

SỬ DỤNG NGUYÊN TỐ ĐỒNG VỊ PHÓNG XẠ ĐỂ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI THUỐC TRỪ SÂU LÂN HỮU CƠ (DIMETOAT) CỦA VI KHUẨN

PHẠM THỊ LỆ HÀ, TRẦN THỊ THỦY, NGUYỄN DUY HẠNG

Viện nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt

Để nghiên cứu sự phân giải các loại thuốc bảo vệ thực vật nói chung và thuốc trừ sâu nói riêng, các loại nguyên tố đồng vị phóng xạ thường được sử dụng [1-3]. Các hợp chất bảo vệ thực vật, thường được đánh dấu ở các vị trí C hoặc P,□ trở thành ¹⁴C, ³²P, nhờ đó có thể nhận biết được sự phân giải và vị trí phân giải bởi các chất có hoạt tính sinh học như vi sinh vật, enzim□

Thuốc dimetoat (Đi) là loại thuốc trừ sâu lân hữu cơ được sử dụng nhiều ở các vùng trồng rau màu và cây công nghiệp [4-6]. Bên cạnh hiệu quả bảo vệ thực vật, nó còn gây ô nhiễm môi trường, làm giảm sự đa dạng sinh học. Hơn thế nữa, nó còn làm giảm giá trị thương phẩm của sản phẩm nông nghiệp [7-10].

Để xử lý thuốc Đi tồn dư trong môi trường, các phương pháp vật lý và hóa học có thể được sử dụng, song nếu sử dụng phương pháp sinh học thì hiệu quả bảo vệ môi trường sẽ tốt hơn [11-15].

Ở Việt Nam, cũng như trên thế giới, các công trình nghiên cứu sử dụng nguyên tố đồng vị phóng xạ để nghiên cứu sự phân giải thuốc Đi còn rất ít [3].

Mục đích của công trình nghiên cứu này là bước đầu sử dụng thuốc Đi có nguyên tố đồng vị phóng xạ ³²P để nghiên cứu khả năng phân giải thuốc Đi của 2 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ vùng đất trồng rau tại Đà Lạt (tỉnh Lâm Đồng).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn

Hai chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C có khả năng phân giải thuốc Đi đã được phân lập từ đất của vùng trồng rau Đà Lạt, được sử dụng để nghiên cứu (các đặc trưng sinh trưởng, khả năng phân giải thuốc Đi của 2 chủng vi khuẩn này đã được xác định) [16].

68

2. Thuốc Di được đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ

Thuốc Di có công thức hóa học: o,o-dimethyl-5-(N-methylcabamido methyl) dithiophosphate. Thuốc Di được đánh dấu nguyên tố đồng vị ở gốc phốt pho (³²P-dimetoat) trên lò phản ứng của Viện hạt nhân Đà Lạt, có độ sạch hạt nhân > 99,5%, độ sạch hóa phóng xạ > 98,8%, độ sạch hóa học > 99,4% (theo bản kiểm nghiệm của phòng Đồng vị phóng xạ, Viện hạt nhân Đà Lạt).

3. Đánh giá sự phân giải thuốc Di bằng phương pháp đồng vị phóng xạ

Thuốc Di đã được đánh dấu nguyên tố đồng vị ³²P (³²P-Đi) được lọc khuẩn bằng màng lọc khuẩn millipore trước khi được đưa vào các bình có nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C với nồng độ là 15 µg/ml.

Tại các thời điểm 0 h*, 24 h, 48 h, 72 h và 120 h, đo các chỉ tiêu sau:

- Hoạt độ phóng xạ (HDPX) tổng trong mẫu.
- Hoạt độ phóng xạ của thuốc ³²P-Đi. Thuốc ³²P-Đi được tách chiết bằng cách cho etil axetat vào dịch nuôi cấy theo tỷ lệ 1: 1; lắc trong 30 phút để tạo thành 2 lớp; tách lớp hữu cơ phía trên chứa thuốc ³²P-Đi.
- Hoạt độ phóng xạ của ³²P trong dịch nuôi cấy sau khi đã loại bỏ sinh khối của vi khuẩn bằng màng lọc khuẩn millipore (Millex GS), $\phi = 0,22 \mu\text{m}$.
- Hoạt độ phóng xạ của ³²P trong sinh khối vi khuẩn.

