.3 Tổng quan về hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon.....	16
2.4 Tác hại của hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon	18
2.5 Động thái của thuốc trừ sâu Diazinon trong đất và nước	21
2.6 Phân hủy sinh học thuốc trừ sâu Diazinon.....	26
2.7 Hệ thống GC/MS	29
2.8 Sắc ký lỏng cao áp (HPLC).....	30
2.9 Phản ứng PCR và nhận diện vi khuẩn phân hủy Diazinon bằng phương pháp sinh học phân tử	31
2.10 Điện di biến tính DGGE.....	33
Chương 3: PHƯƠNG TIỆN, PHƯƠNG PHÁP VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	34
3.1. Phương tiện nghiên cứu	34
3.1.1 Thời gian và địa điểm tiến hành thí nghiệm.....	34
3.1.2 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm	34

3.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu.....	36
3.2.1 Khảo sát tình hình sử dụng thuốc trừ sâu có chứa hoạt chất Diazinon trên một số mô hình canh tác cây trồng ở ĐBSCL.....	36
3.2.2 Khảo sát ô nhiễm thuốc trừ sâu Diazinon. Khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon và ảnh hưởng của các mô hình canh tác lên lưu tồn thuốc Diazinon.	37
3.2.2.1 Khảo sát ô nhiễm thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.	37
3.2.2.2 Khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu tại Hòa An-Hậu Giang và Bình Tân-Vĩnh Long.....	37
3.2.2.3 Lưu tồn thuốc Diazinon mô hình canh tác luân canh lúa-màu (2 lúa-1 màu, 1 lúa- 2 màu) ngoài đồng ruộng	39
3.2.2.4 Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu trong điều kiện nhà lưới.	39
3.2.3 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn hiếu khí có khả năng phân hủy hiếu khí Diazinon từ mô hình canh tác lúa màu và chuyên màu.....	41
3.2.3.1 Phân lập vi khuẩn hiếu khí có khả năng phân hủy Diazinon từ mô hình canh tác luân canh lúa- màu và chuyên màu.	41
3.2.3.2 Đánh giá khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn phân lập được trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.....	44
3.2.4 Khảo sát sự ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả.....	46
3.2.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.....	46
3.2.4.2 Ảnh hưởng của pH đến mật độ của vi khuẩn	48
3.2.4.3 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ của vi khuẩn	49
3.2.4.4 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến mật độ của vi khuẩn	50
3.2.5 Khảo sát sự ảnh hưởng của một số nhân tố sinh thái đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả	52
3.2.5.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn	52
3.2.5.2 Ảnh hưởng của pH đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn.....	53
3.2.5.3 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn.....	55
3.2.5.4 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn.....	56

3.2.6	Đánh giá khả năng phân hủy Diazinon trong đất của dòng vi khuẩn HA7.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm	57
3.2.7	Định danh các chủng vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập từ đất được thu từ ruộng canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu	59
3.2.8	Phương pháp phân tích và xử lý số liệu	59
	Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	60
4.1	Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu Diazinon ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long.....	60
4.1.1	Cơ cấu các nhóm thuốc BTVT ở Đồng bằng sông Cửu Long.....	60
4.1.2	Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu Diazinon trên các mô hình canh tác (chuyên lúa, luân canh lúa-màu và chuyên màu) ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long.....	62
4.2	Ô nhiễm hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng ở Đồng bằng sông Cửu Long.....	66
4.3	Lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon.....	67
4.3.1	Lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng tại Hòa An –Hậu Giang và Bình Tân-Vĩnh Long.....	67
4.3.2	Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác luân canh lúa-màu (2 lúa-1 màu, 1 lúa- 2 màu) tại Long Khánh-Cai Lậy-Tiền Giang.....	69
4.3.3	Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu trong điều kiện nhà lưới.....	72
4.4	Làm giàu mật độ tổ hợp vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon	76
4.5	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn	77
4.5.1	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất chuyên màu.....	77
4.5.2	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất luân canh lúa-màu	78
4.6	Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon.....	80
4.6.1	Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất chuyên màu	80
4.6.2	Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất luân canh lúa-màu.....	81
4.7	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu	82

4.7.1	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu	82
4.7.2	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất luân canh lúa-màu trong môi trường khoáng tối thiểu.....	83
4.8	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.....	85
4.8.1	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.....	85
4.8.2	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.	87
4.9	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.	92
4.9.1	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.	92
4.9.2	Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.	95
4.10	Khảo sát khả năng phân hủy Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1 theo thời gian nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu.....	99
4.11	Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1, trong đất trong điều kiện phòng thí nghiệm	100
4.12	Định danh các chủng vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu	101
Chương 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....		107

DANH SÁCH BẢNG

	Trang
Bảng 2.1 Các cấp độ phân loại độ độc của một chất theo WHO.....	7
Bảng 2.2 Phân loại thuốc bảo vệ thực vật theo nhóm độc (WHO).....	8
Bảng 2.3 Tình hình tồn trữ và sử dụng thuốc BVTV ở An Giang năm 2009	14
Bảng 2.4 Một số tính chất vật lý và hóa học của Diazinon	18
Bảng 2.5 Tốc độ thủy phân của Diazinon trong nước ở 25 ⁰ C	23
Bảng 2.6 Ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ đến thời gian bán hủy Diazinon ở 25 ⁰ C.....	25
Bảng 2.7 Thủy phân Diazinon trong đất sét	25
Bảng 3.1 Số lượng mẫu đất để phân lập vi khuẩn phân hủy Diazinon trên các mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu	41
Bảng 3.2 Một số đặc tính lý hóa của các mẫu đất thu từ ruộng luân canh lúa-màu ở một số tỉnh ĐBSCL được sử dụng trong thí nghiệm.....	42
Bảng 3.3 Một số đặc tính lý hóa của các loại đất sử dụng trong thí nghiệm thu từ ruộng chuyên canh màu ở một số tỉnh ĐBSCL được sử dụng trong thí nghiệm.....	42
Bảng 3.4 Mật độ của các dòng vi khuẩn tương ứng với OD _{600 nm} = 0,7.....	45
Bảng 3.5 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.....	47
Bảng 3.6 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD _{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.....	47
Bảng 3.7 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.	48
Bảng 3.8 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD _{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.	49
Bảng 3.9 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.	49
Bảng 3.10 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD _{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.	50
Bảng 3.11 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.....	51
Bảng 3.12 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD _{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.....	51

Bảng 3.13 Thành phần môi trường khoáng tối thiểu trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.	52
Bảng 3.14 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.....	53
Bảng 3.15 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.....	54
Bảng 3.16 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến phân hủy Diazinon của vi khuẩn.	54
Bảng 3.17 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.	55
Bảng 3.18 Mật độ vi khuẩn ban đầu trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến phân hủy Diazinon của vi khuẩn.	56
Bảng 3.19 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy Diazinon.....	57
Bảng 4.1 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 ở 30°C trong môi trường khoáng tối thiểu sau 30 ngày nuôi cấy.	88
Bảng 4.2 Phần trăm phân hủy và tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ	90
Bảng 4.3 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn	92
Bảng 4.4. Ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ.....	96
Bảng 4.5 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ	97
Bảng 4.6 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến sự phân hủy Diazinon của các dòng (BT4_L1, CL 36_M4) vi khuẩn sau 30 ngày nuôi ủ	98
Bảng 4.7 Độ tương đồng của các dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 với các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI.....	101
Bảng 4.8 Độ tương đồng của các dòng vi khuẩn phân HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 với các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI.....	102
Bảng 4.9 Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4	103
Bảng 4.10 Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17.....	104

Bảng 4.11 Định danh các dòng vi khuẩn phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu
Diazinon phân lập từ đất thu từ ruộng luân canh lúa-màu và chuyên màu . 105

DANH SÁCH HÌNH

	Trang
Hình 2.1 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới.....	11
Hình 2.2 Diễn biến về chi phí dùng cho việc sử dụng thuốc BVTV trên thế giới.....	12
Hình 2.3 Diễn biến về tổng chi phí sử dụng thuốc BVTV theo châu lục.....	13
Hình 2.4 Tình hình nhập khẩu thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam trong giai đoạn 2005 - 2012.....	14
Hình 2.5 Con đường di chuyển thuốc BVTV trong môi trường đất.....	15
Hình 2.6 Công thức cấu tạo Diazinon.....	17
Hình 2.7 Quá trình quang phân Diazinon trong lớp đất mặt.....	26
Hình 2.8 Hệ thống sắc ký khí khối phổ GC.MS.....	30
Hình 2.9 Các chu kỳ gia nhiệt thực hiện phản ứng PCR.....	32
Hình 3.1 Sơ đồ khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng.....	38
Hình 3.2 Các túi lưới chứa đất đã trộn Diazinon.....	41
Hình 4.1 Cơ cấu số loại hoạt chất của các nhóm thuốc BVTV được sử dụng.....	60
Hình 4.2 Cơ cấu số loại hoạt chất được sử dụng trên các mô hình canh tác của từng nhóm thuốc BVTV.....	61
Hình 4.3. Sử dụng Diazinon trên các mô hình chuyên lúa, lúa-màu và chuyên màu.....	63
Hình 4.4 Liều lượng sử dụng Diazinon trong các mô hình canh tác.....	64
Hình 4.5 Ô nhiễm Diazinon tại một số địa điểm ở ĐBSCL.....	66
Hình 4.6 Lưu tồn Diazinon trên mô hình chuyên canh mía tại Hòa An-Hậu Giang (2013).....	67
Hình 4.7 Lưu tồn Diazinon trên mô hình luân canh lúa-khoai lang (vụ khoai lang) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013).....	68
Hình 4.8 Lưu tồn Diazinon trên mô hình chuyên màu (xà lách xoong) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013).....	68
Hình 4.9 Lưu tồn Diazinon trong các mô hình canh tác 1 lúa-2 màu (vụ lúa) và 2 lúa-1 màu tại Long Khánh, Cai Lậy, Tiền Giang (vụ Đông Xuân 2013).....	70
Hình 4.10 Lưu tồn của Diazinon ở mô hình luân canh 1 lúa – 2 màu (đậu xanh) tại Long Khánh, Cai Lậy, Tiền Giang (vụ Hè Thu 2013).....	70

Hình 4.11. Cấu trúc của các tổ hợp vi khuẩn: (1) vụ lúa, (2) vụ màu của mô hình luân canh 1 lúa- 2 màu	72
Hình 4.12 Lưu tồn của Diazinon trên mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014)	73
Hình 4.13 Lưu tồn của Diazinon trong mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (vụ lúa) trong điều kiện nhà lưới (2014).....	73
Hình 4.14 Lưu tồn của Diazinon trên mô hình chuyên canh màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014).....	74
Hình 4.15 Cấu trúc của các tổ hợp vi khuẩn: (1) mô hình luân canh lúa màu vụ lúa, (2) mô hình luân canh lúa màu vụ màu (đậu xanh), (3) mô hình chuyên canh màu (đậu xanh).....	75
Hình 4.16 Sự phát triển của tổ hợp vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu.....	76
Hình 4.17 Sự phát triển của một số tổ hợp vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm.	77
Hình 4.18 Sự phân hủy Diazinon của tổ hợp vi khuẩn làm giàu mật độ từ đất chuyên màu sau 14 ngày nuôi cấy, trong môi trường khoáng tối thiểu.....	78
Hình 4.19 Sự phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu mật độ từ đất luân canh lúa-màu sau 14 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu.....	79
Hình 4.20 Cấu trúc của các tổ hợp vi khuẩn có nguồn gốc từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu	80
Hình 4.21 Độ tương đồng của các tổ hợp vi khuẩn được làm giàu mật độ từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.....	80
Hình 4.22 Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường TSA: (a) dòng HA7.1, (b) dòng HA7.4, (c) dòng TA3.2 và (d) dòng TA4.17.....	81
Hình 4.23 Sự phát triển của một số dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm	82
Hình 4.24 Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường TSA: (a) BT4_L1, (b) CL36_M4.....	82
Hình 4.25 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu, sau 30 ngày nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu.....	83

Hình 4.26 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu, sau 30 ngày nuôi trong môi trường khoáng tối thiểu	84
Hình 4.27 Sản phẩm phân hủy Diazinon	84
Hình 4.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ.....	85
Hình 4.29 Ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ.....	86
Hình 4.30 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ.....	86
Hình 4.31 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ.....	87
Hình 4.32 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ.....	88
Hình 4.33 Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ.....	89
Hình 4.34. Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ.....	91
Hình 4.35. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ.....	93
Hình 4.36 Ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ.....	93
Hình 4.37. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ.....	94
Hình 4.38 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu	95
Hình 4.39. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ.....	96
Hình 4.40. Khả năng phân hủy Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1 theo thời gian ủ ở 30°C, độ pH 6.....	99
Hình 4.41 Khả năng phân hủy Diazinon của vi khuẩn trong đất trong phòng thí nghiệm.....	101

Hình 4.42 Cây phả hệ mối quan hệ di truyền của các dòng vi khuẩn phân hủy
Diazinon phân lập từ đất được thu từ ruộng canh tác chuyên màu và
luân canh lúa-màu ở ĐBSCL 106

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

AG:	An Giang
bp:	Base pair (cặp bazơ)
BT:	Bình Tân
BVTV:	Bảo vệ thực vật
CTAB:	Cetyltrimethylammonium bromide
ĐBSCL:	Đồng bằng sông Cửu Long
DGGE:	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (điện di biến tính tăng cấp)
DNA:	Deoxyribonucleic acid
HA:	Hòa An
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography (sắc ký lỏng cao áp)
LD ₅₀ :	Lethal Dose 50
TG:	Tiền Giang
TSA:	Tryptose Soybean Agar
TSB:	Tryptose Soybean Broth
VL:	Vĩnh Long
CFU:	Colony-Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)
Ppm:	Parts per million (một phần triệu)
Ppb:	Parts per billion (một phần tỷ)

Chương 1: GIỚI THIỆU

1.1 Đặt vấn đề

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) là mối quan tâm lớn trong sản xuất nông nghiệp và đây là khu vực sử dụng thuốc BVTV cao hơn so với các khu vực khác (Phạm Văn Toàn, 2013). Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hữu Huân (2013) cho thấy nông dân vẫn sử dụng thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ, đây là loại thuốc trừ sâu có thời gian tồn tại khá lâu trong môi trường đất với thời gian bán hủy lên đến 124 ngày (đất sét, pH = 7) (Sethunathan and Yoshida, 1969).

Trong các hợp chất thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ, có khoảng 50 hoạt chất thuộc họ phosphorothioates và phosphorodithioates, các hợp chất này tồn tại liên kết thiono (P=S). Các hợp chất có liên kết P=S thường bền hơn hợp chất có liên kết P=O và có khả năng thâm nhập vào lớp biểu bì của côn trùng tốt hơn. Diazinon là hợp chất thuộc họ phosphorothioates và được nông dân sử dụng nhiều (Lê Thị Trinh, 2012). Diazinon có tên khoa học là *O,O*-diethyl-*O*-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl)-phosphorothioates (Abo-Amer and Aly, 2010). Trong nông nghiệp, Diazinon là hoạt chất tạo nên nhiều loại thuốc trừ sâu, trừ côn trùng cho lúa, rau và nhiều loại cây ăn trái. Diazinon là thành phần chính của nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật đã thương mại hóa như Diazan, Agrozinon, AG 500, Azinon, Basudin, Basitox... (Lê Thị Trinh, 2012).

Theo kết quả nghiên cứu của Sapozhnikova *et al.* (2004) khi phân tích các mẫu trầm tích ở hồ chứa nước thoát ra từ ruộng canh tác nông nghiệp ở California và phát hiện nồng độ Diazinon dao động từ 0,5-5,4 ppb. Bên cạnh đó, khi phân tích dư lượng thuốc BVTV trong các mẫu nước mặt ở Mỹ và Canada phát hiện hàm lượng Diazinon lên đến 7,1 ppb (Carey and Kutz, 1985). Diazinon là hoạt chất thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ có chỉ số K_{oc} cao (191 mL/g) (Veronique, 2011) nên có xu hướng hấp thu vào đất và rửa trôi ở mức trung bình.

Nhiều nghiên cứu cho thấy khi phun thuốc BVTV hơn 50% lượng thuốc đi vào môi trường (Lê Huy Bá và Lâm Minh Triết, 2005) và phần lớn di chuyển vào môi trường đất, nước và trầm tích gây ra những tác động tiêu cực cho môi trường, phá hủy hệ sinh thái đất và thủy vực. Bên cạnh vai trò tiêu

diệt đối tượng phòng trừ, thuốc BVTV cũng trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người (Nguyễn Thị Phi Oanh và Hứa Văn Ủ, 2011).

Diazinon gây độc cho sinh vật qua cơ chế làm giảm hoạt tính enzyme *Acetylcholinesterase (AChE)* và khi enzyme này bị ức chế đến 70% sẽ làm chết đa số động vật thủy sinh (Aprea *et al.*, 2002). Thực nghiệm ở ĐBSCL cho thấy sau một lần phun Diazinon cho lúa thì hoạt tính *AChE* của cá Lóc (*Channa striata*) và cá Rô (*Anabas testudineus*) đều bị ức chế đến khoảng 70% (Nguyễn Văn Công, 2012). Bên cạnh đó, Diazinon đã gây ra thiệt hại di truyền ở cá với nồng độ 1 ppb hoặc thấp hơn (Vigfusson *et al.*, 1983), giảm khả năng phát triển cảm giác về mùi để phát hiện kẻ thù (Nathaniel *et al.*, 2000). Đối với con người, Diazinon có thể gây nhiễm độc cấp tính như đau đầu, buồn nôn, tiết nước bọt, tim đập bất thường, động kinh, co giật, gây tử vong (Reigart and Roberts, 1999) và có thể gây ung thư não đối với trẻ khi tiếp xúc thường xuyên với Diazinon (Lê Thị Trinh, 2012).

Vì thế, vấn đề ô nhiễm môi trường đất, nước do sử dụng thuốc BVTV chứa hoạt chất Diazinon là vấn đề cần được quan tâm. Tuy nhiên, cho đến hiện nay chưa có nhiều các nghiên cứu nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon gắn liền với điều kiện canh tác ở ĐBSCL, đặc biệt là sự phân hủy sinh học do hoạt động của vi sinh vật trong đất. Bên cạnh đó, sự phân hủy của vi sinh vật là con đường chủ yếu phân hủy Diazinon trong đất (Aggarwal *et al.*, 2013). Việc ứng dụng vi sinh vật để phân hủy thuốc BVTV là một biện pháp hiệu quả và ít tốn kém (Abo-Amer and Aly, 2010).

Nhiều nghiên cứu cho thấy, có nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc BVTV thuộc nhóm lân hữu cơ có độ độc cao và thời gian lưu tồn lâu trong môi trường đất. Các vi khuẩn như *Arthrobacter* và *Streptomyces* có khả năng phân hủy nhanh Diazinon trong môi trường đất. Nhiều nghiên cứu về các loài vi khuẩn như: *Serratia marcescens* D1101 (Abo-Amer and Aly, 2011), *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Agrobacterium* sp. (Yasouri, 2006), *Pseudomonas peli* BG1, *Burkholderia caryolhylli* BG4 và *Brevundimonas diminuta* PD6 có thể sử dụng Diazinon như nguồn cacbon duy nhất (Mahiuddin *et al.*, 2014).

Một số nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của các mô hình canh tác khác nhau (luân canh màu-lúa và chuyên màu) đến cấu trúc tổ hợp vi sinh vật do có sự thay đổi về chế độ yếm khí và hiếu khí (Trần Văn Dũng, 2011). Do đó, để

có thể đề xuất các biện pháp nhằm thúc đẩy sự phân hủy dư thừa thuốc BVTV trong đất, trước hết cần có những hiểu biết về sự chuyển hóa của các loại thuốc BVTV trong các điều kiện canh tác khác nhau cũng như hoạt động phân hủy của tổ hợp vi khuẩn và các dòng vi khuẩn bản địa. Vì thế, đề tài “Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon trong các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long” được thực hiện nhằm góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường đất do sử dụng thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất Diazinon.

1.2 Mục tiêu đề tài

Mục tiêu chính: Luận án thực hiện nhằm đánh giá tình hình sử dụng và dư lượng thuốc trừ sâu Diazinon trong các mô hình canh tác chuyên lúa, luân canh lúa-màu và chuyên màu. Đồng thời đánh giá ảnh hưởng của mô hình canh tác đến vi khuẩn phân hủy Diazinon. Đánh giá được hiệu quả phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu.

Mục tiêu cụ thể: (1) Phân lập và tuyển chọn được một hoặc một số dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon trong đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu ở một số tỉnh ĐBSCL; (2) Xác định mối quan hệ di truyền giữa các dòng vi khuẩn phân lập có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon dựa trên trình tự nucleotide 16S rRNA. (3) Xác định các yếu tố môi trường (nhiệt độ, pH, nguồn cacbon, nồng độ Diazinon) ảnh hưởng đến sự gia tăng mật độ vi khuẩn. (4) Xác định ảnh hưởng của các yếu tố môi trường (nhiệt độ, pH, nồng độ Diazinon, mật độ vi khuẩn) đến tốc độ phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn phân lập. (5) Xác định được ảnh hưởng của mô hình canh tác đến phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng và trong điều kiện nhà lưới, đồng thời xác định sự ảnh hưởng của mô hình canh tác đến cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn trong điều kiện nhà lưới.

1.3 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài: Các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon được phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Phạm vi nghiên cứu: Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon được phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu ở 4 tỉnh ĐBSCL. Khảo sát khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi

khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu và trong đất trong phòng thí nghiệm.

1.4 Những đóng góp mới, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Lần đầu tiên được nghiên cứu phân hủy sinh học Diazinon bởi tổ hợp vi khuẩn và các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu ở Việt Nam.

Các kết quả có ý nghĩa khoa học

Kết quả phân lập được 196 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon có nguồn gốc từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu ở 4 tỉnh ĐBSCL.

Ứng dụng phương pháp theo dõi hàm lượng thuốc trừ sâu Diazinon còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu sau khi chủng vi khuẩn 30 ngày, kết quả đã xác định được 6 dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả cao.

Xác định được môi trường sinh thái (nhiệt độ, pH, nguồn cacbon, nồng độ Diazinon) thúc đẩy cho sự gia tăng mật độ và phân hủy Diazinon của 6 dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu của đề tài nhằm cung cấp cơ sở khoa học trong quản lý đất nông nghiệp ở đồng bằng sông Cửu Long.

Chương 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Tổng quan về thuốc bảo vệ thực vật

2.1.1 Định nghĩa thuốc bảo vệ thực vật

Các loại cây trồng trong nông nghiệp và nông sản nói chung đều bị ảnh hưởng bởi một số loài gây hại như sâu hại, cỏ dại, chuột... có tên gọi chung là dịch hại. Các hóa chất có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp có tác dụng tiêu diệt hoặc phòng trừ dịch hại được gọi là thuốc phòng trừ dịch hại. Ngoài ra chúng còn có nhiều tên gọi khác như nông dược, thuốc bảo vệ thực vật hay hóa chất bảo vệ thực vật (Lê Thị Trinh, 2012).

Từ lâu con người đã sử dụng từ dịch hại (Pest) để chỉ bất kỳ loài côn trùng, tuyến trùng, động vật hoặc vi sinh vật gây ảnh hưởng đến cây trồng. Danh từ này không bao gồm các các vi sinh vật gây bệnh cho người và gia súc (Nguyễn Trần Oánh và *ctv.*, 2007).

Thuốc bảo vệ thực vật (Pesticide) được sử dụng để quản lý các loài dịch hại. Đây là những sản phẩm với vai trò quan trọng là ngăn chặn, tiêu diệt và đẩy lùi bất kỳ loài sinh vật mà con người không mong muốn (Delaplane, 1996). Thuật ngữ “Pesticide” bao gồm tất cả các hóa chất được sử dụng để tiêu diệt hay kiểm soát các loài dịch hại gây hại cây trồng, nông lâm sản...(Nguyễn Trần Oánh và *ctv.*, 2007). Trong nông nghiệp, thuốc trừ dịch hại bao gồm thuốc trừ cỏ, thuốc trừ sâu, thuốc trừ bệnh (Gilden *et al.*, 2010), thuốc trừ tuyến trùng và thuốc trừ chuột (Edwin, 1996).

Thuốc BVTV là những hợp chất hoá học (vô cơ, hữu cơ), những chế phẩm sinh học (chất kháng sinh, vi khuẩn, nấm, tuyến trùng ...), những chất có nguồn gốc thực vật, động vật, được sử dụng để bảo vệ cây trồng và nông sản, chống lại sự phá hại của những sinh vật gây hại (côn trùng, nhện, tuyến trùng, chuột, chim, thú rừng, nấm, vi khuẩn, cỏ dại, ...) (Nguyễn Trần Oánh và *ctv.*, 2007).

2.1.2 Phân loại thuốc bảo vệ thực vật

Thuốc BVTV được phân loại theo nhiều cách tùy theo mục đích khác nhau như phân loại theo nguồn gốc, cấu tạo hóa học, đối tượng tác dụng, đặc tính tác dụng và theo mức độ gây độc... (Lê Huy Bá, 2006; Trần Văn Hai, 2009).

Theo nguồn gốc và cấu tạo hóa học, thuốc bảo vệ thực vật được chia thành nhiều nhóm, trong đó có bốn nhóm chính:

- Nhóm Chlor hữu cơ là các dẫn xuất Chlor của một số hợp chất hữu cơ như Diphenyletan, Cycloodiene, Benzene và Hexane (Lê Thị Trinh, 2012). Các thuốc Chlor hữu cơ đã bị cấm sử dụng ở nhiều nước trên thế giới do những hợp chất thuộc nhóm này rất bền trong môi trường tự nhiên, phần lớn Chlor hữu cơ khó phân hủy và tích lũy trong mô mỡ của động vật (Lê Huy Bá, 2008).

- Nhóm lân hữu cơ là este của axit phosphoric và dẫn xuất của axit này. Các thuốc lân hữu cơ có thời gian bán hủy ngắn hơn so với nhóm Chlor hữu cơ và được sử dụng rộng rãi hơn (Lê Thị Trinh, 2012). Thuốc lân hữu cơ độc đối với động vật có xương sống hơn là thuốc Chlor hữu cơ và ít hoặc không tích lũy trong mô mỡ động vật. Thuốc lân hữu cơ gây độc chủ yếu thông qua sự ức chế men *Acetylcholinesterase (AChE)* làm tích lũy quá nhiều Acetylcholine tại vùng synap làm cho cơ bị giật và cuối cùng bị tê liệt dẫn đến tử vong (Lê Huy Bá, 2008).

- Nhóm Carbamate là các dẫn xuất hữu cơ của axit cacbamic (Lê Thị Trinh, 2012), tác dụng như nhóm lân hữu cơ làm ức chế men AChE (Lê Huy Bá, 2008). Thuốc Carbamate có khả năng tiêu diệt côn trùng rộng rãi, ít độc (qua da và miệng) đối với động vật có vú (Lê Huy Bá, 2008), kém bền hơn trong môi trường tự nhiên, song cũng có độc tính cao đối với người và động vật (Lê Thị Trinh, 2012).

- Nhóm Pyrethroid (gốc Cúc) là những thuốc BVTV có nguồn gốc tự nhiên, là hỗn hợp của các este khác nhau với cấu trúc phức tạp được tách ra từ hoa cúc có độc tính thấp hơn so với các hóa chất tổng hợp (Lê Thị Trinh, 2012). Ngoài ra còn có một số nhóm khác như: các thuốc vô cơ (nhóm asen, hợp chất của đồng, thủy ngân...), thuốc trừ sâu sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, virus (thuốc trừ nấm, vi khuẩn...), các thuốc có nguồn gốc từ

thực vật (thuốc BVTV làm từ cây cỏ hay các sản phẩm chiết xuất từ cây cỏ) (Lê Huy Bá, 2006; Lê Thị Trinh, 2012; Trần Văn Hai, 2009).

Theo đối tượng tác dụng, thuốc bảo vệ thực vật được chia thành các nhóm: thuốc trừ sâu, thuốc trừ bệnh, thuốc trừ cỏ, thuốc trừ vi khuẩn, thuốc trừ nấm, thuốc trừ gặm nhấm, thuốc trừ tuyến trùng, thuốc trừ nhện... Trong đó thuốc trừ sâu là nhóm chất quan trọng, nó được chia làm 3 nhóm chính: hợp chất vô cơ, hợp chất hữu cơ tổng hợp và hợp chất có nguồn gốc thực vật (Lê Huy Bá, 2006; Trần Văn Hai, 2009).

Phân loại theo con đường xâm nhập vào cơ thể dịch hại:

Tùy theo con đường thuốc BVTV xâm nhập vào cơ thể dịch hại, có thể phân thành các loại thuốc như: thuốc vị độc (nội tác động), thuốc tiếp xúc và xông hơi. Ngoài ra, người ta còn phân biệt thuốc lưu dẫn và không lưu dẫn, thuốc chọn lọc và không chọn lọc (Trần Văn Hai, 2009).

Thuốc BVTV không chỉ độc đối với các loài dịch hại mà còn độc với con người và các động vật không phải mục tiêu với nhiều trường hợp ngộ độc được ghi nhận. Thuốc BVTV có thể xâm nhập vào cơ thể thông qua da, miệng, mắt hoặc phổi và có hai cấp độ độc: độ độc cấp tính và độ độc mãn tính (Delaplane, 1996). Giá trị LD₅₀ (Lethal Dose 50) được các nhà khoa học sử dụng thể hiện cho độ độc cấp tính (liều lượng cần thiết để giết chết 50% số động vật thí nghiệm). Giá trị LD₅₀ càng nhỏ, độ độc cấp tính của thuốc BVTV càng cao (Delaplane, 1996). Nhiều giá trị LD₅₀ được ghi nhận khi quan sát trên chuột thí nghiệm (Bảng 2.1)



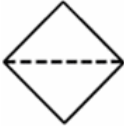
Bảng 2.1 Các cấp độ phân loại độ độc của một chất theo WHO

Mức độ độc	Trị số LD ₅₀ của thuốc (mg/kg)			
	Dạng lỏng		Dạng rắn	
	Qua miệng	Qua da	Qua miệng	Qua da
Rất độc	< 20	< 40	< 5	< 10
Độc	20 – 200	40 – 400	5 – 50	10 – 100
Độc trung bình	200 – 2.000	400 – 4.000	50 – 500	100 – 1.000
Ít độc	> 2.000	> 4.000	> 500	> 1.000

(Nguồn: Trần Quang Hùng, 1999)

Theo WHO (World Health Organization-Tổ chức Y tế Thế giới) căn cứ vào độ độc cấp tính của thuốc BVTV được phân thành 4 nhóm độc khác nhau: I (rất độc), II (độc cao), III (độc trung bình) và IV (độc nhẹ). (Bảng 2.2).

Bảng 2.2 Phân loại thuốc bảo vệ thực vật theo nhóm độc (WHO)

Phân nhóm và kí hiệu	Biểu tượng nhóm độc	Độc tính cấp LD ₅₀ (mg/kg) chuột nhà			
		LD ₅₀ qua da (mg/kg)		LD ₅₀ qua miệng (mg/kg)	
		Thẻ rắn	Thẻ lỏng	Thẻ rắn	Thẻ lỏng
Rất độc (I)		10	40	50	200
Độc cao (II)		10 – 100	40-400	50 -500	200-2000
Độc trung bình (III)		100-1.000	400 -4000	500 -2.000	2.000 - 3.000
Độc nhẹ (IV)		1000	4000	>2000	>3.000

(Nguồn: Lê Văn Khoa, 2010)

2.1.3 Vai trò của thuốc bảo vệ thực vật

Thuốc BVTV mang lại nhiều lợi ích trong canh tác nông nghiệp. Trên thế giới nước kém phát triển, 95% dân số sản xuất lương thực để nuôi sống họ và 5% thuốc diệt cỏ góp phần gia tăng 10% – 20% năng suất ngũ cốc. Ở Mỹ, việc sử dụng thuốc trừ sâu một cách cẩn thận, nông dân gần như loại trừ được loài mọt gây hại trên cây bông trên diện rộng phía đông nam. Dịch hại này đã từng gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng ở các trang trại trồng bông ở miền nam nước Mỹ vào đầu thế kỷ XX (Delaplane, 1996).

Ngược lại, ở các nước phát triển 3% – 5% dân số tham gia sản xuất nông nghiệp đủ đáp ứng nhu cầu lương thực cho dân số cả nước và còn có sản lượng dư để xuất khẩu. Hiệu quả này ở các nước phát triển sẽ không đạt được nếu không có thuốc BVTV (Hodgson, 1991).

Trong sản xuất nông nghiệp, dịch hại là nhân tố rất quan trọng ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Theo ước tính, có khoảng 26% – 40% tiềm năng sản xuất cây trồng bị thiệt hại hằng năm bởi các loài dịch hại. Tuy nhiên, con số này có thể tăng lên gấp đôi nếu không có sử dụng thuốc BVTV. Ví dụ, nếu không có thuốc BVTV, năng suất lúa mì sẽ bị tổn thất 50% thay vì con số thực tế 29% còn đối với củ cải đường sẽ giảm năng suất trung bình trên 80% (Crop Life International, 2011).

2.1.4 Tác hại của thuốc bảo vệ thực vật

Thuốc BVTV đã được sử dụng từ nhiều thập kỷ nay để phòng trừ sinh vật hại cây trồng và nông sản, kết quả đã đem lại lợi ích kinh tế to lớn cho nền nông nghiệp. Cho tới ngày nay thuốc BVTV vẫn được sử dụng như một phần không thể thiếu trong nền nông nghiệp hiện đại. Tuy nhiên việc lạm dụng thuốc BVTV, tình trạng dùng thuốc BVTV sai kỹ thuật ở nhiều nơi đã để lại hậu quả xấu cho môi trường và cộng đồng sinh vật (Nguyễn Trần Oánh và ctv, 2007).

Ảnh hưởng của thuốc BVTV đến môi trường:

Do các loại thuốc BVTV thường là các chất có độc tính cao nên mặt trái của thuốc BVTV là rất độc hại với sức khỏe con người và là đối tượng có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường sinh thái nếu không được quản lý chặt chẽ và sử dụng đúng cách. Việc dùng thuốc BVTV để phòng trừ dịch hại càng phát triển thì sự mất cân bằng của hệ sinh thái càng trở nên nghiêm trọng. Sự phát sinh thành dịch của các loài gây hại là một bằng chứng hiển nhiên của sự mất cân bằng này. Khi phân tích việc phun thuốc, ước tính chỉ có khoảng 10-20% lượng thuốc ở dạng bột và 20-25% lượng thuốc ở dạng lỏng bám trên cây; lượng thuốc thực sự xâm nhập, tác động đến sâu hại chỉ chiếm khoảng 1% (Lê Thị Trinh, 2012; Trần Văn Hai, 2009). Ngoài ra khi lá rụng, lượng thuốc bám trên lá chưa phân hủy hết sẽ tích tụ lại trong đất gây ô nhiễm đất và nguồn nước xung quanh, đồng thời phần thuốc dư tồn sẽ tác động lên những sinh vật không thuộc đối tượng phòng trừ (Trần Văn Hai, 2009).

Thuốc BVTV không những làm mất cân bằng sinh thái mà còn lưu tồn trong đất, nước, không khí, trong cây trồng và cả trong thực phẩm (Trần Viết Thắng và Phạm Thị Ngọc, 2004), hậu quả đã ảnh hưởng xấu đến sức khỏe động vật và con người (Trần Văn Tùng và Ngô Tiến Dũng, 2003).

Ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật đến sức khỏe con người:

Theo Chương trình môi trường Liên hợp quốc (UNEP), sản lượng thuốc BVTV trên thế giới cứ 10 năm lại tăng lên gấp đôi (Lê Huy Bá, 2006; Hà Huy Kỳ, 1998). Trên thế giới ước tính có khoảng 39 triệu người có thể bị ngộ độc cấp tính hàng năm do ảnh hưởng của thuốc BVTV (Margaret *et al.*, 2006). Trong đó có khoảng 3 triệu người bị ngộ độc cấp tính nghiêm trọng (Litchfield, 2005) với gần 500 ngàn người tử vong mỗi năm (Lê Huy Bá, 2006). Ở Mỹ, mỗi năm có đến 90.000 công nhân trong tổng số 5 triệu công nhân phục vụ trong lĩnh vực nông nghiệp bị nhiễm độc thuốc BVTV (Hà Huy Kỳ, 1998). Ở nước ta hàng năm cũng có tới hàng ngàn người bị nhiễm độc (Lê Huy Bá, 2006). Theo thống kê sơ bộ tại 38 tỉnh, thành phố, trong năm 2009 có 4.372 vụ nhiễm độc thuốc BVTV, tử vong 138 người chiếm tỉ lệ 3,05% (Cục Y tế dự phòng và Môi trường, 2010). Bên cạnh đó, các ảnh hưởng mãn tính do tiếp xúc với thuốc BVTV với liều lượng nhỏ trong thời gian dài có liên quan tới nhiều sự rối loạn và các bệnh khác nhau. Các nghiên cứu khoa học đã tìm thấy những bằng chứng về mối liên quan giữa thuốc BVTV với bệnh ung thư não, ung thư vú, ung thư gan, dạ dày, bàng quang, thận. Các hậu quả sinh sản như đẻ non, vô sinh, thai dị dạng, quái thai, ảnh hưởng chất lượng tinh dịch, rối loạn thần kinh thực vật, rối loạn hành vi, tổn thương chức năng miễn dịch và dị ứng, tăng cảm giác da (Swan *et al.*, 2003; Nguyễn Thị Du Loan, 2005; Lê Huy Bá, 2006; Nguyễn Tuấn Khanh, 2010). Đặc biệt là những liên quan của thuốc BVTV với ung thư, bạch cầu cấp ở trẻ em (Ma *et al.*, 2002). Đồng thời, thuốc BVTV cũng liên quan đến một số bệnh như Alzheimer (Gauthier *et al.*, 2001), bệnh Parkinson (Engel *et al.*, 2001), các bệnh ở hệ thống miễn dịch và tạo huyết (Nakashima and Yoshimura, 2002).

2.2 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới và ở Việt Nam

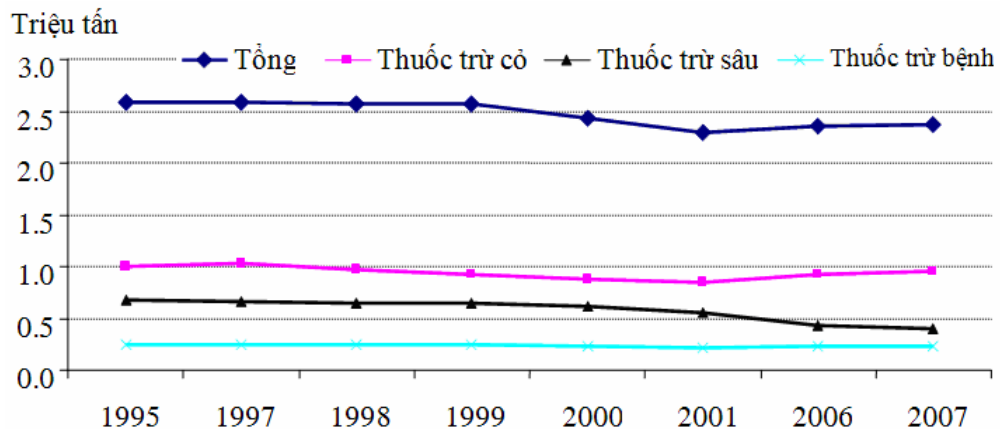
2.2.1 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới

Thuốc BVTV là những hợp chất độc có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp hóa học dùng để phòng và trừ sâu, bệnh, cỏ dại, chuột... hại cây trồng và nông sản được gọi chung là sinh vật hại cây trồng và nông sản (Trần Quang Hùng, 1999). Thuốc BVTV đã được sử dụng từ nhiều thập kỷ nay để phòng trừ sinh vật hại cây trồng và nông sản và kết quả đã đem lại lợi ích kinh tế to lớn cho nền nông nghiệp. Ngày nay thuốc BVTV được sử dụng như một phần không thể thiếu trong nền sản xuất nông nghiệp. Năm 1991, ở Mỹ có 75%

thuốc BVTV được sử dụng trong nông nghiệp với 900.000 nông hộ sử dụng, trong đó thuốc trừ cỏ được sử dụng phổ biến nhất (Aspelin *et al.*, 1991).

Việc sử dụng các loại thuốc BVTV dưới dạng hóa học, đặc biệt là hữu cơ tổng hợp đã góp phần tích cực trong việc bảo vệ cây trồng và nông sản nhằm chống lại sâu hại, dịch bệnh và cỏ dại (WenJun *et al.*, 2011). Từ những thập niên 1960 cho đến nay, cơ cấu sử dụng thuốc BVTV có sự thay đổi đáng kể, cụ thể như sau: phần trăm lượng thuốc trừ cỏ trong tổng số thuốc BVTV tiêu thụ trên thế giới tăng nhanh, từ 20% năm 1960 lên 48% vào năm 2005 (WenJun *et al.*, 2011).

Vào năm 1994, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật tăng lên đến 0,357 triệu tấn từ 0,32 triệu tấn vào năm 1993 (tăng 11%) và giảm khoảng 2% vào năm 1995. Sự gia tăng đáng kể trong việc sử dụng thuốc trừ sâu trong năm 1994 là do diện tích tăng lên đối với một số cây trồng thâm canh. Lượng thuốc bảo vệ thực vật sử dụng trên thế giới khoảng 2,36 triệu tấn trong cả hai năm 2006 và 2007. Trong đó, thuốc diệt cỏ chiếm lượng lớn nhất trong tổng số tất cả các nhóm thuốc được sử dụng, tiếp theo là thuốc trừ sâu và thuốc trừ bệnh. Nhìn chung, tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong giai đoạn 1995-2007 có xu hướng giảm trong đó thuốc trừ cỏ có xu hướng tăng (EPA, 2012) (Hình 2.1).

