

土壤中嘉磷塞分解菌之分離與應用

陳淑娟、陳麗淑、羅致述*
農委會農業藥物毒物試驗所

一、 中文摘要

添加嘉磷塞 6720 ppm 之農業試驗場空白土壤，經 2 個月後（57 天）嘉磷塞殘留量為 1323.5 ppm（19.7 %），土壤 pH 值介於 5.6 ~ 6.7 之間。添加嘉磷塞於第 8 天後對微生物相有影響，此影響在第 57 天後仍持續。試驗田空白土壤經添加嘉磷塞後篩選到 4 株分離株，但都無法利生嘉磷塞生長。另取試驗農場土壤加入礦物鹽培養基（Mineral salts medium, MSM, 含不同濃度嘉磷塞）經 6 天 35 °C 培養後，篩選到 6 株分離株，目前正進行嘉磷塞之分解試驗。未來將嘗試利用這些分解菌在土壤復育及禽畜廢水之應用。

關鍵字：嘉磷塞，變性凝膠梯度電泳，細菌族群

Keyword: glyphosate, denatured gradient gel electrophoresis (DGGE), bacterial communities

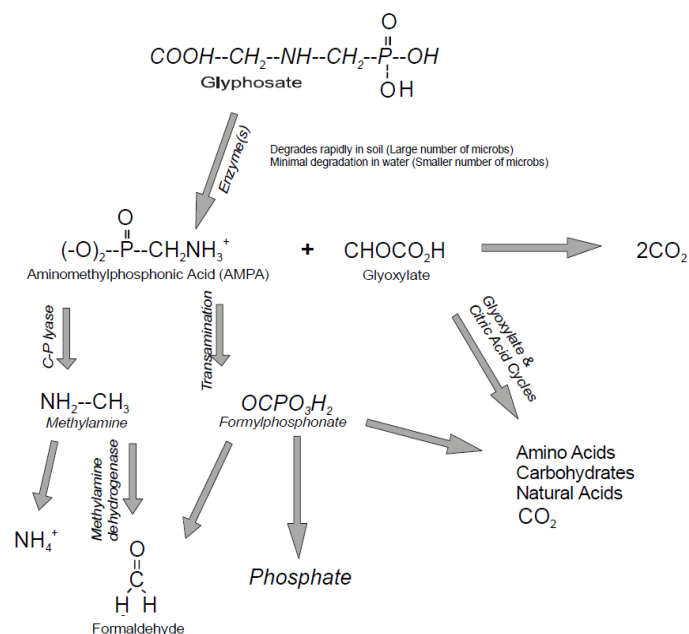
二、 前言

嘉磷塞 (glyphosate) 係於 1971 年由 Monsanto 公司所推出的非選擇性萌後除草劑，可用來防除一年生禾草、莎草、闊葉草及多年生雜草，對一年生禾本科雜草之效果特別好，由於此藥劑於雜草防除具上廣效性、價格低廉及對哺乳類動物低毒性的特質，使之成為全球使用最多之非選擇性除草劑。

嘉磷塞在環境中的半衰期範圍約在 1 至 174 天 (Wauchope *et al.*, 1992)，在土壤主要是由土壤微生物進行分解（圖一）。嘉磷塞分解最後都會分解成 CO₂、NH₄⁺、phosphate、formaldehyde 等 (Schuette, 1998)。一般認為嘉磷塞在環境中可快速分解，土壤中的殘留量低，對植物不會造成傷害，但也有報告顯示土壤中殘留的嘉磷塞會對作物造成傷害 (Eberbach, 1999; Bott *et al.*, 2012)。