Đối chứng là bình chỉ có thuốc ³²P-Đi trong môi trường nuôi cấy, mà không có vi khuẩn.

*Ghi chú: * HDPX của thuốc ³²P-Đi được đo*

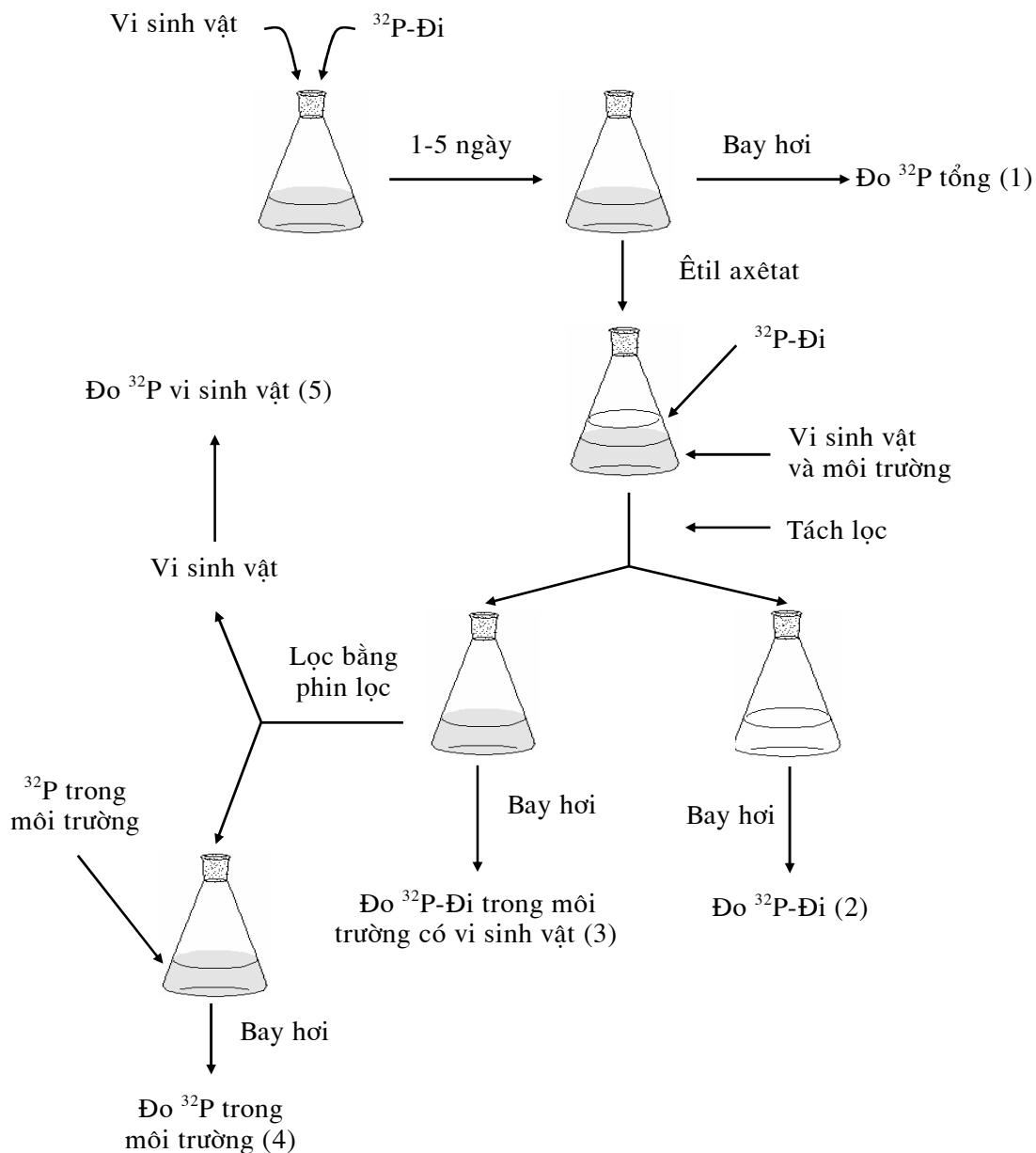
ngay sau khi cho vào môi trường.

Đo nguyên tố đồng vị được thực hiện bởi hệ máy đo β do IAEA cung cấp. Quá trình phân tích được thực hiện theo quy trình 1.

