

DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.115

## PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN TRONG ĐẤT TRỒNG NHẪN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY POTASSIUM CHLORATE

Nguyễn Thị Phi Oanh<sup>1\*</sup> và Nguyễn Lê Lam Ngọc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Phi Oanh (email: ntpoanh@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2020

Ngày nhận bài sửa: 08/04/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

### Title:

Isolation and characterization of potassium chlorate reducing bacteria from longan plantation soil

### Từ khóa:

Đất vườn nhãn, gen 16S-rRNA, hóa hướng động, phân hủy potassium chlorate, vi khuẩn

### Keywords:

Bacteria, chemotaxis, longan plantation soil, potassium chlorate reduction, 16S-rRNA gene

### ABSTRACT

Potassium chlorate is used to induce off-season flowering in longan. However, intensive application of potassium chlorate was shown to cause toxic effects for the environment and human health. Fourteen bacterial isolates capable of reducing potassium chlorate were isolated from soil samples collected from a longan plantation orchard in Cai Rang district, Can Tho city. After cultivating in liquid minimal salt medium added with potassium chlorate (100 ppm) and glucose (2000 ppm), 7 isolates producing high biomass were selected to determine potassium chlorate reducing efficiency. The results indicated that all isolates showed higher potassium chlorate reducing efficiency in medium supplemented with potassium chlorate and glucose compared to control treatment without glucose supplementation. Isolates CR10 and CR8 performed the highest efficiency on potassium chlorate reduction (99.8% and 97.4%, respectively) after 7 days of incubation. In sterile soil with KClO<sub>3</sub> (375 ppm) and glucose (750 ppm) addition, the two isolates CR10 and CR8 also performed higher potassium chlorate reducing efficiency than the others (94.4% and 93.7%, respectively) after 9 days of incubation. Among these 2 potential isolates, CR8 showed chemotaxis towards potassium chlorate. Based on the 16S-rRNA gene sequence, isolate CR8 was genetically identified as *Enterobacter* sp. CR8.

### TÓM TẮT

Potassium chlorate (KClO<sub>3</sub>) là hợp chất được sử dụng để xử lý ra hoa nhãn vào mùa nghịch giúp tăng hiệu quả kinh tế. Tuy nhiên, sử dụng các hợp chất có gốc chlorate vượt liều lượng cho phép gây ô nhiễm môi trường, từ đó, ảnh hưởng đến hệ sinh thái và sức khỏe cộng đồng. Mười bốn dòng vi khuẩn đã được phân lập từ các mẫu đất vườn nhãn ở quận Cái Răng, Cần Thơ có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub>, trong đó 7 dòng tạo sinh khối cao trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm). Trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có bổ sung KClO<sub>3</sub> và glucose, hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> của các dòng vi khuẩn cao hơn so với thí nghiệm không bổ sung glucose. Dòng CR10 và CR8 có hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, tương ứng 99,8% và 97,4% sau 7 ngày nuôi cấy. Khi chủng vi khuẩn vào đất đã khử trùng có bổ sung KClO<sub>3</sub> (375 ppm) và glucose (750 ppm), 2 dòng vi khuẩn CR10 và CR8 cũng có hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> cao hơn các dòng vi khuẩn còn lại, đạt 94,4% và 93,7% sau 9 ngày nuôi cấy. Trong 2 dòng vi khuẩn tiềm năng, dòng CR8 có khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub>. Phân tích trình tự gen 16S-rRNA cho thấy dòng vi khuẩn CR8 thuộc chi *Enterobacter* và được định danh là *Enterobacter* sp. CR8.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Lê Lam Ngọc, 2020. Phân lập và xác định đặc tính của vi khuẩn trong đất trồng nhãn có khả năng phân hủy potassium chlorate. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên)(2): 80-88.

## 1 GIỚI THIỆU

Nhãn là loại cây ăn trái có giá trị kinh tế cao, do đó, cây nhãn đã trở thành một trong các loại cây được trồng với diện tích lớn (khoảng 53.900 ha) ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Bộ Nông Nghiệp & PTNT, 2008). Thu hoạch nhãn ở ĐBSCL thường tập trung theo mùa, đồng thời, bị cạnh tranh bởi các loại trái cây khác nên có thời điểm nhãn được mùa nhưng mất giá. Trong khi đó, vào mùa nghịch, nhãn thường rất khan hiếm và giá tăng cao. Hiện nay,  $KClO_3$  đang được nông dân ĐBSCL sử dụng rộng rãi để tưới vào gốc cây nhãn nhằm kích thích nhãn ra hoa nghịch mùa (Lê Văn Chấn, 2008). Nhiều nghiên cứu công bố nồng độ  $KClO_3$  phù hợp để kích thích ra hoa nhãn vào mùa nghịch (Manochai *et al.*, 2005; Trần Văn Hậu và Lê Văn Chấn, 2009). Theo Trần Văn Hậu và Lê Văn Chấn (2009), xử lý  $KClO_3$  với liều lượng 24 g/m đường kính tán kích thích cây nhãn Xuồng Com Vàng ra hoa cao nhất. Tuy nhiên, nông dân thường sử dụng  $KClO_3$  với liều lượng vượt nhiều lần cho phép, từ đó gây nguy cơ lưu tồn  $KClO_3$  trong đất cao dẫn đến ô nhiễm nước mặt và nước ngầm. Ngoài ra, do  $KClO_3$  là một hợp chất có tính oxy hóa mạnh, không tự phân hủy nên sự ô nhiễm  $KClO_3$  trong môi trường đất và nước ảnh hưởng đến thực vật và sức khỏe cộng đồng (Wiwatanadate *et al.*, 2001; Ongprasert *et al.*, 2002). Reubi (1978) cho rằng  $KClO_3$  gây hoại tử ống thận ở động vật, trong khi đối với người, ngộ độc  $KClO_3$  làm cản trở khả năng vận chuyển oxy trong máu, gây đau đầu, chóng mặt. Người và động vật ăn phải thực phẩm nhiễm  $KClO_3$  gây đau dạ dày và có thể gây tổn hại cho thận.