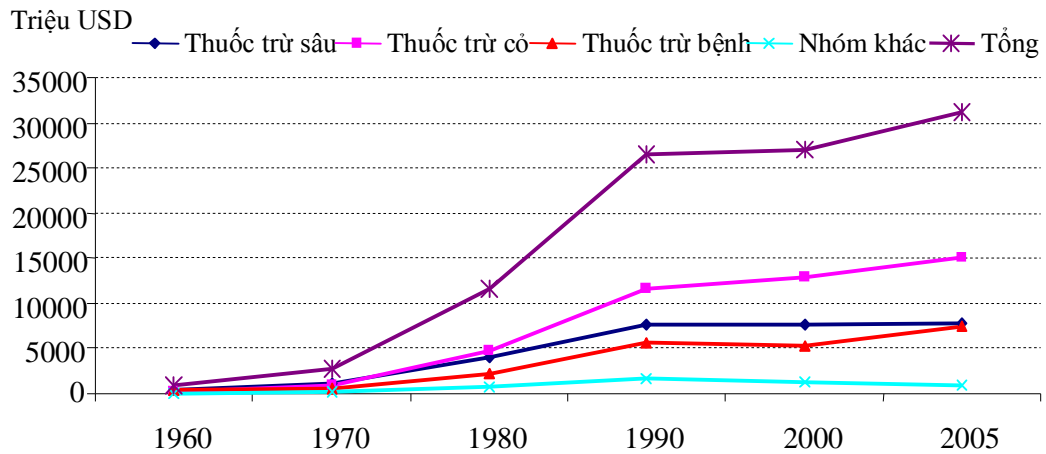


Hình 2.1 Tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới

(Nguồn: EPA, 2012)

Bên cạnh đó, tình hình sử dụng thuốc BVTV trên thế giới cho thấy tổng chi phí cho việc tiêu thụ thuốc BVTV luôn tăng liên tục từ năm 1960 đến 2005. Trong đó, chi phí cho thuốc trừ cỏ là lớn nhất, kế đến là thuốc trừ sâu, thuốc trừ bệnh và cuối cùng là nhóm khác (Hình 2.2). Trước đây thuốc trừ sâu

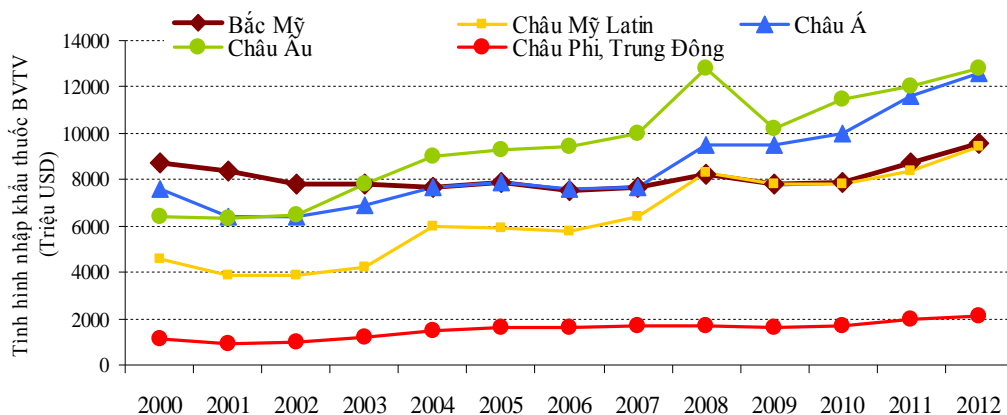
dạng hữu cơ tổng hợp chủ yếu có ba nhóm: (1) Cacbamat; (2) Lân hữu cơ và (3) Clo hữu cơ. Tuy nhiên, sau đó, nhằm đáp ứng lại với nhu cầu của thị trường, các dạng thuốc trừ cỏ và trừ nấm bệnh được sản xuất với một lượng lớn. Theo ước đoán của một số chuyên gia trong lĩnh vực thuốc BVTV thì trong tương lai số lượng thuốc trừ sâu sử dụng sẽ giảm xuống thay vào đó số lượng thuốc diệt cỏ sử dụng sẽ được gia tăng (WenJun *et al.*, 2011).



Hình 2.2 Diễn biến về chi phí dùng cho việc sử dụng thuốc BVTV trên thế giới

(Nguồn: WenJun *et al.*, 2011)

Chi phí sử dụng thuốc BVTV khác nhau giữa các châu lục. Trong đó, châu Âu và châu Á là 2 châu lục có sự gia tăng đáng kể về chi phí sử dụng thuốc BVTV từ năm 2009-2012. Ngược lại, trong hơn 10 năm qua châu Phi và Trung Đông không có sự thay đổi đáng kể về tổng chi phí sử dụng thuốc BVTV và thấp nhất so với các châu lục khác (Hình 2.3). Bên cạnh đó, mức đầu tư về thuốc BVTV, khả năng tiêu thụ các nhóm thuốc BVTV tùy thuộc vào trình độ phát triển và đặc điểm canh tác của từng nước (Nguyễn Trần Oánh và *ctv*, 2007). Các quốc gia như Trung Quốc, Mỹ, Pháp, Braxin và Nhật là nơi sản xuất thuốc BVTV, đồng thời là nơi tiêu thụ và thương mại hóa sản phẩm thuốc BVTV lớn nhất thế giới. Trên thế giới, hầu hết các loại thuốc trừ sâu được sử dụng chủ yếu trên đối tượng là cây ăn quả và rau màu. Ở các nước đang phát triển thuốc trừ sâu và thuốc trừ cỏ chủ yếu được sử dụng trong canh tác bắp (WenJun *et al.*, 2011).



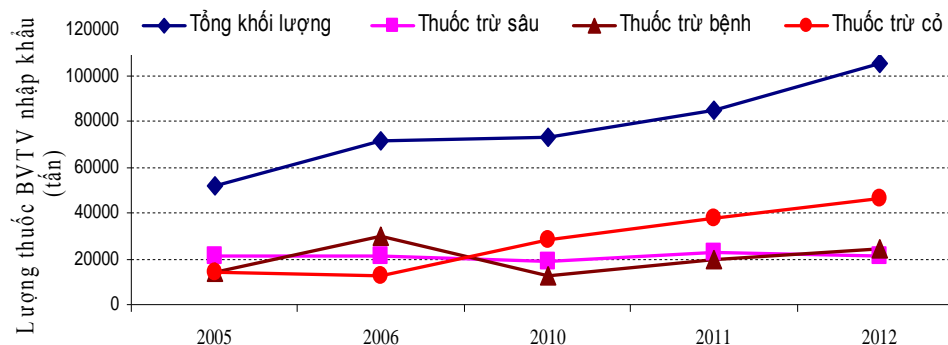
Hình 2.3 Diễn biến về tổng chi phí sử dụng thuốc BVTV theo châu lục

(Nguồn: <http://www.washingtonpost.com>)

2.2.2 Tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam

Giai đoạn 2005-2012 lượng thuốc BVTV nhập khẩu vào Việt Nam có xu hướng tăng dần theo thời gian. Đặc biệt tăng đột biến vào giai đoạn 2008-2012 nguyên nhân là do sự xuất hiện dịch lùn sọc đen hại lúa. Trong các nhóm thuốc BVTV, thuốc trừ cỏ được sử dụng nhiều nhất và tăng đều theo thời gian, các loại thuốc trừ sâu và thuốc trừ bệnh cây trồng có xu hướng ổn định và số lượng sử dụng tương đương nhau (Phan Hiền, 2014) (Hình 2.4).

Ở Việt Nam, số lượng và chủng loại hóa chất nông nghiệp rất đa dạng và phong phú với 3.865 tên thương mại khác nhau và 1.614 hoạt chất được sử dụng. Trước năm 1990, lượng thuốc BVTV nhập khẩu hàng năm dao động trong khoảng từ 13.000 đến 14.000 tấn. Đến năm 2012 số lượng nhập khẩu đã tăng lên 105.000 tấn/năm. Bên cạnh đó, chủng loại thuốc BVTV nhập khẩu vào Việt Nam sau năm 2012 cũng có sự thay đổi như sau: thuốc trừ sâu giảm xuống, trong khi đó, thuốc trừ nấm bệnh, trừ cỏ và các loại thuốc BVTV khác tăng lên. Cụ thể như sau: Trước năm 1990, thuốc trừ sâu chiếm khoảng 83,3% tổng lượng thuốc BVTV nhập khẩu vào Việt Nam, thuốc trừ bệnh cây trồng chỉ chiếm 9,5%, thuốc trừ cỏ dưới 4%, và các loại thuốc khác chiếm 3,1%. Tuy nhiên, vào năm 2012, thuốc trừ sâu chỉ chiếm 20,4%, thuốc trừ bệnh cây trồng tăng lên đến 23,2%, thuốc trừ cỏ tăng lên đến 44,4% và các loại thuốc khác chiếm 12% so với tổng khối lượng thuốc nhập khẩu (Phan Hiền, 2014).



Hình 2.4 Tình hình nhập khẩu thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam trong giai đoạn 2005 - 2012

Theo số liệu thống kê của Bộ Tài nguyên và Môi trường năm 2011, toàn quốc hiện có trên 1.153 điểm lưu hóa chất bảo vệ thực vật cần được xử lý, bao gồm 289 kho lưu giữ và 864 khu vực ô nhiễm môi trường do các kho chứa hóa chất BVTV gây ra (Xuân Hợp, 2011). Trong các loại gốc thuốc hiện đang có trên thị trường, nhóm gốc Lân hữu cơ chiếm tỷ lệ cao nhất (Bảng 2.3).

Bảng 2.3 Tình hình tồn trữ và sử dụng thuốc BVTV ở An Giang năm 2009

Năm	Tổng số kho	Khối lượng (tấn)			Tổng lượng
		Lân hữu cơ	Carbamate	Loại khác	
2001	43	165	-	-	165
2002	73	158	-	-	158
2003	163	98	-	-	98
2004	163	42	-	3	45
2005	171	157	37	47	241
Tổng	612	620	37	50	707
Tỷ lệ (%)	-	87,7	5,23	7,07	100

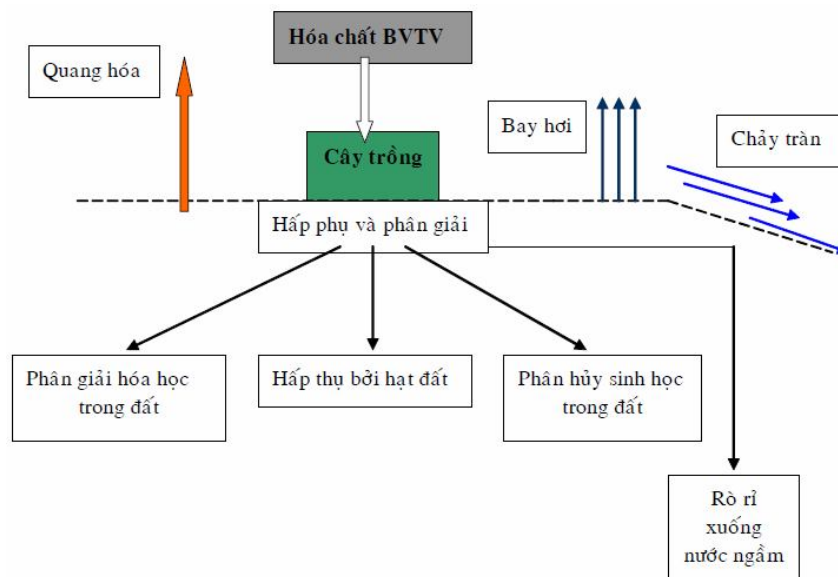
(Nguồn: Lê Minh Uy, 2009)

2.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lưu tồn thuốc bảo vệ thực vật trong đất và nước.

Việc sử dụng thuốc BVTV trong nông nghiệp, lâm nghiệp, là nguồn gốc gây ra tồn dư một lượng thuốc BVTV trong môi trường. Thuốc BVTV phun lên cây một phần được cây hấp thụ, tiêu diệt sâu bệnh, một phần tồn dư đi vào môi trường xung quanh và chịu tác động của hàng loạt các quá trình lý, hóa, sinh học nên chúng sẽ bị biến đổi, di chuyển và phân bố theo đơn vị môi

trường lên các thành phần tự nhiên (Hình 2.5). Lưu tồn thuốc BVTV không những gây ô nhiễm môi trường mà nó còn ảnh hưởng xấu đến sinh vật và đặc biệt là sức khỏe con người.

Thuốc BVTV không chỉ tác dụng tại nơi xử lý mà còn gây ô nhiễm các vùng lân cận do thuốc bị bốc hơi đi vào khí quyển và được gió mang đi xa. Thuốc có thể bị lắng tụ trong các vực nước do mưa rửa trôi, có thể hiện diện trong đất nước, nước ngầm, không khí, súc vật, con người và nhiều loại sản phẩm khác nhau và được tích lũy phóng đại theo chuỗi thức ăn. Sự tích lũy thường gắn liền với thuốc có tính lưu tồn trong đất và nước (Lê Huy Bá, 2006).



Hình 2.5 Con đường di chuyển thuốc BVTV trong môi trường đất

(Nguồn: Lê Huy Bá, 2006)

Việc lưu tồn thuốc BVTV trong môi trường, đặc biệt là trong môi trường đất, nước bị ảnh hưởng bởi tính chất của thuốc BVTV như tính hòa tan, tính hấp phụ, tính bay hơi, tính phân hủy và phụ thuộc vào đặc tính của đất như sa cấu đất, hàm lượng chất hữu cơ... Bên cạnh đó điều kiện môi trường của địa điểm nơi thuốc BVTV được sử dụng như độ sâu đến nước ngầm, khí hậu,... hay thực tiễn quản lý thuốc BVTV cũng ảnh hưởng đến sự lưu tồn thuốc BVTV (Veronique *et al.*, 2011).

Theo Jesse (1992) các yếu tố ảnh hưởng đến sự lưu tồn thuốc BVTV trong đất, nước bao gồm 4 yếu tố chính sau:

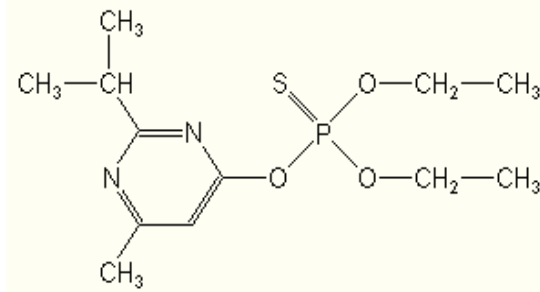
- *Tính chất của thuốc BVTV* ảnh hưởng đến sự di chuyển vào nguồn nước ngầm bao gồm tính tan, tính hấp phụ, tính bay hơi và tính phân hủy;
- *Đặc tính của đất* ảnh hưởng đến sự di động của thuốc BVTV bao gồm: sa cấu đất, tính thấm thấu của đất và hàm lượng chất hữu cơ;
- *Các điều kiện của địa điểm nơi thuốc BVTV được sử dụng* cũng có thể ảnh hưởng đến sự di động của thuốc BVTV. Các điều kiện bao gồm: độ sâu của nước ngầm, điều kiện địa chất và khí hậu;
- *Thực tiễn quản lý* bao gồm các phương pháp sử dụng thuốc BVTV, liều lượng và thời gian của việc sử dụng thuốc.

2.3 Tổng quan về hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Trong các hợp chất thuốc BVTV gốc lân hữu cơ, có khoảng 50 hoạt chất thuộc họ phosphorothioates và phosphorodithioates, các hợp chất này tồn tại liên kết thiono (P=S). Các hợp chất có liên kết P=S thường bền hơn hợp chất tương tự có liên kết P=O và có khả năng thâm nhập vào lớp biểu bì của côn trùng tốt hơn nhưng lại có độc tính thấp hơn với động vật có vú nên được sử dụng khá phổ biến. Diazinon là một hợp chất thuộc họ phosphorothioates được dùng nhiều trong thực tế (Lê Thị Trinh, 2012).

Diazinon được đăng ký đầu tiên tại Mỹ vào năm 1956 bởi công ty Thụy Sĩ JR Geigy (US EPA, 2006). Các sản phẩm thuốc BVTV chứa Diazinon được tổng hợp ở dạng chất lỏng, hạt và hơi (Lê Thị Trinh, 2012). Trong nông nghiệp, Diazinon là hoạt chất tạo nên nhiều loại thuốc trừ sâu, trừ côn trùng cho lúa, rau và nhiều loại cây ăn trái, cụ thể Diazinon là thành phần chính của khoảng hơn nhiều loại thuốc BVTV gốc lân hữu cơ đã thương mại hóa như Alfatox, Agrozinon, AG 500, Azinon, Basudin, Basitox, Cazinon, Dazzel, Diaphos, Diazan, Gardentox, Kayazol, Knox-out, Nucidol, Phantom, Tizonon, Vibasa... (Lê Thị Trinh, 2012; Nguyễn Văn Công, 2012).

Diazinon có tên khoa học (IUPAC) là *O,O*-diethyl-*O*-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl)-phosphorothioates, là sản phẩm tổng hợp không tồn tại trong tự nhiên. Ngoài ra, Diazinon còn một số tên gọi khác như: *O,O*-diethyl-*O*-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioates; *O,O*-diethyl-*O*-6-methyl-2-isopropyl-4-pyrimidinyl phosphorothioates (Abo-Ame and Aly, 2010; Lê Thị Trinh, 2012; Helena *et al.*, 2011; Trần Văn Hai, 2009). Công thức phân tử của Diazinon là $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$. Công thức cấu tạo của Diazinon ở được thể hiện qua Hình 2.6.



Hình 2.6 Công thức cấu tạo Diazinon

Diazinon dạng tinh thể không màu và dạng lỏng có màu vàng nâu sẫm, ít hòa tan trong nước, khoảng 40-60 mg/L tùy nhiệt độ, hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ như cồn, Benzene, Toluene, Hexan, Cyclohexan, Dichlormethan, Acetone và tan hoàn toàn trong dầu hỏa (Lê Thị Trinh, 2012; Trần Văn Hai, 2009). Một số tính chất lý hóa cơ bản của Diazinon được trình bày ở Bảng 2.4.

Ngoài ra, theo EPA (2006) và Nguyễn Văn Công (2012), Diazinon bị phân hủy nhanh ở môi trường axit và kiềm nhưng tồn tại lâu ở môi trường trung tính; thời gian bán hủy (DT_{50}) trong nước ở 20°C, pH 3,1, 7,4 và 10,4 lần lượt là 11,77 giờ, 185 ngày và 6 ngày. Trong đất thời gian bán hủy của Diazinon dao động từ 2-4 tuần. Thời gian bán hủy của Diazinon trong nước dưới tác động của ánh sáng mặt trời là 24,6 ngày.

Bảng 2.4 Một số tính chất vật lý và hóa học của Diazinon

Tính chất	Thông tin
Tên hóa học (IUPAC)	<i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -2-isopropyl-6 methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate
Khối lượng phân tử	304,35 g/mol
Trạng thái vật lý	Không màu, dạng lỏng có màu nâu sẫm;
Độ tan trong nước	0,06 g/L (20°C); 0,054 và 0,069 g/L (20-40°C)
Khối lượng riêng	1,116 g/cm ³ (20°C), 1,118 g/cm ³ (4°C)
Hệ số phân vùng Octanol/water, Log <i>K</i> _{ow} (Log <i>K</i> _{ow} = p <i>K</i> _{ow})	3,69 (pH 7, 20°C) 3,29 3,3-3,81
Thời gian bán hủy bằng con đường quang phân	5,05 ngày (pH 7, 25°C) 50 ngày (pH 7)
Thời gian bán hủy bằng con đường thủy phân	12,4 ngày (pH 5, 24°C) 43,3 ngày (pH 7,4, 16°C) 138 ngày (pH 7, 24°C)
Áp suất bay hơi	8,4x10 ⁻⁵ mmHg (20°C); 8,97x10 ⁻⁵ mmHg (25°C) 2,8x10 ⁻⁴ mmHg (30°C)
Nhiệt độ sôi	82-84°C (ở 2x10 ⁻⁴ mmHg)
<i>K</i> _{oc}	40-432 mL/g, tùy thuộc vào loại đất và điều kiện môi trường
Hằng số của định luật Henry	1,4x10 ⁻⁶ atm.m ³ /mol (25°C) 1,13x10 ⁻⁷ atm.m ³ /mol tùy thuộc vào phương pháp sử dụng 6,01x10 ⁻⁷ atm.m ³ /mol (25°C)

(Nguồn: Aggarwal et al., 2013)

2.4 Tác hại của hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Diazinon gây độc cho sinh vật qua cơ chế làm giảm hoạt tính enzyme Acetylcholinesterase (*AChE*); enzyme có chức năng thủy phân Acetylcholine

thành Choline và Acid Acetic. Khi *AChE* bị ức chế bởi Diazinon thì Acetylcholine không được thủy phân nên sẽ tích tụ ở các đầu nối thần kinh, dẫn đến nhiều ảnh hưởng khác nhau (Nguyễn Văn Công, 2012).

Ảnh hưởng của Diazinon đối với thủy sinh vật:

Trong nuôi trồng thủy sản, Diazinon được sử dụng để diệt giáp xác trong các ao nuôi tôm và sán lá trong các trại tôm giống. Nhiều nơi trên thế giới như Châu Âu, Mỹ đã cấm sử dụng Diazinon do đã có nhiều bằng chứng ảnh hưởng về sinh thái của nó. Dù trên nhãn thuốc BVTV chứa hoạt chất Diazinon bán ở ĐBSCL như Basudin, Diazan có ghi chú “*Thuốc độc đối với cá*” nhưng Cục Bảo Vệ Thực Vật vẫn cho phép lưu hành sử dụng. Qua các nghiên cứu ảnh hưởng Diazinon trên cá lóc và tham khảo các nghiên cứu khác ở nhiều nơi trên thế giới cho thấy Diazinon là thuốc BVTV có tính độc lâu dài đến sinh thái (Nguyễn Văn Công và Nguyễn Thanh Phương, 2011).

Enzyme Cholinesteraza (*ChE*) đóng vai trò quan trọng trong điều tiết chức năng bình thường của chất dẫn truyền xung thần kinh Acetylcholine tại các đầu nối hệ thống thần kinh ở động vật. ChE bao gồm Acetylcholinesterase (*AChE*) và Butyrylcholinesterase (*BchE*) (Chuiko *et al.*, 2003). Khi enzyme *AChE* bị ức chế đến 70% sẽ làm chết đa số động vật thủy sinh và 30% bị ức chế được xem là ngưỡng tối đa cho phép không gây ảnh hưởng đến sức khỏe sinh vật (Aprea *et al.*, 2002).

Diazinon là hợp chất thuộc nhóm lân hữu cơ, tính độc chủ yếu qua sự ức chế men *AChE*. Diazinon khá độc đối với các loài thủy sinh vật. Nồng độ gây độc cấp tính của Diazinon (LC_{50} hoặc EC_{50}) đối với đa số loài thủy sinh vật thường nhỏ hơn 1 mg/L. Giá trị LC_{50} của Diazinon đối với các nhóm giáp xác bậc thấp nhỏ hơn các nhóm tôm và cá. Nồng độ Diazinon trong nước trên ruộng lúa ở ĐBSCL sau một giờ phun cao hơn giá trị LD_{50} các nhóm giáp xác bậc thấp nhiều lần. Qua đó cho thấy ở nồng độ thấp dù chưa gây chết tôm, cá nhưng đã làm chết các nhóm giáp xác bậc thấp vốn là thức ăn cho các loài tôm, cá. Như vậy, Diazinon đã gây ảnh hưởng gián tiếp đến các loài tôm, cá có giá trị thực phẩm hay kinh tế cho con người (Nguyễn Văn Công, 2012).

Ngoài ra, ở nồng độ dưới ngưỡng gây chết cho tôm, cá, Diazinon còn làm ảnh hưởng lâu dài đến hoạt tính enzyme *AChE*, làm ảnh hưởng đến hoạt động bình thường về thần kinh của thủy sinh vật. Thực nghiệm ở ĐBSCL cho thấy sau một lần phun Diazinon cho lúa, dù cá Lóc (*Channa striata*) và cá Rô

(*Anabas testudineus*) được bố trí trên ruộng lúa hay ở ruộng bao quanh ruộng thì hoạt tính ChE đều bị ức chế đến khoảng 70% sau một ngày phun; tỷ lệ ức chế dù có giảm dần theo thời gian sau khi phun nhưng vẫn luôn cao hơn ngưỡng giới hạn cho phép không ảnh hưởng đến hoạt động thần kinh bình thường của đa số sinh vật trong suốt 3 tuần sau khi phun (Nguyễn Văn Công, 2012). Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Vigfusson *et al.* (1983), Diazinon đã gây ra thiệt hại di truyền trong cá ở nồng độ là 1 ppb hoặc thấp hơn. Diazinon cũng làm suy yếu khả năng phát triển hành vi trong cá con, đặc biệt là khả năng phát triển cảm giác về mùi để phát hiện kẻ thù (Nathaniel *et al.* 2000). Theo Nguyễn Văn Công và Nguyễn Thanh Phương (2011), khi sử dụng Diazinon trên ruộng lúa có khả năng gây ra ức chế enzyme Cholinesterase, làm giảm tăng trưởng, gia tăng tập tính đớp khí và có khả năng gây chết cá con khi nó được sinh sản trên ruộng đối với cá lóc (*Chana Striata*). Một số nghiên cứu khác cho thấy khi AChE bị ức chế dù chưa đến mức làm chết thủy sinh vật nhưng làm tăng co rút cơ, giảm khả năng bơi lội để bắt mồi hay lẩn tránh kẻ thù. Các ảnh hưởng này có thể làm suy giảm sinh trưởng và tồn tại của thủy sinh vật (Nguyễn Văn Công, 2012).

Ảnh hưởng của Diazinon đối với động vật:

Liều lượng gây độc cấp tính (LD_{50}) của Diazinon đối với động vật trên cạn cao hơn động vật thủy sinh, giá trị LD_{50} đối với chuột (rat) là 1250 mg/kg, đối với chuột nhắt (mice) từ 80-135 mg/kg, với thỏ là 400 mg/kg. Diazinon rất độc đối với chim, LD_{50} dao động từ 3,5-4,3 mg/kg (NPIC, 2012; Nguyễn Văn Công, 2012). Ở Canada, Diazinon là chất độc cấp tính với các loài chim ở liều nhỏ hơn 10 mg/kg, loài đặc biệt nhạy cảm là ngỗng, chim sẻ, vịt trời và chim két cánh đỏ (US EPA, 2000).

Ảnh hưởng của Diazinon đối với con người:

Cũng giống như nhiều thuốc trừ sâu khác, nhiễm độc cấp tính và mãn tính Diazinon đều có ảnh hưởng lớn đến sức khỏe con người, thậm chí tử vong. Triệu chứng độc cấp tính của Diazinon cũng tương tự như các hợp chất lân hữu cơ khác bao gồm đau đầu, buồn nôn, tiết nước bọt, tỷ lệ tim bất thường, các triệu chứng giống như cúm, động kinh, co giật và gây tử vong (Halle and Sloas, 1987; Murray *et al.*, 1992; Reigart and Roberts, 1999; Wecker *et al.*, 1985). Động kinh là triệu chứng phổ biến ở trẻ em hơn đối với người lớn khi trải qua phơi nhiễm cấp tính. Ngoài ra, trẻ em cũng dễ bị viêm tuyến tụy khi tiếp xúc với Diazinon (Weizman and Sofer, 1992). Trẻ em đặc biệt dễ bị ngộ độc Diazinon và ảnh hưởng khi tiếp xúc với thuốc trừ sâu Diazinon có thể gây hậu quả lâu dài. Một trẻ sơ sinh hai tháng tuổi xuất hiện các triệu chứng bại não kéo dài trong bảy tháng, đó là kết quả của việc sử dụng Diazinon trong nhà của chúng trong thời gian đó (Wagner and Orwick, 1994). Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy, bà mẹ bị nhiễm Diazinon làm giảm sự phát triển của thai nhi. Các nghiên cứu khác kết luận có mối liên quan giữa những người tiếp xúc với Diazinon và khả năng bị nhiễm bệnh ung thư. Nghiên cứu trên một số trẻ em ở Missouri (Mỹ) có cha mẹ thường xuyên sử dụng Diazinon trong vườn thì có nguy cơ ung thư não ở chúng tăng cao (Lê Thị Trinh, 2012).

Ngoài ra, một nghiên cứu khác do Viện Ung thư quốc gia Mỹ thực hiện với nông dân ở một địa phương của quốc gia này cho thấy, việc tiếp xúc với Diazinon thường xuyên làm tăng nguy cơ ung thư máu dạng Non-Hodgkin (Lê Thị Trinh, 2012).

2.5 Động thái của thuốc trừ sâu Diazinon trong đất và nước

Diazinon là một trong những hoạt chất thuốc trừ sâu thuộc nhóm lân hữu cơ và được sử dụng rộng rãi để kiểm soát côn trùng và sâu hại trên nhiều loại cây trồng như lúa, cây ăn quả, mía, ngô và khoai tây. Diazinon cũng được sử dụng để kiểm soát động vật kí sinh trên cừu, bò, lợn, dê, ngựa. Ở California, Diazinon được sử dụng chủ yếu để bảo vệ hình thái nông sản trên đối tượng cây trồng như cây ăn trái và rau màu (Vaneet *et al.*, 2013).

Trong một nghiên cứu về dư lượng thuốc BVTV trong nước mặt ở Mỹ và Canada (1976-1980) thực hiện bởi Carey and Kutz (1985) với kết quả phát hiện dư lượng Diazinon đạt 7,1 ppb. Bên cạnh đó, nước trong nhiều kênh rạch

gần khu vực canh tác nông nghiệp đã phát hiện Diazinon với nồng độ trung bình 0,07 ppb. Diazinon là chất gây ô nhiễm cả nước mặt và nước ngầm (Vaneet *et al.*, 2013).

Trong nước Diazinon có thể hấp phụ vào đất trầm tích và quá trình này có vai trò quan trọng trong việc hạn chế ô nhiễm nước bề mặt và nước ngầm do Diazinon. Trong nước tiết trùng tốc độ thủy phân của Diazinon phụ thuộc vào giá trị pH (Chapman and Cole, 1982) (Bảng 2.5) và sản phẩm chính của quá trình này là 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine, axit diethylthiophosphoric hoặc axit diethylphosphoric (Larkin and Tjeerdema, 2000). Ngoài ra, tốc độ thủy phân Diazinon khi có ion Cu^{2+} cao gấp khoảng 5 lần so với môi trường không có ion Cu^{2+} ở nhiệt độ 25°C và $\text{pH} = 4,9$. Trong nước tốc độ thủy phân Diazinon cao hơn trong đất trầm tích khoảng 2,3 lần. Trong số các nhân tố vô sinh phân hủy Diazinon trong nước tự nhiên, thì thủy phân và phản ứng oxy hóa khử có vai trò quan trọng nhất (Brooke and Smith, 2005).

Theo Frank *et al.*, (1991) nhiệt độ là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến phân hủy Diazinon, nhưng nhóm tác giả này cho rằng thủy phân là quá trình chủ yếu phân hủy Diazinon trong nước. Tương tự, theo Garcia-Repetto *et al.*, (1994) và Bondarenko *et al.* (2004) cho rằng tốc độ phân hủy Diazinon nhanh dưới điều kiện nhiệt độ cao và pH axit. Khi nhiệt độ môi trường nước xuống dưới 10°C thì Diazinon có thể lưu tồn dài với thời gian bán hủy trong nước ngọt là 25-28,3 ngày và trong nước biển là 124 ngày. Từ kết quả này cho thấy trong điều kiện pH và nhiệt độ tương tự thì Diazinon lưu tồn trong nước biển dài hơn trong nước ngọt. Nguyên nhân là do trong môi trường nước biển sự đa dạng về loài và số lượng vi sinh vật thấp. Trong môi trường nước biển Diazinon bị phân hủy chủ yếu là do các tác nhân vô sinh. Ngược lại trong môi trường nước ngọt thì nhân tố hữu sinh (vi sinh vật) có vai trò quan trọng trong phân hủy Diazinon (Sharom *et al.*, 1980b).

Bảng 2.5 Tốc độ thủy phân của Diazinon trong nước ở 25⁰C

pH	Thời gian bán hủy (ngày)
4,5	3,15
5	14,0
6	54,6
7	70
8	53,9

(Nguồn: Chapman and Cole, 1982)

Trong nước, quang phân là quá trình không quan trọng trong phân hủy Diazinon. Tốc độ phân hủy Diazinon trong nước mặt (có ánh sáng) và trong nước ngầm (trong tối) gần tương đương nhau tương ứng là 0,8%/ngày và 0,7%/ngày (Frank *et al.*, 1991).

Như vậy, trong môi trường nước Diazinon có thể phân hủy bởi các tác nhân như: thủy phân, pH, nhiệt độ, nồng độ muối và vi sinh vật. Trong đó, thủy phân được xem là quá trình chủ yếu trong phân hủy Diazinon. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy thì dư lượng thuốc Diazinon trong nước với nồng độ thấp và có thể phân hủy trong thời gian ngắn. Qua đó, cho thấy ô nhiễm Diazinon trong nước chưa phải là vấn đề báo động nhưng cũng cần quan tâm để góp phần ngăn chặn, hạn chế ô nhiễm trong tương lai.

Diazinon có thể bị phân hủy thông qua một số quá trình như: thủy phân, quang phân, phân hủy bởi vi sinh vật và có thể trực di xuống nước ngầm. Trong đất phân hủy sinh học Diazinon là con đường chính. Diazinon hấp thụ vào đất phụ thuộc vào giá trị pH, hàm lượng chất hữu cơ (OM) và hàm lượng sét. Khi OM và hàm lượng sét tăng thì khả năng hấp thụ tăng (Armstrong *et al.*, 1967). Thuốc BVTV có chỉ số K_{oc} cao thì có xu hướng hấp thụ vào đất tốt, ngược lại đối với thuốc BVTV có chỉ số K_{oc} thấp sẽ có xu hướng rửa trôi vào dòng nước. Giá trị K_{oc} của Diazinon được xác định trong nhiều loại đất dao động trong khoảng từ 40-432 (K_{oc} trung bình là 191) nên có khả năng rửa trôi ở mức độ trung bình và chủ yếu hấp phụ vào đất. Theo nghiên cứu của Konrad *et al.*, (1967) khi hàm lượng chất hữu cơ trong đất càng cao thì tốc độ phân hủy Diazinon càng nhanh. Diazinon hấp phụ vào đất thông qua liên kết H và làm giảm pH đất nên tăng mức độ hấp phụ (Konrad *et al.*, 1967). Nhiều nghiên cứu cho thấy Diazinon hấp thụ vào đất khác nhau tùy thuộc vào

độ sâu như ở độ sâu 0-10 cm hấp thu cao hơn độ sâu 40-50 cm gấp 7,5 lần (Sarmah *et al.*, 2009). Nguyên nhân là do ở độ sâu càng lớn thì hàm lượng chất hữu cơ càng ít. Qua đó cho thấy dư lượng thuốc trừ sâu Diazinon trong đất canh tác có thể bị rửa trôi khi hàm lượng chất hữu cơ trong đất thấp.

Bên cạnh đó, dư lượng thuốc trừ sâu Diazinon trong đất còn xảy ra quá trình trực di gây ô nhiễm nước ngầm. Quá trình trực di phụ thuộc vào các yếu tố như lượng mưa, độ sâu của nước ngầm, loại đất và tốc độ phân hủy. Đất pha cát trực di gấp 2 lần so với đất có hàm lượng chất hữu cơ cao (Sharom *et al.*, 1980). Trong đất, Diazinon có thể bị rửa trôi khi hàm lượng chất hữu cơ bé hơn 3% và nếu hàm lượng chất hữu cơ cao hơn 3% thì Diazinon được hấp thu vào đất tốt mà không phát hiện có sự rửa trôi (Levanon *et al.*, 1994). Bên cạnh đó, Diazinon có chỉ số K_{oc} cao nên góp phần hạn chế quá trình trực di vào nước ngầm mà chủ yếu là hấp thu vào đất hoặc chất hữu cơ. Qua đó cho thấy khả năng ô nhiễm nguồn nước ngầm do Diazinon là rất thấp.

Ngoài ra, Diazinon khi tồn tại trong đất còn có thể xảy ra quá trình khoáng hóa là quá trình biến đổi Diazinon thành các chất vô cơ như CO_2 , H_2O và các chất vô cơ khác. Tốc độ khoáng hóa xảy ra nhanh hơn khi có sự tác động của vi sinh vật sử dụng Diazinon như nguồn cacbon và năng lượng (Fenlon *et al.*, 2007). Trong lớp đất mặt có độ sâu 0-5 cm thì quá trình khoáng hóa xảy ra với tốc độ nhanh hơn các lớp đất có độ sâu hơn 5 cm (Levanon *et al.*, 1994). Nguyên nhân có thể là do ở lớp đất mặt hàm lượng chất hữu cơ cao và mật độ vi sinh vật lớn nên đã góp phần tăng khả năng phân hủy Diazinon (Sarmah *et al.*, 2009). Diazinon có thời gian tồn tại trong đất ngắn với chu kỳ bán hủy là 34,8 ngày (Singh and Singh, 2005).

Tốc độ phân hủy Diazinon trong đất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nhiệt độ, độ sâu (Sarmah *et al.*, 2009) và hàm lượng cacbon hữu cơ (Sattar, 1990) (Bảng 2.6). Theo báo cáo của Sarmah *et al.*, (2009) hàm lượng chất hữu cơ và hoạt động của vi sinh vật giảm dần theo độ sâu của đất và từ đó làm giảm khả năng hấp thụ thuốc BVTV nên tốc độ phân hủy chậm. Như vậy, đối với những khu vực ô nhiễm thuốc Diazinon trên diện rộng có thể bổ sung thêm chất hữu cơ vào đất để tăng khả năng hấp thụ Diazinon và phân hủy. Biện pháp này có thể áp dụng trong điều kiện canh tác nông nghiệp ở Việt Nam và mang tính khả thi cao với chi phí thấp.

Bảng 2.6 Ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ đến thời gian bán hủy Diazinon ở 25⁰C

Hàm lượng chất hữu cơ (%)	Thời gian bán hủy (ngày)
0,5	36
0,6	28

(Nguồn: Sattar, 1990)

Trong đất không ngập nước Diazinon có thể bị phân hủy bởi thủy phân và tốc độ thủy phân tăng khi tính axit tăng (Bảng 2.7). Sản phẩm chính của quá trình này là 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxy pyrimidine (Sethunathan and Yoshida, 1969). Qua đó, cho thấy Diazinon có thể tồn tại lâu nhất trong đất có pH trung tính và phân hủy nhanh nhất trong đất có pH axit.

Như vậy, đối với đất canh tác nông nghiệp ô nhiễm thuốc trừ sâu Diazinon có thể làm thay đổi giá trị pH. Việc thay đổi giá trị pH bằng cách bổ sung hoặc tạo điều kiện tối ưu để vi sinh vật bản địa có khả năng sinh axit trong quá trình tăng trưởng từ đó góp phần thúc đẩy quá trình phân hủy Diazinon. Đây có thể là biện pháp tối ưu và hiệu quả để xử lý ô nhiễm thuốc trừ sâu Diazinon trên diện rộng.

Bảng 2.7 Thủy phân Diazinon trong đất sét

pH	Thời gian bán hủy (ngày)
4	49
7	124
10	90

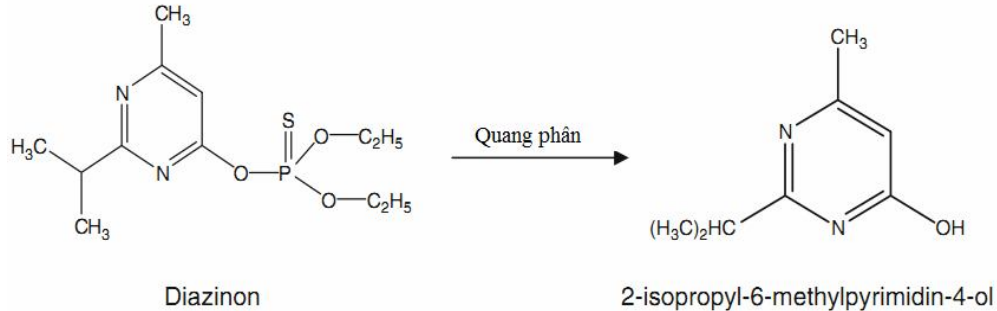
(Nguồn: Sethunathan and Yoshida, 1969)

Quang phân Diazinon trong lớp đất mặt với sản phẩm chính là 2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-ol (Burkhard and Guth, 1979) (Hình 2.7). Tốc độ quang phân Diazinon trong đất mặt khô ráo chậm hơn trong điều kiện ẩm ướt tương ứng là 44% và 51% sau 24 giờ. Diazinon bị phân hủy trong đất mặt bởi quá trình quang phân với thời gian bán hủy dao động từ 17,3-37,4 giờ.

Như vậy, khi Diazinon lưu tồn trong đất và tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời thì tốc độ phân hủy xảy ra rất nhanh và có thể ứng dụng phương pháp này để xử lý đất ô nhiễm Diazinon. Một phương pháp có thể áp dụng để

tạo điều kiện cho Diazinon lưu tồn trong đất tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng là thực hành làm đất (cày đất).