4. Phân tích các chất hình thành sau khi phân giải

Lấy 5 ml dịch nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C có bổ sung

thuốc Đi, thêm vào 5 ml etil axêtat để chiết, ly tâm trong 30 phút, thu lấy 4 ml etil axêtat vào ống nghiệm, cho thêm một ít Na_2SO_4 khan để tách H_2O . Tiêm 4 μl vào máy sắc ký khói phổ (GC-MS), detecto khói phổ tứ cực, nhiệt độ interface: 240°C; nhiệt độ nguồn ion: 210°C. Sử dụng thư viện phổ, kết hợp diện tích thu được trên các đỉnh, xác định các hợp chất đã hình thành và hàm lượng của chúng.



Hình 1. Quy trình sử dụng thuốc trừ sâu dimetoat được đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ ^{32}P ($^{32}\text{P-Đi}$) để đánh giá khả năng phân giải thuốc trừ sâu Đi của vi khuẩn

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá khả năng phân giải thuốc Đi của chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T bằng kỹ thuật đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ

Bảng 1 và hình 2 cho thấy HĐPX của thuốc

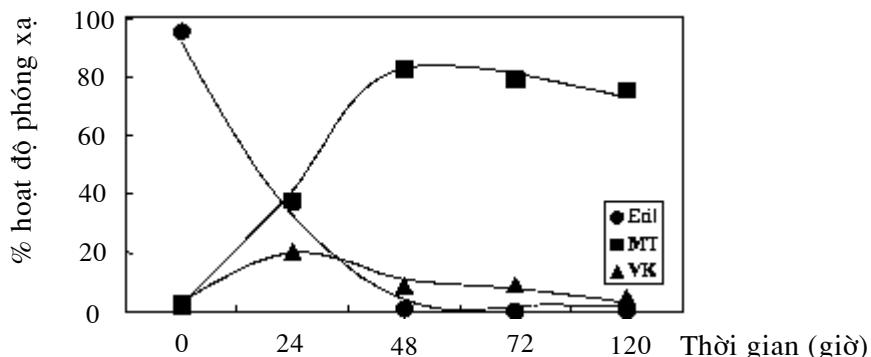
^{32}P -Đi giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Sau 24 giờ, HĐPX còn 36,9% và ở 72 giờ, ^{32}P -Đi không có mặt trong môi trường nuôi cấy; như vậy chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T có khả năng phân giải thuốc Đi. Sự phân giải còn được thể hiện rõ nét qua HĐPX của ^{32}P cao trong môi trường nuôi cấy (tăng từ 2% lên 75% sau 120 giờ nuôi cấy).

Bảng 1

Hoạt độ phóng xạ của thuốc trừ sâu dimetoat (^{32}P -Đi) được đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ ^{32}P còn lại trong dung dịch có chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T

	Σ	Êtil	MT	VK
0 h	100	95,5	2,2	2,0
24 h	96	36,9	37,6	20,5
48 h	93	0,7	82,5	8,7
72 h	89	0	79,1	9,1
120 h	80	0	75,3	4,7

Ghi chú: đơn vị là (%) hoạt độ phóng xạ (HĐPX); Σ . HĐPX trong toàn bộ mẫu. HĐPX của thuốc trừ sâu có đánh dấu đồng vị phóng xạ ^{32}P ; MT. HĐPX của ^{32}P trong môi trường nuôi cấy; VK. HĐPX của ^{32}P trong vi khuẩn.



Hình 2. Sự thay đổi của hoạt độ phóng xạ trong môi trường nuôi cấy có chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T

Hoạt độ phóng xạ của ^{32}P cũng đo được trong sinh khối của chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T, tuy không cao. Trong sinh khối của vi khuẩn, HĐPX của ^{32}P đo được có thể ở hai dạng: dạng 1 là ^{32}P của thuốc ^{32}P -Đi (thuốc Đi là loại thuốc trừ sâu nội hấp nên có thể được hấp thụ một phần vào bên trong tế bào vi khuẩn) và dạng 2 là ^{32}P nhưng không phải là ^{32}P -Đi. Ở giai đoạn 24 giờ, HĐPX trong sinh khối cao hơn các giai đoạn khác, có lẽ là do 24 giờ là giai đoạn của pha tiềm phát-phá lag của chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T [14, 16], nên kích thước của tế