Hiện nay, phương pháp sinh học sử dụng các vi sinh vật bản địa để phân hủy các hợp chất ô nhiễm đang được tập trung nghiên cứu do tính bền vững và thân thiện với môi trường. Đã có nhiều nghiên cứu về khả năng phân hủy  $KClO_3$  của các dòng vi khuẩn được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm như *Ideonella dechloratans* (Malmqvist *et al.*, 1994), *Pseudomonas chloritidismutans* ASK-1 (Wolterink *et al.*, 2005) và *Alicyclophilus denitrificans* BC (Weelink *et al.*, 2008). Tuy nhiên cho đến nay ở Việt Nam chỉ có nghiên cứu về sự phân hủy sinh học  $KClO_3$  trong đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ (Trần Thị Diệu Nguyễn *et al.*, 2017). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn, khảo sát khả năng hóa hướng động và định danh vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy hiệu quả  $KClO_3$  trong đất trồng nhãn ở khu vực quận Cái Răng, Cần Thơ.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Thu mẫu đất

Mẫu đất thí nghiệm được thu từ vườn nhãn có thời gian sử dụng  $KClO_3$  trên 10 năm tại khu vực Khánh Hưng, phường Phú Thứ, quận Cái Răng, Cần Thơ. Vườn nhãn có diện tích 16.500 m<sup>2</sup>,  $KClO_3$  được sử dụng để kích thích nhãn ra hoa với liều lượng 1,2 kg/tán cây (đường kính mỗi tán cây xấp xỉ 10 m) và sử dụng  $KClO_3$  1 lần/năm. Đất mặt được thu ở độ sâu 5 - 10 cm tại 5 điểm trên một vườn nhãn, gồm bốn góc vườn và giữa vườn. Tại mỗi điểm thu mẫu, đất được thu quanh một gốc nhãn trong bán kính 1 m với tâm là thân cây. Vị trí thu mẫu được định vị bằng GPS-V, Garmin, USA (kinh độ và vĩ độ tương ứng 0586077 và 1101598 theo hệ qui chiếu UTM, mảnh số 48P). Các mẫu đất sau khi thu được trộn đều, thu một mẫu đại diện để phân lập vi khuẩn và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy $KClO_3$

Vi khuẩn có khả năng phân hủy  $KClO_3$  được phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu (MM) có bổ sung  $KClO_3$  (100 ppm). Thành phần môi trường MM trong 1 L dung dịch gồm 1,4696 g  $Na_2HPO_4$ ; 1,3609 g  $KH_2PO_4$ ; 98,5 mg  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5,75 mg  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 3,2 mg  $Na_2EDTA$ ; 2,75 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,7 mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 1,16 mg  $H_3BO_3$ ; 1,15 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,24 mg  $CuSO_4$ ; 0,24 mg  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,1 mg  $MoO_3$ . Quy trình phân lập được thực hiện như sau: Cho 5 g mẫu đất vào bình tam giác 100 mL chứa 22,5 mL môi trường MM có bổ sung  $KClO_3$  để đạt nồng độ 100 ppm. Các bình tam giác chứa môi trường nuôi cấy được lắc trên máy lắc tròn (125 vòng/phút) ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm trong một tuần. Sau đó, để mẫu lắng các hạt đất trong 30 phút và chuyển 5 mL mẫu môi trường chứa vi khuẩn sang môi trường MM mới có nồng độ  $KClO_3$  như ban đầu và tiếp tục nuôi cấy như trên. Quá trình nuôi cấy này được lặp lại 4 lần trước khi trải vi khuẩn lên môi trường MM có bổ sung  $KClO_3$  để phân lập thuần (Breugelmans *et al.*, 2004).

Sau 4 lần nuôi cấy, dung dịch vi khuẩn được pha loãng đến  $10^{-5}$  (hệ số pha loãng 10), 50  $\mu$ L dịch vi khuẩn ở từng độ pha loãng được trải lên môi trường MM có bổ sung  $KClO_3$  (100 ppm). Các đĩa Petri agar chứa vi khuẩn được ủ ở nhiệt độ 32°C trong 4 ngày để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc. Phân nhóm khuẩn lạc vi khuẩn theo hình thái và chọn các khuẩn lạc rời để cấy chuyển nhiều lần theo phương pháp cấy ria trên môi trường MM có bổ sung  $KClO_3$  cho đến khi chọn được các dòng vi khuẩn có khuẩn

lạc đồng nhất. Độ thuần của các dòng vi khuẩn phân lập được kiểm tra bằng cách quan sát độ đồng nhất của khuẩn lạc trên môi trường Tryptone soya agar (TSA) (Breugelmans *et al.*, 2004). Các dòng vi khuẩn thuần được quan sát và mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học và nhuộm Gram.