(Burkhard and Guth, 1979)



Hình 2.7 Quá trình quang phân Diazinon trong lớp đất mặt

(Nguồn: Burkhard and Guth, 1979)

2.6 Phân hủy sinh học thuốc trừ sâu Diazinon

Biện pháp phân hủy sinh học thuốc BVTV dựa trên cơ sở sử dụng nhóm vi sinh vật có sẵn môi trường đất và các sinh vật có khả năng sử dụng nguồn carbon từ thuốc BVTV cho sự sinh trưởng. Ngoài ra, biện pháp phân hủy sinh học thuốc BVTV còn dựa trên cơ sở thích nghi của vi sinh vật nhằm đáp ứng lại đối với sự thay đổi của điều kiện môi trường sống. Trong đất, thuốc BVTV bị phân hủy bởi các các tiến trình như: phản ứng ôxy hoá-khử, thủy phân, ánh sáng, do enzyme và hoạt động của hệ vi sinh vật đất. Cộng đồng vi sinh vật đất rất phong phú và phức tạp. Chúng có thể phân hủy và sử dụng Thuốc BVTV như là nguồn cung cấp dinh dưỡng, nguồn cung cấp carbon, nitơ và năng lượng để cấu tạo nên cấu trúc cơ thể (Rao and Sethunathan, 1979).

Nghiên cứu về sự phân hủy Diazinon, tác giả Gunner *et al.*(1966) sử dụng vi khuẩn thuộc chi *Arthrobacter* phân lập từ đất để nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến sự phân hủy Diazinon. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự tương tác giữa quá trình thủy phân và vi khuẩn có khả năng chuyển hóa các sản phẩm thủy phân Diazinon (Gunner *et al.*, 1966). Sau đó, Gunner *et al.* (1966) đã báo cáo rằng sự chuyển hóa Diazinon bởi các chủng vi khuẩn phân lập có ảnh hưởng từ dung môi hòa tan thuốc Diazinon và nguồn carbon bổ sung.

Theo nghiên cứu của Ramanathan and Lalithakumari (1999) đã phân lập được dòng *Pseudomonas* sp. A3 từ đất có thể phân hủy Diazinon. Theo sau đó, Mulbry (2000) đã phân lập được hai dòng vi khuẩn là *Pseudomonas diminuta* MG và *Flavobacterium* sp. ATCC 27551, hai dòng vi khuẩn này có thể phân hủy một lượng đáng kể thuốc trừ sâu lân hữu cơ tổng hợp.

Bên cạnh đó, theo Mahiudddin *et al.* (2014) vi khuẩn *Burkholderia* có thể góp phần vào sự phân hủy hoàn toàn Diazinon. Đã có những nghiên cứu về những loài vi khuẩn như: *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Agrobacterium* sp., có thể sử dụng Diazinon như nguồn cacbon duy nhất (Yasouri, 2006). Ngoài ra, những loài vi khuẩn đó cũng có thể góp phần phân hủy sinh học các thuốc trừ sâu lân hữu cơ khác (Abo-Amer and Aly, 2011). Theo một số nghiên cứu, vi khuẩn *Pseudomonas* được phân lập từ đất bị nhiễm Diazinon và các thuốc trừ sâu lân hữu cơ khác đều có khả năng trao đổi chất rất mạnh và sử dụng nhiều hợp chất hữu cơ tổng hợp cũng như nhiều nông dược khác (Ghassempour *et al.*, 2002; Lakshmi *et al.*, 2008).

Kết quả nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2010) đã phân lập được dòng vi khuẩn *Serratia marcescens* DI101 có khả năng phân hủy hoàn toàn Diazinon trong môi trường MSM có bổ sung Diazinon như nguồn cacbon duy nhất ở nồng độ 50 mg/L. Gần đây Mahiudddin *et al.* (2014) cũng đã phân lập được 3 dòng vi khuẩn là *Pseudomonas peli* BG1, *Burkholderia caryolhylli* BG4 và *Brevundimonas diminuta* PD6. Tất cả ba dòng trên đều có thể phân hủy hoàn toàn 20 mg/L Diazinon trong môi trường muối khoáng MSM như một nguồn cacbon duy nhất trong 12 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, sự tăng trưởng của vi khuẩn và sự phân hủy Diazinon của các dòng được tăng lên khi môi trường MSM (Mineral Salt Medium) có bổ sung 0,5% (khối lượng/thể tích) glucose. Kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy mối tương quan giữa phân hủy Diazinon, sự tăng trưởng của quần thể vi khuẩn và pH trong môi trường MSM khi có bổ sung và không có bổ sung glucose trong thời gian thí nghiệm. pH của môi trường nuôi cấy giảm mạnh hơn khi bổ sung glucose như một hệ quả của sự trao đổi chất của vi khuẩn trong quá trình sinh trưởng (Mahiudddin *et al.*, 2014). Tương tự, một số kết quả nghiên cứu khác cho rằng tốc độ phân hủy Diazinon được tăng lên khi bổ sung glucose vào môi trường MSM (Drufovka *et al.*, 2008; Cycon *et al.*, 2009). Phân hủy sinh học Diazinon nhanh hơn đáng kể khi môi trường nuôi bổ sung các chất có trọng lượng phân tử nhỏ và dễ phân hủy (như là glucose hoặc ethanol) đã được nghiên cứu bởi

Drufovka *et al.* (2008). Theo nghiên cứu của Sethunathan and Yoshida (1973) cho thấy, sự phân hủy Diazinon của vi sinh vật được tăng cường khi có sự hiện diện của một nguồn cacbon hữu cơ như glucose và rượu.

Nhiều nghiên cứu cho thấy có nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc BVTV thuộc nhóm lân hữu cơ có độ độc cao và thời gian lưu tồn lâu dài trong môi trường đất. Các vi khuẩn như *Arthrobacter* và *Streptomyces* có khả năng phân hủy nhanh Diazinon trong môi trường đất (Haim and Bert, 1968). Theo kết quả nghiên cứu của Cycon *et al* (2009) ba chủng vi khuẩn: *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* và *Pseudomonas* sp. đều có khả năng phân hủy Diazinon trên môi trường MSM (mineral salt medium) có bổ sung Diazinon (50 mg/l) như là nguồn cacbon duy nhất. Thí nghiệm kiểm chứng cho thấy sau 14 ngày 80-92% lượng Diazinon ban đầu đã phân hủy bởi hệ vi sinh vật gồm 3 chủng vi khuẩn trên. Tốc độ phân hủy Diazinon được gia tăng khi bổ sung thêm glucose vào môi trường nuôi cấy, tuy nhiên kết quả cho thấy giá trị pH giảm theo thời gian. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu về khả năng phân hủy Diazinon của 3 dòng vi khuẩn riêng biệt và tổ hợp gồm 3 dòng vi khuẩn trên với nhau trong môi trường đất tiệt trùng và không tiệt trùng cho thấy như sau: 50% lượng hoạt chất Diazinon phân hủy dao động từ 11,5 ngày đến 24,5 ngày trong điều kiện đất tiệt trùng, trong khi trong điều kiện đất không tiệt trùng và không bổ sung vi khuẩn thì chỉ có 2% Diazinon phân hủy trong cùng thời gian.

Các kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự phân hủy Diazinon bị ảnh hưởng bởi tác nhân chủng vi khuẩn, pH và nhiệt độ (Abo-Amer and Aly, 2011). Theo Mahiudddin *et al.* (2014) giá trị pH có liên quan mật thiết đến sinh trưởng của vi khuẩn và tốc độ phân hủy tương ứng của Diazinon. Giá trị pH trung bình của môi trường giảm mạnh khi Diazinon được phân hủy hoàn toàn như là nguồn cacbon duy nhất, và giá trị pH giảm nhanh khi môi trường nuôi cấy khi có bổ sung nguồn cacbon glucose. Bên cạnh đó, Drufovka *et al.* (2008) đã báo cáo rằng trong môi trường pH dưới 4,5 sự phân hủy Diazinon chủ yếu do quá trình hóa học và sự phân hủy Diazinon chủ yếu bằng con đường sinh học khi pH trung bình trên 5,0. Theo nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011), dòng vi khuẩn *Serratia marcescens* DI101 được phân lập có thể phân hủy hoàn toàn Diazinon như một nguồn cacbon ở pH 7,0-8,0 và nhiệt độ tối ưu từ 25-30°C.

Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Yaghoob *et al* (2010) các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon thuộc các chi như: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Providencia*. Những chủng vi khuẩn này sử dụng Diazinon như là nguồn cacbon và P (Yaghoob *et al.*, 2010). Ngoài nhóm vi sinh vật trên nhóm tác giả này đã phân lập được một chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng phân hủy Diazinon đến 82,9% sau 48 giờ là *Lactobacillus plantarum*. Theo báo cáo của Forrest *et al.*, (1981) vi khuẩn *Flavobacterium* sp. phân lập từ đất canh tác nông nghiệp có khả năng phân hủy Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu. Nhiều nghiên cứu cho thấy nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu như *Pseudomonas* spp. (Rosenberg and Alexander, 1979), *Arthrobacter* sp. (Barik *et al.*, 1979), *Flavobacterium* sp. và *P. diminuta* (Adhya *et al.*, 1981; Singh and Kuhad, 1999).

Ở Việt Nam hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về vai trò của vi khuẩn phân hủy Diazinon trong đất canh tác nông nghiệp. Tuy nhiên, gần đây theo nghiên cứu của Lê Thị Trinh (2013) đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon thuộc chi *Bacillus* từ đất cát pha bùn ở Hà Nội. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau thời gian 43 ngày chủng vi khuẩn hàm lượng Diazinon giảm 73,8% trong đất tệt trùng.

2.7 Hệ thống GC/MS

Sắc ký khí ghép khối phổ là một trong những phương pháp sắc ký hiện đại nhất hiện nay với độ nhạy và độ đặc hiệu cao và được sử dụng trong các nghiên cứu và phân tích kết hợp (Hình 2.8). Máy GC/MS dùng để phân tích các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi, có phân tử lượng thấp khoảng vài trăm, trong đó có một số loại thuốc BVTV. Nó giúp xác định chính xác các hợp chất trong mẫu dựa trên các chất có trong thư viện mẫu. Ngưỡng phát hiện của phương pháp này là 1 picogram (Dương Minh Viễn, 2011).

Cấu tạo của máy sắc ký khối phổ bao gồm bộ phận sắc ký dùng để phân tách hỗn hợp các chất hữu cơ, chất khí, được cấu tạo bởi buồng điều chỉnh nhiệt độ theo mong muốn, trong buồng có cột sắc ký mao dẫn. Cột được cấu tạo khác nhau và tùy theo đặc tính từng chất muốn phân tích mà sử dụng cột thích hợp. Cột dùng để phân tách hỗn hợp chất hữu cơ hoặc chất khí cần phân tích và cột sắc ký dùng khí mang Heli với độ tinh khiết gần 100% đưa các chất đi qua cột với tốc độ khác nhau đi vào đầu dò khối phổ bắn phá hợp chất, các

mảnh vỡ bắn ra với tín hiệu khác nhau. Tín hiệu đo được nhiều hay ít tùy thuộc vào hàm lượng chất đó có trong hỗn hợp. Các mảnh vỡ bắn ra có thể giúp biết được nồng độ dựa trên tín hiệu của chất chuẩn và xác định tên các chất thông qua phần mềm và thư viện chất có trong máy (Dương Minh Viễn, 2011).



Hình 2.8 Hệ thống sắc ký khí khối phổ GC.MS

Nguyên tắc hoạt động: mẫu sau khi trải qua quá trình sắc ký khí ở hệ thống sắc ký (GC) sẽ rời khỏi cột tách dưới dạng các cấu tử ở các thời điểm khác nhau và lần lượt đi vào detector, tại đây chúng được chuyển thành các tín hiệu điện. Tín hiệu điện này sẽ được khuếch đại sau đó chuyển sang tích phân kế có máy tính để xử lý các tín hiệu và được chuyển sang bộ phận in kết quả dưới dạng các đỉnh (peak) ứng với các cấu tử gọi là sắc ký đồ họa. Thời gian lưu của peak là đại lượng đặc trưng định tính của chất cần phân tích. Diện tích của peak là thước đo định lượng cho từng chất trong hỗn hợp nghiên cứu. (Nguyễn Đức Huệ, 2005)

2.8 Sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Sắc ký lỏng cao áp (High Pressure Liquid Chromatography hay High Performance Liquid Chromatography: HP/LC) là kỹ thuật tách và phân tích đồng thời các chất trong một hỗn hợp.

Quá trình tách trong kỹ thuật tách HPLC là tổ hợp của nhiều quá trình hóa học và lý học. Đó là những cân bằng động xảy ra trong cột sắc ký giữa pha tĩnh và pha động, là sự vận chuyển và phân bố lại liên tục của các chất tan trong hỗn hợp mẫu phân tích (pha động) theo từng lớp qua chất nhồi cột (pha tĩnh) từ đầu cột tới cuối cột tách. Trong quá trình đó, chất tan luôn luôn được

phân bố lại giữa hai pha, trong khi pha động luôn luôn chảy qua cột tách với một tốc độ nhất định, hay gradient. Trong những điều kiện sắc ký nhất định, chất tan luôn luôn phân bố trong hai pha theo những cân bằng động học. Chẳng hạn, mẫu phân tích được bơm vào cột sắc ký và được pha tĩnh giữ lại, thời gian mẫu bị giữ lại trong pha tĩnh gọi là thời gian lưu. Sau đó, quá trình sắc ký các chất trong mẫu phân tích sẽ diễn ra khi dung môi rửa giải của pha động bơm qua cột sắc ký. Trong quá trình sắc ký, các chất trong mẫu phân tích dịch chuyển qua lại giữa pha tĩnh và pha động nhiều lần từ đầu đến cuối cột sắc ký, quá trình này diễn ra cho đến khi chất cuối cùng trong mẫu phân tích được rửa giải xong. Nếu ghi lại quá trình đó ta sẽ có một sắc đồ gồm nhiều đỉnh trên giản đồ (peak), số đỉnh sẽ tương ứng với số chất có trong mẫu phân tích. Như vậy trong quá trình sắc ký, chất nào bị lưu giữ mạnh nhất sẽ được rửa giải ra sau cùng và do vậy được thể hiện ở đỉnh cuối cùng, chất nào bị lưu giữ yếu nhất sẽ được rửa giải đầu tiên nên được thể hiện ở đỉnh đầu tiên của sắc đồ (Luận, 1999 được dẫn bởi Nguyễn Thị Phi Oanh, 2011)

Kết quả sắc ký có thể định tính hoặc định lượng. Mẫu phân tích được tính bằng cách so sánh thời gian lưu của đỉnh sắc ký của mẫu phân tích với mẫu chuẩn. Nồng độ các chất trong mẫu phân tích có thể được xác định bằng cách so sánh chiều cao hay diện tích các đỉnh sắc ký của mẫu phân tích với mẫu chuẩn (Luận, 1999 được dẫn bởi Nguyễn Thị Phi Oanh, 2011).

2.9 Phản ứng PCR và nhận diện vi khuẩn phân hủy Diazinon bằng phương pháp sinh học phân tử

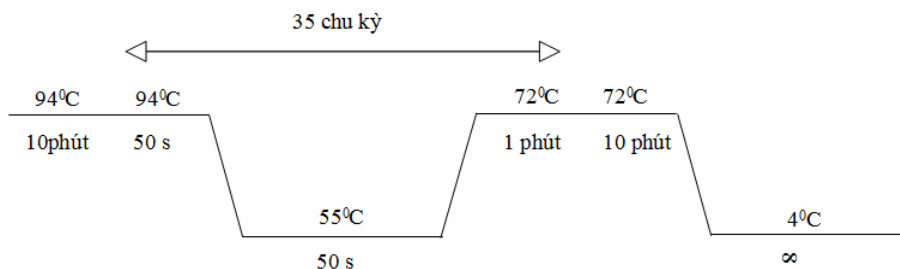
Phản ứng chuỗi sử dụng enzyme polymerase hay còn gọi là PCR (Polymerase Chain Reaction) là một phản ứng tổng hợp sợi DNA đơn dựa vào sợi DNA đơn khác làm khuôn và một đoạn oligonucleotid làm mồi. PCR cho phép nhân nhanh một đoạn DNA với nồng độ thấp (Saiki *et al.*, 1988) và sản phẩm PCR phụ thuộc vào đoạn mồi được thiết kế. Đối với vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ đoạn mồi được thiết kế sao cho nhằm vào đoạn gen có khả năng phân hủy các phức hợp hữu cơ (Lendvay *et al.*, 2003).

Theo kết quả nghiên cứu của Huang *et al* (2000) đã sử dụng thành công kỹ thuật PCR để nhân đoạn gen 16sRNA của *Micrococcus* sp có khả năng phân hủy thuốc Diazinon. Ngoài ra nhiều nghiên cứu của (Ariel and Edwards, 2006) sử dụng PCR để khuếch đại đoạn gen 16sRNA của *Dehalococcoides* spp có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ. Năm 2012, Saeed *et al* sử dụng cặp mồi 27F-1492R để nhân đoạn gen 16sRNA của *Pseudomonas*

aeruginosa, nhóm tác giả đã khẳng định chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy Diazinon và sản phẩm PCR có kích thước 1436 bp (Hình 2.9).

27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')



Hình 2.9 Các chu kỳ gia nhiệt thực hiện phản ứng PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) do Kary Mullis và cộng sự phát minh năm 1985 và đã được sử dụng rộng rãi. Đây là phương pháp nhân nhanh một đoạn phân tử DNA trong ống nghiệm (từ 200-2000bp). Phản ứng PCR là một chuỗi gồm nhiều chu kỳ nối tiếp nhau (khoảng 25 - 35 chu kỳ). Mỗi chu kỳ gồm có 3 giai đoạn:

- Giai đoạn biến tính (denaturation): Biến tính phân tử DNA thành mạch đơn ở nhiệt độ thường là 94⁰ – 96⁰C trong khoảng 30 giây – 1 phút.
- Giai đoạn lai (hybridization): nhiệt độ được hạ thấp cho phép các mồi bắt cặp với khuôn, nhiệt độ thường dao động khoảng 40 – 70⁰C trong 30 giây – 1 phút.
- Giai đoạn tổng hợp (elongation): tổng hợp sợi mới nhờ Taq polymerase, ở nhiệt độ 72⁰C trong khoảng 1,5 phút.

Chu kỳ được kết thúc bằng một “extension” ở 72⁰C trong 5 phút. Sau đó dừng hẳn và trữ sản phẩm PCR ở 4⁰C.

Những dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc bảo vệ thực vật mục tiêu được định danh bằng trình tự gen 16S-rRNA, 16S rRNA (16S ribosomal RNA) là một thành phần của tiểu đơn vị 30S của ribosome tế bào sơ hạch, có kích thước khoảng 1542 nucleotide. Các gen mã hóa cho chúng được gọi là 16S rDNA (DNA ribosome) và được sử dụng để xây dựng cây phả hệ (Case *et al.*, 2007). Trình tự gen 16S rRNA có chứa các trình tự đặc hiệu để có thể định danh vi khuẩn. Dựa vào trình tự gen 16S rRNA là phương pháp phổ biến để định danh vi khuẩn nhanh và chính xác (Clarridge, 2004).

2.10 Điện di biến tính DGGE

Phương pháp điện di biến tính trên gel gradient (DGGE) là phương pháp được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc cộng đồng vi sinh vật mà không cần thông qua phương pháp nuôi cấy. Phương pháp phân tích có nguồn gốc từ trong y học được Muzer *et al.* (1993) áp dụng vào lĩnh vực vi sinh. Đây là phương pháp phân tử chuyên biệt với sản phẩm DNA được tạo ra từ phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Các phản ứng PCR có thể tạo ra các mẫu trình tự DNA khác nhau đại diện cho nhiều nhóm sinh vật. Tuy nhiên, việc tách các sản phẩm PCR từ các phản ứng nhất định có kích thước (bp) tương tự nhau bằng phương pháp điện di trên gel agarose thì kết quả chỉ cho một băng DNA duy nhất. DGGE có thể vượt qua giới hạn này bằng cách tách biệt các sản phẩm PCR dựa trên sự khác biệt về trình tự dẫn đến sự khác biệt giữa các DNA biến tính. Trong DGGE, sản phẩm PCR gặp phải nồng độ ngày càng cao của hóa chất gây biến tính khi di chuyển thông qua gel polyacrylamide. Khi đạt đến một ngưỡng nồng độ biến tính nhất định, các phân tử DNA mạch kép sẽ bắt đầu tách mạch, tốc độ di chuyển sẽ chậm lại đáng kể. Trình tự khác nhau của DNA sẽ bị biến tính tại các mức nồng độ khác nhau. Về mặt lý thuyết, mỗi băng thu được đại diện cho một loài đặc trưng.

Một phân tử DNA ở dạng xoắn kép vài trăm cặp nucleotide khi bắt đầu biến tính sẽ di chuyển chậm lại và không di chuyển khi biến tính hoàn toàn (Meyer, 1997). Cấu trúc của DNA khác nhau thì khả năng biến tính khác nhau và tốc độ di chuyển khác nhau trong gel polyacrylamide (Riesner *et al.*, 1991). Theo Muzer and Smalla (1998) điện di biến tính tăng cấp (DGGE) có thể phân tích cùng lúc nhiều mẫu khác nhau và xác định được sự thay đổi về thành phần, giống loài trong cộng đồng vi sinh vật khi môi trường thay đổi. Tuy nhiên, DGGE cũng có một số hạn chế như đã không thể tách những đoạn rRNA khác nhau từ 2-3 nucleotide và DGGE chỉ có thể biến tính những đoạn DNA lên đến khoảng 500 bp (Buchholz Cleven *et al.*, 1997).

Chương 3: PHƯƠNG TIỆN, PHƯƠNG PHÁP VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

3.1. Phương tiện nghiên cứu

3.1.1 Thời gian và địa điểm tiến hành thí nghiệm

- Thời gian thực hiện luận án: Luận án được thực hiện từ tháng 6/2012 đến tháng 1/2016.

- Địa điểm:

Khảo sát và lấy mẫu đất phân lập vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon tại Chợ Mới - An Giang, Bình Minh - Vĩnh Long, Bình Tân-Vĩnh Long, Cai Lậy -Tiền Giang, Hòa An - Hậu Giang từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Đánh giá sự phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu bởi tổ hợp vi khuẩn và các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu tại phòng thí nghiệm Sinh học đất, Bộ môn khoa học đất, Khoa nông nghiệp, Đại học Cần Thơ.

Thí nghiệm khảo sát lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng tại Hòa An-Hậu Giang (mô hình chuyên màu), Bình Tân –Vĩnh Long (mô hình chuyên màu và luân canh lúa-màu), Cai Lậy-Tiền Giang (mô hình luân canh lúa-màu).

Thí nghiệm khảo sát lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon trong điều kiện nhà lưới tại Bộ môn Khoa học đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Các thí nghiệm khác trong phòng thí nghiệm tại phòng thí nghiệm Sinh Học Đất, Bộ Môn Khoa Học Đất, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

3.1.2 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm

Dụng cụ thu mẫu đất và dụng cụ thực hiện thí nghiệm gồm: khoan, túi nylon, giấy nhôm, bình tam giác 150 mL, ống nghiệm có nắp, chậu, đĩa petri, lọ bi, vial và các dụng cụ cần thiết khác.

Thiết bị thí nghiệm: Tủ cấy BioairESCO, máy tiệt trùng khô, máy tiệt trùng ướt, máy lắc vòng, máy lắc ngang, máy li tâm, tủ đông (-20⁰C, -30⁰C, -80⁰C), máy luân nhiệt PCR Applied Biosystem 9700, tủ ủ. Bộ điện di sản phẩm PCR, hệ thống điện di biến tính tăng cấp (DGGE). Máy quang phổ UV/Vis microplate, hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC/MS) Shimadzu QP-2010, hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và các thiết bị thí nghiệm khác.

3.1.3 Hóa chất

Dung dịch đệm phosphate (Phosphate Buffer) dùng để ly trích vi khuẩn từ đất: 23,99g NaH₂PO₄ (China) và 15,59g Na₂HPO₄ (China) pha trong một lít nước cất.

Môi trường Tryptose Soybean Agar (TSA) dùng để phân lập vi khuẩn: 30g Tryptone Soya Broth (TSB) (India), 15g Agar pha trong một lít nước cất (Joseph *et al.*, 2003).

Môi trường khoáng tối thiểu (Mineral Minimal Medium) dùng để nuôi sinh khối và khảo sát khả năng phân hủy Diazinon của vi khuẩn (tổ hợp và đồng): 870 ml nước khử khoáng, 25 ml dung dịch đệm (35 g Na₂HPO₄.2H₂O, 4 g KH₂PO₄ (China) pha trong một lít nước cất), 100 ml dung dịch muối khoáng (10 g (NH₄)₂SO₄, 2 g MgCl₂.6H₂O, 1 g Ca(NO₃)₂.4H₂O (Merck) pha trong một lít nước cất) và 5 ml dung dịch vi lượng (8,2 mg MnCl₂.2H₂O, 1,5 mg CuSO₄.5H₂O, 2 mg ZnCl₂, 0,6 mg SnCl₂.2H₂O, 2 mg KBr, 5,8 mg BaCl₂.2H₂O, 470 mg FeCl₂.4H₂O, 4 mg CoCl₂.6H₂O, 3 mg Na₂MoO₄.2H₂O, 0,7 mg LiCl.H₂O, 1 mg H₃BO₃, 2 mg KI) (Merck). Trong đó, dung dịch vi lượng được lọc với màng lọc tiệt trùng (Minisart NY 25, Sartorius Stedim Biotech, GmHbH, Germany, đường kính 0,20 μm).

Các thí nghiệm bố trí khảo sát khả năng phân hủy Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu, sử dụng chất chuẩn Diazinon với độ tinh khiết 99%. Thí nghiệm khảo sát lưu tồn và khả năng phân hủy sinh học Diazinon ngoài đồng ruộng và trong nhà lưới sử dụng thuốc trừ sâu Diazan chứa hoạt chất Diazinon 60% được sản xuất bởi công ty bảo vệ thực vật An Giang.

Hóa chất ly trích DNA vi khuẩn: DNA của vi khuẩn được ly trích theo phương pháp CTAB với các loại hóa chất gồm CTAB 3%, Chloroform, Isopropanol và Ethanol (J.TBaker). Quy trình ly trích DNA vi khuẩn được trình bày ở phụ lục 1).

Hóa chất thực hiện phản ứng PCR: sử dụng các hóa chất trong bộ kit PCR, bao gồm: Hỗn hợp Go Taq Green Master Mix (Promega), cặp mồi 341F-GC và 543R (CTgen), cặp mồi 27F và 1492R (CTgen), nước khử khoáng không chứa DNA.

Hóa chất điện di gel Agarose kiểm tra sản phẩm PCR gồm Agarose 1,5% (Merck), TAE buffer 0,5X, Loading buffer (chất chỉ thị màu- LB), Ethidium bromide (chất chỉ thị huỳnh quang-EtBr), thang chuẩn DNA 100 bp (Fermentas). Quy trình điện di sản phẩm PCR được trình bày ở phụ lục 2.

Hóa chất điện di biến tính tăng cấp DGGE gồm: chất nhuộm 2X, tris base Acetate 50X, dung dịch biến tính (100% DS), acrylamide 40% (Bio Rad), ammonium persulfate 10% (ASP) (Bio Rad), TEMED (Bio Rad), nước khử khoáng tiệt trùng, butanol. Quy trình điện di biến tính tăng cấp sản phẩm PCR được trình bày ở phụ lục 3.

Các loại dung môi có độ tinh khiết cao như acetone (99,8%), toluene (99,9%), hexan (99,7%), ... của hãng J.T.Baker.

3.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

3.2.1 Khảo sát tình hình sử dụng thuốc trừ sâu có chứa hoạt chất Diazinon trên một số mô hình canh tác cây trồng ở ĐBSCL

Mục tiêu: Nhằm đánh giá thực trạng sử dụng thuốc trừ sâu ở ĐBSCL trên các mô hình canh tác chuyên lúa, luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Chọn khu vực khảo sát: tiến hành khảo sát tại Bình Tân-Vĩnh Long, Chợ Mới-An Giang, Cai Lậy-Tiền Giang trên đất canh tác chuyên lúa, luân canh lúa-màu và chuyên màu. Các địa điểm được chọn sao cho địa hình, mô hình canh tác và cây trồng phổ biến khác nhau.

Việc khảo sát dựa trên các thông tin trong phiếu điều tra được thiết kế sẵn, chủ yếu thu thập thông tin về tình hình sử dụng thuốc trừ sâu (loại thuốc sử dụng, liều lượng sử dụng/năm, liều lượng/1000 m², diện tích phun thuốc...) của nông dân (Phụ lục 4). Các hộ nông dân được phỏng vấn, được lựa chọn một cách ngẫu nhiên và phân bố đều tại các địa điểm khảo sát. Số nông hộ được chọn điều tra về tình hình sử dụng thuốc trừ sâu từ 45-50 nông hộ tại mỗi địa điểm

Kết quả điều tra tình hình sử dụng thuốc trừ sâu, được tổng hợp để thống kê tình hình sử dụng, diện tích sử dụng, số nông hộ sử dụng đối với từng từng loại hoạt chất thuốc trừ sâu tại các địa điểm.

3.2.2 Khảo sát ô nhiễm thuốc trừ sâu Diazinon. Khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon và ảnh hưởng của các mô hình canh tác lên lưu tồn thuốc Diazinon.

3.2.2.1 Khảo sát ô nhiễm thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Mục tiêu: Xác định mức độ ô nhiễm hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon trong đất tương ứng với mỗi mô hình canh tác luân canh lúa - màu và chuyên màu ở ĐBSCL.

Địa điểm thu mẫu gồm: Bình Tân - Vĩnh Long, Phụng Hiệp - Hậu Giang, Cai Lậy - Tiền Giang. Mẫu đất được thu vào thời điểm ngay sau thu hoạch nông sản tương ứng với mỗi mô hình canh tác.

Phương pháp thu mẫu đất, bảo quản mẫu và ly trích Diazinon: Sử dụng khoan thu mẫu đất ở độ sâu 0 - 20 cm, mỗi ruộng lấy ngẫu nhiên 12 điểm, trộn đều thành một mẫu và chứa trong túi nylon. Các mẫu đất được trữ lạnh tạm thời trong thùng xốp, sau đó được mang về phòng thí nghiệm, ly trích Diazinon từ các mẫu đất tươi và lọc làm sạch qua cột Alumina. Quy trình ly trích Diazinon từ đất và lọc để làm sạch mẫu ly trích được trình bày chi tiết ở phụ lục 5 .

Hàm lượng Diazinon sau khi được ly trích từ đất và lọc làm sạch qua cột Alumina, sau đó được phân tích trên hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC/MS: Gas Chromatography Mass Spectometry) với cột sắc ký Rxi 5SilMS 30 m x 0,32 mm; film 0,25 μm . Nhiệt độ buồng bơm mẫu 250°C, điểm giao tiếp GC và MS 250°C, bộ nguồn ion 200°C. Thể tích mẫu bơm 1 μL .

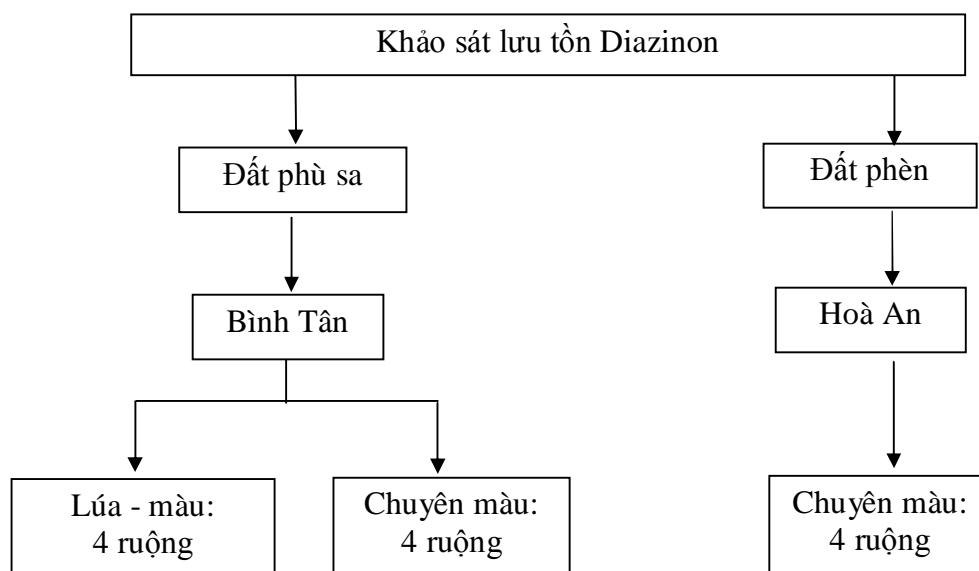
3.2.2.2 Khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu tại Hòa An-Hậu Giang và Bình Tân-Vĩnh Long.

Mục tiêu: Nhằm khảo sát sự thay đổi hàm lượng Diazinon có thể ly trích từ đất theo thời gian, trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu trên các loại đất khác nhau.

Địa điểm thí nghiệm:

- Hòa An - Hậu Giang: Khảo sát lưu tồn Diazinon trong đất phèn nhẹ ở 4 ruộng chuyên canh mía

- Bình Tân - Vĩnh Long: Khảo sát lưu tồn Diazinon trong đất phù sa với 2 mô hình canh tác chuyên màu (xà lách xoong) và luân canh lúa - màu (lúa-khoai lang, khảo sát lưu tồn Diazinon vào vụ khoai lang). Số ruộng chuyên canh tác được chọn để khảo sát lưu tồn Diazinon trên mỗi mô hình là 4 ruộng (Hình 3.1).



Hình 3.1 Sơ đồ khảo sát lưu tồn thuốc Diazinon ngoài đồng ruộng

Phương pháp khảo sát: các ruộng được chọn một cách ngẫu nhiên, cắm cọc, căng dây khoan vùng trên một diện tích nhất định ở mỗi ruộng (40 m^2) và đắp bờ xung quanh khu vực đã chọn để giữ nước. Thuốc trừ sâu được sử dụng trong thí nghiệm là DIAZAN 60EC (được sản xuất bởi Công ty Cổ phần bảo vệ thực vật An Giang) chứa 60% Diazinon. Lượng thuốc được sử dụng theo liều lượng khuyến cáo ghi trên bao bì ($60 \text{ g}/1000\text{m}^2$).

Thời điểm thu mẫu đất: mẫu đất được thu vào các thời điểm trước khi phun thuốc, sau khi phun thuốc 1 ngày, 21 ngày và 42 ngày.

Phương pháp thu mẫu đất, bảo quản mẫu đất, ly trích Diazinon và xác định hàm lượng Diazinon ở mỗi thời điểm lấy mẫu giống như phần đánh giá ô nhiễm Diazinon mục 3.2.2.1

3.2.2.3 Lưu tồn thuốc Diazinon mô hình canh tác luân canh lúa-màu (2 lúa-1 màu, 1 lúa- 2 màu) ngoài đồng ruộng

Mục tiêu: đánh giá ảnh hưởng của mô hình canh tác 2 lúa - 1 màu và 1 lúa - 2 màu đến sự lưu tồn Diazinon trong đất trên cùng một loại đất.

Địa điểm: thí nghiệm được bố trí trên đất phù sa xa sông tại xã Long Khánh-huyện Cai Lậy-tỉnh Tiền Giang

Thí nghiệm được bố trí ngoài đồng để khảo sát lưu tồn Diazinon. Sử dụng đất đã chuyên canh lúa 10 năm, sau đó được chuyển đổi sang 2 mô hình canh tác là 2 lúa - 1 màu và 2 màu - 1 lúa.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 2 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 4 lần. Mỗi nghiệm thức được bố trí thí nghiệm với diện tích là 100 m². Xung quanh bờ bao mỗi nghiệm thức được chèn tấm nylon để hạn chế hiện tượng thấm ngang.

Nghiệm thức 1: Lúa – Bắp – Lúa

Nghiệm thức 2: Lúa – Đậu – Bắp

Sử dụng thuốc DIAZAN 60EC (được sản xuất bởi Công ty Cổ phần bảo vệ thực vật An Giang) chứa 60% Diazinon. Lượng thuốc được sử dụng theo liều lượng khuyến cáo ghi trên bao bì (60 g/1000m²).

Thời điểm thu mẫu đất:

- Vụ Đông Xuân: trước khi phun thuốc, sau khi phun thuốc 1 ngày, 14 ngày và 46 ngày.
- Vụ Hè Thu: sau khi phun thuốc 1 ngày, 13 ngày và 26 ngày.

Phương pháp thu mẫu đất, bảo quản mẫu đất, ly trích Diazinon và xác định hàm lượng Diazinon tương ứng với mỗi thời điểm lấy mẫu giống như phân đánh giá ô nhiễm Diazinon mục 3.2.2.1

3.2.2.4 Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu trong điều kiện nhà lưới.

Mục tiêu: nhằm đánh giá lượng thuốc Diazinon lưu tồn trong đất theo thời gian tương ứng từng mô hình canh tác trong cùng điều kiện ngoại cảnh (điều kiện môi trường, loại đất). Đồng thời, khảo sát ảnh hưởng của mô hình canh tác đến cấu trúc tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon.

Địa điểm thí nghiệm: thí nghiệm được thực hiện trong chậu trong nhà lưới thuộc Bộ môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Vật liệu cho thí nghiệm:

- Mẫu đất: đất sử dụng trong thí nghiệm được thu từ đất chuyên trồng lúa tại Khu vực 07, thị trấn Cai Lậy, huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang, đất được lấy ở độ sâu từ 0 - 30 cm.

- Hạt giống: sử dụng giống lúa MTL-547 và giống đậu xanh ĐX 208 được mua từ đại lý giống cây trồng ở Thành phố Cần Thơ.

- Thuốc trừ sâu chứa hoạt chất Diazinon: Sử dụng thuốc DIAZAN 60EC được sản xuất bởi Công ty Cổ phần bảo vệ thực vật An Giang chứa 60% Diazinon.

- Túi lưới: sử dụng lưới nylon không hấp thu Diazinon để may túi lưới chứa đất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thực hiện trong chậu, với đường kính và chiều cao của mỗi chậu tương ứng là 30 cm và 15 cm. Mỗi chậu được bổ sung 7 kg đất tính theo trọng lượng khô. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nghiệm thức, 4 lần lặp lại.

Nghiệm thức 1: Lúa – Đậu xanh – Lúa

Nghiệm thức 2: Đậu xanh – Đậu xanh – Đậu xanh

Bổ sung Diazinon vào đất: Diazinon được trộn đều vào 300 g đất thu từ mỗi chậu để đạt nồng độ 1,5 ppm. Sau đó, đất được cho vào 4 túi nhỏ có kích thước 3 cm × 4 cm sao cho mỗi túi chứa 10 g đất. Mỗi túi lưới nhỏ chứa đất được cho vào trong một túi lưới lớn có kích thước 6 cm × 8 cm và bổ sung đất vào túi lưới lớn để khối lượng đất trong 2 túi lưới (túi lưới nhỏ và túi lưới lớn) đạt 50 g (Hình 3.2). Trong đó, đất khi bổ sung vào túi lưới lớn phải phủ đều xung quanh túi lưới nhỏ. Các túi lưới chứa đất được cho vào chậu đất với độ sâu 5 cm (mỗi chậu đất chứa 4 túi lưới chứa đất).

Thời điểm thu mẫu đất: mẫu đất được thu vào thời điểm 1 ngày, 10 ngày, 20 và 30 ngày sau khi vùi túi lưới vào chậu đất. Mẫu đất được thu trong các túi lưới nhỏ (1 túi/1 lần thu mẫu), mỗi lần thu mẫu sử dụng 3 g đất để khảo sát lưu tồn Diazinon, phần đất còn lại được sử dụng để làm giàu mật độ vi khuẩn phân hủy Diazinon và trích DNA.

Phương pháp bảo quản mẫu đất, ly trích Diazinon và xác định hàm lượng Diazinon ở mỗi thời điểm lấy mẫu giống như phần đánh giá ô nhiễm Diazinon mục 3.2.2.1



Hình 3.2 Các túi lưới chứa đất đã trộn Diazinon

3.2.3 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn hiếu khí có khả năng phân hủy hiếu khí Diazinon từ mô hình canh tác lúa màu và chuyên màu.