bào tăng nhanh, hàm lượng ARN cũng tăng nhanh; chúng có khả năng tiếp thu cao đối với một số chất, bên cạnh đó thuốc Đi là loại thuốc trừ sâu nội hấp và chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T là vi khuẩn có khả năng sinh trưởng phát triển khá mạnh, cho nên đã hấp thụ khá lớn ^{32}P , trong đó chủ yếu là ^{32}P -Đi và một phần ^{32}P tự do có được do quá trình phân giải bởi các enzym ngoại bào của số vi khuẩn có ban đầu. Ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ, số lượng tế bào bắt đầu tăng lên, có lẽ ^{32}P tự do ở bên ngoài được đưa trở lại, làm chất dinh dưỡng cho tế bào, đồng thời

thông qua quá trình dị hóa, thuốc ^{32}P -Đi có trong tế bào được thả ra môi trường ngoài, cho nên ở giai đoạn này, phần trăm HDPX của ^{32}P trong tế bào giảm thấp và đạt 8,7% và 9,1% tương ứng. Ở giai đoạn 120 giờ, là pha cân bằng, lúc này số lượng tế bào sinh ra trong quần thể ở trạng thái cố định động-số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi, quá trình trao đổi chất giữa tế bào và môi trường giảm thấp. Đối

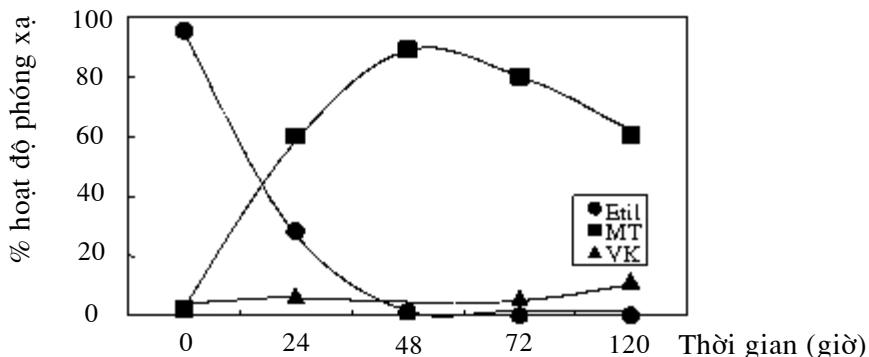
với chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T, giai đoạn này khá ngắn [14, 16]; có lẽ do vậy mà % HDPX của ^{32}P trong tế bào giảm hẳn, chỉ còn 4,7%. Kết hợp với kết quả của các nghiên cứu trước, chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T phân giải thuốc Đi không bằng con đường hấp thụ mà đã tạo ra các enzym ngoại bào phân giải thuốc Đi [14, 16], như vậy chứng tỏ chủng vi khuẩn này đã phân giải thuốc Đi.

Bảng 2

Hoạt độ phóng xạ của thuốc trừ sâu dimetoat (^{32}P -Đi) được đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ ^{32}P còn lại trong dung dịch có chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C

	Σ	Êtil	MT	VK
0 h	100	95,5	2,2	2,0
24 h	96	28,4	60,6	6,6
48 h	93	1,3	89,1	1,7
72 h	89	0	80,2	6,1
120 h	80	0	60,6	11,5

Ghi chú: như bảng 1.



Hình 3. Sự thay đổi của hoạt độ phóng xạ trong môi trường nuôi cấy có chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C

2. Đánh giá khả năng phân giải thuốc Đι của chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C bằng kỹ thuật đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ

Bảng 2 và hình 3 cho thấy HDPX của thuốc ^{32}P -Đi giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Ở thời điểm 24 giờ, HDPX là 28,4% và 72 h sau nuôi cấy, thuốc ^{32}P -Đi không có mặt trong môi trường. Như vậy, chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C có khả năng phân giải thuốc Đι và khả năng phân giải cao hơn so với chủng *Aerococcus* sp.T (37,6%). Điều này phù hợp với kết quả sử dụng sắc ký khí để phân tích dư lượng của thuốc Đι

