

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐẤT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT CƠ PHOSPHO

LÊ THỊ HUỆ ⁽¹⁾, HOÀNG QUANG CƯỜNG ⁽¹⁾,
ĐINH THỊ THU TRANG ⁽¹⁾, VÕ THỊ HOÀI THU ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hợp chất cơ phospho (organophosphorus compounds - OPs) là nhóm các hợp chất hữu cơ chứa phospho, thường gặp là este của axit photphoric. OPs gây bất hoạt một họ enzyme lớn serine hydrolase (lipase và esterase), trong đó có một enzyme rất quan trọng - acetylcholinesterase (AChE). Độc tính cấp của OPs do ức chế không thuận nghịch enzyme AChE trong các tế bào thần kinh, ngăn cản AChE phân giải acetylcholin dẫn tới tích tụ acetylcholin, gây rối loạn quá trình truyền xung thần kinh, rối loạn chức năng của cơ và suy hô hấp dẫn đến hôn mê và tử vong [1]. Thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) OPs (methyl parathion - MP, parathion, diazinon, chlorpyrifos - CP,...) có hiệu quả cao, giúp bảo vệ các loài thực vật khỏi côn trùng gây hại trong vài ngày hoặc vài tuần. Trong suốt nhiều thập kỷ, thuốc BVTV OPs đã rất phổ biến cả về số lượng và thị phần trên toàn thế giới. Việc sử dụng quá nhiều OPs làm cho dư lượng thuốc bảo vệ thực vật bị rửa trôi vào nước hoặc thấm vào đất, không chỉ gây ô nhiễm đất, nước, mà còn ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến môi trường và sức khỏe con người.

Sự phân hủy của thuốc BVTV OPs thường là sự kết hợp của một số quá trình, bao gồm thủy phân hóa học và phân hủy vi sinh, đồng thời cũng bị ảnh hưởng bởi một số đặc tính hóa lý như pH, cacbon hữu cơ và độ ẩm. Tuy nhiên, phân hủy sinh học là cơ chế chính để phân hủy và khử độc thuốc BVTV trong nhiều loại đất [2]. Các sản phẩm phân hủy của diazinon bao gồm diazoxon và 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxypyrimidin (IMHP or oxypyrimidin) [3] hay p-nitrophenol - sản phẩm phân hủy của methyl parathion và parathion là các sản phẩm ít độc hơn và vi sinh vật cũng có thể phân hủy tiếp các sản phẩm đó [1].

Hiện nay, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã công bố trong đất có các vi sinh vật có khả năng phân hủy OPs thuộc các chi như *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Athrobacter*, *Plesiomonas*, ... [4]. Cycoń công bố chủng *Serratia marcescens* có khả năng phân hủy CP, fenitrothion và parathion [5]. Ramu thông báo chủng *Pseudomonas aeruginosa* Is-6 có khả năng phân hủy cả acephate, dimethoate, parathion, MP, CP và malathion [6]. Deng công bố chủng *Stenotrophomonas* sp. G1 có khả năng phân hủy MP, methyl paraoxon, diazinon, phoxim, parathion, CP, profenofos, triazophos; *Pseudomonas* sp. WBC-3 có khả năng phân hủy MP, CP, ethyl parathion và sumithion [7]. Đặc biệt các chủng *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 và *P. diminuta* MG chứa gen opd mã hóa enzym Organophosphoruse hydrolase (OPH, EC 3.1.8.1) thủy phân mạnh nhiều loại thuốc BVTV OPs và cả các tác nhân chiến tranh hóa học (Chemical Warfare Agents) như Sarin, Soman [8].

Sử dụng vi sinh vật phân hủy các loại thuốc BVTV là biện pháp phân hủy sinh học có nhiều tiềm năng, an toàn và thân thiện với môi trường. Mục đích của nghiên cứu này nhằm phân lập, sàng lọc ra một số vi khuẩn đất có khả năng phân hủy thuốc BVTV OPs.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu, hóa chất

55 mẫu đất được thu thập từ các vùng đất nông nghiệp ở Hà Nội, Hà Nam, Thái Bình, Nam Định và mẫu đất trong kho thuốc BVTV cũ ở Hà Nam (bảng 1).