3.2.3.1 Phân lập vi khuẩn hiếu khí có khả năng phân hủy Diazinon từ mô hình canh tác luân canh lúa- màu và chuyên màu.

Mục tiêu: Thu nhận các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy thuốc Diazinon từ các mô hình luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Địa điểm: Vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất được thu tại các địa điểm Chợ Mới-An Giang, Bình Minh-Vĩnh Long, Bình Tân-Vĩnh Long, Cai Lậy - Tiền Giang và Hòa An-Hậu Giang. Số lượng mẫu đất được thu tại mỗi địa điểm trên hai mô hình canh tác (luân canh lúa-màu và chuyên màu) được thể hiện trong Bảng 3.1

Bảng 3.1 Số lượng mẫu đất để phân lập vi khuẩn phân hủy Diazinon trên các mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu

Địa điểm	Mô hình canh tác	
	Chuyên màu	Luân canh lúa-màu
Bình Tân –Vĩnh Long	4	8
Bình Minh-Vĩnh Long	4	0
Hòa An-Hậu Giang	5	0
Chợ Mới-An Giang	4	7
Cai Lậy-Tiền Giang	4	5
Tổng số	21	20

Thu mẫu đất: Mẫu đất được sử dụng trong thí nghiệm dựa trên cơ sở thông tin điều tra của dự án RIP (Chương trình VLIR) hợp tác giữa Trường Đại học Cần Thơ và Bỉ. Các ruộng canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu tại mỗi địa điểm được chọn lấy mẫu phải có lịch sử và đang sử dụng thuốc trừ sâu chứa hoạt chất Diazinon. Mỗi ruộng, mẫu đất được lấy ngẫu nhiên 5 điểm ở độ sâu 0-10 cm và trộn đều thành một mẫu. Mẫu đất được gói trong giấy nhôm và trữ trong thùng lạnh trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm. Đối với lượng đất được sử dụng để phân lập vi khuẩn, tiến hành phân lập vi khuẩn sau khi mang về phòng thí nghiệm. Lượng đất còn lại, sử dụng để phân tích thành phần lý hóa được để khô tự nhiên trong phòng thí nghiệm. Thành phần lý hóa của các mẫu đất được thể hiện trong Bảng 3.2 và Bảng 3.3.

Bảng 3.2 Một số đặc tính lý hóa của các mẫu đất thu từ ruộng luân canh lúa-màu ở một số tỉnh ĐBSCL được sử dụng trong thí nghiệm

Địa điểm	Sa cấu đất			Chất hữu cơ (%)	pH
	Sét (%)	Thịt (%)	Cát (%)		
Bình Tân – Vĩnh Long	47,4	51,4	1,2	4,12	4,8
Cai Lậy – Tiền Giang	67,0	31,0	2,0	4,43	4,9
Chợ Mới – An Giang	51,8	45,5	2,8	1,16	5,6

Bảng 3.3 Một số đặc tính lý hóa của các loại đất sử dụng trong thí nghiệm thu từ ruộng chuyên canh màu ở một số tỉnh ĐBSCL được sử dụng trong thí nghiệm

Địa điểm	Sa cấu đất			Chất hữu cơ (%)	pH
	Sét (%)	Thịt (%)	Cát (%)		
Cai Lậy - Tiền Giang	61	37	2,0	4,30	4,8
Hòa An – Hậu Giang	57	42	1,0	4,87	4,5
Bình Tân - Vĩnh Long	60	38,5	1,5	2,10	5,5

Phân lập vi khuẩn phân hủy thuốc Diazinon gồm 2 giai đoạn: làm giàu mật độ và tách dòng vi khuẩn.

(i) Làm giàu mật độ vi khuẩn hiếu khí phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon

Mục tiêu: sử dụng môi trường chọn lọc để tạo điều kiện cho vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc Diazinon gia tăng mật độ, đồng thời loại bỏ những chủng vi khuẩn không có khả năng phân hủy thuốc Diazinon.

Phương pháp làm giàu mật độ vi khuẩn phân hủy Diazinon: Sử dụng môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm để làm giàu tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon. Mẫu đất sau khi trộn đều, cân 10g cho vào chai thủy tinh 250 mL chứa 90 mL dung dịch đệm phosphate và lắc với tốc độ 130 rpm trong 1 giờ, để lắng 15 phút sau đó chuyển 1 mL dung dịch trên sang bình tam giác dung tích 100 mL chứa 24 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm (Phụ lục 6) . Bình tam giác trên được lắc ngang liên tục trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, trong tối và trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Khi môi trường trở nên đục thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt 20 ppm. Số lần cấy chuyển được lặp lại 5 lần cho mỗi tổ hợp vi khuẩn. Kết thúc quá trình làm giàu mật độ vi khuẩn, mỗi tổ hợp vi khuẩn được bố trí thí nghiệm nhằm khảo sát khả năng phân hủy thuốc Diazinon với hai nghiệm thức như bên dưới:

- Nghiệm thức 1: Đối chứng (Môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm)

- Nghiệm thức 2: Môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm và chủng tổ hợp vi khuẩn

Sau 14 ngày nuôi ủ các tổ hợp vi khuẩn trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng thuốc Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích bằng dung môi Toluene:Acetone (2:1) và phân tích hàm lượng Diazinon bằng hệ thống HPLC (Shimadzu-LC20A): sử dụng cột C18, pha động với tỷ lệ Acetonitril: H₂O (7:3), bước sóng 254 nm, tốc độ dòng chảy của pha động là 1 mL/phút và thể tích hút là 10 µL.

(ii) Tách dòng

Mục tiêu: tách riêng từng dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon để tiếp tục cho các thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy hoạt chất Diazinon.

Phương pháp: Các tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon được pha loãng ở nhiều nồng độ khác nhau (10^{-1} - 10^{-8}). Hút 50 μ L dung dịch huyền phù vi sinh vật đã pha loãng nhỏ lên môi trường TSA và dùng que cấy tráng đều đến khi bề mặt môi trường khô. Các đĩa petri được ủ từ 3 đến 5 ngày trong điều kiện không có ánh sáng ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục phân dạng khuẩn lạc và cấy ria từng dạng khuẩn lạc trên mỗi đĩa petri để tạo khuẩn lạc rời rạc (phân dạng khuẩn lạc dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc như: hình dạng, độ nổi, bờ và màu sắc). Sau khi được các chủng vi khuẩn thuần và chuyển nuôi trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm và theo dõi sự phát triển của các dòng vi khuẩn.

3.2.3.2 Đánh giá khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn phân lập được trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu.

Mục tiêu: Xác định khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các chủng vi khuẩn phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu.

Phương pháp đồng nhất mật độ vi khuẩn của các dòng vi khuẩn: các dòng vi khuẩn được nhân nuôi mật độ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung TSB 0,5% trong 3 ngày, trên máy lắc với tốc độ 90 rpm ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau đó thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi ở tốc độ 10.000 rpm và hiệu chỉnh độ đục về $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ bằng cách đo quang phổ. Mật độ vi khuẩn sau khi hiệu chỉnh độ đục được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982).

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi dòng vi khuẩn phân lập thể hiện khả năng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu được bố trí thí nghiệm với 2 nghiệm thức, 3 lần lặp lại.

- Nghiệm thức 1: 5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm (Đối chứng).

- Nghiệm thức 2: 4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm và chủng 100 μ L dịch vi khuẩn với mật độ vi khuẩn được thể hiện qua Bảng 3.4.

Bảng 3.4 Mật độ của các dòng vi khuẩn tương ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$

STT	Mô hình luân canh lúa-màu		Mô hình chuyên màu	
	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	BT50_M1	$0,50 \times 10^6$	HA7.1	$5,00 \times 10^6$
2	BT50_L14	$0,30 \times 10^6$	HA7.4	$5,67 \times 10^6$
3	BT51_M7	$2,00 \times 10^6$	HA7.5	$0,70 \times 10^6$
4	BT52_M1	$0,20 \times 10^6$	TA3.2	$5,67 \times 10^6$
5	BT52_M2	$5,00 \times 10^6$	TA3.4	$2,33 \times 10^6$
6	BT52_M3	$2,67 \times 10^6$	TA3.7	$2,00 \times 10^6$
7	BT52_M4	$2,33 \times 10^6$	TA3.12	$0,60 \times 10^6$
8	BT52_M7	$4,67 \times 10^6$	TA4.1	$3,00 \times 10^6$
9	BT53_M4	$2,00 \times 10^6$	TA4.2	$0,70 \times 10^6$
10	BT4_L1	$5,33 \times 10^6$	TA4.11	$2,00 \times 10^6$
11	BT4_L5	$3,00 \times 10^6$	TA4.17	$4,00 \times 10^6$
12	BT4_L17	$2,33 \times 10^6$	CM1.3	$3,67 \times 10^6$
13	BT4_L20	$2,67 \times 10^6$	CM1.5	$0,90 \times 10^6$
14	CL4_M4	$0,40 \times 10^6$	CM1.9	$0,12 \times 10^6$
15	CL4_M6	$0,30 \times 10^6$	CM1.17	$2,50 \times 10^6$
16	CL5_M6	$3,67 \times 10^6$		
17	CL36_M1	$1,00 \times 10^6$		
18	CL36_M4	$5,67 \times 10^6$		
19	CL36_M9	$0,15 \times 10^6$		
20	CM41_M1	$4,00 \times 10^6$		
21	CM42_L8	$3,40 \times 10^6$		
22	CM42_L1	$5,30 \times 10^6$		
23	CM43_M25	$1,80 \times 10^6$		
24	CM43_M7	$2,33 \times 10^6$		
25	CM43_M6	$2,00 \times 10^6$		
26	CM44_L10	$0,70 \times 10^6$		
27	CM44_L11	$4,67 \times 10^6$		

Sau 30 ngày nuôi ủ trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng thuốc Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích bằng dung môi Toluene:Acetone (2:1) và phân tích hàm lượng Diazinon bằng hệ thống HPLC (Shimadzu-LC20A): sử dụng cột C18, pha động với tỷ lệ Acetonitril: H₂O (7:3), bước sóng 254 nm, tốc độ dòng chảy của pha động là 1 mL/phút và thể tích hút là 10 μ L.

Sau khi xác định được các dòng vi khuẩn phân hủy hiệu quả Diazinon, tiến hành nhận diện Gram, xác định hình thái tế bào, tính di động, phản ứng oxidase, phản ứng catalase.

- **Nhận diện Gram vi khuẩn:** Khuẩn lạc sau khi tách dòng được trải lên lame và nhỏ một vài giọt KOH 3%, dùng tăm tiết trùng trộn đều vi khuẩn và KOH. Nếu giữa tăm và lame kéo lên thành sợi chỉ thì vi khuẩn được kiểm tra là Gram âm và ngược lại là Gram dương. Phương pháp này dựa vào khả năng tạo nhầy giữa sinh khối vi khuẩn và dung dịch KOH 3%. Dưới tác dụng của dung dịch kiềm loãng, vách tế bào của vi khuẩn gram âm bị phá vỡ làm giải phóng DNA và tạo dịch nhầy khi phản ứng với dung dịch KOH (Suslow *et al.*, 1982; Hellen *et al.*, 2013)

- **Hình thái tế bào:** Hình dạng tế bào vi khuẩn được xem dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 100X, vi khuẩn được nhuộm màu bằng Fushin 0,3%.

- **Tính di động:** khả năng di động của vi khuẩn được xác định bằng cách cấy vi khuẩn vào môi trường bán rắn với 0,3% agar. Kết quả quan sát đối với vi khuẩn di động sẽ làm đục môi trường và ngược lại thì không có khả năng di động (Hellen *et al.*, 2013)

- **Phản ứng oxidase:** sử dụng tăm tiết trùng lấy một ít khuẩn lạc cho lên giấy tẩm cytochrome oxidase. Quan sát và ghi nhận sự thay đổi màu sắc. Kết quả quan sát, đối với vi khuẩn cho kết quả oxidase dương tính sẽ làm giấy tẩm cytochrome oxidase chuyển sang màu tím và ngược lại là oxidase âm tính.

- **Phản ứng catalase:** sử dụng tăm tiết trùng lấy một khuẩn lạc và trải đều lên lame, sau đó nhỏ 1 giọt dung dịch H₂O₂ 3% lên lame. Kết quả quan sát đối với vi khuẩn cho phản ứng catalase dương tính sẽ gây hiện tượng sủi bọt và ngược lại catalase âm tính khi không có hiện tượng sủi bọt.

3.2.4 Khảo sát sự ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả

3.2.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn

Mục tiêu: xác định giá trị nhiệt độ tối ưu cho sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1).

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.5).

Trong đó, phương pháp chủng Diazinon để đạt nồng độ 20 ppm được thể hiện trong phụ lục 7.

Bảng 3.5 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH = 7)	Nhiệt độ (°C)
1	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	25
2	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	30
3	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	37

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với OD_{600 nm} = 0,7: các dòng vi khuẩn được nhân nuôi mật độ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung TSB 0,5% trong 3 ngày, trên máy lắc với tốc độ 90 rpm ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau đó thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi ở tốc độ 10.000 rpm và hiệu chỉnh độ đục về OD_{600 nm} = 0,7 bằng cách đo quang phổ. Mật độ vi khuẩn sau khi hiệu chỉnh độ đục được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982). Mật độ vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.6.

Bảng 3.6 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	4,67x10 ⁶
2	HA7.4	3,90x10 ⁶
3	TA3.2	3,00x10 ⁶
4	TA4.17	5,90x10 ⁶
5	CL36_M4	3,5x10 ⁶
6	BT4_L1	4,3 x10 ⁶

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn: Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982) vào thời điểm ban đầu và sau 5 ngày nuôi cấy.

3.2.4.2 Ảnh hưởng của pH đến mật độ của vi khuẩn

Mục tiêu: xác định độ pH tối ưu cho sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1).

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.7).

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.8.

Bảng 3.7 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (nhiệt độ thí nghiệm: 30 °C)	pH
1	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 μL dịch vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	4
2	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 μL dịch vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	5
3	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 μL dịch vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	6
4	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chủng 100 μL dịch vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	7

Bảng 3.8 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	$5,00 \times 10^6$
2	HA7.4	$4,00 \times 10^6$
3	TA3.2	$2,00 \times 10^6$
4	TA4.17	$5,33 \times 10^6$
5	CL36_M4	$3,00 \times 10^6$
6	BT4_L1	$2,33 \times 10^6$

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn: Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982) vào thời điểm ban đầu và sau 5 ngày nuôi cấy.

3.2.4.3 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ của vi khuẩn

Mục tiêu: khảo sát sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1) trong môi trường khoáng tối thiểu, khi có sự hiện diện của nguồn cacbon khác (TSB, glucose).

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 2 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.9).

Bảng 3.9 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH = 7, nhiệt độ: 30 °C)	Nguồn cacbon
1	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μL dịch vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	0,5% glucose
3	4900 μL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μL dịch nuôi vi khuẩn $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$	0,5% TSB

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ của các dòng vi khuẩn

HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.10.

Bảng 3.10 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	$5,20 \times 10^6$
2	HA7.4	$3,67 \times 10^6$
3	TA3.2	$3,00 \times 10^6$
4	TA4.17	$5,40 \times 10^6$
5	CL36_M4	$2,33 \times 10^6$
6	BT4_L1	$3,07 \times 10^6$

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn: Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982) vào thời điểm ban đầu và sau 5 ngày nuôi cấy.

3.2.4.4 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến mật độ của vi khuẩn

Mục tiêu: Xác định ngưỡng giá trị nồng độ Diazinon gây độc hoặc bị ức chế sự sinh trưởng của các dòng vi HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.11).

Bảng 3.11 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH = 7, nhiệt độ: 30 °C)	Nồng độ Diazinon (ppm)
1	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	20
2	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch nuôi vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	50
3	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch nuôi vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	100
4	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch nuôi vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	150
5	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch nuôi vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	200

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với OD_{600 nm} = 0,7 giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.12.

Bảng 3.12 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	4,50x10 ⁶
2	HA7.4	4,00x10 ⁶
3	TA3.2	2,00x10 ⁶
4	TA4.17	5,67x10 ⁶
5	CL36_M4	3,47x10 ⁶
6	BT4_L1	4,30x10 ⁶

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn: Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982) vào thời điểm ban đầu và sau 5 ngày nuôi cấy.

3.2.5 Khảo sát sự ảnh hưởng của một số nhân tố sinh thái đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả

3.2.5.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn

Mục tiêu: xác định khoảng giá trị nhiệt độ thúc đẩy sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.13).

Bảng 3.13 Thành phần môi trường khoáng tối thiểu trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH = 7, nồng độ Diazinon: 20 ppm)	Nhiệt độ thí nghiệm
1	5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu	25 °C
2	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	25 °C
3	5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu	30 °C
4	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	30 °C
5	5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu	37 °C
6	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	37 °C

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với OD_{600 nm} = 0,7 giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.14.

Bảng 3.14 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$ trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	$5,33 \times 10^6$
2	HA7.4	$5,00 \times 10^6$
3	TA3.2	$5,33 \times 10^6$
4	TA4.17	$4,67 \times 10^6$
5	CL36_M4	$5,33 \times 10^6$
6	BT4_L1	$5,67 \times 10^6$

Phương pháp ly trích Diazinon và phân tích hàm lượng Diazinon: Sau 30 ngày nuôi ủ trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng hoạt chất Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích bằng dung môi Toluen:Acetone tỷ lệ 2:1. Hàm lượng Diazinon được phân tích bằng hệ thống HPLC (Shimadzu-LC20A) với tỷ lệ pha động Acetonitril:H₂O là 7:3 và bước sóng 254 nm, tốc độ dòng chảy của pha động là 1 mL/phút và thể tích hút là 10 μ L.

3.2.5.2 Ảnh hưởng của pH đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn

Mục tiêu: xác định khoảng giá trị pH thúc đẩy hoặc ức chế hoạt động phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.15).

Bảng 3.15 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (nhiệt độ thí nghiệm: 30 °C, nồng độ Diazinon 20 ppm)	pH
1	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	4
2	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	4
3	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	5
4	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	5
5	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	6
6	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	6
7	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	7
8	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	7

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với OD_{600 nm} = 0,7 giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.16.

Bảng 3.16 Mật độ dịch vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH đến phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	6,00x10 ⁶
2	HA7.4	5,67 x10 ⁶
3	TA3.2	5,00 x10 ⁶
4	TA4.17	5,00 x10 ⁶
5	CL36_M4	5,67 x10 ⁶
6	BT4_L1	5,33 x10 ⁶

Phương pháp ly trích Diazinon và phân tích hàm lượng Diazinon: Sau 30 ngày nuôi ủ trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng hoạt chất Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích và phân tích giống mục 3.2.5.1.

3.2.5.3 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn

Mục tiêu: xác định khoảng giá trị nồng độ Diazinon thích hợp cho hoạt động phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 10 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.17).

Bảng 3.17 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến tốc độ phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH = 7, nhiệt độ: 30 °C)	Nồng độ Diazinon (ppm)
1	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	20
2	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	20
3	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	50
4	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	50
5	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	100
6	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	100
7	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	150
8	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	150
9	5000 µL môi trường khoáng tối thiểu	200
10	4900 µL môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 µL dịch vi khuẩn OD _{600 nm} = 0,7	200

Phương pháp hiệu chỉnh độ đục dịch vi khuẩn với OD_{600 nm} = 0,7 giống mục 3.2.4.1. Mật độ vi khuẩn ứng với OD_{600 nm} = 0,7 của các dòng vi khuẩn

HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 được thể hiện qua Bảng 3.18.

Bảng 3.18 Mật độ vi khuẩn ban đầu trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến phân hủy Diazinon của vi khuẩn.

STT	Dòng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)
1	HA7.1	5,33x10 ⁶
2	HA7.4	5,00 x10 ⁶
3	TA3.2	5,33 x10 ⁶
4	TA4.17	4,67 x10 ⁶
5	CL36_M4	5,33 x10 ⁶
6	BT4_L1	5,67 x10 ⁶

Phương pháp ly trích Diazinon và phân tích hàm lượng Diazinon: Sau 30 ngày nuôi ủ trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng hoạt chất Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích và phân tích giống mục 3.2.5.1.

3.2.5.4 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn

Mục tiêu: Xác định mối tương quan giữa mật độ vi khuẩn và tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1.

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn: mật độ vi khuẩn được xác định dựa vào đường chuẩn mối quan hệ giữa giá trị OD và mật độ tế bào vi khuẩn (Phụ lục 7).

Bố trí thí nghiệm: Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí trong ống nghiệm với 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (Bảng 3.19).

Phương pháp ly trích Diazinon và phân tích hàm lượng Diazinon: Sau 30 ngày nuôi ủ trên máy lắc với tốc độ 90 rpm, hàm lượng hoạt chất Diazinon còn lại trong môi trường nuôi được ly trích bằng dung môi Toluen:Acetone tỷ lệ 2:1. Hàm lượng Diazinon được phân tích bằng hệ thống HPLC (Shimadzu-LC20A) với tỷ lệ pha động Acetonitril:H₂O là 7:3 và bước sóng 254 nm, tốc độ dòng chảy của pha động là 1 mL/phút và thể tích hút là 10 µL.

Bảng 3.19 Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy Diazinon

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (pH 7, nhiệt độ: 30 °C, nồng độ Diazinon: 20 ppm)	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)
1	5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu	Không chủng vi khuẩn
2	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn	6,67x10 ⁴ (HA7.1) hoặc 7,00x10 ⁴ (HA7.4) hoặc 4,67x10 ⁴ (TA3.2) hoặc 5,67x10 ⁴ (TA4.17) hoặc 6,67x10 ⁴ (BT4_L1) hoặc 7,00x10 ⁴ (CL36_M4)
3	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn	4,30x10 ⁵ (HA7.1) hoặc 6,30x10 ⁵ (HA7.4) hoặc 4,00x10 ⁵ (TA3.2) hoặc 6,00x10 ⁵ (TA4.17) hoặc 4,30x10 ⁵ (BT4_L1) hoặc 6,30x10 ⁵ (CL36_M4)
4	4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu, chủng 100 μ L dịch vi khuẩn	5,67x10 ⁶ (HA7.1) hoặc 5,30x10 ⁶ (HA7.4) hoặc 5,30x10 ⁶ (TA3.2) hoặc 4,30x10 ⁶ (TA4.17) hoặc 5,67x10 ⁶ (BT4_L1) hoặc 5,30x10 ⁶ (CL36_M4)

3.2.6 Đánh giá khả năng phân hủy Diazinon trong đất của dòng vi khuẩn HA7.1 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mục tiêu: xác định sự thay đổi hàm lượng hoạt chất Diazinon ly trích được từ đất trong các nghiệm thức sau thời gian 30 ngày. Đồng thời, nghiên cứu sự tương tác của dòng vi khuẩn HA7.1 với tổ hợp vi khuẩn trong đất và tương tác với các dòng vi khuẩn BT4_L1, CL36_M4, HA7.4, TA3.2, TA4.17 trong hoạt động phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon.

Bố trí thí nghiệm: Mẫu đất được sử dụng trong thí nghiệm được lấy từ đất canh tác mía tại Xã Hòa An, huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang (mẫu đất sử dụng để phân lập dòng vi khuẩn HA7.1). Đất có sa cẩu: sét 57%; thịt 42%;

cát 1%; hàm lượng hữu cơ 4,87% và pH 4,5. Thí nghiệm được bố trí trong lọ bi thể tích 12 mL và để yên trong tối. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Bảng 3.20. Thành phần môi trường của thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy Diazinon trong đất của dòng vi khuẩn HA7.1

Nghiệm thức	Thành phần môi trường (nhiệt độ: 30 °C, nồng độ Diazinon: 20 ppm)	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)
1	3 g đất tiệt trùng	không chủng vi khuẩn
2	3 g đất tiệt trùng	chủng vi khuẩn HA7.1
3	3 g đất không tiệt trùng	không chủng vi khuẩn
4	3 g đất không tiệt trùng	chủng vi khuẩn HA7.1
5	3 g đất không tiệt trùng	chủng tổ hợp vi khuẩn BT4_L1, CL36_M4, HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17

Phương pháp chủng vi khuẩn: các dòng vi khuẩn BT4_L1, CL36_M4, HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17 được nhân mật độ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 0,5% TSB trong 3 ngày trên máy lắc ngang với tốc độ 90 rpm. Sau đó thu sinh khối vi khuẩn và hiệu chỉnh độ đục của dịch vi khuẩn về OD 600 nm = 0,7. Chủng 100 µL dịch huyền phù vi khuẩn HA7.1 đã hiệu chỉnh độ đục vào nghiệm thức 2 và nghiệm thức 4. Mỗi dòng vi khuẩn hút 100 µL cho vào eppendorf 1,5 mL, sau đó vortex và hút 100 µL dịch vi khuẩn chủng vào đất của nghiệm thức 5.

Sau 30 ngày nuôi ủ, hàm lượng Diazinon trong đất ở các nghiệm thức được ly trích bằng dung môi diethyl ether. Phương pháp ly trích Diazinon từ đất và lọc để làm sạch mẫu ly trích được trình bày chi tiết ở phụ lục 5.

Hàm lượng Diazinon sau khi được ly trích từ đất và lọc làm sạch qua cột Alumina, sau đó được phân tích trên hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC/MS: Gas Chromatography Mass Spectrometry) với cột sắc ký Rxi 5SilMS 30 m x 0,32 mm; film 0,25 µm. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 250 °C, điểm giao tiếp GC và MS 250 °C, bộ nguồn ion 200 °C. Thể tích mẫu bơm 1 µL.

3.2.7 Định danh các chủng vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập từ đất được thu từ ruộng canh tác luân canh lúa-mùa và chuyên màu

Các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon được nuôi trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm. DNA được tách chiết theo quy trình được trình bày trong phụ lục 1. Sau đó, sản phẩm DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F/1492R có trình tự như sau: 27F (5'-3'): AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG và 1492R (5'-3'): TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACTT (Justé *et al.*, 2008b). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn sơ khởi 95°C (5 phút), 30 chu kỳ: 95°C (1 phút) – 53°C (30 giây) – 72°C (90 giây), 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% trước khi giải trình tự.

Các hóa chất để thực hiện phản ứng PCR bao gồm (25 mL cho một phản ứng): 2,5µL buffer (5x); 0,25 µL mồi xuôi 27F (10 µM); 0,25 µL mồi ngược 1492R (10 µM) (5'-3'); 2 µL DNA tinh sạch; 11,75 µL mQ-H₂O, 4 µL dNTPs (10mM); 0,5 µL DMSO; 2 µL MgCl₂ (25 mM); 0,25 µL taq (5 U/µL). Kết quả giải trình tự được so sánh và dò tìm trên ngân hàng gene NCBI trên trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định mức độ tương đồng của các dòng vi khuẩn khảo sát với các trình tự đã lưu trữ trên NCBI. Sau đó sử dụng phần mềm MEGA6.06 (Tamura *et al.*, 2013) để xây dựng cây phả hệ di truyền của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon.

3.2.8 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

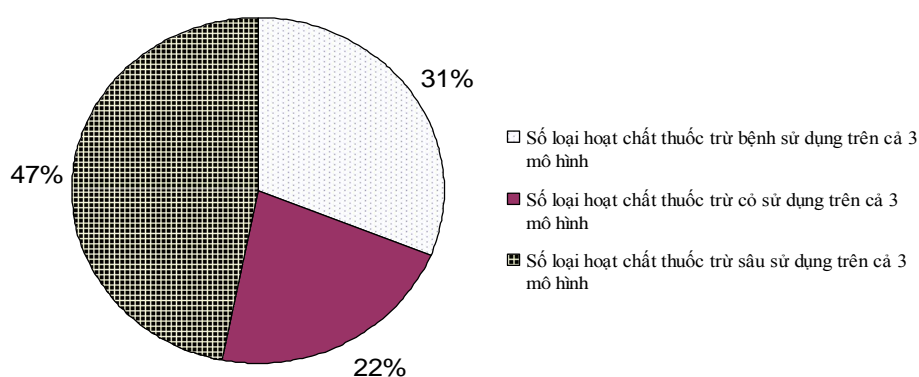
Số liệu được xử lý bằng công cụ microsoft excel để xử lý số liệu và vẽ đồ thị. Phần mềm thống kê Minitab 16.0 được sử dụng để phân tích phương sai của các trung bình. Sử dụng phần mềm MEGA6.06 để xây dựng cây phả hệ di truyền của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon.

Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu Diazinon ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long

4.1.1 Cơ cấu các nhóm thuốc BVTV ở Đồng bằng sông Cửu Long

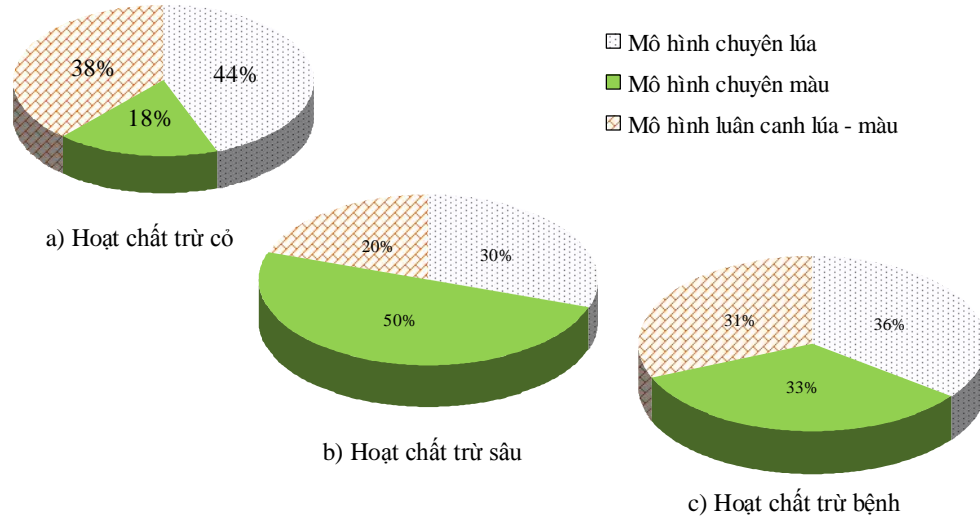
Qua kết quả điều tra đã ghi nhận được 17 loại hoạt chất trừ cỏ, 35 loại hoạt chất trừ sâu và 23 loại hoạt chất trừ bệnh thống kê trên tất cả mô hình. Tỷ lệ số loại hoạt chất của các nhóm thuốc được thể hiện qua Hình 4.1.



Hình 4.1 Cơ cấu số loại hoạt chất của các nhóm thuốc BVTV được sử dụng

Từ kết quả khảo sát về số loại hoạt chất của các nhóm thuốc BVTV, cho thấy thuốc trừ sâu có số loại hoạt chất được nông dân sử dụng nhiều nhất, kể đến là thuốc trừ bệnh và thuốc trừ cỏ.

Qua kết quả điều tra cho thấy có sự khác nhau về số loại hoạt chất được sử dụng trên các mô hình canh tác của từng nhóm thuốc BVTV (Hình 4.2a, Hình 4.2b, Hình 4.3c).



Hình 4.2 Cơ cấu số loại hoạt chất được sử dụng trên các mô hình canh tác của từng nhóm thuốc BVTV

Số loại các hoạt chất thuốc trừ cỏ được sử dụng khác nhau giữa ba mô hình canh tác, trong đó mô hình chuyên lúa sử dụng nhiều nhất (44%). Theo ghi nhận trong quá trình phỏng vấn nông dân, trên mô hình chuyên màu nông dân có xu hướng sử dụng màng phủ nông nghiệp trong quá trình canh tác. Vì thế góp phần hạn chế cỏ dại dẫn đến số loại hoạt chất trừ cỏ được sử dụng trên mô hình chuyên màu ít hơn mô hình chuyên lúa.

Trên mô hình luân canh lúa – màu, tỷ lệ hoạt chất trừ cỏ, ít hơn trên mô hình chuyên lúa và cao hơn mô hình chuyên màu. Có thể giải thích điều này là do trên mô hình luân canh lúa – màu có giai đoạn thay đổi tình trạng đất dẫn đến các loài cỏ dại có cơ hội phát triển khi đất đang trong vụ lúa. Vì thế số loại hoạt chất trừ cỏ được sử dụng trên mô hình luân canh lúa – màu nhiều hơn so với mô hình chuyên màu. Tuy nhiên việc sử dụng màng phủ trong vụ trồng rau màu cũng góp phần hạn chế sự phát triển của hạt cỏ dại từ vụ lúa trước, nên số lượng hoạt chất trừ cỏ được sử dụng trên mô hình luân canh lúa – màu ít hơn so với mô hình chuyên lúa (Hình 4.2a).

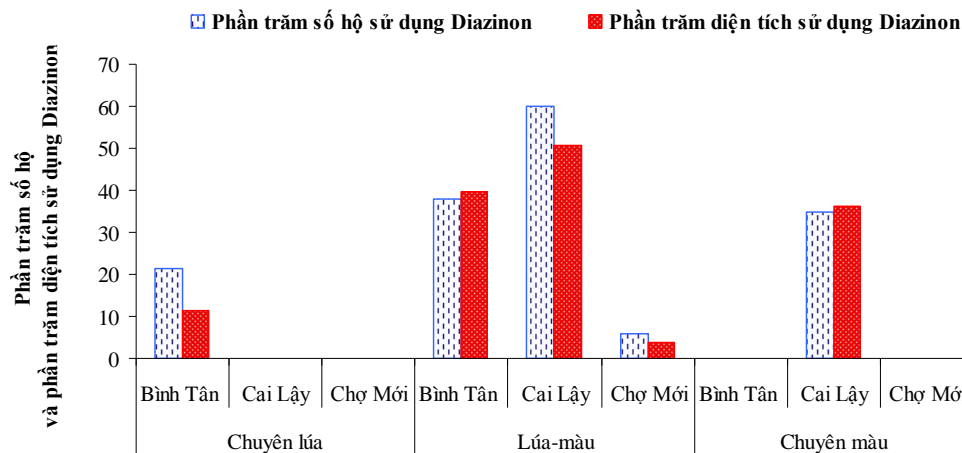
Qua kết quả điều tra cho thấy số loại hoạt chất trừ sâu được sử dụng không giống nhau trên ba mô hình canh tác (Hình 4.2b). Hoạt chất trừ sâu được sử dụng nhiều nhất trên mô hình chuyên màu (50%), kế tiếp là mô hình chuyên lúa (30%) và ít nhất là trên mô hình luân canh lúa – màu (20%). Nguyên nhân của việc số loại hoạt chất sử dụng trên mô hình chuyên màu cao

hơn các mô hình còn lại, là do cây trồng trên mô hình này có thời gian sinh trưởng ngắn và là nguồn thức ăn ưa thích của nhiều loài sâu hại từ giai đoạn cây mầm đến khi thu hoạch. Nên để bảo vệ cây trồng trong suốt quá trình canh tác, nông dân phải sử dụng nhiều loại hoạt chất để phòng trừ nhiều đối tượng sâu hại. Trên mô hình luân canh lúa – màu, số lượng hoạt chất trừ sâu được sử dụng ít nhất, có thể giải thích điều này là do trong quá trình canh tác, việc luân phiên thay đổi cây trồng đã cắt đứt nguồn thức ăn của sâu hại. Song song đó, việc thay đổi điều kiện canh tác như từ đất trồng màu thoáng khí chuyển sang đất lúa ngập nước, yếm khí và ngược lại đã làm thay đổi môi trường sống của chúng. Từ đó làm giảm khả năng gây hại của sâu hại lên nông sản, dẫn đến số loại hoạt chất trừ sâu được sử dụng trên mô hình này ít hơn so với hai mô hình chuyên lúa và chuyên màu.

Ở nhóm hoạt chất trừ bệnh, trên mô hình chuyên lúa chiếm tỷ lệ cao nhất (35%) kế đến là mô hình chuyên màu (33%) và mô hình luân canh lúa – màu (32%). Từ kết quả ghi nhận có thể thấy số loại hoạt chất trừ bệnh không có khác biệt nhiều giữa các mô hình (Hình 4.2c).

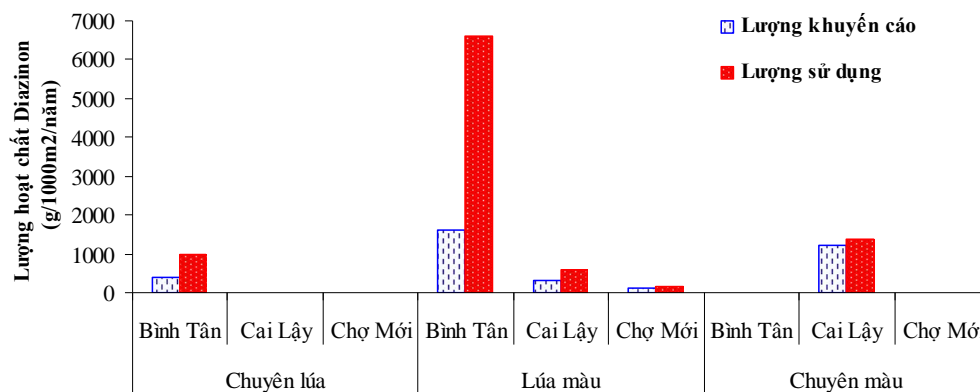
4.1.2 Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu Diazinon trên các mô hình canh tác (chuyên lúa, luân canh lúa-màu và chuyên màu) ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long

Nhìn chung, Diazinon được sử dụng trên mô hình canh tác rau màu, luân canh lúa-màu nhiều hơn trên mô hình canh tác lúa. Kết quả điều tra cho thấy, Diazinon được sử dụng trên mô hình lúa-màu có 25,6% số hộ sử dụng chiếm 32,4% tổng diện tích điều tra; ở mô hình chuyên màu, có 13,7% số hộ sử dụng Diazinon chiếm 13,7% tổng diện tích điều tra; trên mô hình chuyên lúa, Diazinon được sử dụng ít hơn với 6,1% số hộ sử dụng trên 5,0% tổng diện tích điều tra. Trong đó, trên mô hình chuyên lúa Diazinon chỉ được sử dụng ở Bình Tân-VL, trên mô hình chuyên màu chỉ sử dụng ở Cai Lậy-TG và trên mô hình lúa-màu được sử dụng ở cả Bình Tân, Cai Lậy, Chợ Mới (Hình 4.3). Bên cạnh đó liều lượng Diazinon được nông dân sử dụng tại các địa điểm khảo sát cũng cao hơn trung bình khoảng từ 2-4 lần so với liều khuyến cáo (Hình 4.4)



Hình 4.3. Sử dụng Diazinon trên các mô hình chuyên lúa, lúa-màu và chuyên màu

Ở Bình Tân, số phiếu điều tra là 50 phiếu. Ngoài cây lúa, các loại cây rau màu được trồng phổ biến ở đây là khoai lang và xà lách xoong. Số liệu thống kê cho thấy Diazinon được sử dụng trên các mô hình canh tác: chuyên lúa và lúa-màu (Hình 4.3). Trong đó, trên mô hình chuyên lúa có 21,4% số hộ sử dụng chiếm 11,5% tổng diện tích điều tra; trên mô hình luân canh lúa-màu có 38,1% số hộ sử dụng chiếm 39,6% tổng diện tích điều tra. Các loại thuốc BTVT có chứa Diazinon được sử dụng ở đây như Basudin 10H, Diazan 50ND, Diazan 60EC. Liều lượng Diazinon được nông dân sử dụng cao hơn nhiều lần so với khuyến cáo, trung bình lượng Diazinon được sử dụng tại Bình Tân cao hơn khuyến cáo khoảng 2 lần trên mô hình chuyên lúa và cao hơn khoảng 4 lần so với liều khuyến cáo trên mô hình lúa-màu (Hình 4.4). Cụ thể, với thuốc Diazan 60EC được sử dụng trên mô hình chuyên lúa trong khi liều khuyến cáo là 198 g/1.000m²/năm thì nông dân sử dụng với liều 600 g/1.000m²/năm (chia làm 3 lần sử dụng) cao hơn gấp khoảng 3 lần so với liều khuyến cáo. Trên mô hình lúa-màu, với thuốc Diazan 50ND trong khi liều khuyến cáo là 200 g/1000m²/năm thì liều lượng sử dụng là 1.200 g/1.000m²/năm (với 24 lần sử dụng) cao hơn gấp 6 lần so với khuyến cáo, hay với thuốc Basudin 10H được sử dụng ở vụ màu trong khi liều khuyến cáo là 100 g/1.000m²/năm thì liều lượng sử dụng là 1.000 g/1.000m²/năm (với 1 lần sử dụng) cao hơn gấp 10 lần so với khuyến cáo. Nhìn chung, Bình Tân là nơi có liều lượng Diazinon được sử dụng nhiều nhất tại trong các địa điểm điều tra tình hình sử dụng thuốc BTVT.



Hình 4.4 Liều lượng sử dụng Diazinon trong các mô hình canh tác

Chú thích: Liều lượng khuyến cáo được tính dựa theo số lần sử dụng trong năm và dựa vào liều khuyến cáo trên bao bì.

Ở Chợ Mới, số lượng phiếu điều tra là 48 phiếu. Bên cạnh cây lúa, loại cây rau màu tại các hộ điều tra trên mô hình chuyên màu và lúa-màu khá đa dạng như ớt, bắp, bắp rau, dưa leo, khoai môn, khổ qua, bầu bí... Các loại thuốc trừ sâu được nông dân sử dụng cũng khá đa dạng để phòng trừ sâu hại như sâu ăn lá, sâu keo, sâu xanh, bọ trĩ, sâu đục trái... Số liệu điều tra riêng với Diazinon cho thấy có 1/17 hộ điều tra (tương đương 5,9%) chiếm 3,7% tổng diện tích điều tra trên mô hình lúa-màu (Hình 4.3). Loại thuốc BVTV chứa Diazinon được nông dân Chợ Mới sử dụng là Basudin 10H. Tương tự Chợ Mới, tại Bình Tân nồng độ và liều lượng ở đây cũng cho thấy tình trạng sử dụng thuốc cao hơn so với khuyến cáo, trong khi liều lượng khuyến cáo là 100 g/1.000m²/năm thì nông dân sử dụng với liều lượng là 167 g/1.000m²/năm, cao hơn khuyến cáo khoảng 2 lần (Hình 4.4). Kết quả điều tra cũng cho thấy tại các hộ nông dân được điều tra trên mô hình chuyên lúa, lúa màu và chuyên màu tuy hiện tại ít sử dụng thuốc chứa hoạt chất Diazinon nhưng trong lịch sử canh tác của đa số các hộ điều tra tại Chợ Mới trong vòng 20 năm có sử dụng các loại thuốc chứa Diazinon nhiều với liều lượng cao. Nhìn chung, so với địa điểm Bình Tân và Cai Lậy, số loại thuốc và liều lượng Diazinon được sử dụng ít hơn. Nguyên nhân có thể do điều kiện canh tác, loại cây trồng cũng như trình độ canh tác của người dân ở từng địa điểm là khác nhau vì thế mà loại thuốc BVTV được sử dụng cũng như liều lượng sử dụng sẽ khác nhau.