trong công trình nghiên cứu trước [14, 16]. Trong sinh khối của chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C có ^{32}P , tuy nhiên tỷ lệ này là không đáng kể mà ^{32}P chủ yếu tập trung trong môi trường nuôi cấy. Trong sinh khối của vi khuẩn, hoạt độ phóng xạ của ^{32}P ở giai đoạn 24 h là 6,6%, sau đó giảm dần (ở thời điểm 48 h là 1,7%); có lẽ cũng tương tự như chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T, do 24 h là giai đoạn của pha tiềm phát-phá lag. Tuy nhiên, quá trình sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C không mạnh như chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T, cho nên có lẽ có hấp thụ thuốc ^{32}P -Đi nhưng không nhiều [14, 16]. Ở

giai đoạn 120 h, là pha cân bằng của chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C, giai đoạn này là khá dài và dài hơn so với chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T [14, 16]. Do vậy, có lẽ ở giai đoạn này, trong môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T, chất dinh dưỡng cạn, độc tố trong môi trường tích lũy cao thì ở chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C, chất dinh dưỡng vẫn còn, độc tố chưa cao, vẫn còn có sự trao đổi chất, hoặc cũng có thể chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C đã sử dụng ^{32}P trong quá trình đồng hóa, do đó mà % HDPX của ^{32}P trong tế bào tăng và đạt 11,5%. Như vậy, chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C có khả năng phân giải thuốc Đi.

3. Các hợp chất hình thành trong quá trình phân giải thuốc Đi bởi vi khuẩn

Sự chuyển hóa và phân giải các hợp chất lân hữu cơ trong tự nhiên tuy nhanh nhưng rất phức tạp, đôi khi xuất hiện nhiều hợp chất trung gian độc với côn trùng và động vật máu nóng hơn gấp nhiều lần dạng thuốc ban đầu. Phần lớn các hợp chất độc trung gian này là sản phẩm của quá trình oxy hóa khử. Thí dụ trong quá trình

chuyển hóa và phân giải parathion-mêtil, sản phẩm trung gian paraoxon-mêtil độc hơn parathion-mêtil gấp 5 lần; quá trình chuyển hóa và phân giải thuốc Đi có sản phẩm trung gian PO-Đi độc gấp 10-11 lần thuốc Đi. Nếu thuốc Đi được phân giải 90%, trong đó chỉ cần 10% là dạng PO-Đi, thì độ độc còn cao hơn so với ban đầu và sự phân giải xem như mất ý nghĩa. Do vậy, việc phân tích các hợp chất hình thành trong quá trình phân giải bởi vi khuẩn là cần thiết.

Bảng 3 thể hiện các hợp chất có mặt trong dịch nuôi cấy có thuốc Đi và hai chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C. Kết quả cho thấy hàm lượng thuốc Đi trong môi trường nuôi cấy có vi khuẩn nhỏ hơn so với không có vi khuẩn; đặc biệt trong trường hợp có chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C, thuốc Đi bị phân giải hết. Các hợp chất có mặt trong môi trường có vi khuẩn không khác mà lại ít hơn so với dung dịch môi trường có thuốc Đi mà không có vi khuẩn; thêm vào đó, số lượng các hợp chất hình thành ít hơn và trong cả 3 trường hợp, đều không thấy có dạng PO-Đi.

Bảng 3

Các hợp chất có mặt trong môi trường nuôi cấy có thuốc Đi và hai chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C

STT	RT	Tên hợp chất	Diện tích (m^2)
		Không có vi khuẩn	
1	18.79	Tetradecan	3975.93
2	20.46	Hexadecan	
3	20.79	Phocmatiông	71175.91
4	21.82	Điethyltoluamit	9529.46
5		Hexadecan	
6		Heptadecan	
7		Hexacizan	
8	24.11	Dimetoat	12038.60
9		Eicosan	
10	25.38	Polysiloxan	16428.41
11		Đibutylphthalat	16997.36
12	27.19		16003.82
13	27.42		
14	27.58	3- Eicosan	12304.44
15	29.29	Polysiloxan	60863.59
16		Hydrocacbon	
17	30.04	Xyclo Eicosan	13000.97
18	30.99	Polysiloxan	82617.30
19	32.29	Octasican	8987.71
20		Xyclodecosan	

