

Nghiên cứu đặc tính và khả năng phân hủy Chlopyrifos của hỗn hợp sinh học trong hệ thống đệm sinh học

Ngô Thị Tường Châu*, Lê Văn Thiện, Vũ Thị Thu, Đào Thị Thu Hoàn, Nguyễn Thu Trang, Lê Thị Thắm Hồng

*Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội*

Nhận ngày 30 tháng 9 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 06 tháng 11 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 11 năm 2017

Tóm tắt: Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xác định đặc tính lý- hóa học, sinh học và khả năng phân hủy Chlopyrifos tại các nhiệt độ và thời gian khác nhau của hỗn hợp sinh học được tạo ra. Kết quả cho thấy hỗn hợp sinh học ban đầu có độ trữ ẩm cực đại 60%, pH 7,85, hàm lượng carbon hữu cơ 20,35%, nitơ tổng số 1,26% và tỉ lệ C/N đạt 16,15. Hoạt độ enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp sinh học trước, sau 15 và 30 ngày ủ lần lượt là 45, 83 và 60 đơn vị/kg. Sau 15 ngày ủ, hỗn hợp sinh học có mật độ của các nhóm vi sinh vật (i) vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc lần lượt là $6,41 \times 10^8$; $6,4 \times 10^5$ và 10^6 CFU/g, (ii) phân hủy cellulose, hemi-cellulose và lignin tương ứng là $2,22 \times 10^4$; $3,45 \times 10^4$ và $4,22 \times 10^4$ CFU/g, và (iii) chỉ số hô hấp vi sinh vật là 323 mg CO₂/100 g. Hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học cao nhất đạt 96,62% tại nhiệt độ 37°C sau 30 ngày.

Từ khóa: Hỗn hợp sinh học, đệm sinh học, Chlopyrifos, hệ enzyme phân hủy lignin.

1. Đặt vấn đề

Đệm sinh học là một hệ thống đơn giản và chi phí thấp đã được phát triển nhằm mục đích thu gom và phân hủy dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) ngay tại đồng ruộng. Hệ thống đệm sinh học gồm ba phần chính: (i) lớp chống thấm ở đáy, (ii) hỗn hợp sinh học gồm đất bề mặt, rơm và than bùn, và (iii) lớp vỏ phủ trên bề mặt. Trong đó hỗn hợp sinh học được xem là phần quan trọng nhất của hệ thống đệm sinh học [1]. Đến năm 2016, đã có khoảng 36 nước trên thế giới áp dụng hệ thống đệm sinh

học vào xử lý dư lượng HCBVTV trong sản xuất nông nghiệp với thiết kế phù hợp điều kiện khí hậu, tập quán canh tác và đặc biệt là các nguồn nguyên liệu sẵn có tại mỗi nước [2]. Tuy vậy, vẫn chưa có một công trình nghiên cứu nào theo hướng này ở nước ta được ghi nhận trên thế giới. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm (i) tạo hỗn hợp sinh học với nguồn nguyên liệu sẵn có; (ii) xác định đặc tính lý- hóa học và sinh học của hỗn hợp sinh học tại các thời điểm ủ khác nhau và (iii) đánh giá khả năng phân hủy Chlopyrifos tại các nhiệt độ và thời gian khác nhau.

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-917691012.

Email: ngotuongchau@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4164>

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

(i) Hỗn hợp sinh học, và (ii) Chlorpyrifos thuộc nhóm lân hữu cơ. nấm trong danh mục HCBVTV được phép sử dụng tại nước ta (Thông tư 03/2016/TT-BNNPTNT).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị hỗn hợp sinh học

(i) Chuẩn bị nguyên liệu: đất mặt, than bùn được để khô trong không khí, đồng nhất mẫu bằng cách qua rây 3 mm; rơm được cắt nhỏ 2-3 cm; (ii) Phối trộn đất mặt: rơm: than bùn theo tỷ lệ 1:2:1 (khối lượng 2,5 kg); và (iii) Làm ẩm đến độ trữ ẩm cực đại 60%.

Thu mẫu và xác định các đặc tính lý-hóa học

Mẫu được lấy ở các vị trí khác nhau, trộn đều để tạo mẫu tổ hợp. Độ trữ ẩm cực đại được xác định theo phương pháp trọng lực. pH được đo bằng máy đo pH cực chọn lọc ion. Hàm lượng carbon (C) hữu cơ được xác định theo phương pháp Walkley- Black và nitơ (N) tổng số được xác định theo phương pháp Kjeldahl [3].