嘉磷塞經 40 年的大量使用，被土壤吸附的量有可能對農地的傷害將日益明顯。因此收集土壤復育菌以減少嘉磷塞對環境的影響，為近年來環保的重要方向。Fan 等人 (2012) 經由增量方法自土壤中篩得嘉磷塞分解菌 *Bacillus*

cereus CB4，可分解嘉磷塞濃度到達 12 g/L (1.2×10^4 ppm)，利用率至 94.47 %。Hadi 等人 (2013) 發現 *Ochrobactrum* sp. (GDOS) 可在 60 小時內分解完 3 mM (507.6 ppm) 之嘉磷塞。Benslama 和 Boulahrouf (2013) 自土壤中分離到 *Pseudomonas putida* Arph1 可耐嘉磷塞至 9g/L (9.0×10^3 ppm)，在 MM 培養基中可利用嘉磷塞最大量為 1g/L (1.0×10^3 ppm)。Kryuchkova 等人 (2014) 發現自根圈中得到 5 株嘉磷塞分解菌，同時具有固氮、溶磷及產生植物生長激素等益生菌特性，其中更有一株 *Enterobacter cloacae* K7 除可利用嘉磷塞 (5 mM, 846 ppm)，還可直接利用嘉磷塞做為磷源，為具商業價值之土壤復育菌。因此本研究將利用高濃度嘉磷塞協助進行分解菌之篩檢。



圖一、嘉磷塞 (Glyphosate) 於土壤中之分解途徑 (Schuette, 1998)。
Fig. 1. The glyphosate degradation pathway in soil.

三、材料與方法

(一) 土壤

採自本所試驗場農場空白土壤及試驗土壤，取土深度約為 10~20 公分。

(二) 嘉磷塞來源

1. 年年春：41 %嘉磷塞異丙胺鹽水溶液，億豐農化。
2. 嘉磷塞原體：96 %，Aldrich。

3. 嘉磷塞貯存液：精確稱取已知純度之嘉磷塞原體 500 mg (96 %，精確至 0.1 mg)，置於 50 mL 定量瓶中，加入 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液，於 60 °C 下，以超音波振盪至完全溶解後，回至室溫，以 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液定容至刻度，相當於 9.6 mg/mL (9600 ppm) 貯存標準液。

(三) 培養基配製

1. 最低營養需求培養基 (minimal medium, MM)：配方為 15 g/L agar 經高溫高壓滅菌後，再加 2% 預先滅菌之 50 × Vogel-Bonner salts (VB salt) 及 5 % 之 40 % glucose，倒平板備用。
2. 礦物鹽培養基 (Mineral salts medium, MSM)：配方為 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L， $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L， K_2HPO_4 0.625 g/L，pH 7.0。

(四) 土壤處理

取風乾過篩後之土壤 300 g，取約 12 g 先進行空白分析 (HPLC)，土壤 DNA 萃取及微生物培養，其餘 288 g 土壤置於 500 ml 燒杯中，加入成品溶液，混合均勻，使最終土壤含水量為 30%，嘉磷塞濃度為 6720 ppm ($\mu\text{g/mL}$)。於 30 °C 下暗培養 56 天，每 7 天取樣一次進行嘉磷塞殘留分析，土壤 DNA 抽取，微生物調查與土壤 pH 值測定。

(五) 嘉磷塞分析

1. HPLC 分析方法：HPLC 檢驗方法參照本所公告之「嘉磷塞 (Glyphosate) 檢驗法 C1-0069-1.0」，使用管柱為陰離子交換層析管柱，4.6 mm × 250 mm (i.d. × L)，Partisil 10 μm SAX；保護管柱為 Supelcosil SAX1 Supelguard Cartridge 5 μm particle size, 4.0 mm × 2 cm (i.d. × L)；動相為 0.05 M 磷酸氫二鉀緩衝液 (以磷酸調整 pH 至 2.0)，流速 1.0 mL/min，樣品注入量 20 μl ；檢出器為 Varian ProStar 335 photodiode array detector，波長 195 nm；分析溫度為室溫。
2. 溶劑配製：0.05 M 磷酸氫二鉀緩衝液，稱取磷酸二氫鉀 6.8 g 溶於去離子水 1 L，再以磷酸調整 pH 值至 2。
3. 標準品配製：
 - (1) 貯存標準液：精確稱取 96 % 嘉磷塞分析級標準品 500 mg (精確至 0.1 mg)，置於 50 mL 定量瓶中，加入 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH

2.0 緩衝液，於 60 °C 下，以超音波振盪至完全溶解後，回至室溫，以 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液定容至刻度，相當於 9.6 mg/mL (96000 ppm) 貯存標準液。

(2)操作標準液 (Working standard solution): 取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 之嘉磷塞貯存標準液，分別置於 10 mL 定量瓶中，以 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液稀釋定容至刻度，使成 960、1440、1920、2400、2880 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) 之嘉磷塞操作標準液。標準液分別以 0.45 μm 濾膜過濾後，分別取 20 μl 注入液相層析儀求得檢量線。

4. 固相萃取: LiChrolut EN 固相萃取管 3 ml (200 mg)，購自德國 Merck 公司。固相萃取管柱以 10 mL 甲醇流洗 1 次，再接著以 10 mL 二次去離子水流洗 1 次後，取 10 mL 萃取液以 10 mL/min 的流速流經固相萃取管柱後，收集沖提液。

5. 市售商品分析: 將年年春充分混合後，稱取年年春一定量置於 10 mL 定量瓶中，加入 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液定容至刻度，混合均勻 (最後濃度約 2000 $\mu\text{g/mL}$)，並分別以 0.45 μm 耐龍過濾膜過濾，作為檢液。

6. 土壤殘留分析

(1)回收率: 取於淺盤中風乾 3 天並過篩之土壤樣品 10 g，添加嘉磷塞商品 (2000 ppm)，加入 90 ml 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液中，震盪 2 小時後土壤溶液以 ADVANTEC No.1 濾紙進行抽氣過濾，濾液以 0.45 μm 耐龍濾膜過濾。取 10 ml 濾液以 Lichrolut EN (200 mg) 管柱進行固相萃取，濾液再以 0.45 μm 耐龍濾膜過濾，作為檢液。

(2)嘉磷塞殘留分析: 每 7 天取土壤樣品 25 g，於淺盤中風乾三天，過篩並稱取 10 g，加入 90 ml 0.05 M 磷酸二氫鉀 pH 2.0 緩衝液中，震盪 2 小時後土壤溶液以 ADVANTEC No.1 濾紙進行抽氣過濾，再以 Lichrolut EN (200 mg) 管柱進行固相萃取，在以 0.45 μm 耐龍濾膜過濾，作為檢液。

(六) 土壤 pH 值測定

土壤經風乾過篩處理後，秤取 20 g 之樣品於 50 mL 之燒杯內，加入 20 mL 一次水 (土: 水=1:1)，並且持續攪拌懸浮液 5 分鐘後，靜置懸

浮液約 1 小時，使懸浮液的大部分固體沉澱，必要時利用過濾或離心取得水相層，測定上層水層 pH 值。

(七) 細菌相分析

以 PCR 分析土壤中細菌 16S rDNA，預期長度為 234 bp 之 PCR 產物。DGGE 圖譜結果再以 NTSYSpc 做圖，以 UPGMA 分析相似性。

(八) 嘉磷塞分解菌之篩選

1. MM 培養基

自添加嘉磷塞之土中篩檢分離株，再培養於含 6720 ppm 嘉磷塞之 MM 培養基上，確認分離株是否具降解嘉磷塞能力。

2. MSM 培養基

取 10 克土添加含一定量濃度嘉磷塞之 MSM 培養液 30 ml 中進行篩選。先以 6000 ppm 之 MSM 液培於 35 °C、150 rpm 下暗室培養 6 天，之後進行稀釋塗盤篩選菌株。自培養 6 天後之 6000 ppm 之 MSM 培養液取 3 ml 加入含 9000 ppm 之 MSM 液培六天，進行稀釋塗盤。自 9000 ppm 之 MSM 培養液中取 3 ml 加入含 12000 ppm 之 MSM 液培 6 天，進行稀釋塗盤。挑選塗盤結果中生長之單一菌落進行純化保存備用，及確認分離株是否具降解嘉磷塞能力。