Các dòng vi khuẩn có khả năng tạo sinh khối nhanh được tuyển chọn bằng cách chủng khuẩn lạc của từng dòng vi khuẩn vào ống nghiệm 15 mL chứa 4 mL môi trường Tryptone Soy Broth (TSB) và nuôi cấy qua đêm. Vi khuẩn được thông khí trên máy lắc tròn (125 vòng/phút) ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau đó, mật độ quang của vi khuẩn ( $OD_{600nm}$ ) được điều chỉnh về cùng giá trị 0,8 (tương đương  $10^8$  CFU/mL). Chủng 50  $\mu$ L từng dòng vi khuẩn vào môi trường MM có bổ sung  $KClO_3$  (100 ppm) và glucose (2000 ppm). Các ống nghiệm chứa vi khuẩn nuôi cấy tương tự như trên. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mật độ quang của vi khuẩn ( $OD_{600nm}$ ) được xác định sau 2 ngày nuôi cấy.

### 2.3 Khảo sát khả năng phân hủy $KClO_3$ của vi khuẩn trong môi trường MM

Khả năng phân hủy  $KClO_3$  của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường MM được khảo sát trong 7 ngày nuôi cấy. Các dòng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong bình tam giác 100 mL chứa 30 mL môi trường TSB (20 g/L), thông khí trên máy lắc tròn (125 vòng/phút) trong 24 giờ. Sinh khối vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm 10 mL mẫu nuôi cấy (13.000 vòng/phút) trong 5 phút. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được trộn đều với 5 mL dung dịch NaCl 0,9%. Mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ) của từng dòng vi khuẩn được điều chỉnh về cùng giá trị là 0,8. Khả năng phân hủy  $KClO_3$  của các dòng vi khuẩn phân lập được khảo sát trong ống nghiệm 15 mL chứa 5 mL môi trường MM bổ sung  $KClO_3$  (100 ppm) kết hợp với có hoặc không bổ sung glucose (2000 ppm). Đối với nghiệm thức có chủng vi khuẩn, 50  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn sau khi hiệu chỉnh  $OD_{600nm} = 0,8$  được chủng vào môi trường MM chứa  $KClO_3$  kết hợp với có hoặc không bổ sung glucose. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### 2.4 Khảo sát khả năng phân hủy $KClO_3$ của vi khuẩn trong đất khử trùng

Khả năng phân hủy  $KClO_3$  của các dòng vi khuẩn phân lập được khảo sát trong 9 ngày trong môi trường đất được để khô tự nhiên và khử trùng. Các bước nuôi tăng sinh và điều chỉnh mật độ quang của vi khuẩn được tiến hành tương tự như mô tả ở

Mục 2.3. Khả năng phân hủy  $KClO_3$  của các dòng vi khuẩn được khảo sát bằng cách chủng 500  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn ( $OD_{600nm} = 0,8$ ) vào bình tam giác 250 mL chứa 40 g đất khử trùng được bổ sung 15 mL môi trường MM có hòa tan  $KClO_3$  (375 ppm) và glucose (750 ppm). Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Khả năng phân hủy  $KClO_3$  của vi khuẩn phân lập được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng thuốc thử indigo carmine (Chiswell and Keller-Lehmann, 1993). Sau mỗi 24 giờ, 500  $\mu$ L dịch vi khuẩn được thu và ly tâm (13.000 vòng/phút) trong 5 phút. Chuyển 50  $\mu$ L dịch trong sau khi ly tâm vào eppendorf 2 mL chứa hỗn hợp gồm 50  $\mu$ L indigo carmine, 500  $\mu$ L HCl đậm đặc và 400  $\mu$ L nước cất. Trộn đều bằng cách vortex mẫu trong 15 giây, sau đó để yên mẫu ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Độ hấp thụ quang ( $OD_{610nm}$ ) của indigo carmine được xác định bằng phương pháp quang phổ (Multiskan GO, Thermo Scientific).

### 2.5 Khảo sát khả năng hóa hướng động theo $KClO_3$ của vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy  $KClO_3$  hiệu quả được tuyển chọn để khảo sát khả năng hóa hướng động theo  $KClO_3$  trên môi trường khoáng tối thiểu bán đặc (0,75% agar) có bổ sung tinh thể  $KClO_3$  thành vòng tròn hoặc nửa vòng tròn với tâm là vị trí chủng vi khuẩn. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung  $KClO_3$ . Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Vi khuẩn được ủ ở 32°C. Vi khuẩn có khả năng hóa hướng động theo  $KClO_3$  sẽ tạo sinh khối về vị trí có bổ sung tinh thể  $KClO_3$  (Thí nghiệm được mô phỏng theo quy trình của phòng thí nghiệm Bộ môn Quản lý Đất và Nước, Đại Học Leuven, Bỉ).