Xác định hoạt tính enzyme phân hủy lignin

Sử dụng thử nghiệm MBTH/DMAB được mô tả chi tiết ở Castillo và cs. (1994) [4]. Thử nghiệm được dựa trên sự oxy hóa cặp đôi 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) và 3-(dimethylamino) benzoic acid (DMAB). Hệ enzyme phân hủy lignin xúc tác hình thành một hợp chất có màu tím đậm với một độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 590 nm trong sự có mặt của MBTH, DMAB và $MnSO_4$. Phản ứng được khởi đầu bằng việc thêm vào dung dịch H_2O_2 .

Xác định số lượng vi sinh vật

Sử dụng phương pháp pha loãng và đếm số lượng vi sinh vật trên các đĩa thạch chứa môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp: (i) vi khuẩn trên môi trường thạch-cao thịt-pepton, ở 30°C, 2-3 ngày; (ii) xạ khuẩn trên môi trường

Gause I, ở 30°C trong 5-7 ngày; (iii) nấm mốc trên môi trường PDA, ở 30°C trong 3-5 ngày; và (iii) vi sinh vật phân hủy cellulose, hemicellulose và lignin lần lượt trên các môi trường muối khoáng tối thiểu có bổ sung (0,1%) carboxymethylcellulose (CMC), xylan và lignin, ở 30°C trong 3-5 ngày.

Xác định hô hấp vi sinh vật

Dựa vào lượng khí CO_2 sinh ra trong quá trình ủ mẫu hỗn hợp sinh học sử dụng phương pháp bẫy kiềm (alkaline trap method) theo Thompson (2002) [5].

Xác định khả năng phân hủy Chlorpyrifos

Chlorpyrifos được phun vào hỗn hợp sinh học với hàm lượng 10 $\mu g/g$ và đặt tại các nhiệt độ 25°C và 37°C trong 30 ngày. Mẫu được lấy sau 15 và 30 ngày bổ sung Chlorpyrifos. Lượng Chlorpyrifos còn lại trong các mẫu được chiết xuất theo phương pháp của Fernández-Alberti và cs. (2016) [6]. Hàm lượng Chlorpyrifos được xác định bằng phương pháp sắc ký khí (GC) với kỹ thuật (GC-FPD). Khả năng phân hủy Chlorpyrifos được tính bằng tỷ lệ phần trăm hàm lượng Chlorpyrifos còn lại trong mẫu so với hàm lượng ban đầu.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc tính lý-hóa học của hỗn hợp sinh học

Tiến hành chuẩn bị hỗn hợp sinh học theo phương pháp được nêu ở mục 2.2.1 (Hình 1). Hỗn hợp nghiên cứu có pH ban đầu hơi kiềm, phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển và hoạt động phân hủy các hợp chất C của xạ khuẩn. Sau đó, môi trường sẽ trở nên acid hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng, phát triển và hoạt động của nấm mốc nói chung và nấm mốc phân hủy lignin nói riêng.

Độ trữ ẩm cực đại ban đầu được điều chỉnh ở mức 60%. Đây là độ trữ ẩm thích hợp cho sự hòa tan và vận chuyển HCBVTV cũng như sự hô hấp hiếu khí của vi sinh vật [7]. Hàm lượng C hữu cơ ban đầu đạt 20,35%, trong khi hàm lượng N tổng số đạt 1,26% và tỷ lệ C:N đạt

16,15:1. Tỷ lệ này là thấp hơn so với tỷ lệ (20:1 - 30:1) mà Racke và cs. (1994) cho rằng tại đây hoạt động phân hủy chất hữu cơ của vi sinh vật diễn ra mạnh mẽ nhất [8]. So sánh với hỗn hợp sinh học được chuẩn bị bởi Fernández-Alberti và cs. (2012) [6], hỗn hợp sinh học nghiên cứu ban đầu có giá trị pH, hàm lượng C hữu cơ, N tổng số cao hơn nhưng tỷ lệ C/N thấp hơn. Điều này có thể là do sự khác nhau về nguồn gốc nguyên liệu tạo các hỗn hợp sinh học.