Địa điểm lấy mẫu		Số mẫu đất
Hà Nội	Đất trồng lúa	8
	Đất trồng hoa màu	3
Thái Bình	Đất trồng lúa	7
	Đất trồng hoa màu	2
Nam Định	Đất trồng lúa	8
	Đất trồng hoa màu	5
Hà Nam	Đất trồng lúa	8
	Đất trồng hoa màu	5
	Đất kho thuốc BVTV cũ	3
	Nơi tập kết vỏ thuốc BVTV	2
Nghệ An	Đất kho thuốc BVTV cũ	4

Bảng 1. Địa điểm thu thập mẫu đất

Hóa chất: Methyl parathion (99%) - ký hiệu MP, chlorpyrifos (99%) - ký hiệu CP và diazinon (99%) của Sigma-Aldrich.

Môi trường: MM (minimal medium, pH 7,0) [9], môi trường LB agar (Luria Bertani agar: Peptone 10g/L, Yeast Extract 5g/L, muối NaCl 10g/L).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Làm giàu và phân lập các chủng vi sinh vật

Cân 15g mẫu đất mỗi loại vào bình tam giác (250 ml) chứa 50 ml môi trường MM đã bổ sung diazinon nồng độ 50 mg/l và nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 30°C, trong 7 ngày. Sau đó, 2 ml dịch huyền phù được sử dụng để cấy vào bình tam giác môi trường MM mới chứa diazinon với nồng độ cuối 100 mg/l và nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 30°C, trong 7 ngày. Sau 3 lần cấy chuyển tương tự, nồng độ diazinon được nâng dần lên 200 mg/l, 300 mg/l và 500 mg/l. Ở lần cấy chuyển cuối cùng, lấy 100 µl dung dịch nuôi cấy pha loãng 10 lần và trải 100 µl trên đĩa thạch MM chứa 200 mg/l diazinon, ủ 3 ngày ở 30°C. Các khuẩn lạc đơn lẻ được chọn để cấy chuyển trên đĩa thạch MM chứa 200 mg/l diazinon mới cho đến khi thu được chủng thuần khiết.

2.2.2. Khảo sát khả năng phân hủy OPs của các chủng phân lập

Các chủng thuần khiết được nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 10 ml môi trường MM chứa 0,5% glucose. Sau 18-20 giờ, tế bào được thu bằng cách ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, sau đó rửa ba lần bằng nước cất vô trùng và trộn đều trong 2 ml nước cất vô trùng. Bổ sung khoảng 1,3 ml dịch tế bào vào các bình 30 ml môi trường MM có chứa 50 mg/l OP để mật độ tế bào cuối cùng đạt $OD_{600} = 0,5$ và nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 14 ngày. Chuẩn bị bình đối chứng tương tự nhưng không chứa vi khuẩn.

Dịch nuôi cấy được chiết trong hỗn hợp dung môi 2 toluen : 1 acetone (v:v) theo tỷ lệ 2 mẫu : 5 dung môi (v:v), lắc 200 vòng/phút, ở 30°C, trong 1 giờ sau đó ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch pha trên chứa OP để đánh giá. Sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography-TLC) được tiến hành với lượng mỗi mẫu 50 μ l. Sử dụng bản mỏng silica gel 60 F254 của Merck, độ dày 0,25 mm làm pha tĩnh, pha động là hệ dung môi 4 n-hexan: 1 acetone (v:v) [10]. Bản TLC được hiện màu dưới đèn UV bước sóng 254 nm.

