

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thành Lam

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT
ĐỂ XỬ LÝ TỒN DƯ THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
GỐC LÂN HỮU CƠ TRONG ĐẤT TRỒNG CHÈ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC MÔI TRƯỜNG

Hà Nội – 2025

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thành Lam

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT
ĐỂ XỬ LÝ TỒN DƯ THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
GỐC LÂN HỮU CƠ TRONG ĐẤT TRỒNG CHÈ

Chuyên ngành: Khoa học Môi trường

Mã số: 9440301.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC MÔI TRƯỜNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Nguyễn Mạnh Khải

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. PGS. TS Nguyễn Kiều Băng Tâm

2. TS. Lương Hữu Thành

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các số liệu và kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác ngoại trừ các công bố liên quan đến luận án. Để thực hiện luận án, tôi đã trực tiếp tham gia nhóm của đề tài “*Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy photpho hữu cơ (OP) góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và tăng năng suất cây trồng*” do TS. Trần Thị Như Hằng, NCVCC, Viện Hóa học và các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam chủ nhiệm, Bộ môn Sinh học môi trường – Viện Môi trường Nông nghiệp là đơn vị thực hiện và đã được chủ trì đồng ý sử dụng kết quả phục vụ cho luận án nghiên cứu sinh của tôi và cũng là kết quả tham gia đào tạo của đề tài do TS. Trần Thị Như Hằng chủ nhiệm. Mọi sự giúp đỡ để hoàn thành luận án này đã được cảm ơn, các số liệu của các tác giả khác sử dụng đã có trích dẫn rõ ràng.

Hà Nội, ngày 28 tháng 7 năm 2025

Nguyễn Thành Lam

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Kiều Băng Tâm, Giảng viên cao cấp, Trưởng Bộ môn Sinh thái Môi trường, Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và TS. Lương Hữu Thành, Trưởng Bộ môn Sinh học Môi trường, Viện Môi trường Nông nghiệp - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam đã nhiệt tình hướng dẫn tôi thực hiện đề tài và hoàn thành luận án. Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Trần Thị Như Hằng, Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam chủ trì đề tài cấp Nhà nước: “*Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy phát pho hữu cơ góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và tăng năng suất cây trồng*” đã tạo điều kiện và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới tập thể cán bộ nghiên cứu Bộ môn Sinh học Môi trường – Viện Môi trường nông nghiệp đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin cảm ơn Phòng Đào tạo, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cùng toàn thể các Thầy, Cô giáo, cán bộ viên chức Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (ĐHKHTN), Đại học Quốc gia Hà Nội (ĐHQGHN) đã tận tình giúp đỡ, truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Hà Nội, ngày 28 tháng 7 năm 2025

Nguyễn Thành Lam

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	2
LỜI CẢM ƠN	3
MỤC LỤC	1
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC CÁC BẢNG	6
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	8
MỞ ĐẦU	9
1. Lý do lựa chọn đề tài	9
2. Mục tiêu nghiên cứu	11
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	11
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	11
5. Những đóng góp mới của đề tài luận án	11
6. Nội dung nghiên cứu	12
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	13
1.1. Tổng quan về thuốc bảo vệ thực vật	13
1.1.1. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật	13
1.1.2. Phân loại thuốc bảo vệ thực vật	14
1.1.3. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ	16
1.1.4. Tính chất chung của thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ	18
1.1.5. Tác động của thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ	18
1.1.6. Tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ ở Việt Nam	22
1.2. Tình hình sản xuất và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trên cây chè ở Việt Nam	27
1.2.1. Tổng quan cây chè	27
1.2.2. Hiện trạng sử dụng và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ trên đất trồng chè ở Việt Nam	30
1.3. Vai trò của vi sinh vật trong xử lý thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ	32

CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

.....	42
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	42
2.2. Phạm vi nghiên cứu.....	43
2.3. Thiết bị, hoá chất và dụng cụ thí nghiệm.....	43
2.4. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu:.....	43
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	43
2.5.1. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu.....	43
2.5.2. Phương pháp phân tích hàm lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ....	44
2.5.3. Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật.....	45
2.5.4. Phân loại vi sinh vật bằng phương pháp sinh học phân tử.....	46
2.5.5. Thử nghiệm xác định tính an toàn đối với động vật.....	48
2.5.6. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối.....	49
2.5.7. Phương pháp tạo chế phẩm vi sinh vật.....	50
2.5.8. Thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý CPF của vi sinh vật.....	51
2.5.9. Phương pháp xử lí số liệu.....	57
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	58
3.1. Đánh giá dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ ở một số vùng canh tác nông nghiệp.....	58
3.2. Phân lập vi khuẩn phân giải Chlorpyrifos ethyl.....	61
3.3. Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ trong đất trồng chè.....	76
3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	77
3.3.2. Ảnh hưởng của pH.....	79
3.3.3. Môi trường nhân sinh khối và thời gian nuôi cấy.....	81
3.3.4. Tỷ lệ giống cấp 1.....	82
3.3.5. Ảnh hưởng của liều lượng cấp khí.....	84
3.3.6. Thông số kỹ thuật sử dụng trong lên men nhân sinh khối chủng.....	84
3.3.7. Khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm.....	86

3.4. Nghiên cứu khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ	88
3.4.1. Khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật xử lý thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ trên đất trồng chè qui mô nhà lưới	88
3.4.2. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè trên thí nghiệm diện hẹp	92
3.4.3. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè thí nghiệm diện rộng	101
CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	107
4.1. Kết luận	107
4.2. Kiến nghị	108
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	1
TÀI LIỆU THAM KHẢO	2
PHỤ LỤC	21

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
BVTV	Bảo vệ thực vật
CFU	Colony Forming Unit (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)
CPF	Chlorpyrifos
CRD	Complete randomized design (Khôi hoàn toàn ngẫu nhiên)
CS	Cộng sự
CT	Công thức
CTR	Chất thải rắn
CV	Coefficients of variation (Sai số thí nghiệm)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DT	Dễ tiêu
ĐC	Đối chứng
ĐK	Đường kính
HCSH	Hữu cơ sinh học
IAA	Indole-3-acetic acid (Chất điều hòa sinh trưởng thực vật)
KHCN	Khoa học công nghệ
KHNN	Khoa học Nông nghiệp
LSD	Least significant difference (Sai khác giữa các công thức có ý nghĩa)
MSM	Minimal Salt Medium (Môi trường khoáng tối thiểu)

Chữ viết tắt**Chữ viết đầy đủ**

OC	Cacbon hữu cơ
OP	Gốc Lân hữu cơ
QCVN	Quy chuẩn Việt Nam
RCBD	Randomized Complete Block Design (Khối đầy đủ ngẫu nhiên)
TCCS	Tiêu chuẩn cơ sở
TCN	Tiêu chuẩn Ngành
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
TN	Thí nghiệm
TTPT	Trung tâm phân tích
VK	Vi khuẩn
VSV	Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các lớp thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ theo cấu trúc hóa học [80].....	18
Bảng 1.2. Độc tính của một số thuốc BVTV chứa gốc OP [61].....	20
Bảng 1.3. Độc tính và thời gian bán hủy của một số thuốc trừ sâu OP	24
Bảng 1.4. Diện tích và sản lượng chè Việt Nam giai đoạn 2010 – 2023	28
Bảng 3.1. Kết quả phân tích hàm lượng OP trong mẫu chè, rau và đất trồng.	58
Bảng 3.2. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc các chủng VSV đã phân lập	62
Dữ liệu từ hình 3.4 cho thấy mật độ VSV sau 96 giờ của các chủng CNN2, VNN3 và CNN4 dao động từ 2,8 đến $5,7 \times 10^8$ CFU/mL, trong khi CNN1 chỉ đạt $2,3 \times 10^7$ CFU/mL — thấp hơn đáng kể. Do đó, chủng CNN1 bị loại khỏi danh sách nghiên cứu tiếp theo.	65
Bảng 3.3. Khả năng phân giải Chlorpyrifos bởi các chủng vi khuẩn sau khi nhân sinh khối 3 ngày	65
Bảng 3.5. Mức độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật	69
Bảng 3.6. Môi quan hệ giữa chủng <i>M. populi</i> CNN2 và <i>Ensifer sp</i> VNN3	73
Bảng 3.7. Khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng <i>M. populi</i> CNN2 và <i>Ensifer sp</i> . VNN3	76
Bảng 3.8. Khả năng sinh trưởng của vi sinh vật trên các môi trường.....	82
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến quá trình lên men sinh khối.....	83
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của liều lượng cấp khí tới sinh trưởng của VSV	84
Bảng 3.11: Thông số kỹ thuật phù hợp cho nhân sinh khối các chủng VSV	85
Bảng 3.12: Mật độ chủng <i>M. populi</i> CNN2 và <i>Ensifer sp</i> . VNN3 trong chế phẩm	86
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm VSV đến cây chè.....	88
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm VSV đến dư lượng CPF trong đất và lá chè.....	89
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kinh doanh.....	93
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến cây chè giai đoạn kinh doanh.	94
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kiến thiết.....	96

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến sinh trưởng và năng suất chè giai đoạn kiến thiết.	97
Bảng 3.19. Dư lượng CPF trong đất trồng chè tại Nghệ An.....	99
Bảng 3.20. Mật độ các VSV cố định đạm tự do trong đất trồng chè.....	100
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kinh doanh LDP1 tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, Nghệ An.	101
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến năng suất chè LDP1 giai đoạn kinh doanh.	102
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè PH8 giai đoạn kiến thiết.....	103
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến sinh trưởng và năng suất chè giai đoạn kiến thiết.	103
Bảng 3.25. Kết quả phân tích các chỉ tiêu trong đất trồng chè ở Nghệ An.....	104
Bảng 3.26. Mật độ các VSV (CFU/g) có ích trong đất trồng chè.....	104
Bảng 1. Mật độ của các chủng vi sinh vật trên môi trường chứa OP	27
Bảng 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng của vi sinh vật	27
Bảng 3: Ảnh hưởng của pH tới sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn	27

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học chung của các hợp chất OP.....	17
Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện quy trình nghiên cứu của luận án.....	42
Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc của các chủng (a) CNN1, (b) CNN2, (c) VNN3 và (d) CNN4.....	61
Hình 3.2. Hình thái của các chủng vi sinh vật	62
Hình 3.3. OD620 của các chủng VSV trong môi trường chứa cơ chất	63
Hình 3.4. Biểu đồ tăng trưởng của các chủng vi sinh vật	64
Hình 3.6. Sự thay đổi nồng độ CPF theo thời gian khác nhau.....	71
Hình 3.7. Nồng độ CPF trong mẫu đất sau khi cấy chủng <i>M. populi</i> CNN2 và <i>Ensifer sp.</i> VNN3.....	72
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của VSV	77
.....	80
Hình 3.9. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của vi sinh vật.....	80
Hình 3.10: Quy trình sản xuất chế phẩm VSV phân hủy CPF	87

MỞ ĐẦU

1. Lý do lựa chọn đề tài

Trong những năm gần đây, việc lạm dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong nông nghiệp để đạt năng suất và sản lượng cao đã làm cho đất đai ngày càng thoái hóa, dinh dưỡng bị mất cân đối, mất cân bằng hệ sinh thái trong đất, thậm chí gây ô nhiễm môi trường đất. Các loại thuốc bảo vệ thực vật (sau đây viết tắt là BVTV) chứa hoạt chất phospho hữu cơ (còn gọi là gốc Lân hữu cơ hoặc viết tắt là OP) được sử dụng để diệt côn trùng, sâu bọ. Trong điều kiện tự nhiên, sự phân giải các gốc Lân hữu cơ này xảy ra rất chậm, do vậy chúng thường tích lũy trong đất hoặc bị rửa trôi vào sông, suối, mạch nước ngầm. Thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ đã được chứng minh là chất độc nguy hiểm không chỉ đối với một số loại côn trùng và động vật hoang dã, mà còn gây hại cho con người, đặc biệt là đối với trẻ nhỏ và phụ nữ có thai. Không những vậy thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ có đặc tính dễ tan trong nước, có khả năng hấp thụ vào máu, dịch thể, thần kinh của vật chủ nhanh chóng nên chúng thực sự nguy hiểm nếu không được kiểm soát chặt chẽ. Một số thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ có tác động tiêu cực tới môi trường và sức khỏe con người, bao gồm *Glyphosate*, *Chlorpyrifos*, *Parathion*, *Methyl parathion*, *Diazinon*, *Coumaphos*, *Monocrotophos*, *Fenamiphos* và *Phorate*. Các nghiên cứu cho thấy thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ có thể làm thay đổi hormone, ảnh hưởng đến DNA, thai dị dạng, tinh trùng, buồng trứng và trứng phát triển không bình thường của người và động vật.

Tại Việt Nam, thuốc BVTV chứa gốc Lân hữu cơ hiện nay vẫn được dùng rộng rãi trong nông nghiệp nói chung và đặc biệt tại các vùng sản xuất chè nói riêng mà chưa có các biện pháp kiểm soát việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật, cũng như tồn dư thuốc bảo vệ thực vật trong đất sẽ tác động tiêu cực đến môi trường, đe dọa sức khỏe cộng đồng và sự phát triển bền vững của ngành nông nghiệp.

Khả năng tích tụ, tồn dư thuốc BVTV trong môi trường đất, môi trường nước với độc tính của chúng có nguy cơ ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, động vật và môi trường sinh thái đang là bài toán thách thức đối với các nhà khoa học và là vấn đề xã hội rất quan tâm. Việc loại bỏ dư lượng thuốc BVTV, cụ thể là

các hợp chất chứa gốc Lân hữu cơ luôn là bài toán khó vẫn chưa có lời giải một cách trọn vẹn và hiệu quả trong thực tiễn sản xuất cũng như mục tiêu hướng tới một nền sản xuất nông nghiệp an toàn.

Bên cạnh các nghiên cứu phát triển các công nghệ hóa lý trong xử lý dư lượng thuốc BVTV trong đất trồng nông nghiệp thì giải pháp, công nghệ sinh học xử lý đất có chứa thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ theo hướng sử dụng các chế phẩm sinh học chứa các chất xúc tác hiệu quả cao, gồm cả enzyme và vi sinh vật được xem như một hướng nghiên cứu nhiều triển vọng. Đồng thời, việc sử dụng sinh vật để xử lý ô nhiễm môi trường (bioremediation) là giải pháp xanh, thân thiện và bền vững. Công nghệ này dựa trên khả năng hoạt động của các enzyme ngoại bào xúc tác để chuyển hóa các chất lạ sinh học (xenobiotic substances). Việc sử dụng các enzyme ngoại bào dạng tồn tại trong sinh khối (vi sinh vật tiết ra enzyme) cũng như dạng chiết xuất (enzyme tinh sạch) là một kỹ thuật xử lý môi trường hiệu quả và hiện đại.

Nhiều công trình nghiên cứu khoa học trước đây đã tìm ra một số vi sinh vật có khả năng đồng hóa và khoáng hóa các hợp chất chứa gốc lân hữu cơ, trong đó phải kể đến một số vi khuẩn như *Enterobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas diminuta*, *Micrococcus* sp., và một số loài nấm như *Phanerochaete chrysosporium*, *Hypholoma fascicularae*, *Coriolus versicolor*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma harzianum* và *Penicillium brevicompactum*. Đáng chú ý, trong số các chủng vi sinh vật nêu trên có những loài không chỉ có khả năng phân giải thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ tồn dư, tích tụ trong môi trường, mà còn có khả năng tạo enzyme phosphatase, muối oxalat hoặc axit (HNO_3 hoặc H_2SO_4), góp phần chuyển hóa hợp chất phospho không tan thành dạng phospho hòa tan để cây trồng hấp thu, tăng cường dinh dưỡng Lân cho cây trồng.

Đề tài luận án: “*Nghiên cứu tuyển chọn và ứng dụng vi sinh vật để xử lý tồn dư thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ trong đất trồng chè*” của nghiên cứu sinh được thực hiện sẽ góp phần bổ sung cơ sở khoa học và thực tiễn cho việc ứng dụng vi sinh vật để xử lý tồn dư thuốc bảo vệ thực vật có gốc Lân hữu cơ trên đất nông nghiệp, góp phần giảm thiểu tác động tiêu cực của thuốc BVTV đến con người, động vật, cây trồng, hệ sinh thái và môi trường.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Tuyển chọn được chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao và ổn định để xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ nhằm tạo cơ sở khoa học và thực tiễn phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ trong đất nông nghiệp.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải thuốc BVTV gốc lân hữu cơ được phân lập từ đất trồng chè tại tỉnh Nghệ An. Đất nông nghiệp khu vực thâm canh chè có dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ.

- Phạm vi nghiên cứu: Nghiên cứu cơ bản được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Môi trường Nông nghiệp, Viện Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Nghiên cứu đánh giá khả năng sử dụng vi sinh vật có khả năng phân giải thuốc BVTV gốc lân hữu cơ đối với đất trồng chè thuộc Hợp tác xã chè Minh Sáng, xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

- Tuyển chọn được những chủng vi sinh vật bản địa có nguồn gốc rõ ràng, có hoạt tính sinh học ổn định và an toàn sinh học cao để ứng dụng trong xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ trong đất nông nghiệp trong điều kiện thực tế tại Việt Nam.

- Bổ sung danh mục các chủng vi sinh vật có hoạt tính phân hủy dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ; cung cấp phương pháp, số liệu, thông tin khoa học làm cơ sở cho các nghiên cứu công nghệ xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ nói riêng và thuốc bảo vệ thực vật nói chung trong đất trồng nông nghiệp bằng phương pháp vi sinh vật.

5. Những đóng góp mới của đề tài luận án

- Sử dụng vi sinh vật bản địa: Tuyển chọn và ứng dụng các chủng vi sinh vật được phân lập từ môi trường trong nước, đảm bảo nguồn gốc tự nhiên và phù hợp với điều kiện canh tác thực tế tại Việt Nam. Các chủng vi sinh được định danh chính xác đến mức độ loài, đảm bảo về mặt an toàn sinh học khi phóng thích vào môi trường, góp phần giảm thiểu rủi ro cho hệ sinh thái.

- Ứng dụng vào xử lý dư lượng thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ: Nghiên cứu khả năng phân giải, xử lý thuốc BVTV kết hợp với phát triển, thử nghiệm chế phẩm vi sinh vừa có khả năng xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật chứa gốc Lân hữu cơ trong đất trồng chè, tạo ra một giải pháp hiệu quả cho việc khử độc và bảo vệ môi trường đồng thời nâng cao chất lượng và năng suất cây trồng.

- Kết quả nghiên cứu của luận án: Không chỉ mang tính mới về mặt khoa học mà còn có ứng dụng thực tiễn cao, góp phần bảo vệ môi trường, sức khỏe cộng đồng và cải thiện chất lượng sản phẩm chè thương phẩm.

6. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Tổng hợp, thu thập tài liệu, đánh giá và khảo sát hiện trạng ô nhiễm gốc Lân hữu cơ trong đất ở vùng trồng rau, chè.

Nội dung 2: Nghiên cứu và tuyển chọn chủng vi sinh vật (VSV) có khả năng phân giải thuốc BVMT gốc Lân hữu cơ (cụ thể là thuốc trừ sâu Chlorpyrifos).

Nội dung 3: Nghiên cứu sản xuất, ứng dụng chế phẩm VSV phân hủy Chlorpyrifos.

Nội dung 4: Thử nghiệm, đánh giá hiệu quả của chế phẩm VSV phân hủy dư lượng Chlorpyrifos trong đất trồng chè.

Các nội dung trên được bố trí trong 4 chương của luận án:

Chương 1: Tập trung vào việc tổng quan tài liệu trong nước và quốc tế liên quan đến vấn đề nghiên cứu.

Chương 2: Mô tả đối tượng và phương pháp nghiên cứu đã tiến hành nhằm đạt được mục tiêu của đề tài.

Chương 3: Trình bày các kết quả nghiên cứu đạt được, bình luận và so sánh các kết quả đó với những nghiên cứu tương tự trước đây ở trên thế giới và Việt Nam.

Chương 4: Kết luận và Kiến nghị.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về thuốc bảo vệ thực vật

Nông nghiệp là ngành sản xuất vật chất cơ bản, giữ vai trò to lớn trong việc phát triển kinh tế ở hầu hết các nước trên thế giới, nhất là ở các nước đang phát triển, bao gồm cả Việt Nam. Nhu cầu lương thực quốc tế ước tính tăng từ 80 đến 100% trong những thập kỷ tới để đối phó với tình trạng dân số ngày càng tăng [81].

Trong những năm gần đây, việc lạm dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong nông nghiệp với mục đích đạt năng suất và sản lượng cao đã làm cho đất đai ngày càng thoái hóa, dinh dưỡng bị mất cân đối, mất cân bằng hệ sinh thái trong đất thậm chí gây ô nhiễm đất, gây ảnh hưởng không nhỏ đến sức khỏe con người và hệ sinh thái [44, 54]. Thực tế, ngành nông nghiệp đang cải thiện năng suất bằng cách khắc phục 40% tổn thất mùa màng (tương đương 2,5 nghìn tỷ USD) do sâu bệnh phá hoại [81, 144]. Tuy nhiên, chỉ một lượng nhỏ (khoảng 1,0 %) thuốc BVTV sử dụng để tiêu diệt các loài gây hại và phần dư lượng còn lại sẽ lắng đọng trong đất nông nghiệp, dẫn đến rửa trôi vào sông, suối, mạch nước ngầm và gây ra tác hại nghiêm trọng đến hệ sinh thái đất và nước [103, 119].

Việc loại bỏ tồn dư các thuốc BVTV đặc biệt là thuốc BVTV gốc lân hữu cơ đang là một trong những khó khăn chính mà nền nông nghiệp phải đối mặt. Vì vậy cần phải có những hiểu biết về thuốc BVTV nói chung và thuốc BVTV gốc lân hữu cơ nói riêng thì mới có thể đưa ra phương pháp xử lý tồn dư một cách có hiệu quả.

1.1.1. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật

Khoản 16 Điều 3 Luật Bảo vệ và kiểm dịch thực vật năm 2013 đã nêu rõ: “Thuốc bảo vệ thực vật là chất hoặc hỗn hợp các chất hoặc chế phẩm vi sinh vật có tác dụng phòng ngừa, ngăn chặn, xua đuổi, dẫn dụ, tiêu diệt hoặc kiểm soát sinh vật gây hại thực vật; điều hòa sinh trưởng thực vật hoặc côn trùng; bảo quản thực vật; làm tăng độ an toàn, hiệu quả khi sử dụng thuốc”. Theo đó, thuốc bảo vệ thực vật là các chất hoặc sản phẩm có tác dụng phòng ngừa, kiểm soát, tiêu diệt các tác nhân gây hại như sâu bệnh, cỏ dại, nấm bệnh và các sinh vật gây hại khác đối với cây trồng.

Mục đích của việc sử dụng thuốc BVTV là nhằm bảo vệ cây trồng, đảm bảo

năng suất và chất lượng sản phẩm, đồng thời góp phần nâng cao an toàn thực phẩm và bảo vệ môi trường trong sản xuất nông nghiệp [16]. Thuốc BVTV hay còn gọi là hóa chất BVTV là những loại hóa chất bảo vệ cây trồng hoặc những sản phẩm bảo vệ mùa màng. Bên cạnh đó, các loại thuốc kích thích sinh trưởng, giúp cây trồng đạt năng suất cao cũng là một dạng của thuốc BVTV [16].

Thuốc BVTV là những hóa chất độc, có khả năng phá hủy tế bào, tác động đến cơ chế sinh trưởng, phát triển của sâu bệnh, cỏ dại và cả cây trồng, vì thế khi các hợp chất này đi vào môi trường, chúng cũng có những tác động nguy hiểm đến môi trường, đến những đối tượng tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp. Đây cũng là lý do mà thuốc BVTV nằm trong số những hóa chất đầu tiên được kiểm tra triệt để về bản chất, về tác dụng cũng như tác hại [16].

Về cơ bản thuốc BVTV được sản xuất dưới các dạng sau [35]:

- Thuốc sữa: Viết tắt là EC hay ND: gồm các hoạt chất, dung môi, chất hóa sữa và một số chất phụ trợ khác. Thuốc ở thể lỏng, trong suốt, tan trong nước thành dung dịch nhũ tương đồng đều, không lắng cặn hay phân lớp.

- Thuốc bột thấm nước: Còn gọi là bột hòa nước, viết tắt là WP, BTN: gồm hoạt chất, chất độn, chất thấm ướt và một số chất phụ trợ khác. Thuốc ở dạng bột mịn, phân tán trong nước thành dung dịch huyền phù, pha với nước để sử dụng.

- Thuốc phun bột: Viết tắt là DP, chứa các thành phần hoạt chất thấp (dưới 10%), nhưng chứa tỉ lệ chất độn cao, thường là đất sét hoặc bột cao lanh. Ngoài ra, thuốc còn chứa các chất chống ẩm, chống dính. Ở dạng bột mịn, thuốc không tan trong nước.

- Thuốc dạng hạt: Viết tắt là G hoặc H, gồm hoạt chất, chất độn, chất bao viên và một số chất phụ trợ khác.

Ngoài ra còn một số dạng tồn tại khác:

- Thuốc dung dịch;
- Thuốc bột tan trong nước;
- Thuốc phun mùa nóng;
- Thuốc phun mùa lạnh.

1.1.2. Phân loại thuốc bảo vệ thực vật

**) Phân loại theo gốc hoá học*

Căn cứ vào bản chất hóa học của các loại hóa chất BVTV, chúng được phân chia thành các nhóm khác nhau [35]. Dưới đây mô tả sơ bộ hóa chất BVTV thuộc các nhóm Clo hữu cơ, Lân hữu cơ, Carbamat và Pyrethroid:

a) Hóa chất BVTV thuộc nhóm hợp chất Clo hữu cơ: Hóa chất BVTV thuộc nhóm Clo hữu cơ (cơ Clo) là nhóm hóa chất BVTV tổng hợp; điển hình của nhóm này là DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroethane), Endosulfan. Hầu hết các loại thuốc BVTV thuộc nhóm này đã bị cấm sử dụng vì chúng là các chất hữu cơ khó phân hủy, tồn lưu lâu trong môi trường. Công ước Stockholm về các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy cũng quy định về việc giảm thiểu và loại bỏ các loại thuốc bảo vệ thực vật, đa phần thuộc nhóm Clo hữu cơ này.

Hóa chất BVTV nhóm Clo hữu cơ thường có độ độc ở mức độ I hoặc II. Các hợp chất trong nhóm này gồm: Aldrin, Lindan, Chlordan, DDE (Dichloro Diphenyl Dichloroethylene), DDT, Dieldrin, Endrin, Endosulphan, Heptachlor, Keltan, Lindane, Methoxycor, Rothan, Perthan, TDE (Dichloro Diphenyl Dichloroethane), Toxaphen,...là những hợp chất mà trong cấu trúc phân tử của chúng có chứa một hoặc nhiều nguyên tử Clo liên kết trực tiếp với nguyên tử Cacbon. Trong các hợp chất trên DDT và Lindane là những loại hóa chất BVTV được sử dụng nhiều nhất ở Việt Nam từ trước những năm 1960-1993.

b) Hóa chất BVTV thuộc nhóm Lân hữu cơ: Là các este của axit phosphoric; đây là nhóm hóa chất độc với người và động vật máu nóng, điển hình của nhóm này là Methyl Parathion, Ethyl Parathion, Mehtamidophos, Malathion... Hầu hết các loại hóa chất BVTV trong nhóm này cũng đã bị cấm do độc tính của chúng cao. Dấu hiệu và triệu chứng nhiễm độc thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ bao gồm: Nhức đầu, choáng váng, cảm giác nặng đầu, nhức thái dương, giảm trí nhớ, dễ mệt mỏi, ngủ không ngon giấc, ăn kém ngon, chóng mặt.

c) Hóa chất BVTV thuộc nhóm Carbamat: Là các este của axit Carbamic có phổ phòng trừ rộng, thời gian cách ly ngắn, điển hình của nhóm này là Bassa, Carbosulfan, Lannate... Cũng như nhóm Lân hữu cơ, các triệu chứng nhiễm độc thuốc BVTV nhóm này là rất khó khăn, phần lớn các dấu hiệu lâm sàng mang tính chủ quan. Các triệu chứng nhiễm độc gồm nhức đầu, choáng váng, dễ mệt mỏi, ngủ không ngon giấc, ăn kém ngon, chóng mặt

d) Thuốc BVTV thuộc nhóm Cúc tổng hợp (Pyrethroid): Là các este có thêm các Cl, N. Ban đầu, bắt nguồn từ hoạt chất pytherin có nguồn gốc tự nhiên từ cây hoa cúc (pytherum), có phổ trừ sâu rộng, hiệu lực diệt cao, độc tính thấp với động vật máu nóng, nhưng độc cao với cá, dễ bị phân hủy quang hóa nên thường dùng để diệt và loại côn trùng trong nhà. Với hiệu lực diệt cao hơn và độ bền quang hóa tốt hơn nhằm đưa vào sử dụng rộng rãi thay thế cho những hợp chất diệt côn trùng nhóm Clo hữu cơ, Lân hữu cơ và carbamat. Các pyrethroid tổng hợp được sử dụng rộng rãi nhất bao gồm Permethrin, Cypermethrin và Deltamethrin.

*) *Phân loại thuốc bảo vệ thực vật theo công dụng*

Trên thị trường có hàng trăm loại hoạt chất với hàng nghìn tên thương mại khác nhau về thuốc BVTV, tuy nhiên theo công dụng [35] thì có thể phân làm 5 loại chính gồm thuốc trừ sâu bệnh (hợp chất hữu cơ clo, hợp chất hữu cơ phospho, ...); thuốc diệt cỏ; thuốc diệt nấm; thuốc diệt chuột và thuốc kích thích.

*) *Phân loại theo nhóm độc*: Độc tính cấp tính và độc tính mãn tính.

*) *Phân loại theo thời gian phân hủy*: Dựa theo thời gian phân hủy có thể chia làm các nhóm sau:

- Nhóm hầu như không phân hủy (các hợp chất hữu cơ chứa kim loại...);
- Nhóm khó phân hủy (DDT, 666);
- Nhóm phân hủy trung bình (nhóm hợp chất hữu cơ chứa clo);
- Nhóm dễ phân hủy (nhóm hợp chất phospho hữu cơ, cacbamat).

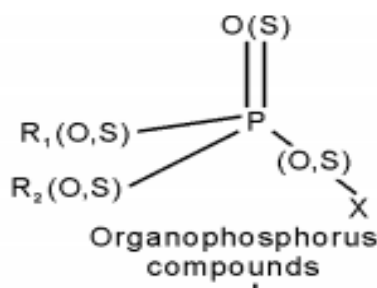
Việc sử dụng thuốc BVTV trong nông nghiệp là cần thiết nhằm ngăn chặn các loài vật gây hại mùa màng, giúp nâng cao sản lượng, chất lượng sản phẩm. Theo ước tính, mỗi năm 4 triệu tấn thuốc BVTV được sử dụng trong nông nghiệp. Tuy nhiên, chỉ 1-10% lượng thuốc đến được đích và tiêu diệt côn trùng, sâu bọ... Phần lớn thuốc BVTV không được sử dụng đi vào hệ sinh thái đất và nước gây nên các áp lực sinh thái, ảnh hưởng trực tiếp đến động thực vật và con người [123].

1.1.3. Khái niệm thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ

Phospho hữu cơ (còn gọi là Lân hữu cơ) là tên gọi chung cho các ester của axit phosphoric. Từ năm 1938 đến nay đã có khoảng 50.000 hợp chất phospho hữu cơ (viết tắt là OP) được tổng hợp. Các hợp chất OP được sử dụng khá phổ biến, đặc

biệt là có khoảng 80 hợp chất được dùng trong nông nghiệp dưới dạng thuốc bảo vệ thực vật [80].

Các hợp chất phospho nói chung đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sống, đặc biệt là quá trình quang hợp, trao đổi chất và các hệ coenzyme. Tuy nhiên, các hợp chất phospho lại bao gồm nhiều chất có tính độc thân kinh (neurotoxic), trong đó phải kể đến các triesters, phosphonates, phosphonofluoridates và phosphonothioates [80]. Cấu trúc chung của phần lớn OP là giống nhau, chứa 3 liên kết phosphoester. Công thức hóa học chung của các thuốc BVTV gốc OP có dạng như mô tả ở hình 1.1 dưới đây. Hợp chất OP chứa liên kết hóa học C-P là bền vững và bền với sự thủy phân hóa học, nhiệt và ánh sáng.



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học chung của các hợp chất OP.

Công thức chung của OP được trình bày ở hình 1.1. Trong đó R₁, R₂ chủ yếu là nhóm aryl hoặc alkyl có thể gắn trực tiếp với phospho hoặc thông qua nguyên tử oxy, lưu huỳnh. Trong một số trường hợp, R₁ được liên kết trực tiếp với P và R₂ liên kết với một nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh. Ít nhất một trong 2 nhóm này được gắn với các nhóm amin không thay thế. Nhóm X có thể đa dạng.

Thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ được dùng rộng rãi và phổ biến nhất trong các loại thuốc BVTV, là các este của axit phosphoric. Đây là nhóm hóa chất độc với người và động vật máu nóng, điển hình của nhóm này là: Malathion, Fenitrothion, Methyl Parathion, Ethyl Parathion, Diazinon, Phosphamidon, Dichlorvos, Chlopyrifos, Monocrotophos, Chlorophos, Methamidophos, Dimethoate, Phenthoate, Glysophate.....[34].

**) Phân loại thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ*

Dựa trên cấu trúc hóa học (mô tả ở hình 1.1), các thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ được phân ra 5 lớp chủ yếu là: Phosphate (i); Thiophosphate (ii);

Dithiophosphate (iii); Chlorophosphate (iv); Phosphorodiamidate (v). Cấu trúc hóa học của các lớp thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ được thể hiện theo bảng 1.1 [80].

Bảng 1.1. Các lớp thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ theo cấu trúc hóa học [80]

TT	Tên lớp thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ	Cấu trúc hóa học điển hình	Tên thuốc BVTV thường dùng
1	Phosphate	$\begin{array}{c} \text{OR} \quad \text{O} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{OR} - \text{P} \\ \quad \quad \text{OX} \end{array}$	Diazinon Demeton
2	Thiophosphate	$\begin{array}{c} \text{OR} \quad \text{S} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{OR} - \text{P} \\ \quad \quad \text{OX} \end{array}$	Metyl parathion Parathion
3	Dithiophosphate	$\begin{array}{c} \text{OR} \quad \text{S} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{OR} - \text{P} \\ \quad \quad \text{SX} \end{array}$	Malathion Dimethoate
4	Chlorophosphate	$\begin{array}{c} \text{OR} \quad \text{S} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{OR} - \text{P} \\ \quad \quad \text{Cl (F)} \end{array}$	Diethyl chlorophosphate (DCP)
5	Phosphorodiamidate	$\begin{array}{c} \text{NR}_2 \quad \text{O} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{NR}_2 - \text{P} \\ \quad \quad \text{OX} \end{array}$	Diamidafos

1.1.4. Tính chất chung của thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ

Đặc điểm chung về hóa học của các hợp chất OP là dễ bị thủy phân. Tác nhân thủy phân đến gần chất phản ứng và tấn công vào nguyên tử phospho. Sản phẩm thủy phân là tạo thành este đơn giản hơn của axit phosphoric [80].

Tính chất quan trọng thứ hai là phản ứng hoạt hóa nhân phospho. Phản ứng xảy ra thường tạo thành chất ức chế enzyme cholinesteraza mạnh hơn.

Đi đôi với phản ứng hoạt hóa là phản ứng phân hủy. Nhờ phản ứng này, các hợp chất OP chuyển hóa thành dẫn xuất trung gian kém độc hơn là chất chính phẩm.

1.1.5. Tác động của thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ

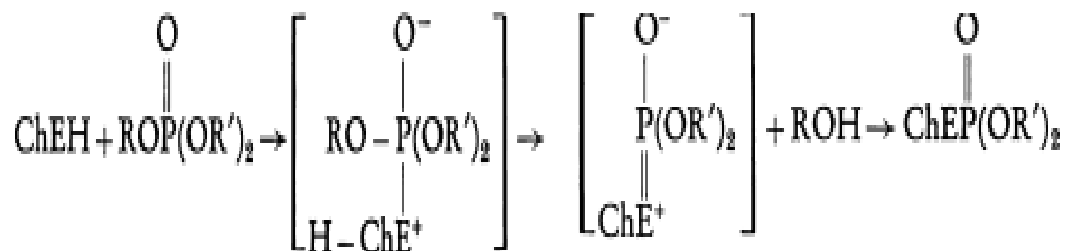
Ưu điểm của các loại thuốc BVTV chứa gốc OP là có tác dụng nhanh, phổ tác dụng rộng đối với các loài sâu hại và tác nhân gây bệnh ở thực vật. Tuy nhiên, nhược điểm lớn của các hợp chất này là tương đối độc, tác động tiêu cực đến động

vật có dây sống nói chung và cơ thể con người nói riêng [12]. Bên cạnh đó, sử dụng thiếu hợp lý thuốc BVTV chứa gốc OP còn gây hại đến môi trường và ảnh hưởng nghiêm trọng tới cân bằng sinh thái.

**) Tác động của hợp chất OP đối với cơ thể người và động vật*

Thuốc BVTV chứa OP có thể xâm nhập vào cơ thể qua thức ăn, không khí, tiếp xúc, đường nước v.v.. Khi vào cơ thể động vật, OP tác dụng ức chế enzyme acetylcholine esterase (AChE) [112, 169]

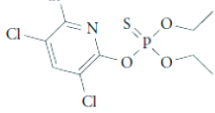
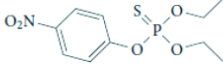
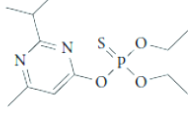
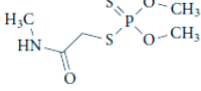
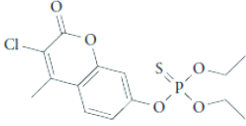
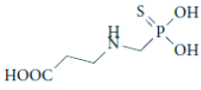
Acetylcholine là thành phần thiết yếu của hệ thống thần kinh và đảm bảo việc truyền xung thần kinh ở não, xương và hệ thống cơ [50]. Để đảm bảo hoạt động dẫn truyền xung thần kinh, acetylcholine phải được thủy phân thành choline và acetyl-CoA bởi enzyme AChE. Khi cơ thể động vật bị nhiễm OP, AChE bị ức chế không phục hồi theo phản ứng sau:



Hậu quả của phản ứng trên là sự tích tụ acetylcholine, dẫn đến kích thích các thụ thể của acetylcholine ở khớp thần kinh của hệ thần kinh và dẫn đến co thắt, co giật, liệt, ngạt thở và có thể gây chết [126, 173].

Một số thuốc BVTV chứa OP hiện được sử dụng rộng rãi với đặc tính bán phân rã và độc tính với động vật được trình bày tại Bảng 1.2 [61]. Theo bảng 1.2, một số thuốc trừ sâu chứa OP như parathion và coumaphos có độc tính cao, với liều gây chết LD₅₀ khoảng từ 2-41 mg/kg.