3.2. Đặc tính sinh học của hỗn hợp sinh học

Hoạt tính enzyme phân hủy lignin

Hệ enzyme phân hủy lignin bao gồm các enzyme laccase, lignin peroxidase và mangan peroxidase. Ngoài khả năng phân hủy lignin, hệ enzyme này còn có khả năng phân hủy các dị sinh chất ngoại lai (xenobiotic) nói chung và HCBVTV nói riêng [1]. Kết quả xác định hoạt

tính enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp sinh học tại các thời điểm ban đầu, sau 15 và 30 ngày ủ được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1 cho thấy hoạt tính enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp sinh học sau khi ủ cao hơn so với trước khi ủ, đặc biệt sau 15 ngày ủ, hoạt độ enzyme phân hủy lignin cao gấp 1,8 lần so với ban đầu. Ngoài ra, hoạt độ enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp sinh học nghiên cứu tại các thời gian ủ khác nhau đều cao gấp nhiều lần so với của hỗn hợp sinh học được chuẩn bị bởi Fernández-Alberti và cs. (2012) [6]. Điều này có thể là do sự khác nhau về đặc tính lý- hóa học của các hỗn hợp sinh học. Hoạt độ enzyme phân hủy lignin được cho là tỷ lệ thuận với khả năng phân hủy HCBVTV, vì vậy hỗn hợp sinh học sau 15 ngày ủ được chọn làm đối tượng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Chuẩn bị hỗn hợp sinh học

Bảng 1. Hoạt tính enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp nghiên cứu

	Thời gian ủ ban đầu (ngày)		
	0	15	30
Hoạt độ enzyme (đơn vị/kg)	45	83	60

Bảng 2. Mật độ của các nhóm vi sinh vật trong hỗn hợp sinh học nghiên cứu

Mật độ vi sinh vật tổng số (10^5 CFU/g)			Mật độ vi sinh vật phân hủy (10^4 CFU/g)		
Vi khuẩn	Xạ khuẩn	Nấm mốc	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin
$6,41 \times 10^3$	6,4	10	2,22	3,45	4,22

Bảng 3. Khả năng phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học nghiên cứu

Thời gian phân hủy (ngày)	15		30	
Nhiệt độ phân hủy (°C)	25	37	25	37
Hiệu quả phân hủy (%)	56,33	60,54	95,34	96,62

Mật độ các nhóm vi sinh vật

Mật độ của các nhóm vi sinh vật tổng số trong hỗn hợp sinh học sau 15 ngày ủ là khá phong phú (Bảng 2). Trong đó vi khuẩn chiếm ưu thế so với xạ khuẩn và nấm mốc, đồng thời mật độ vi khuẩn của hỗn hợp sinh học thí nghiệm cao gấp nhiều lần so với của hỗn hợp sinh học được chuẩn bị bởi Fernández-Alberti và cs. (2012) [6]. Ngoài ra, sự có mặt với mật độ lớn của các nhóm vi sinh vật phân hủy cellulose, hemi-cellulose và lignin sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động phân hủy HCBVTV của hỗn hợp sinh học.

Hô hấp vi sinh vật

Khí CO₂ không chỉ được sinh ra từ quá trình hô hấp hiếu khí của vi sinh vật mà còn từ hoạt động khoáng hóa chất hữu cơ trong hỗn hợp sinh học. Vì vậy, một chỉ số hô hấp cao đại diện cho một hệ vi sinh vật phong phú với hoạt tính sinh học mạnh mẽ. Trong nghiên cứu này, hô hấp vi sinh vật của hỗn hợp sinh học sau 15 ngày ủ đạt 323 mg CO₂/100 g, cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Fernández-Alberti (2012) khi báo cáo rằng hô hấp vi sinh vật của hỗn hợp sinh học đạt 308 mg CO₂/100 g [6].

3.3. Khả năng phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học

Sau khi được bổ sung vào hỗn hợp sinh học, hàm lượng Chlorpyrifos giảm dần theo thời gian do hoạt động phân hủy của vi sinh vật đặc biệt là nhóm vi sinh vật phân hủy lignin. Bên cạnh đó, hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học phụ thuộc vào nhiệt độ phân hủy. Ở nhiệt độ 37°C, sự phân hủy Chlorpyrifos cao hơn so với ở nhiệt độ 25°C. Tuy nhiên mức độ ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học trong nghiên cứu này là thấp hơn so với nghiên cứu của Racke và cs. (1994) khi cho rằng trong

khoảng nhiệt độ 15-35°C, tốc độ phân hủy Chlorpyrifos tăng gần gấp đôi khi nhiệt độ tăng thêm 10°C [8]. Hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học cao nhất đạt 96,62% tại nhiệt độ 37°C sau 30 ngày bổ sung Chlorpyrifos (Bảng 3). Kết quả này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Fernández-Alberti và cs. (2012) khi báo cáo rằng hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học cao nhất đạt 68% [6].