21		Hydrocacbon	
22	32.56	Polysiloxan	112041.10
23	33.46	Hydrocacbon	16003.82
24		Đimetylphthalat	
25	34.23	Polysiloxan	154603.50
26	34.75	Hydrocacbon	26637.91
27	36.33	Polysiloxan	229079.86
28	38.14	Hydrocacbon	64017.42
29	39.08	Polysiloxan	220071.16
	Vì khuẩn Aerococcus sp.T		
1	18.79	Tetradecan	3975.93
2	20.46	Hexadecan	1734.86
3	20.76	Phocmatiòng	4388.07
4			
5			
6	22.05	Heptadecan	4495.25
7		Hydrocacbon	
8	24.10	Dimetoat	6430.91
9	25.47	Axit tetradecanoic	
10	25.96	Hydrocacbon	10514.16
11		Đibutylphthalat	
12		Metil exte của axít béo	9309.32
13		Hydrocacbon	
14	27.21	Hexadecanoic	
15	28.32	Hydrocacbon	38663.75
16		Hydrocacbon	6885.35
17	29.46	1-Docosanol	
18	30.99		9829.25
19			
20			
21			
22			
23	33.44	Đioctylphthalat	
24	34.10		
25			
26	34.72		16285.83
27	36.25		12166.73
28			
29			
	Vì khuẩn Neiseria sp.C		
1	18.78	Tetradecan	5192.35
2	20.46	Hexadecan	2577.69
3	20.76	Phocmatiòng	540.98
4	21.81	Điethyltoluamit	4818.45
5	22.05	Hydrocacbon no mạch thẳng	
6			6262.78
7	22.79		3123.41
8	23.56	Hydrocacbon no mạch thẳng	
9			6453.54
10	23.66	Hydrocacbon mạch vòng	4244.15
11	24.99	Hydrocacbon no mạch thẳng	7140.88

12	25.97	Đibutylphthalat	13706.29
13		Metil exte của axit béo	
14	27.22	Axit hexadecanoic	11264.37
15	27.66	Hydrocacbon no mạch thăng	3602.15
16		1-Eicosan	
17			
18	30.22	Hydrocacbon	1714.55
19	31.00		2169.73
20			
21			
22			
23	32.48	Dioctylphthalat	2757.57
24	34.11		15959.82
25			
26	34.95		4686.39
27			
28	38.36		5411.95
29			

Ghi chú: RT (rectention time). thời gian lưu giữ.

III. KẾT LUẬN

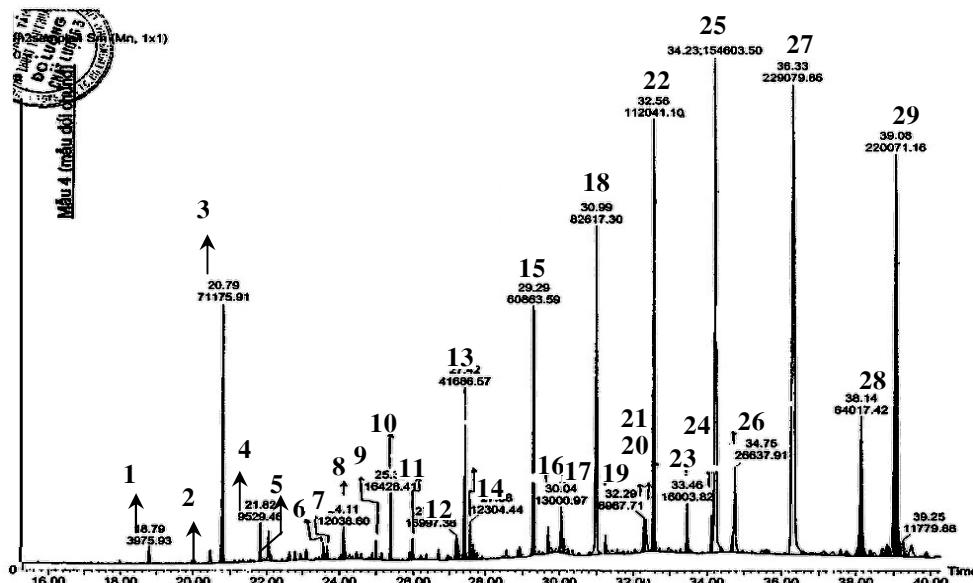
1. Sử dụng thuốc trừ sâu lân hưu cơ dimetoat (Đi) được đánh dấu nguyên tố đồng vị phóng xạ ^{32}P ($^{32}\text{P-Đi}$), đã xác định được khả năng phân giải thuốc Đi của 2 chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C phân lập được từ vùng đất trồng rau Đà Lạt.