Bảng 1.2. Độ tính của một số thuốc BVTV chứa gốc OP [61]

Tên chất BVTV	Mục đích sử dụng	Thời gian bán rã (ngày)	Độc tính trên động vật* (mg/kg)
Chlorpyrifos 	Thuốc trừ sâu	16-120	135-163
Parathion 	Thuốc trừ sâu	30-180	2-10
Diazinon 	Thuốc trừ sâu	11-21	80-300
Dimethoate 	Thuốc trừ sâu	2-41	160-387
Coumaphos 	Thuốc diệt nhện	24-1400	16-41
Glyphosphate 	Thuốc diệt cỏ	30-174	3530-5600

*Với thuốc BVTV OP, độc tính là liều gây chết 50% động vật thử nghiệm (mg/kg)

Khi tiếp xúc trực tiếp, thuốc BVTV dễ xâm nhập vào cơ thể người qua đường miệng, đường da, đường hô hấp gây nhiễm độc và ngộ độc thuốc BVTV. Những người ít hoặc không tiếp xúc trực tiếp với thuốc BVTV cũng có thể bị nhiễm độc do ăn, uống những nông sản, nước sinh hoạt, nước mưa có nhiễm thuốc BVTV. Thuốc BVTV gốc lân hữu cơ xâm nhập vào cơ thể qua đường hô hấp, tiêu hóa, da, trong đó sự hấp thu các hợp chất OP ở niêm mạc đường tiêu hóa diễn ra rất nhanh, chỉ sau vài phút đã xuất hiện các dấu hiệu nhiễm độc. Quá trình hấp thụ qua da chậm hơn, khoảng sau 2 giờ mới bắt đầu có các dấu hiệu của sự ức chế enzyme AChE, những dấu hiệu này kéo dài 2 ngày [128]. Các hợp chất OP dễ tan trong lipid, chúng được hấp thụ nhanh chóng vào máu, các dịch thể của tổ chức và đạt được nồng độ cao trong các synap thần kinh trung ương và ngoại vi. Thuốc BVTV gốc lân hữu cơ và các sản phẩm chuyển hóa của nó tập trung cao nhất ở gan và được thải trừ theo đường tiết niệu [50].

Các thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ có thể phân hủy thành những chất ít độc hơn, những chất này có thể hòa tan vào trong nước và thải trừ qua đường tiết niệu. Ngoài ra, chúng cũng có thể chuyển hóa thành dạng khác, độc hơn, ức chế enzyme AChE mạnh hơn. Quá trình oxy hóa các hợp chất OP được thực hiện ở gan, tạo nên axit thiophốt phoric và dithiophốt phoric. Ngoài ra còn có quá trình thủy phân nhờ phản ứng phosphatase, cacboxyleserase, cacboxylamirase [50, 94].

**) Tác động của hợp chất OP đối với môi trường và hệ sinh thái*

Ngoài ảnh hưởng trực tiếp đến người sử dụng, các thuốc BVTV còn ảnh hưởng đến môi trường, các động vật và khu hệ vi sinh vật có ích trong đất. Có thể nói, thuốc BVTV là một trong những yếu tố quan trọng làm mất tính ổn định của quần thể sinh vật.

Thuốc BVTV dùng trên quy mô càng lớn, thời gian dùng càng dài, số lần phun thuốc càng nhiều, sẽ làm giảm càng mạnh số cá thể trong loài và giảm số loài trong quần thể. Đặc biệt, thuốc BVTV nói chung và các hợp chất OP nói riêng có tác động tiêu cực đến thiên địch và các sinh vật khác trong hệ sinh thái. Thuốc BVTV gốc OP có tác động cấp tính đến côn trùng, chim và động vật có vú bằng cách gây ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE).

Malathion, Fenitrothion, Methyl Parathion (Wofatox), Diazinon,... là các nhóm thuốc BVTV gốc OP.

Malathion có độc tính cao với ong, các loài côn trùng có lợi, một số loài cá và các sinh vật thủy sinh khác [84]. Fenitrothion cũng là một nhóm thuốc BVTV OP được biết đến với các tác động tích cực đối với cây trồng, tuy nhiên tồn dư fenitrothion trong môi trường là thách thức lớn, tiềm ẩn nhiều rủi ro cho sức khỏe con người, chất lượng nông sản, môi trường sinh thái.

Việc sử dụng thuốc BVTV có thể làm xuất hiện dịch hại mới hoặc có thể bùng phát dịch hại thứ cấp. Ở Việt Nam, sau 6-7 năm dùng thuốc DDT, Wofatox để trừ sâu hại chính trên chè, cam, quýt và bông đã làm cho nhện hại cây từ chỗ là dịch hại không đáng quan tâm trở thành một loài dịch hại nguy hiểm gây khô lá trên diện rộng. Các loài rệp sáp theo đó cũng phát triển mạnh.

Khi thuốc BVTV bị sử dụng một cách quá mức sẽ gây ra hiện tượng tái phát

của dịch hại. Hiện tượng tái phát rầy nâu *Nilaparvata lugens* ở vùng Đông Nam Á cũng là một ví dụ điển hình. Để chống rầy nâu trên lúa nương, Viện lúa Quốc tế (IRRI) đã phun Decamethrin, Wofatox và Diazinon ở dạng lỏng với lượng 0,75 kg a.i./ha (Lượng hoạt chất cần thiết cho mỗi hecta) vào những ngày thứ 49-72 và 94 sau gieo. Trước khi phun thuốc lần thứ 3, mật độ rầy nâu của ô phun thuốc cao hơn đối chứng theo thứ tự thuốc là 16,4-6,0 và 4,7 lần. Diện tích cháy rầy ở 117 ngày sau gieo cũng ở ô đối chứng là 4%; nhưng ở các công thức phun thuốc lần lượt là 100-75 và 55%. Trên ô phun Bassa và Pertan không có hiện tượng tái phát của rầy [90]. Khi phun thuốc trừ sâu Wofatox cho bông, đã làm tăng lượng trứng đẻ của nhện đỏ *Tetranychus urticae*. Những cá thể sống sót hình thành tính chống thuốc và đã làm thay đổi đặc tính sinh học của loài [13].

1.1.6. Tình hình sử dụng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ ở Việt Nam

Trước năm 1990, phần lớn các thuốc BVTV sử dụng ở Việt Nam là thuốc Lân hữu cơ. Tuy nhiên, do cơ chế tác động lên enzyme acetylcholinesterase nên các thuốc này không chỉ gây độc với côn trùng có hại mà còn ảnh hưởng tới các côn trùng có lợi như ong mật và nhiều động vật khác như giun đất, cá, ếch, chim, động vật có vú, bao gồm cả con người. Việc sử dụng thuốc BVTV rộng rãi và thường xuyên đã gây ra một số vấn đề nghiêm trọng đe dọa sức khỏe con người, cũng như an ninh sinh thái và môi trường [162, 163, 176]. Những ảnh hưởng của loại thuốc trừ sâu này với con người khi tiếp xúc trong thời gian dài gây ngộ độc cấp tính, dị tật thai nhi, nguy cơ cao mắc các bệnh tự miễn dịch [98] nên các thuốc này đã bị hạn chế và cấm dần, thay thế bằng các thuốc nhóm Carbamate và Pyrethroid.

Sau năm 2009, thuốc BVTV được đăng ký sử dụng phổ biến nhất nước ta là Chlorpyrifos ethyl. Chlorpyrifos là một loại thuốc trừ sâu phospho hữu cơ, được thương mại hóa lần đầu tiên ở Hoa Kỳ bởi Dow Chemical Co. (Midland, MI, Hoa Kỳ) vào năm 1965 [178].

Chlorpyrifos là thuốc trừ sâu loại II, có độc tính vừa phải [111], đã được biết đến với công dụng bảo vệ nhiều loại cây trồng, bao gồm ngũ cốc, trái cây, cây nho, rau, cây cảnh và các loại cây trồng có giá trị kinh tế khác để kiểm soát sâu bướm lá lúa, rầy, rệp mật, sâu bông, rệp và nhện đỏ [78, 79]. Chlorpyrifos tác động lên hệ

thần kinh, gây gián đoạn các xung thần kinh và hậu quả là côn trùng bị tiêu diệt [125, 146].

Nghiên cứu về hiện trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) và hiệu quả tài chính trong mô hình canh tác sầu riêng tại Cù Lao Dài, huyện Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long bằng phương pháp khảo sát thực địa và phỏng vấn trực tiếp 40 nông hộ trồng sầu riêng. Giống sầu riêng chủ yếu được trồng là Ri6, có giá trị kinh tế trong vụ nghịch cao hơn so với vụ chính; tuy nhiên, chi phí đầu tư trung bình trên 1 ha trong vụ nghịch cao gấp 1,66 lần so với vụ chính (đặc biệt là chi phí cho việc sử dụng thuốc BVTV). Các loại sâu bệnh xuất hiện chủ yếu là rầy nháy, sâu đục trái, rệp sáp phân, sâu ăn bông, cháy lá. Kết quả nghiên cứu cũng đã ghi nhận được 33 hoạt chất thuốc BVTV được nông hộ sử dụng trong quá trình canh tác sầu riêng. Trong đó, các hoạt chất có độ độc từ nhóm II (trung bình) đến nhóm IV (rất nhẹ) theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế Giới (WHO). Đặc biệt, hoạt chất acephate bị cấm sử dụng vào năm 2019; trong khi đó, Chlorpyrifos ethyl và fipronil là các hoạt chất thuộc danh mục thuốc BVTV bị cấm sử dụng kể từ ngày 12/2/2021 theo quy định của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Liều lượng thuốc BVTV thường được sử dụng cao gấp 1,5-2 lần so với khuyến cáo. Hơn nữa, các phương pháp xử lý bao bì thuốc BVTV được nông dân áp dụng bao gồm đốt, chôn lấp là không đảm bảo an toàn, Để thu gom, xử lý lượng chất thải nguy hại từ hoạt động nông nghiệp, nhiều địa phương trên cả nước đã triển khai xây dựng bể thu gom bao bì hóa chất BVTV. Theo Báo cáo công tác BVMT ngành nông nghiệp năm 2023, đã có 48/63 tỉnh, thành phố có văn bản chỉ đạo về hướng dẫn thu gom, vận chuyển và xử lý bao bì hóa chất BVTV sau sử dụng; 42/63 tỉnh, thành phố có 57.910 bể thu gom. Số lượng bể và mật độ xây dựng bể của mỗi địa phương là rất khác nhau, tuy nhiên nhìn chung vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu thực tế.. Trong số 14 thuốc diệt mối công trình cũng có 01 thuốc diệt mối chứa nhóm OP theo Thông tư số 03/2016/TT-BNNPTNT (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016). Theo Thông tư số 25/2024/TT-BNNPTNT ngày 16 tháng 01 năm 2024 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn ban hành Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và Danh mục thuốc bảo vệ thực vật

cấm sử dụng tại Việt Nam: Danh mục thuốc BVTV cho phép sử dụng vẫn có mặt của Dimethoate - sử dụng trong trừ rệp sáp, sâu xanh, sâu cuốn lá, sâu đục thân và bọ trĩ. Căn cứ Phụ lục II ban hành kèm theo Thông tư số 25/2024/TT-BNNPTNT, trong danh sách 31 hoạt chất bảo vệ thực vật bị cấm đã xuất hiện Methyl Parathion và Parathion Ethyl là những hoạt chất thuộc nhóm Lân hữu cơ [15].

Chlorpyrifos là một loại thuốc bảo vệ thực vật thuộc gốc Lân hữu cơ được sử dụng phổ biến trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng. Hoá chất này có dạng tinh thể không màu hoặc màu trắng, có thể tiêu diệt một phổ rất rộng các loài côn trùng bao gồm muỗi, sâu bướm, rầy nâu, sâu ăn quả, gián ruồi, mối, kiến lửa, v.v. Thông qua cơ chế bất hoạt enzyme acetylcholinesterase, một enzyme đóng vai trò quan trọng trong hoạt động dẫn truyền thần kinh ở động vật. Tuy nhiên, do cơ chế tác động lên enzyme acetylcholinesterase mà Chlorpyrifos gây độc không chỉ với côn trùng có hại mà còn với tác động tới các côn trùng có lợi và nhiều động vật khác. Những ảnh hưởng của loại thuốc trừ sâu này với con người khi tiếp xúc trong thời gian dài bao gồm gây ngộ độc cấp tính, dị tật thai nhi, nguy cơ cao mắc các bệnh tự miễn dịch [98].

Thuốc trừ sâu gốc OP gồm nhiều hoạt chất khác nhau, độc tính và thời gian bán hủy của các hoạt chất vì vậy cũng khác nhau, cụ thể được thể hiện tại bảng 1.3 [109]

Bảng 1.3. Độc tính và thời gian bán hủy của một số thuốc trừ sâu OP

Tên hoạt chất	Loại	Năm bắt đầu sử dụng	Ngưỡng gây chết LD50 đối với động vật (mg/kg)	Thời gian bán hủy trong đất (ngày)
Chlorpyrifos	Thuốc trừ sâu	1965	135-163	10-120
Parathion	Thuốc trừ sâu	1947	2-10	30-180
Methyl parathion	Thuốc trừ sâu	1949	3-30	25-130
Glyphosate	Thuốc trừ cỏ	1971	3530-5600	30-174
Coumaphos	Thuốc trừ nhện, ve	1952	16-41	24-1400
Fenamiphos	Thuốc trừ tuyến trùng	1967	6-10	28-90
Monocrotophos	Thuốc trừ sâu	1965	18-20	40-60
Dicrotophos	Thuốc trừ sâu	1965	15-22	45-60
Diazinon	Thuốc trừ sâu	1953	80-300	11-21

Các công trình nghiên cứu cho thấy Chlorpyrifos có thời gian bán hủy trong đất thay đổi từ 10 đến 120 ngày tùy theo điều kiện và kết cấu của đất, gây

ra mối đe dọa lớn đối với môi trường và sức khỏe cộng đồng [48, 85, 158]. Chlorpyrifos có thể được sử dụng trên nhiều đối tượng cây trồng ở các mô hình canh tác khác nhau.

Căn cứ trên Danh mục “Thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam năm 2018” thì từ tháng 2/2019, hợp chất Chlorpyrifos ethyl và fipronil đã bị cấm sản xuất và lưu hành theo Quyết định 501/QĐ-BNN-BVTV ngày 12/02/2019 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Tuy nhiên, thực tế cho thấy dư lượng Chlorpyrifos nói riêng và các thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ nói chung trong đất canh tác và các loại nông sản vẫn được phát hiện và còn tồn dư; theo đó, việc xử lý ô nhiễm, giảm thiểu tối đa tồn dư thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ trong môi trường và trong sản phẩm nông nghiệp vẫn đang hết sức quan trọng, cần thiết, đặc biệt trong bối cảnh hội nhập quốc tế, tăng trưởng xanh và xuất khẩu nông sản của Việt Nam hiện nay.

Bên cạnh thuốc BVTV có chứa gốc Organic phosphorus gây độc thì các hợp chất phosphorus hữu cơ có nguồn gốc tự nhiên trong đất không gây nguy hiểm trực tiếp. Tuy nhiên, nếu tích tụ quá mức hoặc không được quản lý tốt (đặc biệt từ phân hữu cơ), chúng có thể gây ô nhiễm thứ cấp thông qua quá trình khoáng hóa và rửa trôi. Các hợp chất phosphorus hữu cơ (organic phosphorus compounds) trong môi trường đất có thể phát sinh từ nhiều nguồn khác nhau, bao gồm cả nguồn tự nhiên và nhân tạo, dưới đây là một số nguồn phát sinh chính:

- Phân và chất thải từ động vật chứa nhiều hợp chất hữu cơ chứa phosphorus, như phytic acid (một dạng lưu trữ phosphorus trong hạt) và các phospholipid có trong màng tế bào. Khi phân hủy, các vi sinh vật giải phóng enzyme phosphatases, giúp phân giải các hợp chất này và giải phóng phosphorus vào đất. Các mẫu tàn dư thực vật, lá, cành và rễ khi phân hủy cũng giải phóng các hợp chất hữu cơ chứa phosphorus. Quá trình phân hủy này góp phần vào vòng tuần hoàn tự nhiên của phosphorus trong hệ sinh thái đất [20].

- Nguồn từ phân bón hữu cơ và vật liệu cải tạo đất: Các loại phân bón hữu cơ như phân trộn, phân hữu cơ từ xử lý chất thải sinh học (ví dụ: nước thải sinh hoạt, bùn sau xử lý) thường chứa các hợp chất phosphorus hữu cơ. Khi được bón vào đất, những hợp chất này dần dần phân hủy, cung cấp phosphorus cho cây trồng và động

thời phát thải vào môi trường đất. Một số vật liệu cải tạo đất được sản xuất từ chất thải hữu cơ cũng có thể chứa các dạng phosphorus hữu cơ, góp phần vào tổng lượng phosphorus trong đất [14].

- Nguồn từ hoạt động công nghiệp và nông nghiệp: Các quá trình sản xuất và xử lý trong công nghiệp, đặc biệt là những ngành liên quan đến sản xuất thực phẩm, chế biến nông sản, hoặc xử lý nước thải, có thể tạo ra chất thải chứa các hợp chất phosphorus hữu cơ. Khi những chất thải này được xả ra môi trường đất mà không qua xử lý thích hợp, chúng sẽ góp phần tăng nồng độ hợp chất hữu cơ phosphorus. Một số loại thuốc trừ sâu và các hợp chất hóa học trong nông nghiệp là dạng hợp chất organophosphorus (ví dụ như các loại thuốc trừ sâu organophosphate). Mặc dù các hợp chất này thường được sản xuất để có thể phân hủy trong môi trường, nhưng nếu sử dụng quá mức hoặc quản lý không tốt, chúng cũng có thể tích tụ và phát thải vào môi trường đất [178].

- Quá trình chuyển hóa và tác động của vi sinh vật: Trong môi trường đất, các vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất hữu cơ chứa phosphorus. Các enzyme như phosphatases giải phóng phosphorus từ các hợp chất hữu cơ, tạo ra dạng phosphorus dễ hấp thu cho cây trồng. Quá trình này không chỉ giúp tái tạo phosphorus mà còn đồng thời phát thải các hợp chất trung gian vào đất. Các yếu tố như pH, nhiệt độ, độ ẩm và thành phần vi sinh vật của đất có thể ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy và chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa phosphorus. Điều này dẫn đến sự biến đổi về nồng độ và dạng của phosphorus phát thải vào môi trường [19].

Kết quả nghiên cứu tài liệu, công bố khoa học cho thấy thuốc BVTV nói chung và thuốc BVTV gốc lân hữu cơ nói riêng được sử dụng rất phổ biến tại Việt Nam với nhiều tác dụng mang lại như kiểm soát sâu bướm lá lúa, rầy, rệp mật, sâu bông, rệp và nhện đỏ, ... góp phần bảo vệ mùa màng. Tuy nhiên, việc sử dụng các loại thuốc BVTV này cũng đã gây ra nhiều tác động tiêu cực đến con người, môi trường đất và các hệ sinh thái xung quanh. Vì vậy, việc nghiên cứu, ứng dụng các giải pháp kỹ thuật xử lý hiệu quả thuốc BVTV gốc OP trong môi trường là rất cần thiết.

1.2. Tình hình sản xuất và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trên cây chè ở Việt Nam

1.2.1. Tổng quan cây chè

1.2.1.1. Giới thiệu, phân bố và phân loại chè

Cây chè thuộc ngành hạt kín (Angiospermae), lớp song tử diệp (Dicotyledonae), bộ chè (Theales), họ chè (Theaceae), chi chè (Camellia), loài Sinensis.

Theo các nhà phân loại thực vật của Trung Quốc chia chè làm 4 loại sau:

- Chè *Camellia Sinesis* Var Boheat (chè Trung Quốc lá nhỏ).
- Chè *camellia Sinesis* Var Macrophylla Sieb (Chè Trung Quốc lá to).
- Chè *camellia Sinesis* Var Shan (Chè Shan).
- Chè *camellia Sinesis* Var Assamica Mast – choisy (Atsam - Ấn Độ).

Cả 4 loại chè trên đều được trồng ở Việt Nam nhưng phổ biến nhất là 2 loại chè: Chè *camellia Sinesis* Var Macrophy và Chè *camellia Sinesis* Var Shan đặc biệt là chè Shan được dùng để chế biến chè xanh tốt hơn chè đen.

- *Camellia sinensis* var. macrophylla được trồng nhiều nhất ở các tỉnh trung du với các tên gọi của địa phương (tùy theo màu sắc của lá) như: Trung du lá xanh, Trung du lá vàng, v.v... Tỷ lệ trồng các giống chè trung du ở miền bắc đạt tới 70%. Năng suất búp trong sản xuất đại chè khi chè 5 - 19 tuổi thường đạt 4 - 5 tấn/ha. Các giống chè Trung du chịu được đất xấu, nhưng nhiều sâu hại: rầy xanh, bọ cánh tơ..., ở vùng cao thường bị bệnh phòng lá; chè Trung du thường để chế biến chè xanh.

- *Camellia sinensis* var. Shan được trồng ở miền núi các tỉnh miền bắc và ở miền nam Tây Nguyên (Lâm Đồng). Ở mỗi địa phương có các giống khác nhau như: Shan Mộc Châu, Shan Tham Vè, Shan Trấn Ninh ... Năng suất búp thường đạt 6 - 7 tấn/ha. Búp chè có nhiều tuyết, dùng chế biến chè xanh, chè đen đều cho phẩm chất tốt nhưng thích hợp với chế biến chè xanh hơn. Ngoài ra, còn có một số cách phân loại theo mùa sản xuất, theo thời vụ, theo cách chế biến và theo địa cư.

Trong khi đó, theo phân loại của nhà phân loại thực vật Hà Lan Cohen Stuart (1918) và nhà nông học Pháp Du Pasquier (1923), giống chè có ở Việt Nam chia thành 4 thứ (varietas): Chinemicrophylla, Chine macrophylla, Assamica và Shan và ở Việt Nam hiện nay phổ biến 02 loại:

+ Thù chè Trung Quốc lá to (*Chine macrophylla*), điển hình là giống chè Trung du Bắc bộ, cây thấp thân gỗ nhỏ, phân bố tại Phú Thọ, Thái Nguyên, Yên Bái, Thanh Hoá, Nghệ An... làm trà đen và trà xanh.

+ Thù chè Tuyết (Shan), cây thân gỗ cao to, búp nhiều tuyết trắng, phẩm chất tốt, phân bố tại vùng cao miền núi phía Bắc Việt Nam như Hà Giang, Sơn La, Lào Cai, làm chè mạn, chè vàng; trồng tại các đồn điền chè cũ tư bản Pháp ở Tây Nguyên, chế biến trà đen xuất khẩu [9].

1.2.1.2. Sản xuất chè ở Việt Nam

Tính đến năm 2023 nước ta có tổng diện tích trồng chè ổn định ở mức trên 120 nghìn ha, sản lượng đạt trên 1,1 triệu tấn [36].

Bảng 1.4. Diện tích và sản lượng chè Việt Nam giai đoạn 2010 – 2023

Năm	Diện tích (nghìn ha)	Diện tích cho sản lượng (nghìn ha)	Sản lượng (nghìn tấn)
2010	129,9	113,2	834,6
2011	127,8	114,2	878,9
2012	128,3	114,5	909,8
2013	128,2	114,1	921,7
2014	132,6	115,4	981,9
2015	133,6	117,8	1012,9
2016	133,4	118,7	1033,6
2017	129,3	115,6	972,0
2018	123,0	108,3	993,8
2019	123,3	107,9	1017,6
2020	123,6	109,6	1065,0
2021	123,8	111,2	1091,1
2022	123,4	112,2	1116,7
2023	122,4	112,2	1125,1

Nguồn: Tổng cục Thống kê, 2023

Cây chè được trồng chủ yếu ở khu vực Trung du và miền núi phía Bắc chiếm khoảng 70% diện tích trồng chè cả nước; kế đến là vùng Tây Nguyên với khoảng 19%; vùng Bắc Trung bộ và Duyên hải miền Trung có diện tích chè chiếm 7,0% và khu vực đồng bằng Bắc bộ 4,0%. Một số địa phương có sản lượng chè lớn: Thái Nguyên (264,4 nghìn tấn), Phú Thọ (178,1 nghìn tấn), Lâm Đồng (118,7 nghìn tấn), Nghệ An (112,6 nghìn tấn).

Hiện nay, Việt Nam có trên 170 giống chè các loại đảm bảo chất lượng và cho năng suất cao, với các hương vị đặc biệt được thế giới ưa chuộng, như: Chè shan, PH1, LDP1, LDP2, PT14... và các giống chè nhập nội như PT95, Kim Tuyên, Bát Tiên, Tứ Quý Xuân... Trong đó, chè shan là giống chè quý, được phát triển lâu đời tại một số địa phương khu vực phía Bắc như: Hà Giang, Yên Bái, Sơn La, Điện Biên... Với khoảng trên 24% tổng diện tích trồng chè cả nước. Chè shan bao gồm các giống: Chè shan công nghiệp, shan vùng cao và shan đầu dòng. Hiện những rừng chè shan cổ thụ với nhiều cây hàng trăm năm tuổi của Việt Nam đang cho sản phẩm có nhiều đặc tính quý và là nguyên liệu không thể thiếu để sản xuất chè sạch, chè đặc sản, cũng như các sản phẩm chè chế biến có giá trị gia tăng cao.

Việt Nam có khoảng 300 cơ sở chế biến chè với công suất khoảng 900 nghìn tấn búp tươi/năm, trong đó có khoảng 31 nhà máy có quy mô sản xuất lớn 30 tấn búp tươi/ngày chiếm 47% công suất chế biến; 103 nhà máy có quy mô vừa công suất chế biến 10 đến 28 tấn búp tươi/ ngày chiếm 43%; còn lại là cơ sở chế biến nhỏ công suất từ 3 đến 5 hoặc 6 tấn búp tươi/ngày và các hộ chế biến nhỏ lẻ chiếm khoảng 10% tổng công suất chế biến.

Tổng giá trị sản phẩm chè năm 2022 khoảng 12.600 tỷ đồng, tương đương với 552 triệu USD. Trong tổng số 194 nghìn tấn chè sản xuất trong năm 2022, xuất khẩu chè đạt khoảng 146 nghìn tấn, trị giá 237 triệu USD; Chè tiêu thụ trong nước khoảng 48 nghìn tấn, trị giá khoảng 7.500 tỷ đồng (tương đương với 325 triệu USD). Như vậy, lượng chè tiêu thụ trong nước chỉ bằng 1/3 so với khối lượng chè xuất khẩu, tuy nhiên giá trị tiêu thụ trong nước cao hơn, do tiêu thụ trong nước chủ yếu là các loại chè đặc sản đóng gói. Trong khi giá xuất khẩu chè bình quân của nước ta chỉ đạt 1,65 USD/kg, thì khả năng tiêu thụ chè trong nước ở mức ổn định là

45.000 tấn với giá bán ra thị trường bình quân là 150.000 đồng/kg. Những sản phẩm trà đặc sản có thương hiệu, đạt được giá bán rất cao, từ 200.000 đến 1 triệu đồng/kg.

Ngành chè đã mở ra nhiều cơ hội việc làm cho người lao động, nâng cao đời sống người dân miền núi, giúp họ xóa nghèo, cải thiện được kinh tế gia đình và cả góp phần to lớn trong việc cải thiện kinh tế ở nhiều địa phương.

Sản phẩm chè của Việt Nam đã xuất khẩu tới 74 quốc gia và vùng lãnh thổ, nhưng chủ yếu vẫn là xuất khẩu đến các thị trường ngoài nước dễ tính như Pakistan, Trung Quốc, Nga, Indonesia... Với các thị trường khó tính như Mỹ, EU... thì ngành chè Việt Nam còn gặp nhiều khó khăn trong việc tiếp cận bởi chè Việt Nam phần lớn chưa đạt được những yêu cầu khắt khe về tiêu chuẩn an toàn thực phẩm.

1.2.2. Hiện trạng sử dụng và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ trên đất trồng chè ở Việt Nam

Hiện nay, diện tích trồng chè búp của cả nước ta là khoảng 134,6 ha, sản lượng 1.025,2 nghìn tấn, diện tích ổn định, năng suất tăng gần 1 tạ/ha, quy ra sản lượng chè khô đạt 196 nghìn tấn (năm 2022). Theo báo cáo của Hiệp hội Chè Việt Nam, diện tích trồng chè lớn tập trung chủ yếu ở khu vực trung du và miền núi phía Bắc, sau đó rải rác ở các khu vực như Tây Nguyên, đồng bằng Bắc Bộ và bắc Trung Bộ. Một số tỉnh của nước ta có diện tích đất trồng chè lớn là Thái Nguyên (22,3 nghìn ha), Lâm Đồng (10,8 nghìn ha), Hà Giang (21,5 nghìn ha), Phú Thọ (16,1 nghìn ha). Hiện nay, Việt Nam có đa dạng giống chè, theo thống kê có đến 170 giống chè.

Thực tế, chè xuất khẩu chiếm 2/3 sản lượng, tuy nhiên có rất nhiều những khuyến cáo của các nước nhập khẩu, đưa ra cũng như ý kiến phản hồi về chất lượng sản phẩm chè; nhiều nước đã tạm ngừng nhập khẩu sản phẩm chè do dư lượng thuốc BVTV trên chè xuất khẩu của nước ta quá mức cho phép so với TCVN:2013 – Chè và chè hòa tan dạng rắn [25] và yêu cầu của nước nhập khẩu. Bộ Y tế đã ban hành Thông tư số 50/2016/TT-BYT ngày 30/12/2016 quy định giới hạn tối đa dư lượng thuốc BVTV trong sản phẩm chè như: bifenthrin là 30 ppm, buprofezin là 30 ppm, chlorpyrifos là 2 ppm, clothianidin là 0,7 ppm. Thực tế hiện nay, đã có một số thông báo của Liên minh Châu Âu đề cập đến việc vi phạm quy định về giới hạn dư lượng thuốc BVTV trong sản phẩm chè nhập khẩu từ Việt Nam. Nếu không có

những hành động, giải pháp quyết liệt, cụ thể, thì thương hiệu chè Việt sẽ mất chỗ đứng trên thị trường quốc tế.

Theo Tiêu chuẩn của Liên minh Châu Âu thì MRL (Maximum Residue Limit-“giới hạn tối đa dư lượng”) đối với Chlorpyrifos trong lá chè khô hiện là 0,01 mg kg⁻¹; với đất canh tác Việt Nam chưa có MRL riêng, song ngưỡng nguy cơ sinh thái ngắn hạn thường áp dụng 0,1 mg kg⁻¹. Theo Word Tea News và Cổng thông tin châu Âu cho biết đã phát hiện chlorpyrifos 0,08 mg kg⁻¹ trong lô trà hỗn hợp nhập từ Việt Nam, vượt MRL EU (0,01) gấp 8 lần; cảnh báo mức serious [74]. Năm 2024 ghi nhận thêm 3 cảnh báo OP khác cho hàng Việt Nam (Fenitrothion, Malathion). Và hệ quả là một số nhà nhập khẩu EU tạm ngưng mua chè Việt (Quý IV-2023); giá xuất khẩu bình quân của Việt Nam giảm còn 1 700 USD/tấn, thấp hơn 9 % so 2022. Lịch sử & hiện trạng sử dụng thuốc BVTV gốc lân hữu cơ tại Việt Nam được thể hiện tại bảng 1.5.

Bảng 1.5: Lịch sử & hiện trạng sử dụng thuốc BVTV gốc lân hữu cơ tại Việt Nam

Nhóm hoạt chất OP phổ biến	Công dụng	Trạng thái pháp lý hiện nay
Chlorpyrifos-ethyl	Trừ rầy lách, bọ xít, sâu cuốn lá	Bị loại khỏi Danh mục được phép theo Thông tư 10/2020/TT-BNNPTNT; cấm sản xuất/nhập từ 15/6/2020 & chấm dứt lưu thông từ ngày 12/2/2021 (Thông tư số 10/2019/TT-BNNPTNT)[31].
Diazinon, Malathion	Côn trùng phổ biến	Giảm mạnh đăng ký, nhiều doanh nghiệp tự ngừng do khó đáp ứng MRL EU.
Parathion-methyl (độc tính cao)	Đã từng dùng trước 2010	Cấm hoàn toàn (Thông tư số 21/2015/TT-BNNPTNT ngày 08/6/2015)[30].

Tại Nghệ An nói chung và xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An nói riêng vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá dư lượng thuốc BVTV gốc lân hữu cơ

trong đất trồng chè. Trong khuôn khổ luận án này, nghiên cứu sinh đã thu thập mẫu đất trồng chè tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An để khảo sát, kết quả nghiên cứu cho thấy mức dư lượng của Chlorpyrifos ethyl (hoạt chất điển hình được sử dụng trong sản xuất thuốc BVTV gốc lân hữu cơ thông dụng) được ghi nhận có giá trị trung bình khoảng 0.5 mg/kg, với phạm vi dao động từ 0.3 đến 0.7 mg/kg. Điều này cho thấy, mặc dù thuốc BVTV đã cấm sử dụng từ năm 2019, mức sử dụng thuốc có thể không phổ biến rộng rãi nhưng việc sử dụng không đúng chủng loại, liều lượng và thời gian cách ly vẫn dẫn đến tồn dư thuốc BVTV trong đất ở mức đáng quan ngại.

Như vậy, để khắc phục việc lạm dụng thuốc BVTV nói chung và tình trạng tồn dư thuốc BVTV gốc lân hữu cơ trên cây chè nói riêng, bên cạnh giải pháp tăng cường kiểm tra và quản lý chất lượng chè, tăng cường đào tạo và phổ biến kiến thức sử dụng thuốc cho người làm chè trên địa bàn cả nước, cần đẩy mạnh tiến hành các nghiên cứu tạo ra các chế phẩm sinh học nói chung và chế phẩm vi sinh nói riêng có tác dụng thay thế phân bón hóa học, cũng như khử độc, xử lý ô nhiễm môi trường đất và làm giảm tác hại của thuốc BVTV trên sản phẩm chè tại Việt Nam.

1.3. Vai trò của vi sinh vật trong xử lý thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ

Trong tự nhiên, thuốc BVTV gốc lân hữu cơ (OP) phân hủy khá nhanh, tuy nhiên chúng lại có độc tính cao đối với người và động vật, làm thay đổi đặc tính đất. Các OP có liên kết ester có thể bị thủy phân bởi các tác nhân sinh học (vi sinh vật) và tác nhân khác (hóa học, vật lý, tia xạ...). Sự phân hủy OP bởi vi sinh vật thông qua thủy phân liên kết P–O–alkyl và P–O–aryl được cho là bước quan trọng nhất trong quá trình khử độc chất OP.

Các phương pháp hiện nay để xử lý OP dựa vào xử lý hóa học, đốt và chôn lấp. Phương pháp hóa học có tính khả thi, hiệu quả xử lý nhanh, nhưng có hạn chế bởi dùng lượng lớn thể tích acid hay base mà sau đó cũng cần phải xử lý chất thải thứ cấp phát sinh. Chôn lấp sẽ có nguy cơ thất thoát, rò rỉ OP vào môi trường đất, môi trường nước mặt, nước ngầm và đây là phương pháp xử lý không triệt để. Phương pháp đốt cũng gặp nhiều bất cập như giá thành sự lý cao, sự phản đối của người dân xung quanh, kiểm soát phát thải dioxin/furan trong khí thải khó khăn và

sự phát tán ô nhiễm khí ra môi trường. Xử lý OP nhờ vi khuẩn hoặc enzyme đã nhận được quan tâm, đầu tư đáng kể vì biện pháp này cho thấy thân thiện môi trường, giá thành rẻ và có thể thực hiện tại khu vực có nồng độ ô nhiễm thuốc BVTV, khu vực tồn dư thuốc BVTV ở mức không quá cao.

Trong thời gian vừa qua, đã có nhiều giải pháp áp dụng để xử lý OP gồm phân hủy quang hóa bằng phương pháp vật lý, hóa học như sử dụng vật loại nano kim loại, hấp phụ than sinh học [114], xử lý siêu âm [183], phân hủy bằng xúc tác UV/H₂O₂ [40, 57, 168], quang xúc tác titan dioxide [167] và ứng dụng giải pháp sinh học; trong đó việc sử dụng các chủng vi sinh vật có hoạt tính phân hủy OP được đánh giá như một biện pháp để xử lý hiệu quả và biện pháp này được đánh giá là dễ thực hiện, thân thiện với môi trường và tiết kiệm chi phí [92].

Xử lý sinh học là quá trình sử dụng vi sinh vật để phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các phân tử vô cơ nhỏ, ít có hại hoặc không độc [56, 62, 142].

Năm 1973, vi khuẩn đầu tiên được phát hiện có hoạt tính phân giải OP là *Flavobacterium* sp. ATCC 27551, được phân lập từ ruộng lúa ở Philippine [156]. Sau này, vi khuẩn *Pseudomonas diminuta* cũng được phân lập [155]. Tuy hai vi khuẩn khác nhau và phân lập ở vị trí địa lý khác nhau, nhưng đều sản xuất enzyme OPH có trình tự axit amin giống nhau. Hai gene mã hóa enzyme OPH (opd gene) này đều nằm trên plasmid (có nguồn gốc khác nhau) và gene có trình tự giống nhau. Các gene này được cho rằng là một phần của nhân tố gene di chuyển hay các transposon. Vi khuẩn *Flavobacterium* thủy phân diazinon và parathion (liên kết P-O-C) nhanh chóng, nhưng không thủy phân được malathion (liên kết P-SCH). Chlorpyrifos bị thủy phân bởi cộng đồng vi sinh vật đất chứa các chủng khác nhau thuộc *Pseudomonas*, *Agrobacterium* và *Bacillus* [126]. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Brucella melitensis*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescence*, *Serratia marcescens* đều có khả năng thủy phân 46 - 72% Chlorpyrifos và sử dụng OP làm nguồn C duy nhất trong môi trường lỏng sau 20 ngày. Các vi khuẩn trên đều có khả năng sử dụng OP làm nguồn C, N và P duy nhất. Nhóm vi khuẩn sinh axit lactic thuộc nhóm chức năng, lên men đường hexose và tạo axit lactic. Nhóm này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm,

bao gồm *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*... Trong lên men kim chi, một số vi khuẩn sinh lactic phân giải Chlorpyrifos như *Lactobacillus mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sakei* cũng được phân lập từ nghiên cứu của [95]. Các enzyme OpdB của nhóm này được cho rằng có tiềm năng để khử độc OP trong thực phẩm.

Enterobacter sp. đã được phân lập từ một vùng đất ở Úc có khả năng phân hủy Chlorpyrifos vào năm 2003, vi khuẩn này phân giải Chlorpyrifos thành DETP và TCP và sử dụng DETP làm nguồn cacbon và phospho [159]. Chủng *Arthrobacter* sp. có thể phân giải diazinon và các hợp chất phospho hữu cơ khác như Chlorpyrifos, Parathion,... [138]. Các chủng *Arthrobacter* sp. và *Mycobacterium* sp. phân lập được từ đất bị ô nhiễm dầu mỏ của Hawaii cho thấy chúng rất hiệu quả trong quá trình phân giải OP đặc biệt là diazinon [154]. Chủng *Ochrobactrum* sp. được phân lập năm 2006 có thể sử dụng dichlorvos như một nguồn C duy nhất ở pH 7 và 30°C và phân hủy hoàn toàn sau 24 giờ [177]

Một số vi sinh vật phân hủy OP đã được phân lập, nghiên cứu như *Serratia* sp SPL-2 thủy phân methidathion, *Pseudomonas aeruginosa* is-6 thủy phân acephate, methamidophos, methy parathion, dimethoate, và malathion. Chlorpyrifos bị thủy phân bởi cộng đồng vi sinh vật đất chứa các chủng khác nhau thuộc *Pseudomonas*, *Agrobacterium* và *Bacillus* [126]. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Brucella melitensis*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescence*, *Serratia marcescens* đều có khả năng thủy phân 46-72% Chlorpyrifos và sử dụng làm nguồn C duy nhất trong môi trường lỏng sau 20 ngày. Các vi khuẩn trên đều có khả năng sử dụng OP làm nguồn C, N và P duy nhất.