2.2.3. Định danh vi khuẩn

Kỹ thuật nhuộm Gram sử dụng bộ nhuộm Gram của hãng Liofilchem; quan sát hình thái, đo kích thước tế bào dưới kính hiển vi quang học Axiocam 503 color (Imager.Z2) 100x; thử nghiệm catalase sử dụng dung dịch H_2O_2 3%; thử nghiệm oxidase trên đĩa giấy có tẩm 1% tetramethyl-p-phenylenediamin hydrochlorid.

Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen mã hóa 16S rRNA: Tách chiết DNA từ vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGAC TT-3') [11]. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen - Đức) và giải trình tự tại hãng FirstBase. Trình tự thu được so sánh với các dữ liệu gen tương ứng NCBI GenBank bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

2.2.4. Đánh giá khả năng phân hủy diazinon bằng phương pháp GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometer)

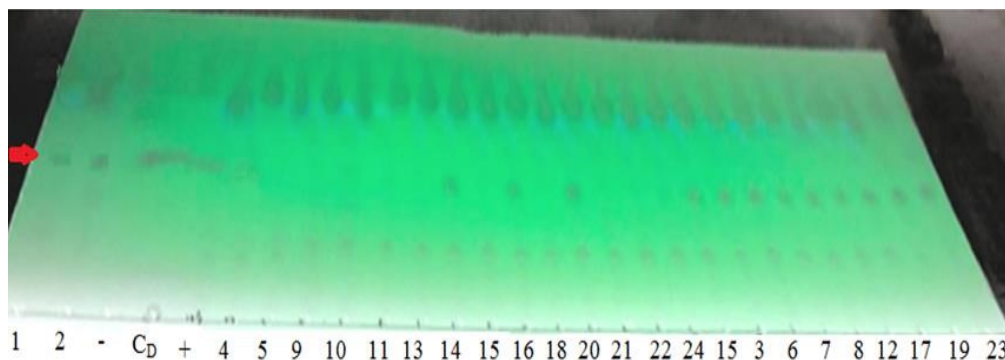
Dịch nuôi cấy chủng chọn lọc được thu theo thời gian và bổ sung acetonitril với tỷ lệ 2 mẫu : 8 acetonitril (v:v), trộn đều, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ cặn và lọc qua màng 0,22 μ m. Thu dịch sau lọc để xác định diazinon trên hệ thống GC-MS Thermo Scientific™ ISQ™ 7000 Single Quadrupole [12].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá sơ bộ khả năng phân hủy diazinon của các chủng phân lập

Hiện nay có các nghiên cứu phân tích mẫu OPs bằng kỹ thuật TLC như: Sherma (phân tích azinphos- ethyl, diazinon, ethyl parathion, malathion, MP,...) [10]; Islam (CP) [13]; Le (đánh giá khả năng phân hủy MP, diazinon) [12]; Pawar (profenofos) [14]. TLC là kỹ thuật thuận tiện, dễ dàng và linh hoạt cho phép phân tích định tính một số lượng lớn các chất hóa học, ma túy và thuốc BVTV [14].

Từ 55 mẫu đất thu thập ở các khu vực khảo sát đã phân lập được 24 chủng vi sinh (dựa vào đặc điểm khuẩn lạc) có khả năng sử dụng diazinon làm nguồn cacbon duy nhất. Các chủng sau phân lập được nuôi cấy và đánh giá sơ bộ khả năng phân hủy diazinon bằng kỹ thuật TLC (hình 1).



Hình 1. Khả năng sử dụng diazinon làm nguồn cacbon duy nhất của 24 chủng vi khuẩn

Ghi chú: “-” : môi trường MM; “+” : môi trường MM có bổ sung diazinon;
C_D: diazinon chuẩn, 1-24 (chủng OP1-24).

Kết quả thu được 9 chủng vi khuẩn OP5, OP9, OP10, OP11, OP13, OP15, OP18, OP21, OP22 không xuất hiện băng R_f ngang chuẩn C_D chứng tỏ các chủng này có khả năng phân hủy diazinon và đã sử dụng diazinon làm nguồn cacbon duy nhất (hình 1). 9 chủng trên được lựa chọn để đánh giá khả năng phân hủy các loại OPs khác nhau.