Ở Cai Lậy, số phiếu điều tra là 45 phiếu. Bên cạnh cây lúa, các loại cây rau màu tại khu vực này rất đa dạng như mướp, bắp, dưa leo, cà phôi, đậu bắp, dưa hấu... Vì vậy các loại thuốc trừ sâu được sử dụng ở đây đa dạng nhất trong các khu vực khảo sát nhằm phòng trừ các loại sâu hại như: sâu đục trái, sâu đục thân, sâu vẽ bùa, rầy xanh, bọ trĩ... Kết quả điều tra cũng cho thấy, cũng tương tự như Chợ Mới, do đặc điểm đa dạng cây trồng, nhiều loại sâu hại nên việc sử dụng thuốc trừ sâu ở đây cũng đa dạng và liều lượng cao. Số liệu thống kê cho thấy Diazinon được sử dụng trên mô hình chuyên màu và vụ màu trong mô hình lúa-màu. Trong đó, trên mô hình chuyên màu có 35% số hộ sử dụng chiếm 36,2% tổng diện tích điều tra; trên mô hình lúa-màu có 60% số hộ chiếm 50,8% tổng diện tích điều tra (Hình 4.3). Các loại thuốc BTVT chứa Diazinon được sử dụng ở đây là Basudin 10H, Diazan 10H và Vibasu 40EC. Cũng tương tự như ở Chợ Mới và Bình Tân, liều lượng Diazinon được sử dụng ở Cai Lậy cao hơn khoảng 2 lần so với liều khuyến cáo trên mô hình lúa-màu (Hình 4.4). Cụ thể, đối với thuốc Basudin 10H được sử dụng trên mô hình chuyên màu Diazinon được sử dụng với liều lượng là 200 g/1.000m²/năm trong khi liều khuyến cáo là 100 g/1.000m²/năm (với 1 lần sử dụng), cao hơn gấp 2 lần so với liều khuyến cáo. Trên mô hình chuyên màu, Diazinon thường được sử dụng với liều từ 1-2 lần so với khuyến cáo. Cụ thể, thuốc Basudin 10H trong khi liều lượng khuyến cáo là 200 g/1.000m²/năm (chia làm 2 lần sử dụng) thì lượng Diazinon được sử dụng là 400 g/1.000m²/năm, cao hơn 2 lần so với khuyến cáo. Tuy nhiên, ở đây vẫn có trường hợp sử dụng Diazinon ít hơn so với liều khuyến cáo, nguyên nhân là do thuốc trừ sâu chứa Diazinon được phối trộn với một số loại thuốc khác như Regent 800WG (hoạt chất: Fipronil) hay Padan 95SP (hoạt chất: Cartap).

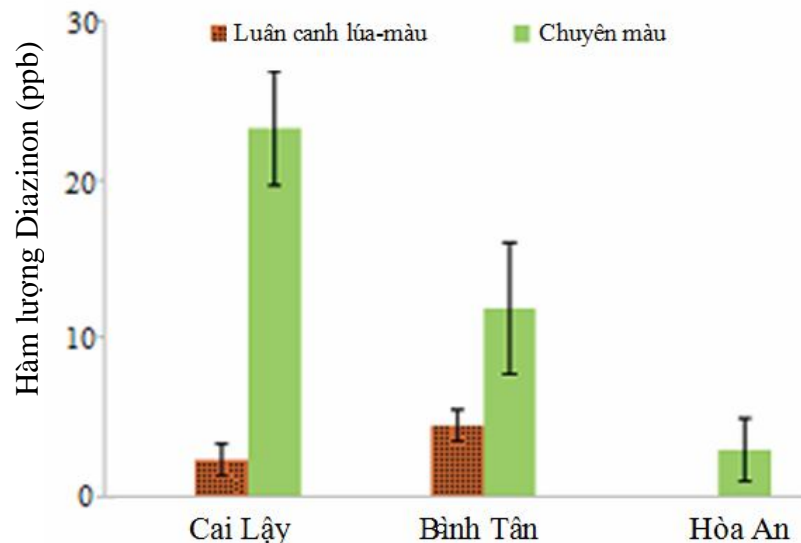
Tóm lại, tại các địa điểm khảo sát, thuốc trừ sâu được sử dụng khá đa dạng về chủng loại hoạt chất cũng như chế phẩm thương mại. Kết quả thống kê cho thấy Diazinon được sử dụng phổ biến ở huyện Bình Tân-VL và Cai Lậy-TG. Liều lượng Diazinon được nông dân sử dụng cao hơn khuyến cáo từ 2-4 lần. Diazinon được sử dụng trên mô hình canh tác rau màu nhiều hơn trên mô hình canh tác lúa. Điều này có thể do một số nguyên nhân như: thứ nhất, trên mô hình canh tác lúa, do đặc tính cây lúa, sâu hại thường xuất hiện vào thời kì đầu (thời kì sinh trưởng dinh dưỡng) do đó thuốc trừ sâu sẽ được sử dụng ở thời kì này, về sau trên ruộng lúa ít xuất hiện sâu hại. Thêm vào đó là sự xuất hiện của nhiều loại thuốc BTVT với nhiều loại hoạt chất mới, khi canh

tác lâu năm có thể xuất hiện tình trạng kháng thuốc nên nông dân đã thay đổi các loại thuốc mới, do đó Diazinon cũng phần nào ít được sử dụng; thứ hai, trên mô hình chuyên màu, luân canh lúa-màu: có sự đa dạng về loại cây trồng nên cũng đa dạng về loài sâu hại. Vì thế, xác suất Diazinon được sử dụng cao hơn.

Ngoài ra, trong quá trình điều tra tại các địa điểm cũng ghi nhận được tình trạng như sử dụng thuốc quá liều và cách xử lý vỏ bao thuốc ngay tại ruộng hoặc vứt xuống sông hồ gần ruộng. Đây có thể là một trong những nguyên nhân làm ô nhiễm môi trường, gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người.

4.2 Ô nhiễm hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng ở Đồng bằng sông Cửu Long

Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon trong đất vào thời điểm sau khi thu hoạch tại các địa điểm đều phát hiện dư lượng Diazinon (Hình 4.5). Trong đó, hàm lượng Diazinon trong đất cao nhất tại Cai Lậy trên mô hình chuyên canh màu là 23,2 ppb. Qua đó, cho thấy nếu sau mỗi vụ canh tác dư lượng của Diazinon khá cao. Nhưng sau khi kết thúc vụ canh tác, nông dân tiếp tục sử dụng Diazinon để bảo vệ cây trồng cho vụ tiếp theo và dư lượng Diazinon tiếp tục tích lũy trong đất.



Hình 4.5 Ô nhiễm Diazinon tại một số địa điểm ở ĐBSCL

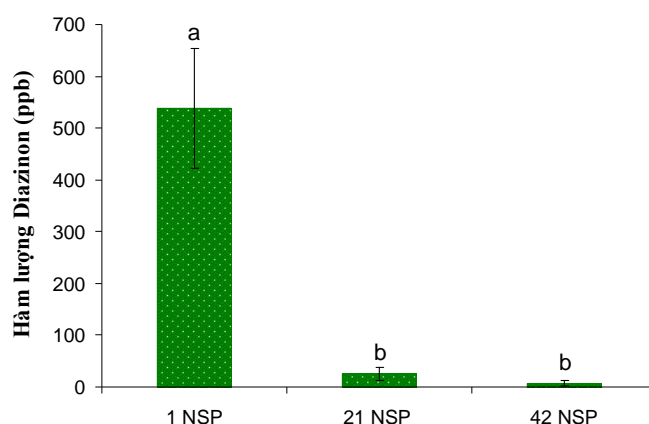
Ghi chú: địa điểm Hòa An là một xã thuộc huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang

4.3 Lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon

4.3.1 Lưu tồn thuốc trừ sâu Diazinon ngoài đồng ruộng tại Hòa An –Hậu Giang và Bình Tân-Vĩnh Long

- Tại Hòa An-Hậu Giang

Hàm lượng Diazinon có khả năng ly trích trong đất canh tác mía được phân tích theo thời gian được thể hiện qua Hình 4.6. Hàm lượng Diazinon giảm dần theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm sau khi phun thuốc 1 ngày. Hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất trong giai đoạn 1 – 21 ngày sau phun giảm 95,5% với tốc độ phân hủy 4,54 %/ngày, giai đoạn 21 – 42 ngày sau phun hàm lượng Diazinon giảm 3,0% với tốc độ phân hủy 0,14%/ngày. Như vậy, trên mô hình chuyên canh mía Diazinon phân hủy với tốc độ khá cao và nếu một vụ nông dân chỉ sử dụng thuốc Diazinon một lần, thì sau một vụ canh tác dư lượng Diazinon sẽ phân hủy hoàn toàn.



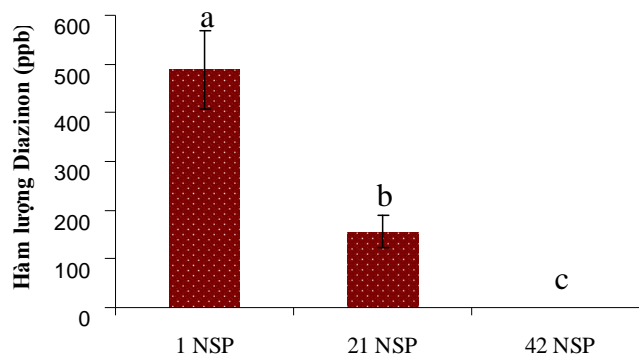
Hình 4.6 Lưu tồn Diazinon trên mô hình chuyên canh mía tại Hòa An-Hậu Giang (2013)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

- Tại Bình Tân –Vĩnh Long

Theo kết quả nghiên cứu, hàm lượng Diazinon trong hai mô hình canh tác tại Bình Tân giảm dần theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 1 ngày sau khi phun thuốc trừ sâu chứa hoạt chất Diazinon. Trên mô hình luân canh lúa-màu (vụ khoai lang), hàm lượng Diazinon cao nhất ở thời điểm 1 ngày sau phun là 488 ppb và đến 42 ngày sau phun thì không phát hiện Diazinon trong đất. Hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất trong giai đoạn 1 – 21 ngày sau phun (68%) với tốc độ phân hủy 3,24 %/ngày, giai đoạn 21 –

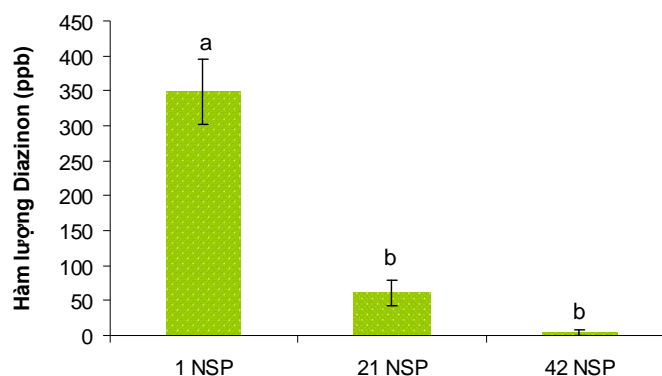
42 ngày sau phun hàm lượng Diazinon giảm 32% với tốc độ phân hủy 1,52%/ngày (Hình 4.7).



Hình 4.7 Lưu tồn Diazinon trên mô hình luân canh lúa-khoai lang (vụ khoai lang) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

Trên mô hình chuyên canh màu, hàm lượng Diazinon cao nhất vào thời điểm 1 ngày sau phun 318 ppb và thấp nhất ở thời điểm 42 ngày sau phun 3,52 ppb. Hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất trong giai đoạn 1 – 21 ngày sau phun giảm 82,6%, với tốc độ phân hủy 3,93%/ngày, giai đoạn 21 – 42 ngày sau phun hàm lượng Diazinon giảm 16% với tốc độ phân hủy 0,76%/ngày (Hình 4.8).



Hình 4.8 Lưu tồn Diazinon trên mô hình chuyên màu (xà lách xoong) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

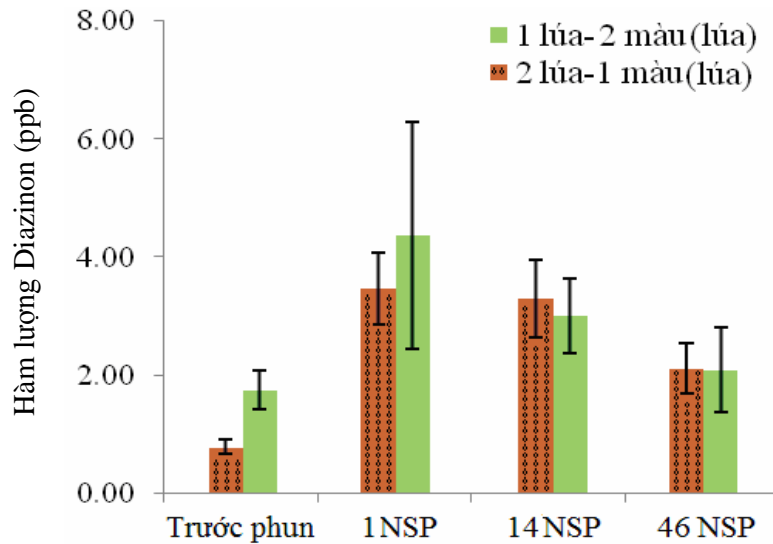
Qua kết quả phân tích trên cho thấy tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu. Theo các nghiên cứu trước của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy tốc độ phân hủy Diazinon trong đất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như pH, hàm lượng chất hữu cơ và yếu tố hữu sinh (vi sinh vật). Trong đó, tốc độ phân hủy Diazinon cao

khi pH đất có giá trị axit hoặc kiềm và Diazinon bền trong đất khi pH đất trung tính (Chapman and Cole, 1982). Nhưng pH đất tại các địa điểm trên các mô hình canh tác có giá trị tương đương nhau (Bảng 3.2, Bảng 3.3), vì thế tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau trong đất tại các địa điểm Bình Tân-Vĩnh Long và Hòa An – Hậu Giang trên các mô hình canh tác (luân canh lúa-màu và chuyên màu) có thể phụ thuộc vào các yếu tố khác. Kết quả phân tích hàm lượng chất hữu cơ trong đất tại Hòa An –Hậu Giang và Bình Tân –Vĩnh Long (Bảng 3.2, Bảng 3.3) tỷ lệ thuận với tốc độ phân hủy Diazinon trong đất (Hình 4.6, Hình 4.7, Hình 4.8). Kết quả nghiên cứu này tương tự kết quả nghiên cứu của Sattar (1990) và Konrad *et al.*, (1967) tốc độ phân hủy Diazinon trong đất tăng khi hàm lượng chất hữu cơ tăng. Bên cạnh đó, hàm lượng chất hữu cơ trong đất tỷ lệ thuận với mật độ vi sinh vật nên đã góp phần gia tăng khả năng phân hủy Diazinon (Sarmah *et al.*, 2009). Như vậy trong trường hợp trên tốc độ phân hủy Diazinon có thể phụ thuộc vào hàm lượng chất hữu cơ trong đất và mật độ vi sinh vật đất.

Từ kết quả phân tích trên cho thấy, tốc độ phân hủy Diazinon rất cao trên cả hai mô hình chuyên canh màu (xà lách xoong) và mô hình luân canh lúa-màu (vụ khoai lang). Tuy nhiên, thí nghiệm chỉ khảo trên một lần phun thuốc chứa hoạt chất Diazinon vào đầu vụ canh tác cây trồng. Trong điều kiện sản xuất thực tế, nông dân sử dụng thuốc trừ sâu Diazinon với tần suất rất cao trên mỗi vụ. Nên tiềm ẩn nguy cơ ô nhiễm do thuốc trừ sâu Diazinon rất cao.

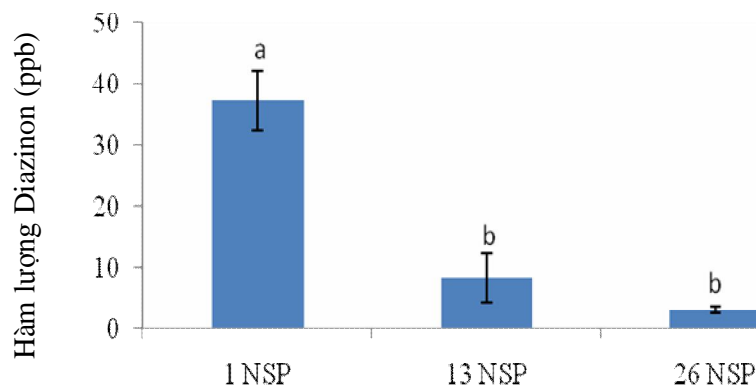
4.3.2 Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác luân canh lúa-màu (2 lúa-1 màu, 1 lúa- 2 màu) tại Long Khánh-Cai Lậy-Tiền Giang

Vụ Đông Xuân, trồng lúa trên cả 2 mô hình canh tác. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng Diazinon trong đất canh tác trên cả hai mô hình đều lưu tồn từ vụ canh tác trước, dao động từ 0,79 ppb đến 1,81 ppb (thời điểm trước phun thuốc). Vào thời điểm 1 ngày sau khi phun thuốc, hàm lượng Diazinon trên mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu và mô hình luân canh 1 lúa – 2 màu cao nhất, tương ứng là 3,30 ppb và 4,37 ppb. Sau 46 ngày phun thuốc hàm lượng Diazinon còn lại khoảng 50% trên cả 2 mô hình canh tác, với tốc độ khoảng 1,08%/ngày. Qua đó cho thấy, với tốc độ phân hủy 1,08/ngày thì sau một vụ canh tác lúa hàm lượng Diazinon vẫn lưu tồn đến vụ sau (Hình 4.9).



Hình 4.9 Lưu tồn Diazinon trong các mô hình canh tác 1 lúa-2 màu (vụ lúa) và 2 lúa-1 màu tại Long Khánh, Cai Lậy, Tiền Giang (vụ Đông Xuân 2013)

Kết quả nghiên cứu lưu tồn của Diazinon trên mô hình luân canh 1 lúa – 2 màu (trồng đậu xanh) (Hình 4.10), cho thấy hàm lượng Diazinon giảm với tốc độ rất cao theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 1 ngày sau khi phun thuốc. Hàm lượng Diazinon cao nhất ở thời điểm 1 ngày sau phun (37 ppb) và thấp nhất ở thời điểm 26 ngày sau phun (3 ppb). Giai đoạn 1 – 13 ngày sau phun, hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất, giảm 79% với tốc độ phân hủy 6,58%/ngày. Giai đoạn 13 – 26 ngày sau phun hàm lượng Diazinon giảm 13% với tốc độ phân hủy 1%/ ngày. Như vậy, sau 26 ngày phun thuốc trừ sâu Diazinon, thì hàm lượng Diazinon giảm 92% với tốc độ phân hủy trung bình là 3,54%/ngày.

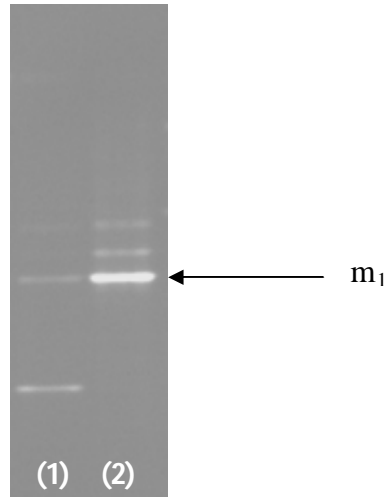


Hình 4.10 Lưu tồn của Diazinon ở mô hình luân canh 1 lúa – 2 màu (đậu xanh) tại Long Khánh, Cai Lậy, Tiền Giang (vụ Hè Thu 2013)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

Qua kết quả phân tích trên cho thấy mô hình canh tác có ảnh hưởng đến lưu tồn Diazinon và tốc độ phân hủy Diazinon. Việc thay đổi điều kiện thoáng khí trong mô hình canh tác luân canh lúa-màu (1 lúa-2 màu, 2 lúa-1 màu) thì vụ lúa, tốc độ phân hủy Diazinon không khác biệt vào các thời điểm. Nhưng ở vụ màu (đậu xanh) của mô hình 1 lúa-2 màu tốc độ phân hủy Diazinon cao hơn vụ lúa. Qua đó cho thấy, trên cùng mô hình canh tác nhưng tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau vào vụ màu và vụ lúa (mô hình canh tác luân canh lúa-màu). Thí nghiệm này được thực hiện trên cùng ruộng canh tác cây trồng vì thế đã loại trừ các nhân tố sinh thái ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy Diazinon như nhiệt độ, pH và hàm lượng chất hữu cơ. Bên cạnh đó theo nghiên cứu của Armstrong *et al.*, (1967) trong đất phân hủy sinh học Diazinon là con đường chính. Như vậy cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon trong đất vào vụ màu và vụ lúa (mô hình 1 lúa-2 màu) có thể khác nhau được thể hiện qua Hình 4.11.

Kết quả điện di biến tính tăng cấp (DGGE) của sản phẩm PCR với cặp mồi 341F-GC và 534R, mẫu số (1) có 2 vạch (tổ hợp vi khuẩn đất vào vụ lúa) và mẫu số (2) có 3 vạch (tổ hợp vi khuẩn đất vào vụ màu) (Hình 4.11). Trong đó, mỗi vạch là một nhóm vi khuẩn. Độ đậm và kích thước của vạch, thể hiện mật độ vi khuẩn trong tổ hợp vi khuẩn. Vị trí vạch có kí hiệu m_1 xuất hiện trong hai mẫu, chứng tỏ nhóm vi khuẩn này có thể sinh trưởng tốt trong cả hai chế độ thoáng khí. Các vị trí vạch còn lại thể hiện sự tăng trưởng khác nhau của các loài vi khuẩn ở hai chế độ thoáng khí. Như vậy, trong điều kiện canh tác thực tế ngoài đồng ruộng sự thay đổi mùa vụ trong mô hình canh tác luân canh lúa-màu, làm thay đổi cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon. Hai tổ hợp vi khuẩn này thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả, nhưng các dòng vi khuẩn được phân lập từ hai tổ hợp này không phân hủy Diazinon, trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm. Qua đó cho thấy, các dòng vi khuẩn trong cả hai tổ hợp có thể có sự tương tác với nhau trong hoạt động phân hủy Diazinon.



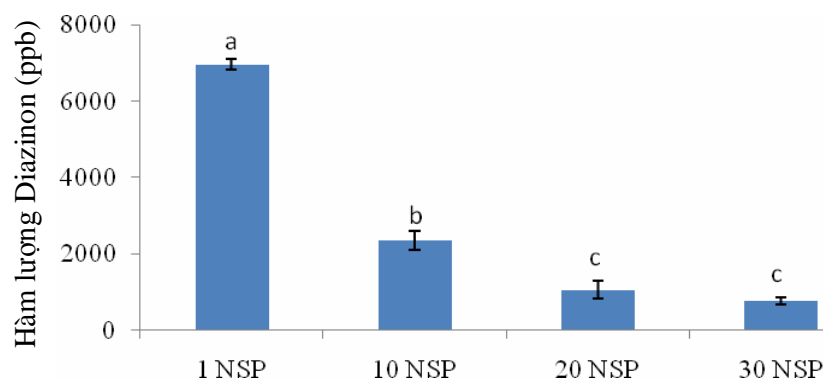
Hình 4.11. Điện di đồ về các tổ hợp vi khuẩn: (1) vụ lúa, (2) vụ màu của mô hình luân canh 1 lúa- 2 màu

Từ kết quả trên cho thấy vi khuẩn có vai trò quan trọng trong phân hủy Diazinon, kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Sharom *et al.*, (1980b) và Armstrong *et al.*, (1967).

4.3.3 Lưu tồn thuốc Diazinon trên mô hình canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu trong điều kiện nhà lưới.

Kết quả khảo sát lưu tồn Diazinon trên các mô hình canh tác trong điều kiện nhà lưới được thể hiện qua Hình 4.12, Hình 4.13 và Hình 4.14.

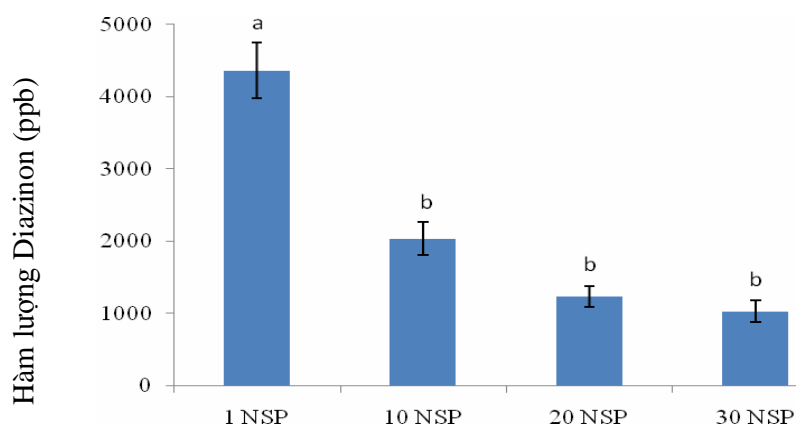
Qua kết quả khảo sát lưu tồn của Diazinon trên mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (trồng đậu xanh) cho thấy hàm lượng Diazinon giảm theo thời gian, và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 1 ngày sau phun. Hàm lượng Diazinon cao nhất ở thời điểm 1 ngày sau phun (6958 ppb) và thấp nhất ở thời điểm 30 ngày sau phun (772 ppb). Hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất trong giai đoạn 1 – 10 ngày sau phun, giảm 66% với tốc độ phân hủy 6,6%/ngày, giai đoạn 10 – 20 ngày sau phun giảm 19% với tốc độ phân hủy 1,9%/ngày và giai đoạn 20 – 30 ngày sau phun giảm 4% với tốc độ phân hủy 0,4%/ngày. Sau 30 ngày phun thuốc, hàm lượng Diazinon trong đất ly trích được là 11%. Kết quả này được trình bày ở Hình 4.12.



Hình 4.12 Lưu tồn của Diazinon trên mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

Kết quả thể hiện ở Hình 4.13 cho thấy hàm lượng Diazinon trên mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (trồng lúa) giảm dần theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 1 ngày sau phun. Hàm lượng Diazinon cao nhất ở thời điểm 1 ngày sau phun (4361 ppb) và thấp nhất ở thời điểm 30 ngày sau phun (1026 ppb). Hàm lượng Diazinon giảm mạnh nhất trong giai đoạn 1 – 10 ngày sau phun, giảm 53% với tốc độ phân hủy 5,3%/ngày; giai đoạn từ 10 – 20 ngày sau phun, giảm 19% với tốc độ phân hủy là 1,9%/ngày và giai đoạn từ 20 – 30 ngày sau phun giảm 4% với tốc độ phân hủy 0,4%/ngày. Hàm lượng Diazinon ly trích được từ đất sau 30 ngày phun thuốc là 24%.

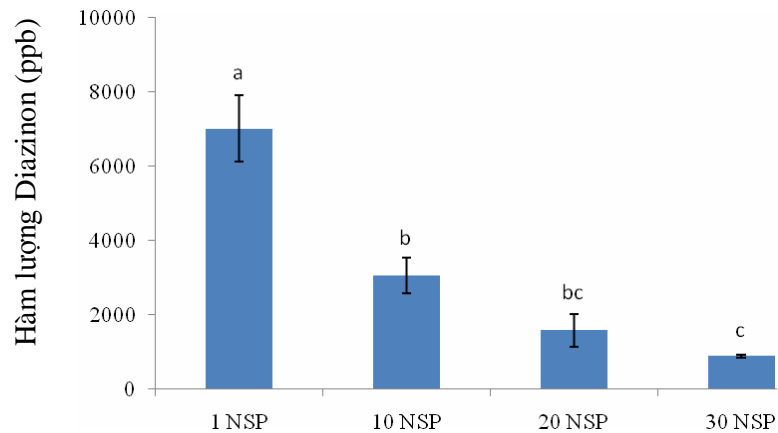


Hình 4.13 Lưu tồn của Diazinon trong mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (vụ lúa) trong điều kiện nhà lưới (2014)

Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

Qua kết phân tích trên, cho thấy trên cùng một mô hình canh tác luân canh 2 lúa – 1 màu, nhưng cây trồng khác nhau thì sự lưu tồn của Diazinon khác nhau. Có thể nguyên nhân là do cây trồng ảnh hưởng đến phân hủy Diazinon hoặc có thể chế độ thoáng khí khác nhau là tác nhân quyết định sự tăng trưởng của tổ hợp vi khuẩn hiếu khí phân hủy Diazinon.

Kết quả phân tích hàm lượng Diazinon trong đất trên mô hình chuyên canh màu (đậu xanh), cho thấy hàm lượng Diazinon giảm tuyến tính theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 1 ngày sau khi phun thuốc (Hình 4.14). Hàm lượng Diazinon cao nhất ở thời điểm 1 ngày sau phun 7012 ppb và thấp nhất ở thời điểm 30 ngày sau phun 882 ppb. Giai đoạn từ 1 – 10 ngày sau phun hàm lượng Diazinon giảm cao nhất, giảm 66% với tốc độ phân hủy 6,6%/ngày; giai đoạn từ 1 – 20 ngày sau phun giảm 21% với tốc độ phân hủy 2,1%/ngày và giai đoạn từ 20 – 30 ngày sau phun giảm 10% với tốc độ phân hủy 1%/ngày. Sau 30 ngày phun thuốc, hàm lượng Diazinon ly trích được từ đất canh tác chuyên canh màu (đậu xanh) là 13%.



Hình 4.14 Lưu tồn của Diazinon trên mô hình chuyên canh màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014)

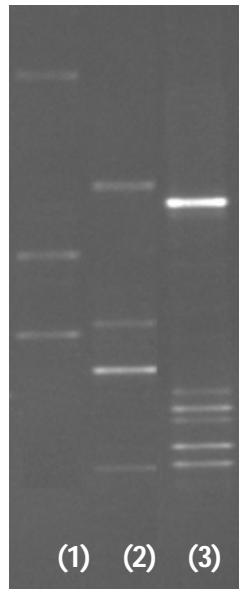
Ghi chú: NSP: Ngày sau phun, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức

Kết quả khảo sát lưu tồn Diazinon, trên các mô hình canh tác luân canh lúa màu và chuyên màu trong điều kiện nhà lưới, tương tự như kết quả khảo sát ngoài đồng ruộng. Mô hình chuyên màu tốc độ phân hủy Diazinon cao nhất, mức độ lưu tồn thấp nhất sau khi kết thúc vụ canh tác. Trên mô hình luân canh lúa-màu, vụ màu Diazinon phân hủy với tốc độ lớn hơn so với vụ lúa.

Từ kết quả trên cho thấy, tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu, mặc dù thí nghiệm được bố trí trên cùng một loại đất thu từ một ruộng canh tác. Bên cạnh đó điều kiện

ngoại cảnh trong nhà lưới tương đối đồng nhất, nhưng tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau, nguyên nhân có thể là do hoạt động của tổ hợp vi khuẩn đất trong phân hủy Diazinon. Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của Sarmah *et al.*, (2009) vi khuẩn có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy Diazinon. Như vậy cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phải khác nhau trên các mô hình canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu vì tốc độ phân hủy Diazinon khác nhau. Cấu trúc các tổ hợp vi khuẩn được thể hiện qua Hình 4.15

Trên mô hình chuyên canh màu, kết quả điện di biến tính tăng cấp (DGGE) của sản phẩm PCR với cặp mồi 341F-GC và 534R, gồm 6 vạch khác nhau được thể hiện qua mẫu số (3) Hình 4.15. Trong đó, mỗi vạch có thể là một nhóm vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon. Trên mô hình luân canh lúa màu vào vụ lúa, kết quả điện di biến tính tăng cấp với mẫu số (1) gồm 3 vạch và 4 vạch vào vụ màu mẫu số (2). Trong đó, một số vạch đậm nét ở mẫu số (1) (vụ lúa) lại rất nhạt ở mẫu số (2) (vụ màu) và ngược lại. Điều này chứng tỏ rằng, khi độ thoáng khí trong đất canh tác thay đổi: độ thoáng khí cao vào vụ màu và độ thoáng khí thấp vào vụ lúa, sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon.

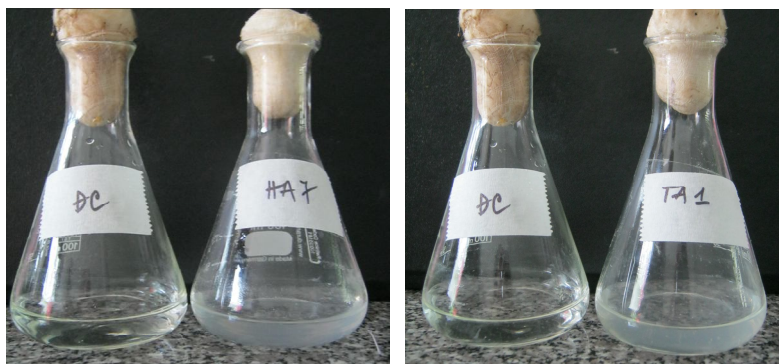


Hình 4.15 Điện di đồ về các tổ hợp vi khuẩn: (1) mô hình luân canh lúa màu vụ lúa, (2) mô hình luân canh lúa màu vụ màu (đậu xanh), (3) mô hình chuyên canh màu (đậu xanh)

4.4 Làm giàu mật độ tổ hợp vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon

- Trên mô hình chuyên màu

Từ 21 mẫu đất gồm 4 mẫu ở Cai Lậy, 4 mẫu ở Bình Minh, 4 mẫu ở Bình Tân, 5 mẫu ở Hòa An và 4 mẫu ở Chợ Mới đã làm giàu mật độ 21 tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon. Sau 3-5 ngày nuôi cấy tổ hợp vi khuẩn thì môi trường chuyển sang đục hơn so với đối chứng, điều này chứng tỏ vi khuẩn có thể phát triển và có sự gia tăng về mật độ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm như là nguồn cacbon (Hình 4.16). Tuy nhiên, mỗi tổ hợp vi khuẩn có độ đục khác nhau.

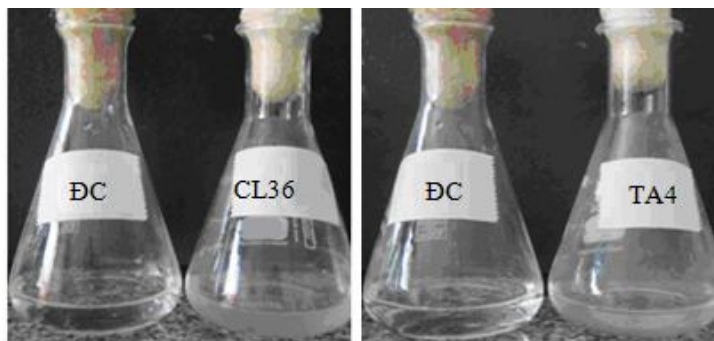


Hình 4.16 Sự phát triển của tổ hợp vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu

Ghi chú: ĐC (Đối chứng): Môi trường khoáng tối thiểu + Diazinon 20 ppm

- Trên mô hình luân canh lúa-màu

Hai mươi tổ hợp vi khuẩn được làm giàu mật độ từ các mẫu đất thu được tại các ruộng luân canh lúa-màu bao gồm 12 mẫu lấy ở vụ màu và 8 mẫu lấy ở vụ lúa. Các mẫu được làm giàu mật độ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm. Sau thời gian làm giàu từ 3-5 ngày, tất cả các dịch nuôi của các tổ hợp vi khuẩn đều trở nên đục hơn so với đối chứng (Hình 4.17). Tiếp tục chuyển các tổ hợp vi khuẩn sang môi trường khoáng tối thiểu mới có chứa Diazinon 20 ppm để làm giàu mật độ. Sau khi cấy chuyển vi khuẩn để nhân mật độ đến lần thứ năm, tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy Diazinon của 20 tổ hợp vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu.



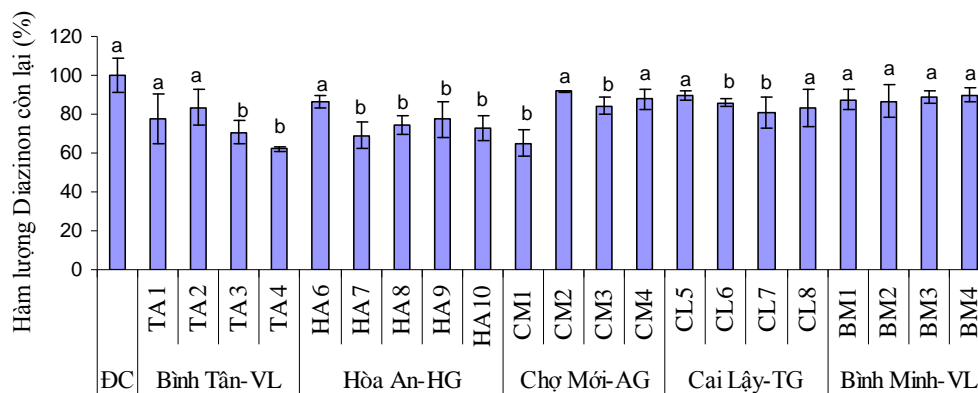
Hình 4.17 Sự phát triển của một số tổ hợp vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm.

Ghi chú: ĐC: Môi trường khoáng tối thiểu + Diazinon 20 ppm

4.5 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn

4.5.1 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất chuyên màu

Thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy Diazinon được bố trí trong môi trường khoáng tối thiểu. Kết quả thí nghiệm sau 14 ngày nuôi cấy, có 10 tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả, giảm từ 14,3 đến 37,9% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Hình 4.18). Từ kết quả trên cho thấy xác suất tìm được tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon rất cao từ 50% - 80% (ngoại trừ địa điểm Bình Minh-Vĩnh Long). Trong đó, tại địa điểm Hòa An số tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon chiếm tỷ lệ cao nhất (80%) có thể là do ở đây cây trồng cạn là mía, nông dân thường xuyên sử dụng thuốc trừ sâu có hoạt chất Diazinon ở dạng hạt (Basudin) để bón vào gốc mía với lượng lớn nhằm tiêu diệt sâu hại.

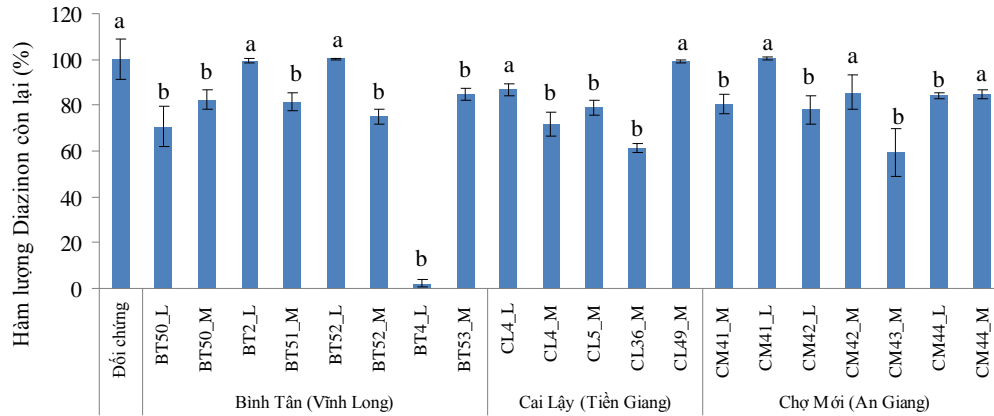


Hình 4.18 Sự phân hủy Diazinon của tổ hợp vi khuẩn làm giàu mật độ từ đất chuyên màu sau 14 ngày nuôi cấy, trong môi trường khoáng tối thiểu.

Ghi chú: ĐC (Đối chứng): Môi trường khoáng tối thiểu + Diazinon 20 ppm, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

4.5.2 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất luân canh lúa-màu

Thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu của 20 cộng đồng vi khuẩn. Kết quả thí nghiệm sau 14 ngày nuôi cấy, có 13 tổ hợp vi khuẩn (4 tổ hợp vi khuẩn vụ lúa, 9 tổ hợp vi khuẩn vụ màu) phân hủy Diazinon hiệu quả, giảm từ 15,3 đến 97,8% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Hình 4.19). Từ kết quả trên cho thấy xác suất tìm được tổ hợp vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon rất cao đạt 65% trong tổng số 20 tổ hợp vi khuẩn khảo sát. Trong đó, số tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập ở vụ màu nhiều hơn so với số tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập ở vụ lúa. Kết quả sau 14 ngày nuôi cấy, có 83,3% tổ hợp vi khuẩn được phân lập ở vụ màu có khả năng phân hủy Diazinon và có 37,5% tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập ở vụ lúa.