Nhóm vi khuẩn sinh axit lactic thuộc nhóm chức năng, lên men đường hexose và tạo axit lactic. Nhóm này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, bao gồm *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*...

Vi khuẩn *Serratia marcescens* thủy phân diazinon và đồng thời các loại OP khác như Chlorpyrifos, fenitrothion, và parathion [67]. *Stenotrophomonas* sp. SMP-1 có thể thủy phân hoàn toàn methy parathion cũng như fenitronthion và ethyl parathion và một phần fenthion và phoxim tuy nhiên không thủy phân Chlorpyrifos tại nồng độ

20 mg/L [157]. *Stenotrophomonas* sp. PF32 thủy phân hiệu quả methyl parathion, cũng như phoxim, fenthion, sumithion, triazophos, và Chlorpyrifos. Chúng này thủy phân 99% methyl parathion (100 mg/L), fenthion trong 24h và 99% 100 mg/L chất triazophos trong 42h, và 97% 100mg/L chất Chlorpyrifos trong 48h [179]. Một số chủng thuộc chi *Stenotrophomonas* có thể thủy phân Chlorpyrifos và sử dụng chất sau thủy phân làm nguồn C như trichlorophenol cũng như muối diethyl thiophosphat. Tuy nhiên, các chủng khác như *Stenotrophomonas* sp. YC-1 có thể sử dụng Chlorpyrifos làm nguồn C, nhưng không thủy phân được tiếp sản phẩm như trichlorophenol. *Stenotrophomonas* YC-1 và DSP-4 thủy phân hoàn toàn Chlorpyrifos (100 mg/L) trong 24h [62]. Vi khuẩn *Stenotrophomonas* thường được phát hiện với số lượng vượt trội trong môi trường nhiễm Chlorpyrifos. Vi khuẩn *Stenotrophomonas acidaminiphila* được phân lập từ bùn thải của nhà máy sản xuất Chlorpyrifos (Jiangsu, Trung Quốc), thủy phân được 8 loại thuốc OP, trong đó Chlorpyrifos, parathion, phoxim, diazinon, methyl paraoxon bị thủy phân 99-100% trong 24h [68].

Các nghiên cứu về vi sinh vật phân giải gốc Lân hữu cơ chủ yếu tập trung vào vi khuẩn. Tuy nhiên, một số nấm mục trắng thuộc *Basidiomycetes* như *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida* cũng có tiềm năng để xử lý, sử dụng phục hồi môi trường nhiễm OP. Nấm *Penicillium lilacinum* BP303 đã được phân lập từ đất trồng cây bông được bón thuốc demeton-S (4kg/ha/năm) và parathion (5kg/ha/năm). Nấm *P. lilacinum* thủy phân được một loạt chất OP gồm methyl parathion, parathion, paraoxon, coumaphos, demeton-S, malathion, phosmet [120]

Phân tích khả năng phân giải các hợp chất phospho hữu cơ (Chlorpyrifos, fenitrothion và parathion) của chủng *Serratia marcescens*, kết quả cho thấy chủng này có thể sử dụng các loại thuốc BVTV này như một nguồn C duy nhất [52]. Chủng *Bacillus aryabhatai* đã phân lập được từ đất nông nghiệp của Tây Bengal Ấn Độ có thể phân giải hiệu quả Chlorpyrifos với nồng độ tối ưu 200 mg/mL [140]. Tương tự, *Stenotrophomonas* sp. được phân lập từ bùn công nghiệp ở Trung Quốc có thể làm giảm 63% lượng Chlorpyrifos trong vòng 24 giờ với nồng độ ban đầu là 50 mg/mL.

Ở Việt Nam, mặc dù tình hình sử dụng thuốc BVTV có chứa gốc Lân hữu cơ là phổ biến, dẫn đến dư lượng thuốc BVTV tồn dư vượt mức cho phép. Tuy vậy,

hiện vẫn còn rất ít công trình nghiên cứu sử dụng biện pháp sinh học để loại bỏ hoạt chất gốc Lân hữu cơ tích tụ, tồn dư trong đất và xử lý ô nhiễm môi trường đất. Một số công trình nghiên cứu phân lập chủng vi sinh vật phân giải gốc Lân hữu cơ và có những kết quả nhất định. Tuy vậy, các chủng vi sinh vật phân giải gốc Lân hữu cơ vẫn chưa được miêu tả, xác định vị trí phân loại và chưa có công bố sử dụng các vi sinh vật cũng như enzyme OPH để loại bỏ hoạt chất gốc Lân hữu cơ trên các mẫu môi trường khác nhau. Sau đây là một số công trình tiêu biểu:

- Hai chủng vi khuẩn PH-C3.1 và PH-C4.3 được phân lập năm 2014 có thể phân hủy Chlorpyrifos với hiệu suất 13,96 và 49,72% sau 30 ngày. Tuy nhiên, 2 vi khuẩn này cũng chưa được xác định hệ thống phân loại [18].

- Nghiên cứu phân lập vi khuẩn phân giải diazinon ở đồng bằng sông Cửu Long: Kết quả đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải diazinon (20 mg/L) và có 4 chủng phân giải mạnh 15,4 - 27,% sau 30 ngày nuôi. Tuy nhiên, các chủng này chưa được miêu tả chi tiết cũng như hệ thống phân loại chưa được nghiên cứu [4].

- Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tốc độ phân hủy Chlorpyrifos của 3 chủng vi khuẩn hiếu khí *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Sphingomonas pseudosanguinis* đạt giá trị cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường MSM ở nhiệt độ là 30°C, pH = 7, nồng độ Chlorpyrifos bổ sung vào trong môi trường từ 10 mg/L - 40 mg/L. Kết quả này cho thấy tiềm năng cao trong việc sử dụng các chủng vi khuẩn hiếu khí để loại bỏ tồn dư thuốc BTVT Chlorpyrifos trong đất nông nghiệp [38].

- Năm 2018, nghiên cứu đánh giá hệ vi sinh vật (VSV) phân giải Lân trên đất phù sa ở Hà Nội và Hưng Yên cho thấy có sự xuất hiện của nhóm vi khuẩn và xạ khuẩn phân giải Lân. Trên cả 2 loại đất, mật độ VSV phân giải Lân vô cơ chiếm ưu thế hơn so với hữu cơ và hoạt tính phân giải Lân hữu cơ dạng lecithine là không cao khoảng 0 - 1,83 mg/L [1].

- Nghiên cứu về sử dụng vi sinh vật phân giải Lân ở Việt Nam, các vi sinh vật phân giải Lân khó tan được biết đến nay thuộc các loài: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Penicillium*, *Sclerotium* và *Aspergillus*. Các

vi sinh vật này không chỉ phân giải Lân mà còn có khả năng khoáng hóa các hợp chất Lân hữu cơ và một số có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng vi sinh vật vùng rễ cây trồng. Nghiên cứu cũng đưa ra quy trình sản xuất phân bón vi sinh vật phân giải Lân từ 3 chủng thuộc chi *Bacillus* (*B. polymixa*, *B. polyfermenticus*, *B. subtilis* đều là những chủng có khả năng phân giải Lân và tổng hợp IAA) [18].

Nhiều chủng vi khuẩn và nấm đã được sử dụng thành công để phân hủy/biến đổi sinh học của nhóm thuốc BVTV này và cơ chế của quá trình phân hủy cũng đã được xác định [106]. Một số loại vi sinh vật có khả năng phân hủy Chlorpyrifos như *Pseudomonas* sp. CB2 [180], *Paracoccus* sp. TRP [116], *Sphingomonas* sp. Dsp-2 [117], *Alcaligenes faecalis* DSP3, *Streptomyces* sp.AC5, *Bacillus cereus* MCAS02, *Cupriavidus* sp. DT-1 [121], *Ochrobactrum* sp. JAS2 [39], *Klebsiella* sp. [61] v.v.

Mặc dù tình hình sử dụng thuốc BVTV chứa lân hữu cơ là phổ biến, dẫn đến dư lượng thuốc vượt mức cho phép. Tuy vậy, hiện vẫn còn ít công trình nghiên cứu sử dụng biện pháp sinh học để loại bỏ hoạt chất OP. Một số công trình nghiên cứu phân lập chủng vi sinh vật phân giải OP có những kết quả nhất định, tuy nhiên, các chủng vi sinh vật phân giải OP vẫn chưa được miêu tả, xác định vị trí phân loại và chưa có công bố sử dụng các vi sinh vật cũng như enzyme OPH để khử độc OP trên các mẫu khác nhau.

Cơ chế phân giải OP của vi sinh vật:

Các nghiên cứu đã chỉ ra có 2 con đường phân giải OP của vi sinh vật:

- Tác động trực tiếp của vi sinh vật qua các phản ứng oxy hóa, oxy hóa khử, thủy phân bằng cách phá hủy các liên kết P-O-alkyl và P-O-aryl với sự xúc tác của enzyme hydrolase, phosphotriesterase và phosphatase. Các enzyme này được vi sinh vật sinh ra hoặc do môi trường xung quanh biến đổi tạo các đột biến gen và hình thành hệ thống gen mới.

- Hoạt động của vi sinh vật làm thay đổi tính chất vật lý hoặc hóa học của môi trường, từ đó OP sẽ được phân hủy: Khi Chlorpyrifos được phân hủy bởi vi sinh vật hoặc dưới tác động hóa, lý sẽ tạo thành 3,5,6-Trichloropyridine-2-ol (TCP) [107, 115], là hợp chất trung gian có tác động tiêu cực đến vi sinh vật đất [58, 92, 162; 178]. Do vậy, trong thực tế việc phân giải Chlorpyrifos thành các sản phẩm

đơn giản phụ thuộc vào hệ vi sinh vật đất tham gia chuyển hóa lần lượt các hợp chất trung gian này.

Dưới sự hoạt động của các chủng *Pseudomonas* spp., ở giai đoạn đầu Chlorpyrifos có thể bị oxy hóa nhóm S để thành Chlorpyrifos oxon trước khi được thủy phân để thành DETP và TCP [77, 110]. Sau đó TCP có thể được methyl hóa thành 3,5,6-Trichloro-2-methoxypyridine (TMP), tiếp theo TMP được chuyển hóa thành 2,3-Dihydroxypyridine để vào con đường phân giải thông thường. Đối với DETP sẽ được chuyển hóa thành ethanol và phosphoric acid, từ đó chuyển thành thiophosphate [85].

Feng và cộng sự đã phân lập được 5 loài vi khuẩn gồm *Pseudomonas* sp. RRA, *Bacillus* sp. RRB, *Sphingobacterium* sp. RSA, *Stenotrophomonas* sp. RSB và *Curtobacter* sp. RSC từ canh tác lúa; kết quả đã xử lý được đất lúa bị ô nhiễm Chlorpyrifos ở mức 90%, 5 mg/L. Tổ hợp vi khuẩn gồm *Bacillus* sp. CP6 và *Klebsiella* sp. CP19 được nghiên cứu để tăng cường sự phân hủy Chlorpyrifos trong đất bằng cách tối ưu hóa các thông số khác nhau và nó cũng có thể tồn tại trong môi trường chứa kháng sinh [72]

Bên cạnh vi khuẩn, các enzyme vi sinh vật (như enzyme esterase từ *Pseudomonas* sp. C11 và enzyme hydrolase từ *Arthrobacter* sp. HM01) cũng được sử dụng trực tiếp để xử lý thuốc BVTV (OP, pyrethroid và carbamide) [55, 75, 124]. Vi khuẩn có các enzyme cụ thể đóng vai trò thiết yếu trong việc phân hủy thuốc BVTV [75].

Các enzyme có khả năng phân hủy thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ đóng vai trò quan trọng trong việc giảm thiểu tác động độc hại của các hợp chất này đến môi trường và sức khỏe con người. Dưới đây là các enzyme chính có khả năng phân hủy thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ:

+ Enzyme Phosphotriesterase (PTE):

PTE có khả năng xúc tác thủy phân một số thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ bao gồm parathion, methyl parathion, fensulfothion, trong số những loại khác [69]. Ngoài ra, PTE có khả năng thủy phân các chất độc thần kinh sarin, soman nhưng hiệu quả xúc tác đối với các chất nền này không cao [70].

Cơ chế hoạt động: Phosphotriesterase thủy phân liên kết ester trong các hợp chất Lân hữu cơ, chuyển đổi chúng thành các sản phẩm ít độc hại hơn. Enzyme có khả năng phân hủy parathion thành p-nitrophenol và diethyl thiophosphate, Phân hủy methyl parathion thành p-nitrophenol và dimethyl thiophosphate. Enzyme này được tìm thấy trong vi khuẩn (ví dụ: *Pseudomonas diminuta*, *Agrobacterium radiobacter*).

+ Enzyme Carboxylesterase (CES)

Cơ chế hoạt động: Carboxylesterase thủy phân các liên kết ester trong hợp chất Lân hữu cơ, làm giảm độc tính của chúng. Malathion bị phân hủy bởi carboxylesterase thành các dẫn xuất monoacid và diacid của nó; đây là cơ chế chuyển hóa chính để phân hủy malathion bởi vi sinh vật. Trong các nghiên cứu trước đây, carboxylesterase đã được phân lập từ *Bacillus cereus*, *Brevibacillus* và *Lysinibacillus*, và một loại enzyme carboxylesterase mới cũng đã được phân lập từ *Acinetobacter baumannii* [76, 127, 164, 166]

+ Enzyme Organophosphate Hydrolase (OPH): OPH là một enzyme quan trọng trong quá trình giải độc Chlorpyrifos. Enzyme này thủy phân nhiều loại hợp chất như paraoxon, parathion, diazinon và cyanophos [69]

+ Enzyme Cytochrome P450: Cytochrome P450 oxy hóa các hợp chất Lân hữu cơ, chuyển đổi chúng thành các chất trung gian dễ phân hủy hơn. Chlorpyrifos có thể được hoạt hóa bởi cytochrome P450 thông qua phản ứng khử lưu huỳnh để tạo thành Chlorpyrifos-oxon, một chất kháng cholinesterase mạnh [100]

+ Enzyme Glutathione S-Transferase (GST): GST kết hợp glutathione với các hợp chất Lân hữu cơ, tạo thành các sản phẩm ít độc hại hơn. Enzyme có khả năng phân hủy methyl parathion thành các sản phẩm liên hợp với glutathione, glutathione S-transferase (GST, EC. 2.5.1.18) còn tham gia vào quá trình phân hủy các chuỗi alkyl/aryl của OP [171].

+ Enzyme Alkaline Phosphatase (ALP): Enzyme ALP có khả năng phân hủy parathion thành p-nitrophenol và diethyl phosphate, phân hủy Chlorpyrifos từ nồng độ ban đầu 100 ppm xuống còn 20 ppm trong 1 giờ, Chlorpyrifos được ALP hoạt hóa thành 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol [152].

Cho đến nay, vẫn chưa có nhiều kết quả về nghiên cứu, ứng dụng phân hủy sinh học Chlorpyrifos ethyl trong điều kiện yếm khí. Tuy nhiên, cơ chế phân hủy của Chlorpyrifos ethyl cũng tương tự như sự phân hủy các độc chất hữu cơ khác, đó là khả năng sử dụng các độc chất như nguồn carbon duy nhất và sự khử gốc chlor ở vòng thơm trong hô hấp yếm khí. Đối với các hợp chất hữu cơ chứa cả carbon và nitơ, vi khuẩn có thể sử dụng vừa làm nguồn carbon vừa làm nguồn nitơ cung cấp cho sự sống, giúp phá vỡ cấu trúc và gây mất hoạt tính sinh học ban đầu của hợp chất. Riêng với quá trình khử loại bỏ gốc chlor được thực hiện bởi một vài loài vi khuẩn kỵ khí bắt buộc có khả năng loại bỏ gốc halogen, được gọi là halorespiration hay dehalorespiration. Sự loại bỏ gốc chlor chủ yếu nhờ vào quá trình hô hấp yếm khí. Tương tự như cơ chế phân hủy Dioxins, Chlorpyrifos ethyl và các độc chất hữu cơ khác đóng vai trò là chất nhận điện tử. Chất cho điện tử là quá trình lên men các acid hữu cơ như acid butyric, acid pyruvic để sản sinh hydro nguyên tử thay thế cho vị trí gốc chlor. Tuy các phân tử hữu cơ không bị phân hủy hoàn toàn trong hô hấp yếm khí nhưng sự loại bỏ gốc chlor sẽ giúp giảm độc tính ban đầu của chúng một cách đáng kể.

Từ những nghiên cứu tổng quan các công trình thực nghiệm về khả năng ứng dụng VSV trong phân giải thuốc BTVT gốc lân hữu cơ nói chung và Chlorpyrifos nói riêng có thể thấy tiềm năng cao trong việc sử dụng các chủng vi khuẩn hiếu khí để loại bỏ tồn dư thuốc BTVT Chlorpyrifos trong đất nông nghiệp. Các nghiên cứu tập trung chủ yếu vào nhóm vi khuẩn, các vi sinh vật này không chỉ phân giải lân mà còn có khả năng khoáng hóa các hợp chất lân hữu cơ và một số có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng vi sinh vật vùng rễ cây trồng. Ngoài vi khuẩn, một số nghiên cứu phát hiện nấm mốc cũng có khả năng tái tạo môi trường nhiễm OP. Về bản chất, những VSV này sẽ sản xuất ra enzyme, dưới tác dụng của enzyme, thuốc BTVT OP có thể bị chuyển hoá theo nhiều cơ chế thành những hợp chất mới có cấu trúc đơn giản hay phức tạp hơn, từ đó làm thay đổi hoạt tính sinh học ban đầu của thuốc. Các thuốc BTVT và trừ nấm gốc lân hữu cơ bị phân giải qua từng bước và sản phẩm cuối cùng là acid phosphoric không độc. Khi VSV sử dụng OP làm nguồn thức ăn cho chúng, độc tính của thuốc vì vậy cũng có khả năng

suy giảm. Dưới tác động của VSV trong điều kiện yếm khí, tuy các phân tử hữu cơ không bị phân hủy hoàn toàn trong nhưng sự loại bỏ gốc chlor sẽ giúp giảm độc tính ban đầu của chúng một cách đáng kể. Một số nghiên cứu cũng phát hiện ra nhiều VSV có khả năng này là do chúng đều sản xuất enzyme OPH có trình tự axit amin giống nhau, gene mã hóa enzyme OPH (opd gene) này nằm trên plasmid. Mặc dù có tiềm năng như vậy, nhưng những nghiên cứu sâu về VSV phân giải OP vẫn còn tản mạn, chưa đi sâu vào cơ chế, bản chất di truyền và chưa có đánh giá hiệu quả ứng dụng thực tiễn một cách bài bản.

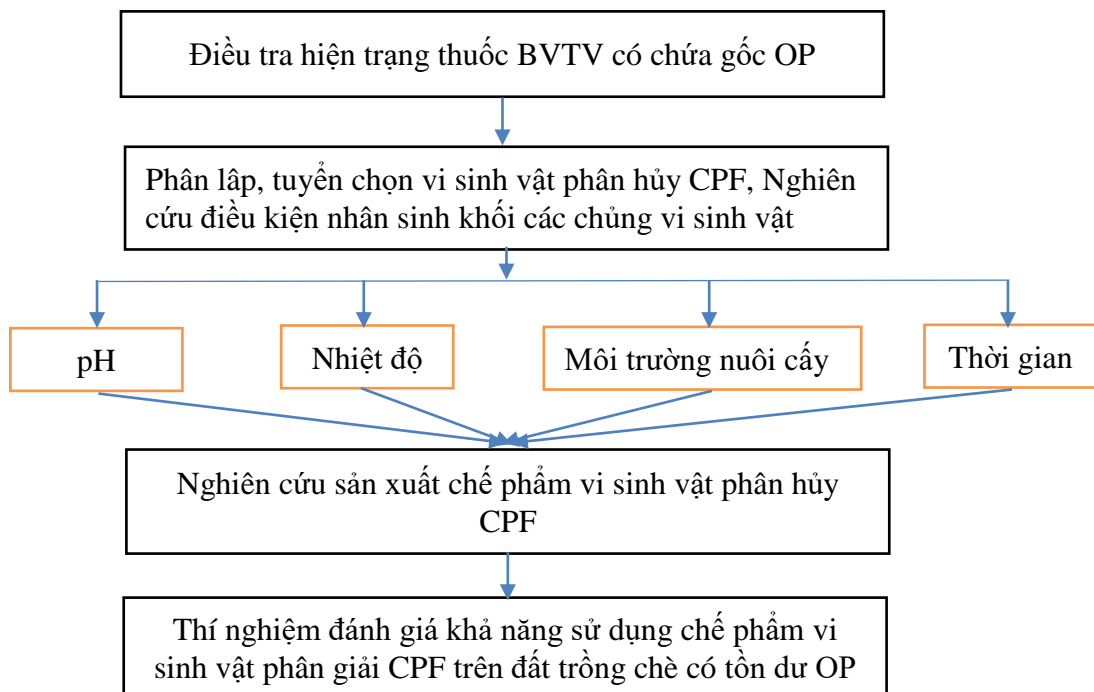
CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải thuốc BVTV gốc lân hữu cơ được phân lập từ đất trồng chè tại tỉnh Nghệ An.

- Đất nông nghiệp khu vực thâm canh chè có dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ.

Sơ đồ logic của đề tài được thể hiện như sau: Từ đất trồng chè có dư lượng CPF → Phân lập các chủng VSV có hoạt tính phân giải CPF → Đánh giá hoạt tính phân giải CPF của các chủng để chọn chủng có hoạt lực mạnh → Đánh giá tính an toàn sinh học để chọn chủng có khả năng phóng thích ra môi trường, an toàn cho hệ sinh thái → Nghiên cứu các thông số kỹ thuật (pH, nhiệt độ, môi trường lên men, tỉ lệ giống cấp 1, liều lượng cấp khí) phù hợp để tạo sinh khối cao nhất cho các chủng lựa chọn → Sản xuất chế phẩm từ các chủng được tuyển chọn → Ứng dụng chế phẩm trên quy mô diện hẹp và diện rộng → Đánh giá kết quả ứng dụng ngoài thực tiễn thông qua khả năng phân giải CPF của chế phẩm và năng suất, chất lượng chè → Đưa ra các kết luận, kiến nghị. Sơ đồ khối được trình bày tại hình 2.1



Hình 2.1. Sơ đồ thể hiện quy trình nghiên cứu của luận án

Sơ đồ nghiên cứu trên cho thấy trình tự logic của quá trình nghiên cứu: từ điều tra hiện trạng, phân lập vi sinh vật, tối ưu điều kiện nuôi cấy, sản xuất chế phẩm, đến thử nghiệm ngoài thực địa và đánh giá hiệu quả xử lý chất ô nhiễm.

2.2. Phạm vi nghiên cứu

- Nghiên cứu cơ bản được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Môi trường Nông nghiệp (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam); ngoài ra còn có sự hỗ trợ của một số phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ sinh học (Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (Đại học Quốc gia Hà Nội).

- Nghiên cứu đánh giá khả năng sử dụng vi sinh vật có khả năng phân giải thuốc BVTV gốc lân hữu cơ đối với đất trồng chè thuộc Hợp tác xã chè Minh Sáng, xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An.

- Nghiên cứu được thực hiện từ 9/2019 – 6/2024.

2.3. Thiết bị, hoá chất và dụng cụ thí nghiệm

Liệt kê tại phụ lục 1.

2.4. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu:

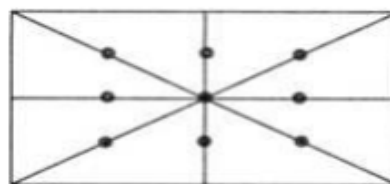
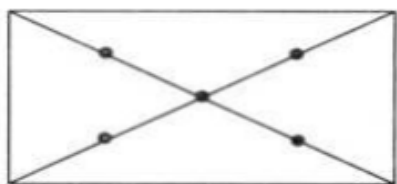
Mẫu chè và đất trồng chè được thu thập tại Nghệ An, Thái Nguyên, Lâm Đồng.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu.

- Phương pháp lấy mẫu chè: Thực hiện theo QCVN 01-28:2010/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia: Chè - Quy trình lấy mẫu phân tích chất lượng, an toàn vệ sinh thực phẩm.

Trước khi lấy mẫu phải rải và trộn đều chè trên nền nhà thành một lớp dày không quá 30cm. Với lô chè dưới 1 tấn, lấy mẫu ở 5 vị trí và lô chè trên 1 tấn lấy mẫu ở 8 đến 9 vị trí như sau:



Khi lấy mẫu phải bốc chè từ trên mặt đến nền, tổng khối lượng mẫu của 1 lô hàng không ít hơn 1 kg. Lượng mẫu trên được trộn và rải thành lớp phẳng hình vuông.

Chia mẫu theo hai đường chéo, lấy hai phần đối diện và tiếp tục làm như vậy cho đến khi lượng mẫu còn lại khoảng 200 g (hoặc 400 g nếu cần phải lưu mẫu).

- Phương pháp lấy mẫu đất: Thực hiện theo TCVN 7538-2:2005 (ISO 10381-2:2002): Chất lượng đất - Lấy mẫu - Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.

Mẫu đất được thu tại 5 vị trí trên cùng một luống chè theo hình zigzag, thu ở độ sâu 20cm; sau đó trộn đều các mẫu lại và lấy 1 mẫu đại diện với trọng lượng 2kg. Đất đã thu xong sẽ cho vào bao nylon màu đen (2 lớp), ký hiệu mẫu và trữ lạnh rồi chuyển về phòng thí nghiệm để thực hiện các nghiên cứu.

- Phương pháp bảo quản mẫu: Mẫu được bọc kín trong túi đen hoặc trong thùng xốp để tránh ánh nắng, tia UV và được bảo quản lạnh trong quá trình vận chuyển.

2.5.2. Phương pháp phân tích hàm lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ

Quá trình chiết OP được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Gan & cs. (1999) [82]. Cụ thể, 10 g mẫu được lắc với 20 mL dung môi methanol/nước (4:1), sau đó ly tâm 10.000 v/phút, 15 phút, gạn lấy phần dịch nổi. Lặp lại quá trình chiết 2 lần và gộp lại, cô quay chân không cho tới 15 mL. Dịch sau đó được axit hóa bằng HCl tới pH ~1,0 và chiết phân đoạn với chloroform (30 mL) bằng phễu. Sau đó, pha hữu cơ được loại làm khô trong chân không và hòa lại bằng 10 mL acetone.

Xác định nồng độ CPF: CPF trong mẫu lỏng được chiết bằng ete dầu mỏ trong 1 phút. Dung dịch chứa CPF được đo ở bước sóng 294 nm bằng phương pháp quang phổ. Các mẫu CPF được lắc với 5 mL acetonitrile và lọc bằng bộ lọc xi lanh 0,22 µm. Nồng độ CPF được đo bằng HPLC ở bước sóng 300 nm [77]. Cột được sử dụng là XDB-C18 (5 Mm, 4.6x250 mm). Pha động là hỗn hợp acetonitrile và dung dịch đệm chứa axit axetic và nước. Thời gian lưu giữ của CPF là 9,5 phút. Nồng độ CPF còn lại trong mẫu đất được xác định bằng GC/MS [78]

Công thức chung tính hàm lượng CPF:

$$\text{Hàm lượng CPF } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \frac{C \times V}{m}$$

Trong đó:

C: Nồng độ CPF trong dung dịch chiết (mg/L), đọc GC/MS qua đường chuẩn.

V: Thể tích dung dịch cuối cùng sau chiết (L), ở đây là 10 mL = 0,01 L.

m: Khối lượng mẫu đất (kg), ở đây là 10 g = 0,01 kg.

2.5.3. Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật.

- *Xác định mật độ vi sinh vật theo TCVN 4884-1:2015 - Phần 1 [26]*

Cân 10g mẫu vào bình tam giác dung tích 250ml có chứa 90ml nước cất đã khử trùng. Lắc trên máy lắc 150 vòng/phút trong 30 phút, thu được dịch pha loãng có nồng độ là 10^{-1} . Sau đó, hút 1ml dịch trong bình pha loãng nồng độ 10^{-1} sang ống nước cất 9ml đã khử trùng, được nồng độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục pha loãng như trên, được nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} ... đến nồng độ pha loãng cần thiết. Hút 0,05ml dịch đã pha loãng nhỏ vào các hộp petri chứa môi trường thạch thịt-pepton. Dùng que trang thủy tinh (đã vô trùng), trang đều lên mặt môi trường trong hộp petri. Sau khi trang xong dùng giấy gói lại và chuyển các hộp petri chứa vi sinh vật vào tủ ấm và nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ thích hợp. Sau khoảng từ 2- 4 ngày nuôi cấy, lấy mẫu ra quan sát và đếm số khuẩn lạc mọc trên các hộp petri (*chỉ đếm ở các nồng độ pha loãng có 50-399 khuẩn lạc*). Số lượng khuẩn lạc được tính bằng công thức:

$$N = \frac{\sum C}{d(n_1 + 0,1n_2)}$$

Trong đó:

N: là số vi sinh vật trong một đơn vị kiểm tra (CFU/g (ml));

$\sum C$: là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa Petri được giữ lại;

n_1 : là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 : là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d : là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

- *Phương pháp phân lập vi sinh vật có khả năng phân giải thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ*

Khối lượng và loại mẫu: Lấy chính xác 5 g đất hoặc bùn (tươi, đồng nhất); nếu là nước cống thì lấy 5 ml, lắc đều trước khi pha loãng.

+ Phân lập: Hòa tan mẫu vào 45 ml dung dịch NaCl 0,85%, sau đó lắc đều 15–30 phút trên máy lắc ngang trước khi tiến hành pha loãng, cấy phân lập trên môi trường chuyên biệt chứa Chlorpyrifos để tuyển chọn chủng phân giải thuốc BVTV.

* Với cơ chất malathion và Chlorpyrifos

5 g mẫu đất được chuyển vào 95 mL môi trường MSM có chứa 50 mg/L cơ chất (malathion, Chlorpyrifos) và nuôi tại 28°C, lắc 120 v/ph, thời gian 5 ngày. Quá trình làm giàu lặp lại 3 lần. Sau đó, dịch nuôi cấy được pha loãng tại các giá trị nhất định và 50 µL dịch được trải trên đĩa thạch MSM có chứa 50 mg/L cơ chất. Sau khi ủ 28°C, các khuẩn lạc được chọn và cấy ria trên đĩa thạch mới chứa OP cho tới khi các khuẩn lạc đồng nhất (cùng có cùng hình dáng, màu sắc ...).

* Với cơ chất (methyl) parathion.

5 g mẫu đất, bùn (hoặc nước cống) được chuyển vào 95 mL môi trường MSM có chứa 50 mg/L cơ chất (hòa trong 5% methanol và lọc qua màng lọc 0.22 µm) và nuôi cấy 28-30°C, lắc 120 v/ph từ 7-14 ngày. OP được sử dụng như nguồn C và năng lượng duy nhất. 50-100 µL mẫu được trải đều trên đĩa thạch MSM chứa 100 mg/L parathion. Sau 3 ngày ủ tại 30°C, các khuẩn lạc tạo vòng màu vàng được lựa chọn, tinh sạch.

- *Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, hóa sinh của các chủng vi sinh vật:*

Các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng VSV theo kit API 20NE (đối với các chủng vi khuẩn Gram (-), không thuộc loại Enterobacter), kit API20E, và kit API 50CHB để xác định vi khuẩn Gram (+). Định tên vi khuẩn dựa vào kết quả phân tích của phần mềm APILAB PLUS 3.3.3 kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey [99].

2.5.4. Phân loại vi sinh vật bằng phương pháp sinh học phân tử

• Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

Quy trình tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp CTAB/NaCl của Ausubel [49]

(1) Vi khuẩn nuôi trong 24 giờ trên môi trường thạch thu sinh khối hòa trong 1,5 ml nước khử trùng. (2) Cặn tế bào được thu bằng cách ly tâm lạnh trong ở tốc độ 5000 vòng/5 phút để thu sinh khối. (3) Cặn tế bào hòa trong 567 µl TE, 5 µl lysozym mix đều ủ 37°C trong 20 phút. (4) Bổ sung 3 µl proteaza K, 30 µl SDS 10 % vào dung dịch trên mix đều ủ 37°C trong 30 phút. (5) Sau đó bổ sung 100 µl NaCl 5 M, mix đều, bổ sung tiếp 80 µl dung dịch CTAB/NaCl (10% cetyltrimethylammonium bromide, 0.7 M NaCl) mix đều ủ 65 oC/10 phút. (6) Chiết 1 V hỗn hợp chloroform: isoamyl (24 : 1), vortex. (7) Ly tâm 12000

vòng/phút thu dịch nổi (lặp lại chiết dung môi hai lần). (8) Bổ sung 10 µl Na-acetat 3 M, mix đều, bổ sung tiếp 2 V cồn 100 % (lạnh) hoặc 0,7 V isopropanol (lạnh), mix đều. (9) Để lạnh ở -20°C ít nhất 4 giờ. (10) Ly tâm 12000 vòng/20 phút thu cặn. (11) Rửa rửa bằng 500 µl cồn 70°, ly tâm 12000 vòng/10 phút, thu cặn. (12) Làm khô. (13) Hòa cặn trong 40 ÷ 60 µl TE - ARNaza, ủ ở 37°C/ 1 giờ. (14) Kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 260 nm và 280 nm. CDNA (protein) = A260 (280) x 50 x độ pha loãng mẫu. Tỷ lệ DNA/protein > 1,8 là mẫu sạch. (15) Điện di kiểm tra trên gel agarosa 0.8 %, điện thế 100 V. Nhuộm bản gel trong dung dịch ethidium bromit 1 %/ 10 phút.

• Nhân bản đoạn DNA thuộc gen 16S rARN bằng PCR

Thu nhận đoạn gen 16S rARN bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi Pr16F và Pr16R. (Pr16F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; Pr16R: TACGGTTACCTTGTTACCGACTT)

PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 µl/ mẫu: DNA tổng số (1 µl), 16F(1 µl), 16R (1 µl), dNTPs 10 mM (2 µl), Taq polymeraza (0,25 µl), đệm Taq polymeraza 10 X (5 µl), nước khử ion.

Chu trình nhiệt: (1) 94°C - 3 phút, (2) 94°C - 1 phút, (3) 55°C - 1 phút, (4) 72°C - 2 phút. Lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2-4; 72°C - 7 phút. Giữ ở 4°C.

Điện di kết quả: Lấy 5µl sản phẩm PCR để điện di kiểm tra trên agarose 0,8% với điện thế 100V trong 30 phút.

• Tinh sạch sản phẩm PCR:

Tinh sạch sản phẩm PCR: Các chủng dương tính được tinh sạch bằng bộ kit Gel jet extraction kit (fermentas). Quy trình:

- Thêm 25µl Binding bufer theo tỉ lệ 1:1 với 25 µl DNA, mix đều.
- Chuyển hỗn hợp dung dịch lên cột liên kết DNA và ly tâm 12000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch chảy qua cột.
- Tiếp tục bổ sung 300µl cồn 70° hoặc 500 µl đệm rửa WB (Washing Buffer), ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch chảy qua cột. Chuyển cột sang ống Eppendorf mới. Mở nắp cho bay hơi cồn.
- Bổ sung 20 µl nước khử ion khử trùng, để ở nhiệt độ phòng 1 phút và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút để thu mẫu DNA.

• Xác định trình tự gen 16s rARN

(1) Trình tự DNA được xác định bằng kit Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Weiterstadt, Đức), sản phẩm được phân tích trên

máy đọc trình tự tự động ABI 377 (Perkin-Elmer, Mỹ).

(2) Chuỗi nucleotit được xử lý bằng chương trình Bioedit.

(3) Truy cập dữ liệu ngân hàng gen EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) để so sánh bằng chương trình GENDOC 2.5.

(4) Sử dụng chương trình phân tích phả hệ và tiến hóa MEGA 12 để xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng được phân tích.

Xây dựng cây phát sinh loài cho các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Phương pháp Neighbor-Joining dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Các giá trị bootstrap (1.000 lần lặp lại) được hiển thị bên cạnh các nhánh. Khoảng cách tiến hóa được tính bằng phương pháp Maximum Composite Likelihood và biểu thị dưới dạng số lần thay thế nucleotide trên mỗi vị trí. Phân tích được thực hiện bằng phần mềm MEGA12.

2.5.5. Thử nghiệm xác định tính an toàn đối với động vật.

- Xác định vị trí phân loại theo danh mục EWG 90/679/EWG (26/11/1990):
Mục tiêu: Xác định các chủng VSV dựa trên vị trí phân loại và danh mục của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học. Danh mục này đưa ra các tiêu chí và hướng dẫn về độ an toàn sinh học của các sinh vật khi được phóng thích vào môi trường, giúp phân loại các chủng thành các nhóm an toàn hoặc có rủi ro tương đối.

Quy trình thực hiện:

Thu thập dữ liệu phân loại của các chủng VSV, bao gồm các đặc điểm di truyền, sinh lý và khả năng tương tác với hệ sinh thái.

So sánh vị trí của các chủng với danh mục được công bố theo hướng dẫn số 90/679/EWG, từ đó xác định nhóm an toàn tương đối.

Các chủng có vị trí nằm trong các nhóm được đánh giá là có rủi ro thấp hoặc an toàn sẽ được lựa chọn cho bước đánh giá tiếp theo.

- Đánh giá độc lực và khả năng gây bệnh trên động vật theo phương pháp của Cater (1984) [60]:

Mục tiêu: Đánh giá khả năng gây độc và khả năng gây bệnh của các chủng VSV được dự định phóng thích ra môi trường, nhằm đảm bảo rằng chúng không gây tác hại cho động vật, từ đó đảm bảo an toàn cho cả con người và hệ sinh thái.

- Các bước thực hiện:

+ Sử dụng chuột nhắt trắng là đối tượng thí nghiệm.

+ Chuẩn bị dung dịch chứa chủng vi sinh vật cần đánh giá (đã được định lượng mật độ tế bào).

+ Chia động vật thành 2 nhóm:

Nhóm thí nghiệm (20 con) được phơi nhiễm VSV;

Nhóm đối chứng (20 con) không phơi nhiễm VSV;

+ Hình thức phơi nhiễm phù hợp: Cho uống hoặc nhỏ vào miệng: Dùng trong đánh giá qua đường tiêu hóa, sử dụng liều lượng chuẩn xác.

- Theo dõi và ghi nhận:

+ Thời gian theo dõi: từ 7 đến 14 ngày sau phơi nhiễm.

+ Ghi nhận các biểu hiện lâm sàng hằng ngày như:

Tình trạng hoạt động, ăn uống, phản ứng khi tiếp xúc.

Các triệu chứng như sốt, tiêu chảy, co giật, lờ đờ...

- So sánh với nhóm đối chứng:

+ Đánh giá sự khác biệt giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng về:

Tỷ lệ tử vong (nếu có);

Mức độ tổn thương cơ quan;

Thay đổi sinh lý và miễn dịch.