3.2. Khảo sát khả năng phân hủy MP, CP của các chủng tuyển chọn

9 chủng OP5, OP9, OP10, OP11, OP13, OP15, OP18, OP21, OP22 được nuôi cấy trong môi trường MM chứa MP hoặc CP 50 mg/l. Sau 14 ngày thu dịch nuôi cấy để chiết và sử dụng TLC để đánh giá sơ bộ khả năng phân hủy MP và CP.

Bảng 2. Khảo sát khả năng sử dụng MP và CP làm nguồn cacbon duy nhất của 9 chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật TLC

Kí hiệu chủng	Độ đậm của băng R _f ngang chuẩn		Kí hiệu chủng	Độ đậm của băng R _f ngang chuẩn	
	MP	CP		MP	CP
Đối chứng	++	++	OP13	+	-
OP5	++	-	OP15	+	-
OP9	+	-	OP18	++	-
OP10	+	-	OP21	++	+
OP11	+	-	OP22	++	+

Ghi chú: Kí hiệu dựa vào độ đậm màu của băng R_f ngang chuẩn OP:

++, +, - tương ứng với đậm màu, nhạt màu và không xuất hiện băng.

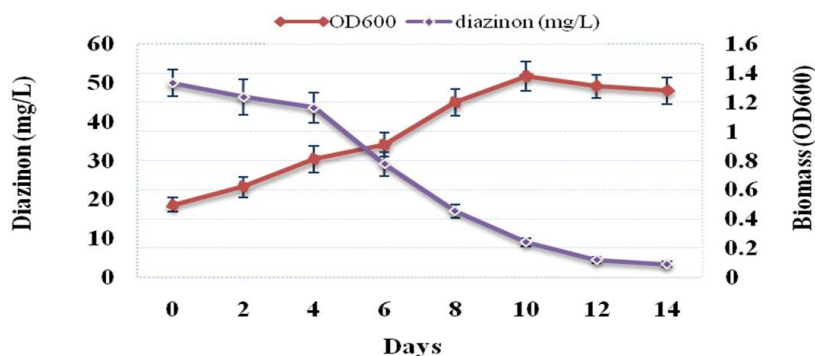
Kết quả khảo sát khả năng phân hủy MP của 9 chủng vi khuẩn được thể hiện trên bảng 2 cho thấy: 5 chủng OP9, OP10, OP11, OP13, OP15 có băng Rf ngang chuẩn MP nhạt màu hơn so với ở đối chứng chứng tỏ 5 chủng này có khả năng phân hủy MP và đã sử dụng MP làm nguồn cacbon duy nhất. Kết quả trên bảng 2 cũng chỉ ra: 7 chủng OP5, OP9, OP10, OP11, OP13, OP15, OP18 không thấy xuất hiện băng Rf ngang chuẩn CP trong khi 2 chủng OP21 và OP22 xuất hiện băng nhưng nhạt màu hơn mẫu đối chứng. Minh chứng thực nghiệm này chứng tỏ 7 chủng OP5, OP9, OP10, OP11, OP13, OP15, OP18 có khả năng phân hủy CP và đã sử dụng CP làm nguồn cacbon duy nhất.

Qua các kết quả phân tích ở trên cho thấy: 5 chủng OP9, OP10, OP11, OP13 và OP15 có khả năng phân hủy và sử dụng được cả 3 loại thuốc BVTV nhóm OPs làm nguồn cacbon duy nhất. Các nghiên cứu quốc tế về các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy nhiều loại OPs như: chủng *S. marcescens* (phân hủy diazinon, CP, fenitrothion và parathion) [5]; chủng *P. aeruginosa* Is-6 (acephate, dimethoate, parathion, MP, CP và malathion) [6]; chủng *Stenotrophomonas* sp. G1 (MP, methyl paraoxon, diazinon, phoxim; parathion, CP, profenofos và triazophos) [7],... Ở Việt Nam chỉ có một số công bố về vi khuẩn đất có khả năng phân hủy 1 loại thuốc BVTV OP [15, 16, 17]. Trước đó chúng tôi cũng đã phân lập được 5 chủng có khả năng phân hủy MP, 5 chủng có khả năng phân hủy diazinon trong đó có 2 chủng có khả năng phân hủy cả MP và diazinon (*Klebsiella variicola* P9 và *Priestia aryabhattai* H14) [12].