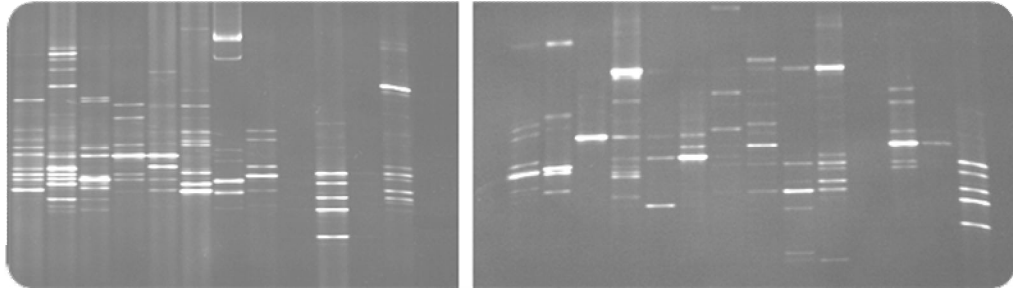


Hình 4.19 Sự phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu mật độ từ đất luân canh lúa-màu sau 14 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

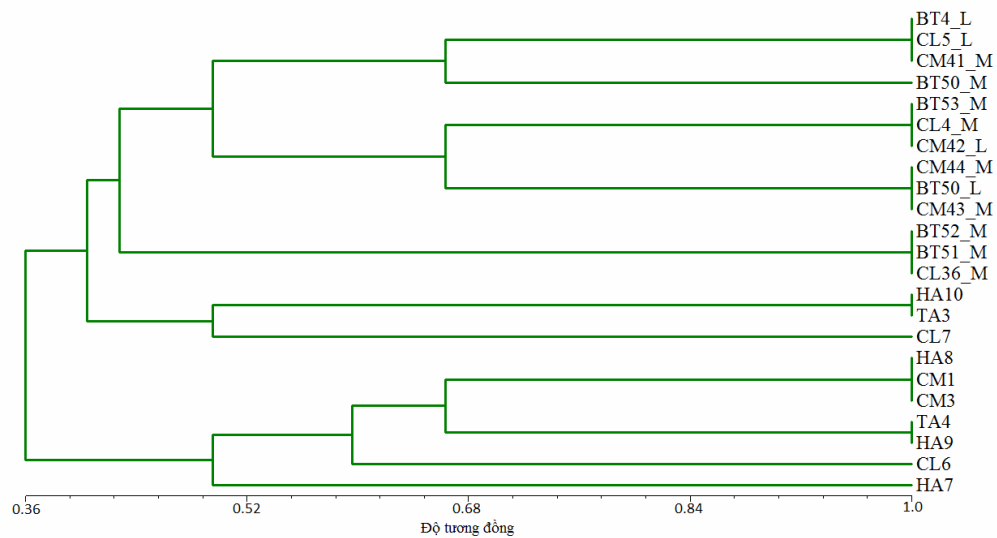
Kết quả trên cho thấy, xác suất phân lập được tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon ở vụ màu cao hơn so với ở vụ lúa. Điều này có thể do một số nguyên nhân như: thứ nhất, trong điều kiện canh tác lúa hay ngập nước liên tục kéo dài, có thể hạn chế sự sinh trưởng của quần thể vi khuẩn hiếu khí. Tuy nhiên, khi chuyển đổi mô hình canh tác từ lúa sang màu trong mô hình canh tác luân canh lúa-màu sẽ làm cho các quần thể vi khuẩn hiếu khí chiếm đa số. Ngoài ra, các đặc tính lý hóa của đất cũng có thể bị thay đổi từ điều kiện canh tác lúa sang màu và ngược lại. Thứ hai, từ kết quả điều tra tình hình sử dụng Diazinon trên mô hình canh tác lúa-màu ở các huyện Bình Tân-Vĩnh Long, Cai Lậy-Tiền Giang, Chợ Mới-An Giang cho thấy, tình hình sử dụng Diazinon ở vụ màu thường có số lượng nông hộ, diện tích sử dụng và liều lượng sử dụng Diazinon nhiều hơn so với vụ lúa. Điều này có thể dẫn đến nguy cơ ô nhiễm Diazinon ở vụ màu cao hơn ở vụ lúa, từ đó hình thành nên tổ hợp vi khuẩn phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon.

Từ kết quả thể hiện qua Hình 4.18 và Hình 4.19 cho thấy các tổ hợp vi khuẩn thể hiện tiềm năng phân hủy Diazinon khác nhau có thể là do nhân tố môi trường thí nghiệm hoặc tổ hợp vi khuẩn. Tuy nhiên, thí nghiệm được bố trí hoàn toàn giống nhau trên các tổ hợp vi khuẩn, vì thế nhân tố môi trường không ảnh hưởng đến sự khác biệt này. Qua đó cho thấy nhân tố ảnh hưởng đến hàm lượng Diazinon suy giảm khác nhau là do thành phần loài vi khuẩn khác nhau trong tổ hợp vi khuẩn (Hình 4.20). Sự khác biệt về cấu trúc của tổ

hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon là do ảnh hưởng của mô hình canh tác được thể hiện qua Hình 4.21.



Hình 4.20 Điện di đồ về các tổ hợp vi khuẩn có nguồn gốc từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu



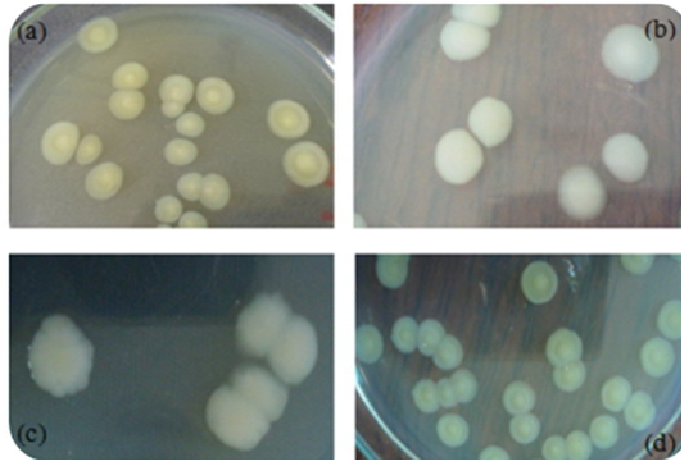
Hình 4.21 Độ tương đồng của các tổ hợp vi khuẩn được làm giàu mật độ từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu

4.6 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon

4.6.1 Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất chuyên màu

Từ 21 tổ hợp đã làm giàu mật độ và khảo sát khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu, sáu cộng đồng có ký hiệu CM1, CL7, HA7, HA10, TA3 và TA4 được chọn để phân lập vi khuẩn. Sử dụng môi trường TSA để phân lập vi khuẩn hiếu khí. Kết quả phân lập được 87 dòng vi khuẩn từ 6 tổ hợp trên. Tuy nhiên, khi chuyển các dòng vi khuẩn đã thuần vào môi trường khoáng tối thiểu bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm, chỉ có 15 dòng vi khuẩn gây đục môi trường. Điều này chứng tỏ rằng các dòng vi khuẩn này phát triển được trong môi trường có chứa thuốc Diazinon và có

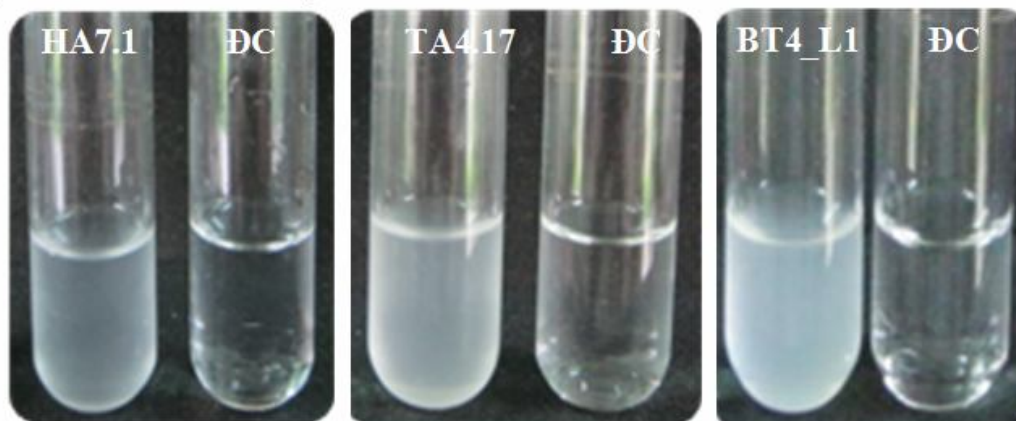
khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon. Hình thái khuẩn lạc một số dòng vi khuẩn được miêu tả thông qua Hình 4.22.



Hình 4.22 Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường TSA: (a) dòng HA7.1, (b) dòng HA7.4, (c) dòng TA3.2 và (d) dòng TA4.17

4.6.2 Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon của các tổ hợp vi khuẩn làm giàu từ đất luân canh lúa-màu

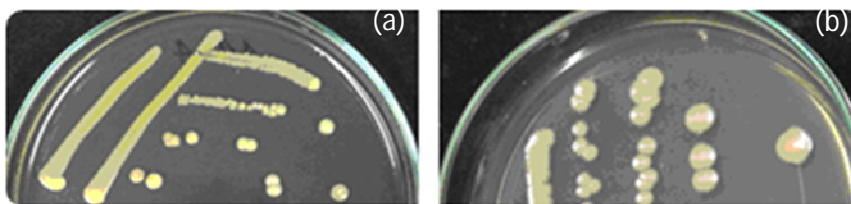
Các tổ hợp vi khuẩn làm giàu mật độ từ đất canh tác luân canh lúa-màu, được chọn để phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Kết quả phân lập vi khuẩn trên môi trường TSA, từ 9 tổ hợp vi khuẩn ở vụ màu phân lập được 90 dòng vi khuẩn, 4 tổ hợp vi khuẩn ở vụ lúa phân lập được 19 dòng vi khuẩn. Tuy nhiên chỉ có 27 dòng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu. Các dòng vi khuẩn phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm sẽ gây độc môi trường nuôi cấy được thể hiện qua hình 4.23.



Hình 4.23 Sự phát triển của một số dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm

Chú thích: Mẫu dòng: Môi trường khoáng tối thiểu + Vi khuẩn + Diazinon 20 ppm. Đối chứng (ĐC): Môi trường khoáng tối thiểu + Diazinon 20 ppm

Kết quả phân lập cho thấy, hình dạng khuẩn lạc ở các dòng vi khuẩn cũng khá đa dạng. Các hình dạng khuẩn lạc bao gồm hình dạng: hình tròn, không đều, dạng rãnh; bờ (rìa): bờ nguyên, phân thùy, gợn sóng; độ nổi có các dạng: phẳng, lồi, lồi có mấu, mô; màu sắc bao gồm màu trắng đục, trắng trong, trắng sữa, vàng, vàng nhạt. Trong đó dạng khuẩn lạc hình tròn, bờ nguyên, lồi hoặc lồi có mấu và màu trắng đục là hình dạng khuẩn lạc chiếm đa số. Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Hình 4.24.



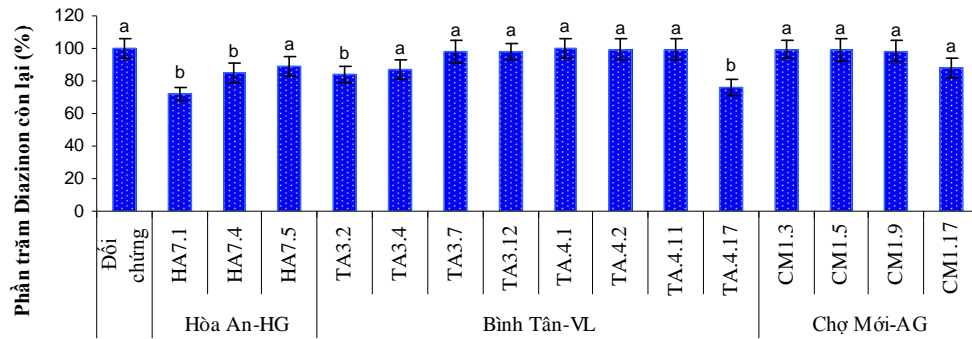
Hình 4.24 Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường TSA: (a) BT4_L1, (b) CL36_M4.

4.7 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu

4.7.1 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu

Trong số các dòng vi khuẩn phân lập được, chọn các dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu, có bổ sung Diazinon 20 ppm để bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy Diazinon. Kết quả phân

tích hàm lượng Diazinon còn lại trong các nghiệm thức sau 30 ngày nuôi cấy cho thấy, các nghiệm thức có chủng các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 thì hàm lượng Diazinon giảm so với đối chứng lần lượt là 27,9%, 15,4%, 15,7% và 24,2% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Hình 4.25).



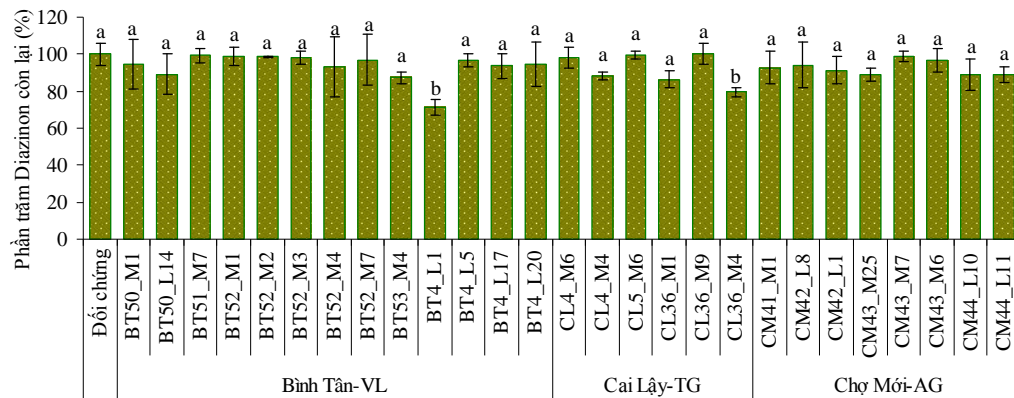
Hình 4.25 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu, sau 30 ngày nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu
 Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Từ kết quả trên cho thấy dòng vi khuẩn HA7.1 có tốc độ phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon cao nhất đạt 0,93%/ngày. Đối với các dòng vi khuẩn còn lại hàm lượng thuốc trừ sâu Diazinon còn lại trong mẫu nuôi thấp hơn so với đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, mặc dù các dòng vi khuẩn này được phân lập từ các tổ hợp có khả năng phân hủy Diazinon (dao động từ 19,4% - 37,9%). Nguyên nhân có thể được giải thích có thể là do trong cộng đồng có nhiều nhóm vi khuẩn, có thể có cả nhóm vi khuẩn phân hủy Diazinon lẫn nhóm không phân hủy Diazinon, bản thân một dòng vi khuẩn có thể không tự phân hủy Diazinon, nhưng khi ở trong một tổ hợp vi khuẩn chúng có thể hỗ trợ nhau, mỗi dòng vi khuẩn sẽ đóng vai trò góp phần vào sự phân hủy Diazinon nhờ đó mà tổ hợp vi khuẩn có thể phân hủy Diazinon.

4.7.2 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất luân canh lúa-màu trong môi trường khoáng tối thiểu

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có chứa Diazinon 20

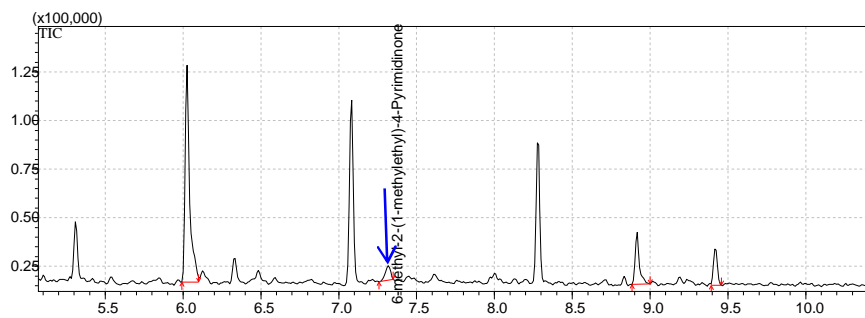
ppm, để bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy Diazinon. Kết quả phân tích hàm lượng Diazinon còn lại trong các mẫu nuôi, cho thấy hàm lượng Diazinon trong một số mẫu thấp hơn so với đối chứng sau 30 ngày nuôi cấy (Hình 4.26). Các nghiệm thức có bổ sung chủng vi khuẩn BT4_L1 hoặc CL36_M4 thì hàm lượng Diazinon giảm so với đối chứng lần lượt là 29,3% và 20,9% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.



Hình 4.26 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu, sau 30 ngày nuôi trong môi trường khoáng tối thiểu

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Sự suy giảm Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu được thể hiện qua Hình 4.25 và Hình 4.26 có thể là do hiện tượng hấp thu sinh học (Diazinon hấp thu vào vách tế bào vi khuẩn) hoặc phân hủy bởi vi khuẩn. Tuy nhiên, kết quả phân tích thành phần môi trường nuôi cấy của các dòng vi khuẩn đã phát hiện sản phẩm do vi khuẩn phân hủy Diazinon với thời gian lưu là 6,3 phút (Hình 4.27) Điều này chứng tỏ rằng các chủng vi khuẩn trên có khả năng phân hủy Diazinon và có thể sử dụng sản phẩm phân hủy Diazinon như nguồn cacbon cho sự sinh trưởng (Yaghoob *et al.*, 2010).

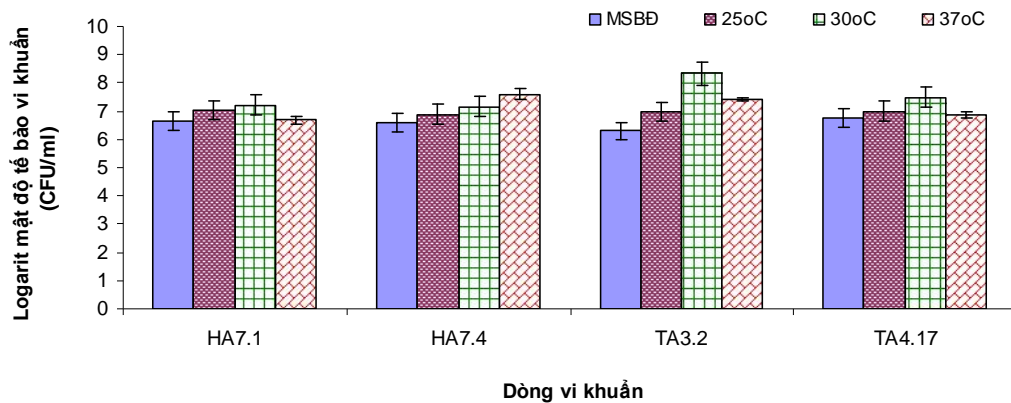


Hình 4.27 Sản phẩm phân hủy Diazinon

4.8 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.

4.8.1 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.

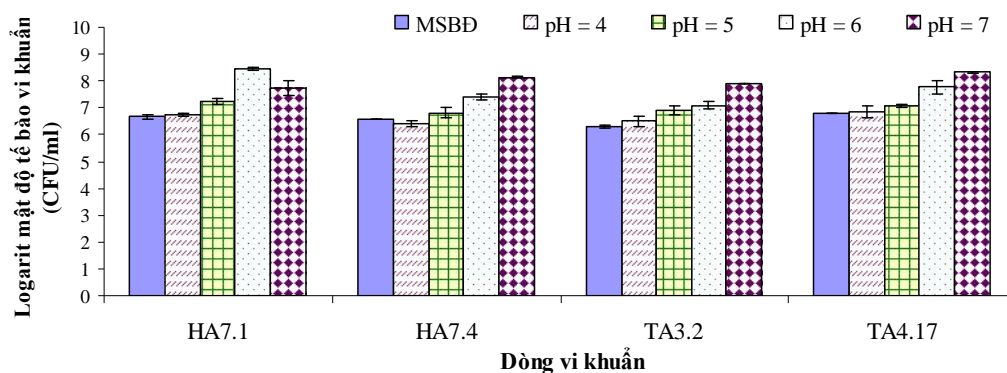
Kết quả thí nghiệm cho thấy có 3 dòng vi khuẩn mật độ tăng cao nhất ở 30°C (HA7.1, TA3.2, TA4.17) và một dòng vi khuẩn gia tăng mật độ cao nhất ở 37°C (HA7.4) (Hình 4.28). Từ kết quả trên cho thấy nhiệt độ có vai trò quan trọng đối với sự gia tăng mật độ vi khuẩn.



Hình 4.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

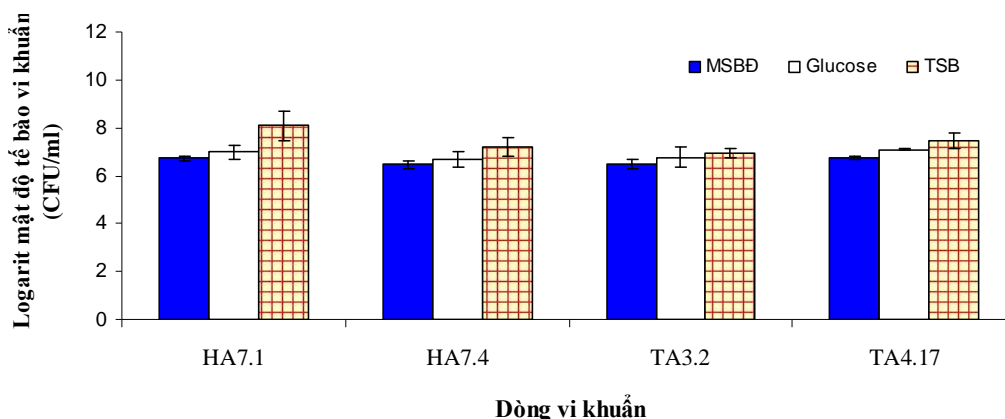
Các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 có khả năng phân hủy hiệu quả hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon được bố trí thí nghiệm để nghiên cứu sự ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn. Kết quả thí nghiệm cho thấy đa số các dòng vi khuẩn có mật độ vi khuẩn cao nhất ở pH = 7. Trong đó, có 3 dòng vi khuẩn mật độ tăng cao nhất ở pH = 7 (HA7.4, TA3.2, TA4.17) và một dòng vi khuẩn gia tăng mật độ cao nhất ở pH = 6 (HA7.1) (Hình 4.29).



Hình 4.29 Ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

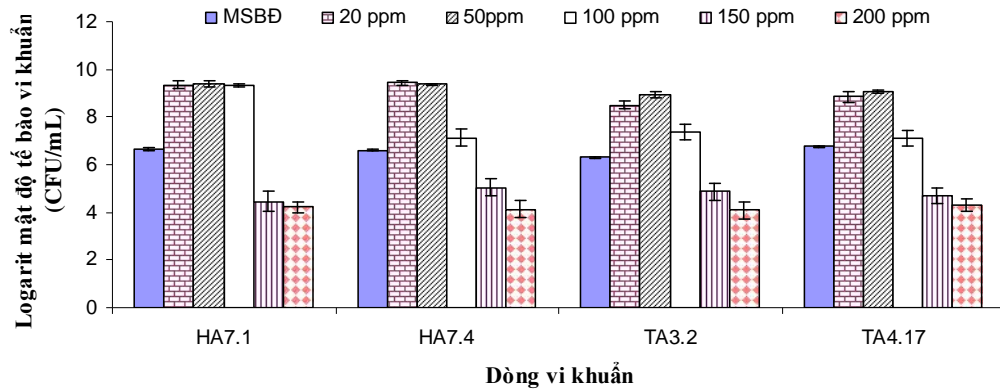
Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả 4 dòng vi khuẩn mật độ tăng cao nhất với nguồn cacbon là TSB (Hình 4.30).



Hình 4.30 Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

Kết quả thí nghiệm cho thấy các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17) đều gia tăng mật độ cao nhất trong khoảng giới hạn tan của Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu (20 ppm - 50ppm). Với nồng độ Diazinon 150 ppm và 200 ppm thì mật độ các dòng vi khuẩn đều thấp hơn so với mật độ ban đầu, điều này chứng tỏ rằng với ở nồng độ 150 ppm và 200 ppm có thể ức chế sự tăng trưởng của các chủng vi khuẩn (Hình 4.31).

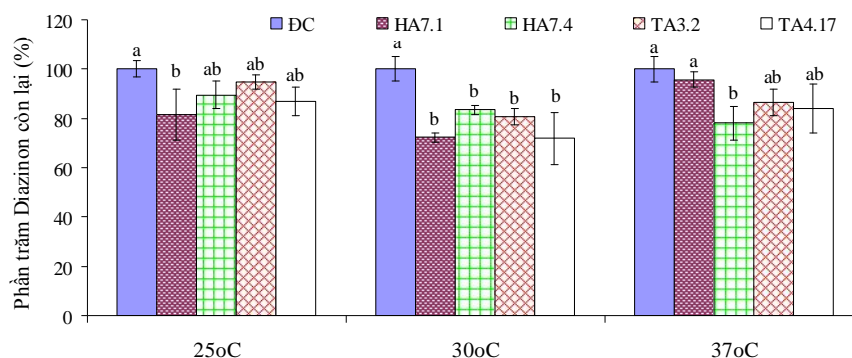


Hình 4.31 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự gia tăng mật độ vi khuẩn của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

4.8.2 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu.

Mỗi dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17) thể hiện khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon khác nhau, tương ứng với các giá trị nhiệt độ khác nhau. Ở nhiệt độ 25°C chỉ có dòng vi khuẩn HA7.1 có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả (giảm 18,3% và tốc độ phân hủy là 0,62%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng, các dòng vi khuẩn còn lại hàm lượng Diazinon còn lại có giảm hơn so với đối chứng, nhưng khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng (Hình 4.32). Đối chiếu với kết quả khảo sát khả năng gia tăng mật độ của vi khuẩn, dòng vi khuẩn HA7.1 thể hiện tăng trưởng tốt ở nhiệt độ 25°C trong môi trường khoáng tối thiểu. Ở 30°C, cả bốn dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 đều phân hủy Diazinon hiệu quả, được thể hiện qua tốc độ phân hủy Diazinon cao (Bảng 4.1). Chỉ có một dòng vi khuẩn HA7.4 có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả ở nhiệt độ 37°C (giảm 15,9% và tốc độ phân hủy là 0,53%/ngày).



Hình 4.32 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ.

Ghi chú: DC: Đối chứng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Bảng 4.1 Khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 ở 30°C trong môi trường khoáng tối thiểu sau 30 ngày nuôi cấy.

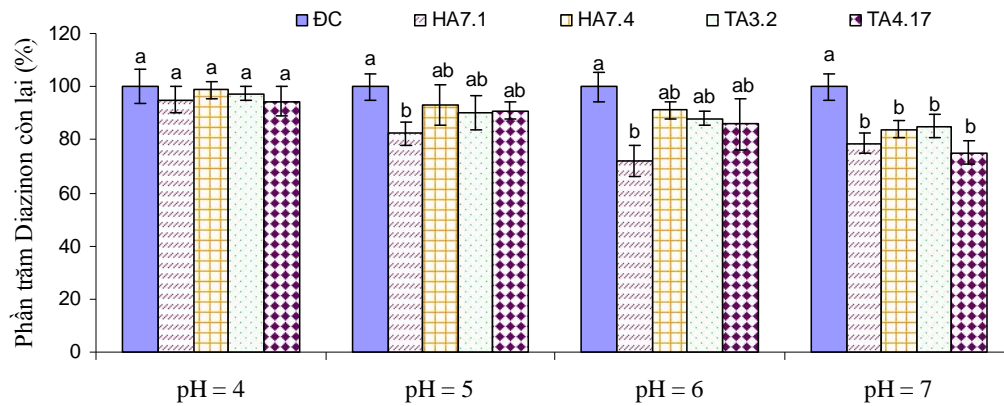
Dòng vi khuẩn	Phần trăm phân hủy (%)	Tốc độ phân hủy (%/ngày)
HA7.1	27,7	0,92
HA7.4	16,5	0,55
TA3.2	19,4	0,65
TA4.17	28,2	0,94

Thí nghiệm khảo sát độ pH của môi trường khoáng tối thiểu, cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả ở pH = 7 và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (Hình 4.33). Tuy nhiên, dòng vi khuẩn HA7.1 thể hiện khả năng phân hủy Diazinon cao nhất ở pH = 6. Điều này chứng tỏ rằng, tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phụ thuộc vào giá trị pH môi trường. Vì thế, trong xử lý ô nhiễm hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon trong điều kiện canh tác thực tế, cần quan tâm độ pH của môi trường để tạo điều kiện tối ưu cho vi khuẩn hoạt động.

Đối với dòng vi khuẩn HA7.1, phân hủy Diazinon hiệu quả khi độ pH môi trường đạt pH = 5, pH = 6 và pH = 7, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng là 17,6% (tốc độ phân hủy 0,59%/ngày), 28,1% (tốc độ phân hủy 0,94%/ngày) và 21,3% (tốc độ phân hủy 0,71%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Qua đó cho thấy độ pH tăng dần đến giá trị trung tính thì tốc độ phân hủy Diazinon bởi HA7.1 tăng.

Các dòng vi khuẩn HA7.4, TA3.2 và TA4.17, phân hủy Diazinon hiệu quả khi độ pH môi trường đạt pH = 7, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng là 16,1% (tốc độ phân hủy 0,54%/ngày), 14,9% (tốc độ phân hủy 0,50%/ngày) và 24,8% (tốc độ phân hủy 0,83%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Một số nghiên cứu khác trên thế giới cũng cho thấy, độ pH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy Diazinon. Kết quả thí nghiệm này tương tự với kết quả nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011), tốc độ phân hủy Diazinon cao nhất ở độ pH = 7 đối với chủng vi khuẩn DI10. Điều này chứng tỏ rằng pH trung tính của môi trường nuôi cấy là điều kiện tối ưu cho phân hủy sinh học Diazinon.



Hình 4.33 Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ.

Ghi chú: ĐC: Đối chứng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả, trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon đạt nồng độ từ 20 ppm đến 100 ppm. Trong đó, Diazinon trong môi trường nuôi cấy đạt nồng độ 20 ppm và 50 ppm, các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Hình 4.34). Ở nồng độ 150 ppm và 200 ppm các dòng vi khuẩn không thể hiện khả năng phân hủy Diazinon. Đối chiếu với kết quả nghiên cứu về sự tăng trưởng của quần thể vi khuẩn khi thay đổi nồng độ Diazinon, khi nồng độ Diazinon đạt 150 ppm và 200 ppm các dòng vi khuẩn đều không gia tăng mật độ so với mật độ ban đầu.

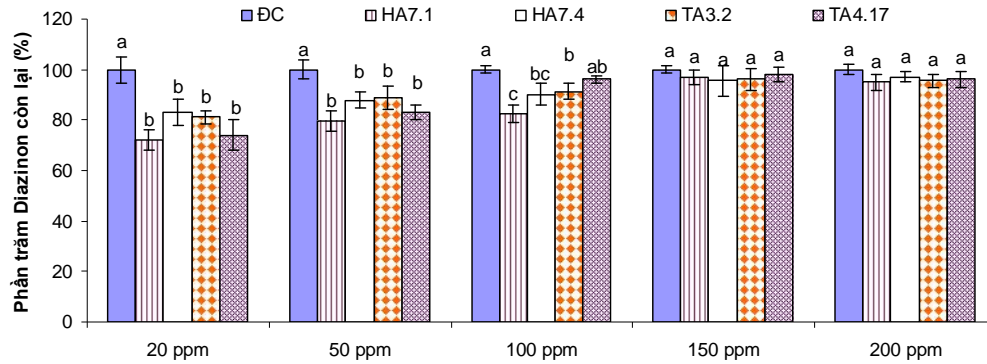
Phần trăm phân hủy và tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 giảm dần khi tăng nồng độ Diazinon trong môi trường nuôi cấy, kết quả được trình bày qua Bảng 4.2.

Bảng 4.2 Phần trăm phân hủy và tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ủ

Dòng vi khuẩn	Chỉ tiêu khảo sát	Nồng độ Diazinon				
		20 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
HA7.1	Phần trăm phân hủy (%)	27,9	20,6	17,4	3,00	5,00
	Tốc độ phân hủy (%/ngày)	0,93	0,69	0,58	0,10	0,17
HA7.4	Phần trăm phân hủy (%)	16,7	12,1	9,92	4,36	2,81
	Tốc độ phân hủy (%/ngày)	0,56	0,41	0,33	0,15	0,09
TA3.2	Phần trăm phân hủy (%)	18,9	11,1	8,70	3,92	4,49
	Tốc độ phân hủy (%/ngày)	0,63	0,37	0,29	0,13	0,15
TA4.17	Phần trăm phân hủy (%)	25,9	16,8	3,82	2,09	3,88
	Tốc độ phân hủy (%/ngày)	0,86	0,56	0,13	0,07	0,13

Kết quả thí nghiệm tương tự với kết quả nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011), tốc độ phân hủy Diazinon cao nhất khi chủng Dizinon vào môi trường nuôi đạt 20 ppm kể đến là 50 ppm đối với dòng vi khuẩn DI10. Tốc độ phân hủy Diazinon của dòng vi khuẩn này giảm dần khi nồng độ Diazinon trong môi trường nuôi cấy tăng. Khi nồng độ Diazinon trong môi trường nuôi cấy đạt 160 ppm thì dòng vi khuẩn DI10 không có khả năng phân hủy Diazinon sau 11 ngày chủng (Abo-Amer and Aly, 2011). Như vậy, tốc độ phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ Diazinon trong môi trường nuôi cấy. Qua kết quả nghiên cứu thể hiện trong Hình 4.34 và kết quả nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011), cho thấy các dòng vi khuẩn có tốc độ phân hủy Diazinon cao nhất khi hàm lượng Diazinon trong môi trường nuôi cấy nằm trong giới hạn tan (20 - 50 ppm).

Theo kết quả nghiên cứu về mức độ ô nhiễm thuốc trừ sâu Diazinon tại một số địa điểm ở ĐBSCL đều không vượt 30 ppb. Vì thế việc ứng dụng các dòng vi khuẩn này trong xử lý ô nhiễm Diazinon ở ĐBSCL có thể mang lại hiệu quả cao, việc xử lý có thể bằng phương pháp làm giàu sinh học hoặc kích thích sinh học.



Hình 4.34. Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.3, TA4.17) sau 30 ngày nuôi ù
 Ghi chú: ĐC: Đối chứng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng phân hủy Diazinon được thể hiện qua Bảng 4.3. Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn (HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17) có tốc độ phân hủy Diazinon tăng khi mật độ vi khuẩn tăng. Dòng vi khuẩn HA7.1 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt từ $4,30.10^5$ CFU/mL đến $5,67.10^6$ CFU/mL, giảm từ 20,8% đến 29,3% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, với tốc độ phân hủy tương ứng là 0,69%/ngày và 0,98%/ngày.

Dòng vi khuẩn HA7.4 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt từ $6,30.10^5$ CFU/mL đến $5,30.10^6$ CFU/mL, giảm từ 15,1% đến 19,9% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, với tốc độ phân hủy tương ứng là 0,50%/ngày và 0,66%/ngày.

So sánh với dòng vi khuẩn HA7.1 ($4,30.10^5$ CFU/mL), dòng vi khuẩn TA3.2 ($4,00.10^5$ CFU/mL) có mật độ ban đầu tương đương nhau, nhưng dòng vi khuẩn TA3.2 phân hủy Diazinon không hiệu quả. Dòng vi khuẩn TA3.2 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt $5,3.10^6$ CFU/mL, giảm 18,1% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, với tốc độ phân hủy tương ứng là 0,60%/ngày.

Dòng vi khuẩn TA4.17 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt từ $6,00.10^5$ CFU/mL đến $4,30.10^6$ CFU/mL, giảm từ 17,3% đến 24,9% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, với tốc độ phân hủy tương ứng là 0,577%/ngày và 0,83%/ngày.

Từ các kết quả phân tích trên, cho thấy các dòng vi khuẩn đều phân hủy Diazinon hiệu quả sau 30 ngày nuôi ủ, khi mật độ vi khuẩn chủng ban đầu đạt từ 10^6 CFU/mL, với mật độ này được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Tuy nhiên, tốc độ phân hủy Diazinon ở mỗi dòng vi khuẩn là khác nhau. Nguyên nhân có thể là do mỗi dòng vi khuẩn, có thời gian thế hệ khác nhau nên cùng một thời gian nuôi cấy có thể mật độ vi khuẩn có sự khác biệt. Kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011), mật độ vi khuẩn tỷ lệ thuận với tốc độ phân hủy Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu.

Bảng 4.3 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng phân hủy Diazinon của các chủng vi khuẩn

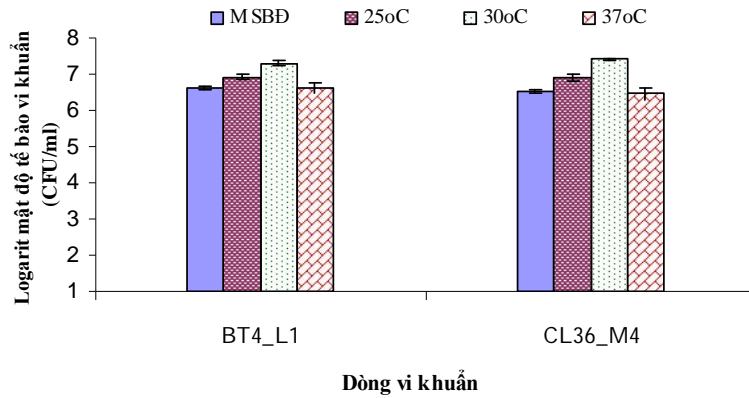
Dòng vi khuẩn							
HA7.1		HA7.4		TA3.2		TA4.17	
Mật độ (CFU/mL)	P* (%)	Mật độ (CFU/mL)	P* (%)	Mật độ (CFU/mL)	P* (%)	Mật độ (CFU/mL)	P* (%)
0 (ĐC)	100 ^a	0 (ĐC)	100 ^a	0 (ĐC)	100 ^a	0 (ĐC)	100 ^a
$6,67.10^4$	88.4 ^{ab}	$7,00.10^4$	91.8 ^{ab}	$4,67.10^4$	89.9 ^{ab}	$5,67.10^4$	92.8 ^{ab}
$4,30.10^5$	79.2 ^{bc}	$6,30.10^5$	84.9 ^b	$4,00.10^5$	86.2 ^{ab}	$6,00.10^5$	82.7 ^{bc}
$5,67.10^6$	70.7 ^c	$5,30.10^6$	80.1 ^b	$5,30.10^6$	81.9 ^b	$4,30.10^6$	75.1 ^c

Ghi chú : P* : Phần trăm Diazinon còn lại sau 30 ngày nuôi cấy (%), ĐC: Đối chứng (Môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon ở 20 ppm và không chủng vi khuẩn). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

4.9 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ và khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.

4.9.1 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.

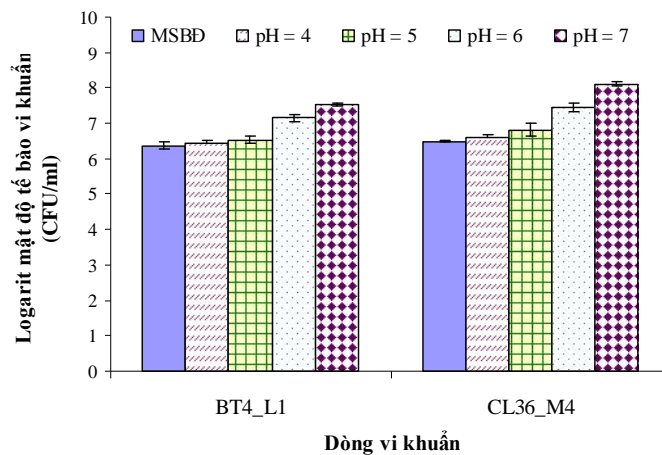
Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ của vi khuẩn được thể hiện trong Hình 4.35. Thí nghiệm được bố trí trong ống nghiệm, chứa 5mL dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung Diazinon 20 ppm, thời gian nuôi ủ là 5 ngày và được lắc liên tục trên máy lắc vòng. Kết quả thí nghiệm cho thấy cả hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4, mật độ tế bào có sự gia tăng ở nhiệt độ môi trường là 25°C và 30°C. Trong đó, mật độ vi khuẩn tăng cao nhất khi nhiệt độ môi trường là 30°C.



Hình 4.35. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

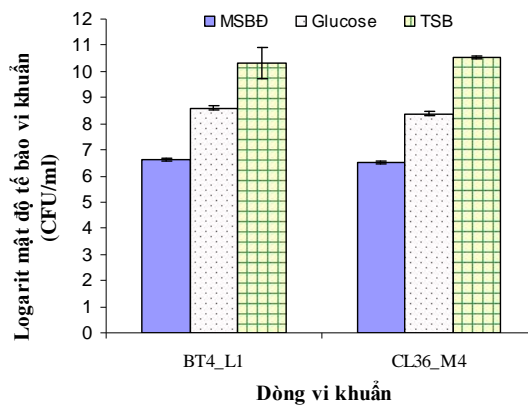
Mối tương quan giữa mật độ vi khuẩn và sự biến thiên độ pH được thể hiện quan Hình 4.36. Dãy giá trị pH được chọn trong thí nghiệm gồm pH 4, pH 5, pH 6 và pH 7. Mật độ vi khuẩn được xác định vào thời điểm ban đầu và sau thời gian nuôi ủ 5 ngày trong ống nghiệm, chứa 5mL dung dịch khoáng tối thiểu và bổ sung Diazinon 20 ppm. Kết quả thí nghiệm cho thấy hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 có mật độ cao nhất ở pH 7. Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Mahiudddin *et al.* (2014), dòng vi khuẩn PD6 mật độ cao nhất khi pH môi trường gần trung tính.