- Đánh giá kết quả:

+ Nếu không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt lâm sàng và sinh lý – sinh hóa giữa hai nhóm → Chủng VSV được coi là an toàn.

+ Nếu xuất hiện dấu hiệu bất thường, tăng tử vong hoặc tổn thương cơ quan → Chủng VSV bị loại bỏ hoặc yêu cầu đánh giá lại.

2.5.6. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối

Lần lượt xây dựng thí nghiệm xác định các điều kiện lên men như: nhiệt độ, pH, môi trường nuôi cấy, thời gian nhân sinh khối, lưu lượng cấp khí và tỉ lệ nhân giống cấp 1.

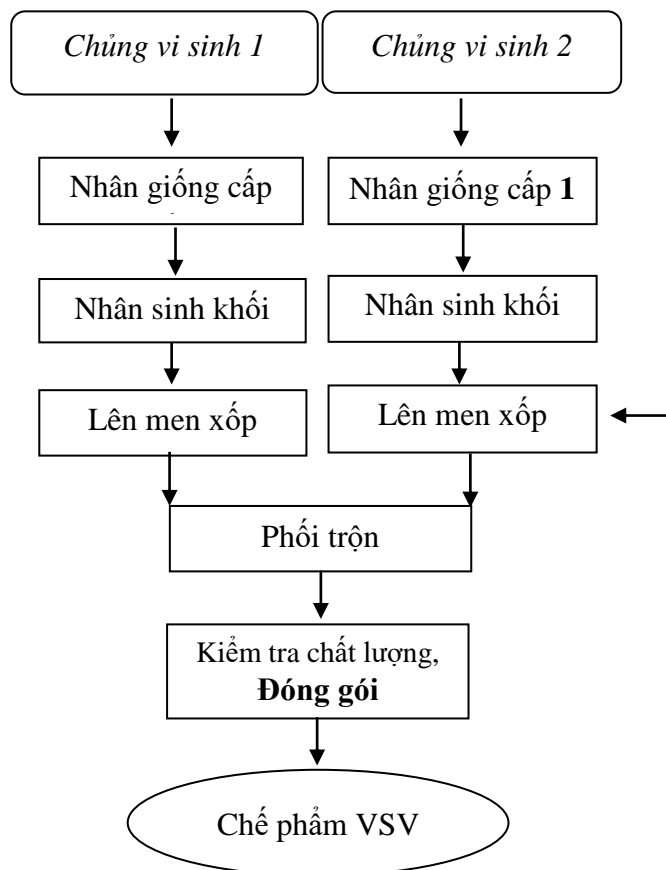
Mục tiêu của thí nghiệm là xác định điều kiện tối ưu trong nhân sinh khối vi sinh vật thông qua chỉ tiêu mật độ của chúng. Cụ thể: Nhiệt độ trong quá trình lên men sinh khối được điều chỉnh ở các mức khác nhau: 20°C; 25°C; 30°C; 35°C; 40°C; 45°C; pH ban đầu được điều chỉnh về các giá trị lần lượt là 5,0; 5,5; 6,0; 6,5;

7,0; 7,5; 8,0 và môi trường nhân sinh khối được đưa ra để lựa chọn là môi trường sản xuất SX1; SX2 và SX3

Tỷ lệ giống cấp 1 được bổ sung ở các mức khác nhau từ 0,5÷5%, được kiểm tra độ thuần khiết và phải đạt mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml (giống cấp 1 được nhân sinh khối trong môi trường dịch thể trên máy lắc dàn với tốc độ lắc 150 vòng/phút, dịch lên men sau 48 giờ được kiểm tra đảm bảo mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml). Liều lượng cấp khí: Điều chỉnh lượng khí cấp trong quá trình nhân sinh khối các chủng VSV ở các mức: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 (dm^3 không khí/lít môi trường/phút). Đánh giá ảnh hưởng lượng cấp khí thông qua giá trị mật độ các chủng VSV ở các mức khí cấp khác nhau.

2.5.7. Phương pháp tạo chế phẩm vi sinh vật

Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý tồn dư thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ - CPF được xây dựng theo sơ đồ sau:



Mô tả quy trình

+ *Nhân sinh khối các chủng VSV:*

Chủng VSV được lên men sinh khối cấp 1 trong bình tam giác, sau đó lên men sinh khối trên thiết bị lên men và được kiểm tra độ thuần khiết và đạt mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml, sinh khối vi sinh vật được tách nước bằng thiết bị li tâm với tốc độ 6000 v/p trong 30 phút.

+ *Lên men xốp:*

Sinh khối vi sinh vật được sử dụng để lên men xốp với môi trường lên men là đường dextro trong 72 giờ với tỷ lệ tiếp giống là 1%.

+ *Phối trộn:*

Phối trộn đều sản phẩm sau lên men xốp của các chủng vi sinh vật với tỷ lệ phù hợp để đảm bảo mật độ các chủng đạt yêu cầu.

+ *Kiểm tra chất lượng:* Sản phẩm cuối cùng của qui trình sản xuất cũng như các sản phẩm tạo ra trong từng công đoạn của qui trình đều phải được kiểm tra đánh giá chất lượng về các chỉ tiêu mật độ vi sinh vật lựa chọn và mức độ tạp nhiễm.

+ *Bảo quản sản phẩm:* Sản phẩm được đóng gói trong túi zip tráng thiếc, bảo quản trong điều kiện phòng. Sản phẩm được kiểm tra mật độ vi sinh vật theo thời gian bảo quản 0 giờ, 7 ngày, 15 ngày, 30 ngày, 45 ngày, 60 ngày, 75 ngày.

2.5.8. Thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý CPF của vi sinh vật

2.5.8.1. *Xác định khả năng phân giải CPF của các chủng vi sinh vật trong đất (in vitro):*

Đất thử nghiệm được sấy khô ở 100°C trong 24 giờ, sau đó được nghiền và rây qua lưới để thu đất mịn, sau đó tiếp tục được sấy lại (100°C, 12h) để khử trùng.

Trộn đều cơ chất thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ (50 mg/L Chlorpyrifos) với 1g đất khô nghiền mịn đã chuẩn bị sau đó tiếp tục thêm đất trộn đều cho đủ 100g. Mẫu đất được kiểm tra dư lượng CPF theo các mức thời gian 0 giờ, sau 3, 5, 7 ngày bằng phương pháp đã mô tả trong mục 2.5.2. và lắc 120 rpm trong điều kiện nhiệt độ 28 – 30°C, thời gian 5 ngày.

2.5.8.2. *Đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè ở quy mô nhà lưới:*

Nguyên vật liệu: Cây chè giống LDP 1 do Trung tâm nghiên cứu và phát triển chè thuộc Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệm miền núi phía Bắc cung cấp

- Đối tượng cây trồng: Cây con vườn ươm 9 tháng tuổi, có chiều cao trung bình 22,5 cm, số lá từ 6-8 lá.
- Phương pháp thí nghiệm: bố trí kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), nhắc lại 03 lần trong nhà lưới.
- Chậu đất: Chứa 30 kg đất (loại đất thịt pha cát).
- Phân bón: Phân hữu cơ 30g/chậu bón lót trước khi trồng.

+ Chỉ tiêu theo dõi:

- Chỉ tiêu sinh trưởng phát triển của cây chè: số lá, cao cây.
- Chỉ tiêu phân tích đất: Dư lượng CPF trong đất, Mật độ vi sinh vật sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng (IAA).
- Dư lượng CPF trong chè.

- *Đánh giá ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm vi sinh vật*

+ Công thức thí nghiệm:

CT1: Đối chứng (không chế phẩm) + CPF (200mg/m²).

CT2: Bổ sung CP VSV 1g/m² + CPF (200mg/m²).

CT3: Bổ sung CP VSV 2g/m² + CPF (200mg/m²).

CT4: Bổ sung CP VSV 3g/m² + CPF (200mg/m²).

CT5: Bổ sung CP VSV 5g/m² + CPF (200mg/m²).

CT6: Bổ sung CP VSV 10g/m² + CPF (200mg/m²).

+ Đối với mỗi chậu đất (đã có sẵn dư lượng Chlorpyrifos theo thiết kế), bổ sung chế phẩm vi sinh vật với mật độ 10⁸ CFU/g đất khô (trương đương 20 ml chế phẩm lỏng hoặc 5 g dạng bột đã chuẩn hóa) bằng cách trộn đều vào lớp đất mặt (0–5 cm).

+ Sau khi bổ sung chế phẩm, tiến hành tưới nhẹ bằng nước vô trùng để độ ẩm đất đạt khoảng 60–70% khả năng giữ nước tối đa.

+ Đặt các chậu vào nơi có mái che, thông thoáng, nhiệt độ ổn định 25–30°C. Mỗi tuần đảo trộn nhẹ lớp đất mặt một lần để duy trì hiệu khí.

2.5.8.3. Thí nghiệm diện hẹp đánh giá hiệu quả của chế phẩm VSV đối với cây chè:

Địa điểm triển khai:

✓ Thí nghiệm diện hẹp tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An, trên 2 loại chè gồm:

- Cây chè giai đoạn kiến thiết (3 năm tuổi): giống PH 8.

- Cây chè kinh doanh: giống LDP1 (19 năm), 1 năm thu 6 vụ bắt đầu từ tháng 1, mỗi vụ cách nhau 40-50 ngày.

- Thời gian thực hiện: 10/2022 - 12/2022.

- Chế độ canh tác: Các công thức thí nghiệm có điều kiện canh tác như nhau, các loại phân bón, thuốc bảo vệ thực vật chăm sóc như nhau (thuốc BVTV do người dân sử dụng), chỉ khác nhau duy nhất là lượng chế phẩm bón thêm vào.

* Các loại thuốc bảo vệ thực vật người dân sử dụng chủ yếu trừ rệp sáp, rầy hại chè gồm:

+ Atylo 650WP: Hoạt chất gồm Acetamiprid 400g/kg + Buprofezin 250g/kg.

+ Sokupi 0,5 SL: Hoạt chất gồm Matrine 0,5%; dung môi 99,5%.

Các nhóm thuốc BVTV trên đều không chứa gốc OP (đối tượng nghiên cứu trong đề tài) nên không ảnh hưởng đến thí nghiệm.

- Phương pháp bố trí thí nghiệm: Theo khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD), nhắc lại 03 lần. diện tích ô thí nghiệm: 100m²/ô. Tổng diện tích ô thí nghiệm là 1200m².

- Công thức thí nghiệm: Bổ sung chế phẩm VSV ở liều lượng phù hợp nhất từ kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý OP của vi sinh vật ở quy mô nhà lưới và bổ sung thêm các công thức tăng liều lượng chế phẩm vi sinh (CT2, CT3).

+ Đối chứng: không bón chế phẩm.

+ CT1: chế phẩm bón 100 kg/ha.

+ CT2: chế phẩm bón 200 kg/ha.

+ CT3: chế phẩm bón 300kg/ha.

- Chỉ tiêu theo dõi:

+ Chỉ tiêu sinh trưởng phát triển của cây chè

✓ Chiều cao cây: (cm): Dùng một khung vuông có kích thước bằng diện tích tán chè đặt trên mặt tán thẳng bằng song song với mặt đất, chiều cao cây đo từ cổ rễ đến bề mặt khung vuông. Chọn những cây chè đại diện cho ô thí

nghiệm, mỗi ô thí nghiệm đo 5 điểm theo phương pháp đường chéo, mỗi điểm đo 10 cây. Thời điểm đo là trước các lứa thu hoạch, chiều cao cây là số liệu trung bình của những lần đo.

- ✓ Rộng tán (cm): Chọn những cây chè đại diện cho ô thí nghiệm, mỗi ô thí nghiệm đo 5 điểm theo phương pháp đường chéo, mỗi điểm đo 10 cây. Thời điểm đo là trước các lứa thu hoạch. Rộng tán chè được đo ở vị trí rộng nhất của tán và lấy số liệu trung bình của các lần đo.
- ✓ Chiều dài búp (cm): Chiều dài búp là chiều dài từ điểm giữa lá 2 và lá 3 đến đỉnh sinh trưởng búp.

Mỗi công thức thí nghiệm lấy 150 g mẫu. Đo chiều dài 15 búp được lấy ngẫu nhiên, thực hiện 03 lần nhắc. Chiều dài búp là bình quân chiều dài một búp của 03 lần nhắc lại.

+ Chỉ tiêu cấu thành năng suất và năng suất thực thu

- ✓ Khối lượng búp (g/búp): lấy mẫu theo đường chéo 5 điểm. Mỗi điểm hái 100g. Chỉ hái những búp theo yêu cầu của thí nghiệm. Toàn bộ lượng búp ở các điểm trộn đều với nhau, cân 100g, đếm tổng số búp có trong 100g đó. Khối lượng búp được tính bằng tỷ số 100/tổng số búp có trong 100g búp. Thời điểm theo dõi: khi thu hoạch búp.
- ✓ Mật độ búp (búp/m²): Sử dụng khung mật độ 25 x 25cm, đặt trên tán chè đại diện cho thí nghiệm theo phương pháp đường chéo 5 điểm sau đó đếm số búp đủ tiêu chuẩn hái. Thời điểm theo dõi khi thu hoạch búp.
- ✓ Tỷ lệ búp tôm 2,3 lá: Kết hợp xác định mật độ búp tiến hành đếm số búp 1 tôm 2,3 lá trong khung, tính tỷ lệ búp 1 tôm 2,3 lá theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ búp 1 tôm 2,3 lá \%} = \frac{\text{Số búp 1 tôm 2,3 lá}}{\text{Tổng số búp điều tra}} \times 100$$

- ✓ Năng suất thực thu (tấn/ha): cân trọng lượng búp thu hái sau mỗi vụ.

+ Chỉ tiêu chất lượng: tanin (%), hàm lượng cafein (%), chất tro (%), màu sắc, mùi vị chè. Trong đó:

- Chỉ tiêu tannin được phân tích theo TCCS 35:2017/TTPT.

- Chỉ tiêu cafein được phân tích theo TCVN 9744:2013.
- Chỉ tiêu chất tro được phân tích theo TCVN 5611:2007.
- Chỉ tiêu màu sắc được phân tích theo TCVN 3218:2012.
- Chỉ tiêu mùi vị được phân tích theo TCVN 3218:2012.

+ Chỉ tiêu sâu bệnh hại: Áp dụng phương pháp quan trắc theo dõi thí nghiệm bảo vệ thực vật chè của Nguyễn Văn Hùng (Tuyển tập các công trình nghiên cứu về chè (1988 – 1997), Nhà xuất bản Nông nghiệp). Mỗi giống chè hái ngẫu nhiên 100 búp trên 5 điểm chéo góc, 2 lần lặp, đếm số búp bị hại do từng loại sâu bệnh rồi tính.

Điều tra rầy xanh, bọ cánh tơ, nhện đỏ: Hái 5 điểm 20 búp x 5 điểm = 100 búp cho vào túi nilon đem về phòng đếm số búp bị rầy xanh, bọ cánh tơ, nhện đỏ hại và tính theo công thức:

$$\% \text{ búp bị hại} = \frac{\text{Tổng số búp bị hại}}{\text{Tổng số búp điều tra (100 búp)}} \times 100$$

Điều tra bệnh thối búp: Hái 5 điểm chéo góc mỗi điểm 20 búp x 5 điểm = 100 búp cho vào túi nilon đem về phòng đếm số búp bị bệnh và tính theo công thức:

$$\% \text{ búp bị hại} = \frac{\text{Tổng số búp bị hại}}{\text{Tổng số búp điều tra (100 búp)}} \times 100$$

+ Chỉ tiêu về đất: Dư lượng thuốc BVTV gốc OP.

2.5.8.4. Thí nghiệm diện rộng đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè

+ Thời gian thực hiện: 05/2023 - 09/2023.

+ Địa điểm thực hiện:

✓ Thí nghiệm diện rộng tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An, trên 2 loại chè gồm:

+ Cây chè giai đoạn kiến thiết (3 năm tuổi): Giống PH 8.

+ Cây chè kinh doanh: giống LDP1 (19 năm).

+ Công thức thí nghiệm:

Công thức đối chứng (ĐC): Không bón chế phẩm.

Công thức thí nghiệm (TN): Sử dụng chế phẩm vi sinh vật - Công thức thí nghiệm ở liều lượng phù hợp nhất từ kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý OP của vi sinh vật diện hẹp.

Cách bón chế phẩm: Tiến hành dọn sạch cỏ dại sau đó đào rãnh giữa hai hàng chè sâu 20 – 25 cm, rộng 25 – 30 cm để bón chế phẩm vi sinh vật. Sau khi bón chế phẩm với liều lượng phù hợp (dựa vào kết quả nghiên cứu diện hẹp đánh giá hiệu quả của chế phẩm VSV đối với cây chè để lựa chọn liều lượng phù hợp), tiến hành lấp đất để giữ chế phẩm trong đất, tránh tình trạng bị rửa trôi, giúp cây chè có thể sử dụng được tối đa lượng chế phẩm vi sinh vật đã bón.

- Chế độ canh tác: Các công thức thí nghiệm có điều kiện canh tác như nhau, các loại phân bón, thuốc bảo vệ thực vật chăm sóc như nhau (thuốc BVTV do người dân sử dụng), chỉ khác nhau duy nhất là lượng chế phẩm bón thêm vào.

* Các loại thuốc bảo vệ thực vật người dân sử dụng chủ yếu trừ rệp sáp, rầy hại chè giống diện hẹp nên không ảnh hưởng đến thí nghiệm.

- Phân bón và kỹ thuật bón phân (Hoàng Văn Chung, 2013. Quy trình Kỹ thuật trồng, thâm canh chè an toàn):

+ Cuốc lật toàn bộ diện tích; đào rạch giữa hai hàng chè sâu 20 đến 25 cm, rộng 25 đến 30 cm trước khi đốn chè, bổ sung phân xanh (nếu có) kết hợp bón phân hữu cơ 30 -35 tấn/ha.

+ Kỹ thuật bón thúc: Hàng năm bón NPK với lượng phân 35N cho 1 tấn sản phẩm + 75kg MgSO₄/ha. Số lần bón: 4 lần trong năm. Lần 1: Bón 30% NPK + 60% MgSO₄ (Tháng 2) Lần 2: Bón 30% NPK + 40% MgSO₄ (Tháng 5) Lần 3: Bón 25% NPK (Tháng 7) Lần 4: Bón 15% NPK (Tháng 9). (NPK=80N:40P₂O₅:60 K₂O)

- Phương pháp bố trí thí nghiệm: theo khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD), nhắc lại 03 lần. Diện tích ô thí nghiệm: 1.000m²/ô, số lần lặp 3. Tổng diện tích ô thí nghiệm là 2 công thức x 2 địa điểm (loại đất) x 2 loại cây chè x 1.000m²=8.000m².

- Chỉ tiêu theo dõi:

+ Chỉ tiêu sinh trưởng phát triển của cây chè (cao cây, rộng tán) chỉ tiêu yếu tố cấu thành năng suất (số búp/cây, khối lượng búp, chiều dài búp, tỷ lệ tôm 2, 3 lá và năng suất thực thu.

+ Chỉ tiêu chất lượng: Tanin (%), hàm lượng cafein (%), chất tro (%), màu sắc, mùi vị chè.

+ Chỉ tiêu về đất: Dư lượng thuốc BVTV gốc OP.

Các phương pháp phân tích thực hiện tương tự thí nghiệm diện hẹp.

2.5.9. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel để quản lý số liệu, vẽ đồ thị, tính toán và so sánh các giá trị trung bình nghiệm thức.

Xử lý số liệu theo phần mềm IRISTAT 4.0.

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ ở một số vùng canh tác nông nghiệp

Theo Thông tư số 25/2024/TT-BNNPTNT ngày 16 tháng 01 năm 2024 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn ban hành Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và Danh mục thuốc bảo vệ thực vật cấm sử dụng tại Việt Nam: Danh mục thuốc BVTV cho phép sử dụng vẫn có mặt của Dimethoate - sử dụng trong trừ rệp sáp, sâu xanh, sâu cuốn lá, sâu đục thân và bọ trĩ. Căn cứ Phụ lục II ban hành kèm theo Thông tư số 25/2024/TT-BNNPTNT, trong danh sách 31 hoạt chất bảo vệ thực vật bị cấm có thành phần Methyl Parathion và Parathion Ethyl là những hoạt chất thuộc nhóm Lân hữu cơ.

Để khẳng định cho hướng nghiên cứu của Đề tài về đối tượng nghiên cứu là dư lượng thuốc BVTV gốc lân hữu cơ còn tồn tại trong đất trồng nông nghiệp, nghiên cứu đã tiến hành thu thập mẫu từ tháng 9-12/2019 để phân tích đánh giá dư lượng OP trong chè, rau và đất trồng chè, rau luân canh tại các tỉnh Thái Nguyên, Bắc Ninh, Nghệ An và Lâm Đồng cụ thể như sau: Mẫu chè và đất trồng chè được thu thập tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An (Tọa độ 18°44'43" đến 19°03'56" Bắc; 105°17'56" đến 105°41'9" Đông); xã Phú Thịnh, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên và xã Lộc Tân, huyện Bảo Lâm, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu rau và đất trồng rau được thu thập tại huyện Quế Võ, tỉnh Bắc Ninh. Kết quả phân tích được thể hiện tại bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả phân tích hàm lượng OP trong mẫu chè, rau và đất trồng.

Mẫu	Ký hiệu mẫu	Kết quả phân tích (mg/kg)				
		<i>Chlorpyrifos ethyl</i>	<i>Fenitrothion</i>	<i>Malathion</i>	<i>Parathion</i>	<i>Profenofos</i>
Chè	TN1	1,125	KPH	KPH	KPH	KPH
	TN2	0,457	KPH	KPH	KPH	KPH
	NA1	0,372	KPH	KPH	KPH	KPH
	NA2	0,059	KPH	KPH	KPH	KPH

Mẫu	Ký hiệu mẫu	Kết quả phân tích (mg/kg)				
		<i>Chlorpyrifos ethyl</i>	<i>Fenitrothion</i>	<i>Malathion</i>	<i>Parathion</i>	<i>Profenofos</i>
Đất trồng chè	TN1	0,029	KPH	KPH	KPH	KPH
	TN2	0,007	KPH	KPH	KPH	KPH
	NA1	27,8	KPH	KPH	KPH	KPH
	NA2	16,9	KPH	KPH	KPH	KPH
	BL1	25,95	KPH	KPH	KPH	KPH
	BL2	7,63	KPH	KPH	KPH	KPH
	BL3	2,15	KPH	KPH	KPH	KPH
	BL4	18,44	KPH	KPH	KPH	KPH
	BL5	3,06	KPH	KPH	KPH	KPH
Bắp cải	1	0,094	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,053	KPH	KPH	KPH	KPH
Cà chua	1	0,034	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,032	KPH	KPH	KPH	KPH
Cà rốt	1	1,106	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,783	KPH	KPH	KPH	KPH
Đất trồng bắp cải	1	0,025	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,032	KPH	KPH	KPH	KPH
Đất trồng cà chua	1	0,025	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,018	KPH	KPH	KPH	KPH
Đất trồng cà rốt	1	0,032	KPH	KPH	KPH	KPH
	2	0,025	KPH	KPH	KPH	KPH

Ghi chú: KPH: Dưới ngưỡng phát hiện (<0,002 mg/kg).

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu chè, rau và đất trồng đều phát hiện thấy Chlorpyrifos ethyl (CPF) trong sản phẩm nông nghiệp và trong đất; các gốc

Fenitrothion, Malathion, Parathion và Profenofos đều không phát hiện. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy đối với cây rau, dư lượng Chlorpyrifos ethyl trong sản phẩm cao hơn so với đất trồng; đối với cây chè thì đất trồng chè tại địa điểm lấy mẫu cao hơn rất nhiều so với dư lượng trong sản phẩm (mẫu NA1 cao gấp 300 lần), kết quả này cho thấy thuốc BVTV có chứa Chlorpyrifos ethyl được nông dân sử dụng rất phổ biến, đặc biệt là ở vùng trồng chè huyện Anh Sơn, Nghệ An. Đối với vùng trồng chè, thời điểm đề tài lấy mẫu là vụ chè Xuân, đây là khoảng thời tiết rất phù hợp với các loại bệnh rầy xanh, rệp, nhện đỏ, bọ xít, muỗi và bệnh phòng lá phát sinh gây hại ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây chè cũng như năng suất và chất lượng chè búp. Để phòng chống các nhóm bệnh, đối tượng gây hại này người dân thường sử dụng các loại thuốc có phổ phòng trừ bệnh, côn trùng gây hại rộng như những loại thuốc BVTV có chứa gốc Lân hữu cơ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, thuốc BVTV có chứa hoạt chất nhóm Lân hữu cơ được nông dân sử dụng khá phổ biến trong sản xuất nông sản để phòng trị nhiều đối tượng gây hại khác nhau như rầy nâu, sâu đục thân, sâu cuốn lá, nhện v.v.. do thuốc BVTV có chứa gốc Lân hữu cơ có hoạt tính mạnh và có phổ tiêu diệt, phòng trừ bệnh và các đối tượng gây hại rộng. Đối với cây chè, do người nông dân sử dụng rất nhiều thuốc BVTV vào thời điểm đầu vụ (khoảng tháng 2- tháng 3 trong năm), đây là thời điểm độ ẩm không khí cao, thích hợp cho các loại sâu hại (rệp) phát triển mạnh, do đó ở tất cả các mẫu kiểm tra đều phát hiện có dư lượng Lân hữu cơ trong đất trồng chè và trong lá chè với hoạt chất chủ yếu là Chlorpyrifos ethyl (CPF).

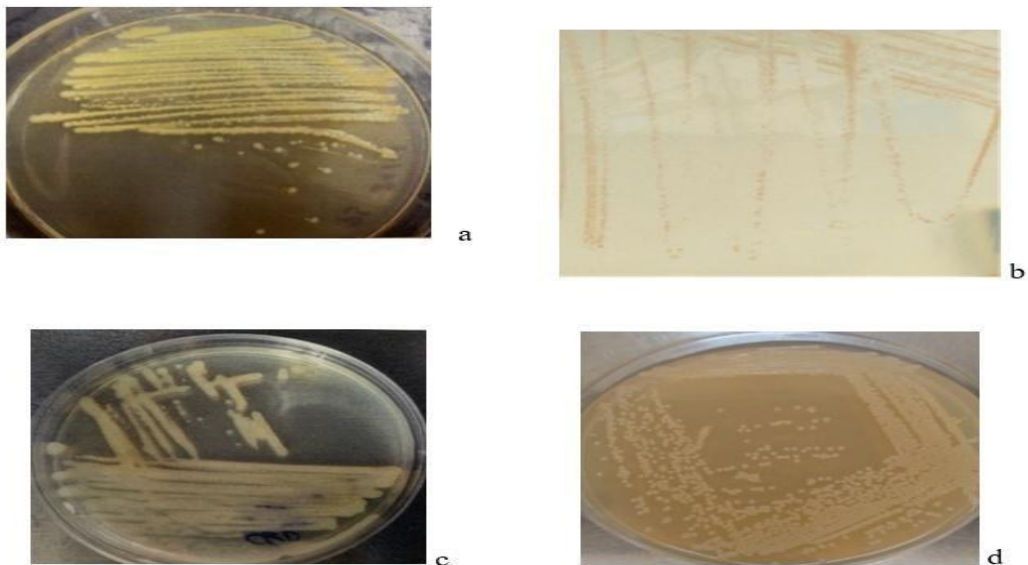
Một số nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam cũng đã đánh giá về dư lượng thuốc BVTV nói chung và CPF nói riêng. Cụ thể, sự hiện diện của dư lượng thuốc bảo vệ thực vật đã được điều tra trong mô hình sản xuất lúa hữu cơ tại tỉnh An Giang, Việt Nam. Tổng cộng có 16 loại dư lượng thuốc bảo vệ thực vật đã được ghi nhận trong quá trình điều tra. Dựa trên tỷ lệ nhiễm, chúng được phân loại như sau: Nhóm rủi ro cao: Tricyclazole (80%); Nhóm rủi ro trung bình: Chlorpyrifos (47%), Isoprothiolane (47%), Difenoconazole (40%), Propiconazole (40%), Hexaconazole (40%), Chlorfenapyr (33%), Azoxystrobin (20%), và Cypermethrin (20%) [89].

Ngoài ra, 14 loại thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ (OPPs) đã được xác định trong đất và rau tại Nigeria bằng máy sắc ký khí kết hợp đầu dò khối phổ (GC-MSD). Tổng nồng độ của 14 loại OPPs ($\Sigma 14$ OPPs) dao động từ 5,29 đến 419 ng/g đối với đất và 0,69 đến 130 ng/g đối với rau. Trung bình, pirimiphos methyl (23,8 ng/g) là hợp chất chiếm ưu thế trong đất, trong khi diazinone (4,74 ng/g) là hợp chất chiếm ưu thế trong rau [172].

3.2. Phân lập vi khuẩn phân giải Chlorpyrifos ethyl

Với mục tiêu tuyển chọn được chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hoạt chất Chlorpyrifos ethyl, nghiên cứu đã phân lập các chủng vi sinh vật có nguồn gốc tại các vùng sản xuất nông nghiệp có sử dụng thuốc BVTV chứa CPF vì tại khu hệ sinh thái đất này quần thể vi sinh vật ở đây đã có thời gian thích nghi với CPF và có thể sử dụng chúng như nguồn dinh dưỡng để sinh trưởng và phát triển.

Từ 20 mẫu đất thu thập (thông tin trích dẫn tại phụ lục 2) đã phân lập được tổng cộng 51 chủng vi khuẩn, trong đó có 4 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải CPF là CNN1, CNN2, VNN3 và CNN4.



Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc của các chủng

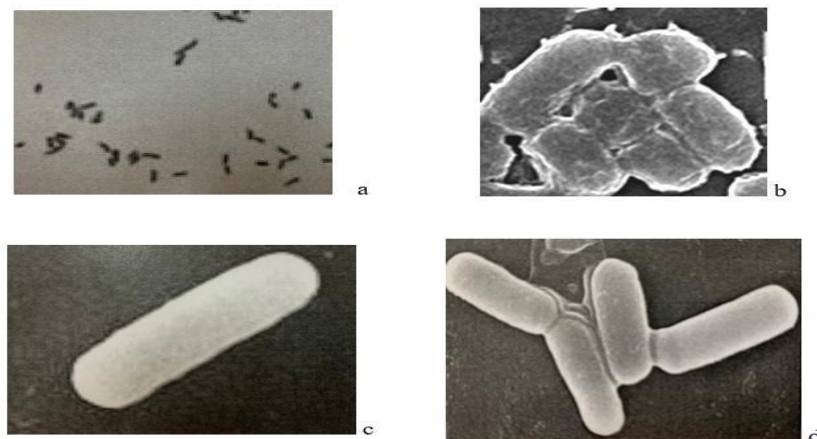
(a) CNN1, (b) CNN2, (c) VNN3 và (d) CNN4

Hình 3.1. cho thấy hình ảnh thể hiện các khuẩn lạc của các chủng CNN1, CNN2, VNN3 và CNN4 đã phân lập. Hình thái tế bào các chủng được thể hiện tại bảng 3.2:

Bảng 3.2. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc các chủng VSV đã phân lập

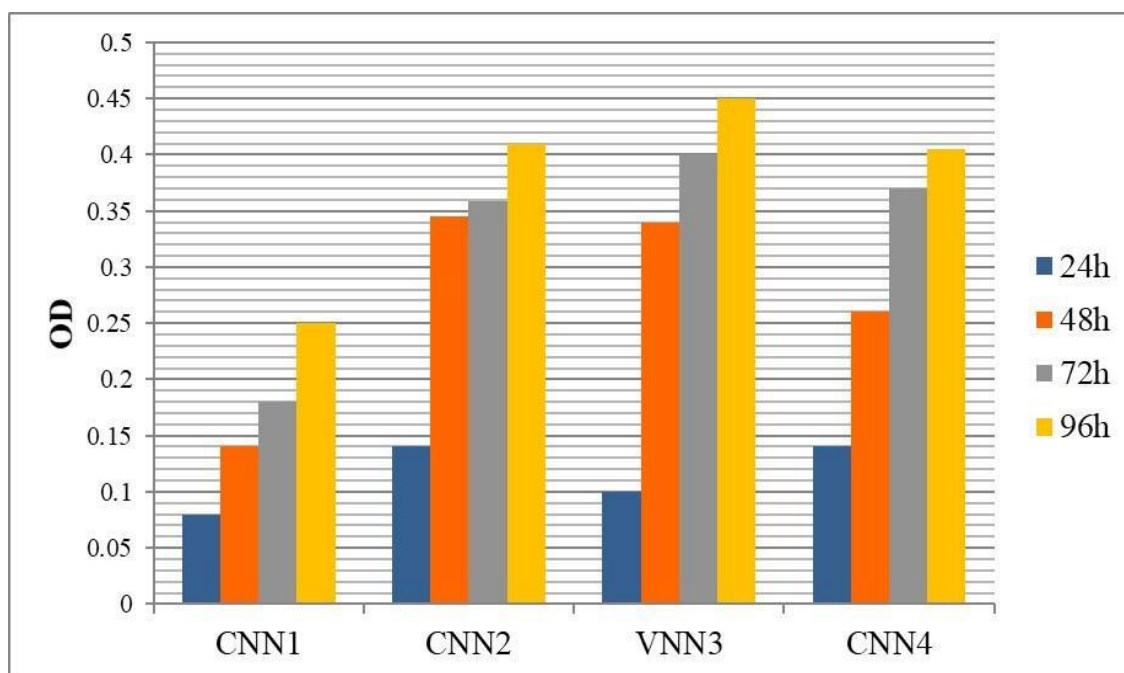
STT	Chủng VSV	Đặc điểm hình thái
1	CNN1	Tế bào có hình que, tế bào đứng đơn, kích thước khoảng 0,5 x 1,0 μm . Khuẩn lạc có hình tròn, bóng, màu vàng ngà, không có sắc tố (đường kính 1 - 3 mm)
2	CNN2	Tế bào có hình que, tế bào đứng đơn, kích thước 0,8 x 1,0 μm . Khuẩn lạc có màu hồng nhạt, tròn đều, nhẵn, tròn, lồi, bóng và không có sắc tố (đường kính: 0,5 mm)
3	VNN3	Tế bào có hình que, tế bào đứng đơn, kích thước 1,0 x 1,5 μm Khuẩn lạc có màu trắng, tròn, nhỏ, đều, bề mặt nhẵn, không có sắc tố (đường kính: 1,5 mm)
4	CNN4	Tế bào có hình que, tế bào đứng đơn, kích thước khoảng 0,5 x 1,0 μm . Khuẩn lạc có màu trắng ngà, tròn và nhỏ, bề mặt nhẵn và không có sắc tố (đường kính: 1,5 mm)

Để thấy rõ đặc điểm hình thái của các tế bào các chủng VSV đã phân lập, nghiên cứu sinh đã tiến hành soi dưới kính hiển vi quang học, kính hiển vi điện tử (a) CNN1 (độ phóng đại 1000x); chủng (b) CNN2,(c) VNN3 và (d) CNN4 (độ phóng đại 5000x), kết được thể hiện theo hình 3.2:



Hình 3.2. Hình thái của các chủng vi sinh vật

Tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng vi sinh vật. Kết quả đo OD_{620} của các chủng vi sinh vật phân lập được thể hiện trên Hình 3.3.



Hình 3.3. OD₆₂₀ của các chủng VSV trong môi trường chứa cơ chất

Sau 96 h nuôi, giá trị OD₆₂₀ của cả bốn chủng đều vượt 0,25 – cao hơn đáng kể ngưỡng 0,05–0,25 mà Asamba và cộng sự quan sát được sau 5 ngày [47] đối với các chủng phân hủy Chlorpyrifos Ethyl (CPF). Điều này cho thấy tiềm năng sinh trưởng mạnh của các chủng hiện đang sử dụng cho nghiên cứu, để lựa chọn chủng vi sinh vật làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

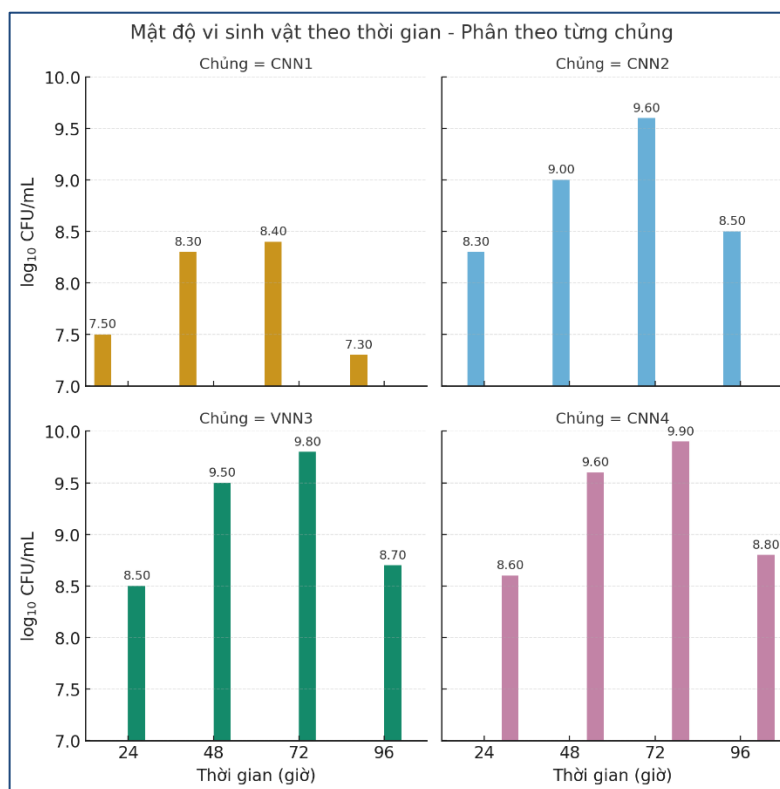
Như vậy, kết quả nghiên cứu thể hiện trong Hình 3.3 cho thấy chủng VNN3 là ứng viên nổi bật cho phát triển chế phẩm vi sinh để xử lý Chlorpyrifos Ethyl, đồng thời xác định thời gian nuôi có thể tối ưu hoá ở mức 72 h thay vì 96 h để nâng cao hiệu quả sản xuất.

Nghiên cứu của Asamba và cộng sự đã chỉ ra rằng giá trị OD₆₀₀ của 6 chủng vi khuẩn phân hủy CPF phân lập được là từ 0,05 đến 0,25 sau 5 ngày [47].

Tiếp tục đánh giá mật độ của các chủng VSV theo phương pháp nuôi cấy và đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch (Phương pháp 2.5.3) theo nguyên tắc tính trung bình giữa các nồng độ pha loãng (chỉ đếm ở các nồng độ pha loãng có 50-300 khuẩn lạc) và các lần lặp (lặp 3 lần), kết quả được thể hiện theo hình 3.4

Số liệu tại hình 3.4 cho thấy, mật độ VSV sau 96 giờ đối với 3 chủng CNN2, VNN3 và CNN4 đạt $2,8 - 5,7 \times 10^8$ CFU/mL, riêng chủng CNN1 thì thấp hơn nhiều với mật độ chỉ đạt $2,3 \times 10^7$ CFU/mL.

Theo nghiên cứu của Hadibarata và cộng sự, mật độ của chủng vi khuẩn phân hủy CPF *Hortaea* sp. B15 từ $0,5 \times 10^6$ CFU/mL đến $4,5 \times 10^6$ CFU/mL sau 30 giờ ủ cùng điều kiện [88]. Như vậy, các giá trị về mật độ vi khuẩn trong nghiên cứu hiện tại là cao hơn so với nghiên cứu trước đó.



Hình 3.4. Biểu đồ tăng trưởng của các chủng vi sinh vật

Biểu đồ tăng trưởng trong hình 3.4 cho thấy sự biến đổi \log_{10} CFU/mL theo thời gian đối với bốn chủng vi sinh vật CNN1, CNN2, VNN3, CNN4. Mỗi màu tương ứng với khả năng sinh trưởng với một chủng vi sinh vật, biểu diễn giá trị đo được tại các mốc thời gian 24, 48, 72 và 96 giờ. Có thể thấy, cả bốn chủng đều có giai đoạn tăng từ 24 giờ đến 72 giờ (đường đi lên), đạt đỉnh ở 72 giờ, sau đó giảm xuống ở 96 giờ. Ba chủng CNN2, VNN3 và CNN4 đạt mật độ cao nhất vào khoảng 72 giờ với \log_{10} CFU/mL xấp xỉ 9.9–10.0, trong khi chủng CNN1 đạt đỉnh thấp hơn ($\log_{10} \approx 8.58$). Đến 96 giờ, mật độ tế bào sống của tất cả các chủng đều giảm rõ rệt so với đỉnh 72 giờ, thể hiện xu hướng suy giảm sau khi đạt cực đại.

Dữ liệu từ hình 3.4 cho thấy mật độ VSV sau 96 giờ của các chủng CNN2, VNN3 và CNN4 dao động từ 2,8 đến $5,7 \times 10^8$ CFU/mL, trong khi CNN1 chỉ đạt $2,3 \times 10^7$ CFU/mL — thấp hơn đáng kể. Do đó, chủng CNN1 bị loại khỏi danh sách nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.3. Khả năng phân giải Chlorpyrifos bởi các chủng vi khuẩn sau khi nhân sinh khối 3 ngày

Chủng VSV	Dư lượng Chlorpyrifos (mg/l)				Tỷ lệ giảm (%)
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	
ĐC	102,67±0,6	101,39±0,6	97,11±0,6	94,34±0,6	8,11±0,6
CNN2	102,35±0,6	60,26±0,6	41,42±0,6	19,06±0,6	81,38±0,6
VNN3	102,44±0,6	67,42±0,6	34,11±0,6	4,95±0,6	95,17±0,6
CNN4	103,05	74,67	55,41	39,96	61,22±0,6

Kết quả tại bảng 3.3 cho thấy, các chủng VSV đều có khả năng phân giải dư lượng Chlorpyrifos (OP).

Sau 3 ngày, ở công thức đối chứng phân giải 8,11%±0,6 dư lượng OP ban đầu do thuốc BVTV cũng có khả năng phân hủy tự nhiên theo thời gian (theo nghiên cứu của Singh và cộng sự thì Chlorpyrifos có thời gian bán phân rã từ 20-120 ngày [163]). Đối với các môi trường có bổ sung VSV cho thấy OP đều được phân hủy từ 61,22±0,6% đến 95,17±0,6%. Trong đó, chủng VNN3 có tốc độ phân giải OP nhanh nhất là 95,17%; tiếp theo là chủng CNN2 và CNN4 lần lượt là 81,37% và 61,22±0,6%. Có thể thấy khi bổ sung các chủng VSV (CNN2, CNN3 và CNN4) thì hiệu quả phân giải dư lượng thuốc BVTV có thể gấp từ 7-12 lần so với tự phân hủy trong điều kiện tự nhiên.

Rao và cộng sự đã phân lập được các chủng vi khuẩn thuộc các chi như *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Enterobacter* từ mẫu đất nông nghiệp có lịch sử sử dụng CPF, hỗn hợp các chủng vi sinh vật này có khả năng giảm nồng độ CPF lên đến khoảng 65% sau 10 ngày áp dụng điều kiện thí nghiệm kiểm soát được các yếu tố như pH và nhiệt độ [148].

Zhang và cộng sự đã công bố chủng vi khuẩn do nhóm nghiên cứu phân lập được có thể phân giải khoảng 80% CPF trong vòng 5 ngày khi nuôi cấy trong môi trường chứa CPF ở nồng độ ban đầu khoảng 50 mg/L [182].

Theo nghiên cứu của Zhao và cộng sự, dòng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* phân lập từ rễ của cây họ bị nhiễm thuốc BVTV Chlopyrifos có khả năng phân giải 60% hoạt chất Chlopyrifos có nồng độ ban đầu là 100 mg/L trong 4 ngày [184].

+ Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng được chọn

Nghiên cứu tiến hành nhuộm Gram, nhuộm bào tử, thử khả năng hiếu khí của vi khuẩn, thử hoạt tính catalase, oxidase, thử khả năng di động, khả năng lên men các nguồn đường của các chủng VSV được lựa chọn.

Các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng VSV được xác định theo kit API 20NE (đối với các chủng vi khuẩn Gram (-), không thuộc loại *Enterobacter*), Định tên vi khuẩn dựa vào kết quả phân tích trình tự gen 16s rRNA kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey (1994). Kết quả được trình bày ở bảng 3.4 (Ghi chú: (+) phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính).

Bảng 3.4. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi sinh vật

TT	Đặc điểm	Chủng vi sinh vật		
		CNN2	VNN3	CNN4
1	Hiếu khí	+	+	+
2	Vi hiếu khí	-	-	-
3	Khả năng di động	+	-	-
4	Phép thử catalase	+	+	+
5	Phép thử oxidase	+	+	+
6	Khả năng đồng hóa tinh bột	+	-	-
7	Acid hóa nguồn L-Arabinose	+	+	+
8	Acid hóa nguồn D-Xylose	+	-	
9	Acid hóa nguồn D-Fructose	+	-	-
10	Acid hóa các nguồn lactose	+	+	+
11	Acid hóa nguồn Galactose	-	+	+
12	Acid hóa nguồn sucrose	+	+	+
13	Acid hóa nguồn glucose	+	+	+

TT	Đặc điểm	Chủng vi sinh vật		
		CNN2	VNN3	CNN4
14	Khả năng sinh aesculin	-	-	-
15	Tạo H ₂ S	-	-	-
16	Hoạt tính urease	-	+	+
17	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	28 ÷ 32°C	28 ÷ 37°C	28 ÷ 37°C
18	pH cho sinh trưởng	6,0 ÷ 7,5	6,0 ÷ 7,0	6,0 ÷ 7,5
19	Gram	-	-	-

Số liệu trong Bảng 3.4 cho thấy chủng CNN2 sử dụng trong nghiên cứu là chủng gram âm, có phản ứng dương tính với oxidase, catalase, có khả năng lên men trong điều kiện hiếu khí và có khả năng di động. Chủng này phát triển tốt ở dải nhiệt độ từ 28°C đến 32°C với pH phù hợp ở mức trung tính (6-7,5). Chủng CNN2 có khả năng đồng hóa tinh bột, sử dụng một số loại đường Arabinose, Xylose, Fructose, Lactose, Sucrose và Glucose.

Số liệu nghiên cứu cũng cho thấy số liệu cho thấy chủng VNN3 sử dụng trong nghiên cứu là chủng gram âm, có phản ứng dương tính với oxidase, catalase, có khả năng lên men trong điều kiện hiếu khí. Chủng này phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ từ 28°C đến 37°C với pH phù hợp ở mức trung tính (6-7,0). Chủng CNN3 không đồng hóa tinh bột nhưng có khả năng sử dụng một số loại đường Arabinose, Xylose, Galactose, Sucrose và Glucose. Ngoài ra, chủng CNN3 có hoạt tính urease.

Chủng CNN4 sử dụng trong nghiên cứu là chủng gram âm, có phản ứng dương tính với oxidase, catalase, có khả năng lên men trong điều kiện hiếu khí. Chủng này phát triển tốt ở dải nhiệt độ từ 28°C đến 32°C với pH phù hợp ở mức trung tính (6-7,5). Chủng CNN4 không đồng hóa tinh bột nhưng có khả năng sử dụng một số loại đường Arabinose và Galactose. Ngoài ra chủng CNN4 còn có khả năng sinh indol và tạo H₂S.

Từ các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa kết hợp với khóa phân loại Bergey cho thấy rằng chủng CNN2 có nhiều điểm tương đồng với loài Methylobacterium sp., chủng VNN3 có nhiều điểm tương đồng với loài Ensifer sp., chủng CNN4 có nhiều điểm tương đồng với loài Acinetobacter sp.

Để định danh các dòng vi khuẩn đã phân lập thuộc loài nào, ngoài phương pháp dựa trên các đặc điểm sinh lý, sinh hóa cần áp dụng thêm kỹ thuật sinh học phân tử để nâng cao tính chính xác trong định danh loài của các chủng CNN2, CNN3 và CNN4.

- Kết quả định danh các vi sinh vật bằng phân tích gen 16S rRNA:

Các chủng phân lập CNN2, VNN3 và CNN4 được xác định bằng phân tích gen 16S rRNA (Trình tự gen của các chủng CNN2, VNN3 và CNN4 được trích dẫn tại phụ lục 3). So sánh sự giống nhau về các gen 16S rRNA của các chủng CNN2, VNN3 và CNN4 với trình tự công bố trên GenBank được thể hiện bằng bảng 3.6. Kết quả nghiên cứu cho thấy:

+ Chủng CNN2: Chủng CNN2 có độ tương đồng rất cao (trên 99.7%) với các loài thuộc chi *Methylobacterium* và *Methylorubrum*, hai chi vi khuẩn được biết đến với khả năng sử dụng methanol và các hợp chất một carbon (C1) làm nguồn năng lượng.

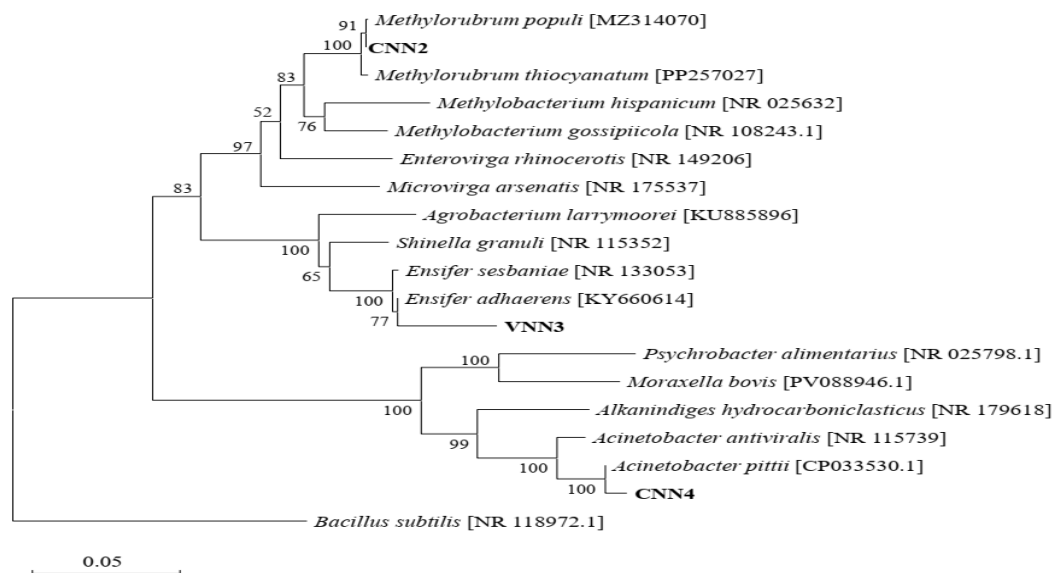
+ Chủng VNN3: Chủng VNN3 có độ tương đồng khoảng 98% với các loài thuộc chi *Ensifer*, đặc biệt là *Ensifer adhaerens*. Chi *Ensifer* (trước đây được gọi là *Sinorhizobium*) là nhóm vi khuẩn có khả năng cố định đạm và thường sống cộng sinh với cây họ đậu.

Chủng CNN4: Chủng CNN4 có độ tương đồng rất cao (trên 99%) với các loài thuộc chi *Acinetobacter*, đặc biệt là *Acinetobacter pittii* và *Acinetobacter calcoaceticus*. Chi *Acinetobacter* là nhóm vi khuẩn Gram âm, thường được tìm thấy trong môi trường đất và nước, một số loài có khả năng gây bệnh ở người.

Từ kết quả thu được có thể kết luận 3 chủng phân lập có điểm tương đồng rất cao với các chủng *Methylobacter populi* (CNN2), *Ensifer adhaerens* (VNN3) và *Acinetobacter pittii* (CNN4). Các thành viên thuộc các chi *Methylobacteria*, *Ensifer* và *Acinetobacter* đã được chứng minh là có khả năng phân hủy CPF [86, 118, 127, 184].

Chủng *Acinetobacter* sp. MemCl4 phân lập từ đất nông nghiệp ở Ấn Độ đã cho thấy khả năng phân hủy 98% CPF trong vòng 144 giờ ủ [141]. Tỷ lệ loại bỏ CPF được tìm thấy là 89,5% đến 91,1% bởi vi khuẩn *Hortaea* sp. B15 trong vòng 30 giờ ủ [88]. Trong một nghiên cứu khác, 23% CPF có thể bị loại bỏ bởi *Enterobacter*

sp. SWLC2 [97]. Có báo cáo cho rằng *M. populi* YC-XJ1 sở hữu các gen quan trọng mã hóa các enzyme chịu trách nhiệm phân hủy các hợp chất ngoại sinh khác nhau, bao gồm cả CPF [118].



Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loại của các chủng được lựa chọn

Kết quả định danh trên sẽ là nền tảng để xác định độ an toàn sinh học theo hướng dẫn số 90/679/EWG ngày 26/11/1990 của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học và là cơ sở khoa học phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm xây dựng quy trình tạo chế phẩm sinh học chứa VSV phân giải CPF trong đất trồng nông nghiệp.

+ Độ an toàn của các chủng vi sinh vật

Độ an toàn của các chủng VSV được thử nghiệm trên động vật (chuột BALB/c). Kết quả thử nghiệm được mô tả trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Mức độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật

TT	Ký hiệu mẫu	Số chuột tiêm	Liều tiêm (ml)	Đường tiêm	Thời gian theo dõi (ngày)	Số chuột ốm hoặc chết	Thời gian chết chuột (h)	Đánh giá
1	CNN2	5 con	0,2	TM	10	0	0	AT
		5 con	0,5	PX	10	0	0	AT
2	VNN3	5 con	0,2	TM	10	0	0	AT
		5 con	0,5	PX	10	0	0	AT

TT	Ký hiệu mẫu	Số chuột tiêm	Liều tiêm (ml)	Đường tiêm	Thời gian theo dõi (ngày)	Số chuột ốm hoặc chết	Thời gian chết chuột (h)	Đánh giá
3	CNN4	5 con	0,2	TM	10	1/5	16	KAT
		5 con	0,5	PX	10	1/5	16	KAT
4	Đôi chứng	5 con	0,2	TM	10	0	0	AT
		5 con	0,5	PX	10	0	0	AT

Ký hiệu: TM: Tĩnh mạch; PX: Phức xoang; AT: An toàn; KAT: Không an toàn

Từ kết quả đạt được, có thể thấy trong số 3 chủng VSV thử nghiệm, có 2/3 chủng được đánh giá an toàn, không gây chết chuột nhất trắng, gồm chủng có ký hiệu CNN2 và VNN3. Một chủng được đánh giá không an toàn, gây chết 1/5 chuột nhất trắng là chủng CNN4.

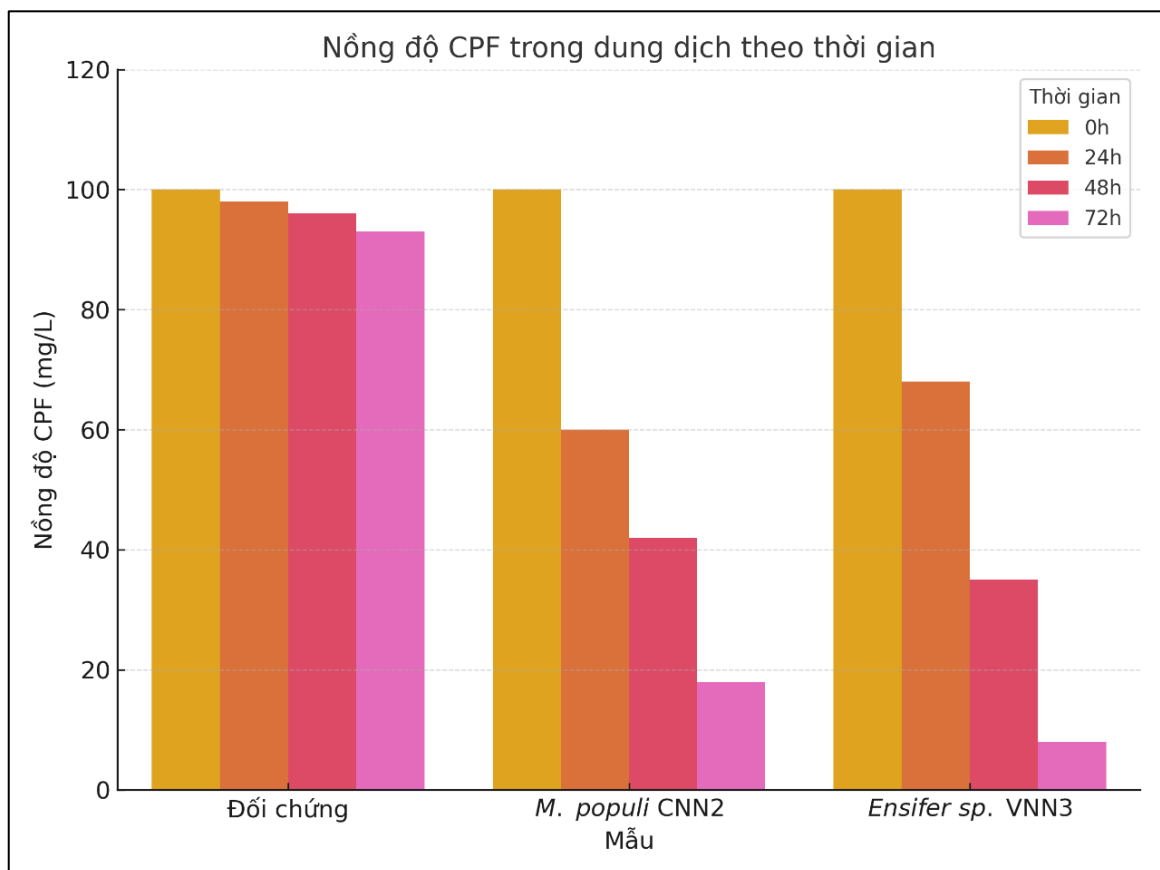
Đối chiếu với danh mục các loài vi sinh vật an toàn của Cộng đồng châu Âu cũng như danh mục các loài vi sinh vật bị hạn chế sử dụng cho thấy các chủng *Methylobacterium populi* (có quan hệ gần với chủng CNN2) chủng *Ensifer adhaerens* (có quan hệ gần với chủng VNN3) không nằm trong nhóm vi sinh vật bị hạn chế sử dụng. Cùng với kết quả phân loại theo cấu trúc 16S rDNA nêu trên, đề tài luận án đã xác định được các chủng CNN2 và VNN3 có thể ứng dụng trong xử lý dư lượng CPF trong đất trồng cây nông nghiệp và đề xuất tên gọi chủng CNN2 là *Methylobacterium populi* CNN2 và chủng VNN3 là *Ensifer sp.* VNN3

+ Khả năng phân hủy CPS trong môi trường dịch thể của các chủng vi sinh vật:

Các chủng vi sinh vật *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 được chọn lọc để nghiên cứu khả năng phân hủy CPF bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường MSM bổ sung 100 mg/L CPF. Nồng độ CPF ở mẫu đối chứng (không cấy) và mẫu cấy các chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 sau 24, 48 và 72h được thể hiện trên Hình 3.6. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng VSV nghiên cứu đều có khả năng làm giảm CPF trong môi trường. *Ensifer sp.* VNN3 cho thấy tốc độ phân hủy CPF cao hơn *M. populi* CNN2. Sau 24 giờ, nồng độ CPF giảm lần lượt là 41,1% và 34,2% ở chủng *Ensifer sp.* VNN3 và *M. populi* CNN2. Sau 72 giờ, nồng độ CPF

trong các mẫu được cấy vi khuẩn *Ensifer sp.* VNN3, *M. populi* CNN2 lần lượt là $4,95 \pm 0,02$, $19,06 \pm 0,03$ mg/L; trong khi nồng độ CPF trong mẫu đối chứng là $94,34 \pm 0,98$ mg/L. Mức độ giảm nồng độ CPF của chủng *Ensifer sp.* VNN3 và *M. populi* CNN2 sau 72 giờ lần lượt đạt khoảng 95,2% và 81,4%.

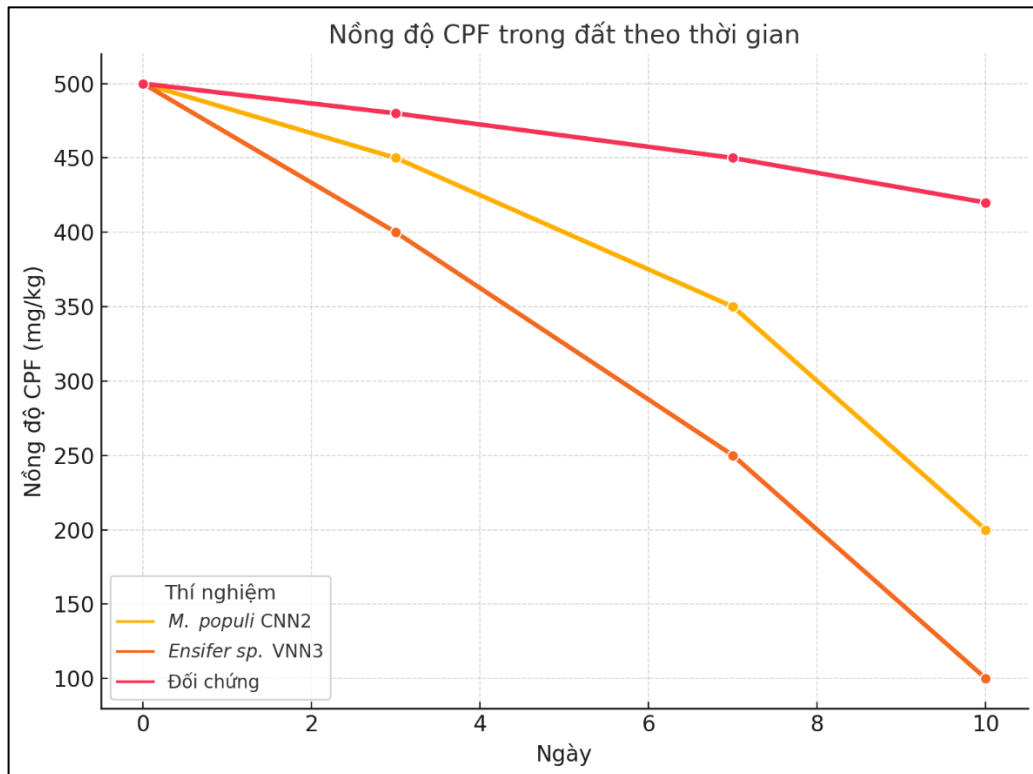
Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng phân hủy CPF của 2 chủng được chọn trong nghiên cứu này cao hơn so với báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Năm 2014, nghiên cứu của Zhao và cộng sự cho thấy khả năng phân hủy CPF của chủng vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* D10 phân lập từ vùng rễ họ là 60,2% sau 18 ngày. Trong một nghiên cứu khác, chủng *Methylobacteria populi* YC-XJ1 phân lập từ đất sa mạc có khả năng phân hủy CPF 27,3% sau 72 giờ [118]. Hơn nữa, Elshikh và cộng sự đã đưa ra kết quả chủng *Bacillus cereus* CP6 và *Klebsiella pneumoniae* CP19 phân hủy khoảng 70% CPF ở nồng độ 200 – 300 mg/L sau 10 ngày [72].



Hình 3.6. Sự thay đổi nồng độ CPF theo thời gian khác nhau khi có mặt chủng *Ensifer sp.* VNN3 và *M. populi* CNN2

Để phục vụ cho nghiên cứu tạo chế phẩm VSV xử lý CPF trong đất trồng cây, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá khả năng phân hủy CPF trong đất ở điều kiện in vitro của chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 theo phương pháp ủ với đất trồng trọt có bổ sung CPF.

Sự thay đổi nồng độ CPF trong các mẫu đất có nhiễm chủng vi khuẩn *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 sau 3, 7 và 10 ngày ủ được thể hiện trên Hình 3.7.



Hình 3.7. Nồng độ CPF trong mẫu đất sau khi cấy chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3

Đồ thị hình 3.7. cho thấy nồng độ CPF giảm dần sau 3 ngày ủ và giảm mạnh sau 10 ngày ủ, số liệu trình bày trong đồ thị 3.7. cũng cho thấy khi có mặt chủng *Ensifer sp.* VNN3 nồng độ CPF giảm mạnh hơn khi so với mẫu đất có bổ sung chủng *M. populi* CNN2.

Sau 7 ngày, nồng độ CPF giảm từ 500 mg/kg xuống còn $225 \pm 1,73$ và $349 \pm 0,59$ mg/kg khi bổ sung chủng *Ensifer sp.* VNN3 và *M. populi* CNN2, trong khi ở mẫu đối chứng, CPF chỉ giảm được $62 \pm 2,65$ mg/kg. Sau 10 ngày, nồng độ CPF giảm lần lượt là 77,6 và 60,6% (tương ứng $112 \pm 1,73$ và $197 \pm 2,08$ mg/kg) khi bổ

sung chủng *Ensifer sp. VNN3* và *M. populi* CNN2. Kết quả của nghiên cứu hiện tại vượt trội hơn so với kết quả của Li et al. (2020), cụ thể nồng độ CPF ban đầu chỉ giảm 27,3% sau 3 ngày do chủng *M. populi* YC-XJ1 phân lập từ đất sa mạc. Trong một nghiên cứu khác, các chủng *Achromobacter xylosoxidans* (JCp4) và *Ochrobactrum sp.* (FCp1) được phân lập từ đất bị nhiễm thuốc BVTV có thể làm giảm nồng độ CPF lần lượt là 40% và 60% sau 7 và 10 ngày ủ (nồng độ CPF ban đầu là 200 mg/kg) [118]. Kết quả cho thấy rằng chủng *Ensifer sp. VNN3* và *M. populi* CNN2 có tiềm năng xử lý sinh học CPF cao hơn hoặc tương đương so với một số chủng thuộc các nghiên cứu trước đây trong đất nông nghiệp có nhiễm CPF, góp phần loại bỏ dư lượng CPF trong nông nghiệp và hướng tới một nền nông nghiệp bền vững.

+ Mối quan hệ của giữa chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp. VNN3*

Với mục tiêu tạo ra một chế phẩm sinh học thân thiện với môi trường và có khả năng phân hủy dư lượng CPF trong đất trồng nông nghiệp, đề tài đã tiến hành nghiên cứu mối quan hệ của chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp. VNN3*, nếu chúng có khả năng cùng tồn tại trong chế phẩm thì sẽ khai thác được tối đa hoạt tính của chúng khi ứng dụng ngoài thực tiễn.

Bảng 3.6. Mối quan hệ giữa chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp. VNN3*

Chủng VSV	<i>A. chroococcum</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
<i>A. chroococcum</i>		+	+	+
<i>B. polymyxa</i>	+		+	+
<i>M. populi</i> CNN2	+	+		+
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	+	+	+	

(+): không ức chế

(-): ức chế

Trong thí nghiệm đánh giá này chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp. VNN3* được cấy rìa trên cùng một đĩa petri chứa môi trường LB agar nhằm tạo những điểm tiếp xúc giữa các đường cấy, nếu ở những điểm tiếp xúc xuất hiện vùng vô khuẩn chứng tỏ 2 chủng đó đối kháng lẫn nhau và ngược lại. Nghiên cứu cũng sử dụng chủng vi sinh vật có ích trong nông nghiệp như chủng vi sinh vật cố định đạm tự do

Azotobacter chroococcum và chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hợp chất photphat khó tan như *Bacillus polymyxa*. Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.6) cho thấy chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3 có thể sinh trưởng và phát triển cùng trên môi trường LB cùng với chủng *Azotobacter chroococcum* và chủng *Bacillus polymyxa*, và chúng không ức chế lẫn nhau khi nuôi cấy trên môi trường LB. Kết quả cho thấy *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3 đủ điều kiện cho lựa chọn phát triển chế phẩm.

Trên thực tế, nhiều nghiên cứu đã chứng minh hai chủng vi khuẩn *M. populi* và *Ensifer sp.* ngoài khả năng phân giải CPF còn có một số các hoạt tính sinh học có ích khác, có thể đưa vào ứng dụng trong xử lý và làm sạch môi trường bị ô nhiễm các chất hữu cơ và nâng cao năng suất cây trồng. Cụ thể, trong nghiên cứu của Trần Thị Giang và cs (2014) về nhận diện vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật đã phát hiện ra 5 dòng có khả năng cố định đạm và phân giải lân cao (0,8-2,21mg/l NH_4^+ , 27,8-50,6 mg/l P_2O_5), trong đó có dòng NPD855 tương đồng với *E. adhaerens* M27 [35]. Nghiên cứu của M. Antonio Rogel (2001) cho thấy, *Ensifer adhaerens* là một loại vi khuẩn đất bám vào các vi khuẩn khác và có thể gây ra hiện tượng phân hủy các vi khuẩn này. Dựa trên trình tự gen rRNA, *E. adhaerens* có quan hệ họ hàng với *Sinorhizobium* spp. *E. adhaerens* ATCC 33499 không tạo nốt sần trên *Phaseolus vulgaris* (đậu) hoặc *Leucaena leucocephala*, nhưng với các plasmid cộng sinh từ *Rhizobium tropici* CFN299, nó đã tạo thành các nốt sần cố định nitơ trên cả hai cây chủ. *E. adhaerens* được xác định là có mặt trong các nốt sần sau khi phân lập và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc [122]. Trong nghiên cứu của mình, Valeria Ventorino (2014) cũng khẳng định việc sử dụng vi sinh vật để đẩy nhanh quá trình giải độc tự nhiên của các chất độc hại trong đất là một phương pháp thân thiện với môi trường và chi phí thấp so với phương pháp đốt cháy và xử lý hóa học độc hại. Mười bốn chủng có khả năng phát triển trên môi trường chọn lọc tối thiểu với hỗn hợp phức tạp của các lớp hợp chất xenobiotics khác nhau làm nguồn cacbon duy nhất đã được phân lập từ đất của khu vực công nghiệp cũ ACNA (Aziende Chimiche Nazionali Associate) ở Cengio (Savona, Ý). Trong đó, chủng tiềm năng nhất là *Methylobacterium*

populi VP2 đã được xác định bằng phương pháp dựa trên đặc điểm kiểu hình, sinh hóa và phân tử. Chúng này cũng thể hiện hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng thực vật như: có khả năng sản xuất axit indole-3-acetic (IAA) và siderophores, hòa tan phosphate và tạo ra màng sinh học. Đây là báo cáo đầu tiên về sự xuất hiện đồng thời khả năng phân hủy Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) bởi *Methylobacterium populi* và nhiều hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng thực vật của nó. Do đó, chủng bản địa này đã được lựa chọn cho việc phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ xenobiotics để khắc phục đất bị ô nhiễm một mình hoặc liên kết với thực vật [175]

Cơ chế của việc phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp của *Methylobacterium populi* đã được chỉ ra ở nghiên cứu của Li và cs (2020). Vi khuẩn *Methylobacterium populi* YC-XJ1 được phân lập từ đất sa mạc thể hiện khả năng phân hủy đa dạng đối với thuốc diệt cỏ este oxyphenoxypropionic thơm (AOPP), este phthalate (PAE), chất chống cháy hữu cơ phospho (OPFR), Chlorpyrifos và phoxim. Bộ gen của YC-XJ1 đã được giải trình tự và phân tích một cách có hệ thống. YC-XJ1 có nhiều con đường phân hủy hợp chất ngoại sinh và nguồn hydrolase. Gen *qpeh2* phân hủy quizalofop-p-ethyl (QPE) và gen *deph1* phân hủy diethyl phthalate (DEP) đã được nhân bản và thử nghiệm. Các đặc tính của hydrolase tương ứng cũng đã được đề cập trong nghiên cứu. Điều này đã làm sáng tỏ một cách có hệ thống sự đa dạng trao đổi chất của chủng YC-XJ1 thông qua sự kết hợp giữa phân tích bộ gen và các thí nghiệm trong phòng. Những kết quả này cho thấy chủng YC-XJ1 với khả năng phân hủy sinh học xenobiotics đa dạng là một ứng viên đầy hứa hẹn cho việc xử lý sinh học các địa điểm bị ô nhiễm [118]

Căn cứ vào những nghiên cứu đã liệt kê ở trên, luận án cũng đã tiến hành khảo sát thêm hoạt tính sinh học có ích của 2 chủng được lựa chọn, cụ thể là khả năng phân giải hợp chất phosphat khó tan của các chủng lựa chọn. Kết quả kiểm tra nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Khả năng phân giải phosphat khó tan của chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3

Chủng VK	% giảm CPF trong môi trường nuôi cấy có chứa 100 mg CPF/L dịch	Đường kính vòng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (D-d) mm
<i>M. populi</i> CNN2	79,6	22
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	88,2	18

Kết quả kiểm tra hoạt tính sinh học còn cho thấy ngoài khả năng phân giải CPF, *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 còn có hoạt tính phân giải hợp chất phosphat khó tan, đường kính vòng phân giải D-d của chủng lần lượt là 22 và 18mm. Kết quả thu được cho thấy các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu đều có tính chất đa hoạt tính sinh học, phù hợp với những nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự, một chủng *Pseudomonas sp.* được phân lập từ đất nông nghiệp ô nhiễm thuốc BVTV đã cho thấy hoạt tính phosphatase mạnh với đường kính vòng phân giải (D-d) khoảng 20 mm [182]. Nghiên cứu của Singh & Walker (2006) cũng cho thấy nhiều chủng vi sinh không chỉ phân giải CPF mà còn kích hoạt các enzyme như phosphatase, với vòng phân giải thường nằm trong khoảng từ 15 mm đến 25 mm [162]. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các hợp chất phosphat không tan, hỗ trợ việc cải thiện sẵn dinh dưỡng trong đất; tính chất này có ý nghĩa làm tăng thêm hiệu quả khi ứng dụng trong thực tế.

3.3. Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý dư lượng thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ trong đất trồng chè.

Trong công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật, quá trình nhân sinh khối vi sinh vật đóng vai trò quan trọng quyết định đến chất lượng sản phẩm. Đáp ứng mục tiêu xây dựng qui trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật, đề tài luận án đã tiến hành nghiên cứu một số điều kiện thích hợp cho quá trình nhân sinh khối các chủng vi sinh vật như: pH, nhiệt độ, môi trường, lượng không khí cấp, thời gian thu sinh khối... từ đó đưa ra các thông số kỹ thuật phù hợp cho quá trình nhân sinh khối các chủng vi sinh vật.

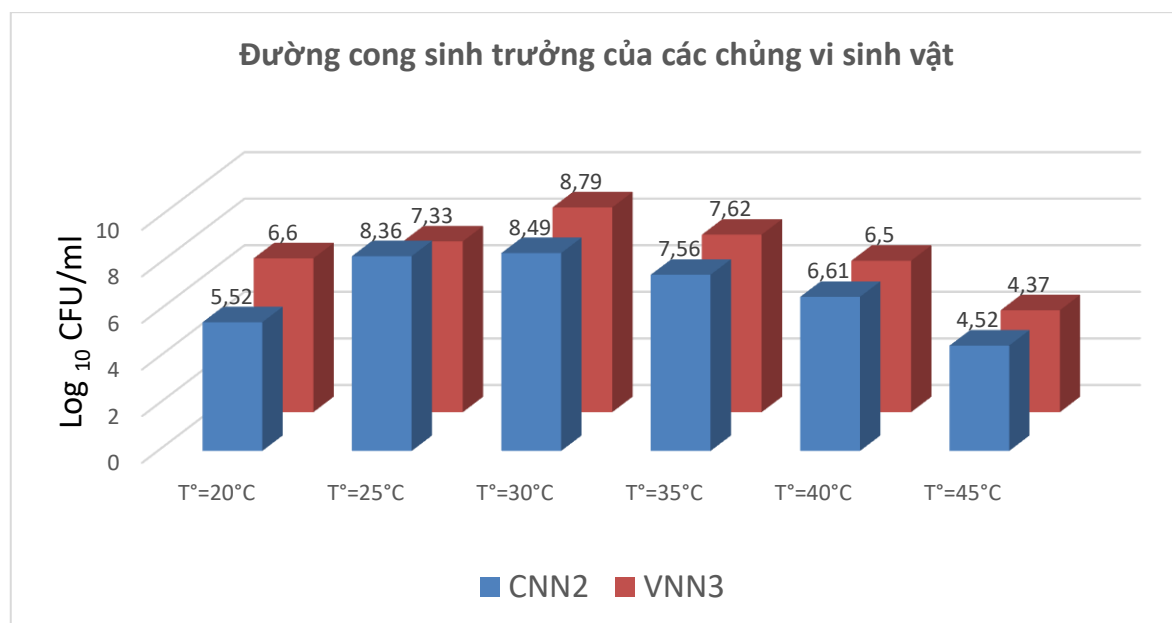
3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố quyết định đến hiệu suất sinh trưởng của vi sinh vật trong hệ thống lên men. Tùy vào chủng vi sinh và mục đích ứng dụng, việc kiểm soát nhiệt độ cần được tối ưu để cân bằng giữa tốc độ sinh trưởng, ổn định quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.

Để xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình nhân sinh khối các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu, đề tài đã tiến hành lên men sinh khối trong hệ thống lên men tự động Hàn Quốc (Bộ môn Sinh học môi trường - Viện Môi trường Nông nghiệp), có cùng các điều kiện:

- + Môi trường nuôi cấy: Môi trường dịch thể LB.
- + pH: Trung tính.
- + Lưu lượng cấp khí: 0,7 dm³ không khí/lít môi trường/phút.
- + Thời gian lên men: 72 giờ.

Nhiệt độ trong quá trình lên men sinh khối được điều chỉnh ở các mức khác nhau (từ 20°C ÷ 45°C). Kết quả kiểm tra mật độ tế bào sau 72 giờ nuôi cấy được thể hiện trong hình 3.8



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của VSV

Bảng số liệu hình 3.8 cho thấy nhiệt độ 20°C không thích hợp cho sinh trưởng của chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3, ở điều kiện

nhiệt độ này mật độ tế bào VK chỉ đạt $10^5 \div 10^6$ CFU/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3 sinh trưởng tốt và đạt mật độ cao nhất khi nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 25-30 °C, ở nhiệt độ điều kiện 30°C chủng *M. populi* CNN2 đạt mật độ $3,1 \times 10^8$ CFU/ml, chủng *Ensifer sp.* VNN3 đạt mật độ $6,2 \cdot 10^8$ CFU/ml; ở điều kiện 35-45°C chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3 không phù hợp với quá trình lên men nhân sinh khối các chủng vi khuẩn nghiên cứu, sau 72 giờ mật độ tế bào xu hướng giảm dần.

Kết quả cho thấy cả hai chủng vi khuẩn *Methylobacterium populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 đều đạt mật độ tế bào cao nhất ở 30°C, tương ứng là $3,1 \times 10^8$ CFU/mL và $6,2 \times 10^8$ CFU/mL. Đây là ngưỡng nhiệt độ tối ưu giúp cân bằng giữa tốc độ phân chia tế bào và tính ổn định của quá trình trao đổi chất nội bào. Ở các mức nhiệt cao hơn (35°C–45°C), mật độ tế bào đều suy giảm rõ rệt, cho thấy hiện tượng ức chế nhiệt độ đối với hệ enzyme và cấu trúc protein của cả hai chủng.

Điều này phù hợp với đặc tính sinh học của vi khuẩn ưa ấm (mesophilic bacteria), vốn có khoảng nhiệt độ sinh trưởng tối ưu từ 25°C đến 35°C. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận *M. populi* phát triển tốt trong môi trường nhiệt độ từ 28°C đến 32°C, vượt quá 35°C thì hoạt tính phân giải hợp chất hữu cơ bắt đầu suy giảm mạnh do mất cân bằng nội môi (homeostasis) trong tế bào vi khuẩn.

Tương tự, với *Ensifer sp.*, kết quả cũng tương đồng với công bố của Zhao et al. (2020), khi chủng này được phân lập từ đất nông nghiệp và cho thấy khả năng tăng trưởng tối ưu tại 30°C trong môi trường giàu dinh dưỡng. Khi vượt qua ngưỡng 35°C, khả năng tạo biofilm cũng giảm đi đáng kể, cho thấy cơ chế kiểm soát nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến hệ gen điều hòa stress nhiệt.

Một điểm cần chú ý là mật độ sinh khối của *Ensifer sp.* VNN3 luôn cao hơn *M. populi* CNN2 ở cùng điều kiện, cho thấy tiềm năng ứng dụng của *Ensifer sp.* vượt trội hơn trong các hệ thống lên men hiếu khí nhiệt độ trung bình, đặc biệt trong xử lý dư lượng hợp chất organophosphates (như Chlorpyrifos ethyl).

Từ kết quả nghiên cứu trên của Đề tài cho thấy:

- Chủng *M. populi* CNN2 lên men nhân sinh khối thích hợp ở dải nhiệt độ từ 25÷30°C.

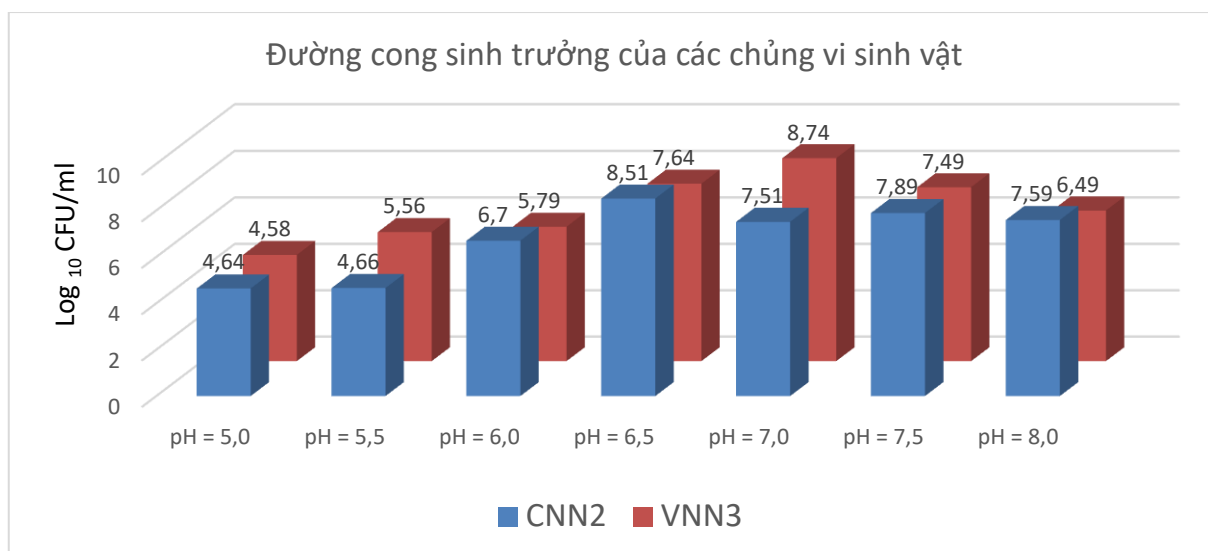
- Chủng *Ensifer sp.* VNN3 lên men nhân sinh khối thích hợp ở nhiệt độ 30°C.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH

pH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình nhân sinh khối. Trong nghiên cứu này, Đề tài đã sử dụng kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của 2 chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu và lựa chọn nhiệt độ lên men sinh khối phù hợp với cả 2 chủng là 30°C. Kết quả được trình bày ở hình 3.9

- + Môi trường nuôi cấy: Môi trường dịch thể LB.
- + Nhiệt độ trong quá trình lên men nhân sinh khối: 30°C.
- + Lưu lượng cấp khí: 0,7 dm³ không khí/lít môi trường/phút.
- + Thời gian lên men: 72 giờ.
- + pH: được điều chỉnh pH ban đầu = 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0.

Số liệu hình 3.9 cho thấy điều kiện pH ban đầu từ 5,0÷6,0 không phù hợp với sinh trưởng của các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu, mật độ tế bào $\leq 10^6$ CFU/ml. Chủng sinh trưởng tốt và đạt mật độ cao nhất khi nuôi cấy ở điều kiện pH=6,5; mật độ tế bào đạt $3,4 \cdot 10^8$ CFU/ml. Khi được lên men sinh khối trong điều kiện pH ban đầu =7,0 chủng *Ensifer sp.* VNN3 đạt mật độ cao nhất $5,6 \cdot 10^8$ CFU/ml. Số liệu trong bảng 3.12 cũng cho thấy pH ban đầu của môi trường lên men sinh khối >7,0 không phù hợp với *M. populi* CNN2, ở điều kiện pH= 7,0 này sau 72 giờ nuôi cấy *M. populi* CNN2 đạt mật độ tế bào $3,4 \cdot 10^7$ CFU/ml và giảm hơn khi nuôi cấy ở pH= 7,5; 8,0. Đối với chủng *Ensifer sp.* VNN3 đạt mật độ tế bào giảm xuống $3,2 \cdot 10^7$ CFU/ml khi nuôi cấy ở pH= 7,5 sau 72 giờ.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của vi sinh vật

Biểu đồ hình 3.9 cho thấy cả hai chủng vi khuẩn đều chịu ảnh hưởng mạnh của pH môi trường, với các mức sinh trưởng rất khác nhau theo từng khoảng pH. Tuy nhiên, mỗi chủng có một khoảng pH tối ưu riêng biệt:

- *M. populi* CNN2 đạt mật độ cao nhất ở pH 6,5 (log₁₀ ~ 8,53), cho thấy đây là mức pH tối ưu giúp cân bằng hệ enzyme nội bào và màng tế bào. Chủng này nhạy cảm với môi trường acid và vẫn duy trì sinh trưởng ổn định ở pH kiềm nhẹ (7,5–8,0).

- *Ensifer sp.* VNN3 thể hiện sự ưa thích pH trung tính và hơi kiềm, đạt mật độ tối đa ở pH 7,0 (log₁₀ ~ 8,75). Chủng này có biên độ thích nghi rộng hơn, thích hợp cho các môi trường đất trung tính đến kiềm nhẹ.

- So sánh với nghiên cứu trước, kết quả hoàn toàn phù hợp với đặc tính sinh học của hai chủng vi khuẩn. Các công bố khác cũng cho thấy pH ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính enzyme và hệ sinh học vi khuẩn trong quá trình xử lý môi trường. Các kết quả này phù hợp với kết luận trong nghiên cứu của Hwang và cs năm 2009, khi pH ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ tổng hợp protein và hoạt tính enzyme của vi khuẩn trong quá trình xử lý chất ô nhiễm [93].

Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy:

- Chủng *M. populi* CNN2 thích hợp ở pH môi trường lên men sinh khối ban đầu = 6,5.

- Chủng *Ensifer sp.* VNN3 thích hợp ở pH môi trường lên men sinh khối ban đầu = 7,0.

3.3.3. Môi trường nhân sinh khối và thời gian nuôi cấy

Để lựa chọn được môi trường nhân sinh khối các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu sản xuất chế phẩm, Đề tài đã kế thừa kết quả nghiên cứu về môi trường dinh dưỡng do Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam và Viện Môi trường Nông nghiệp thực hiện trong giai đoạn 2000-2020 [7, 14, 15].

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu là môi trường dinh dưỡng đã được tối ưu hóa các thành phần dinh dưỡng đối với sinh trưởng và phát triển tương ứng của các chủng sử dụng trong nghiên cứu này; với thành phần chế tạo môi trường là những nguyên liệu, hóa chất rẻ tiền và sẵn có tại Việt Nam. Vi sinh vật được nhân sinh khối cấp 1 trên môi trường giàu dinh dưỡng LB, sau khi kiểm tra mật độ và độ thuần khiết tiếp tục nhân sinh khối trên môi trường sản xuất SX1, SX2, SX3 với tỷ lệ 5% giống cấp 1. Các thông số kỹ thuật sử dụng trong quá trình nhân sinh khối:

+ Môi trường nuôi cấy: Môi trường dịch thể SX1; SX2; SX3.

+ Tỷ lệ giống cấp 1: 5% (giống cấp 1 được nhân sinh khối, trong môi trường dịch thể Gause, trên máy lắc dàn với tốc độ lắc 150 vòng/phút, dịch lên men sau 48 giờ được kiểm tra độ đảm bảo mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml).

+ Nhiệt độ trong quá trình nhân sinh khối chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3: 30°C

+ pH môi trường ban đầu cho chủng *M. populi* CNN2: 6,5.

+ pH môi trường ban đầu cho chủng *Ensifer sp.* VNN3: 7,0.

+ Thời gian lên men nhân sinh khối: 96 giờ.

+ Lượng không khí cấp: 0,70 dm³ không khí/lít môi trường/phút.

Trong quá trình lên men sinh khối, đề tài tiến hành lấy mẫu và kiểm tra mật độ tế bào theo thời gian. Kết quả lựa chọn môi trường nhân sinh khối và thời gian nuôi cấy các chủng vi sinh vật được tổng hợp trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Khả năng sinh trưởng của vi sinh vật trên các môi trường

Chủng VK	Sự sinh trưởng và phát triển của chủng (CFU/ml)				
	0 giờ	Sau 24 giờ	Sau 48 giờ	Sau 72 giờ	Sau 96 giờ
	Môi trường SX1				
<i>M. populi</i> CNN2	$5,3(\pm 1,6) \times 10^4$	$3,7(\pm 1,4) \times 10^6$	$2,4(\pm 1,6) \times 10^8$	$5,4(\pm 1,5) \times 10^8$	$5,5(\pm 1,9) \times 10^8$
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	$3,3(\pm 1,4) \times 10^4$	$5,5(\pm 1,7) \times 10^7$	$5,2(\pm 1,2) \times 10^8$	$4,3(\pm 1,0) \times 10^8$	$4,7(\pm 1,6) \times 10^8$
Môi trường SX2					
<i>M. populi</i> CNN2	$3,6(\pm 1,2) \times 10^4$	$5,7(\pm 1,7) \times 10^5$	$5,8(\pm 1,3) \times 10^6$	$6,2(\pm 1,4) \times 10^8$	$6,4(\pm 1,8) \times 10^8$
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	$3,5(\pm 1,8) \times 10^4$	$3,8(\pm 1,9) \times 10^6$	$6,5(\pm 1,6) \times 10^7$	$5,3(\pm 1,1) \times 10^7$	$6,8(\pm 1,7) \times 10^8$
Môi trường SX3					
<i>M. populi</i> CNN2	$3,8(\pm 1,0) \times 10^4$	$3,5(\pm 1,7) \times 10^5$	$4,4(\pm 1,5) \times 10^6$	$6,5(\pm 1,9) \times 10^7$	$2,2(\pm 1,3) \times 10^8$
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	$4,6(\pm 1,9) \times 10^4$	$4,2(\pm 1,2) \times 10^6$	$5,1(\pm 1,4) \times 10^7$	$7,4(\pm 1,5) \times 10^7$	$6,1(\pm 1,6) \times 10^8$

Số liệu trong bảng 3.8 cho thấy mật độ tế bào các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và thời gian nhân sinh khối. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả 2 chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 đều có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường SX1, tại thời điểm sau 72 giờ mật độ tế bào chủng *M. populi* CNN2 đạt $5,4 \cdot 10^8$ CFU/ml; sau 48 giờ lên men sinh khối chủng *Ensifer sp.* VNN3 đạt mật độ $5,2 \cdot 10^8$ CFU/ml. Khi được nuôi cấy trên môi trường dịch thể SX2 cả 2 chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 đều đạt mật độ tế bào $\geq 6 \cdot 10^8$ CFU/ml sau 72 giờ; trên môi trường SX3 cả 2 chủng vi sinh vật đạt mật độ tế bào $\geq 2 \cdot 10^8$ CFU/ml sau 96 giờ nuôi cấy.

Từ số liệu nghiên cứu bảng 3.8 cho thấy để thu sinh khối cao nhất với thời gian ngắn nhất thì đối với chủng *M. populi* CNN2 có thể sử dụng môi trường sản xuất SX1, SX2 và thu sinh khối sau 72 giờ; chủng *Ensifer sp.* VNN3 có thể sinh trưởng tốt trên môi trường sản xuất SX1 và thời gian thu sinh khối là 48 giờ.

3.3.4. Tỷ lệ giống cấp 1

Với mục tiêu tăng sinh khối các chủng vi sinh vật, ngoài các yếu tố về môi trường dinh dưỡng, điều kiện nuôi cấy thì lượng giống cấp 1 bổ sung vào quá trình lên men nhân sinh khối hết sức quan trọng, nó quyết định chất lượng và chi phí sản xuất. Việc nghiên cứu đưa ra một tỷ lệ giống cấp 1 thích hợp trong quá trình lên men là rất cần thiết. Giống cấp 1 được sản xuất trên môi trường chuẩn (môi trường

LB), sau đó được cấy vào môi trường lên men sinh khối sản xuất phù hợp với từng chủng vi sinh vật theo tỷ lệ khác nhau. Thông số kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- + Môi trường nuôi cấy: Môi trường dịch thể SX1.
- + Nhiệt độ trong quá trình nhân sinh khối chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3: 30°C.
- + pH môi trường ban đầu cho chủng *M. populi* CNN2: 6,5.
- + pH môi trường ban đầu cho chủng *Ensifer sp.* VNN3: 7,0.
- + Thời gian lên men: 72 giờ với chủng *M. populi* CNN2, 48 giờ với chủng *Ensifer sp.* VNN3.

+ Tỷ lệ giống cấp 1: Bổ sung ở các mức khác nhau từ 0,5÷5%. Giống cấp 1 được nhân trên môi trường chuẩn LB, được kiểm tra độ thuần khiết và phải đạt mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.9.

Bảng số liệu 3.9 cho thấy khi lượng giống cấp 1 cung cấp vào trong quá trình nhân sinh khối từ 0,5 - 2 % thì khả năng sinh trưởng và phát triển của cả 2 chủng vi sinh vật trong nghiên cứu đạt mật độ thấp, khi lượng giống cấp 1 đưa vào 3% trở lên thì mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml và không có sự chênh lệch giữa các nồng độ 3%; 4% và 5%. Với tỷ lệ giống cấp 1 bổ sung ban đầu là 3%, mật độ tế bào chủng *M. populi* CNN2 đạt $4,56 \times 10^8$ và khi bổ sung lượng giống cấp 1 tăng lên 5% vẫn không có sự sai khác đáng kể về mật độ tế bào đạt được. Kết quả kiểm tra mật độ tế bào chủng *Ensifer sp.* VNN3 cũng cho kết quả tương tự: khi bổ sung lượng giống cấp 1 với tỷ lệ 3% mật độ tế bào đạt $5,40 \times 10^8$ CFU/ml, không sai khác so với công thức bổ sung 5% giống cấp 1 (mật độ tế bào đạt $5,50 \times 10^8$ CFU/ml). Kết quả nghiên cứu này cho thấy để tiết kiệm chi phí sản xuất thì lượng giống cấp 1 được bổ sung vào 3% thích hợp nhất cho quá trình lên men sinh khối các chủng sử dụng trong nghiên cứu.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến quá trình lên men sinh khối

Tỷ lệ giống bổ sung ban đầu (%)	Sự sinh trưởng và phát triển của chủng (CFU/ml)	
	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
0,5	$6,32(\pm 1.7) \times 10^7$	$6,57(\pm 1.5) \times 10^7$

Tỷ lệ giống bổ sung ban đầu (%)	Sự sinh trưởng và phát triển của chủng (CFU/ml)	
	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
1	$8,18(\pm 1.3) \times 10^7$	$8,22(\pm 1.9) \times 10^7$
2	$8,54(\pm 1.0) \times 10^7$	$8,36(\pm 1.7) \times 10^7$
3	$4,56(\pm 1.8) \times 10^8$	$5,40(\pm 1.3) \times 10^8$
4	$4,60(\pm 1.1) \times 10^8$	$5,46(\pm 1.0) \times 10^8$
5	$5,06(\pm 1.2) \times 10^8$	$5,50(\pm 1.4) \times 10^8$

3.3.5. Ảnh hưởng của liều lượng cấp khí

Lượng khí cấp trong quá trình nhân sinh khối các chủng vi sinh vật được điều chỉnh ở các mức: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 (dm^3 không khí/lít môi trường/phút). Ảnh hưởng của liều lượng cấp khí được thể hiện tại bảng 3.10.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của liều lượng cấp khí tới sinh trưởng của VSV

Liều lượng cấp khí (dm^3 không khí/lít môi trường/phút)	Sự sinh trưởng và phát triển của chủng (CFU/ml)	
	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
0,5	$4,35(\pm 1,3) \times 10^6$	$5,22(\pm 1,3) \times 10^6$
0,6	$3,32(\pm 1,7) \times 10^7$	$4,54(\pm 1,2) \times 10^7$
0,7	$6,59(\pm 1,4) \times 10^8$	$7,03(\pm 1,0) \times 10^8$
0,8	$5,78(\pm 1,9) \times 10^8$	$5,92(\pm 1,5) \times 10^8$
0,9	$5,11(\pm 1,5) \times 10^8$	$5,09(\pm 1,1) \times 10^8$

Kết quả tại bảng 3.10 cho thấy, với liều lượng cấp khí từ 0,5 - 0,6 dm^3 không khí/lít môi trường/phút thì mật độ các chủng vi sinh vật đều thấp hơn 10^8 CFU/ml; khi lượng khí cấp tăng lên từ 0,7 - 0,9 dm^3 không khí/lít môi trường/phút thì mật độ các chủng đã đạt trên 10^8 CFU/ml và mật độ các chủng đạt giá trị cao nhất ở liều lượng cấp khí là 0,7 dm^3 không khí/lít môi trường/phút, trên cơ sở đó nhóm nghiên cứu lựa chọn giá trị liều lượng cấp khí là 0,7 dm^3 không khí/lít môi trường/phút cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.6. Thông số kỹ thuật sử dụng trong lên men nhân sinh khối chủng

Trong nghiên cứu của Zhao et al. (2014), *Acinetobacter calcoaceticus* cho thấy sự phát triển tốt nhất ở 30°C và pH 7,5 trong môi trường chứa glucose và chiết

xuất nấm men, cũng hỗ trợ tính hiệu quả của điều kiện nhiệt độ ấm vừa phải và môi trường hơi axit đến trung tính cho các chủng vi khuẩn phân hủy CPF [184].

Ví dụ, Singh et al. (2004) quan sát thấy sự phát triển tối ưu của chủng *Enterobacter* B-14 ở 30°C và pH 7 trong môi trường LB, với khả năng phân hủy CPF đạt đỉnh trong vòng 7 ngày. Tương tự, Farhan et al. (2021) đã tối ưu hóa việc sản xuất sinh khối của các chủng phân hủy CPF của họ bằng cách sử dụng môi trường nutrient broth ở nhiệt độ 28–32°C và ghi nhận hoạt động phân hủy được tăng cường ở pH gần trung tính [161].

Trong nghiên cứu này, các điều kiện tối ưu để sản xuất sinh khối của *Methylobacterium populi* CNN2 và *Ensifer adhaerens* VNN3 được xác định là:

- Nhiệt độ: 30°C, pH: 6,5–7,0, Môi trường: SX1, Tỷ lệ giống cấp 1: 3%,
- Tốc độ thông khí: 0,7 dm³ không khí/lít/phút.

- Những phát hiện này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đó về các vi sinh vật phân hủy CPF.

Từ kết quả nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu, đề tài đã tổng hợp các điều kiện phù hợp cho quá trình nhân sinh khối các chủng vi sinh vật sử dụng trong sản xuất chế phẩm, kết quả được trình bày trong bảng 3.11.

Bảng 3.11: Thông số kỹ thuật phù hợp cho nhân sinh khối các chủng VSV

Thông số kỹ thuật	Chủng vi sinh vật	
	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
pH môi trường lên men	6,5	7,0
Nhiệt độ lên men sinh khối (°C)	30	30
Thời gian lên men sinh khối (giờ)	72	48
Tỷ lệ giống cấp 1 (%)	3	3
Môi trường lên men sinh khối	SX1	SX1
Lưu lượng cấp khí (dm ³ không khí/dm ³ môi trường/phút)	0,7	0,7

Trên cơ sở các kết quả đạt được, đề tài đã tiến hành lên men sinh khối các chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 theo các thông số kỹ thuật trong bảng 3.11.

3.3.7. Khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm

Trên cơ sở kế thừa các kết quả đã nghiên cứu thành công về công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật của Viện Môi trường nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, nghiên cứu đã tiến hành sản xuất chế phẩm VSV xử lý CPF theo phương pháp chất mang sử dụng trong qui trình sản xuất này là đường khan Dextro.

+ Nhân giống cấp 1 và lên men nhân sinh khối các chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 với các thông số kỹ thuật theo bảng tổng hợp kết quả 3.11. Sinh khối các chủng VSV (sau lên men phải được kiểm tra chất lượng, đảm bảo độ thuần khiết và mật độ tế bào $\geq 10^8$ CFU/ml) được li tâm tốc độ 6000v/p trong 30 phút.

Phối trộn sinh khối vi sinh vật sau li tâm với chất mang Dextro trên thiết bị trộn thùng quay với tỷ lệ 1 sinh khối VSV/100 Dextro, sản phẩm tạo ra cần đạt độ đồng nhất, độ ẩm sản phẩm sau trộn đạt 12%.

Kết quả nghiên cứu khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong sản phẩm được trình bày trong bảng 3.12:

Bảng 3.12: Mật độ chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 trong chế phẩm

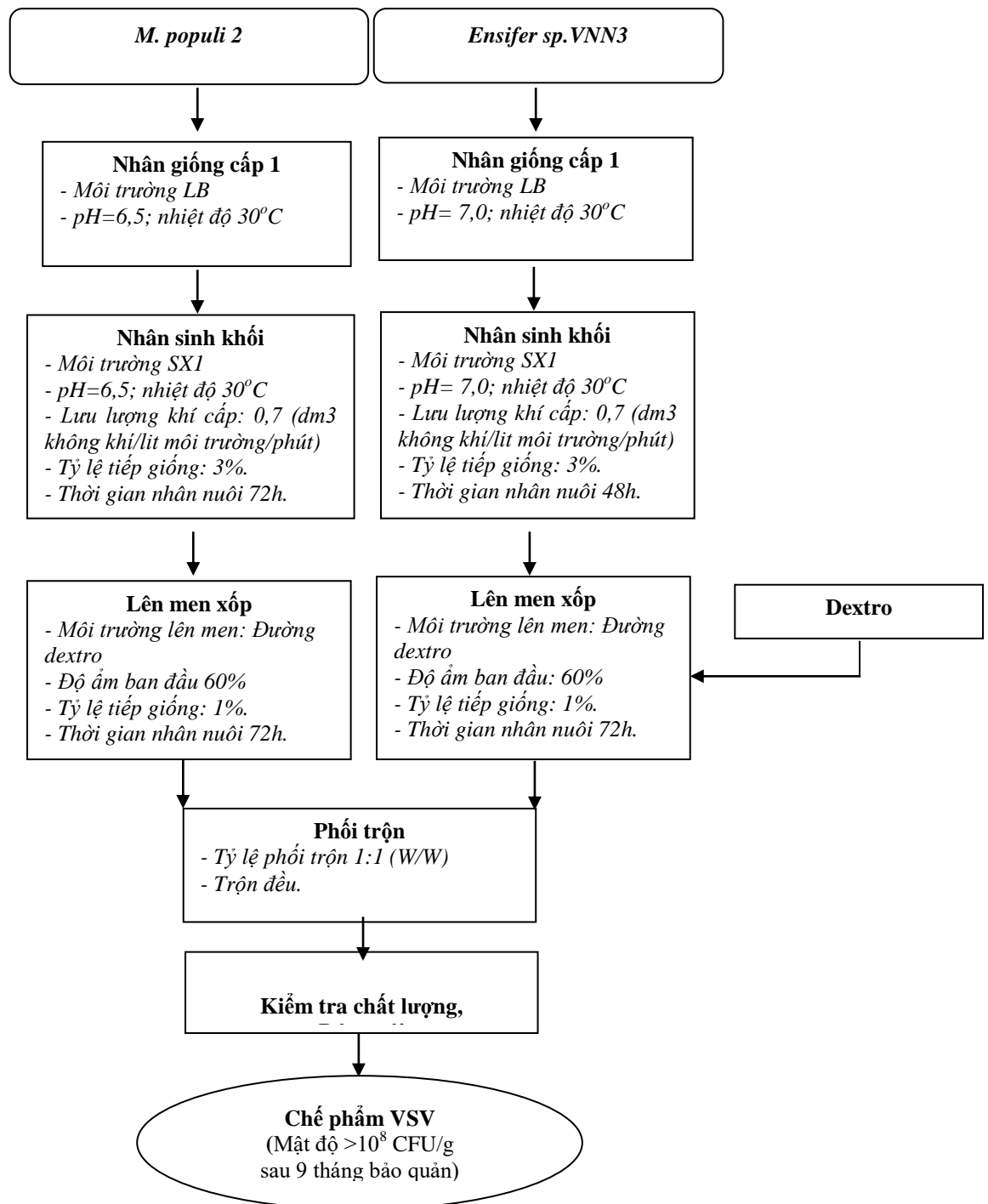
Chủng XK	Mật độ tế bào VSV (CFU/g)					
	0 giờ	Sau 1 tháng	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 9 tháng	Sau 12 tháng
<i>M. populi</i> CNN2	$7,2 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$	$7,5 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	$8,4 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$

Trong nghiên cứu, đề tài phân biệt 2 chủng *M. populi* CNN2 và chủng *Ensifer sp.* VNN3 khi nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa dựa vào sự khác biệt của khuẩn lạc khi chúng phát triển trên đĩa thạch: mép khuẩn lạc, chủng *Methylobacterium populi* có hình khuẩn lạc tròn, bờ đều, nhẵn còn chủng *Ensifer sp.* VNN3 có hình khuẩn lạc tròn hoặc bất định, bờ gợn sóng nhẹ.

Kết quả kiểm tra cho thấy tại thời điểm 0 giờ, trong điều kiện hỗn hợp mật độ chủng VSV sử dụng trong nghiên cứu $>10^9$ CFU/g, sau 1 tháng mật độ tế bào VSV vẫn đạt $>10^9$ CFU/g. Sau 3 tháng mật độ cả 2 chủng *M. populi* CNN2 và

Ensifer sp. VNN3 giảm xuống $>10^8$ CFU/g và ổn định đến thời điểm kiểm tra sau 9 tháng sản xuất. Tại các thời điểm kiểm tra sau 12 tháng sản xuất mật độ các chủng *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 trong chế phẩm giảm xuống $>10^7$ CFU/g.

Tổng hợp các kết quả trên, luận án đã tiến hành xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa VSV phân hủy CPF cụ thể như sau:



Hình 3.10: Quy trình sản xuất chế phẩm VSV phân hủy CPF

Chế phẩm vi sinh vật đảm bảo theo TCVN 6168-2002, sản phẩm đạt mật độ tế bào VSV có ích $>10^9$ CFU/g sau khi sản xuất và có thể đảm bảo chất lượng $>10^8$ CFU/g sau 9 tháng bảo quản.

3.4. Nghiên cứu khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ

3.4.1. Khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật xử lý thuốc bảo vệ thực vật gốc Lân hữu cơ trên đất trồng chè qui mô nhà lưới

- Ảnh hưởng của liều lượng bón chế phẩm VSV đến phát triển của cây chè:

Thí nghiệm được bố trí với các công thức có bổ sung chế phẩm VSV từ 1g, 2g, 3g, 5g, 10 g/m² đất trồng, lượng CPF được bổ sung vào đất trồng với liều lượng 200mg/m² đất. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.13.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm VSV đến cây chè.

STT	Công thức	Cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	TLK TLá (g/chậu)	TLK rễ (g/chậu)
1	Đối chứng (0)	38,17 ^a	12,83	3,89	3,89
2	CPVSV 1 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	43,50 ^{ab}	17,00 ^{ab}	4,61 ^{ab}	4,61 ^a
3	CPVSV 2 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	43,70 ^{ab}	17,20 ^{ab}	4,77 ^{ab}	4,77 ^a
4	CPVSV 3 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	44,17 ^{ab}	17,50 ^{ab}	4,83 ^{ab}	4,83 ^a
5	CPVSV 5 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	44,33 ^{ab}	17,60 ^{ab}	4,86 ^{ab}	4,86 ^a
6	CPVSV 10 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	44,75 ^{ab}	17,67 ^{ab}	4,91 ^{ab}	4,91 ^a
	CV (%)	5,1	4,7	5,6	4,8
	LSD 0,05	2,63	0,93	0,391	0,282

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột và trong cùng một vụ thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức $P < 0,05$.

Giá trị LSD (Least Significant Difference) ở mức ý nghĩa 0,05 được tính cho từng chỉ tiêu là:

- Chiều cao cây: LSD = 2,63 cm.
- Số lá: LSD = 0,93 lá/cây.
- Trọng lượng lá (TLK TLá): LSD = 0,391 g/chậu.
- Trọng lượng rễ (TLK rễ): LSD = 0,282 g/chậu.

Những giá trị này cho biết mức chênh lệch tối thiểu giữa các trung bình của các nhóm thí nghiệm cần có để được xem là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại mức 5%. Ví dụ, đối với chiều cao cây, nếu sự khác biệt giữa hai nhóm thí nghiệm vượt quá 2,63 cm, thì sự khác biệt đó được coi là có ý nghĩa thống kê. Tương tự, với số lá, nếu sự khác biệt trung bình giữa hai nhóm lớn hơn 0,93 lá, thì có thể kết luận có sự khác biệt có ý nghĩa.

Trong bảng số liệu, mặc dù các nhóm thí nghiệm với liều chế phẩm vi sinh từ 1 g/m² đến 10 g/m² đều cho giá trị tương đối gần nhau (đều được gắn nhãn “ab”), nhưng so với nhóm đối chứng (0 g/m²) thì sự khác biệt giữa các chỉ tiêu đã vượt qua giá trị LSD, cho thấy việc sử dụng chế phẩm VSV có tác dụng kích thích tăng trưởng có ý nghĩa thống kê.

Số liệu thể hiện tại bảng 3.13 cho thấy, ở công thức có bón chế phẩm VSV đã tác động tích cực đến phát triển của cây chè thông qua các số liệu về chiều cao cây và số lá trên cây. Các chỉ tiêu theo dõi cho thấy ở các công thức có sử dụng chế phẩm VSV đều cao hơn so với công thức đối chứng không bón chế phẩm.

Kết quả phân tích hàm lượng CPF trong đất và trong lá chè ở các công thức thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.14.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm VSV đến dư lượng CPF trong đất và lá chè.

TT	Công thức	OP trong đất (mg/kg)	% Tăng giảm OP trong đất	OP trong chè (mg/kg)	% Tăng giảm OP trong chè
1	Đối chứng (0)	3,68	-	1,46	-
2	CPVSV 1 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	2,25	38,85	1,03	29,45
3	CPVSV 2 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	1,87	49,2	0,324	77,8

TT	Công thức	OP trong đất (mg/kg)	% Tăng giảm OP trong đất	OP trong chè (mg/kg)	% Tăng giảm OP trong chè
4	CPVSV 3 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	1,7	53,8	0,309	78,83
5	CPVSV 5 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	1,15	68,75	0,284	80,54
6	CPVSV 10 g/m ² + CPF (200mg/m ²)	0,87	76,35	0,249	82,94
	CV (%)	5,9		6,6	
	LSD 0,05	0,63		0,391	

Ghi chú: -: không phân tích

Kết quả nghiên cứu trình bày trong bảng 3.14 cho thấy giá trị LSD (Least Significant Difference) ở mức 5% cho biết sự khác biệt tối thiểu giữa các trung bình của các nhóm cần đạt được để xem xét sự khác biệt đó có ý nghĩa thống kê. Ở bảng số liệu trên, ta có:

- OP trong đất: LSD = 0,63 mg/kg
 - Điều này có nghĩa là nếu sự khác biệt giữa trung bình của hai nhóm thí nghiệm vượt quá 0,63 mg/kg, thì sự khác biệt đó được xem là có ý nghĩa thống kê.
 - Trong bảng, sự giảm lượng OP từ nhóm đối chứng (3,68 mg/kg) xuống 2,25 mg/kg ở liều CPVSV 1 g/m² (chênh lệch 1,43 mg/kg) vượt qua giá trị LSD, cho thấy sự giảm này có ý nghĩa thống kê. Tương tự, sự giảm ở các công thức thí nghiệm khác (ví dụ, 3,68 mg/kg so với 0,87 mg/kg ở liều 10 g/m²) cũng vượt xa mức LSD, khẳng định hiệu quả của các liều CPVSV.
- OP trong chè: LSD = 0,391 mg/kg
 - Tương tự, sự khác biệt giữa các nhóm phải vượt quá 0,391 mg/kg mới được xem là có ý nghĩa thống kê.

- Ví dụ, sự giảm từ 1,46 mg/kg ở đối chứng xuống 1,03 mg/kg ở liều chế phẩm VSV 1 g/m² (chênh lệch 0,43 mg/kg) đã vượt qua mức LSD, đồng nghĩa với sự cải thiện có ý nghĩa thống kê. Các mức giảm ở các liều điều trị cao hơn (ví dụ, 1,46 mg/kg so với 0,249 mg/kg ở liều 10 g/m²) càng khẳng định hiệu quả rõ rệt.

Như vậy, các giá trị LSD thấp (0,63 và 0,391) cho thấy tính lặp lại và độ chính xác của thí nghiệm, đồng thời khẳng định rằng các sự khác biệt quan sát được giữa nhóm đối chứng và các nhóm xử lý là có ý nghĩa thống kê.

Việc bổ sung chế phẩm vi sinh vật (VSV) ở liều từ 1–10 g/m² đã giúp cây chè phát triển rõ rệt so với đối chứng không xử lý. Chiều cao cây, số lá, trọng lượng lá và rễ đều tăng có ý nghĩa thống kê tại mức LSD 0,05. Đặc biệt, liều 10 g/m² cho kết quả tốt nhất ở tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng.

So với nghiên cứu trên cây cà chua, khi xử lý đất nhiễm CPF bằng chế phẩm chứa chủng *Bacillus subtilis*, kết quả cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng (chiều cao, khối lượng khô) cũng tăng 15–30% so với đối chứng [93]. Điều này cho thấy xu hướng tăng sinh trưởng thực vật do giảm độc CPF kết hợp với tiết enzyme kích thích sinh trưởng (như IAA, ACC deaminase) là hiện tượng phổ biến khi dùng vi sinh vật xử lý ô nhiễm.

Chế phẩm VSV đã cho hiệu quả phân huỷ CPF đáng kể:

- Mức giảm dư lượng CPF trong đất đạt 76,35% (từ 3,68 xuống còn 0,87 mg/kg) ở liều cao nhất.
- Dư lượng CPF trong lá chè giảm mạnh từ 1,46 mg/kg còn 0,249 mg/kg, tương ứng hiệu quả giảm hấp thu đạt 82,94%.

Số liệu nghiên cứu của luận án cho thấy hiệu quả phân huỷ CPF trong đất trồng của chế phẩm VSV với các liều lượng bón từ 1-10g/m² đều có khả năng phân huỷ CPF, hiệu quả phân huỷ CPF trong đất trồng đạt 38,8-76,3% và hiệu quả giảm khả năng hấp thụ CPF trong lá chè ở các công thức từ 29,45-82,94%. Tuy nhiên, hiệu quả tốt nhất thể hiện ở công thức sử dụng chế phẩm với liều lượng 10 g/m², vì

vậy luận án tiếp tục sử dụng liều lượng bổ sung từ 10g chế phẩm/m² (tương đương 100kg/ha) để áp dụng cho các thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm VSV đối với các thí nghiệm sau.

3.4.2. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè trên thí nghiệm diện hẹp

Nghiên cứu được thực hiện tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An. Hùng Sơn là một xã miền núi thuộc huyện Anh Sơn, vùng phía Tây tỉnh Nghệ An. Huyện Anh Sơn được UNESCO đưa vào danh sách các địa danh thuộc Khu dự trữ sinh quyển miền Tây Nghệ An. Huyện nằm dọc theo đôi bờ sông Lam và Quốc lộ 7, phía Đông giáp với huyện đồng bằng Đô Lương, phía Bắc giáp với huyện miền núi Tân Kỳ và huyện vùng cao Quỳnh Hợp, phía Tây giáp với huyện vùng cao Con Cuông và Lào, phía Nam giáp với huyện miền núi Thanh Chương và cách thành phố Vinh 100 km về phía Tây Bắc.

Theo thống kê Anh Sơn là một trong những huyện trọng điểm trồng chè của tỉnh Nghệ An với diện tích trên 2.500 ha, trong đó 1.700 ha đã cho thu hoạch, tập trung nhiều ở các xã: Hùng Sơn, Cẩm Sơn, Đinh Sơn, Long Sơn, Phúc Sơn. Hàng năm sản lượng chè búp tươi đạt 17-20 nghìn tấn. Trong đó xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn đang tận dụng lợi thế của một vùng sản xuất chè lâu năm để dần nâng cao giá trị kinh tế của cây chè thông qua việc đầu tư sản xuất các giống chè cao cấp, có chất lượng cao như chè móc câu, trà matcha. Tuy nhiên trong thời gian vừa qua, vấn đề dùng phân bón hóa học, thuốc BVTV nói chung và trong sản xuất chè nói riêng tại xã Hùng Sơn vẫn chưa được chú trọng dẫn đến việc lạm dụng phân bón hóa học, thuốc BVTV trong sản xuất nông nghiệp.

3.4.2.1. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè ở giai đoạn kinh doanh

Giống chè kinh doanh sử dụng nghiên cứu là chè giống LDP1, phân tích thành phần hoạt chất trong chè trước và sau khi tiến hành thí nghiệm sử dụng chế phẩm VSV. Để khảo sát hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với khả năng phân hủy Chlorpyrifos trong đất trồng chè và ảnh hưởng của chúng đến cây chè giai đoạn

kinh doanh, Đề tài đã sử dụng kết quả nghiên cứu liều lượng chế phẩm có hiệu quả cao nhất đã thực hiện ở mục 3.4.1 là 10g/m² kết hợp với bố trí thêm các công thức tăng liều lượng bổ sung chế phẩm vi sinh vật 20g, 30 g chế phẩm/m² đất trồng chè (tương đương 100kg, 200, 300 kg chế phẩm vi sinh vật/ha) để xác định liều lượng phù hợp chế phẩm vi sinh trong điều kiện thực tế sản xuất, kết quả được thể hiện theo bảng 3.15.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kinh doanh.

Chỉ tiêu	Kết quả phân tích			
	Đối chứng	Sử dụng 100kg CP VSV/ha	Sử dụng 200kg CP VSV/ha	Sử dụng 300kg CP VSV/ha
Mùi, vị	Vị chất đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chất đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chất đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chất đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu
Màu sắc	Xanh vàng	Xanh vàng	Xanh vàng	Xanh vàng
Hàm lượng tro (%)	6,54	6,52	6,53	6,53
Hàm lượng cafein (%)	2,26	2,26	2,25	2,26
Hàm lượng Tanin (%)	22,2	22,9	22,7	22,7
Hàm lượng Chlorpyrifos (mg/kg)	0,188	0,046	0,042	0,042
Tình hình sâu bệnh	Không phát sinh	Không phát sinh	Không phát sinh	Không phát sinh

Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu mùi vị và màu sắc ở các công thức thí nghiệm là không sai khác. Các chỉ tiêu hàm lượng tro, cafein và tanin tuy có giảm khi tăng lượng

chế phẩm vi sinh vật song giá trị thay đổi rất nhỏ, không sai khác nhiều. Vì vậy, có thể đánh giá chế phẩm vi sinh vật không ảnh hưởng đến chất lượng chè kinh doanh.

Đề tài đã phân tích dư lượng CPF trong lá chè. Kết quả phân tích ở công thức đối chứng (không sử dụng chế phẩm) hàm lượng CPF trong lá chè là 0,188 mg/kg. Tuy nhiên, trong công thức thí nghiệm có bổ sung chế phẩm VSV thì hàm lượng CPF đều giảm so với đối chứng. Cụ thể khi sử dụng chế phẩm ở liều lượng 10; 20; 30 kg chế phẩm/ha thì hàm lượng CPF trong lá chè giảm chỉ còn 0,042-0,046 mg/kg, tương đương giảm 75,53-77,66% so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi sử dụng chế phẩm VSV trong sản xuất chè không những không ảnh hưởng đến chất lượng của chè mà còn có tác dụng làm giảm dư lượng Chlorpyrifos trong chè. Trong quá trình thử nghiệm, tình hình sâu bệnh được kiểm soát ở các công thức đối chứng và công thức thí nghiệm.

Tiến hành theo dõi sinh trưởng và năng suất chè sau khi sử dụng chế phẩm VSV, kết quả được thể hiện theo bảng 3.16.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến cây chè giai đoạn kinh doanh.

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Rộng tán (cm)	Chiều dài búp (cm)	Khối lượng búp (gam)	Mật độ búp (búp/m ²)	NS thực thu (tấn/ha)
ĐC	102,97	100,13	5,21	0,55	494,53	2,72
Bón CP 100kg/ha	106,33	106,78*	6,11*	0,63*	509,87*	3,21*
Bón CP 200kg/ha	107,34*	106,91*	6,13*	0,63*	509,79*	3,21*
Bón CP 300kg/ha	107,26*	107,29*	6,12*	0,63 *	509,24*	3,21 *
<i>LSD</i> _{0,05}	3,31	5,11	0,87	0,06	14,42	0,41
<i>CV</i> (%)	11,2	11,8	10,9	11,2	12,7	10,3

*: Biểu thị sai khác có ý nghĩa ở mức 0,05 so với công thức đối chứng

Kết quả thí nghiệm trình bày trong bảng 3.16 cho thấy các giá trị LSD ở mức 0,05 trong bảng giúp xác định mức chênh lệch tối thiểu giữa các trung bình cần có để xem xét sự khác biệt giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê. Cụ thể:

- Chiều cao cây (LSD = 3,31 cm):
 - Đối chứng có chiều cao trung bình 102,97 cm, trong khi các nhóm bón CP cho chiều cao dao động từ 106,33 đến 107,34 cm.
 - Sự khác biệt (từ khoảng 3,36 đến 4,37 cm) vượt qua mức LSD 3,31 cm, cho thấy sự tăng chiều cao do bón CP là có ý nghĩa thống kê.
- Rộng tán (LSD = 5,11 cm):
 - Đối chứng đạt 100,13 cm, các nhóm xử lý từ 106,78 đến 107,29 cm.
 - Hiệu chỉnh khoảng 6,65 đến 7,16 cm, vượt qua giá trị LSD, khẳng định rằng sự mở rộng tán cây ở các nhóm bón chế phẩm là có ý nghĩa thống kê.
- Chiều dài búp (LSD = 0,87 cm):
 - Đối chứng có giá trị 5,21 cm, trong khi các nhóm xử lý đều đạt khoảng 6,11–6,13 cm.
 - Sự khác biệt xấp xỉ 0,9 cm, vừa vượt qua mức LSD, cho thấy sự tăng trưởng về chiều dài búp cũng có ý nghĩa thống kê.
- Khối lượng búp (LSD = 0,06 g):
 - Đối chứng có khối lượng búp trung bình 0,55 g, so với các nhóm bón CP đạt 0,63 g.
 - Hiệu chỉnh khoảng 0,08 g vượt qua LSD 0,06 g, chứng tỏ sự tăng khối lượng búp là có ý nghĩa.
- Mật độ búp (LSD = 14,42 búp/m²):
 - Đối chứng ghi nhận mật độ búp 494,53 búp/m², các nhóm xử lý khoảng 509,24–509,87 búp/m².
 - Sự khác biệt khoảng 15–15,34 búp/m², vượt qua giá trị LSD, khẳng định ý nghĩa thống kê của sự thay đổi mật độ búp.
- NS thực thu (LSD = 0,41 tấn/ha):

- Đối chứng có sản lượng 2,72 tấn/ha, trong khi các nhóm bón CP đạt khoảng 3,21 tấn/ha.
- Sự chênh lệch khoảng 0,49 tấn/ha vượt qua giá trị LSD, cho thấy sản lượng tăng có ý nghĩa thống kê.

Các giá trị LSD trong bảng cho thấy rằng mọi sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và các nhóm bón CP đều vượt qua mức chênh lệch tối thiểu cần thiết, khẳng định rằng các cải thiện về chỉ số tăng trưởng và sản lượng của cây chè do bón CP là có ý nghĩa thống kê. CV (%) của các chỉ tiêu nằm trong khoảng 10,3–12,7%, cho thấy tính ổn định tương đối của thí nghiệm.

Kết quả cho thấy ở công thức bón chế phẩm với liều lượng 100, 200, 300 kg chế phẩm VSV/ha, năng suất chè là tương đương nhau và đạt 3,21 tấn/ha (tăng 0,49 tấn/ha) so với công thức đối chứng (tương ứng tăng 18,01%).

3.4.2.2. Thí nghiệm trên chè ở thời kỳ kiến thiết:

Giống chè kiến thiết sử dụng nghiên cứu là chè giống PH8, phân tích thành phần hoạt chất trong chè sau khi tiến hành thí nghiệm sử dụng chế phẩm VSV, kết quả được thể hiện theo bảng 3.17.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kiến thiết.

TT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích			
		Đối chứng	Bón CP VSV 100kg/ha	Bón CP VSV 200kg/ha	Bón CP VSV 300kg/ha
1	Mùi, vị	Vị chát đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chát đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chát đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu	Vị chát đậm, hậu ngọt, hương thơm dịu
2	Màu sắc	Xanh vàng	Xanh vàng	Xanh vàng	Xanh vàng
3	Hàm lượng tro (%)	6,51	6,49	6,50	6,49
4	Hàm lượng cafein (%)	2,17	2,19	2,19	2,17

TT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích			
		Đối chứng	Bón CP VSV 100kg/ha	Bón CP VSV 200kg/ha	Bón CP VSV 300kg/ha
5	Hàm lượng Tanin (%)	22,7	23,1	22,9	22,9
6	Hàm lượng CPF (mg/kg)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
7	Tình hình sâu bệnh	Không phát sinh	Không phát sinh	Không phát sinh	Không phát sinh

Kết quả phân tích chất lượng chè kiến thiết cho thấy, giá trị các chỉ tiêu màu sắc, mùi vị, hàm lượng tro, cafein và tanin ở các công thức thí nghiệm có thay đổi nhưng độ biến thiên rất thấp và không theo quy luật rõ ràng, sự chênh lệch này nằm trong sai số cho phép. Chất lượng chè ở các công thức có thể coi là như nhau, qua đó cho thấy chế phẩm vi sinh vật không ảnh hưởng đến chất lượng chè kiến thiết.

Kết quả phân tích hàm lượng Chlorpyrifos trong chè kiến thiết cho thấy không có sự hiện diện của gốc Lân hữu cơ trong chè kiến thiết. Tiến hành theo dõi sinh trưởng và năng suất chè sau khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật, kết quả được thể hiện theo bảng 3.18.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến sinh trưởng và năng suất chè giai đoạn kiến thiết.

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Rộng tán (cm)	Chiều dài búp (cm)	Khối lượng búp (gam)	Mật độ búp (búp/m ²)	NS thực thu (tấn/ha)
ĐC	61,87	80,43	3,72	0,34	255,33	0,87
Bón CP 100kg/ha	72,23*	101,82*	5,10*	0,40*	296,93*	1,19*

Bón CP 200kg/ha	72,41*	101,81*	5,12*	0,40*	297,14*	1,19*
Bón CP 300kg/ha	72,29 *	101,85*	5,12*	0,40*	296,98*	1,19*
LSD _{0,05}	9,89	19,28	1,29	0,05	38,99	0,30
CV (%)	12,1	11,9	13,7	14,1	13,8	12,5

*: *Biểu thị sai khác có ý nghĩa ở mức 0,05 so với công thức đối chứng*

Số liệu bảng 3.18 cho thấy các giá trị LSD (Least Significant Difference) ở mức ý nghĩa 0,05 trong bảng được sử dụng để đánh giá sự khác biệt tối thiểu giữa các nhóm cần có để xác định ý nghĩa thống kê của sự khác biệt đó. Cụ thể:

- Chiều cao cây (LSD = 9,89 cm):
 - Nhóm đối chứng (ĐC) có chiều cao trung bình 61,87 cm, trong khi các nhóm bón chế phẩm (CP) đạt khoảng 72,23–72,41 cm.
 - Hiệu chỉnh giữa ĐC và các nhóm bón CP khoảng 10,36–10,54 cm, vượt qua giá trị LSD 9,89 cm, cho thấy sự tăng trưởng về chiều cao là có ý nghĩa thống kê.
- Rộng tán (LSD = 19,28 cm):
 - ĐC có giá trị 80,43 cm; các nhóm bón CP có giá trị khoảng 101,81–101,85 cm.
 - Sự khác biệt khoảng 21,38–21,42 cm vượt qua LSD, khẳng định ý nghĩa thống kê của sự thay đổi về tán cây.
- Chiều dài búp (LSD = 1,29 cm):
 - ĐC có 3,72 cm, trong khi các nhóm bón CP đạt khoảng 5,10–5,12 cm.
 - Sự khác biệt khoảng 1,38–1,40 cm, vượt qua giá trị LSD, cho thấy sự tăng trưởng của chiều dài búp có ý nghĩa thống kê.
- Khối lượng búp (LSD = 0,05 g):
 - ĐC có khối lượng búp trung bình là 0,34 g; các nhóm bón CP đều đạt 0,40 g.
 - Sự khác biệt 0,06 g vượt qua LSD 0,05 g, đồng nghĩa với hiệu ứng bón CP lên khối lượng búp là có ý nghĩa thống kê.

- Mật độ búp (LSD = 38,99 búp/m²):
 - ĐC có mật độ búp là 255,33 búp/m², trong khi các nhóm bón CP đạt khoảng 296,93–297,14 búp/m².
 - Hiệu chỉnh khoảng 41,60–41,81 búp/m², vượt qua giá trị LSD, khẳng định sự khác biệt về mật độ búp giữa các nhóm là có ý nghĩa thống kê.
- Năng suất thực thu (LSD = 0,30 tấn/ha):
 - ĐC có sản lượng 0,87 tấn/ha, còn các nhóm bón CP đều đạt 1,19 tấn/ha.
 - Sự khác biệt khoảng 0,32 tấn/ha vượt qua giá trị LSD, cho thấy sự cải thiện sản lượng có ý nghĩa thống kê.

Nhìn chung, mọi chỉ tiêu ở các nhóm bón CP đều cho kết quả vượt qua mức LSD so với nhóm đối chứng, khẳng định rằng việc bón CP có tác động tích cực đến sự tăng trưởng và năng suất của cây chè là có ý nghĩa thống kê. CV (%) trong khoảng từ 11,9% đến 14,1% cho thấy tính ổn định tương đối của thí nghiệm.

Số liệu bảng 3.23 cho thấy, ở công thức sử dụng chế phẩm VSV ở liều lượng 10-30kg/ha, các chỉ tiêu rộng tán, chiều dài búp, khối lượng búp, mật độ búp và năng suất đều tăng ở mức có ý nghĩa so với công thức đối chứng; Năng suất thực thu ở công thức thí nghiệm đạt 1,19 tấn/ha tăng 0,32 tấn/ha tương ứng tăng 36,78% so với đối chứng.

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm đến khả năng phân giải Chlorpyrifos trong đất trồng chè ở xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, Nghệ An:

Phân tích hàm lượng Chlorpyrifos trong đất trồng chè trước thí nghiệm và các công thức bón chế phẩm, số liệu thu được ghi lại trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Dư lượng CPF trong đất trồng chè tại Nghệ An.

Giai đoạn sản xuất chè	Công thức thí nghiệm	Dư lượng Chlorpyrifos (mg/kg)
Kiến thiết	ĐC: Không CP	<0,002
	Bón CP 100kg/ha	<0,002
	Bón CP 200kg/ha	<0,002
	Bón CP 300kg/ha	<0,002

Giai đoạn sản xuất chè	Công thức thí nghiệm	Dư lượng Chlorpyrifos (mg/kg)
Kinh doanh	ĐC: Không CP	0,042
	Bón CP 100kg/ha	0,012
	Bón CP 200kg/ha	0,011
	Bón CP 300kg/ha	0,011

Tiến hành phân tích dư lượng Chlorpyrifos trong đất trồng chè cho thấy ở giai đoạn kiến thiết, dư lượng Chlorpyrifos (<0,002).

Ở đất trồng chè kinh doanh, tất cả các công thức đều phát hiện Chlorpyrifos với các nồng độ khác nhau. Cụ thể, ở công thức đối chứng– không sử dụng chế phẩm thì hàm lượng Chlorpyrifos là 0,042 mg/kg, nhưng ở công thức thí nghiệm – sử dụng chế phẩm vi sinh vật ở liều lượng 100-300 kg/ha thì kết quả cho thấy hàm lượng Chlorpyrifos giảm chỉ còn 0,011-0,012 mg/kg (tương đương giảm 72-76%).

Phân tích mật độ các vi sinh vật cố định đạm tự do trong đất trồng chè ở các công thức, số liệu thu được ghi lại trong bảng 3.20.

Bảng 3.20. Mật độ các VSV cố định đạm tự do trong đất trồng chè

Giai đoạn sản xuất chè	Công thức thí nghiệm	VSV cố định đạm tự do
Kinh doanh	ĐC: Không CP	$3,3 \times 10^3$
	Bón CP 100kg/ha	$0,4 \times 10^4$
	Bón CP 200kg/ha	$5,9 \times 10^4$
	Bón CP 300kg/ha	$6,2 \times 10^4$
Kiến thiết	Bón CP 100kg/ha	$1,4 \times 10^3$
	Bón CP 200kg/ha	$1,2 \times 10^4$
	Bón CP 300kg/ha	$6,0 \times 10^4$
	Bón CP 100kg/ha	$6,4 \times 10^4$

Kết quả cho thấy, việc sử dụng chế phẩm giúp tăng mật độ vi sinh vật cố định đạm tự do trong chè. Mật độ vi sinh vật cố định đạm tự do trong các công thức sử dụng chế phẩm dao động khoảng 10^4 CFU/g, cao hơn so với công thức đối chứng (10^3 CFU/g).

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- *Chất lượng chè trong các công thức sử dụng chế phẩm không khác biệt so với công thức đối chứng (không sử dụng chế phẩm). Khi sử dụng chế phẩm, hàm lượng Chlorpyrifos trong chè giảm lần lượt ở Nghệ An là 77,66%; hiệu quả xử lý Chlorpyrifos trong đất đạt 72-76%.*

- *Sử dụng chế phẩm ở liều lượng từ 100-300kg/ha giúp cây chè sinh trưởng tốt hơn, các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao, rộng tán, chiều dài búp, khối lượng búp và mật độ búp ở công thức thí nghiệm đều cao hơn công thức đối chứng; Tại Nghệ An, năng suất chè kinh doanh tăng 18,01%, chè kiến thiết tăng 36,78%; Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng chế phẩm ở liều lượng từ 100kg chế phẩm VSV/ha đến 300kg/ha không có sự sai khác nhiều giữa các công thức, vì vậy lựa chọn liều lượng bón chế phẩm 100kg/ha cho mô hình diện rộng.*

3.4.3. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đối với cây chè thí nghiệm diện rộng

3.4.3.1. Thí nghiệm trên chè ở thời kỳ kinh doanh

Giống chè kinh doanh sử dụng nghiên cứu là chè giống LDP1, phân tích thành phần hoạt chất trong chè ở hai công thức thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp tại Chương II. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.21.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè kinh doanh LDP1 tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, Nghệ An.

Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Đối chứng	Thí nghiệm
Mùi, vị		Vị chát đậm, hương thơm dịu	Vị chát đậm, hương thơm dịu
Màu sắc		Xanh vàng	Xanh vàng
Hàm lượng tro	%	6,05	5,24
Hàm lượng Cafein	%	2,64	2,12
Hàm lượng Tanin	%	20,14	24,52
Hàm lượng OP (Chlorpyrifos)	mg/kg	0,094	<0,01

Kết quả nghiên cứu trình bày trong bảng 3.21 cho thấy, các chỉ tiêu mùi vị và màu sắc ở hai công thức thí nghiệm và cả trước thí nghiệm là không sai khác. Các chỉ tiêu hàm lượng tro, cafein và tanin tuy có giảm khi tăng lượng chế phẩm vi sinh vật song giá trị thay đổi rất nhỏ, không sai khác nhiều. Vì vậy, có thể đánh giá chế phẩm vi sinh vật không ảnh hưởng đến chất lượng chè kinh doanh. Kết quả phân tích ở công thức đối chứng (không sử dụng chế phẩm VSV) hàm lượng Chlorpyrifos trong lá chè là 0,094 mg/kg. Kết quả phân tích dư lượng Chlorpyrifos trong lá chè ở công thức thí nghiệm (sử dụng chế phẩm ở liều lượng 10 kg/ha) thì không phát hiện hàm lượng Chlorpyrifos trong lá chè. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự có mặt của 2 chủng vi sinh vật *M. populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 trong chế phẩm đã có tác dụng làm giảm Chlorpyrifos trong đất trồng chè và sản phẩm.

Kết quả về sinh trưởng và năng suất chè sau khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật được thể hiện trong bảng 3.22.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến năng suất chè LDP1 giai đoạn kinh doanh.

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Rộng tán (cm)	Chiều dài búp (cm)	Khối lượng búp (gam)	Mật độ búp (búp/m ²)	Năng suất thực thu (tấn/ha)
Đối chứng	101,67	104,22	5,14	0,54	505,19	2,73
Thí nghiệm	105,09	107,45	5,46	0,61	521,37	3,18

*: *Biểu thị sai khác có ý nghĩa ở mức 0,05 so với công thức đối chứng*

Kết quả bảng 3.22 cho thấy, so với công thức đối chứng không sử dụng chế phẩm thì sử dụng chế phẩm VSV ở liều lượng bón 10kg/ha có thể làm tăng chiều cao cây, chiều dài búp, khối lượng búp, tăng năng suất ở mức có ý nghĩa LSD_{0,05}. Cụ thể, năng suất chè ở công thức sử dụng chế phẩm đạt 3,18 tấn/ha (tăng 16,48% so với công thức đối chứng).

3.4.3.2. Thí nghiệm trên cây chè ở thời kỳ kiến thiết

Giống chè kiến thiết sử dụng nghiên cứu là chè giống PH8, đề tài đã phân tích thành phần hoạt chất trong chè sau khi tiến hành thí nghiệm sử dụng chế phẩm vi sinh vật, kết quả được thể hiện theo bảng 3.23.

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến chất lượng chè PH8 giai đoạn kiến thiết.

Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Đối chứng	Thí nghiệm
Mùi, vị		Vị chát đậm, hương thơm dịu	Vị chát đậm, hương thơm dịu
Màu sắc		Xanh vàng	Xanh vàng
Tro	%	6,18	6,22
Cafein	%	2,53	2,72
Tanin	%	22,12	23,75
Chlorpyrifos	mg/kg	<0,01	<0,01

Kết quả phân tích chất lượng chè kiến thiết cho thấy, giá trị các chỉ tiêu màu sắc, mùi vị, hàm lượng tro, cafein và tanin ở các công thức thí nghiệm có thay đổi nhưng độ biến thiên rất thấp và không theo quy luật rõ ràng, sự chênh lệch này nằm trong sai số cho phép. Chất lượng chè ở các công thức có thể coi là như nhau, qua đó cho thấy chế phẩm vi sinh vật không ảnh hưởng đến chất lượng chè kiến thiết.

Kết quả phân tích hàm lượng Chlorpyrifos trong chè kiến thiết cho thấy không có sự hiện diện của thuốc BVTV gốc Lân hữu cơ (Chlorpyrifos) trong chè kiến thiết.

Tiến hành theo dõi sinh trưởng và năng suất chè sau khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật, kết quả được thể hiện theo bảng 3.24.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến sinh trưởng và năng suất chè giai đoạn kiến thiết.

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Rộng tán (cm)	Chiều dài búp (cm)	Khối lượng búp (gam)	Mật độ búp (búp/m ²)	Năng suất thực thu (tấn/ha)
Đối chứng	65,25	82,18	3,88	0,35	257,64	0,90
Thí nghiệm	71,03	89,87	4,56	0,39	295,26	1,15

*: Biểu thị sai khác có ý nghĩa ở mức 0,05 so với công thức đối chứng

Số liệu bảng 3.24 cho thấy, khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật thì các chỉ tiêu sinh trưởng (chiều cao cây, chiều dài búp, khối lượng búp, mật độ búp) và năng suất cây chè tăng ở mức có ý nghĩa. Cụ thể, khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật ở liều lượng 10kg/ha thì năng suất đạt 1,15 tấn/ha (tăng 27,78% so với công thức đối chứng). Kết quả phân tích

lượng Chlorpyrifos trong đất trồng chè trước thí nghiệm và sau thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả phân tích các chỉ tiêu trong đất trồng chè ở Nghệ An.

Loại hình chè	CTTN	Kết quả phân tích Chlorpyrifos (mg/kg)
Kinh doanh	Trước thí nghiệm	0,064
	Đối chứng	<0,032
	Thí nghiệm	<0,002
Kiến thiết	Trước thí nghiệm	0,042
	Đối chứng	<0,022
	Thí nghiệm	<0,002

Qua bảng số liệu cho thấy, mẫu đất ở thời điểm trước thí nghiệm ở chè kinh doanh và chè kiến thiết đều có phát hiện thấy Chlorpyrifos ở giá trị lần lượt là 0,064 và 0,042 mg/kg. Khi phân tích hàm lượng OP trong đất tại thời điểm sau thí nghiệm ở cả hai công thức đối chứng, dư lượng Chlorpyrifos giảm so với ban đầu, điều này có thể do dư lượng Chlorpyrifos có thể bị rửa trôi, phân hủy tự nhiên dưới tác động của các yếu tố thời tiết (mưa, nắng, gió, v.v.). Ở các công thức thí nghiệm có sử dụng chế phẩm VSV thì dư lượng Chlorpyrifos còn lại là rất thấp (<0,002 mg/kg). Kết quả này khẳng định thêm hiệu quả của vi sinh vật trong chế phẩm đã phát huy được vai trò của chúng trong xử lý dư lượng Chlorpyrifos trong đất trồng chè. Phân tích mật độ các vi sinh vật cố định đạm tự do trong đất trồng chè ở các công thức, số liệu thu được ghi lại trong bảng 3.26.

Bảng 3.26. Mật độ các VSV (CFU/g) có ích trong đất trồng chè.

Loại hình chè	Mẫu	VSV cố định đạm tự do	VSV phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Kiến thiết	Đối chứng	$1,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$
	Thí nghiệm	$4,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
Kinh doanh	Đối chứng	$5,9 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$
	Thí nghiệm	$7,1 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$

Kết quả bảng 3.26 cho thấy, việc sử dụng chế phẩm giúp tăng mật độ vi sinh vật có ích trong đất trồng chè. Cụ thể, mật độ vi sinh vật cố định đạm và phân giải

hợp chất phospho khó tan trong công thức sử dụng chế phẩm đều $> 10^5$ CFU/g, cao hơn so với công thức đối chứng (khoảng $10^2 - 10^3$ CFU/g). Kết quả nghiên cứu này cho thấy ngoài tác dụng làm giảm CPF trong đất trồng chè, chế phẩm VSV của còn có tác dụng tương hỗ giúp cho sự phát triển của quần thể vi sinh vật có ích trong đất trồng chè phát triển, đặc biệt là nhóm vi sinh vật có ích cố định đạm tự do và và phân giải hợp chất phospho khó tan, khi nghiên cứu về vi sinh vật phân giải phosphate khó tan. Năm 2017, Nguyễn Văn Giang và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu khả năng sinh IAA và cố định N của các chủng vi sinh vật phân giải phosphate khó tan và nhận thấy rằng các chủng vi sinh vật phân giải phosphate khó tan đều có khả năng đa hoạt tính [2].

Kết quả nghiên cứu thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm VSV trên cây chè tại Nghệ An cho thấy: Sử dụng chế phẩm ở liều lượng 100kg/ha không những có tác dụng làm giảm dư lượng CPF trong đất và trong lá chè (trong lá $< 0,01$ mg/kg, trong đất $< 0,002$ mg/kg ở cả hai giai đoạn kiến thiết và kinh doanh); giúp cây chè sinh trưởng tốt hơn, các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao, rộng tán, chiều dài búp, khối lượng búp và mật độ búp ở công thức thí nghiệm đều cao hơn công thức đối chứng; quần thể vi sinh vật có ích trong đất trồng chè phát triển như vi sinh vật có ích cố định đạm tự do và và phân giải hợp chất phospho khó tan tăng cao hơn so với không sử dụng chế phẩm (năng suất chè kinh doanh tăng 16,48%, năng suất chè kiến thiết tăng 27,78%).

Ngoài ra, Singh và cộng sự đã sử dụng chủng *Enterobacter* B-14 trong đất bị ô nhiễm CPF và báo cáo mức độ phân hủy đạt 75% sau 7 ngày [161]. Điều này càng khẳng định tiềm năng vượt trội của các chủng bản địa CNN2 và VNN3, không chỉ về hiệu quả phân hủy mà còn về khả năng tồn tại lâu dài trong chế phẩm (duy trì 10^7 CFU/g sau 12 tháng –Bảng 10), điều mà ít nghiên cứu khác đánh giá đến.

Nghiên cứu của Islam và Iyer (2021) đã sử dụng một tổ hợp vi sinh vật gồm ba chủng trong đất nông nghiệp và cho thấy khả năng phân hủy CPF khoảng 65–70% sau 7 ngày xử lý [96]. Trong khi đó, Farhan và cộng sự (2021) đã sử dụng các chủng phân lập từ đất nông nghiệp bị ô nhiễm và đạt mức phân hủy 73% sau 10 ngày [77].

So sánh với các nghiên cứu này, chế phẩm vi sinh được phát triển trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả phân hủy cao hơn trong thời gian ngắn hơn – đạt 81,4% (CNN2) và 95,2% (VNN3) chỉ trong 3 ngày nuôi cấy (kết quả mục 3.3).

Kết quả xử lý dư lượng CPF bằng chế phẩm vi sinh trên đất trồng chè cho thấy mức giảm từ 11 đến 16 lần so với đối chứng và giảm hơn 76% trong các ứng dụng diện nhỏ. So với các nghiên cứu trước đây, hiệu quả này được coi là cao và có tính ứng dụng thực tiễn.

CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

1. Từ 20 mẫu đất trồng chè thu thập từ Thái Nguyên, Nghệ An, đã phân lập được 4 chủng vi sinh vật có hoạt tính phân hủy Chlorpyrifos và lựa chọn được 2 chủng vi sinh vật có ký hiệu *Methylobacterium populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 có khả năng phân hủy Chlorpyrifos, có tính an toàn sinh học và đủ điều kiện làm vật liệu phục vụ cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật phân hủy thuốc BVTV chứa gốc lân hữu cơ.

2. Đã xây dựng được quy trình công nghệ lên men nhân sinh khối trên các chủng *Methylobacterium populi* CNN2 và *Ensifer sp.* VNN3 và quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý dư lượng thuốc BVTV có chứa gốc lân hữu cơ:

- Chủng *Methylobacterium populi* CNN2: pH môi trường lên men: 6,5; Nhiệt độ lên men sinh khối: 30°C; Thời gian lên men sinh khối: 72 giờ; Tỷ lệ giống cấp 1: 3%; Môi trường lên men sinh khối: SX1; Lưu lượng cấp khí 0,7 dm³ không khí/dm³ môi trường/phút; mật độ tế bào đạt $\geq 10^8$ CFU/ml, hoạt tính sinh học ổn định.

- Chủng *Ensifer sp.* VNN3: pH môi trường lên men: 7,0; Nhiệt độ lên men sinh khối: 30°C; Thời gian lên men sinh khối: 48 giờ; Tỷ lệ giống cấp 1: 3%; Môi trường lên men sinh khối: SX1; Lưu lượng cấp khí 0,7 dm³ không khí/dm³ môi trường/phút; mật độ tế bào đạt $\geq 10^8$ CFU/ml, hoạt tính sinh học ổn định.

Chế phẩm vi sinh vật xử lý dư lượng thuốc BVTV có chứa gốc lân hữu cơ, mật độ chủng vi sinh vật $\geq 10^8$ CFU/g và chất lượng ổn định sau 9 tháng bảo quản điều kiện bình thường.

3. Kết quả đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật trên đất trồng chè diện hẹp tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, Nghệ An cho thấy: Chất lượng chè trong các công thức sử dụng chế phẩm không khác biệt so với công thức đối chứng (không sử dụng chế phẩm). Khi sử dụng chế phẩm, hàm lượng Chlorpyrifos trong chè giảm 77,66%; hiệu quả xử lý Chlorpyrifos trong đất đạt 72-76%: cây chè sinh trưởng tốt hơn, các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao, rộng tán, chiều dài búp, khối lượng búp và mật độ búp ở công thức thí nghiệm đều cao hơn công thức đối chứng.

4. Kết quả đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật trên đất trồng chè diện rộng tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, Nghệ An cho thấy: Sử dụng chế phẩm ở liều lượng 10kg/ha giúp cây chè sinh trưởng tốt hơn, các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao, rộng tán, chiều dài búp, khối lượng búp và mật độ búp ở công thức thí nghiệm đều cao hơn công thức đối chứng; năng suất chè kinh doanh tăng 16,48%, chè kiến thiết tăng 27,78%; khi sử dụng chế phẩm với liều lượng 100kg/ha có thể xử lý được dư lượng Chlorpyrifos trong đất và trong lá chè.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục tiến hành nghiên cứu khai thác ứng dụng thêm các chủng vi sinh vật có ích khác (VSV cố định đạm, phân giải Lân, VSV kháng VSV gây bệnh thực vật) cùng kết hợp với việc khai thác sử dụng những chủng vi sinh vật có hoạt tính phân hủy dư lượng thuốc BVTV trong đất để tạo ra những sản phẩm tốt hơn, đa hoạt tính hơn đáp ứng được yêu cầu của thực tiễn và để hướng tới nền sản xuất nông nghiệp hữu cơ bền vững.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC
CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

- 1) Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Đàm Trọng Anh, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Nguyễn Thị Thu, Đàm Thị Huyền, Hứa Thị Sơn, Vũ Tiến Đức, Trần Thị Như Hằng, Nguyễn Thành Lam (2020), “Nghiên cứu khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy thuốc bảo vệ thực vật chứa gốc lân hữu cơ và kích thích sinh trưởng thực vật đối với cây chè”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 12(121).
- 2) Nguyễn Thành Lam, Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Đàm Trọng Anh, Đàm Thị Huyền, Nguyễn Kiều Băng Tâm (2023), “Thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ và khả năng sử dụng vi sinh vật để xử lý”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 07 (149).
- 3) Lam Thanh Nguyen, Tam Bang Kieu Nguyen, Thanh Huu, Huyen Thi Dam, Phuong Minh Nguyen (2023), Isolation and characterization of chlorpyrifos-degrading bacteria in tea-growing soils, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 11(3), pp. 563 – 571.
- 4) Lam Thanh Nguyen, Tam Bang Kieu Nguyen, Le Duc Trung, Pham Hoang Thuong, Do Vinh Duong, Thanh Tran (2024), “Enhancing Soil Bioremediation: Microbial Composting Strategies for the Degradation of Chlorpyrifos Ethyl in Agricultural Soils”, *Second International Conference on Sustainable Technologies in Civil and Environmental Engineering* (E3S Web of Conferences 559, 04026, ICSTCE 2024).
- 5) Duong Thi Thanh Xuyen, Luong Huu Thanh, Nguyen Ngoc Quynh, Vu Thuy Nga, Dam Trong Anh, Nguyen Thanh Lam, Nguyen Kieu Bang Tam (2024), “Potential use of microbial product to degrade Chlorpyrifos in tea cultivation soil”, *Earth and Environmental Sciences*, 40(4), pp. 88-96.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1-185]

Tiếng Việt

1. Nguyễn Tú Điệp và cộng sự (2018), “Hiện trạng hệ vi sinh vật phân giải Lân trên một số loại đất phù sa trồng lúa nước vùng đồng bằng sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ- Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*, 54(7B), tr. 79-85.
2. Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Đức Thái (2017), “Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải phosphat khó tan từ đất rừng Xuân Liên”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6(79), tr. 68-73.
3. Trần Thị Giang và cộng sự (2014), “Phân lập và nhận diện vi khuẩn vùng rễ kích thích sự sinh trưởng (PGPR) từ một số loại rau ăn lá trồng tại thành phố Cần Thơ”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ - Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*, 35, tr. 65-73.
4. Nguyễn Thanh Giao và cộng sự (2021), “Hiện trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và hiệu quả kinh tế của mô hình canh tác sâu riêng tại Cù Lao Dài, huyện Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tập 57, Số Chuyên đề Môi trường và Biến đổi khí hậu (1), tr. 79-89.
5. Hoàng Hà (2009), “*Thực trạng dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong một số loại rau trên địa bàn Hà Nội và đề xuất một số giải pháp quản lý thuốc bảo vệ thực vật*”, Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp.
6. Đặng Thị Mỹ Hạnh và cộng sự (2022), “Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật sản xuất phytase trong đất tại xã Hòa An, huyện Phú Hòa, tỉnh Phú Yên”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Duy Tân*, 4(53), tr. 63-71.
7. Bùi Huy Hiền và cộng sự (2011), “*Nghiên cứu chế phẩm vi sinh vật xử lý nhanh phế thải chăn nuôi*”, Báo cáo tổng kết nghiệm thu đề tài thuộc chương trình Công nghệ Sinh học - Bộ NN& PTNT.
8. Kha Thanh Hoàng và cộng sự (2010), “Hiệu quả của phân hữu cơ trong cải thiện năng suất khóm trên đất phèn tại Hồng Dân, Bạc Liêu”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 14, tr.128-134.

9. Lê Tất Khương, Hoàng Văn Chung, Đỗ Ngọc Oanh (1999), *Giáo trình cây chè*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
10. Nguyễn Văn Lệ, Dương Minh Viễn, and Đỗ Thị Xuân (2015), “Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu diazinon trên đất chuyên màu ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 2, tr. 56-61.
11. Nguyễn Trần Oánh và cộng sự (2007), *Giáo trình sử dụng thuốc Bảo vệ thực vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
12. Trần Minh Quân and Nguyễn Mạnh Tuấn (2024), “Đánh giá khả năng phân hủy fenitrothion của chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* BPPL-102 phân lập tại Thái Nguyên”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 229(13), tr. 257 - 263.
13. Lương Thị Thắm và cộng sự (2020), “Khảo sát khả năng phân hủy chlorpyrifos của 3 dòng vi khuẩn hiếu khí phân lập tại Đà Lạt”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Duy Tân*, 06(43), tr. 35-45.
14. Lương Hữu Thành và cộng sự (2012), *Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý phế thải nhà máy chế biến tinh bột sắn*, Đề tài KH-CN cấp nhà nước thuộc chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020.
15. Lương Hữu Thành và cộng sự (2016), *Hoàn thiện công nghệ sản xuất và sử dụng chế phẩm vi sinh vật xử lý phế thải chế biến tinh bột sắn*, Dự án sản xuất thử nghiệm thuộc chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020.
16. Trần Thị Thành (2005), *Điều tra tình hình sử dụng và đánh giá dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong một số loài rau ăn quả, ăn củ tại một số địa phương trên thị trường thành phố Vinh-Nghệ An*, Đại học Vinh.
17. Nguyễn Thị Anh Thư (2014), *Phân lập vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ Chlorpyrifos ethyl từ đất canh tác lúa tại một số tỉnh ở đồng bằng sông Cửu Long*, Luận án tốt nghiệp Đại học, Trường Đại học Cần Thơ.

18. Phạm Văn Toàn và Phạm Bích Hiền (2015), “*Nghiên cứu sử dụng vi sinh vật phân giải Lân ở Việt Nam*”, Tài liệu Hội thảo quốc gia về sử dụng hiệu quả phân bón Văn Điển cho cây trồng tại Việt Nam, tr. 179-188
19. Hà Minh Trung (2000), *Nghiên cứu ảnh hưởng của hóa chất độc hại dùng trong nông nghiệp tới sức khỏe con người, các biện pháp khắc phục*, Đề tài cấp Nhà nước 11-08, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
20. Bộ Khoa học và Công nghệ (2005), *Tiêu chuẩn Việt Nam 7538-2:2005 (ISO 10381-2:2002): Chất lượng đất - Lấy mẫu - Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu*.
21. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), *Tiêu chuẩn Việt Nam 5611:2007 về Chè - Xác định tro tổng số*.
22. Bộ Khoa học và Công nghệ (2011), *Tiêu chuẩn Việt Nam 9016:2011: Rau tươi - Phương pháp lấy mẫu trên ruộng sản xuất*.
23. Bộ Khoa học và Công nghệ (2012), *Tiêu chuẩn Việt Nam 3218:2012 về Chè - Xác định các chỉ tiêu cảm quan bằng phương pháp cho điểm*.
24. Bộ Khoa học và Công nghệ (2013), *Tiêu chuẩn Việt Nam 9744:2013 (ISO 10727:2002) Chè và chè hòa tan dạng rắn - Xác định hàm lượng cafein - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*.
25. Bộ Khoa học và Công nghệ (2015), *Tiêu chuẩn Việt Nam 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013), 01/01/2015, Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 độ C bằng kỹ thuật đổ đĩa*.
26. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2010), *Quy chuẩn kỹ thuật sản xuất và kiểm định thuốc bảo vệ thực vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
27. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2010), *Quy chuẩn Việt Nam 01-28:2010/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia: chè – Quy trình lấy mẫu phân tích chất lượng, an toàn vệ sinh thực phẩm*.
28. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2018), *Quy chuẩn Việt Nam 01-188:2018/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng thuốc bảo vệ thực vật*.
29. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2015), *Thông tư số 21/2015/TT-BNNPTNT về quản lý thuốc bảo vệ thực vật*.

30. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2019), *Thông tư số 10/2019/TT-BNNPTNT: Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng, cấm sử dụng tại Việt Nam.*
31. Bộ Tài nguyên và Môi trường (2015), *Báo cáo 10 năm thực hiện Công ước Stockholm về các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy tại Việt Nam 2005-2015.*
32. Cục Bảo vệ thực vật (2006), *Tổng quan quản lý thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam và các nước, Tài liệu báo cáo kết quả thực hiện dự án cấp ngành.*
33. Cục trồng trọt – Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, *Báo cáo kết quả thực hiện công tác trong lĩnh vực trồng trọt.*
34. Tổng cục Môi trường (2015), *Hiện trạng ô nhiễm môi trường do hóa chất bảo vệ thực vật tồn lưu thuộc nhóm chất hữu cơ khó phân hủy tại Việt Nam, Dự án xây dựng năng lực nhằm loại bỏ hóa chất bảo vệ thực vật POP tồn lưu tại Việt Nam.*
35. Tổng cục thống kê (2023), *Niên giám thống kê năm 2023, Nhà xuất bản Thống kê.*
36. Trung tâm kiểm định thuốc BVTV phía Bắc (2001), *Dư lượng thuốc BVTV trong rau và chè ở Việt Nam, Tạp chí Bảo vệ thực vật, số 4.*
37. Trung tâm Quan trắc Môi trường Miền Nam (2022), *Tìm hiểu về thuốc bảo vệ thực vật: phân loại và độc tính.*

Tiếng Anh

38. Abraham, Jayanthi and Silambarasan, Sivagnanam (2016), “Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium Ochrobactrum sp. JAS2: a proposal of its metabolic pathway”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126, pp. 13-21.
39. Affam, A. C. and Chaudhuri, M (2013), “Degradation of pesticides chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil in aqueous solution by TiO₂ photocatalysis”, *Journal of Environmental Management*, 130, pp. 160-165.
40. Aislabie, Jackie, Saul, David J., and Foght, Julia M. (2006), “Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils”, *Extremophiles*, 10(3), pp. 171-179.

41. Akbar, S., & Sultan, S. (2016), "Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement", *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 563-570
42. Alex Odoom and Wilfred Ofofu (2023), "Phosphorus in Soils and Plants", *Intech Open*, 162(1), pp. 4-6.
43. Alvarenga, N., et al. (2018), "Biotransformation and biodegradation of methyl parathion by Brazilian bacterial strains isolated from mangrove peat", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, pp. 319-326.
44. Aribisala, Jamiu Olaseni and Sabiu, Saheed (2022), "Redox impact on bacterial macromolecule: a promising avenue for discovery and development of novel antibacterials", *Biomolecules*, 12(11), p. 1545.
45. Armbrust, K. L (2001), "Chlorothalonil and chlorpyrifos degradation products in golf course leachate", *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(9), pp. 797-802.
46. Asamba, M. N., et al. (2022), "Molecular characterization of chlorpyrifos degrading bacteria isolated from contaminated dairy farm soils in Nakuru County, Kenya", *Heliyon*, 8(3), e09176
47. Aswathi, A., Pandey, A., and Sukumaran, R. K (2019), "Rapid degradation of the organophosphate pesticide–Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3", *Bioresource Technology*, 292, p. 122025.
48. Ausubel, F.M et al. (1994), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
49. Bajgar, J (2004), "Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment", *Adv Clin Chem*, 38(1), pp. 151-216.
50. Barles, R. W., Daughton, C. G., and Hsieh, D. P. (1979), "Accelerated parathion degradation in soil inoculated with acclimated bacteria under field conditions", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8, pp. 647-660.

51. Berg, G. (2009), "Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), pp. 11-18.
52. Bhagobaty, R. K., and Malik, A (2008), "Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh, India", *Research Journal of Microbiology*, 3(5), pp. 293-307.
53. Bhatt, P., et al. (2019), "Insight into microbial applications for the biodegradation of pyrethroid insecticides", *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1778.
54. Bhatt, P., et al. (2021), "Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides", *Journal of Hazardous Materials*, 411, p. 125026.
55. Birolli, W. G., et al. (2018), "Enantioselective biodegradation of the pyrethroid (\pm)-lambda-cyhalothrin by marine-derived fungi", *Chemosphere*, 197, pp. 651-660.
56. Bootharaju, M. S. and Pradeep, T (2012), "Understanding the degradation pathway of the pesticide, chlorpyrifos by noble metal nanoparticles", *Langmuir*, 28(5), pp. 2671-2679.
57. Bose, S., Kumar, P. S., and Vo, D. V. N. (2021), "A review on the microbial degradation of chlorpyrifos and its metabolite TCP", *Chemosphere*, 283, p. 131447.
58. Capela, R., et al. (2020), "Embryo bioassays with aquatic animals for toxicity testing and hazard assessment of emerging pollutants: A review", *Science of the Total Environment*, 705, p. 135740.
59. Cater, A. D. (1984), "*Evaluation of virulence and pathogenicity in animal models*", *Methods in Microbial Pathogenesis*, Academic Press, (pp. 45–55).
60. Chawla, N., Suneja, S., and Kukreja, K (2013), "Isolation and characterization of chlorpyrifos degrading bacteria", *Indian Journal of Agricultural Research*, 47(5), pp. 381-391.

61. Chen, S., et al. (2015), “Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19”, *Scientific reports*, 5(1), p. 8784.
62. Cho, C. M. H., Mulchandani, A., and Chen, W (2002), “Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp. 2026-2030.
63. Cho, T. H., Wild, J. R., and Donnelly, K. C (2000), “Utility of organophosphorus hydrolase for the remediation of mutagenicity of methyl parathion”, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(8), pp. 2022-2028.
64. Cycoń, M., et al. (2013), “Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils”, *Journal of Environmental Management*, 117, pp. 7-16.
65. Deng, S., et al. (2015), “Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1”, *Journal of Hazardous Materials*, 297, pp. 17-24.
66. Dumas, D. P., et al. (1989), “Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*”, *Journal of Biological Chemistry*, 264(33), pp. 19659-19665.
67. Dumas, D. P., et al. (1990), “Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277, pp. 155-159
68. Ekesi, S., Adamu, R. S., and Maniania, N. K. (2002), “Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes to the legume pod borer, *Maruca vitrata* and the pod sucking bug, *Clavigralla tomentosicollis*”, *Crop Protection*, 21(7), pp. 589-595.
69. Elshikh, M. S., et al. (2022), “Enhanced Biodegradation of Chlorpyrifos by *Bacillus cereus* CP6 and *Klebsiella pneumoniae* CP19 from municipal waste water”, *Environmental Research*, 205, p. 112438.

70. EPA (1996), “SW-846 Test Method 3540C: Soxhlet Extraction”, Part of Test methods for Evaluating Solid Waste, 68.
71. European Commission (2023), Notification 2023.3447: *Pesticide residues in tea mixture with sweetener from Vietnam via France*.
72. Fan, S., et al. (2018), “A novel chlorpyrifos hydrolase CPD from *Paracoccus* sp. TRP: Molecular cloning, characterization and catalytic mechanism”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, pp. 10-16.
73. Farag azmy A., et al. (2015), “Biodegradation of Malathion by *Acinetobacter baumannii* Strain AFA Isolated from Domestic Sewage in Egypt”, *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering*, 9(1), pp. 55–65.
74. Farhan, M., et al. (2021), “Biodegradation of chlorpyrifos using isolates from contaminated agricultural soil, its kinetic studies”, *Scientific Reports*, 11(1), p. 10320.
75. Feng, F., et al. (2017), “Isolation, colonization, and chlorpyrifos degradation mediation of the endophytic bacterium *Sphingomonas* strain HJY in Chinese Chives (*Allium tuberosum*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), pp. 1131-1138.
76. Feng, F., et al. (2017), “Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability”, *Chemosphere*, 184, pp. 505-513.
77. Fest, C. and Schmidt, K. J (2012), *The chemistry of organophosphorus pesticides*, Springer Science & Business Media.
78. Foong, S. Y., et al. (2020), “A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed”, *Journal of Hazardous Materials*, 400, p. 123006.
79. Gan, X., Li, Y., & Zhang, H. (1999), “A New Method for the Extraction and Determination of Organophosphorus Compounds in Soil Samples”, *Journal of Agricultural Chemistry*, 47(3), 256-262

80. Georghiou, G. P. (Ed.). (2012), Pest resistance to pesticides, *Springer Science & Business Media*.
81. Gervais, J. A., et al. (2009), *Picaridin technical fact sheet*, National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services, Editor^Editors.
82. Gilani, R. A., et al. (2016), “Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*”, *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), pp. 105-119.
83. Gokhan Onder Erguven et al. (2021), “Evaluation of the efficiency of chlorpyrifos-ethyl remediation by *Methylobacterium radiotolerans* and *Microbacterium arthrosphaerae* using response of some biochemical biomarkers”, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(3), pp. 2871-2879
84. Gopal, S., et al. (2000), “Mutagenesis of organophosphorus hydrolase to enhance hydrolysis of the nerve agent VX”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), pp. 516-519.
85. Hadibarata et al. (2023), “Biodegradation mechanism of chlorpyrifos by halophilic bacterium *Hortaea* sp. B15”, *Chemosphere*, 312(1):137260.
86. Hay V. Duong, et al., (2022), “Evaluating the Presence of Pesticide Residues in Organic Rice Production in An Giang Province, Vietnam”, *Journal of Sustainable Development*, Vol. 15 (1), pp. 1913-9063.
87. Heinrichs, E. A. and Mochida, O. (1984), “From secondary to major pest status: the case of insecticide-induced rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, resurgence”, *Agricultural and Food Sciences, Environmental Science*.
88. Horne, I., et al. (2002), “Organophosphate Hydrolase: A Versatile Enzyme for Bioremediation of Organophosphate Pesticides”, *Applied and Environmental Microbiology*.
89. Huang, Y., et al. (2021), “Insights into the microbial degradation and catalytic mechanisms of chlorpyrifos”, *Environmental Research*, 194, p. 110660.
90. Hwang et al., (2009), “Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora”, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 34 (24) pp. 9702-9710

91. ILO (2000), “*Safe and health in used chemical agriculture*”, Labuor Publish Geneva.
92. Islam, et al. (2010), “Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), pp. 5380-5386.
93. Islam N, Rupa Iyer (2021), “Functional Analysis of Chlorpyrifos Biodegradation in Agricultural Soils Augmented with a Three-Strain Bacterial Consortium”, *Water, Air, & Soil Pollution*, 232 (425)
94. Jha, S. K., et al. (2022), “*Enterobacter sp.* SWLC2 for biodegradation of chlorpyrifos in the aqueous medium: Modeling of the process using artificial neural network approaches”, *Computers and Electronics in Agriculture*, 193, 106680.
95. John, E. M. and Shaike, J. M. (2015), “Chlorpyrifos: pollution and remediation”, *Environmental Chemistry Letters*, 13, pp. 269-291.
96. John, G. Holt, et al. (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition, Lippincott Williams and Wilkins, United States, pp. 9-754
97. Kapoor, M. and Rajagopal, R. (2000), “Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides”, *Journal of the Geological Society*, 157(4), pp. 859-876.
98. Kapoor, Mukesh and Rajagopal, R (2011), “Enzymatic bioremediation of organophosphorus insecticides by recombinant organophosphorous hydrolase”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), pp. 896-901.
99. Karami-Mohajeri, S. and Abdollahi, M. (2011), “Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review”, *Human & Experimental Toxicology*, 30(9), pp. 1119-1140.
100. Karns, J. S., et al. (1998), “Biotechnology for the elimination of agrochemical wastes”, *HortScience*, 33(4).

101. Karns, J. S., et al. (1987), "Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticides", *ACS Publications*.
102. Karpouzias, D. G. and Singh, B. K. (2006), "Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis", *Advances in Microbial Physiology*, 51, pp. 119-225.
103. Kim, J. R. and Ahn, Y. J (2009), "Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia sp.* strain KR100", *Biodegradation*, 20, pp. 487-497.
104. Krieger, R (2010), Hayes' handbook of pesticide toxicology, Vol. 1, *Academic press*.
105. Krieger, R (2001), Handbook of pesticide toxicology, *Elsevier Science*.
106. Kumar, S., et al. (2018), "Microbial degradation of organophosphate pesticides: a review", *Pedosphere*, 28(2), pp. 190-208.
107. Kumar, S. V., et al. (2010), "Current review on organophosphorus poisoning", *Archives of Applied Science Research*, 2, No. 4, pp.199-215.
108. Kushwaha, M., Verma, S., and Chatterjee, S. (2016), "Profenofos, an Acetylcholinesterase-Inhibiting Organophosphorus Pesticide: A Short Review of Its Usage, Toxicity, and Biodegradation", *Journal of Environmental Quality*, 45(5), pp. 1478-1489.
109. Lai, K., Stolowich, N. J., and Wild, J. R. (1995), "Characterization of PS bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(1), pp. 59-64.
110. Lei, W., Tang, X., and Zhou, X. (2020), "Biochar amendment effectively reduces the transport of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (a main degradation product of chlorpyrifos) in purple soil: Experimental and modeling", *Chemosphere*, 245, p. 125651.
111. Li, J., et al. (2010), "Isolation and characterization of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol-degrading *Ralstonia sp.* strain T6", *Bioresource Technology*, 101(19), pp. 7479-7483.

112. Li, K., et al. (2011), “Genome sequence of *Paracoccus* sp. strain TRP, a chlorpyrifos biodegrader”, *Journal of Bacteriology*, 193(7), pp. 1786-1787.
113. Li, X., et al. (2007), “Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene”, *Research in Microbiology*, 158(2), pp. 143-149.
114. Li, X., et al. (2020), “The Genome Analysis of *Methylobacterium populi* YC-XJ1 with Diverse Xenobiotics Biodegrading Capacity and Degradation Characteristics of Related Hydrolase”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12):4436.
115. Liu, B., et al. (2016), “Construction of a controlled-release delivery system for pesticides using biodegradable PLA-based microcapsules”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 144, pp. 38-45.
116. Liu, Y. H., et al. (2004), “Purification and characterization of a novel organophosphorus pesticide hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP303”, *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3-4), pp. 297-303.
117. Lu, P., et al. (2013), “Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1”, *Bioresource Technology*, 127, pp. 337-342.
118. M. Antonio Rogel et al. (2001), “Nitrogen-Fixing Nodules with *Ensifer adhaerens* Harboring *Rhizobium tropici* Symbiotic Plasmids”, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7) , pp. 3264–3268
119. Maggi, V. L. and Leigh, T. F. (1983), “Fecundity response of the twospotted spider mite to cotton treated with methyl parathion or phosphoric acid”, *Journal of Economic Entomology*, 76(1), pp. 20-25.
120. Mali, H., et al. (2022), “Improved live-cell PCR method for detection of organophosphates degrading opd genes and applications”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(4), pp. 1705-1714.
121. Manahan, S. E. (2003), *Toxicological chemistry and biochemistry*, CRC Press.

122. Maya, K., et al. (2011), “Kinetic analysis reveals bacterial efficacy for biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP”, *Process Biochemistry*, 46(11), pp. 2130-2136.
123. McDonald, N. D et al. (2021), “The ChpR transcriptional regulator of *Sinorhizobium meliloti* senses 3,5,6-trichloropyridinol, a degradation product of the organophosphate pesticide chlorpyrifos”, *Access Microbiology*, 3(12):000297
124. Meggs, W. J. (2003), “*Poisoning with organophosphorous pesticides can cause sensory and moto*”, Departement of Emergency Medicine, Division of Toxicology, Brody School of Medicine at East Carolina University, USA. 41(6), pp. 883-6.
125. Melnikov, N. N. and Melnikov, N. N. (1971), “Organophosphorus compounds”, *Chemistry of Pesticides*, pp. 303-386.
126. Method, AOAC Official (1965), “*Tanin in distilled liquors. Spectrophotometri method*”.
127. Mohamed, T., et al. (2022), “*Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives*”, *Frontiers in Plant Science*.
128. Mulbry, W., Ahrens, E., and Karns, J. (1998), “Use of a field-scale biofilter for the degradation of the organophosphate insecticide coumaphos in cattle dip wastes”, *Pesticide Science*, 52(3), pp. 268-274.
129. Mulchandani, A., Kaneva, I., and Chen, W. (1999), “Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase”, *Biotechnology and Bioengineering*, 63(2), pp. 216-223.
130. Munnecke, D. M. (1977), “Properties of an immobilized pesticide-hydrolyzing enzyme”, *Applied and Environmental Microbiology*, 33(3), pp. 503-507.
131. Munnecke, D. M. and Hsieh, D. P. (1976), “Pathways of microbial metabolism of parathion”, *Applied and Environmental Microbiology*, 31(1), pp. 63-69.

132. Naamala, J. and Smith, D. L. (2020), “Relevance of plant growth promoting microorganisms and their derived compounds, in the face of climate change”, *Agronomy*, 10(8), p. 1179.
133. Nguyen, T. P., et al. (2018), “Assessment of Organophosphorus Insecticides Residues in Agricultural Soils from the Mekong Delta, Vietnam”, *Journal of Environmental Science & Technology*.
134. Ohshiro, K et al. (1996), “Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (3): 299-305
135. Organization, World Health (1986), “*Organophosphorus insecticides: a general introduction*”, World Health Organization.
136. Pailan, S., et al. (2015), “Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, pp. 191-195
137. Pailan, S., et al. (2016), “Evidence of biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated heavy metaltolerant bacterium *Acinetobacter sp.* strain MemCl4”. *Environmental Earth Sciences*, 75(1019)]
138. Pang, S., et al. (2020), “Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids”, *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 868.
139. Paul, D. and Sarma, Y. R. (2006), “Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.)”, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(02), pp. 113-118.
140. Peshin, R., et al. (2009), “Integrated pest management: a global overview of history, programs and adoption”, *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, 1, pp. 1-49.

141. Rabinowitz, R. (1963), "The reactions of phosphonic acid esters with acid chlorides. A very mild hydrolytic route", *The Journal of Organic Chemistry*, 28(11), pp. 2975-2978.
142. Ragnarsdottir, K. V. (2000), "Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides", *Journal of the Geological Society*, 157(4), pp. 859-876.
143. Rani, N. L. and Lalithakumari, D. (1994), "Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*", *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), pp. 1000-1006.
144. Rao, N. S., et al., (2008), "Degradation of chlorpyrifos by a microbial consortium isolated from agricultural soil", *Journal of Environmental Science and Health*, 43(1), 46–52
145. Richins, R. D., et al. (1997), "Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase", *Nature Biotechnology*, 15(10), pp. 984-987.
146. Rosenberg, E (2017), *It's in Your DNA: From Discovery to Structure, Function and Role in Evolution, Cancer and Aging*, Academic Press.
147. Russell, R. J., et al. (2011), "The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects", *Evolutionary Applications*, 4(2), pp. 225-248.
148. Rutwik Ravindra Mandakini Thengodkar, S Sivakami (2010), "Degradation of Chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*", *Biodegradation*, 21(4), pp. 637-644.
149. Satoh, T., & Hosokawa, M. (2006), "Carboxylesterases in Lipid Metabolism: From Enzymology to Metabolic Diseases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
150. Seo JS et al. (2007), "Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14): 5383-5389.

151. Serdar, C. M., et al. (1982), "Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*", *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), pp. 246-249.
152. Sethunathan, N. and Yoshida, T. (1973), "A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion", *Canadian Journal of Microbiology*, 19(7), pp. 873-875.
153. Shen, Y. J., et al. (2010), "Isolation of a methyl parathion-degrading strain *Stenotrophomonas sp.* SMSP-1 and cloning of the *ophc2* gene", *Biodegradation*, 21, pp. 785-792.
154. Silva, M. H. (2020), "Effects of low-dose chlorpyrifos on neurobehavior and potential mechanisms: A review of studies in rodents, zebrafish, and *Caenorhabditis elegans*", *Birth Defects Research*, 112(6), pp. 445-479.
155. Singh, B. K. (2009), "Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications", *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), pp. 156-164.
156. Singh, B. K., et al. (1999), "Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms", *Critical Reviews in Biotechnology*, 19(3), pp. 197-225.
157. Singh B. K., et al. (2004), "Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), pp. 4855-63
158. Singh, B. K. and Walker, A (2006), "Microbial degradation of organophosphorus compounds", *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), pp. 428-471.
159. Singh, B. K., et al. (2003), "Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium", *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), pp. 5198-5206.
160. Singh, B., Kaur, J., Singh K. (2012), "Biodegradation of malathion by *Brevibacillus sp.* strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, pp. 1133–1141.

161. Singh, B., Kaur, J., Singh, K. (2012), "Transformation of malathion by *Lysinibacillus sp.* isolated from soil", *Biotechnology Letters*, 34, pp. 863-867.
162. Singh, B., Kaur, J., Singh K. (2013), "Bioremediation of malathion in soil by mixed *Bacillus* culture", *Advances in Bioscience and Biotechnolog*, 4, pp. 674–678.
163. Sivagami, K., et al. (2016), "Chlorpyrifos and Endosulfan degradation studies in an annular slurry photo reactor", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, pp. 327-331.
164. Soltani-Nezhad, F., et al. (2020), "Synthesis of Fe₃O₄/CdS–ZnS nanostructure and its application for photocatalytic degradation of chlorpyrifos pesticide and brilliant green dye from aqueous solutions", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, p. 109886.
165. Straus, D. L. and Chambers, J. E. (1995), "Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate (DEF)", *Aquatic Toxicology*, 33(3-4), pp. 311-324.
166. Tatiana Pashirova et al. (2024), "Applications of Microbial Organophosphate-Degrading Enzymes to Detoxification of Organophosphorous Compounds for Medical Countermeasures against Poisoning and Environmental Remediation", *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7822.
167. Tesi GO, et al., (2025), "Assessment of organophosphate pesticides in soils and vegetables from agricultural areas of Delta Central District, Nigeria", *Sci Rep.*, 15(1):8267.
168. Uniyal, S. and Sharma, R. K. (2018), "Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of Organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects", *Biosensors and Bioelectronics*, 116, pp. 37-50.
169. Ur Rahman, H. U., et al. (2021), "A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies", *Science of The Total Environment*, 755, p. 142649.

170. Valeria Ventorino et al. (2014). “*Methylobacterium populi* VP2: Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from a Highly Polluted Environment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Biodegradation”, *The Scientific World Journal*, 2014, 931793
171. Wang, D., Singhasemanon, N., and Goh, K. S. (2016), “A statistical assessment of pesticide pollution in surface waters using environmental monitoring data: Chlorpyrifos in Central Valley, California”, *Science of The Total Environment*, 571, pp. 332-341.
172. Xiao-Hua Zhang et al. (2006), “Isolation and Characterization of a Dichlorvos-Degrading Strain DDV-1 of *Ochrobactrum sp*”, *Pedosphere on Science Direct*, 16 (1): 64-71
173. Yadav, M., et al. (2016), “Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: a review”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), pp. 727-742.
174. Yu-xin, X. U., et al. (2009), “Isolation and Characterization of Capable of Degrading Parathion-methyl Bacterium *Stenotrophomonas sp.* PF32”, *Chinese Journal of Pesticide Science*, 11(3), pp. 329-334.
175. Zhang, Q., et al. (2018), “Simultaneous biodegradation of bifenthrin and chlorpyrifos by *Pseudomonas sp.* CB2”, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 53(5), pp. 304-312.
176. Zhang, R., et al. (2006), “Cloning of the organophosphorus pesticide hydrolase gene clusters of seven degradative bacteria isolated from a methyl parathion contaminated site and evidence of their horizontal gene transfer”, *Biodegradation*, 17, pp. 465-472.
177. Zhang, Y., et al. (2007), “Biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated bacterial strain”, *Journal of Hazardous Materials*, 141(3), pp. 1003–1009
178. Zhang, Y., et al. (2010), “Degradation behavior and products of malathion and chlorpyrifos spiked in apple juice by ultrasonic treatment”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), pp. 72-77.

179. Zhao et al. (2014), “Identification and functional characteristics of chlorpyrifos-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*”. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), pp. 457–463
180. Zheng, Y., et al. (2008), Bioinformatics analysis of methyl parathion hydrolase MPH and the structure prediction with homology modeling, *2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, IEEE*, pp. 13-16.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Danh mục thiết bị, hóa chất, dụng cụ sử dụng

1. *Thiết bị thí nghiệm*

Tủ cấy vi sinh vật AVC4-D1	ESCO - Singapore 2008
Tủ Hood EFH-4AX	ESCO- Singapore 2008
Tủ âm lạnh ổn nhiệt JSSI 200CL	JS Research - Hàn Quốc 2009
Tủ sấy JSOF-150	JS Research - Hàn Quốc 2009
Tủ sấy Memmert	Đức
Máy quang phổ tử ngoại khả biến BioMate 3	Thermol Scientific - 2009
Máy chu trình nhiệt MultiGene II	Labnet - Mỹ, 2009
Tủ Thao tác PCR - 4A	ESCO – Singapore, 2009
Bộ giữ lạnh để bàn IC25	Torrey - Mỹ, 2009
Máy ly tâm thường 380R	Hettich Zentrifugen – Đức, 2008
Máy li tâm lạnh Prism R	Labnet- Mỹ, 2008
Máy phá vỡ màng tế bào kèm lắc rung HD 2070	Bandelin - Đức, 2009
Bộ điện di nằm ngang	Labnet- Mỹ, 2008
Bàn soi UV T1000	Labnet- Mỹ, 2008
Máy cô ADN UNIVAPO 100 ECH	Uniequip- Đức, 2007
Nồi khử trùng JSAC-100	JS Research-Hàn Quốc 2009
Máy lắc rung Vortex MS 3 Digital/Basic	IKA-Đức, 2009
Máy lắc ống nghiệm Wizard	Velp – Italy, 2009
Máy khuấy từ F60	FALC-Italy
Cân điện tử PW254	Adam-Anh, 2007
Máy đo pH pH 2-11	Hanna Instrument-Italy, 2008
Kính hiển vi quét	Olympus
Hệ thống lên men tự động	Hàn Quốc

2. *Hóa chất thí nghiệm:*

- Các thí nghiệm làm giàu, phân lập và đánh giá khả năng phân giải của các chủng phân lập được đối với các loại thuốc BVTV phospho hữu cơ đều sử dụng hóa chất tinh khiết của hãng Dr.Ehrenstorfer với độ tinh khiết 99,5%, Bao gồm các loại thuốc BVTV như Chlorpyrifos, Malathion và Parathion.

- Các loại dung môi có độ tinh khiết cao như Acetone (99,8%), Methanol (99,9%), n-Hexan (99,7%).

- Hóa chất phân tách DNA: CTAB 3%, Chloroform, Isopropanol và Ethanol; hóa chất thực hiện phản ứng PCR: Hỗn hợp Go Taq Green Master Mix (Promega), Mồi xuôi 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'), mồi ngược 907R (5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3') và nước (không có chứa DNA). Hóa chất chuẩn bị chạy gel Agarose kiểm tra sản phẩm PCR: Agarose 1% - 1,5% (Merck), TBE buffer 0.5X, Loading buffer (chất chỉ thị màu - LB), Ethidium bromide (chất chỉ thị huỳnh quang - EtBr), thang chuẩn DNA 100 bp plus và 100 bp (Fermentas).

- Môi trường nuôi cấy

+ Môi trường muối khoáng tối thiểu MMS (Mineral minimal salt medium) gồm 870 mL nước khử khoáng được khử trùng ước ở 121oC trong 20 phút, khi nhiệt độ hạ xuống còn 70oC thêm 25 mL dung dịch đệm, 100 mL dung dịch muối khoáng và 5 mL dung dịch

+ Môi trường Luria-Bertani (LB) Agar gồm 20 gram Peptone, 10 gram NaCl, 5 gram Cao nấm men và 15 gram Agar trong một lít nước khử khoáng được khử trùng ước ở 121oC trong 20 phút, khi nhiệt độ hạ xuống khoảng 50oC thì đổ môi trường nuôi cấy vào đĩa petri nhựa đã khử trùng bằng tia gamma. Môi trường LB dùng để tinh sạch và lưu giữ các chủng vi sinh vật sau giai đoạn làm giàu mật số.

+ Môi trường sản xuất SX1: Ri đường: 20 g; bột nấm men: 10 g; K₂HPO₄: 0,2 g; nước sạch: 1000 ml.

+ Môi trường sản xuất SX2: Nước chiết giá: 40 g; Glucose: 5 g; Bột nấm men: 5 g; nước sạch: 1000 ml.

+ Môi trường sản xuất SX3: Pepton: 20 g; bột nấm men: 10 g; Glucose: 1 g; nước sạch: 1000 ml.

3. Dụng cụ thí nghiệm

Dụng cụ thí nghiệm sử dụng các thiết bị từ Phòng Sinh học thực nghiệm và các phòng chuyên môn khác của Viện Môi trường Nông nghiệp; Viện Công nghệ sinh học (Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (Đại học Quốc gia Hà Nội).

Phụ lục 2: Danh sách các mẫu đất được thu thập phục vụ nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Tọa độ
1	A1	19.003556oB; 105.007111oĐ
2	A2	19.003611oB; 105.007056oĐ
3	A3	19.003639oB; 105.007139oĐ
4	A4	19.003694oB; 105.007056oĐ
5	A5	19.003778oB; 105.007111oĐ
6	B1	19.004389oB; 105.006833oĐ
7	B2	19.004361oB; 105.006750oĐ
8	B3	19.004444oB; 105.006722oĐ
9	B4	19.004389oB; 105.006639oĐ
10	B5	19.004472oB; 105.006611oĐ
11	C1	21.617694oB; 105.559778oĐ
12	C2	21.617694oB; 105.559833oĐ
13	C3	21.617750oB; 105.559833oĐ
14	C4	21.617750oB; 105.559889oĐ
15	C5	21.617806oB; 105.559861oĐ
16	D1	21.616778oB; 105.560111oĐ
17	D2	21.616806oB; 105.560139oĐ
18	D3	21.616778oB; 105.560167oĐ
19	D4	21.616806oB; 105.560194oĐ
20	D5	21.616778oB; 105.560222oĐ

Phụ lục 3: Trình tự gen của các chủng vi sinh vật

3.1. Trình tự gen 16S rRNA của chủng CNN2

CAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCCTTCGGTTCGGAATAACTCAG
GGAAACTTGAGCTAATACCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACCGCCGA
AGGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGC
GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGC
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGC
TCTTTTGTCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAAGAATAAGCCCCGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACT
GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCGATTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGG
CTCAACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACA
GCGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAG
TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCCGGTTCGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGC
CAGCCGTTGGCCTGCTTGCAGGTCAGTGGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACC
ATCCCTTGACATGGCATGTTACCTCGAGAGATCGGGGATCCTCTTCGGAGGCG
TGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGC
ACTCTAGGAGACTGCCGGTGATAA

3.2. Trình tự gen 16S rRNA của chủng VNN3

GGTGAGTAACGCGTGGGATCTACCCTTTTCTACGGAATAACGCAGGGAAACTT
GTGGTAATACCGTATGAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGGAAATGATGAG
CCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCC
ATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGA
TCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAC
CGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGT

AAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAAC
CCCGGAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGA
TTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGT
CGGGCAGTTTACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCT
TGACATCCCGATCGCGGATTACAGAGATGTTTTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCG
GGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAGTTGGGGTTT
AAAGTCCCGCAACGAAGCCGCAACCCCTTCGCCCTTTAGTTTGCCCAGCAAT
TTGGGTTTGGGG

3.3. Trình tự gen 16S rRNA của chủng CNN4

ATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTG
GGGGACAACATTTGAAAGGAATGCTAATACCGCATACTCCTACGGG
AGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCG
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGC
GGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC
TGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCA
CTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGAC
GTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTTCCAGCAGCCGCGGTA
ATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGC
GTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGA
ATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGC
GAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGGC
TACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATA
AGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAAT

TGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATG
GATTGGTGCCTTCGGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGGTTAAGGTCCCGGCAACGAGCGCACCC
TTTTCCCTTTATTTGCCAGCGAGTAAATGTCGGGAAA

Phụ lục 4: Kết quả nghiên cứu tại phòng thí nghiệm

Bảng 1. Mật độ của các chủng vi sinh vật trên môi trường chứa OP

Chủng	Mật độ (CFU/mL)			
	Sau 24 h	Sau 48 h	Sau 72 h	Sau 96 h
CNN1	3.5×10^7	2.1×10^8	3.8×10^8	2.3×10^7
CNN2	2.6×10^8	3.2×10^9	8.8×10^9	2.8×10^8
VNN3	3.9×10^8	4.8×10^9	9.2×10^9	4.4×10^8
CNN4	4.3×10^8	5.8×10^9	9.0×10^9	5.7×10^8

Bảng 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng của vi sinh vật

Chủng VK	Sự sinh trưởng và phát triển của chủng (CFU/ml)					
	T ^o =20°C	T ^o =25°C	T ^o =30°C	T ^o =35°C	T ^o =40°C	T ^o =45°C
<i>M. populi</i> CNN2	$3,4(\pm 0,9) \times 10^5$	$2,3(\pm 1,1) \times 10^8$	$3,1(\pm 0,7) \times 10^8$	$3,7(\pm 1,2) \times 10^7$	$4,1(\pm 1,0) \times 10^6$	$3,3(\pm 0,6) \times 10^4$
<i>Ensifer sp.</i> VNN3	$4,1(\pm 1,2) \times 10^6$	$2,2(\pm 0,8) \times 10^7$	$6,2(\pm 0,9) \times 10^8$	$4,3(\pm 1,4) \times 10^7$	$3,3(\pm 1,3) \times 10^6$	$2,4(\pm 0,8) \times 10^3$

Bảng 3: Ảnh hưởng của pH tới sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

pH	<i>M. populi</i> CNN2	<i>Ensifer sp.</i> VNN3
pH=5.0	$4,5 (\pm 1,7) \times 10^4$	$3,9 (\pm 1,2) \times 10^4$
pH=5.5	$4,7 (\pm 1,4) \times 10^4$	$3,8 (\pm 1,8) \times 10^5$
pH=6.0	$5,1 (\pm 1,2) \times 10^6$	$6,3 (\pm 1,5) \times 10^5$
pH=6.5	$3,4 (\pm 1,4) \times 10^8$	$4,5 (\pm 1,7) \times 10^7$
pH=7.0	$3,4 (\pm 1,6) \times 10^7$	$5,6 (\pm 1,6) \times 10^8$
pH=7.5	$7,9 (\pm 1,7) \times 10^7$	$5,6 (\pm 1,6) \times 10^8$
pH=8.0	$4,1(\pm 1,9) \times 10^7$	$3,2 (\pm 1,3) \times 10^6$

Phụ lục 5. Hình ảnh trong quá trình triển khai các thí nghiệm

5.1. Hình ảnh nghiên cứu tại phòng thí nghiệm



5.2. Thí nghiệm nhà lưới







5.3. Thí nghiệm diện hẹp



5.4. Thí nghiệm diện rộng



Phụ lục 5: Thống kê thí nghiệm

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn của VSV																
Chủng VSV	OD _{620 nm}															
	24h				48h				72h				96h			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
CNN1	0.08	0.08	0.08	0.08±0.1	0.13	0.14	0.14	0.14±0.1	0.19	0.18	0.18	0.18±	0.25	0.25	0.24	0.25
CNN2	0.14	0.13	0.14	0.14±	0.346	0.345	0.344	0.345±	0.36	0.359	0.359	0.359±	0.409	0.409	0.408	0.409
CNN3	0.1	0.1	0.1	0.1±	0.34	0.34	0.35	0.34±	0.375	0.42	0.4	0.4±	0.44	0.45	0.47	0.45
CNN4	0.15	0.14	0.14	0.14±	0.26	0.26	0.27	0.26±	0.37	0.37	0.38	0.37±	0.377	0.405	0.433	0.405
CV				3.2				1.5				3.9				4
LSD				7.44E-03				8.15E-03				2.58E-02				3.05E-02
Mật độ VSV của các chủng CNN1, CNN2, CNN3 và CNN4																
KH chủng	Mật độ VSV(CFU/ml)															
	24h				48h				72h				96h			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
CNN1	3.3	3.8	3.4	3,5x10⁷	1.8	2.4	2.1	2,1x10⁸	3.7	3.8	3.8	3,8x10⁸	2.2	2.4	2.3	2,3x10⁷
CNN2	2.5	2.7	2.6	2,6x10⁸	2.9	3.3	3.3	3,2x10⁹	8.8	8.8	8.9	8,8x10⁹	2.7	2.7	3	2,8x10⁸
CNN3	3.9	3.8	4.1	3,9x10⁸	4.8	4.8	4.9	4,8x10⁹	9.6	8.8	9.1	9,2x10⁹	4.2	4.5	4.6	4,4x10⁸
CNN4	4.3	4.4	4.2	4,3x10⁸	5.7	5.8	5.9	5,8x10⁹	9.3	8.7	9	9,0x10⁹	5.6	5.7	5.7	5,7x10⁸
CV				4.1				2.9				3.1				3.3
LSD				2.29E+07				2.03E+08				4.25E+08				2.18E+07
Đánh giá khả năng phân giải Chlorpyrifos bởi các chủng vi khuẩn sau khi lên men 3 ngày																
Chủng VSV	Dư lượng Chlorpyrifos (mg/l)															
	Ngày 0				Ngày 1				Ngày 2				Ngày 3			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
ĐC	101.36	101.36	101.38	101,37	101.38	101.37	101.42	101,39	97.15	97.11	97.08	97,11	93.36	94.34	95.32	94,34
CNN2	102.38	101.38	103.31	102,35	60.25	60.25	60.29	60,26	41.42	41.4	41.46	41,42	19.06	19.04	19.09	19,06
CNN3	102.44	102.44	102.45	102,44	67.41	67.41	67.45	67,42	34.11	34.07	34.16	34,11	4.94	4.94	4.97	4,95
CNN4	103.04	103.06	103.07	103,05	74.66	74.65	74.69	74,67	55.42	55.41	55.39	55,41	39.96	39.96	39.97	39,96
CV				0.5				0				0.1				1.2
LSD				0.980532				0.00E+00				6.68E-02				0.966977