Chủng vi khuẩn OP15 có khả năng phân hủy tốt cả 3 loại thuốc BVTV (MP, CP, diazinon) và sinh trưởng tốt trên cả 3 đĩa môi trường MM agar bổ sung MP, CP, diazinon 300 mg/l được lựa chọn để làm sáng tỏ khả năng phân hủy dianizon và cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn OP15.

3.3. Khả năng phân hủy diazinon của chủng vi khuẩn OP15 xác định bằng GC-MS

Chủng OP15 được nuôi lác trong 30 ml môi trường MM có chứa 50 mg/l diazinon và được lấy mẫu theo thời gian để xác định mức độ sinh trưởng (OD₆₀₀) và định lượng hiệu suất phân hủy diazinon bằng GC-MS.

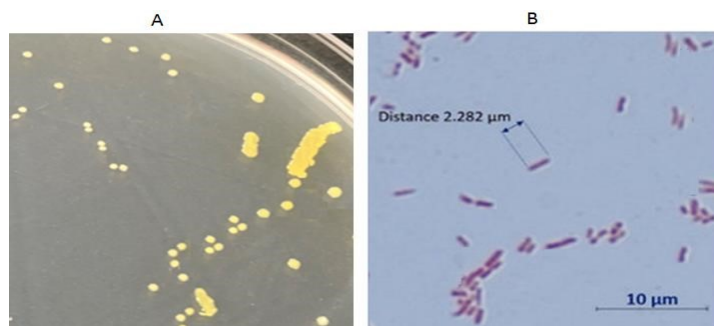


Hình 2. Quá trình sinh trưởng và sự phân hủy diazinon của chủng OP15

Kết quả phân tích trên hình 2 cho thấy chủng OP15 sinh trưởng đạt tối đa sau 10 ngày nuôi lắc ($OD_{600} = 1,38$). Sau 4; 8; 12 và 14 ngày nuôi cấy hàm lượng diazinon đã giảm từ 50mg/l xuống tương ứng còn 43,7; 17,1; 4,51 và 3,43 mg/l đồng nghĩa với chủng OP15 đã phân hủy lần lượt được 12,6%; 65,8%; 90,98% và 93,14% diazinon. Kết quả phân tích GC-MS của chủng OP15 cho thấy hiệu quả phân hủy diazinon của chủng vi khuẩn cao hơn đáng kể so với công bố của tác giả Nguyễn Văn Lệ (10 nhóm vi khuẩn phân hủy 14,3 - 37,9% diazinon 20 ppm sau 14 ngày) [17]; của Mahiuddin (*Pseudomonas peli* BG1, *Burkholderia caryophylli* BG4 và *Brevundimonas diminuta* PD6 phân hủy hết 20 mg/l diazinon sau 12 ngày) [2]. Tuy nhiên, hiệu quả phân hủy diazinon của chủng OP15 vẫn thấp hơn công bố của Abo-Amer (chủng DI101 phân hủy hoàn toàn 50 mg/l diazinon sau 11 ngày) [3] và của Deng (chủng *Stenotrophomonas* sp. G1 phân hủy 100% diazinon (50 mg/l) sau 24 giờ [7].

3.4. Định danh chủng vi khuẩn OP15

Chủng vi khuẩn OP15 được lựa chọn để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tử để định danh chủng.



