TÁC ĐỘNG SINH THÁI CỦA THUỐC TRỪ SÂU CYPERMETHRIN Ở NỒNG ĐỘ MÔI TRƯỜNG ĐẾN VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ NƯỚC HỒ 29/3, TP ĐÀ NẴNG

ECOLOGICALLY RELEVANT EFFECTS OF THE INSECTICIDE CYPERMETHRIN AT ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS ON THE BACTERIA ISOLATED FROM 29/3 LAKE, DANANG CITY

Phùng Khánh Chuyên, Nguyễn Thị Tâm

Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng; khanhchuyenqlmt@gmail.com

Tóm tắt - Thuốc trừ sâu thường được nghiên cứu về độc tính lên vi sinh vật, tuy nhiên chủ yếu tập trung vào độc tính cấp và ở nồng độ gây chết chứ không phải là độc mãn tính và ở nồng độ thấp hơn. Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy sự tiếp xúc với thuốc trừ sâu cypermethrin ở nồng độ tương đương với nồng độ hiện diện trong môi trường đã ảnh hưởng các chức năng sinh thái của vi khuẩn phân lập từ hồ 29/3 là *E. coli* và *Pseudomonas* sp., như hoạt động của các enzyme (cellulase và protease). Trong khi các nồng độ xử lý thấp này của cypermethrin không tác động đến tổng số tế bào sống của hai loài vi khuẩn được phân lập, thì chúng lại làm giảm hoạt động của enzyme cellulase và protease. Sau khi tiếp xúc với cypermethrin ở hầu hết các nồng độ, cả *E. coli* và *Pseudomonas* sp. đều bị giảm độ nhạy với 2 kháng sinh thông dụng là ceftazidim và ciprofloxacin. Riêng sự tiếp xúc với nồng độ cypermethrin 25µg/L đã gây kháng mức trung bình ở *E. coli* với ciprofloxacin.

Từ khóa - thuốc trừ sâu; cypermethrin; vi khuẩn; kháng kháng sinh; tác động sinh thái

Abstract - Insecticides are often tested for toxicity but only for acute and lethal, not for chronic and sublethal effects on microbes. In this study, exposures of *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. isolated from 29/3 lake in Danang city to the pesticide cypermethrin at environmentally relevant concentrations (0.25; 2.5 and 25 µg/L) were found to induce changes regarding ecological function such as enzymatic activities (cellulase and protease). While these sublethal concentrations of cypermethrin did not affect total vital bacteria cells of both bacteria species, they reduced activity of cellulase and protease enzymes in *E. coli* and *Pseudomonas* sp. With the application of cypermethrin at most of the concentrations, *E. coli* and *Pseudomonas* sp. had significant reduction in susceptibility to the antibiotics ceftazidim and ciprofloxacin. Specifically, exposure to 25µg/L of cypermethrin caused intermediate resistance to ciprofloxacin in *E. coli.*

Key words - insecticides; cypermethrin; bacteria; antibiotic resistance; ecological effects

1. Đặt vấn đề

Nông nghiệp là một trong những nền kinh tế quan trọng trong việc đảm bảo an ninh lương thực, phát triển và hội nhập quốc tế của Việt Nam. Trong nông nghiệp, việc sử dụng phân bón hóa học và hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) trong đó có thuốc trừ sâu đã mang lại hiệu quả đáng kể trong phòng trừ dịch hại, sâu bệnh, tăng năng suất và sản lượng nông phẩm. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc trừ sâu trong nông nghiệp ngày càng tăng, cùng với độc tính của các loại thuốc trừ sâu thường cao, nên đã và đang gây ra những tác hại tiêu cực đối với sức khỏe con người, môi trường và các loài sinh vật không chủ đích khác, kể cả các loài vi sinh vật.

Thuốc trừ sâu thâm nhập vào hệ sinh thái thuỷ sinh bằng nhiều cách: Dùng trực tiếp để kiểm soát sâu bệnh, vi khuẩn, nấm bệnh cho cây trồng và động vật thuỷ sinh; Tiếp cận với nguồn nước do lan truyền từ vùng đất xung quanh đã được phun hay bón thuốc. Khi thuốc trừ sâu xâm nhập vào môi trường nước và tồn tại lâu dài trong đó sẽ gây ra một số tác động tiêu cực cho sinh vật thủy sinh và nhất là hệ thống vi khuẩn phân giải các chất hữu cơ trong nước [1].

Hệ vi sinh vật trong môi trường nước có vai trò quan trọng trong chuyển hóa vật chất thông qua các chu trình dinh dưỡng như chuyển hóa nitơ, phân giải cellulose, phân giải tinh bột… Sự phân bố của các loài vi khuẩn trong môi trường nước đã góp phần điều hòa chất lượng nước trong tự nhiên, giảm ô nhiễm môi trường và giảm các hiện tượng phú dưỡng gây ảnh hưởng đến các sinh vật thủy sinh khác. Phản ứng của vi sinh vật đã được khuyến cáo như là một chỉ số cảnh báo sớm về sự căng thẳng của hệ sinh thái, nhờ vào tính chất phản ứng nhanh chóng với những thay đổi của điều kiện môi trường, như tiếp xúc với độc tố [2].