2. Sau 72 giờ nuôi cấy, trong môi trường nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và

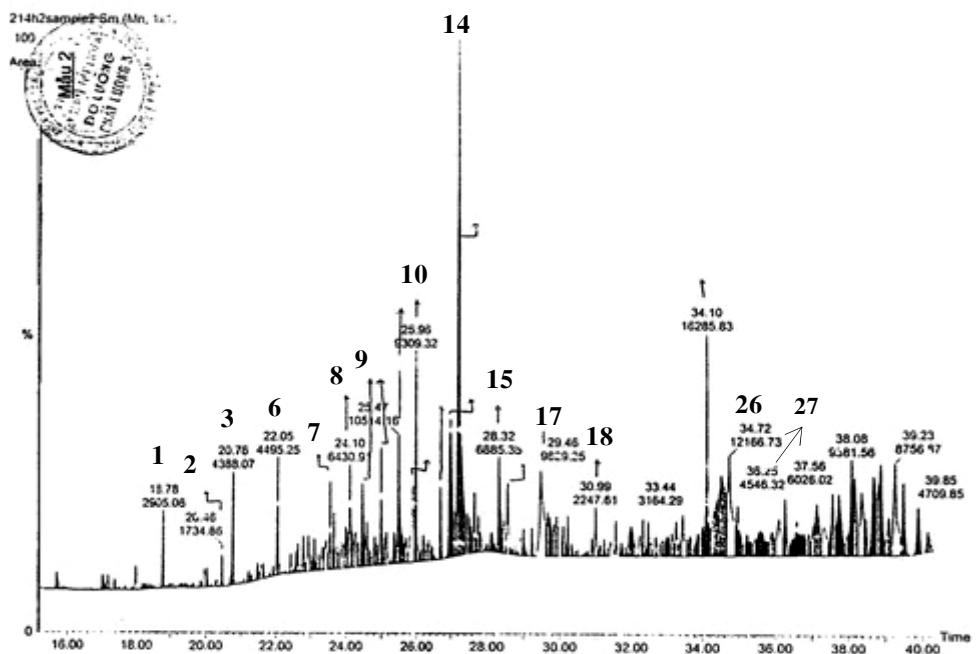
Neiseria sp.C không có thuốc $^{32}\text{P-Đi}$.

3. Sau 120 giờ nuôi cấy, hoạt độ phóng xạ của ^{32}P đo được chủ yếu trong môi trường nuôi cấy; trong sinh khối của vi khuẩn, ^{32}P đo được rất thấp.

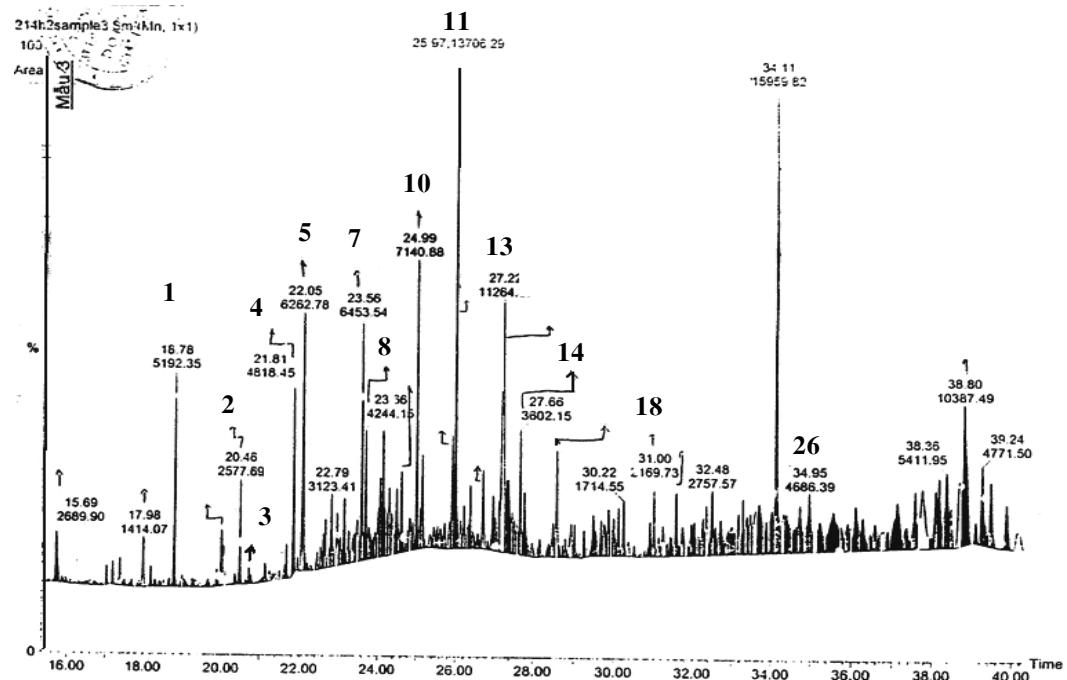
4. Các hợp chất hình thành trong quá trình phân giải thuốc Đi bởi 2 chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T và *Neiseria* sp.C ít hơn so với không có vi khuẩn và không hình thành các hợp chất độc.