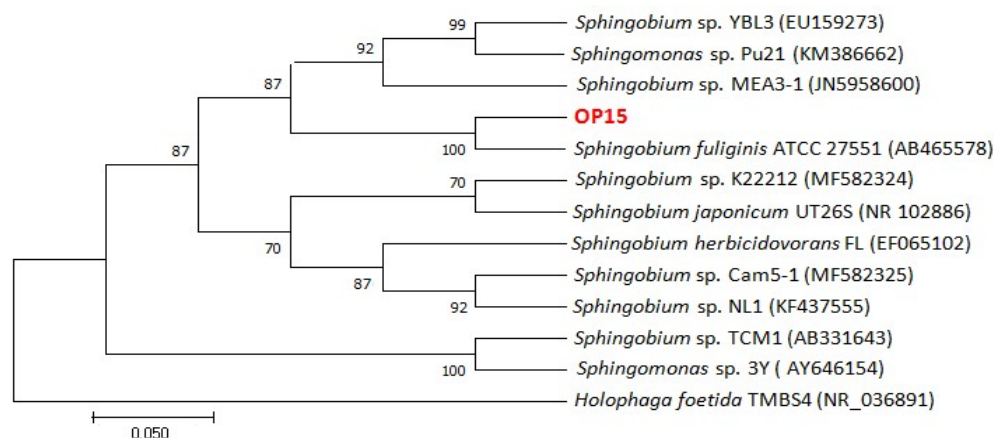
Hình 3. Hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch LB sau 3 ngày nuôi cấy (A) và hình thái tế bào sau nhuộm Gram dưới kính hiển vi (100 x) (B) của chủng vi khuẩn OP15

Nghiên cứu cho thấy chủng OP15 là vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch LB hình tròn, màu vàng, bề mặt nhẵn, tế bào hình que (rộng 0,5 µm, dài 1,5-2,3 µm) (hình 3). Thử nghiệm oxidase và catalase của chủng vi khuẩn đều cho kết quả dương tính.

Gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn OP15 được giải trình tự với độ dài 1420 bp. Cây phát sinh chủng loại đã được xây dựng dựa trên các dữ liệu tương ứng của vi khuẩn trên GenBank quốc tế (hình 4).

Trình tự gen 16S rRNA của chủng OP15 tương đồng cao nhất 99,58% với chủng *Sphingobium fuliginis* ATCC 27551 (tên cũ là *Flavobacterium* sp. ATCC 27551) và được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số MZ637486. Kết hợp với so sánh các đặc tính hình thái và một số đặc điểm sinh hóa chứng tỏ chủng vi khuẩn OP15 thuộc chi *Sphingobium* và được đặt tên là *Sphingobium* sp. OP15. Một số đại diện thuộc chi *Sphingobium* cũng được công bố có khả năng phân hủy OPs như:

chủng *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 (sau phân loại lại đổi tên thành *Sphingobium fuliginis* ATCC 27551) có khả năng thủy phân nhiều loại thuốc BVTV nhóm OPs như: diazinon, parathion, MP, fenitrothion [18], và có thể phân hủy hoàn toàn 10 mg/l CP trong môi trường MM sau 48h [19]. Enzyme OPH từ chủng ATCC 27551 có khả năng thủy phân nhiều loại OPs như phosphothioeste và phosphoflorua, bao gồm cả DFP và vũ khí hóa học như Sarin và Soman và là enzym duy nhất có thể thủy phân liên kết P-S trong OPs [8]. Ahn công bố chủng *Sphingobium* sp. K22212 và *Sphingobium* sp. Cam5-1 phân hủy hoàn toàn 100 mg/l cadusafos lần lượt sau 7 giờ và 12 giờ; phân hủy hơn 50% ethoprophos, phenthoate và phorate (25 mg/l) mà không phân hủy được CP và diazinon sau 7 ngày nuôi cấy [20]. Chủng *Sphingobium* sp. TCM1 và *Sphingomonas* sp. TDK1 có khả năng phân hủy các OPs: haloalkyl phosphate, Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate) và Tris(2-chloroethyl)phosphate [21].