### 2.6 Định danh vi khuẩn dựa vào trình tự gen 16S-rRNA

Dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy  $KClO_3$  cao và hóa hướng động theo hợp chất này được tuyển chọn để định danh. ADN của vi khuẩn được ly trích theo mô tả của Sambrook *et al.* (1989), sử dụng cặp môi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACG-ACT-3') (Lane, 1991) để khuếch đại gen 16S-rRNA của vi khuẩn. Thành phần của một phản ứng PCR 50  $\mu$ L gồm: 5  $\mu$ L PCR buffer (10X); 4  $\mu$ L  $MgCl_2$ ; 4  $\mu$ L dNTPs (1,25 mM mỗi loại); 1  $\mu$ L mỗi loại môi (10  $\mu$ M); 0,5  $\mu$ L DMSO; 0,5  $\mu$ L Taq polymerase (5U/ $\mu$ L); 2  $\mu$ L DNA (50-100 ng/ $\mu$ L); 32  $\mu$ L nước cất vô trùng. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR gồm: 95°C (5 phút); 30 chu kỳ nhân số lượng ADN với

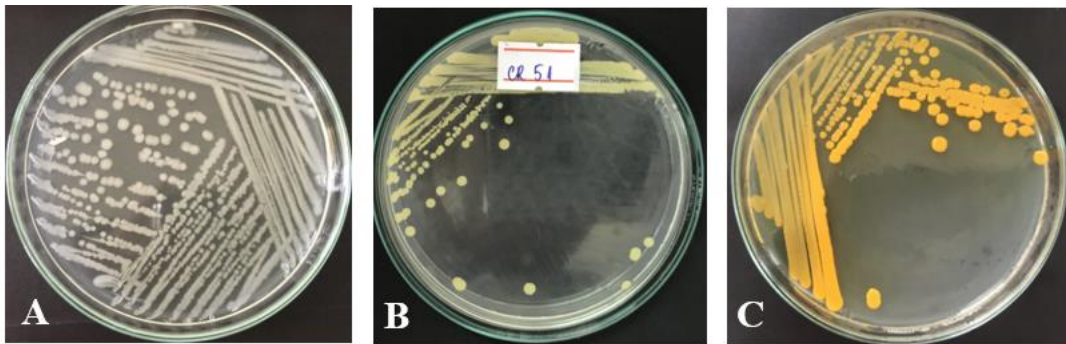
hiệt độ và thời gian tương ứng là 95°C (1 phút), 53°C (30 giây), 72°C (90 giây); và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được nhận diện bằng kỹ thuật điện di trong gel agarose 1,5% sử dụng dung dịch đệm Tris-Acetate-EDTA 1X với hiệu điện thế 50V trong 30 phút và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty Sinh Hóa Phù Sa. Trình tự ADN của vi khuẩn được phân tích bằng phần mềm Geneious và được so sánh với gen tương ứng của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI sử dụng công cụ BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub>

Sau 4 lần nhân sinh khối, chọn lọc và tuyển chọn, 14 dòng vi khuẩn đã được phân lập trong môi trường

MM bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm). Khi được nuôi cấy trên môi trường TSA sau 48 giờ, khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn không đồng nhất, kích thước biến thiên từ 1 - 3 mm; khuẩn lạc tròn hoặc không đều; có màu trắng, vàng hoặc cam; bìa nguyên, răng cưa hoặc gợn sóng. Về độ nổi, đa số khuẩn lạc lồi, chỉ có một dòng có khuẩn lạc phẳng (Hình 1). Tất cả các dòng vi khuẩn đều Gram âm và có khả năng chuyển động khi quan sát tế bào dưới kính hiển vi ở vật kính 100X. Trong 14 dòng vi khuẩn phân lập, 7 dòng được ký hiệu CR3, CR8, CR10, CR45, CR48, CR51 và CR84 có khả năng tạo sinh khối cao hơn các dòng còn lại khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm) sau 2 ngày nuôi cấy. Trong 7 dòng vi khuẩn, 5 dòng có tế bào hình que ngắn, 2 dòng có tế bào hình cầu. Các dòng vi khuẩn này được tuyển chọn để khảo sát khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đại diện sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA

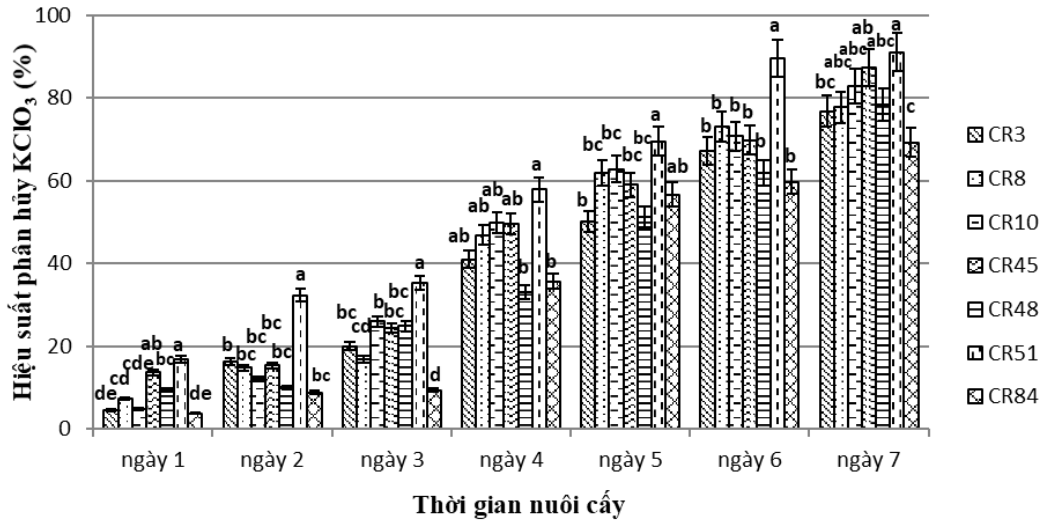
A: dòng CR10; B: dòng CR51; C: dòng CR84

#### 3.2 Khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của vi khuẩn trong môi trường MM

##### 3.2.1 Môi trường nuôi cấy không bổ sung glucose

Khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của 7 dòng vi khuẩn trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) trong 7 ngày nuôi cấy được trình bày trong Hình 1. Trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub>, hiệu quả phân hủy KClO<sub>3</sub> của 7 dòng vi khuẩn tăng dần theo thời gian nuôi cấy, và giữa các dòng vi khuẩn có khác biệt thống kê khi so sánh với nhau về khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> theo thời gian. Sau một ngày nuôi cấy, dòng CR51 phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất (16,8%), khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các dòng còn lại. Đặc biệt, trong thời gian từ 2 đến 7

ngày, dòng vi khuẩn CR51 có hiệu quả phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các dòng còn lại. Sau 7 ngày, dòng CR51 có khả năng phân hủy đến 91,4% KClO<sub>3</sub> trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm). Năm dòng vi khuẩn gồm CR3, CR8, CR10, CR45 và CR48 không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) về hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub>. Dòng CR84 phân hủy KClO<sub>3</sub> thấp nhất, đạt 84,5% (Hình 2). Sự gia tăng sinh khối của vi khuẩn thông qua giá trị mật độ quang ( $OD_{600nm}$ ) khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> so với nghiệm thức đối chứng có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung KClO<sub>3</sub> chứng tỏ 7 dòng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng sử dụng KClO<sub>3</sub> cho sự tăng trưởng (Bảng 1).



**Hình 2: Hiệu suất phân giải KClO<sub>3</sub> của các dòng vi khuẩn trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) theo thời gian**

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% (n=3, độ lệch chuẩn)

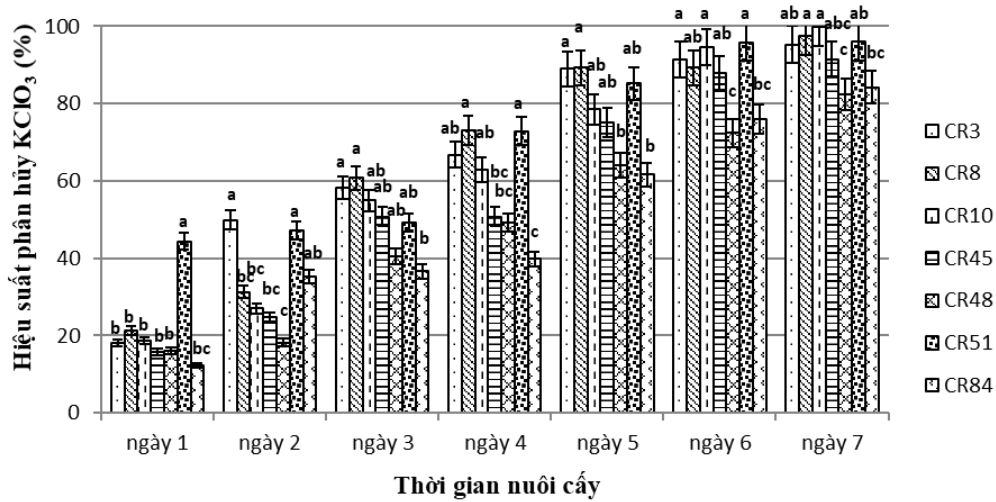
**Bảng 1: Mật độ quang của vi khuẩn theo thời gian khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub>**

Dòng	Mật độ quang trung bình (OD <sub>600nm</sub> )						
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
CR3	0,27	0,14	0,31	0,54	0,64	0,83	0,93
CR8	0,27	0,17	0,25	0,61	0,73	0,89	0,95
CR10	0,22	0,14	0,37	0,64	0,74	0,87	1,00
CR45	0,24	0,25	0,31	0,64	0,69	0,83	1,05
CR48	0,20	0,19	0,32	0,45	0,61	0,77	0,95
CR51	0,27	0,44	0,43	0,73	0,84	1,07	1,09
CR84	0,14	0,20	0,15	0,49	0,75	0,75	0,86
Đối chứng	0,11	0,11	0,12	0,13	0,12	0,12	0,13

3.2.2 Môi trường nuôi cấy có bổ sung glucose

Khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của 7 dòng vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm) trong 7 ngày được trình bày trong Hình 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn đều phân hủy KClO<sub>3</sub> nhanh hơn so với môi trường chỉ bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) (Hình 2). Sau một ngày nuôi cấy, dòng CR51 phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất với hiệu suất 43,6%, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng còn lại. Sau 4 ngày, hiệu suất phân hủy đạt trên 60% ở các dòng vi khuẩn CR3, CR8, CR10 và CR51 tương

ứng với 67,4%, 73,6%, 63,7% và 73,3%. Hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> của 4 dòng vi khuẩn này tiếp tục tăng nhanh đến ngày 6 và đạt tối đa ở ngày 7 (trên 95%), trong đó dòng vi khuẩn CR10 và CR8 có hiệu quả phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất tương ứng với hiệu suất 99,8% và 97,4%, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng còn lại. Dòng CR48 có hiệu suất phân hủy thấp nhất (82,6%), kể đến là dòng CR84 (84,5%) khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng còn lại. Các dòng vi khuẩn CR3, CR45 và CR51 không khác biệt về hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> khi so sánh với nhau (Hình 3).



**Hình 3: Hiệu suất phân giải KClO<sub>3</sub> của các dòng vi khuẩn trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm) theo thời gian**

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% (n=3, độ lệch chuẩn)

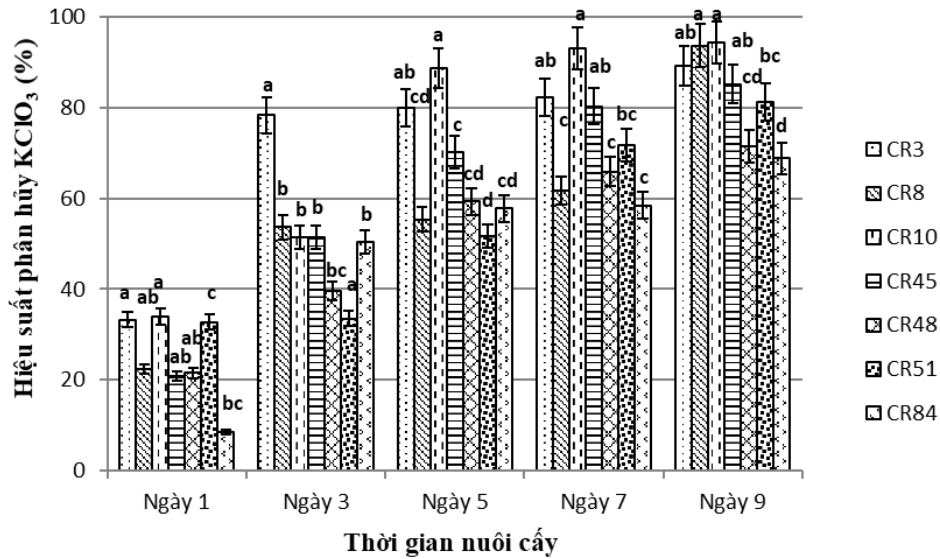
Theo nghiên cứu của Trần Thị Diệu Nguyên và ctv (2017), dòng vi khuẩn TN3 được phân lập từ đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ có khả năng phân hủy 78,6% KClO<sub>3</sub> (100 ppm) 7 ngày nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung glucose (2000 ppm). Như vậy, 2 dòng vi khuẩn CR10 và CR8 được phân lập từ đất trồng nhãn ở quận Cái Răng có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> hiệu quả hơn. Sự khác nhau về khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> có thể do các dòng vi khuẩn được phân lập từ hai vùng trồng nhãn khác nhau đã được tiếp xúc với KClO<sub>3</sub> với thời gian và nồng độ không giống nhau. Ngoài ra, các dòng vi khuẩn phân lập có thể thuộc các loài khác nhau nên khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của chúng cũng khác nhau.

Nhìn chung các dòng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm) có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> cao hơn so với môi trường chỉ có KClO<sub>3</sub>. Khi so sánh 3 dòng vi khuẩn phân hủy KClO<sub>3</sub> hiệu quả gồm CR8, CR10 và CR51 cho thấy hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> của các dòng vi khuẩn này cao hơn khi môi trường được bổ sung glucose, tương ứng đạt 97,4%; 99,8% và 96,1% (Hình 3), trong môi trường không bổ sung glucose, hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> lần lượt là 78,4%; 83,3% và 91,4% (Hình 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sutigoolabud et al. (2004) cho thấy mẫu đất được bổ sung glucose ở nồng độ từ 10 g/kg đất (10.000 ppm) giúp cho lượng KClO<sub>3</sub> tồn dư trong đất (341 ppm) được vi sinh vật đất phân hủy nhanh hơn, KClO<sub>3</sub> được phân hủy gần

như hoàn toàn trong 4 tuần khảo sát khi so với mẫu đất đối chứng không bổ sung glucose. Điều này có thể do glucose là nguồn carbon hữu dụng giúp gia tăng sinh khối của vi khuẩn dẫn đến tăng hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub>.

### 3.3 Khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của vi khuẩn trong đất

Khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> của 7 dòng vi khuẩn trong môi trường đất đã khử trùng có bổ sung KClO<sub>3</sub> (375 ppm) và glucose (750 ppm) trong 9 ngày được trình bày trong Hình 4. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn đều có hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> tăng trong thời gian khảo sát. Trong đó, dòng CR10 và CR3 phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, tương ứng với hiệu suất 33,9% và 33,3% sau một ngày nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng còn lại. Đến ngày thứ 3, dòng CR3 phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, đạt 78,4%. Sau 5 ngày, hiệu suất phân hủy đạt trên 80% ở 2 dòng vi khuẩn CR10 và CR3 (88,7% và 80% tương ứng). Hiệu suất phân hủy của 2 dòng vi khuẩn này tiếp tục tăng cao đến ngày thứ 7. Đặc biệt đến ngày thứ 9, dòng vi khuẩn CR10 và CR8 có hiệu quả phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, đạt 94,4% và 93,7%, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng khác ở cùng thời điểm. Dòng CR84 có hiệu suất phân hủy thấp nhất (68,8%), kể đến là dòng CR48 (78,9%) và CR51 (81,3%) khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với các dòng còn lại. Hai dòng CR3 và CR45 không khác biệt về hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub>.



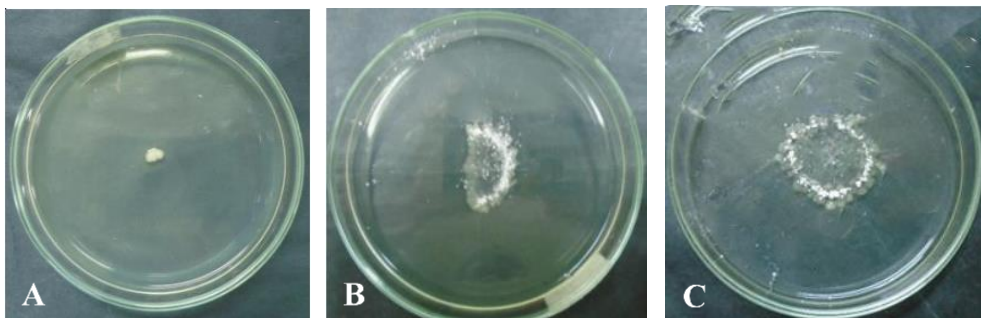
**Hình 4: Hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> của các dòng vi khuẩn trong đất có bổ sung KClO<sub>3</sub> (375 ppm) và glucose (750 ppm) theo thời gian**

Các giá trị trung bình trong cùng một ngày theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% (n=3, độ lệch chuẩn)

**3.4 Khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub> của vi khuẩn**

Hai dòng vi khuẩn CR8 và CR10 có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất nên được tuyển chọn để khảo sát khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub>. Kết quả khảo sát cho thấy dòng CR8 có khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub> do dòng vi khuẩn này tạo

sinh khối về phía vị trí có bổ sung KClO<sub>3</sub> (Hình 5). Ngược lại, ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung KClO<sub>3</sub>, vi khuẩn CR8 chỉ tạo sinh khối ngay tại vị trí chủng ban đầu (Hình 5A). Dòng vi khuẩn CR8 thể hiện sự tạo sinh khối hướng về vị trí bổ sung KClO<sub>3</sub> ở hai nghiệm thức bổ sung KClO<sub>3</sub> ở nửa vòng tròn (Hình 5B) và cả vòng tròn (Hình 5C) quanh vị trí chủng vi khuẩn.



**Hình 5: Hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub> của dòng vi khuẩn CR8**

- A. Môi trường MM không bổ sung KClO<sub>3</sub>, có chủng vi khuẩn.
- B. Môi trường MM bổ sung KClO<sub>3</sub> ở nửa vòng tròn, có chủng vi khuẩn.
- C. Môi trường MM bổ sung KClO<sub>3</sub> ở cả vòng tròn, có chủng vi khuẩn.

Trong đất, các hợp chất hóa học thường phân bố không đồng đều và bám vào các phân tử đất làm cho vi sinh vật khó tiếp xúc và phân hủy, do đó khả năng di chuyển theo một hợp chất hóa học nào đó (hóa hướng động) là đặc điểm thuận lợi giúp vi khuẩn

phát hiện và di chuyển đến hợp chất này để phân hủy (Grimm and Harwood, 1997). Theo Pandey and Jain (2002), các vi khuẩn có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ ô nhiễm khác nhau như hydrocarbon một vòng và đa vòng thơm, alkan, nitroaromatics,

và các thuốc trừ sâu gốc chlor cũng thể hiện khả năng hóa hướng động theo các chất này. Chẳng hạn, Bijdekerke (2004) và Sniegowski (2005) đã phân lập được vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* E1, *Pseudomonas* sp. E7 và *Novosphingobium subarcticum* E6 có khả năng phân hủy và hóa hướng động theo hydrocarbon đa vòng thơm phenanthrene. Vi khuẩn *Novosphingobium* sp. KN65.2 có khả năng hóa hướng động theo thuốc diệt côn trùng carbofuran cũng có khả năng phân hủy hiệu quả carbofuran (Nguyen *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn CR8 vừa có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> cao trong môi trường có bổ sung glucose vừa có khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub> nên CR8 là dòng vi khuẩn tiềm năng có thể được sử dụng cho các nghiên cứu ứng dụng để xử lý KClO<sub>3</sub> trong đất.

### 3.5 Định danh vi khuẩn

Kết quả phân tích trình tự gen cho thấy gen 16S-rRNA của dòng vi khuẩn CR8 tương đồng 98% với gen tương ứng của dòng *Enterobacter cloacae* MC4 (accession number KX268122.1) do đó dòng vi khuẩn CR8 thuộc chi *Enterobacter* và được định danh là *Enterobacter* sp. CR8. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ridley *et al.* (2006) về enzyme phân giải nitrate được ly trích từ màng tế bào của vi khuẩn *Enterobacter cloacae* dòng SLD1a-1 cũng có khả năng phân hủy hợp chất chlorate.

## 4 KẾT LUẬN

Từ mẫu đất thu ở vườn trồng nhãn khu vực Khánh Hưng, phường Phú Thứ, quận Cái Răng, Cần Thơ, 14 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy KClO<sub>3</sub> đã được phân lập trong đó 7 dòng vi khuẩn có khả năng tạo sinh khối cao trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> (100 ppm) và glucose (2000 ppm). Trong môi trường MM có bổ sung KClO<sub>3</sub> và glucose, hiệu suất phân hủy KClO<sub>3</sub> của vi khuẩn cao hơn so với môi trường chỉ có KClO<sub>3</sub>. Dòng CR8 và CR10 phân hủy KClO<sub>3</sub> cao nhất, đạt 97,4% và 99,8% sau 7 ngày nuôi cấy. Trong môi trường đất đã khử trùng có bổ sung KClO<sub>3</sub> (375 ppm) và glucose (750 ppm), 2 dòng vi khuẩn CR8 và CR10 cũng phân hủy KClO<sub>3</sub> cao hơn các dòng vi khuẩn còn lại, đạt 93,7% và 94,4% sau 9 ngày nuôi cấy. Dòng vi khuẩn CR8 có khả năng hóa hướng động theo KClO<sub>3</sub> và được định danh là *Enterobacter* sp. CR8.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bijdekerke, K., 2004. Pollutant driven motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria in soil. Master Thesis. Laboratory for Soil and Water Management and

Centre of Microbial and Plant Genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, KU Leuven.

Bộ Nông nghiệp và Phát Triển Nông Thôn - Cục Trồng Trọt, 2008. Báo cáo hiện trạng và giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn quả các tỉnh phía Nam trong thời gian tới. Hội nghị đánh giá hiện trạng và bản giải pháp phát triển sản xuất, tiêu thụ cây ăn quả các tỉnh phía Nam, tr 138-157.

Breugelmans, P. and Uyttendaele, M., 2004. Protocol for DNA extraction and purification. Laboratory of soil and water management, KU Leuven, Belgium.

Chiswell, B. and Keller-Lehmann, B., 1993. Spectrophotometric method for the determination of chlorite and chlorate. *Analyst*. 118: 1457-1459.

Grimm, A.C. and Harwood, C.S., 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 4111-4115.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In: Goodfellow, M., Stackebrandt, E. (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Lê Văn Chấn, 2008. Ảnh hưởng của liều lượng chlorate kali, biện pháp khoan cành và liều lượng phân đạm bón sau thu hoạch lên sự ra hoa sớm nhãn Xuông Cơm Vàng (*Dimocarpus longan* L.) tại huyện Châu Thành - tỉnh Đồng Tháp. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ.

Malmqvist, A., Wellander, T., Moore, E., Ternstrom, A., Molin, G.L., Stenstrom, M., 1994. *Ideonella dechloratans* gen. nov., sp. nov., a new bacterium capable of growing anaerobically with chlorate as an electron acceptor. *Systematic and Applied Microbiology*. 17(1): 58-64

Manochai, P., Srumsiri, P., Wiriya-Alongkorn, W., Naphrom, D., Hegele, M. and Bangerth, F., 2005. Year around off-season flower induction in longan trees by KClO<sub>3</sub> application: potentials and problems. *Scientia Horticulturae*, 104(4): 379-390.

Nguyen, T.P.O., Helbling, D.E., Bers, K., Fida, T.T., Wattiez, R., Kohler, H.P.E., Springael, D., De Mot, R., 2014. Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65.2. *Applied Microbiology Biotechnology*. 98(19): 8235-8252.

Ongprasert, S., Sutikoolabud, P. and Aumtong, S., 2002. The impact of application of chlorates in longan plantations on the environment and the remedy. Symposium no. 42, paper no. 1191. 17<sup>th</sup> WCSS, 14-21 August 2002, Thailand.

Pandey, G. and Jain, R.K., 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12), 5789-5795.



- Reubi, F.C., 1978. Pathogenesis and renal function in acute toxic nephropathies. *Contributions to Nephrology*. 10: 1-14.
- Ridley, H., Watts, C.A., Richardson, D.J. and Butler, C.S., 2006. Resolution of distinct membrane-bound enzymes from *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 that are responsible for selective reduction of nitrate and selenate oxyanions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8): 5173-5180.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sniegowski, K., 2005. Motility of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading bacteria in soil: role of chemotaxis. Master Thesis. Laboratory for Soil and Water Management and Centre of Microbial and Plant Genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, KU Leuven.
- Sutigoolabud, P., Senoo, K., Ongprasert, S. *et al.*, 2004. Decontamination of chlorate in longan plantation soils by bio-stimulation with sugar amendment. *Soil Science and Plant Nutrition*. 50(2): 249-256.
- Trần Thị Diệu Nguyên, Nguyễn Thị Quỳnh Anh và Nguyễn Thị Phi Oanh, 2017. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy chlorate kali từ đất trồng nhãn ở quận Thốt Nốt, Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 53a: 65-73.
- Trần Văn Hậu và Lê Văn Chấn, 2009. Ảnh hưởng của chlorate kali và biện pháp khoan canh đến sự ra hoa và năng suất nhãn Xuồng Com Vàng (*Dimocarpus longan* Lour.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 11a: 432-441.
- Weelink, S.A., Tan, N.C., ten Broeke, H. *et al.*, 2008. Isolation and characterization of *Alicyclophilus denitrificans* strain BC which grows on benzene with chlorate as the electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(21): 6672-6681.
- Wiwatanadate, P., Voravong, R., Mahawana, T., and Saraprug, D., 2001. Health effects of potassium chlorate-exposed longan drying factory workers. *Chiang Mai Medical Journal*. 40(4): 173-176.
- Wolterink, A., Kim, S., Muusse, M. *et al.*, 2005. *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 2063-2068.