Độc tính của thuốc trừ sâu có thể ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật theo những cách khác nhau. Thuốc trừ sâu được điều chế và phát triển với cơ chế hoạt động đặc biệt cho côn trùng, cỏ dại và hoặc các mầm bệnh. Hầu hết các thuốc trừ sâu với cách thức hoạt động cụ thể trên sâu bệnh (thuốc ức chế AChE, điều biến GABA, kênh điều biến natri hoặc kali, chất ức chế sterol, ức chế sự phát triển) có thể không có một hoạt động hay bất kỳ tác dụng trực tiếp nào trên vi khuẩn [3]. Các loại thuốc trừ sâu với cơ chế không có tiềm năng tác động đến các vi khuẩn thì có thể không gây ảnh hưởng đến chúng, nhưng mặt khác với những loại có tiềm năng ảnh hưởng thì có thể tác động bằng cách làm vi khuẩn chết, làm giảm dân số hoặc các hoạt tính của chúng. Hóa chất bảo vệ thực vật ảnh hưởng đến vi khuẩn theo nhiều cách thông qua việc biến đổi các thuộc tính sinh hóa và sinh lý [4], ngoài việc tiêu diệt chúng. Thuốc trừ sâu có thể gây hại trực tiếp (ngay lập tức hoặc ngắn hạn) đến các vi khuẩn tiếp xúc với hóa chất hoặc gián tiếp do sự thay đổi gây ra bởi các chất hóa học đối với môi trường hay thông qua nguồn thực phẩm [5]. Tác động của thuốc trừ sâu cũng bị ảnh hưởng bởi nhiều thông số của môi trường, ngoài các tính độc nội tại của hóa chất.

Cypermethrin là một hoạt chất nhóm Cúc tổng hợp (Pyrethroid), được tổng hợp thành công vào năm 1974, là thuốc trừ sâu được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả trong nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản cũng như sử dụng trong lĩnh vực gia dụng và y tế [6]. Hoạt chất cypermethrin thuộc nhóm độc II, có chỉ số tác động môi trường tương đối cao (EIQ 36,35), cypermethrin rất độc với cá và là một trong những nguyên nhân làm tôm chết hàng loạt. Vì vậy ngày 16/01/2012, Bộ NN&PTNT đã ban hành Thông tư số 03/2012/TT-BNNPTNT cấm sử dụng cypermethrin trong sản xuất, kinh

doanh thủy sản. Tuy nhiên, hiện nay các loại thuốc trừ sâu có hoạt chất này vẫn đang được sản xuất và sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp. Điều này có thể dẫn đến nguy cơ xâm nhập và tồn dư trong hệ sinh thái thủy sinh, gây ảnh hưởng đến quá trình phân giải của hệ vi khuẩn trong nước, góp phần làm tăng ô nhiễm môi trường nước. Tuy vậy, tác động sinh thái của các loại thuốc trừ sâu nói chung và cypermethrin nói riêng chủ yếu được đánh giá về độc tính cấp và số lượng tế bào sống vi sinh vật dưới nồng độ xử lý cao. Do đó, vẫn còn thiếu các nghiên cứu về độc tính lâu dài trên các chỉ số liên quan đến chức năng sinh thái cũng như ảnh hưởng đến độ nhạy của vi khuẩn với các loại kháng sinh phổ biến.

Bài báo này xác định ảnh hưởng của thuốc trừ sâu *Cypermethrin* ở nồng độ thường tồn dư trong môi trường nước đến số lượng sống, hoạt tính enzyme (protease, cellulase) và khả năng kháng kháng sinh (độ nhạy cảm với kháng sinh) sau tiếp xúc lâu dài với *Cypermethrin* của vi khuẩn *E. Coli* và *Pseudomonas* sp. được phân lập từ hồ 29/3, thành phố Đà Nẵng.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp thu mẫu

Các mẫu nước được thu tại hồ công viên 29/3 ở TP. Đà Nẵng và quy trình thu mẫu theo Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8880:2011 - Chất lượng nước - Lấy mẫu nước để phân tích vi sinh vật.

Chọn 05 vị trí thu mẫu khác nhau tại hồ sau đó trộn 5 mẫu lại để được 1 mẫu đặc trưng. Mẫu được bảo quản lạnh, không được để ánh sáng tiếp xúc trực tiếp với mẫu và vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm để phân tích.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Phân lập các mẫu dựa trên phương pháp phân lập của Egorow [7].

2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn

Xác định các đặc điểm về hình thái, phản ứng sinh hóa, kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản: Nhuộm Gram, tính di động, catalase, oxidase, khả năng sử dụng đường trong điều kiện hiếu khí và yếm khí (O/F), dựa theo phương pháp của Frerichs và Millar [8] và Buller [9]. Đồng thời, sử dụng bộ kít API 20E (BioMerieux) để định danh đến loài vi khuẩn.

2.4. Phương pháp giữ giống vi khuẩn Egorow

Để bảo quản chủng giống vi sinh vật cho những nghiên cứu tiếp theo, vi khuẩn được cấy lại định kì trên môi trường thạch nghiêng có cùng môi trường để tủ ấm ở 35^0C – 39^0C trong 2 - 3 ngày. Sau đó bảo quản trong tủ lạnh ở 4^0C, cấy chuyền định kì để giữ giống.

2.5. Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn

Tổng số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa thích hợp đối với mỗi loại vi khuẩn.

$$\frac{CFU}{g} = \frac{Số\ khuẩn\ lạc\ (CFU) x\ Độ\ pha\ loãng}{Thể\ tích\ mẫu\ (ml)}$$

2.6. Phương pháp xác định khả năng sinh hoạt tính enzyme protease, cellulase và amylase của vi sinh vật

Xác định khả năng sinh hoạt tính enzyme protease, cellulase của vi sinh vật bằng phương pháp đục lỗ thạch [7].

2.7. Phương pháp xác định thời gian sinh trưởng của vi khuẩn

Xác định đường cong sinh trưởng của vi sinh vật tuyển chọn bằng phương pháp nuôi cấy tĩnh và đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa [10].