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự gen 16S rRNA của chủng OP15 và các chủng liên quan trên GenBank bằng phần mềm MEGA X

4. KẾT LUẬN

- Từ 55 mẫu đất thu thập đã phân lập được 24 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường muối khoáng chứa diazinon là nguồn cacbon duy nhất; kết quả sàng lọc được 9 chủng có khả năng phân hủy diazinon, trong đó 5 chủng OP9, OP10, OP11, OP13 và OP15 có khả năng phân hủy và sử dụng cả 3 loại OPs là methyl parathion, diazinon, chlorpyrifos làm nguồn cacbon duy nhất;

- Chủng OP15 được xác định là *Sphingobium* sp. OP15, sinh trưởng đạt mức cao nhất là $OD_{600} = 1,38$ sau 10 ngày nuôi cấy trong môi trường MM chứa diazinon 50mg/l, ở 30°C, và phân hủy đạt 93,14% sau 14 ngày nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với nguồn kinh phí hỗ trợ từ đề tài “Nghiên cứu tạo và đánh giá khả năng phân giải chất độc cơ phospho của chế phẩm enzyme OPH (*Organophosphorus Hydrolase*) có nguồn gốc từ vi sinh vật”, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pakala S.B., Gorla P., Pinjari A.B., Krovdi R.K., Baru R., Yanamandra M., Merrick M. and Siddavattam D., *Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative Serratia sp. strain DS001*, Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **73**(6):62-1452.
2. Mahiudddin M., Fakhruddin A.N.M., Abdullah-Al-Mahin, Chowdhury M.A.Z., Rahman M.A., Alam M.K., *Degradation of the organophosphorus insecticide diazinon by soil bacterial isolate*, Int. J. Biotechnol, 2014, **3**(1):12-23.
3. Abo-Amer A., *Biodegradation of diazinon by Serratia marcescens DII01 and its use in bioremediation of contaminated environment*, J Microbiol Biotechnol, 2011, **21**(1):71-80.
4. Kumar S., Kaushik G., Dar M.A., Nimesh S., Lopez-Chuken U.J., Villarreal Chiu J.F., *Microbial degradation of organophosphate pesticides: a review*, Pedosphere, 2018, **28**(2):190-208.
5. Cycoń M., Żmijowska A., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z., *Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading Serratia marcescens to remove other organophosphorus pesticides from soils*, J. Environ Manage, 2013, **117**:7-16.
6. Ramu S., Seetharaman B., *Biodegradation of acephate and methamidophos by a soil bacterium Pseudomonas aeruginosa strain Is-69*, J. Environ. Sci. Health B., 2014, **49**(1):23-34.
7. Deng S., Chen Y., Wang D., Shi T., Wu X., Ma X., Li X., Hua R., Tang X., and Li Q.X., *Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by Stenotrophomonas sp. G1*, J. Hazard Mater, 2015, **297**:17-24.
8. Firozjaei S.A.A., Latifi A.M., Khodi S., Abolmaali S., and Choopani A., *A review on biodegradation of toxic organophosphate compounds*, JABR, 2015, **2**(2):215-224.
9. Chaudhry G.R., Ali A.N., Wheeler W.B., *Isolation of a methyl parathion-degrading Pseudomonas sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a Flavobacterium sp.*, Appl Environ Microbiol, 1988, **54**(2):288-93.
10. Sherma J. and Bretschneider W., *Determination of organophosphorus insecticides in water by C-18 solid phase extraction and quantitative TLC*, Journal of Liquid Chromatography, 1990, **13**(10):1983-1989.
11. Miller C.S., Handley K., Wrighton K.C., Frischkorn K.R., Thomas B.C., Banfield J.F., *Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments*, PloS one, 2013, **8**(2):e56018.