六、結果

(一) 土壤回收率分析

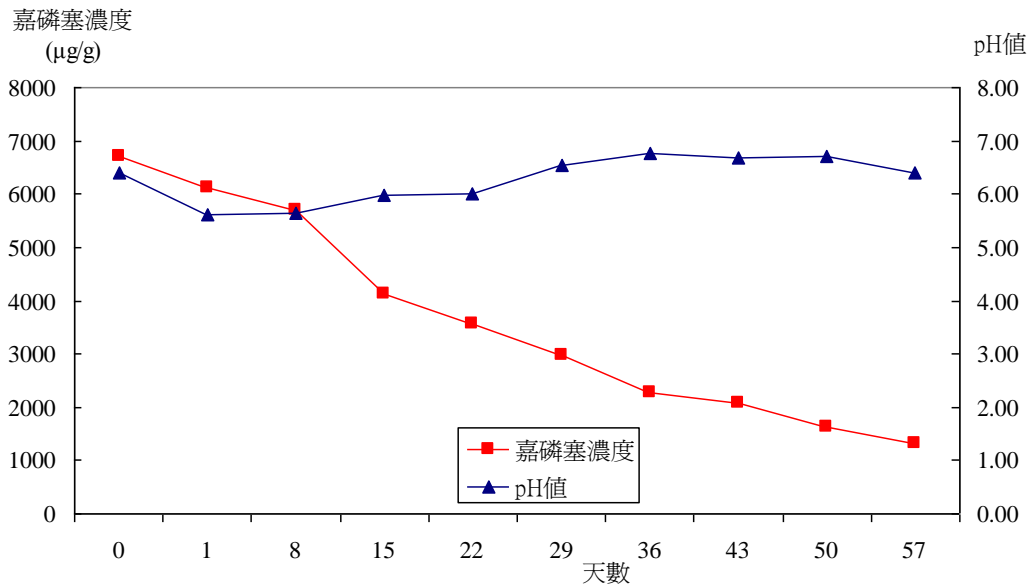
添加年年春 1920 ppm 於土壤中進行回收率分析，經固相萃取回收後，濃度為 1794.07 ppm，回收率為 93.5 %。

(二) 殘留量分析

殘留濃度隨著時間遞減（圖二），由第 0 天之 6720 $\mu\text{g/g}$ 至第 57 天之濃度為 1323.5 $\mu\text{g/g}$ （19.7%）。

(三) 土壤 pH 值

本實驗經兩個月的偵測得知，在第 15 天時嘉磷塞於土壤樣品中降解效果開始增加，此時土壤 pH 值由 5 升至 6 並持續上升，此一現象與 Forlanie *et al.* (1999) 經研究指出，嘉磷塞降解速率在 pH 7 時較 pH 5 快之結果相符。未添加嘉磷塞之土壤 pH 值為 6.4，添加嘉磷塞後使土壤 pH 值降低為 5.6，並隨時間增加至 6.4（圖二）。