Hình 4.36 Ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

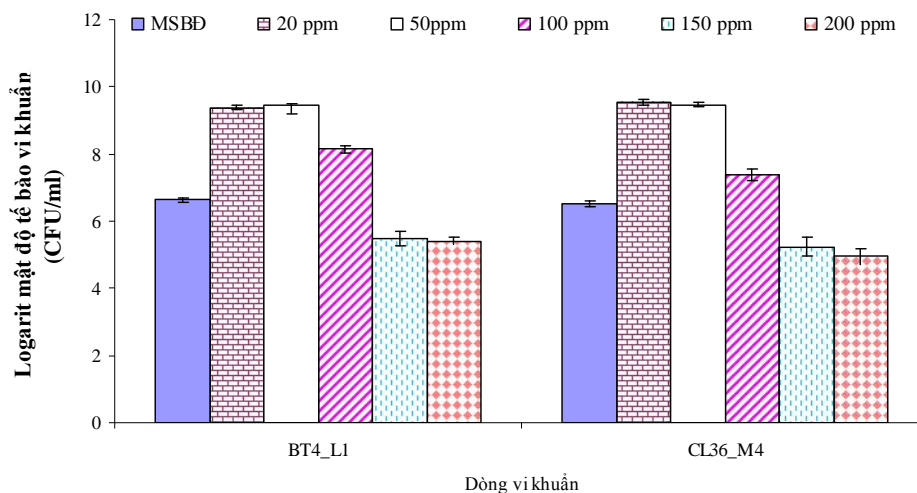
Nguồn cacbon là một trong những nhân tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn, ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy Diazinon (Abo-Amer and Aly, 2011). Thí nghiệm được bố trí để nghiên cứu về ảnh hưởng của nguồn cacbon (glucose, TSB) đến mật độ vi khuẩn sau thời gian nuôi ủ là 5 ngày trong ống nghiệm, chứa 5mL dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn cacbon TSB 0,5% hoặc glucose 0,5%. Kết quả thí nghiệm cho thấy hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4, mật độ tăng cao nhất với nguồn cacbon là TSB (Hình 4.37). Như vậy, hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 có thể sinh trưởng tốt trong điều kiện môi trường với sự hiện diện của nguồn cacbon khác ngoài Diazinon.



Hình 4.37. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ

Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ Diazinon có mối tương quan với mật độ vi khuẩn (Hình 4.38). Hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 đều gia tăng mật độ cao nhất trong khoảng giới hạn tan của Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu (20 ppm – 50 ppm). Với nồng độ Diazinon 150 ppm và 200 ppm thì mật độ các dòng vi khuẩn thấp hơn so với mật độ ban đầu. Vì vậy, với nồng độ Diazinon 150 ppm và 200 ppm có thể ức chế sự tăng trưởng của hai chủng vi khuẩn này.



Hình 4.38 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự gia tăng mật độ của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 5 ngày nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu

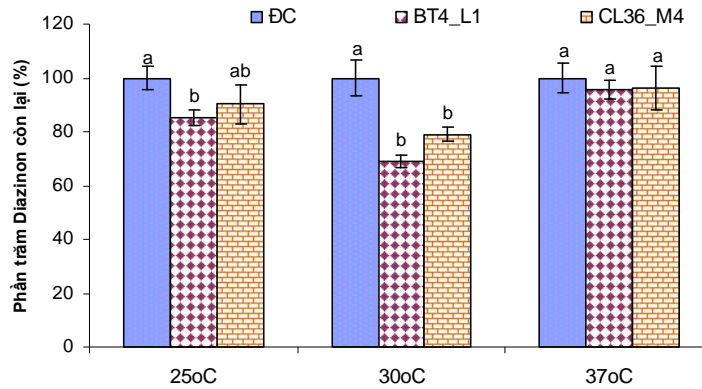
Ghi chú: MSBD: Mật độ ban đầu

4.9.2 Ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến khả năng phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy Diazinon của hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 được thể hiện qua Hình 4.39. Mỗi dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 thể hiện khả năng phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon khác nhau, tương ứng với các giá trị nhiệt độ.

Đối với dòng vi khuẩn BT4_L1 có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ở nhiệt độ 25°C và 30°C, giảm tương ứng 14,8% (tốc độ phân hủy 0,49%/ngày) và 31,0% (tốc độ phân hủy 1,03%/ngày).

Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn CL36_M4 có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ở 30°C, giảm tương ứng 21,1% (tốc độ phân hủy 0,70%/ngày).



Hình 4.39. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ

Ghi chú: DC: Đối chứng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng

Phân hủy sinh học thuốc bảo vệ thực vật là con đường chủ yếu và chịu ảnh hưởng bởi nhiều nhân tố. Trong đó, pH là một trong những nhân tố có vai trò quan trọng thúc đẩy quá trình phân hủy Diazinon (Gunther, 1974).

Kết quả thí nghiệm thể hiện trong Bảng 4.4, cho thấy dòng vi khuẩn BT4_L1 có khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả ở pH 5, pH 6 và pH 7, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng là 16% (tốc độ phân hủy 0,53%/ngày), 21,1% (tốc độ phân hủy 0,70%/ngày), 30,5% (tốc độ phân hủy 1,02%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Đối với dòng vi khuẩn CL36_M4 thể hiện khả năng phân hủy Diazinon cao nhất ở pH 6 và pH 7, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng là 13,8% (tốc độ phân hủy 0,46%/ngày), 21,7% (tốc độ phân hủy 0,72%/ngày).

Bảng 4.4. Ảnh hưởng của pH đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ

Dòng vi khuẩn	Giá trị pH			
	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7
Đối chứng	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Dòng BT4_L1	95,6 ^a	84,1 ^b	78,9 ^b	69,5 ^b
Dòng CL36_M4	94,3 ^a	90,4 ^{ab}	86,2 ^b	78,3 ^b

Ghi chú: Các số liệu trong bảng 4.4 thể hiện phần trăm Diazinon còn lại (%). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng ở mỗi giá trị pH.

Thí nghiệm nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến phân hủy sinh học của các dòng vi khuẩn được trình bày qua Bảng 4.5. Hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 thể hiện khả năng phân hủy Diazinon trong môi

trường khoáng tối thiểu, có bổ sung Diazinon đạt nồng độ từ 20 ppm đến 100 ppm.

Dòng vi khuẩn BT4_L1 phân hủy Diazinon hiệu quả nhất khi bổ sung Diazinon đạt nồng độ từ 20 ppm đến 50 ppm, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng từ 29,2% (tốc độ phân hủy 0,97%/ngày) và 16,5% (tốc độ phân hủy 0,55%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Tương tự, dòng vi khuẩn CL36_M4 phân hủy Diazinon hiệu quả nhất khi bổ sung Diazinon đạt nồng độ từ 20 ppm đến 50 ppm, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng từ 20,1% (tốc độ phân hủy 0,67%/ngày) và 12,6% (tốc độ phân hủy 0,42%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Qua kết quả trên cho thấy, các dòng vi khuẩn khác nhau thể hiện tiềm năng phân hủy Diazinon khác nhau, mặc dù được tiến hành thí nghiệm trong điều kiện môi trường giống nhau. Hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36, có tốc độ phân hủy Diazinon hiệu quả nhất khi bổ sung Diazinon trong giới hạn tan (20 ppm – 50 ppm). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Abo-Amer and Aly (2011) đối với dòng vi khuẩn DI101, thể hiện tốc độ phân hủy Diazinon hiệu quả nhất khi nồng độ Diazinon đạt từ 20 ppm-50ppm trong môi trường khoáng tối thiểu.

Bảng 4.5 Ảnh hưởng của nồng độ Diazinon đến sự phân hủy Diazinon của các dòng vi khuẩn (BT4_L1, CL 36_M4) sau 30 ngày nuôi ủ

Dòng vi khuẩn	Nồng độ Diazinon				
	20 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
Đối chứng	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Dòng BT4_L1	70,8 ^b	83,5 ^b	90,9 ^b	98,0 ^a	96,5 ^a
Dòng CL36_M4	79,9 ^b	87,4 ^b	91,1 ^b	97,5 ^a	97,1 ^a

Ghi chú: Các số liệu trong bảng 4.5 thể hiện phần trăm Diazinon còn lại (%). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng ở mỗi nồng độ Diazinon.

Mật độ vi khuẩn và tốc độ phân hủy sinh học Diazinon trong môi trường khoáng tối thiểu là hai đại lượng tỷ lệ thuận (Abo-Amer and Aly, 2011; Mahiuddin *et al.*, 2014). Vì thế, nghiên cứu này nhằm xác định mật độ tối ưu ứng với mỗi dòng vi khuẩn, ảnh hưởng đến hoạt động phân hủy sinh học Diazinon. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến khả năng phân hủy Diazinon của hai dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4, được thể hiện qua Bảng 4.6.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, dòng vi khuẩn BT4_L1 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt từ $6,67.10^4$ CFU/mL đến $5,67.10^6$ CFU/mL, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng từ 12,7% (tốc độ phân hủy 0,42%/ngày) đến 35,4% (tốc độ phân hủy 1,18%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Dòng vi khuẩn CL36_M4 phân hủy Diazinon hiệu quả khi mật độ vi khuẩn được chủng ban đầu đạt từ $6,3.10^5$ CFU/mL đến $5,3.10^6$ CFU/mL, hàm lượng Diazinon giảm tương ứng từ 14,8% (tốc độ phân hủy 0,49%/ngày) đến 22,2% (tốc độ phân hủy 0,74%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Bảng 4.6 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến sự phân hủy Diazinon của các dòng (BT4_L1, CL 36_M4) vi khuẩn sau 30 ngày nuôi ủ

Dòng vi khuẩn			
BT4_L1		CL36_M4	
Mật độ vi khuẩn	P*	Mật độ vi khuẩn	P*
Đối chứng	100 ^a	Đối chứng	100 ^a
$6,67.10^4$	87,3 ^b	$7,00.10^4$	88,3 ^{ab}
$4,30.10^5$	80,3 ^b	$6,30.10^5$	85,2 ^b
$5,67.10^6$	64,6 ^c	$5,30.10^6$	77,8 ^b

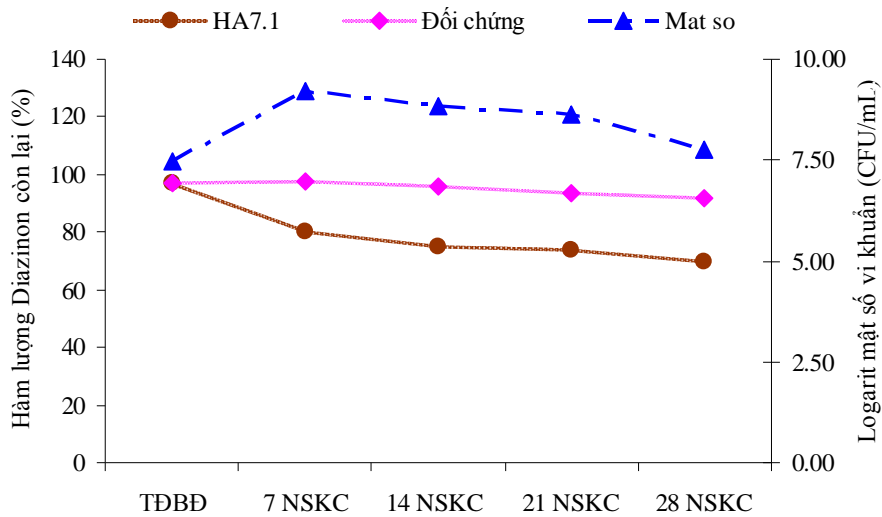
Ghi chú: P* là phần trăm Diazinon còn lại sau 30 ngày nuôi cấy (%). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức so với nghiệm thức đối chứng ở mỗi nồng độ Diazinon.

Qua kết quả phân tích trên cho thấy sáu dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 có tốc độ phân hủy Diazinon phụ thuộc vào nhiều nhân tố môi trường. Nhìn chung, các dòng vi khuẩn này, thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả ở nhiệt độ 30°C, độ pH 7, nồng độ Diazinon dao động từ 20 ppm đến 50 ppm, mật độ vi khuẩn chủng ban đầu đạt 10^6 CFU/mL. Trong đó, dòng vi khuẩn HA7.1 thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả nhất ở pH 5 và pH 6 so với các dòng vi khuẩn còn lại và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Theo kết quả xác định độ pH của các mẫu đất ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, dao động từ 4,5 đến 5,5. Vì thế, dòng vi khuẩn HA7.1 được chọn để tiếp tục nghiên cứu khả năng phân hủy Diazinon trong đất. Đồng thời, nghiên cứu sự tương tác của dòng vi khuẩn HA7.1 với tổ hợp vi khuẩn trong đất đến tốc độ phân hủy Diazinon.

4.10 Khảo sát khả năng phân hủy Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1 theo thời gian nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu

Diễn biến phân hủy Diazinon theo thời gian được khảo sát với dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy Diazinon hiệu quả nhất và tiềm năng ứng dụng cao là dòng HA7.1.

Qua kết quả theo dõi cho thấy sau 7 ngày nuôi ủ, hàm lượng Diazinon phân hủy mạnh nhất (giảm 19,7%, tốc độ phân hủy là 2,81%/ngày) so với các khoảng thời gian khảo sát. Sau đó, tốc độ phân hủy Diazinon chậm lại so với thời gian 7 ngày đầu. Hàm lượng Diazinon trong môi trường chỉ còn 67,7% (giảm 31,3%, tốc độ phân hủy là 1,08%/ngày) vào thời điểm 28 ngày ủ so với hàm lượng khi bắt đầu nuôi ủ (Hình 4.40).



Hình 4.40. Khả năng phân hủy Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1 theo thời gian ủ ở 30°C, độ pH 6.

Ghi chú: TĐBD: Thời điểm bắt đầu nuôi ủ, NSKC: Ngày sau khi chủng vi khuẩn

Bên cạnh đó, nghiệm thức đối chứng (môi trường khoáng tối thiểu, bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm) nồng độ Diazinon sau 28 ngày nuôi ủ giảm so với nồng độ Diazinon vào thời điểm ban đầu. Nguyên nhân có thể là do trong môi trường nước Diazinon bị phân hủy bởi quá trình thủy phân và đây là nguyên nhân quan trọng nhất thúc đẩy phân hủy Diazinon trong nước (Frank *et al.*, 1991).

Bên cạnh theo dõi hàm lượng Diazinon trong môi trường nuôi ủ theo thời gian, sự thay đổi mật độ của dòng vi khuẩn HA7.1 cũng được theo dõi. Kết quả theo dõi cho thấy mật độ vi khuẩn của dòng vi khuẩn này trong giai

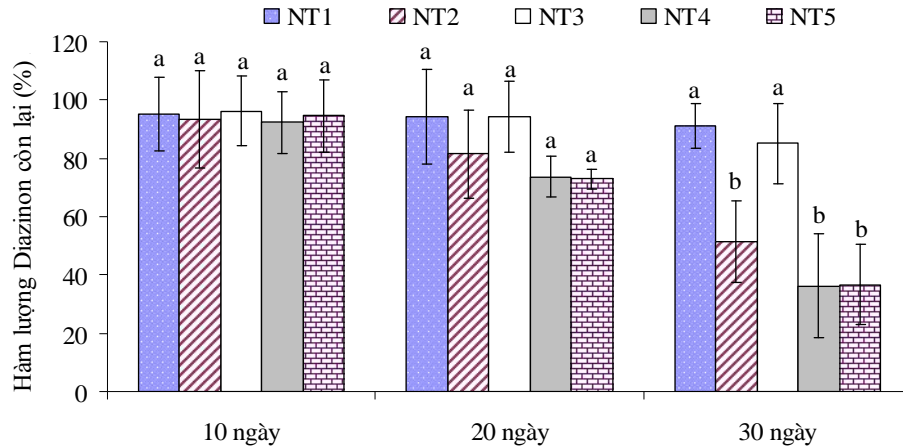
đoạn trước 7 ngày tăng mạnh (Hình 4.40). Đối chiếu kết quả này với diễn biến suy giảm mạnh hàm lượng Diazinon trong giai đoạn này (Hình 4.40) có thể vi khuẩn đã tiêu thụ sản phẩm phân hủy hoạt chất Diazinon nên gia tăng mật độ. Sau 7 ngày ủ, cùng với sự suy giảm tốc độ phân hủy Diazinon là sự suy giảm mật độ vi khuẩn trong môi trường nuôi. Nguyên nhân có thể liên quan đến hàm lượng Diazinon trong môi trường giảm và tích lũy độc tố từ các sản phẩm chuyển hóa.

Qua kết quả phân tích trên, cho thấy mật độ vi khuẩn có mối tương quan thuận với hàm lượng Diazinon phân hủy trong môi trường khoáng tối thiểu, có bổ sung Diazinon đạt nồng độ 20 ppm.

4.11 Đánh giá khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon của dòng vi khuẩn HA7.1, trong đất trong điều kiện phòng thí nghiệm

Mẫu đất được sử dụng trong thí nghiệm này trùng với mẫu đất sử dụng để phân lập dòng vi khuẩn HA7.1. Dòng vi khuẩn HA7.1, được bố trí thí nghiệm trong đất để khảo sát hiệu quả phân hủy Diazinon với sự hiện diện của các nguồn cacbon khác. Đồng thời, khảo sát sự tương tác của dòng vi khuẩn HA7.1 với các dòng vi khuẩn trong quần xã.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn (NT2, NT4, NT5) thì hàm lượng Diazinon giảm theo thời gian so với đối chứng (NT1). Tuy nhiên, vào các thời điểm 10 ngày và 20 ngày sau khi chủng vi khuẩn thì hàm lượng Diazinon còn lại ở các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng (NT1). Vào thời điểm 30 ngày, các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn HA7.1 thì hàm lượng Diazinon giảm và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Trong đó, nghiệm thức 4 (Đất không tiết trùng + bổ sung vi khuẩn HA7.1) hàm lượng Diazinon giảm mạnh hơn so với nghiệm thức 2 (Đất tiết trùng + bổ sung vi khuẩn HA7.1), giảm tương ứng là 63,7% (tốc độ phân hủy Diazinon 2,11%/ngày) và 48,6% (1,62%/ngày). Sự khác biệt này có thể là do sự tương tác của dòng vi khuẩn HA7.1 với các dòng vi khuẩn tồn tại trong đất đến quá trình phân hủy Diazinon. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Cycon *et al* (2009), khi tổ hợp hệ vi khuẩn gồm 3 chủng vi khuẩn thì tốc độ phân hủy Diazinon gấp 2,1 lần so với từng chủng vi khuẩn độc lập (Hình 4.41).



Hình 4.41 Khả năng phân hủy Diazinon của vi khuẩn trong đất trong phòng thí nghiệm

Ghi chú: NT1: Đất tiết trùng + không bổ sung vi khuẩn (đối chứng); NT2: Đất tiết trùng + bổ sung vi khuẩn HA7.1; NT3: Đất không tiết trùng + không bổ sung vi khuẩn; NT4: Đất không tiết trùng + bổ sung vi khuẩn HA7.1; NT5: Đất không tiết trùng + bổ sung tổ hợp vi khuẩn BT4_L1, CL36_M4, HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17. Các chữ cái khác nhau ứng với mỗi thời điểm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

4.12 Định danh các chủng vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu và chuyên màu

Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA của 6 dòng vi khuẩn phân hủy hiệu quả Diazinon với các trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI cho thấy có độ tương đồng cao từ 97% đến 100% (Bảng 4.7, Bảng 4.8)

Bảng 4.7 Độ tương đồng của các dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4 với các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI.

Dòng	Độ tương đồng (%)	Thông tin trên cơ sở dữ liệu	
		Vi khuẩn	Số đăng kí
BT4_L1	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain CIFT MFB 14375(TK50)	KP240967.1
	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain BL6	JQ923444.1
	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain M66	HQ676601.1
	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain WB-24	HQ393893.1
	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain B8L	DQ466568.1
	100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain NFRI-A1	AB161691.1
CL36_M4	98	<i>Cupriavidus</i> sp. USMAA2-4	KF460029.1
	98	<i>Cupriavidus gilardii</i> isolate MSMB32	EF114429.1
	98	<i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	DQ351699.1
	98	<i>Cupriavidus</i> sp. USMAHM13	KF460028.1

Bảng 4.8 Độ tương đồng của các dòng vi khuẩn phân HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 với các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI.

Dòng	Độ tương đồng (%)	Thông tin trên cơ sở dữ liệu	
		Vi khuẩn	Số đăng kí
HA7.1	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain JBE245	CP014780.1
	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain B21	CP010528.1
	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain LZ95,	CP012122.1
	99	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAUH2	CP015126.1
HA7.4	97	<i>Pandoraea</i> sp. B2-9	EF467849.1
	97	<i>Pandoraea pnomenus</i> strain LA-2	EF191352.1
	97	<i>Pandoraea</i> sp. LA-1	EF191351.1
	97	<i>Pandoraea</i> sp. S14	AY741155.1
	97	<i>Pandoraea</i> sp. 2001032141	AY268169.1
	97	<i>Pandoraea</i> sp. G8107	AF247695.1
	97	<i>Pandoraea pnomenus</i> strain LMG 18087	NR_114519.1
TA3.2	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain B80	LN890256.1
	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain B54	LN890230.1
	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain B42	LN890218.1
	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain JN144	KF687069.1
	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain JN132	KF687060.1
	97	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain JN170	KF150415.1
TA4.17	99	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain FDAARGOS_162	CP014065.1
	99	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain SSB2	JX042463.1
	99	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain 22426	FJ810080.1

Đặc điểm sinh học của các dòng vi khuẩn BT4_L1, CL36_M4, HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17 được thể hiện trong Bảng 4.9 và Bảng 4.10. Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon cho thấy các dòng vi khuẩn này phù hợp với các chủng vi khuẩn được xác định trên ngân hàng gen NCBI (Bảng 4.7 và Bảng 4.8).

Bảng 4.9 Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn BT4_L1 và CL36_M4

Đặc tính	Dòng vi khuẩn	
	BT4_L1	CL36_M4
Hình dạng tế bào	que	que
Gram	-	-
Chuyển động	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Sinh beta- galactosidaza (ONPG)	-	-
Agrinine (ADH)	-	-
Lysine (LDC)	-	-
Ornithin (ODC)	-	-
Sử dụng Citrate (CIT)	+	-
Sinh H ₂ S	-	-
Sinh Ureaza (URE)	-	-
Sinh tryptophane (TDA)	-	-
Sinh indole (IND)	+	-
Phản ứng Voges – Proskauer (VP)	-	-
Sinh Gelatinaza (GEL)	-	+
Sử dụng đường Glucose (GLU)	-	-
Mannitol (MAN)	-	-
Inositol (INO)	-	-
Sorbotol (SOR)	-	-
Ramnose (RHA)	-	-
Sucrose (SAC)	-	-
Melibiose (MEL)	-	-
Amygdalin (AMY)	+	-
Arabinose (ARN)	-	+

Ghi chú: dấu “-” thể hiện âm tính, dấu “+” thể hiện dương tính

Bảng 4.10 Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2 và TA4.17

Đặc tính	Dòng vi khuẩn			
	HA7.1	HA7.4	TA3.2	TA4.17
Hình dạng tế bào	que	que ngắn	que	que
Gram	+	-	+	-
Chuyển động	-	+	-	+
Oxidase	-	-	-	+
Catalase	-	+	+	+
Sinh beta- galactosidaza (ONPG)	+	-	-	-
Agrinine (ADH)	-	-	-	-
Lysine (LDC)	-	-	-	-
Ornithin (ODC)	-	-	-	-
Sử dụng Citrate (CIT)	-	+	+	+
Sinh H ₂ S	-	-	-	-
Sinh Ureaza (URE)	-	-	-	-
Sinh tryptophane (TDA)	-	-	-	-
Sinh indole (IND)	-	+	-	+
Phản ứng Voges – Proskauer (VP)	-	+	-	-
Sinh Gelatinaza (GEL)	-	-	-	-
Sử dụng đường Glucose (GLU)	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	-	+	-
Inositol (INO)	-	-	-	-
Sorbitol (SOR)	+	+	+	-
Ramnose (RHA)	-	-	-	-
Sucrose (SAC)	+	-	+	-
Melibiose (MEL)	-	-	-	-
Amygdalin (AMY)	-	+	=	-
Arabinose (ARN)	+	-	+	+

Ghi chú: dấu “-” thể hiện âm tính, dấu “+” thể hiện dương tính

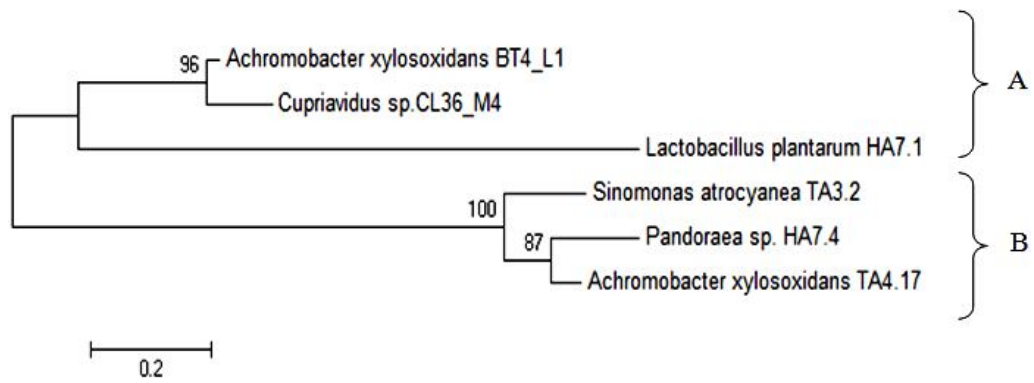
Kết quả giải mã trình tự gen 16S rRNA kết hợp với kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa của sáu dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 cho thấy chúng lần lượt được định danh là *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp. CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1. (Bảng 4.11). Trong đó, *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1 được biết đến như dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy hiệu quả hợp chất thuốc trừ sâu lân hữu cơ được công bố trong các nghiên cứu trước (Niansheng *et al.*, 2007).

Bảng 4.11 Định danh các dòng vi khuẩn phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon phân lập từ đất thu từ ruộng luân canh lúa-màu và chuyên màu

Dòng	Định danh
BT4_L1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> BT4_L1
CL36_M4	<i>Cupriavidus</i> sp. CL36_M4
HA7.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> HA7.1
HA7.4	<i>Pandoraea</i> sp. HA7.4
TA3.2	<i>Sinomonas atrocyanea</i> TA3.2
TA4.17	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> TA4.17

Mối quan hệ di truyền của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp. CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1 được thể hiện qua Hình 4.41. Theo Tagle *et al.* (1988) để xác định mối quan hệ di truyền của các loài sinh vật trong quá trình tiến hóa dựa trên cơ sở cây phả hệ.

Từ cây phả hệ Hình 4.42 cho thấy 6 chủng vi khuẩn phân hủy Diazinon hiệu quả phân bố trên 2 nhánh A và B. Trong đó, nhánh A gồm 3 chủng thuộc 3 chi (*Lactobacillus*, *Achromobacter*, *Cupriavidus*) được phân lập từ đất thuộc 2 mô hình canh tác: mô hình canh tác chuyên màu 1 chủng (*Lactobacillus plantarum* HA7.1), mô hình luân canh lúa-màu 2 chủng (*Achromobacter xylosoxidans* TA4.17 và *Cupriavidus* sp. CL36_M4). Hai chủng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17 và *Cupriavidus* sp. CL36_M4 phân bố ở 2 tỉnh khác nhau (Vĩnh Long và Tiền Giang). Nhánh B gồm 3 chủng vi khuẩn đều được phân lập từ đất canh tác chuyên màu: *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, thuộc 3 chi khác nhau (*Pandoraea*, *Sinomonas*, *Achromobacter*). Qua đó cho thấy 6 chủng vi khuẩn phân hủy Diazinon thể hiện qua Hình 4.42 thuộc 5 chi khác nhau. Nguyên nhân có thể là do khác nhau về vị trí địa lý, điều kiện canh tác khác nhau, liều lượng và tần suất sử dụng thuốc Diazinon khác nhau hoặc có thể cây trồng trên các mô hình canh tác khác nhau.



Hình 4.42 Cây phả hệ mối quan hệ di truyền của các dòng vi khuẩn phân hủy Diazinon phân lập từ đất được thu từ ruộng canh tác chuyên màu và luân canh lúa-màu ở ĐBSCL

Ghi chú: Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự 16S rRNA của 6 chủng khuẩn bằng phương pháp Maximum Likelihood

Chương 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1 Kết luận

Tình hình sử dụng Diazinon: Lượng thuốc trừ sâu Diazinon được nông dân sử dụng nhiều trên mô hình chuyên màu và luân canh lúa-màu. Trong đó, nông dân sử dụng nhiều nhất trên mô hình canh tác luân canh lúa-màu

Ảnh hưởng của mô hình canh tác đến dư lượng Diazinon trong đất: Mô hình canh tác luân canh lúa-màu có tốc độ phân hủy Diazinon cao nhất vào vụ màu. Mô hình canh tác 1 lúa-2 màu có tốc độ phân hủy Diazinon cao hơn so với mô hình canh tác 2 lúa-1 màu

Trên mô hình chuyên màu, Tổng số có 21 mẫu đất được thu tại một số địa điểm ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả phân lập vi khuẩn được 4 dòng vi khuẩn HA7.4, TA3.2, TA4.17, HA7.1 có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu Diazinon hiệu quả, giảm từ 15,4% đến 27,9% sau 30 ngày nuôi ủ. Mật độ của bốn dòng vi khuẩn này đạt cao nhất khi điều kiện nhiệt độ là 30°C, độ pH 7 (ngoại trừ dòng HA7.1 mật độ cao nhất ở pH 6), nguồn cacbon là TSB và nồng độ Diazinon là 20 ppm – 50ppm sau 5 ngày nuôi ủ. Các dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy Diazinon hiệu quả nhất ở nhiệt độ 30°C, độ pH 6 và pH 7, nồng độ Diazinon 20 ppm và mật độ vi khuẩn 10⁶ CFU/mL.

Trên mô hình canh tác luân canh lúa –màu, tổng số có 20 mẫu đất được thu tại một số địa điểm ở Đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả phân lập vi khuẩn được 2 dòng vi khuẩn ký hiệu CL36_M4 và BT4_L1 phân hủy hiệu quả Diazinon lần lượt là 20,9% và 29,3% sau 30 ngày nuôi cấy. Mật độ của hai dòng vi khuẩn CL36_M4 và BT4_L1 đạt cao nhất ở nhiệt độ là 30°C, độ pH 7, nguồn cacbon là TSB và nồng độ Diazinon là 20 ppm – 50ppm. Hai dòng vi khuẩn này phân hủy Diazinon hiệu quả nhất ở nhiệt độ 30°C, độ pH 7, nồng độ Diazinon 20 ppm và mật độ vi khuẩn 10⁶ CFU/mL.

Trên mô hình luân canh lúa màu ngoài đồng ruộng, cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn hiếu khí phân hủy Diazinon vào vụ màu đa dạng hơn vào vụ lúa về số loài vi khuẩn. Trong điều kiện nhà lưới, trên mô hình chuyên màu cấu trúc của tổ hợp vi khuẩn phân hủy Diazinon đa dạng hơn mô hình luân canh lúa-màu.

Kết quả giải mã trình tự gen 16S rRNA của sáu dòng vi khuẩn HA7.1, HA7.4, TA3.2, TA4.17, CL36_M4 và BT4_L1 cho thấy chúng lần lượt được định danh là *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4,

Sinomonas atrocyanea TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp.CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1.

5.2 Kiến nghị

Tiếp tục có các thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy Diazinon của các loài vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp.CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1 ngoài đồng ruộng. Thiết kế thêm các thí nghiệm để khảo sát khả năng phân hủy sinh học của các loài vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* HA7.1, *Pandoraea* sp. HA7.4, *Sinomonas atrocyanea* TA3.2, *Achromobacter xylosoxidans* TA4.17, *Cupriavidus* sp.CL36_M4 và *Achromobacter xylosoxidans* BT4_L1 bằng phương pháp kích thích sinh học, trên cơ sở các thông tin về ảnh hưởng của nhân tố sinh thái đến hoạt động phân hủy sinh học Diazinon của 6 loài vi khuẩn trên được nghiên cứu trong đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abo-Amer and E. Aly, 2010. Biodegradation of Diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its Use in Bioremediation of Contaminated Environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1): 71-80
- Adhya T.K, S. Barik and N. Sethunathan, 1981. Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacterial isolates from flooded soil. *J Appl Bacteriol*, 50: 167–172.
- Aggarwal, V., X. Deng, A. Tuli and K.S. Goh, 2013. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer. New York. 294pp
- Apra, C., C. Colosio, T. Mammone and M. Maroni, 2002. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatogy*, 769B: 191-219.
- Ariel, G., and E. A. Edwards, 2006. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during Degradation of Chlorinated Ethanes. *Appl Environ Microbiol*, 72(1): 428-436.
- Armstrong, D.E, G. Chesters and R.F. Harris, 1967. Atrazine hydrolysis in Soil. *Soil Sci Soc Am Proc*, 31: 61-66.
- Aspelin, A.L., A. H. Grube and V. Kibler, 1991. Pesticide industry sales and usage: 1989 market estimates. EPA Economic Analysis Branch, Washington, DC. 33pp
- Barik, S., P.A Wahid, C. Ramakrishnan and N. Sethunathan, 1979. A change in degradation pathway of parathion in natural ecosystems. *J Environ Qual*, 7: 346–351.
- Bondarenko, S., J. Gan, D.L. Haver and J.N. Kabashima, 2004. Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. *Environ Toxicol Chem* 23(11): 2649–2654
- Brooke, L.T, G.J. Smith, 2005 *Aquatic life ambient water quality criteria: Diazinon*. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, office of Science and Technology, Washington, DC. 78pp

- BuchholzCleven, B.E.E., B.Ratunde and K.L.Straub, 1997. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Syst Appl Microbiol*, 20:301-309
- Burkhard, N. and J.A.Guth, 1979. Photolysis of organophosphorus insecticides on soil surfaces. *Journal of Pesticide Science*, 10:313–319
- Carey, A.E., F.W. Kutz, 1985. Trends in ambient concentrations of agrochemicals in humans and the environment of the USA. *Environmental Monitoring and Assessment*, 5:155–163
- Carey, A.E., F.W. Kutz, 1985. Trends in ambient concentrations of agrochemicals in humans and the environment of the USA. *Environmental Monitoring and Assessment*, 5:155–164
- Case, R.J.,Y. Boucher, I.Dahllöf, C.Holmström, W.F.Doolittle and S.Kjelleberg, 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol*, 73 (1): 278–288.
- Chapman, R.A. and C.M. Cole, 1982. Observations on the influence of water and soil pH on the persistence of insecticides. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 17(5):487–504
- Chuiko, G.M, V.A. Podgornaya and Y.Y. Zhelnin, 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comp Biochem Physiol*, 135B: 55-61.
- Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *Clin Microbiol*, 17: 840–862.
- Crop Life International, 2011. A Stocktaking Report about Crop Protection Stewardship Activities of the Plant Science Industry 2005 – 2011.
- Cục Y tế dự phòng và Môi trường, 2010. Báo cáo công tác y tế lao động, bệnh nghề nghiệp năm 2009. Hội nghị tổng kết các công tác Y tế lao động, bệnh nghề nghiệp năm 2009, triển khai công tác năm 2010 ngày 14/3/2010. Bộ Y tế. Hà Nội.
- Cycon, M., M. Wojcik and Z. Piotrowska-Seget, 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide Diazinon by *Serratia* sp. and

Pseudomonas sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76(4): 494-501.

- Delaplane, S.K., 1996. *Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends*. The University of Georgia, Athens, Georgia, USA.
- Do Thi Xuan, 2012. *Microbial Communities in Paddy Fields in the Mekong Delta of Vietnam*. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Swedish
- Drufovka, K., T. Danevcic, P. Trebse and D. Stopar, 2008. Microorganisms trigger chemical degradation of Diazinon. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(3): 293-296
- Dương Minh Viễn, 2011. Khả năng phân hủy Dioxins bởi tổ hợp vi khuẩn hiếu khí và yếm khí. Báo cáo tổng kết đề tài Khoa học và Công nghệ cấp bộ. Đại học Cần Thơ.
- Edwin D. O., 1996. *Control of water pollution from agriculture*. Food and Agriculture Organization (FAO). Canada. 101pp
- Engel, L., H. Checkoway, M. Keifer, N. Seixas, W. Longstreth, K. Scott, K. Hudnell, W. Anger and R. Camicioli, 2001. Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med*, 58(9): 582–589.
- EPA, 2012. *Pesticide Industry Sales and Usage*. <http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/>, accessed on 20/5/2014
- Fenlon, K.A., K.C. Jones and K.T. Semple., 2007. Development of microbial degradation of cypermethrin and Diazinon in organically and conventionally managed soils. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(6): 510–515
- Forrest, M., K.A. Lord, N. Walker and H.C. Woodville, 1981. The influence of soil treatments on the bacterial degradation of Diazinon and other organophosphorus insecticides. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 24(2): 93-104.
- Frank, R., H.E. Braun, N. Chapman, C. Burchat, 1991. Degradation of parent compounds of nine organophosphorus insecticides in Ontario surface and ground waters under controlled conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(3): 374–380

- Garcia-Repetto, R., D. Martinez and M. Repetto, 1994. The influence of pH on the degradation kinetics of some organophosphorous pesticides in aqueous solutions. *Veterinary and human toxicology*, 36(3): 202–204
- Gauthier, E., I. Fortier, F. Courchesne and P. Pepin, 2001. Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease. *Journal of Environmental Sciences*, 86(1): 37-45.
- Ghassempour, A., A. Mohammadkhah, F. Najafi and M. Rajabzadeh, 2002. Monitoring of the pesticide Diazinon in soil, stem and surface water of rice fields. *Anal Sci*, 18(7): 779-783.
- Gilden, R.C, K. Huffling and B.Sattler, 2010. Pesticides and Health Risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing*, 39(1): 103-110
- Gunner, H.B, B. Zuckerman, R.W. Walker, C.W Miller, K.H. Deubert and R.E Longley, 1966. The Distribution and Persistence of Diazinon Applied to Plant and Soil and Its Influence on Rhizosphere and Soil Microflora. *Plant and Soil*, 25(2): 249-264.
- Gunther, A. F., 1974. Residues of pesticides and other contaminants in the total environment, *Residue Reviews*, Springer-Verlag. New York. 181 pp.
- Hà Huy Kỳ, 1998. Điều tra cơ bản thực trạng sức khỏe của người lao động tiếp xúc với hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV). Đề tài khoa học cấp Bộ. Viện Y học lao động và Vệ sinh môi trường. Hà Nội. <http://magazine.panna.org/spring2006/inDepthGlobalPoisoning.html>, truy cập ngày 20/1/2014
- Haim, B.G. and M.Z. Bert, 1968. Degradation of Diazinon by synergistic microbial action. *Nature*, 217:1183 – 1184
- Halle, A. and Sloas, D.D., 1987. Percutaneous organophosphate poisoning. *South. Med. J.*, 80: 1179-1181.
- Helena, M., V. Dagmar, M. Stanislava, K. Jana, H. Jana, H. Ivana and S. Zdenka, 2011. Comparison of Diazinon Toxicity to Embryos of *Xenopus laevis* and *Danio rerio*; Degradation of Diazinon in Water. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86: 601-604.
- Hellen, A.O, I.B Hamadi, B. Nancy, T. Muniru and O.A Darius, 2013. Isolation, characterization and identification of Diazinon degrading

- bacteria from the soil and gut of macrotermes. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3(9): 70-79.
- Hoben, H. and P. Somasegaran, 1982. Comparison of the Pour, Dspread, and Drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44: 1246-1247.
- Hodgson E., 1991. Pesticides: past, present and future. Pesticides and the future: toxicological studies of risks and benefits (E. Hodgson, R. M. Roe, N. Motoyama, et al.). North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Huang, X., L.S Lee and C. Nakatsu, 2000. Impact of animal waste lagoon effluents on chlorpyrifos degradation in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(12): 2864 - 2870
- Jesse, C. Laprade, 1992. Fate of Pesticide in Soils and Waters. <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0737/ANR-0737.pdf>, accessed on 17/6/2013
- Joseph, S. J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. A. Osborne, and P. H. Janssen. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7210-7215.
- Justé, A., B.Lievens, M.Klingeberg, C.W.Michiels, T.L.Marsh, K.A.Willems, 2008b. Predominance of *Tetragenococcus halophilus* as the cause for sugar thick juice degradation. *Food Microbiol*, 25, 413-421.
- Konrad, J.G., D.E. Armstron and G. Chesters, 1967. Soil Degradation of Diazinon a Phosphorothioate Insecticide. *Agron J*, 59(6): 591–594
- Lakshmi, C., M. Kumar and S. Khanna, 2008. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodet Biodeg*, 62(3): 204-209.
- Larkin D.J., R.S.Tjeerdema, 2000. Fate and effects of Diazinon. *Reviews Environmental Contamination and Toxicology*, 166:49–82
- Lê Huy Bá và Lâm Minh Triết, 2000. Sinh thái môi trường ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật. Hà Nội. 644 trang
- Lê Huy Bá, 2006. Độc học môi trường. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. TP Hồ Chí Minh. 644 trang

- Lê Huy Bá, 2008. Độc học môi trường. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. TP Hồ Chí Minh. 586 trang
- Lê Minh Uy, 2009. Hóa chất trừ sâu và sức khỏe. “Nâng cao ý thức tổ hợp trong việc sử dụng thuốc BVTV theo hướng an toàn”. Tổ chức tại Châu Thành, An Giang, ngày 16/04/2009.
- Lê Thị Trinh, 2012. Nghiên cứu thành phần và quá trình chuyển hóa của hóa chất bảo vệ thực vật chứa Diazinon trong môi trường đất bằng phương pháp sắc ký khí, khối phổ và cộng hưởng từ hạt nhân. Luận án tiến sĩ. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Hà Nội.
- 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: 47-50
- Lê Văn Khoa, 2010. Ô nhiễm môi trường đất và biện pháp xử lý. NXB Giáo dục và Đào tạo. Hà Nội. 255 trang
- Lendvay, J. M., F.E. Loffler, M.Dollhopf, M.R. Aiello, G. Daniels, B.Z. Fathepure, M. Gebhard, R. Heine, R. Helton, J. Shi, R. Krajmalnik-Brown, C.L. Major, M.J. Barcelona, E. Petrovskis, R. Hickey, J.M. Tiedje and P. Adriaens, 2003. Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environmental Science and Technology*, 37: 1422-1431.
- Levanon, D., J.J. Meisinger, E.E. Codling and J.L. Starr, 1994. Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. *Water Air and Soil Pollut*, 72(1-4): 179-189
- Levanon, D., J.J. Meisinger, E.E. Codling, J.L. Starr, 1994. Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. *Water Air and Soil Pollut*, 72(1): 179-189.
- Litchfield, M.H., 2005. Estimates of acute pesticide poisoning in agricultural workers in less developed countries. *Toxicol Rev*, 24(4): 271-248.
- Ma, X., P.A. Buffer and R.B. Gunier, 2002. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environ Health Perspect.*, 110(9): 955-60.