Hình 4. Kết quả phân tích khói mẫu có Đi mà không có vi khuẩn (các hợp chất đánh số 1, 2, □ có tên tương ứng với tên các hợp chất trong bảng 3)



Hình 5. Kết quả phân tích khói phổi mẫu có thuốc Đi và chủng vi khuẩn *Aerococcus* sp.T



Hình 6. Kết quả phân tích khói phổi mẫu có thuốc Đi và chủng vi khuẩn *Neiseria* sp.C

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Braschi I. et al., 2000: J. Agric. Food Chem., 48: 2565-2571.
2. Hussain M., 1989: Energy Agency Bull., 31: 2-36.
3. Hussain M., 1993: FAO/IAEA, Interregional training course on radiotrace and conventional techniques for studies of pesticides in food and the environment, Vienna.
4. Miller G. T. Jr., 1988: Environmental

- Science, An Introduction, 2nd ed. by Wadsworth Publishing Company, Belmont, California 94002.
5. Lê Văn Khoa, 1995: Môi trường và ô nhiễm. Nxb. Giáo dục, Hà Nội.
 6. Trần Quang Hùng, 1995: Thuốc bảo vệ thực vật. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
 7. Nguyễn Văn Tuyên, 1997: Sinh thái và Môi trường. Nxb. Giáo dục, Hà Nội.
 8. Lê Huy Bá, 1997: Môi trường t.1. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
 9. Phạm Văn Lãm, 1997: Hóa chất nông nghiệp với môi trường. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
 10. Lê Huy Bá, 1998: Sinh thái môi trường đất. Nxb. Nông nghiệp, tp. Hồ Chí Minh.
 11. Bollag J. M., Liu S. Y., 1990: Biological transformation processes of pesticides, in Pesticides in the soil environment, SSSA Book series, no. 2, 677 S. Segoe Rd., Madison, WI 53711.
 12. Madsen E. L., 1991: Sci. Technol., 25(10): 1663.
 13. Bollag J. M., Myers C. J. and Minard R. D., 1992: The science of the total environment, 123/124: 205-217.
 14. Trần Thị Thủy, Phạm Thị Lệ Hà, 2001: Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (T) trên môi trường có thuốc trừ sâu lân hữu cơ, Hội nghị Vật lý toàn quốc lần thứ IV, Hà Nội.
 15. Doãn Thái Hòa và cs., 2001: Tập chí Khoa học và Công nghệ, XXXIX(1): 46-51.
 16. Phạm Thị Lệ Hà và cs., 2003: Tập chí Sinh học, 25(2): 35-38.

USING RADIOISOTOPE TO STUDY THE DIMETHOATE DEGRADATION CAPACITY OF BACTERIA

PHAM THI LE HA, TRAN THI THUY, NGUYEN DUY HANG

SUMMARY

The dimethoate (Di) biodegradation capacity of 2 bacterium strains *Aerococcus* sp.T and *Neiseria* sp.C isolated from agricultural soil of Dalat city was determined by using ^{32}P labeled dimethoate (^{32}P -Di). Adding ^{32}P -Di into the culture medium of these 2 bacterium strains, ^{32}P -Di was quickly biodegraded and at 72 hours of cultivation, ^{32}P -Di was not detected. After 120 hours of incubation, the radioactivity of ^{32}P was mostly accumulated in the medium, partly in the biomass of bacteria. Intermediates found in the biotransformation processes by the strains *Aerococcus* sp.T and *Neiseria* sp.C were less than compared to the non biotransformation process and the poisonous intermediates were not found.

Ngày nhận bài: 9-5-2005