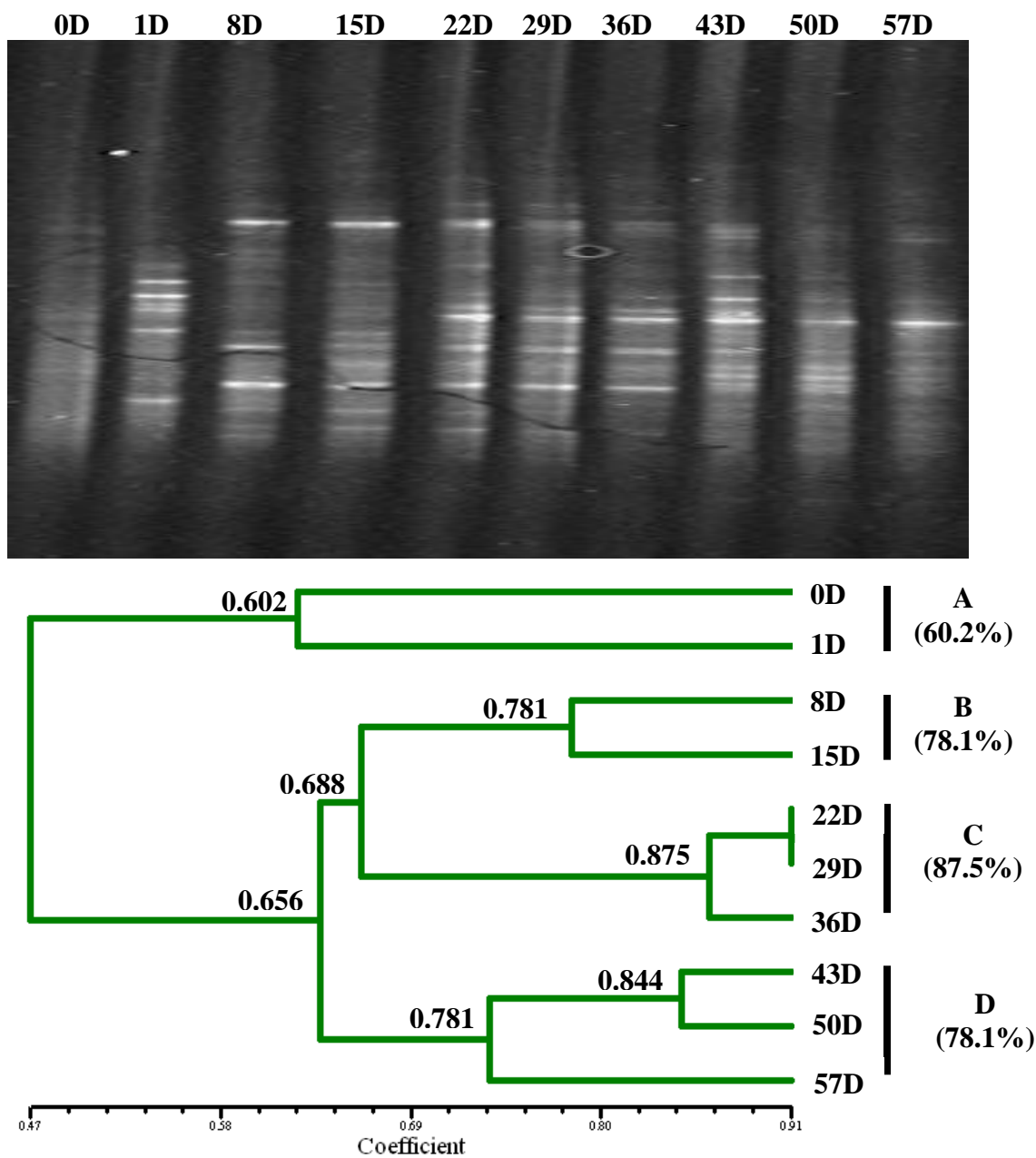


圖二、添加嘉磷塞於土中之第 0 天至 57 天之殘留量與 pH 值。

Fig. 2. The residue of glyphosate and pH in treated soil from day 0 to day 57.

(四) 細菌相分析

分析未添加前與添加後 1、8、15、22、29、36、43、50、57 天之微生物相。發現土壤中一般細菌族群可分為 4 群 (A、B、C 及 D)，第一群為第 0 天與添加後第 1 天為一群 (相似度為 0.602)，第二群則為添加後第 8、15 天為一群 (相似度為 0.781)，第三群為添加後第 22、29、36 天為一群 (相似度為 0.875)，第四群為添加後第 43、50、57 天為一群 (相似度為 0.781)。顯示添加 6720 mg/L 於第 8 天後的微生物族群有了改變。A 群與 B、C、D 群之菌群相似度為 0.47，表示有明顯之差異。



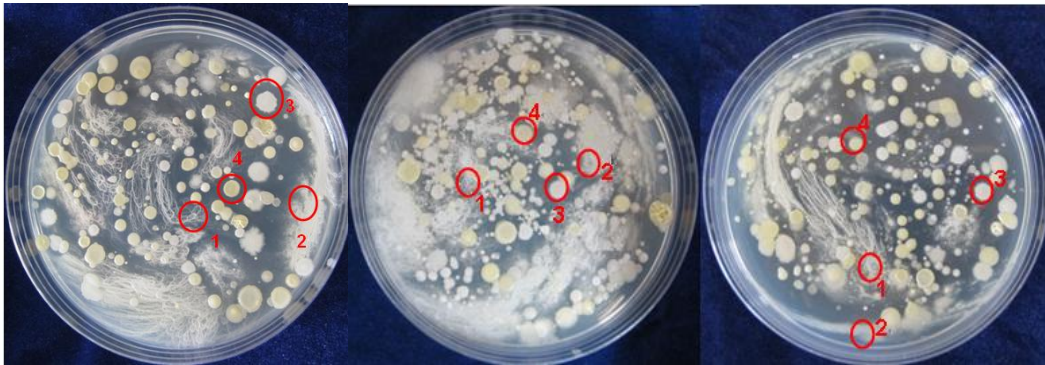
圖三、土添加 6379 ppm 嘉磷塞之第 0、1、8、15、22、29、36、43、50、57 天樣品之 PCR-DGGE 分析（上圖）與菌群分析（下圖）。

Fig. 3. The DGGE profiles (above) and cluster analysis (below) of bacterial communities in soil treated with 6379 ppm glyphosate at day 0,1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 and 57.

(五) 嘉磷塞分解菌之篩選

1. Gly-01~04：

將未添加嘉磷塞之空白土壤以 ISP2、LA+cyc³⁰⁰ 及 TSA+cyc³⁰⁰ 培養基進行塗佈平板，得知菌相均相同（圖四左），其中出現較多的 4 種主要細菌（Gly01~04）在處理後兩個月細菌量變化仍不大（ $10^4\sim 10^5$ cfu/g）。此四株菌培養於含 6720 ppm 嘉磷塞之 MM 培養基，經 6 天培養後無菌落生長，顯示此 4 株菌雖可存在於添加嘉磷塞之土壤中，但不能利用嘉磷塞生長。



圖四、添加嘉磷塞之土壤於不同天數時，於 ISP2 培養基上之菌相。左為未添加嘉磷塞之土壤，中為添加後第 29 天，右為添加後第 57 天。（1~4 菌種代碼分別為 Gly01~04）

Fig. 4. Four bacteria isolated from soil treated with glyphosate and incubated on ISP2 medium at day 0 (left), day 29 (middle), and day 57 (right). 1~4 indicated bacterial isolates of Gly 01~04.

此 4 株菌株經 16S rDNA 序列 1841bp 基因片段鑑定後得知 Gly-01 與 Gly-02 為蕈狀芽孢桿菌 (*Bacillus mycoides*)，Gly-03 為蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*)，Gly-04 為巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*)。

2. MSM-分解菌

自空白土壤中經添加嘉磷塞後，得到之分離株未具有分解嘉磷塞之能力。所以改用試驗農場土壤再進行篩檢。取 10 克土壤到添加不同濃度嘉磷塞之 MSM 培養基進行液培，篩選嘉磷塞分解菌。添加

6000 ppm 之嘉磷塞 MSM 培養基液培 6 天後進行稀釋塗盤，於培養基上篩得淺黃色透明菌株 2 株 (MSM-6K-1~2)；添加 9000ppm 之嘉磷塞 MSM 培養基液培 6 天後塗盤篩得菌株 3 株 (MSM-9K-1~3)；添加 12000ppm 之嘉磷塞 MSM 培養基液培 6 天後塗盤篩得菌株 1 株 (MSM-12K-1)。目前正進行嘉磷塞分解能力測試。

七、討論與結論

添加嘉磷塞 6720 ppm 之農業試驗場空白土壤，經 2 個月後 (57 天) 嘉磷塞殘留量為 1323.5 ppm (19.7%)，土壤 pH 值介於 5.6~6.7 之間。添加嘉磷塞於第 8 天後對微生物相有影響，此影響在第 57 天後仍持續。試驗田農場土壤經添加嘉磷塞後篩選到 4 株分離株，但都無法利生嘉磷塞生長。另取試驗農場土壤加入礦物鹽培養基 (Mineral salts medium, MSM, 含不同濃度嘉磷塞) 經 6 天 35°C 培養後，篩選到 6 株分離株，分離株對嘉磷塞之分解試驗進行中，將續探討此 6 株細菌對嘉磷塞之分解效果。

未來本研究將嘗試利用高濃度嘉磷塞處理所得之分解菌進行土壤復育及禽畜廢水處理上之應用。

八、參考文獻

1. 行政院農委會農業藥物毒物試驗所公告嘉磷塞 (Glyphosate) 農藥有效成分檢驗方法。
<http://www.tactri.gov.tw/wSite/htdocs/intro/pcd/pcdfiler/Cate/book02/091.pdf>
2. Bott, S., T. Tesfamariam, A. Kania, B. Eman, N. Aslan, V. Roemheld, and G. Neumann, 2011 Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilization. *Plant soil* 342 : 249-263.
3. Eberbach, P. L, 1999 Influence of incubation temperature on the behavior of triethylamine-extractable glyphosate (N-phosphonomethylglycine) in four soils. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 2459-2467.
4. Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., and Tao, K. 2012 Isolation, identification and characterization of a

- glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. J. Gen. Appl. Microbiol. 58 : 263-271.
5. Forlani, G., Mangiagalli, A., Nielsen, E., and C. Suardi, M. 1999 Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 31 : 991-997.
 6. Hadi, F., Mousavi, A., Noghabi, K.A., Tabar, H.G., Salmanian, A.H, 2013 New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity. J. Environ. Sci. Health B. 48 : 208-213.
 7. Kryuchkova, Y. V., G. L. Burygin, N. E. Gogoleva, Y. V. Gogolev, M. P. Chernyshova, O. E. Makarov, E. E. Fedorov, and O. V. Turkovskaya, 2014 Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. Institute Microbiological Research 169 : 99-105.
 8. Ouided, B., and Abderrahmane, B, 2013 Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. African Journal of Microbiology research. 7 : 5587-5595.
 9. Schuette, J, 1998 Environmental fate of glyphosate. Environmental Monitoring & Pest Management Department of Pesticide Regulation: 1-13.
 8. Wauchope, R. D., T. M. Buttler, A. G. Hornsby, P. W. M. Augustijn-Beckers, and J. P. Burt, 1992 The SCS ARS CES pesticide properties database for environmental decision-making. Rev Environ Contam Toxicol 123:1-155.

Isolation and identification of glyphosate-degrading bacteria from soil.

Shu-chuan Chen, Li-shu Chen, Chi-chu Lo

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute,
COA.

Blank soil collected from agricultural field was treated with 6720 ppm glyphosate, and the residue of glyphosate was declined to 1324 ppm at day 57 (19.7 %). The pH values were in the range of 5.6 ~ 6.7, and the soil bacterial communities were influenced from day 8 to day 57. Four bacteria isolated from treated soil were unable to degrade glyphosate. Soil collected from test field was added with glyphosate and incubated in mineral salts medium (MSM) for 6 days at 35 °C. Six bacteria were isolated, and the ability of degrading glyphosate was conducted at present time. In the future, we will try to use the isolated bacteria in soil remediation, and in the treatment for wastewater from livestock.