- Mahiudddin, M., A.N.M. Fakhrudin, A.A.Mahin, M.A.Z. Chowdhury, M.A. Rahman and M.K. Alam, 2014. Degradation of the organophosphorus insecticide Diazinon by soil bacterial isolate. *The International Journal of Biotechnology*, 3(1): 12-23
- Margaret, R., K. Schwind and R. Silberblatt, 2006. *The Invisible Epidemic: Global Acute Pesticide Poisoning* Available. <http://magazine.panna.org/spring2006/inDepthGlobalPoisoning.html>, accessed on 5/12/2013
- Meyer, J.C, 1997. A realistic approach to the sensitivity of PCR-DGGE and its application as a sensitive tool for the detection of clonality in cutaneous T-cell proliferations. *Experimental Dermatology*, 6(3): 122–127.
- Mulbry, W., 2000. Characterization of a novel organo-phosphorus hydrolase from nocardioles simplex. *Microbiol Res*, 154(4): 285-288.
- Murray, V.S., H.M. Wiseman, S. Dawling, I. Morgan and I.M. House, 1992. Health effects of organophosphate sheep dips. *Brit Med J*, 305: 1090-1093.
- Muyzer, G. and Smalla. K, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1): 127-141.
- Muyzer, G., E.C. Dewaal and A.G. Uiterlinden, 1993. Profiling of complex microbial-populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes- coding for 16S ribosomal - RNA. *Application Environment Microbiology*, 59: 695-700.
- Nakashima, K., and T, Yoshimura, 2002. Effects of pesticides on cytokines production by human peripheral blood mononuclear cells – fenitrothion and glyphosate. *Chudoku Kenkyu*, 15(2): 159-165.
- Nathaniel, L.S, N.K. Truelove, B.L. French, B.A. Berejikian, T.P. Quinn, E. Casillas, and T.K. Collier, 2000. Diazinon disrupts antipredator and homing behaviors in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 1911–1918.
- Nguyễn Đức Huệ, 2005. Các phương pháp phân tích hữu cơ. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội. 456 trang

- Nguyễn Hữu Huân, 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, số 28: 47-53
- Nguyễn Thị Dư Loan, 2005. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp hóa chất bảo vệ thực vật (Wofatox, Padan, Carbaryl) đối với động vật thực nghiệm. Luận án PTS khoa học y dược. Hà Nội.
- Nguyễn Thị Phi Oanh, 2011. Phân lập và khảo sát khả năng phân hủy nông dược của vi sinh vật ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ. Trường Đại học Cần Thơ
- Nguyễn Thị Phi Oanh, Hứa Văn Ủ và Dirk Spkhoanael, 2011. Vi khuẩn phân hủy 2,4-D trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng. Tạp chí khoa học, 18a: 65-70.
- Nguyễn Trần Oánh, Nguyễn Văn Biên và Bùi Trọng Thủy, 2007. Giáo trình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội. 171 trang.
- Nguyễn Tuấn Khanh, 2010. Đánh giá ảnh hưởng của sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật đến sức khỏe người chuyên canh chè tại Thái Nguyên và hiệu quả của các biện pháp. Luận án tiến sĩ Y học. Trường Đại học Y – Dược Thái Nguyên. Thái Nguyên.
- Nguyễn Văn Công và Nguyễn Thanh Phương, 2011. Tổng kết một số nghiên cứu ảnh hưởng thuốc bảo vệ thực vật hoạt chất Diazinon lên cá lóc đồng (Channa Striata). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 2011, số 17a: 133-140.
- Nguyễn Văn Công và Phạm Hữu Nghị, 2013. Ảnh hưởng của sử dụng phối trộn thuốc trừ sâu hoạt chất chlorpyrifos ethyl và fenobucarb cho lúa đến enzyme *cholinesterase* ở cá rô đồng *anabas testudineus* (Bloch, 1792). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh. Số 47(81): 98-104
- Nguyễn Văn Công, 2012. Ảnh hưởng của Diazinon đến đời sống thủy sinh vật. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ. <http://uv-vietnam.com.vn/NewsDetail.aspx?newsId=1491>. Truy cập ngày 20/01/2012

- Niansheng, W., J.D. Gu, Y.Yan, 2007. Degradation of p-nitrophenol by *Achromobacter xylosoxidans* Ns isolated from wetland sediment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59 (2): 90-96
- NIPC (National Pesticide Information Center), 2012. Diazinon technical fact sheet. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/Diazinontech.html>, accessed on 1/05/2013
- 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*, số 28: 47-53
- Phan Hiền, 2014. Xử lý nghiêm hành vi buôn lậu thuốc bảo vệ thực vật.. <http://www.quangngai.gov.vn>. Truy cập ngày 27/05/2014
- Ramanathan, M. and Lalithakumari, D., 1999. Complete mineralization of methylparathion by *Pseudomonas* sp. A3. *Appl Biochem Biotechnol*, 80(1): 1-12.
- Rao, Y.R and N. Sethunathan, 1979. Effect of ferrous sulfate on the degradation of parathion in flooded soil. *Journal of environment science and health*, 14b: 335-339
- Reigart, J.R. and J.R. Roberts, 1999. Recognition and management of pesticide poisoning. Fifth edition. Washington, D.C.: U.S. EPA. 236pp
- Riesner, D., M. Heibey and K. Henco, 1991. Temperature-gradient gel electrophoresis for the detection of polymorphic DNA and for quantitative polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 13(1): 632–636.
- Rosenberg A, and M.Alexander, 1979. Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. *Appl Environ Microbiol*, 37: 886–891.
- Saeed, N., A.S. Lotfi, K.A. Noghabi, A. Mohsenifar, M.M. Milani, A.M. Kalvanagh, R. Behrouzi and F. Masoumi, 2012. A high potential organophosphorus pesticide degrading enzyme from a newly characterized, *Pseudomonas aeruginosa* NL01. *African Journal of Microbiology Research*, 6(20): 4261-4269
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic

amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. 239: 487-491.

- Sapozhnikov, Y, O .Bawardi and D.Schlenk, 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, 55: 797-809.
- Sapozhnikova, Y., O. Bawardi, D. Schlenk, 2004. Pesticides and PCB's in sediments and fish from the Salton Sea, California, US. *Chemosphere*, 55:797-809
- Sarmah, A.K., M.E. Close and N.W.H. Mason, 2009. Dissipation and sorption of six commonly used pesticides in two contrasting soils of New Zealand. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 44(4): 325–336
- Sattar, M.A., 1990. Fate of Organophosphorus Pesticides in Soils. *Chemosphere*, 20(3): 387–396
- Sethunathan, N. and Yoshida, T., 1973. A *Flvobacterium* that degrades Diazinon and parathion. *Can J Microbiol*, 19(7): 873-875.
- Sethunathan, N., and T. Yoshida, 1973. A *Flavobacterium* sp. that degrades Diazinon and parathion. *Revue canadienne de microbiologie*, 19(7): 873-875
- Sethunathan, N., and T.Yoshida, 1969. Fate of Diazinon in Submerged Soil - Accumulation of Hydrolysis Product. *J Agric Food Chem* 17(6):1192–1195
- Sharom M.S., J.R.W. Miles, C.R. Harris and F.L.McEwen, 1980b. Behavior of 12 insecticides in soil and aqueous suspensions of soil and sediment. *Water Res* 14(8):1095–1100
- Singh BK and Kuhad R C., 1999. Biodegradation of lindane by the white-rot fungus *Trametes hirsutus*. *Lett Appl Microbiol*, 28: 238–241
- Singh J. and D.K.Singh, 2005. Bacterial, azotobacter, actinomycetes, and fungal population in soil after Diazinon, imidacloprid, and lindane treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) fi elds. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and. Agricultural Wastes* 40(5): 785–800

- Suslow, T.V, M.N Schroth and M. Isaka, 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology Journal*, 72(7): 917-918.
- Swan, S.H., R.L. Kruse and F. Liu, 2003. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure, *Enviromen Health Perspect*, Departement of Family and Community Medicien. MA 306 Medical Sciences Building. University of school of Medicine Columbia, USA, 111(120): 1478-84
- Tagle, D.A., B.F. Koop, M. Goodman, J.L. Slightom, D.L. Hess and R.T. Jones, 1988. Embryonic epsilon and gamma globin gens of a prosimian primate. Nucleotide and amino acid sequences, developmental regulation and phylogentic footprints. *J Mol Biol.*, 203: 439-455
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A.Filipski and S.Kumar, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30(12): 2725–2729.
- Trần Quang Hùng, 1999. Thuốc bảo vệ thực vật. NXB Nông Nghiệp. Hà Nội. 350 trang
- Tran Van Dung, 2011. Influence of crop rotation on the composition of the microbial community colonizing rice straw residues in paddy rice soil in the Mekong river delta of Vietnam. Doctoral Thesis. K.U.Leuven. Belgium
- Trần Văn Hai, 2009. Giáo trình Hóa bảo vệ thực vật. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ. 114 trang
- Trần Văn Tùng và Ngô Tiến Dũng, 2003. Nghiên cứu mối liên quan giữa liều độc – thời gian – hiệu quả và tác dụng của thuốc trừ sâu trong môi trường không khí, đất và nước. Hội nghị khoa học Quốc tế Y học lao động và Vệ sinh môi trường lần thứ I, Hà Nội.762-765.
- Trần Viết Thắng và Phạm Thị Ngọc, 2004. Ảnh hưởng của hóa chất bảo vệ thực vật đến sức khỏe tổ hợp tại Yên Bái. *Tạp chí Y học dự phòng*, số 4(67): 96
- US EPA, 2000. Enviromental eisk assessment for Diazinon (Preliminary). Washington, DC. www.epa.gov / Insecticide / op / Diazinon.htm. Released May 19. Pp: 75-78.

- US EPA, 2006. Reregistration eligibility decision (RED) Diazinon. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, US Government Printing Office, Washington, DC, EPA 738-R-04-006.
- Vaneet A., D.Xin, T.Atac and G.S.Kean, 2013. Diazinon-Chemistry and Environmental Fate: A California Perspective. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 223:107-140
- Veronique, C., M. Laure, V.G. Laure, M. Christian, B. Pierre, B. Enrique and N. Sylvie, 2011. Pesticides in the modern world-risks and benefits. *InTech*, 572pp
- Vigfusson, N.V., E.R. Vyse, C.A. Pernsteiner, R.J. Dawson, 1983. In vivo induction of sister chromatid exchange in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, Diazinon and guthion. *Mutat Res*, 118(1): 61-68.
- Wagner, S. and D. Orwick, 1994. Chronic organophosphate exposure associated with transient hypertonia in an infant. *Pediatrics*, 1: 94-7
- Wecker, L., R. Mrak, and W.D. Dettbarn, 1985. Evidence of necrosis in human intercostal muscle following inhalation of an organophosphate insecticide. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*, 6: 171-175.
- Weizman, Z. and S. Sofer, 1992. Acute pancreatitis in children with anticholinesterase insecticide intoxication. *Pediatr*, 90: 204-206
- WenJun, Z., J. FuBin and O. JianFeng, 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. [http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1\(2\)/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf](http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1(2)/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf), accessed on 25/7/2017
- Xuân Hợp, 2011. Tồn lưu hóa chất thuốc bảo vệ thực vật: “Quả bom” ô nhiễm cần tháo nhanh ngòi nổ. <http://www.vea.gov.vn/VN/quanlymt>. Truy cập ngày 15/08/2013
- Yaghoob, T., K. Farshid, D. Mehdi, A.M. Amir, M.S. Siamak and A.H.A. Hazandy, 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): 240-245.

Yasouri, F., 2006. Plasmid mediated degradation of Diazinon by three bacterial strains *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. and *Agrobacterium* sp.. Asian J Chem, 18(4): 2437-2444.

PHỤ CHƯƠNG

Phụ lục 1. Quy trình trích DNA trong dung dịch bằng phương pháp CTAB

- Cân 0,45 gram cát mịn sạch, đã tiệt trùng cho vào các eppendorf 1,5 mL.
- Lấy từ 8-10 khuẩn lạc đã thuần từ đĩa môi trường TSA cho vào eppendorf.
- Cho 1 mL CTAB 3% vào mỗi eppendorf, trộn đều hỗn hợp khuẩn lạc và cát trong dung dịch CTAB.
- Vortex các eppendorf sau đó đem ủ ở 65°C trong 1-2 giờ, cách 15 phút lắc đều các eppendorf để mẫu nóng đều.
- Ly tâm ở tốc độ 13.000 rpm trong 10 phút.
- Chuyển 700 µL dịch trong bên trên cho sang eppendorf 1,5 mL mới.
- Cho thêm 500 µL chloroform vào 700 µL dịch trong vừa chuyển và vortex nhanh để tăng sự tiếp xúc của mẫu và chloroform.
- Ly tâm ở tốc độ 13.000 rpm trong 8 phút.
- Chuyển 500 µL dịch trong bên trên sang eppendorf 1,5 mL mới.
- Kết tủa DNA bằng 750 µL isopropanol lạnh, giữ lạnh trong 30 phút.
- Ly tâm mẫu ở tốc độ 13000 rpm trong 30 phút.
- Loại bỏ isopropanol cẩn thận, tránh làm trôi DNA.
- Làm sạch DNA bằng 200 µL ethanol lạnh.
- Ly tâm ở tốc độ 6.500 rpm trong 5 phút.
- Loại bỏ ethanol và để khô mẫu qua đêm.
- Thêm 30-100 µL TE vào để hòa tan DNA và trữ ở -20°C.

Phụ lục 2. Quy trình điện di sản phẩm phản ứng PCR

Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1,5% (Merck)

Đặt khay nơi bằng phẳng, để khuôn vào khay, đặt lược vào khuôn, kiểm tra sự cân bằng của khay. Cân 0,15g agarose cho vào bình tam giác dung tích 250 mL, thêm 100 mL dung dịch TAE 1X đối với gel 20 giếng, lắc nhẹ cho agarose tan đều. Đặt bình tam giác vào lò vi sóng, đun ở chế độ phù hợp khoảng 3- 4 phút cho agarose hòa tan hoàn toàn, tạo thành một dung dịch trong suốt. Lấy bình tam giác ra khỏi lò vi song, đặt giấy bạc lại tránh bay hơi, để nguội khoảng 50°C và lắc đều. Đổ nhẹ dung dịch vào khuôn đã chuẩn

bị sẵn, tránh bọt khí, để nguội khoảng 30 phút, lấy nhẹ lược ra khỏi khuôn, tránh bề giếng.

Bước 2: Điện di trên gel agarose

Đặt khuôn gel vào bể điện di và bổ sung TAE buffer 1X cho ngập giếng. Load (nạp) vào mỗi giếng 4 μ l sản phẩm PCR. Load khoảng 2 μ l thang chuẩn vào giếng còn lại. Bật nguồn điện thiết bị điện di và điều chỉnh các thông số: 140 V, 400mA, thời gian 45 phút. Quan sát khi thấy chất chỉ thị màu di chuyển đến gần cuối gel (khoảng 1- 1,5 cm), tắt nguồn điện, lấy khuôn gel ra khỏi thiết bị điện di chuẩn bị chụp hình gel.

Bước 3: Chụp hình gel

Sau khi điện di sản phẩm PCR, quan sát kết quả các băng DNA xuất hiện trên gel bằng hệ thống chụp hình gel. Chụp hình gel chứa sản phẩm PCR của đoạn DNA được khuếch đại và so sánh kích thước so với thang chuẩn 100bp.

Phụ lục 3. Quy trình điện di điện di biến tính tăng cấp (DGGE)

Chuẩn bị hóa chất:

- **Chất nhuộm 6X (10mL)**
 - 1.5mL bromophenol blue 2%
 - 1.5mL xylene cyanol 2%
 - 3mL glycerol 100%
 - 4mL dH₂O
- **Chất nhuộm 2X (10mL)**
 - 0.25mL bromophenol blue 2%
 - 0.25mL xylene cyanol 2%
 - 7mL glycerol 100%
 - 2.5mL dH₂O
- **Pha 50X tris base Aceate (TAE) buffer**
 - 242 g Tris base (hydroxymethyl aminomethane) + 800mL dH₂O
 - thêm 57.1 mL glacial acetic acid.
 - thêm 100mL EDTA pH 8.0
 - thêm dH₂O để đạt thể tích 1000mL
- **Pha EDTA (pH 8.0)**
 - 146.1 g EDTA (pH 8.0), 186.1g Na₂EDTA.2H₂O
 - thêm 20g NaOH pellet
 - lên thể tích 1000mL.
- **Dung dịch biến tính (100% DS)**
 - 42g urea

- 40mL Formamide
- **40% PAGE**
- **10% fresh ASP (ammonium persulfate)**
- **TEMED**
- **DW**
- **Butanol**

Quy trình:

1. Chuẩn bị 8% PAGE trong ống nhựa thí nghiệm

	40%	60%	stacking	
100% DS	4.80	7.20	0.00	0.00
DW	4.56	2.16	3.32	8.30
40% PAGE	2.40	2.40	0.60	1.50
50 x TAE	0.24	0.24	0.08	0.20
Sum	12.00	12.00	4.00	10.00

2. Thêm 100 μ L APS 10% cho cả hai ống 60% và 40%.
3. Thêm 7 μ L TEMED vào ống 60%, trộn đều và cho vào ống tiêm.
4. Thêm 7 μ L TEMED vào ống 40%, trộn đều và cho vào ống tiêm.
5. Đổ gel vào.
6. Cho 1 mL butanol lên bề mặt tron lảng.
7. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 2h.
8. Khởi động và làm nóng máy chạy DGGE khoảng 1h ở nhiệt độ 60⁰C.
9. Sau đó tạo dung dịch stacking trong khoảng 2h từ khi bắt đầu khởi động máy.
10. Thêm 33 μ L APS 10% và 7 μ L TEMED vào 4mL hỗn hợp stacking.
11. Trộn đều, đổ lên bề mặt gel, để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.
12. Lấy mẫu thử: 45 μ L 2x thuốc nhuộm + 45 μ L sản phẩm đã chạy PCR.
13. Điều chỉnh thông số: 45V/16h hoặc 50V/14h hoặc 60V/12h hoặc 80V/8h cho 341F-GC/534R sản phẩm đã thực hiện phản ứng PCR.

Phụ lục 4. Mẫu phiếu điều tra tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật ở Đồng bằng sông Cửu Long

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
KHOA NÔNG NGHIỆP&SHƯỞ

**PHIẾU ĐIỀU TRA
 HIỆN TRẠNG SỬ DỤNG THUỐC BVTV TRÊN LÚA**

Phiếu số.....

1. Thông tin chung:

Tên người điều tra: Ngày điều tra:
/...../20...

- Tên nông dân: Nam , Nữ , Tuổi:

Trình độ học vấn:/12.

- Địa phương: Ấp: Xã: Huyện:

Tỉnh.....

- Diện tích trồng:.....m².

- Thời gian canh tác:.....năm

2. Kỹ thuật canh tác:

- Giống:.....

- Kỹ thuật làm đất:

Bón vôi: Có Không Liều lượng:.....kg/1000m²

Xử lý thuốc: Có Không

Làm đất: Có Không

Chuẩn bị đất: Cày Xới

Phơi đất: Có Không Phơi bao lâu:.....ngày

- Kỹ thuật tưới tiêu: Tự chảy Bơm bằng động cơ

Nguồn nước tưới tiêu:.....

- Thời điểm xuống giống, chăm sóc và thu hoạch:

Bảng 1. Thời gian xuống giống, chăm sóc và thu hoạch

Thời điểm thực hiện (tháng)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Thời vụ												
Năng suất												

Bảng 2. Lượng phân (kg) và thời điểm bón (ngày sau khi sạ: NSKS):

Loại phân	Lần 1		Lần 2		Lần 3		Lần 4	
	NSKS	Lượng	NSKS	Lượng	NSKS	Lượng	NSKS	Lượng

3. Sâu, bệnh:

Bảng 4. Các loại thuốc và thời điểm phun rải

Loại sâu bệnh	Tên thuốc	Liều lượng, nồng độ	Thời điểm phun, rải thuốc

Ngày.....tháng.....năm 20....

Người điều tra

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
KHOA NÔNG NGHIỆP & SHƯD

PHIẾU ĐIỀU TRA
HIỆN TRẠNG SỬ DỤNG THUỐC BVTV TRÊN RAU MÀU

Phiếu số:

1. Thông tin chung:

- Tên người điều tra: Ngày điều tra:
/...../20....

- Tên nông dân: Nam , Nữ , Tuổi:.....

- Trình độ học vấn:/12.

- Địa chỉ: ấp: xã: huyện:
tỉnh.....

- Diện tích trồng:.....m².

- Thời gian canh tác:.....năm.

- Kinh nghiệm:năm.

2. Điều kiện tự nhiên

+ Loại đất: Phù sa Sét Cát Thít

Nhiễm phèn từ tháng đến

tháng.....

+ Khả năng thoát nước: Tốt:..... Trung bình:.....

+ Tình trạng ngập: Có Không Thời gian ngập:.....

Lý do ngập: Mưa, lũ Chủ động xả lũ

+ Thời gian mưa: Từ tháng đến tháng.....

3. Lịch sử đất canh tác (tính cả trước khi lên vườn):

TT	Loại cây trồng	Thời gian trồng (từ năm đến năm)	Loại thuốc BVTV đã sử dụng

4. Lịch thời vụ

Loại rau	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12

5. Kỹ thuật làm đất

- + Chuẩn bị đất: Cày Xới Cuốc
- + Phơi đất: Có Không Bao lâu:.....ngày
- + Xử lý đất:
 - * Vô: Có Không Liều
lượng.....kg/1000m²
 - * Khác:

6.kỹ thuật trồng:

- + Mật độ trồng: Cây x cây:..... Hàng x hàng:.....
- + Có sử dụng màng phủ không? Có Không

7. Phương pháp và chế độ nước

- Nguồn nước tưới:.....
- Phương pháp tưới:.....
- Chế độ tưới:
 - +Loại rau:..... Tần suất tưới/ngày:.....
 - +Loạirau:..... Tần suất tưới/ngày:.....
 - +Loạirau:..... Tần suất tưới/ngày:.....

8. Phân bón và kỹ thuật bón phân (phân hóa học & hữu cơ)

*** Lưu ý: về việc sử dụng phân hữu cơ sinh học**

TT	Loại rau	Loại phân/phương pháp bón/liều lượng (1.000m ²)/NSKT	Ghi chú

1			
2			

9. Quản lý sâu hại và bệnh: * Lưu ý: về việc sử dụng thuốc phòng trừ sinh học

❖ Có áp dụng IPM: Có Không

Cách áp dụng:.....

❖ Có biết gì về rau an toàn không? Có Không

❖ Có biết về tiêu chuẩn GAP không? Có Không

❖ Phương pháp hóa học

Loại rau	Loại sâu	Tên thuốc	Liều lượng/công	Nồng độ	Thời gian phun

10. Chi phí sản xuất:

Loại rau	Tổng chi phí/.....công	Chi phí (1.000 đồng)			Ngày công lao động	Doanh thu
		Giống	Thuốc BVTV	Phân bón		

11. Thông tin khác liên quan đến sử dụng thuốc BVTV của nông dân:

Tình hình sử dụng thuốc BVTV (loại thuốc, lượng thuốc sử dụng) trong 20 năm trở lại đây (quan tâm nhiều hơn đến thời gian 10 năm cuối), để ý đến các loại thuốc có gốc chlor

.....

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
 KHOA NÔNG NGHIỆP & SHƯD

PHIẾU ĐIỀU TRA

- Giống:.....Thời gian sinh trưởng:
ngày

- Kỹ thuật làm đất:

Bón vôi: Có Không Liều lượng:.....kg/1000m²

Xử lý thuốc: Có Không

Làm đất: Có Không

Chuẩn bị đất: Cày Xới

Phơi đất: Có Không Thời gian phơi:.....ngày

- Kỹ thuật tưới tiêu: Tự chảy Bơm bằng động cơ

- Nguồn nước tưới tiêu:.....

- Thời gian rút nước trong vụ (trước khi thu hoạch):.....ngày

3.3 Màu

+ Loại cây rau, màu:.....

+ Chuẩn bị đất: Cày Xới Cuốc

+ Phơi đất: Có Không Bao

lâu:.....ngày

+ Xử lý đất:

* Vôi: Có Không Liều lượng kg/1000m²

* Khác:

+ Mật độ trồng: Cây x cây:..... Hàng x

hàng:.....

+ Có sử dụng màng phủ không? Có Không

-Nguồn nước tưới:.....

-Phương pháp tưới:.....

- Chế độ tưới:

+Loại rau, màu:..... Tần suất tưới/ngày:.....

+Loại rau, màu:.....Tần suất tưới/ngày:.....

+Loại rau, màu:..... Tần suất tưới/ngày:.....

4. Phân bón (bao gồm phân hóa học & hữu cơ, hữu cơ vi sinh)

Loại phân	Lần 1		Lần 2		Lần 3		Lần 4		Lần 5	
	NSKS	Liều lượng	NSKS	Liều lượng	NSKS	Liều lượng	NSKS	Liều lượng	NSKS	Liều lượng

4. Sâu, bệnh: Điều tra riêng lẻ cho vụ ĐX, HT, TĐ

STT	Loại dịch hại (sâu, bệnh, cỏ dại, ốc, chuột)	Tên thuốc	Liều lượng/công	Nồng độ	Thời điểm phun, rải thuốc	Ghi chú
ĐÔNG XUÂN						
1						
2						
3						
HÈ THU						
1						
2						
3						
THU ĐÔNG						
1						
2						
3						

5. Chi phí sản xuất:

Mùa vụ	Tổng chi phí/.....công	Chi phí (1.000 đồng)			Ngày công lao động	Doanh thu
		Giống	Thuốc BVTV	Phân bón		
Đông xuân						
Hè thu						
Thu đông						

6. Thông tin khác liên quan đến việc sử dụng thuốc BVTV của nông dân:

Tình hình sử dụng thuốc BVTV (loại thuốc, lượng thuốc sử dụng) trong 20 năm trở lại đây (quan tâm nhiều hơn đến thời gian 10 năm cuối), để ý đến các loại thuốc có gốc chlor

.....

Phụ lục 5. Quy trình ly trích Diazinon từ đất và làm sạch dịch trích bằng cột Alumina

- Ly trích Diazinon từ đất: thông qua 7 bước

- Bước 1. Cân 3g đất cho vào mỗi lọ bi, cho 50 μ l 2,2,5- PCB(0,5ppm) để qua đêm(2,2,5- PCB – chất đi kèm thấm vào đất nhằm mục đích kiểm tra hiệu suất trích)
- Bước 2. Trộn đều 3g đất với 1g Diatomaceous silical, sau đó thêm vào mỗi lọ bi 7mL diethyl ether, vortex 2500 vòng trong 1 phút, lắc đều trên máy lắc ngang 24 giờ
- Bước 3. Trích mẫu lần 1: vortex lọ bi đã lắc thật kỹ trước khi trích với tốc độ 2500 vòng trong 1 phút, ly tâm ở tốc độ 2500 vòng trong 3 phút. Dùng pipet hút dịch trong (không để dính đất hoặc bị đục)
- Bước 4. Thêm 4mL diethyl ether vào lọ bi vortex 2500 vòng trong 1 phút, lắc đều trên máy lắc ngang 24 giờ
- Bước 5. Trích mẫu lần 2: vortex lọ bi đã lắc thật kỹ trước khi trích với tốc độ 2500 vòng trong 1 phút, ly tâm ở tốc độ 2500 vòng trong 3

- phút. Dùng pipet hút dịch trong (không để dính đất hoặc bị đục).
Dịch trong được cho vào cùng lọ bi đã trích lần 1
- Bước 6. Thêm 4mL diethyl ether vào lọ bi vortex 2500 vòng trong 1 phút, ly tâm ở tốc độ 2500 vòng trong 3 phút và tiến hành trích lần 3. Dùng pipet hút dịch trong (không để dính đất hoặc bị đục). Dịch trong được cho vào cùng lọ bi đã trích lần 1 và 2.
- Bước 7. Cô dung dịch thu được sau khi trích còn 1mL để tiến hành lọc mẫu với cột sắc lý alumina

- Làm sạch dịch trích: dịch ly trích được làm sạch bằng cột sắc ký alumina

- Bước 1. Bất hoạt Alumina bằng cách đem nung ở 550°C ít nhất 24h, chuyển qua tủ sấy ở 250°C trong 30 phút rồi chuyển sang bình hút ẩm để nguội. Thêm 3% nước khử khoáng và lắc trong 30 phút.
- Bước 2. Chuẩn bị cột thủy tinh, gòn thủy tinh, cốc thủy tinh, Na₂SO₄ sấy khan ở nhiệt độ 250°C, để nguội trong bình hút ẩm.
- Bước 3. Nhồi một ít gòn thủy tinh vào cột, lắp vào giá.
- Bước 4. Cân 1g Alumina đã bất hoạt (bằng giấy nhôm) đổ vào cột (cột nhỏ), thêm khoảng 1cm Na₂SO₄ lên trên. Gõ nhẹ cột để Alumina được nén chặt
- Bước 5. Luyện cột với 1,3mL hỗn hợp DCM : Hexane (2:1) (Lưu ý: không để dung môi xuống thấp hơn lớp Na₂SO₄)
- Bước 6. Ổn định cột tiếp với 2,5mL Hexane để loại bỏ hỗn hợp DCM : Hexane (2:1) ra khỏi cột
- Bước 7. Lọc mẫu với 4mL hexan (chia làm 4 lần lọc)
- Bước 8. Cô mẫu xuống còn 1mL đo trên GC-MS

Phụ lục 6. Phương pháp chủng hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon để đạt nồng độ 20 ppm để làm giàu mật độ vi khuẩn phân hủy hoạt chất Diazinon

Bước 1: chuẩn bị các bình tam giác 250 mL đã tiệt trùng khô và được chuyển vào tủ cấy vô trùng.

Bước 2: dùng syringe 250 µL hút 100 µL hoạt chất Diazinon có nồng độ 5000 ppm và chủng vào các bình tam giác 250 mL (Diazinon được pha trong dung môi acetone).

Bước 3: để bay hơi dung môi acetone trong 30 phút

Bước 4: bổ sung 24 mL môi trường khoáng tối thiểu

Bước 5: chủng 1 mL dịch trích vi khuẩn từ đất.

Phụ lục 7. Phương pháp chủng hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon để đạt nồng độ 20 ppm để nhân mật độ vi khuẩn phân hủy hoạt chất Diazinon

Bước 1: chuẩn bị các ống nghiệm 25 mL đã tiệt trùng khô và được chuyển vào tủ cấy vô trùng.

Bước 2: dùng syringe 50 μ L hút 50 μ L hoạt chất Diazinon có nồng độ 2000 ppm và chủng vào các ống nghiệm 25 mL (Diazinon được pha trong dung môi acetone).

Bước 3: để bay hơi dung môi acetone trong 30 phút

Bước 4: bổ sung 4900 μ L môi trường khoáng tối thiểu

Bước 5: chủng 100 μ L dịch vi khuẩn.

Chú ý đối với các nghiệm thức không chủng vi khuẩn thì ở **Bước 4** bổ sung 5000 μ L môi trường khoáng tối thiểu và bỏ qua **Bước 5**.

Phụ lục 6. Giới hạn tối đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong đất

Bảng 1. Giới hạn tối đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong đất

TÊN HOẠT CHẤT	GIỚI HẠN CHO PHÉP (mg/kg đất khô)
Atrazine ($C_8H_{14}ClN_5$)	0,1
Benthiocarb($C_{16}H_{16}ClNOS$)	0,1
Cypermethrin($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$)	0,1
Diazinon($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$)	0,05
Fenoxaprop – ethyl($C_{16}H_{12}ClNO_5$)	0,1
Metolachlor($C_{15}H_{22}ClNO_2$)	0,1
MPCA ($C_9H_9ClO_3$)	0,1

(Nguồn: qui chuẩn kỹ thuật quốc gia về dư lượng hóa chất BVTV trong đất Hà Nội, 2008.)

Phụ lục 7. Quy trình xây dựng đường chuẩn mối quan hệ giữa $OD_{600\text{ nm}}$ với mật độ vi khuẩn: thông qua các bước bên dưới

- Nuôi nhân mật độ các dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung TSB 0,5%.
- Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm với tốc độ 10.000 rpm
- Hiệu chỉnh độ đục của các dòng vi khuẩn với $OD_{600\text{ nm}} = 0,2; 0,4; 0,6$ bằng cách đo quang phổ.

- Xác định mật độ vi khuẩn tương ứng với mỗi giá trị OD_{600 nm} của mỗi dòng vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt
- Sử dụng công cụ microsoft excel để xây dựng đường chuẩn ứng với mỗi dòng vi khuẩn.

Phụ lục 8. Phân tích phương sai khảo sát lưu tồn ngoài đồng ruộng

Bảng 2. Phân tích phương sai khảo sát lưu tồn Diazinon trên mô hình luân canh lúa-khoai lang (vụ khoai lang) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	496866	248433	100.28	0.000
Sai số	9	22296	2477		
Tổng cộng	11	519162			

Bảng 3. Lưu tồn Diazinon trên mô hình chuyên màu (xà lách xoong) tại Bình Tân-Vĩnh Long (vụ Đông Xuân, 2013)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	273043	136521	162.71	0.000
Sai số	9	7551	839		
Tổng cộng	11	280594			

Bảng 4. Bảng phân tích phương sai lưu tồn của Diazinon trong mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	98616686	32872229	222,01	0,000
Sai số	12	1776808	148067		
Tổng cộng	15	100393495			

Bảng 5. Bảng phân tích phương sai mức độ lưu tồn của Diazinon trong mô hình luân canh 2 lúa – 1 màu (lúa) trong điều kiện nhà lưới (2014)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	28070387	9356796	37,19	0,000
Sai số	12	3018873	251573		
Tổng cộng	15	31089260			

Bảng 6 Bảng phân tích phương sai mức độ lưu tồn của Diazinon trong mô hình chuyên canh màu (đậu xanh) trong điều kiện nhà lưới (2014)

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	74028750	24676250	27,69	0,000
Sai số	11	9803282	891207		
Tổng cộng	14	83832032			

Phụ lục 8. Phân tích phương sai ảnh hưởng của môi trường sinh thái đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác chuyên màu

Bảng 7. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 25°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	612,8	153,2	3,97	0,035
Sai số	10	385,6	38,6		
Tổng cộng	14	998,4			

Bảng 8. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 30°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1577.7	394.4	13.14	0.001
Sai số	10	300.3	30.0		
Tổng cộng	4	1878.0			

Bảng 9. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 37°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	951.7	237.9	5.73	0.012
Sai số	10	415.1	41.5		
Tổng cộng	14	1366.8			

Bảng 10. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 4 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	66.3	16.6	0.73	0.590
Sai số	10	226.1	22.6		
Tổng cộng	14	292.5			

Bảng 11. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 5 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	479.5	119.9	3.86	0.038
Sai số	10	310.5	31.0		
Tổng cộng	14	790.0			

Bảng 12. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 6 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1099.5	274.9	7.05	0.006
Sai số	10	389.9	39.0		
Tổng cộng	14	1489.5			

Bảng 13. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 7 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1084.2	271.1	15.33	0.000
Sai số	10	176.9	17.7		
Tổng cộng	14	1261.1			

Bảng 14. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 20 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1461.3	365.3	15.91	0.000
Sai số	10	229.6	23.0		
Tổng cộng	14	1690.8			

Bảng 15. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 50 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	727.3	181.8	12.37	0.001
Sai số	10	147.0	14.7		
Tổng cộng	14	874.3			

Bảng 16. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 100 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	523.98	130.99	14.16	0.000
Sai số	10	92.54	9.25		
Tổng cộng	14	616.52			

Bảng 17 Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 150 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	36.1	9.0	0.58	0.681
Sai số	10	154.3	15.4		
Tổng cộng	14	190.4			

Bảng 18 Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 200 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	47.65	11.91	1.81	0.204
Sai số	10	65.87	6.59		
Tổng cộng	14	113.52			

Bảng 19 Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.1

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	1418.5	472.8	16.69	0.001
Sai số	8	226.6	28.3		
Tổng cộng	11	1645.1			

Bảng 20 Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn HA7.4

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	674.2	224.7	7.02	0.012
Sai số	8	256.1	32.0		
Tổng cộng	11	930.3			

Bảng 21 Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn TA3.2

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	534.7	178.2	4.14	0.048
Sai số	8	344.2	43.0		
Tổng cộng	11	878.9			

Bảng 22 Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn TA4.17

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	1083.6	361.2	13.29	0.002
Sai số	8	217.5	27.2		
Tổng cộng	11	1301.0			

Phụ lục 9. Phân tích phương sai ảnh hưởng của môi trường sinh thái đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn phân lập từ đất canh tác luân canh lúa-màu

Bảng 23 Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 25°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	327,7	163.9	10.06	0.012
Sai số	6	97,7	16.3		
Tổng cộng	8	425,4			

Bảng 24. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 30°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	1508.7	754.3	41.01	0.000
Sai số	6	110.4	18.4		
Tổng cộng	8	1619.0			

Bảng 25. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nhiệt độ 37°C đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	31.9	16.0	0.43	0.670
Sai số	6	223.4	37.2		
Tổng cộng	8	255.3			

Bảng 26. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 4 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	54.4	27.2	1.15	0.379
Sai số	6	142.4	23.7		
Tổng cộng	8	196.8			

Bảng 27. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 5 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	217.9	109.0	6.42	0.032
Sai số	6	101.8	17.0		
Tổng cộng	8	319.7			

Bảng 28. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 6 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	689.9	344.9	26.41	0.001
Sai số	6	78.4	13.1		
Tổng cộng	8	768.3			

Bảng 29. Phân tích phương sai ảnh hưởng của pH 7 đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	1479.2	739.6	18.25	0.003
Sai số	6	243.1	40.5		
Tổng cộng	8	1722.3			

Bảng 30. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 20 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	1336.5	668.2	53.70	0.000
Sai số	6	74.7	12.4		
Tổng cộng	8	1411.2			

Bảng 31. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 50 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	447.8	223.9	11.92	0.008
Sai số	6	112.7	18.8		
Tổng cộng	8	560.5			

Bảng 32. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 100 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	170.76	85.38	52.23	0.000
Sai số	6	9.81	1.63		
Tổng cộng	8	180.57			

Bảng 33. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 150 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	10.68	5.34	0.77	0.504
Sai số	6	41.66	6.94		
Tổng cộng	8	52.33			

Bảng 34. Phân tích phương sai ảnh hưởng của nồng độ Diazinon 200 ppm đến phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của các dòng vi khuẩn

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	2	21.29	10.64	1.60	0.277
Sai số	6	39.86	6.64		
Tổng cộng	8	61.15			

Bảng 35. Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của dòng vi khuẩn BT4_L1

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	1957.2	652.4	41.31	0.000
Sai số	8	126.3	15.8		
Tổng cộng	11	2083.5			

Bảng 36. Phân tích phương sai ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến tốc độ phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Diazinon của dòng vi khuẩn CL36_M4

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	3	767.6	255.9	9.02	0.006
Sai số	8	226.8	28.4		
Tổng cộng	11	994.4			

Phụ lục 10. Phân tích phương sai khả năng phân hủy Diazinon trong đất trong điều kiện phòng thí nghiệm

Bảng 37. Phân tích phương sai sau 10 ngày nuôi ủ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	28	7	0.05	0.995
Sai số	10	1417	142		
Tổng cộng	14	1444			

Bảng 38. Phân tích phương sai sau 20 ngày nuôi ủ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1328	332	1.75	0.216
Sai số	10	1901	190		
Tổng cộng	14	3229			

Bảng 38. Phân tích phương sai sau 20 ngày nuôi ủ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	1328	332	1.75	0.216
Sai số	10	1901	190		
Tổng cộng	14	3229			

Bảng 38. Phân tích phương sai sau 20 ngày nuôi ủ

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Nghiệm thức	4	9676	2419	17.58	0.000
Sai số	10	1376	138		
Tổng cộng	14	11052			