2.8. Phương pháp kháng sinh đồ

Phương pháp lập kháng sinh đồ được thực hiện theo tiêu chuẩn của The Clinical và Laboratory Standards Institute (CLSI 2006) [11], sử dụng môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck, Darmstadt, Germany) với 2 loại kháng sinh Ciprofloxacin, Ceftazidime (Bio-rad, Marnes-la-Coquettle, France). Ủ 24 – 48 giờ ở 28 – 30^0C, sinh khối khoảng 10^8 CFU/mL.

Đo đường kính vô trùng (mm) theo tiêu chuẩn của Clinical và Laboratory [11], nhằm xác định loại kháng sinh nhạy, trung bình và kháng. Độ nhạy của vi khuẩn đối với 2 loại kháng sinh ceftazidime và ciprofloxacin được quy định theo bảng 1:

Bảng 1. *Xác định độ nhạy của vi khuẩn đối với ceftazidime và ciprofloxacin theo đường kính vòng vô trùng (CLSI 2006)*

Kháng sinh	Vòng vô trùng (mm)		
	Nhạy	*Kháng trung bình*	*Kháng*
Ceftazidime	≥19	17 – 18	≤16
Ciprofloxacin	≥21	15 – 20	≤14

2.9. Phương pháp xử lí số liệu

Tất cả các số liệu đều được lặp lại với 3 mẫu. Phân tích hồi quy đơn biến (ANOVA) (phần mềm SPSS phiên bản 22) được sử dụng để nhận biết sự khác biệt về mọi thông số giữa các mẫu được xử lý thuốc trừ sâu và mẫu đối chứng($\propto = 0{,}05$). Nếu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 95% ($p \leq 0{,}05$) thì phép phân tích hậu định Tukey được sử dụng để nhận biết nồng độ xử lý nào có tác động mang ý nghĩa thống kê đến các thông số.

2.10. Thiết kế thí nghiệm thử nghiệm ảnh hưởng của cypermethrin lên vi khuẩn được phân lập

Vi khuẩn được nuôi trong các lọ chứa môi trường NB lỏng, với nồng độ thuốc thử nghiệm cuối cùng tương đương với nồng độ cypermethrin hiện diện trong môi trường nước mặt đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đây (0,11µg/L) [12] và cao hơn nồng độ đó từ 10 – 100 lần để mô phỏng nồng độ trong nước thải hoặc trong trường hợp sử dụng thuốc trừ sâu với số lượng lớn hơn nhiều và không được kiểm soát chặt chẽ (gồm 0,25; 2,5 và 25µg/L). Nuôi lắc đều trên máy lắc (200 vòng/phút) cứ sau 48h mẫu vi khuẩn ở mỗi lọ được lấy ra để xác định hoạt độ enzyme theo phương pháp đục lỗ thạch, xác định mật độ sống theo phương pháp xác định tổng số vi khuẩn và được cấy chuyền qua 2 đợt nữa trong môi trường giống môi trường ban đầu để tiến hành xác định hoạt độ enzyme, mật độ sống theo thời gian.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả mật độ sống của vi khuẩn khi nuôi cấy với cypermethrin ở các nồng độ khác nhau

Từ mẫu nước mặt đã phân lập và định danh được 7 chủng vi khuẩn. Thử nghiệm sinh hóa cùng với sử dụng bộ test API đã định danh được 7 chủng này, gồm *E.coli*,

Pseudomonas sp., *Klebsiella pneumoniae, Burkholderia pseudomallei, Vibrio vulnificus, Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis*. Tác giả đã lựa chọn 2 trong số 7 chủng vi khuẩn do tính phổ biến trong sử dụng để nghiên cứu là *E.coli* và *Pseudomonas* sp.

Kết quả đếm CFU của hai loài vi khuẩn trong các mẫu đối chứng và các mẫu xử lý với thuốc trừ sâu cypermethrin ở các nồng độ khác nhau qua 3 đợt cấy chuyền được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. *Mật độ sống của vi khuẩn sau 3 đợt cấy chuyền trong môi trường chứa thuốc trừ sâu cypermethrin ở các nồng độ khác nhau*

Vi khuẩn	Thời gian	Nồng độ thuốc trừ sâu (µg/L)			
		Số lượng vi khuẩn*10^8±SE (CFU/mL)			
		Đối chứng	0,25	2,5	25
E. coli	Sau 48h đợt 1	167,30 ±5,24	165,00 ±2,65	166,30 ±3,84	166,00 ±3,79
	Sau 48h đợt 2	167,00 ±6,66	163,67 ±4,80	162,30 ±4,84	165,00 ±4,36
	Sau 48h đợt 3	168,30 ±2,90	162,00 ±3,46	162,00 ±5,36	165,00 ±4,73
Pseudomonas sp.	Sau 48h đợt 1	153,30 ±3,48	154,67 ±3,48	151,67 ±1,86	153,67 ±3,53
	Sau 48h đợt 2	154,67 ±3,53	152,00 ±3,22	154,00 ±4,04	155,30 ±7,10
	Sau 48h đợt 3	154,00 ±3,60	155,30 ±1,80	154,67 ±5,24	155,30 ±3,84

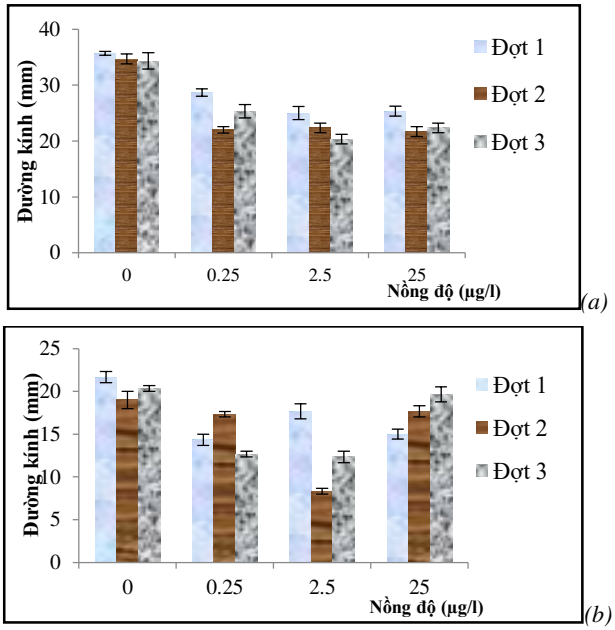
Về khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn qua các nồng độ ở cả 3 đợt sau 6 ngày tiếp xúc với thuốc, số lượng CFU/ml của *E.coli* nằm trong pha cân bằng ở các nồng độ 0,25 µg/L; 2,5µg/L, 25 µg/L đều không có sự khác nhau so với đối chứng. Cụ thể, đợt 1 số lượng CFU/ml dao động từ 165,0±2,7 đến 166,3±3,8 CFU/ml, so với mẫu đối chứng (167,3±5,2) không có sự khác biệt rõ rệt (p-value>0,05). Ở đợt 2, số lượng CFU/ml thấp nhất ở nồng độ 2,5 µg/L là 162,3±4,8 nhưng so với mẫu đối chứng 167,0±6,7CFU/ml vẫn không có sự khác nhau. Trong đợt 3, cũng tương tự ở 2 đợt trước số lượng CFU/ml ở các nồng độ thuốc dao động từ 162,0±3,5 đến 165,0±4,7 CFU/ml, tuy nhiên vẫn không khác biệt so với mẫu đối chứng 168,3±2,9 CFU/ml.

Đối với *Psedomonas* sp., số lượng vi khuẩn sau 3 đợt cấy chuyền tiếp xúc với thuốc trừ sâu Cypermethrin, tuy có số lượng sinh trưởng ở pha cân bằng thấp hơn so với số lượng sinh trưởng của *E.coli,* tuy nhiên cũng không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng. Ở đợt 1, số lượng vi khuẩn dao động từ 151,7±1,9 đến 154,7±3,5CFU/ml, so với mẫu đối chứng 153,3±3,5 CFU/ml không có sự khác biệt (p>0,05). Tương tự, ở đợt 2 và đợt 3 số lượng vi khuẩn trong pha cân bằng vẫn không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng sinh hoạt tính enzyme cellulase và protease của vi khuẩn sau khi cấy chuyền trong môi trường chứa cypermethrin

3.2.1. Tác động lên enzyme cellulase

Kết quả phân tích cho thấy, theo nồng độ thuốc và thời gian tiếp xúc lâu dài với cypermethrin thì khả năng sinh tổng hợp *cellulase* của *E.coli* có sự chênh lệch so với mẫu đối chứng ở cả 3 đợt nuôi cấy, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (p<0,0001). Cụ thể, đối với đợt 1, giá trị trung bình theo nồng độ của hoạt tính *cellulase* so với mẫu đối chứng (35,67 ± 0,30) có sự thay đổi khác nhau theo nồng độ 0,25 µg/L, 2,5 µg/L, 25 µg/L lần lượt là 28,67 ± 0,60 (mm) (p=0,001); 25,00± 1,15 (mm) (p<0,0001) và 25,30 ± 0,88 (mm) (p<0,0001). Đối với đợt 2, giá trị trung bình của hoạt tính *cellulase* ở các nồng độ thấp hơn so với mẫu đối chứng (34,67 ± 0,88 mm) dao động từ 22,00 ± 0,60 mm, 22,33± 0,88 mm đến 21,67 ± 0,88 mm (tất cả giá trị p< 0,0001). Đối với đợt 3, hoạt tính *cellulase* có sự giảm đáng kể so với đối chứng (34,33 ± 1,45 mm), giá trị trung bình theo nồng độ lần lượt là 25,33 ± 1,20 mm (p=0,002); 20,33 ± 0,88 mm (p<0,0001) và 22,33 ± 0,88 mm (p<0,0001).

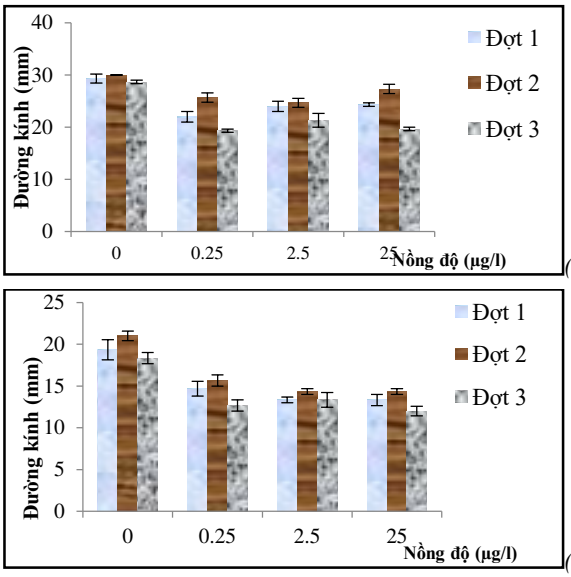


Hình 1. *Sự thay đổi hoạt độ enzyme cellulase của E.coli (a) và Pseudomonas* sp. *(b) qua 3 đợt cấy chuyền trong môi trường chứa thuốc trừ sâu cypermathrin (Số liệu biểu diễn trị số trung bình của 3 mẫu với giá trị SE)*

Sau 6 ngày tiếp xúc với cypermethrin theo từng nồng độ, cho thấy ở ngày cuối cùng hoạt tính enzyme *cenllulase* của *E. coli* đều thấp hơn so với đợt đầu tiên khi nuôi cấy. Đối với *E. coli* khi cấy chuyền ở nồng độ thuốc là 2,5µg/l thì khả năng sinh hoạt tính enzyme *cellulase* giảm dần theo thời gian nuôi cấy từ đợt 1 đến đợt 3 (25,00 ± 1,15 - 20,33 ± 0,88 mm). Ở cả 3 đợt không có sự khác biệt giữa các nồng độ xử lý.

Đối với *Pseudomonas* sp., phân tích ANOVA cho thấy kết quả hoạt tính *cellulase* dưới tác động của cypermethrin ở cả 3 đợt đều có sự khác biệt mang ý nghĩa (p đều < 0,001). Đợt 1, hoạt độ *cellulase* tại các nồng độ 0,25; 2,5 và 25µg/L đều thấp hơn và có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng (với p tương ứng là <0,0001; 0,017; 0,001); Đợt 2 kết quả cho thấy, sự khác biệt xảy ra ở nồng độ 2,5µg/L (p<0,0001) còn ở 0,25 và 25µg/L không làm thay đổi hoạt độ của enzyme (p tương ứng = 0,329 và 0,501). Đợt 3, nồng độ cao nhất của cypermethrin không làm ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme (p=0,860) trong khi 0,25 và 2,5µg/L làm giảm so với đối chứng (p<0,0001).

3.2.2. Tác động lên enzyme protease



Hình 2. *Sự thay đổi hoạt độ enzyme protease của E.coli (a) và Pseudomonas sp. (b) qua 3 đợt cấy chuyền trong môi trường chứa thuốc trừ sâu cypermethrin*
(Số liệu biểu diễn trị số trung bình của 3 mẫu với giá trị SE)

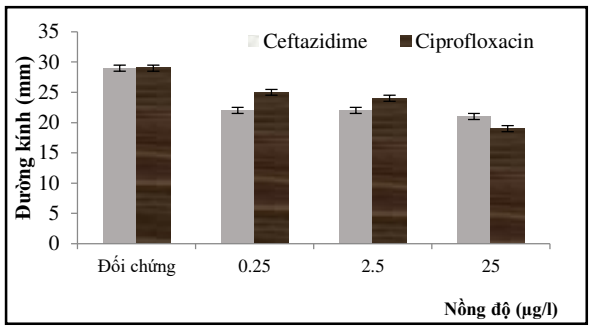
Kết quả *E.coli* sau khi nuôi cấy với cypermethrin ở các nồng độ khác nhau có hoạt tính enzyme *protease* có chênh lệch so với mẫu đối chứng. Ở đợt 1 sau 2 ngày tiếp xúc với thuốc, hoạt độ *protease* của *E.coli* tại các nồng độ 0,25; 2,5 và 25µg/L lần lượt là 22,0±1,0 (mm); 24,0±1,0 (mm); 24,3±0.3 (mm) đều thấp hơn và có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng 29,33±0,88 (với p tương ứng = 0,001; 0,009; 0,013). Sau 4 ngày tiếp xúc với thuốc ở đợt 2 giá trị hoạt độ enzyme *protease* của *E.coli* cũng thấp hơn và có sự khác biệt giữa các nồng độ thử nghiệm 0,25; 2,5 lần lượt là 25,67±0,88; 24,67±0,88 (p tương ứng = 0,016; 0,005), ngoại trừ tại 25 µg/L giảm nhưng không mang ý nghĩa thống kê (p=0,14) so với ở nồng độ đối chứng. Sau 6 ngày nuôi cấy trong thuốc ở đợt 3, hoạt độ *protease* tương ứng cũng như hai đợt trước (19,67±0,30; 21,30±1,30; 19,67±0,30) đều thấp hơn so với mẫu đối chứng (28,67±0,30) (p<0,0001).

Các nồng độ xử lý cypermethrin gây tác động mạnh mẽ đến hoạt độ enzyme protease của *Pseudomonas* sp. ở cả 3 đợt (p tương ứng = 0,003; < 0,0001; 0,001). Đợt 1, hoạt độ enzyme ở các nồng độ 0,25; 2,5; 25µg/L giảm so với đối chứng (p tương ứng = 0,018; 0,004; 0,004). Tương tự ở đợt 2, các giá trị này giảm so với đối chứng với tất cả giá trị p<0,0001 và ở đợt 3 (p=0,002; 0,005; 0,001).

3.3. Kết quả về sự thay đổi độ nhạy với kháng sinh ở vi khuẩn E. coli và Pseudomonas sp. *sau khi tiếp xúc với cypermethrin*

3.3.1. Độ nhạy của vi khuẩn E. coli với các loại kháng sinh

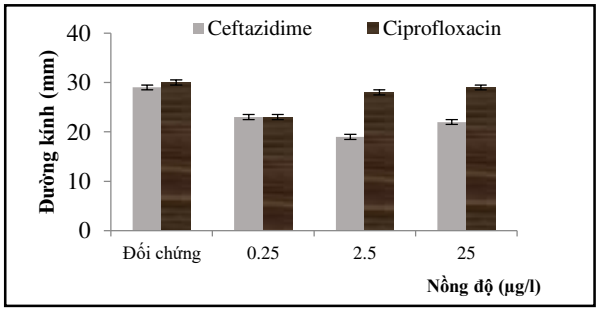
Kết quả kháng sinh đồ *E.coli* sau khi nuôi trong môi trường có cypermethrin với các loại kháng sinh ceftazidime và ciprofloxacin cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn đối với *E.coli* ở các nồng độ thuốc 0,25; 2,5; 25 µg/l đều thấp hơn so với đường kính vòng kháng khuẩn của mẫu đối chứng (29,0±0,5mm) (ANOVA, p<0,0001, Hình 3). Đối với ceftazidime, phân tích Tukey cho thấy sự giảm có ý nghĩa thống kê xảy ra ở cả 3 nồng độ tương ứng theo từng nồng độ là 22,0±0,5mm; 22,0±0,5mm; 21,0±0,5mm (p đều <0,0001). Tương tự, đối với ciprofloxacin, vi khuẩn *E. coli* sau khi tiếp xúc với 3 nồng độ xử lý của thuốc trừ sâu thì giá trị các vòng kháng khuẩn giảm tương ứng là 25,0±0,5mm (p=0,002); 24,0±0,5mm (p=0,0023) 19,0±0,5mm (p<0,0001).



Hình 3. *Biểu đồ thể hiện sự thay đổi đường kính vòng kháng khuẩn của E.coli sau khi được nuôi trong môi trường chứa cypermethrin với các loại thuốc kháng sinh*

3.3.2. Độ nhạy của vi khuẩn Pseudomonas sp. *với các loại kháng sinh*

Đối với *Pseudomonas* sp. sau khi nuôi trong môi trường có cypermethrin, kết quả kháng sinh đồ cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn kháng sinh đối với *Pseudomonas* sp. ở các nồng độ thuốc 0,25; 2,5; 25 µg/l thì đều nhỏ hơn so với đường kính vòng kháng khuẩn của mẫu đối chứng (Hình 4).



Hình 4. *Sự thay đổi đường kính vòng kháng khuẩn của Pseudomonas.sp sau khi được nuôi trong môi trường chứa cypermethrin với các loại thuốc kháng sinh*

Phân tích ANOVA cho thấy, *Pseudomonas* sp. sau khi tiếp xúc với cypermethrin thì độ nhạy với 2 kháng sinh ceftazidime và ciprofloxacin đều giảm (p<0,0001 và p=0,015 tương ứng). Các phân tích Tukey chỉ ra rằng, sự khác biệt này là ở cả 3 nồng độ xử lý đối với trường hợp kháng sinh ceftazidime, đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 23,0±0,5mm; 19,0±0,5mm; 22,0±0,5mm (p đều <0,0001), so với của mẫu đối chứng (29,0±0,5mm). Đối với ciprofloxacin, sự khác biệt chỉ có ở nồng độ 0,25 và 2,5 với các giá trị tương ứng 23,0±0,5mm (p<0,0001); 28,0±0,5mm (p=0,0035), ở 25µg/L không có sự khác biệt với giá trị là 29,0±0,5mm (p=0,081), so với mẫu đối chứng 30,0±0,5mm.

4. Bàn luận

4.1. Tiếp xúc với thuốc trừ sâu cypermethrin ở nồng độ thấp từ 0,25 – 25µg/L không ảnh hưởng đến mật độ tế bào sống của vi khuẩn được phân lập

Qua 3 đợt nuôi cấy *E.coli* và *Pseudomonas* sp. trong môi trường với các nồng độ cypermethrin khác nhau, mô

phỏng sự tiếp xúc thường xuyên qua nhiều thế hệ vi sinh vật với thuốc có mặt trong môi trường tự nhiên thì mật độ sống của cả hai chủng vi khuẩn đều không sự thay đổi so với mẫu đối chứng. Điều này cho thấy, với cypermethrin được thử nghiệm ở nồng độ thấp thì không ảnh hưởng đến mật độ sống của vi khuẩn được nghiên cứu, phù hợp với kết quả nghiên cứu của Binner và cs. [13] rằng cypermethrin không ảnh hưởng đến số lượng sống của vi khuẩn trong đất. Tuy nhiên, khác với nghiên cứu của Ahmed và Ahmad [14] về ảnh hưởng của nhóm cúc tổng hợp đối với vi khuẩn trong đất thì sau 14 ngày thử nghiệm với cypermethrin ở nồng độ từ 125-1000 mg/l đã cho thấy, cypermethrin đã có tác động tiêu cực đến số lượng vi khuẩn nhưng với độ chênh lệch thấp. Lý do dẫn đến kết quả khác nhau này có thể do sự khác biệt về nồng độ xử lý, với nghiên cứu trên nồng độ gây giảm số lượng vi khuẩn cao gấp hàng nghìn lần so với nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của López và cs. [15] lại cho ra kết quả số lượng vi khuẩn dị dưỡng ưa ấm và ưa lạnh tăng sau tiếp xúc với các loại thuốc trừ sâu lindane, dimetoate, methidathion và methyl-parathion, trong khi giảm đối với nhóm vi khuẩn chuyển hoá photphat. Sự khác biệt về kết quả là do khác biệt về loài vi sinh vật nghiên cứu, loại thuốc trừ sâu và nồng độ các loại thuốc sử dụng là 50µg/l, cao gấp hai lần so với nghiên cứu của nhóm tác giả.

4.2. Tiếp xúc với thuốc trừ sâu cypermethrin ở nồng độ thấp từ 0,25 – 25µg/l tác động đến hoạt tính enzyme cellulase và protease của vi khuẩn E. coli và Pseudomonas sp.

Sau 3 đợt cấy chuyền trong môi trường có thuốc trừ sâu cypermethrin đã cho thấy, chỉ ở nồng độ thấp (0,25 – 25µg/L) nhưng cypermethrin vẫn tác động làm giảm hoạt tính enzyme của vi khuẩn. Một số nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của thuốc trừ sâu đến hoạt tính enzyme đã được nghiên cứu như sự kích thích hoạt động của enzyme phosphatase trong vi khuẩn do thuốc diệt cỏ như paraquat, trifluralin, glyphosate và atrazine [16]. Ngược lại, một số loại thuốc diệt cỏ khác như fluchloralin, metoxuron, 2,4-D và isoproturon đã được báo cáo về sự làm giảm hoạt tính phosphatase của các vi khuẩn [17]. Thuốc diệt nấm Mancozeb đã được báo cáo làm tăng hoạt động của phosphatase kiềm, protease và amidase trong khi giảm urease và asparaginase [18]. Sự kích thích hoạt động của protease đã được báo cáo trong đất tự nhiên được xử lí bằng linuron ở mức 10mg/kg trong khi đó, cartap-HCl 100 mg/kg ức chế vĩnh viễn nó [19]. Đối với vi khuẩn, trong quá trình sinh trưởng và phát triển thì hệ enzyme đóng vai trò rất quan trọng trong việc chuyển hóa các chất trong môi trường thành năng lượng, chất dinh dưỡng cho tế bào vi khuẩn. Hơn nữa, các enzyme *cellulase và protease* là những enzyme thủy phân trong môi trường nước, giúp vi khuẩn có thể phân giải các hợp chất hữu cơ [20]. Sự ảnh hưởng và làm giảm hoạt tính của hệ enzyme sẽ làm chậm các quá trình phân giải các chất hữu cơ trong môi trường nước, từ đó gây ảnh hưởng đến quá trình điều tiết và làm sạch môi trường nước của vi khuẩn.

4.3. Tiếp xúc với thuốc trừ sâu cypermethrin ở nồng độ thấp từ 0,25 – 25µg/L làm giảm độ nhạy với kháng sinh ceftazidime và ciprofloxacin của vi khuẩn được phân lập

Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn sau khi nuôi lâu dài trong môi trường chứa cypermethrin chỉ với nồng độ thấp thì độ nhạy với các loại thuốc kháng sinh như ceftazidime và ciprofloxacin giảm đi. Điều này cho thấy, cypermethrin đã tác động đến quá trình sinh trưởng từ đó làm giảm độ nhạy với kháng sinh của vi khuẩn. Mặc dù, chỉ với nồng độ cypermethrin rất thấp và tồn tại khoảng 6 ngày trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn nhưng cypermethrin đã tác động và dẫn đến sự giảm đáng kể với độ nhạy của vi khuẩn với các loại thuốc kháng sinh phổ biến trong thị trường. Đối với kháng sinh ceftazidime, độ nhạy của cả 2 loại vi khuẩn tuy đều giảm so với đối chứng, nhưng vẫn còn nằm trong mức nhạy cảm theo quy định tiêu chuẩn. Tuy nhiên, ở *E. coli* mức giảm độ nhạy cảm với ceftazidime ở các nồng độ xử lý là tương đương trong khi ở *Pseudomonas* sp. thì ở nồng độ 2,5µg/L có sự giảm mạnh nhất với độ nhạy nằm ở ngưỡng thấp nhất theo tiêu chuẩn (19mm). Đối với ciprofloxacin, độ nhạy vi khuẩn *E.coli* giảm nhưng vẫn nằm trong giới hạn nhạy cảm, ở nồng độ xử lý của cypermethrin 0,25µg/L và 2,5µg/L, trong khi ở nồng độ cao nhất 25µg/L đã gây kháng thuốc mức trung bình. Ngược lại, ở *Pseudomonas* sp. nồng độ cao nhất của cypermethrin không gây tác động đến độ nhạy cảm với ciprofloxacin nhưng ở 2 nồng độ xử lý thấp hơn làm giảm độ nhạy tuy vẫn nằm trong khoảng nhạy cảm.

Sự giảm độ nhạy với 2 loại thuốc kháng sinh như trên có thể dẫn đến nguy cơ làm xuất hiện hiện tượng kháng kháng sinh do ô nhiễm thuốc trừ sâu lâu dài và lan truyền các gen kháng kháng sinh của vi khuẩn trong môi trường. Kết quả này cũng thống nhất với một nghiên cứu của Kurenbach và cộng sự [21], rằng việc tiếp xúc với glyphosate và hai loại thuốc diệt cỏ phổ biến khác là 2,4-D và dicamba đã làm thay đổi độ nhạy của vi khuẩn đối với một số kháng sinh, bao gồm ampicillin, ciprofloxacin và các loại thuốc tetracycline. Điều này được giải thích rằng, những chất diệt cỏ này không phải là "siêu độc" đối với vi khuẩn mà theo nghiên cứu với *E. Coli* và *Salmonella* thì chúng không bị giết chết ngay ở mức thường được sử dụng để diệt cỏ dại. Thay vào đó, các vi khuẩn sống sót sẽ kích hoạt các protein để loại các độc tố. Và cơ chế bảo vệ này có thể làm cho vi khuẩn phát triển sức đề kháng với kháng sinh [21].

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng, việc tiếp xúc lâu dài với thuốc trừ sâu cypermethrin ở nồng độ thấp, tương đương với nồng độ có mặt trong môi trường tự nhiên (0,25 – 25µg/L) đã gây tác động đến các thông số có liên quan đến sinh thái môi trường, mặc dù không gây tác động đến sự sinh trưởng của các loài vi sinh vật được phân lập. Cụ thể, sau 6 ngày tiếp xúc với cypermethrin đã làm giảm hoạt tính của enzyme cellulose và protease, cũng như giảm độ nhạy với kháng sinh ceftazidime và ciprofloxacin của vi khuẩn *E. coli* và *Pseudomonas* sp. phân lập từ hồ 29/3. Đặc biệt tiếp xúc với cypermethrin trong 6 ngày ở nồng độ 25µg/L đã gây kháng kháng sinh ciprofloxacin mức trung bình ở *E. coli*. Trong khi đó mật độ sống của các loài vi khuẩn này không bị thay đổi dưới tác động của cypermethrin ở các nồng độ nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Neumann, R. Schulz, K. Schäfer, W. Müller, W. Mannheller and M. Liess, "The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams," *Water Research*, Vol. 36, No. 4, pp.835-842, 2002.

[2] G. A. Burton Jr, "Assessing the toxicity of freshwater sediments," *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, Vol.10, No. 12, pp.1585-1627, 1991.

[3] E. P. D. B. Ferreira, A. N. Dusi, J. R. Costa, G. R. Xavier and N. G. Rumjanek, "Assessing insecticide and fungicide effects on the culturable soil bacterial community by analyses of variance of their DGGE fingerprinting data," *European Journal of Soil Biology*, Vol. 45, No. 5-6, pp. 466-472, 2009.

[4] E. Jastrzebska, "The effect of crop protection chemicals on soil-dwelling microorganisms," in *Contemporary Problems Management and Environmental Protection – Influence of Pesticide Dump on the Environment*, ed. by K.A. Skibniewska. Olsztyn: University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 2010, pp. 43-53.

[5] G. Imfeld and S. Vuilleumier, "Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review," *European Journal of Soil Biology*, Vol. 49*,* pp.22-30, 2012.

[6] H. Li, EY. Zeng and J. You, "Mitigating pesticide pollution in China requires law enforcement, farmer training and technological innovation," *Environ Toxicol Chem,* Vol. 33, pp.963–971, 2014.

[7] N. L. Dũng và cộng sự, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập 2*, Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục, 1983.

[8] Frerichs, G. N., *Isolation and identification of fish bacterial pathogens*, Scotland: Institute of Aquaculture, University of Stirling, 1984, pp. 107.

[9] Buller, N. B., *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*, UK: Cabi publishing, 2004, pp. 353.

[10] N. L. Dũng, B. T. V. Hà, *Sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật*, Hà Nội: Nhà xuất bản giáo dục, 2009.

[11] CLSI., *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard*, 16th edition, Vol 28, No. 8, M31-A3, Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp.1-37, 2006.

[12] S. Bhattacharjee, A. N. M. Fakhruddin, M. A. Z. Chowdhury, M. A. Rahman and M. K. Alam, "Monitoring of selected pesticides residue levels in water samples of paddy fields and removal of cypermethrin and chlorpyrifos residues from water using rice bran," *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, Vol. 89*,* No. 2, pp.348-353, 2012.

[13] R. Binner, K. H. Berendes, D. Felgentreu, H. Friesland and M. Glitschka, "Cypermethrin in bark and coniferous forest soil after pesticide treatment of single specimen of barked round wood in forests: persistence, distribution of diastereomers and effects on soil microorganisms," *Nachrichtenblatt-des-Deutschen-Pflanzenschutzdienstes*, Vol. 51, No. 9, pp.227-237, 1999.

[14] S. Ahmed and M.S. Ahmad, "Effect of insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions," *Pak. Entomol*., Vol. 28, No. 2, pp.63-68, 2006.

[15] L. López, C. Pozo, B. Rodelas, C. Calvo and J. Gonzalez-Lopez, "Influence of pesticides and herbicides presence on phosphatase activity and selected bacterial microbiota of a natural lake system," *Ecotoxicology*, Vol. *15, No.* 5, pp.487-493, 2006.

[16] H. A. D. And and M. P. Greaves, "Effects of some herbicides on soil enzyme activities," *Weed Research*, Vol. 21, No. 5, pp.205-209, 1981.

[17] J. C. Tarafdar and A. V. Rao, "Effect of different herbicides on enzyme activity in controlling weeds in wheat crop," *Pesticides*, Vol. 20*,* pp.46-49, 1986.

[18] N. Rasool and Z. A. Reshi, "Effect of the fungicide Mancozeb at different application rates on enzyme activities in a silt loam soil of the Kashmir Himalaya, India," *Tropical Ecology*, Vol. 51, No. 2, pp.199, 2010.

[19] T. Endo, T. Kusaka, N. Tan and M. Sakai, "Effects of the insecticide Cartap Hydrochloride on soil enzyme activities, respiration and nitrification," *Journal of Pesticide Science*, Vol. 7, No. 2, pp.101–110, 1982.

[20] R. J. Chróst and W. Siuda, *Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems.* New York: Marcel Dekker, Inc., 2002, pp. 35-72.

[21] B. Kurenbach, D. Marjoshi, C. F. Amábile-Cuevas, G. C. Ferguson, W. Godsoe, P. Gibson and J. A. Heinemann, "Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides Dicamba, 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, and Glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium*," *MBio*, Vol. 6, No. 2, pp.e00009-15, 2015.

(BBT nhận bài: 15/02/2019, hoàn tất thủ tục phản biện: 10/01/2020)