4. Kết luận

Đã tạo được một hỗn hợp sinh học từ các nguyên liệu sẵn có tại địa phương gồm đất mặt: rơm: than bùn theo tỷ lệ 1:2:1 về khối lượng có độ trữ ẩm cực đại đạt 60%, pH 7,85, hàm lượng C hữu cơ 20,35%, N tổng số 1,26% và tỉ lệ C/N đạt 16,15. Hoạt độ enzyme phân hủy lignin của hỗn hợp sinh học trước, sau 15 và 30 ngày ủ lần lượt là 45, 83 và 60 đơn vị/kg. Sau thời gian ủ tối ưu (15 ngày), hỗn hợp sinh học có (i) mật độ các nhóm vi sinh vật tổng số như vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc lần lượt là $6,41 \times 10^8$, $6,4 \times 10^5$ và 10^6 CFU/g, (ii) mật độ của các nhóm vi sinh vật phân hủy ligno-cellulose như vi sinh vật phân hủy cellulose, hemi-cellulose và lignin tương ứng là $2,22 \times 10^4$, $3,45 \times 10^4$ và $4,22 \times 10^4$ CFU/g, và (iii) chỉ số hô hấp vi sinh vật là 323 mg CO₂/100 g. Các đặc tính lý, hóa và sinh học của hỗn hợp sinh học nghiên cứu phù hợp cho sự hấp phụ và phân hủy Chlorpyrifos. Hiệu quả phân hủy Chlorpyrifos của hỗn hợp sinh học lên đến 96,62% ở 37°C sau 30 ngày. Vì vậy, hỗn hợp sinh học nghiên cứu này có tiềm năng được sử dụng trong hệ thống đệm sinh học nhằm xử lý dư lượng Chlorpyrifos tại các vùng canh tác nông nghiệp.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài “Nghiên cứu xây dựng hệ thống đệm sinh học xử lý hóa chất bảo vệ thực vật tại vùng canh tác nông nghiệp trên địa bàn thành phố Hà Nội” mã số QG 18.13 của ĐHQGHN.

Tài liệu tham khảo

- [1] M.D.P. Castillo, L. Torstensson, J. Stenström, Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Uses- A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 6206.
- [2] J. Husby, Biobeds in the world, 5th European Biobed Workshop, Thross Farm, UK, 2016.
- [3] Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Sổ tay phân tích Đất-Nước-Phân bón-Cây trồng, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 1983.
- [4] M.D.P. Castillo, J. Stenström, P. Ander, Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2- benzothiazolinone hydrazide and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Analytical Biochemistry* 218 (1994) 399.
- [5] W.H. Thompson, Test methods for the examination of composting and compost, U.S Composting Council and Department of Agriculture, U.S. Government Printing Office, Washington DC, 2002.
- [6] S. Fernández-Alberti, O. Rubilar, G.R. Tortella, M.C. Diez, Chlorpyrifos degradation in a Biomix: Effect of pre-incubation and water holding capacity, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(4) (2012) 785.
- [7] M.D.P. Castillo, L. Torstensson, Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 5725.
- [8] K.D. Racke, J.R. Coats, K.R. Titus, Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in soil, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 23 (1988) 527.

Characteristics and Chlorpyrifos Degradation of a Biomix in Biobed

Ngo Thi Tuong Chau, Le Van Thien, Vu Thi Thu, Dao Thi Thu Hoan,
Nguyen Thu Trang, Le Thi Tham Hong

Faculty of Environmental Sciences, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Abstract: The biobed, a simple and cheap on-farm construction intended to collect and degrade spills of pesticides, can be used to minimize the risk of pollution when handling such pesticides. The biomix plays the most important role in the adsorption and degradation of pesticides in the biobed. This study aimed at (i) constructing a biomix from the available resources, (ii) determining the physical, chemical and biological characteristics of biomix at different pre-incubation times and (iii) assessing the ability to degrade Chlorpyrifos of the biomix. The results showed the water holding capacity, pH, organic C, total N, and C/N ratio of the biomix were 60%, 7.85, 20,35%, 1.26% and 16,15, respectively. Ligninolytic enzyme activity of the biomix pre-incubated for 0, 15 and 30 days were 45, 83 and 60 units/kg, respectively. For the biomix pre-incubated for 15 days, (i) the numbers of total bacteria, actinomyces, and molds were 6.41×10^8 , 6.4×10^5 and 10^6 CFU/g, respectively, (ii) the numbers of cellulolytic, hemi-cellulolytic and ligninolytic were 2.22×10^4 , 3.45×10^4 and 4.22×10^4 CFU/g, respectively, and (iii) the microbial respiration was 323 mg CO₂/100 g. The highest degradation of Chlorpyrifos was 96.62% in the biomix pre-incubated for 15 days at the degradation conditions of 37°C and 30 days.

Keywords: Biomix, biobed, Chlorpyrifos, pesticides, ligninolytic enzymes.