12. Le T.H., Hoang Q.C., Vu D.D., and Vo T.H.T, *Biodegradation of organophosphorus insecticide methyl parathion by soil microorganisms*, E3S Web of Conferences, 2021, **265** (<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202126503002>).
13. Islam S.M.A., Math R.K., Cho K.M., Lim W.J., Hong S.Y., Kim J.M., Yun M.G., Cho J.J., Yun, *Organophosphorus hydrolase (OpdB) of Lactobacillus brevis WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides*, J Agric Food Chem., 2010, **58**(9):5380-6.
14. Pawar U.D., Pawar C.D., Kulkarni U.K., and Pardeshi R.K., *Development method of high-performance thin-layer chromatographic detection of synthetic organophosphate insecticide profenofos in visceral samples*, JPC-J Planar Chromat., 2020, **33**:203-206.
15. Hoang K.C., Le H.C., Tran T.H.H., Tran H.Q., Nguyen T.H., Luong H.T., Vu T.N., Le M.H., Tran T.N.H., *Ensiffer sp. CNN3 - an indigenous bacterial strain in Viet Nam has properties of plant growth promotion and organophosphorus degradation*, Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam, 2021, **59**(1):9-18.
16. Đoàn Thị Mộng Thắm, Trần Trung Hiếu, Lương Thị Mỹ Ngân, *Phân lập vi khuẩn phân giải chlorpyrifos từ đất nông nghiệp*, Tạp chí khoa học, Trường ĐHSP TP.HCM, 2017, **14**(12):127-138.
17. Nguyễn Văn Lạ, Đỗ Thị Xuân, Dương Minh Viễn, *Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy thuốc BVTV Diazinon trên đất chuyên màu ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long*, Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2015, **12**:56-61.
18. Adhya T.K., Barik S. and Sethunathan N., *Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacteria isolated from flooded soil*, J. Appl. Microbiol., 1981, **50**(1):167-172.
19. Mallick K., Bharati K., Banerji A., Shakil N.A. and Sethunathan N., *Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil*, Bull Environ Contam Toxicol., 1999, **62**(1):48-54.
20. Ahn J.H., Lee S.A., Kim S.J., You J., Han B.H., Weon H.Y., Lee S.W., *Biodegradation of organophosphorus insecticides with P-S bonds by two Sphingobium sp. strains*, Int Biodeterior Biodegradation, 2018, **132**:59-65.
21. Kera Y., Abe K., Kasai D., Fukuda M., Takahashi S., *Draft genome sequences of Sphingobium sp. strain TCM1 and Sphingomonas sp. strain TDK1, haloalkyl phosphate flame retardant- and plasticizer-degrading bacteria*, Genome Announc., 2016, **4**(4):e00668-16.

SUMMARY

ISOLATION AND SCREENING OF SOIL BACTERIA CAPABLE OF DEGRADING SOME ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES

For many decades, organophosphorus compounds (OPs) have been widely used all over the world for several purposes like chemical weapons, flame-retardants, ectoparasiticides and investigational new drugs, but mainly used in agriculture and indoors. However, they have high toxicity to animals and also to humans. Various methods have been used to detoxify these compounds. Among them, biodegradation is preferable, as this method is environmentally and produces less harmful substances. In this study, from the 55 soil samples collected from many places where pesticides were used, we isolated and obtained 9 bacterial strains capable of degrading OPs, of which 5 strains (OP9, OP10, OP11, OP13, OP15) are capable of using all three types of OPs (methyl parathion, diazinon, chlorpyrifos) as the sole carbon source. The OP15 strain has been identified as *Sphingobium* sp. OP15, and exhibited a remarkable diazinon degradability in the minimal medium with a reduction of 93.14% after 14 days of growing (initial diazinon concentration 50 mg/l). Research results open the possibility of applying these bacterial strains in OPs contaminated soil treatment.

Keywords: *Organophosphorus, biodegradation, TLC, GC-MS, phân hủy sinh học, hợp chất cơ phospho.*

Nhận bài ngày 20 tháng 5 năm 2021

Phản biện xong ngày 24 tháng 7 năm 2021

Hoàn thiện ngày 03 tháng 8 năm 2021

(¹) Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga