

Bakgrund

Målet med projektet är att snabbt minska mängden av de glyfosatrester i fält som har hamnat på platser (växtrester, mark) där de ej har avsedd effekt utan endast utgör ett potentiellt hot för yt- och grundvattenförorening. Detta åstadkommes genom tillförsel av optimalt formulerade mikroorganismer i samband med applicering av herbiciden i fält. Denna samtidiga tillförsel av glyfosat och mikroorganismer säkerställer en nära kontakt mellan dem och ger därmed gynnsamma förutsättningar för nedbrytningen, eftersom resterna är som mest tillgängliga för nedbrytning omedelbart efter applicering.

Trots alla ansträngningar som gjorts för att begränsa riskerna med användningen av bekämpningsmedel och motverka oönskade effekter, finns fortfarande alltför stora mängder av vissa bekämpningsmedel i yt- och grundvatten i Sverige och i andra länder. För att komma tillrätta med detta måste metoder utvecklas mot både punktkällor (t ex spill vid fyllning av spruttanken) och diffusa källor (t ex från utlakning och yttransport efter sprutning i fält). En effektiv och relativt enkel metod för reduktion av förorening från punktkällor är användning av biobäddar (Castillo et al, 2008). Förorening från diffusa källor är dock mer komplicerad att komma till rätta med.

Reduktion av diffus förorening – åldrande och tillgänglighet

Diffus förorening av bekämpningsmedel efter deras användning i fält kan ske på flera olika sätt, t ex som förångning, yttransport och utlakning genom markprofilen till dräneringsrör och grundvatten. Storleken på förluster från dessa transportvägar beror på mängden och tiden för bekämpningsmedlets exponering i miljön. En annan faktor som påverkar tillgängligheten för transport av bekämpningsmedel är medlets åldrande, d v s den tidsberoende transport in i markens organiska material och dess mikroporer som ökar med ökad kontakttid mellan medlet och markpartiklarna. Denna transport startar när medlet når marken och leder också till en tidsberoende minskning i mängden bekämpningsmedel som är tillgängligt för nedbrytning (Bergström & Stenström, 1998).

Det är därför viktigt att rester av bekämpningsmedel på växter, växtrester och på marken, och som inte är avsedda att ha en kvarstående jordverkan, snabbt bryts ner innan de transporteras till yt- och grundvatten och innan åldringsprocessen gör dem mer motståndskraftiga mot nedbrytning. Ett sätt att uppnå detta vore att tillsätta bekämpningsmedelsnedbrytande mikroorganismer eller enzymer samtidigt med sprutningen så att bekämpningsmedel som hamnar på platser där det inte har någon funktion snabbt bryts ner. Detta nya koncept och resultat från laboratoriestudier med herbiciden MCPA som modellsubstans har presenterats tidigare (Önneby et al., 2010).

Glyfosat – världens mest använda herbicid

Glyfosat är den mest använda herbiciden i Sverige och i världen. Förutom på åkermark används glyfosat också bl. a. i hemträdgårdar, i parker, på banvallar och gårdsplaner. Totalt såldes i Sverige år 2011 1 660 ton bekämpningsmedel till jordbruket och 665 ton till hushåll och den totala försäljningen av glyfosat var 708 ton (KEMI, 2012). Glyfosat återfinns också ofta i ytvatten med en fyndfrekvens åren 1985-2001 av 85 % för glyfosat (Törnquist et al., 2002). En viktig källa till sådana fynd kan vara användning av glyfosat på hårdgjorda ytor. Det har t ex visats att 80-90 % av den glyfosat som applicerades på asfalt kunde transporteras bort med ett simulerat regn (Spanoghe et al., 2005).

Nedbrytning av glyfosat

För glyfosat och många andra bekämpningsmedel har ingen mikroorganism kunnat isoleras som använder medlet för tillväxt. Glyfosat anses därför endast brytas ner i närvaro av en annan kolkälla, d v s cometaboliskt i flera steg av olika bakterier och svampar. Det finns dock organismer som kan använda glyfosat som en fosforkälla när fosfor begränsar tillväxten (Ternan et al., 1998; Singh & Walker, 2006). Vi har funnit att ligninnedbrytande enzymer som produceras av vitrötesvampar kan bryta ner alla hittills undersökta bekämpningsmedel (ca 25 stycken) inklusive glyfosat (Pizzul et al., 2009).

Glyfosat kan brytas ner av mikroorganismer i jord under bildning av metaboliten aminometylfosfonsyra (AMPA). Denna nedbrytningsväg har dock hittills bara påvisats hos två bakterieisolat. Övriga isolerade glyfosatnedbrytande bakterier klyver i frånvaro av oorganiskt fosfat C-P-bindningen vilket ger metaboliten sarkosin. På grund av svårigheten att hitta bakterier som utför nedbrytning till AMPA, prioriterade vi i detta projekt att finna bakterier som utför nedbrytningen med klyvning av C-P-bindningen. Denna strategi medför också att ingen AMPA kommer att bildas eller ackumuleras som ett resultat av glyfosatnedbrytningen.

Material och metoder

Anrikning och isolering av glyfosatnedbrytande bakterier från jord

Matjord från en åkerjord (1 % organiskt kol, 0,11 % kväve och pH 6,6) samlades in, sållades (<2 mm) och lagrades vid 4 °C. En glyfosatnedbrytande blandkultur med bakterier isolerade från en åkerjord och *Pseudomonas* sp. 4ASW (Quinn et al., 1989) erhöles från Dr J. Quinn, Queen's University, Belfast.

Ett fosfatfritt minimalmedium med pyruvat som kolkälla användes för anrikning. Glyfosat användes som den enda fosforkällan i alla försök. Ett jordprov (1 g) sattes till 100 ml Erlenmeyer kolvar med 25 ml minimalmedium och 50 mg/L glyfosat som P-källa och inkuberades på skak (150 rpm) vid 25 °C. Kulturen överfördes till nytt medium var tionde dag. Efter den tredje överföringen spreds utspädningar av denna anrikningskultur på agarplattor (Tryptic Soy Broth, TSB) och inkuberades vid 25 °C. Olika enskilda isolat valdes utifrån koloniernas färg och morfologi. Samma medium och metod användes för anrikning och isolering av bakterier från blandkulturen som hade erhållits från Dr. Quinn.

Karakterisering av bakterieisolat

Isolerade glyfosatnedbrytande bakterier karakteriserades med avseende på koloniutseende, form, oxidastest, katalastest, Gramfärgning och förmåga att bryta ner glyfosat.

Identifiering och riskbedömning och av bakterieisolaten

Isolaten identifierades baserat på 16S rRNA genom jämförelse med sekvenser i GenBank vid the National Centre for Biotechnology Information (NCBI—<http://www.ncbi.nih.gov/>). De riskbedömdes baserat på tillgänglig information i den vetenskapliga litteraturen.

Nedbrytning av glyfosat av de olika enskilda isolaten

Varje isolat ympades till minimalmediet med 20 mg/L glyfosat som enda P-källa och inkuberades 15 dygn vid 25 °C och 150 rpm. Resterande mängder glyfosat i mediet bestämdes vid slutet av inkuberingen. *Pseudomonas* sp. 4ASW (Quinn et al., 1989) odlades också som en positiv kontroll. Ett prov från den ursprungliga blandkulturen inkluderades också.

Test av glyfosatnedbrytning i sand och jord

De isolerade organismernas effekt på nedbrytning av glyfosat undersöktes i sand och jord. Testerna utfördes med olika pesticid- och ympkoncentrationer.

Formulering

För att ge hög överlevnad, god lagringsstabilitet och för att göra det möjligt att sprida glyfosatnedbrytande bakterier tillsammans med formulerad glyfosat, formulerades organismerna genom frystorkning med sackaros (10 %) som bärmaterial.

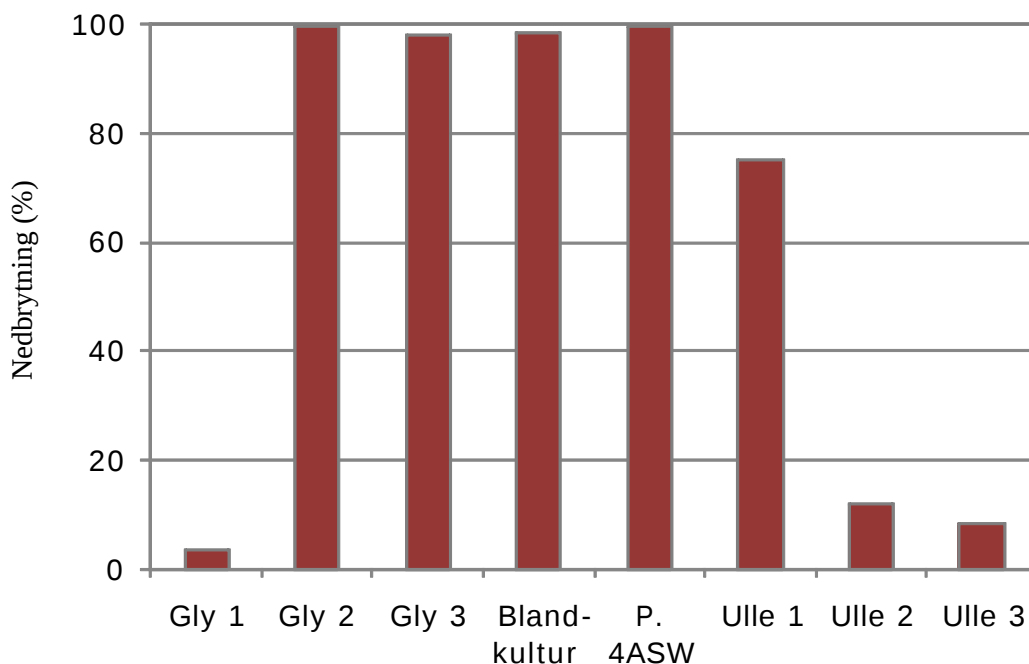
Glyfosatanalys

Analys av glyfosat gjordes med HPLC vid institutionen för mikrobiologi, SLU, enligt en modifierad metod från Nedelkoska och Low (2004).

Resultat

Glyfosatnedbrytande isolat

Glyfosatnedbrytande bakterier isolerades från två olika källor. Den ena var en blandkultur som erhöles från Dr. Quinn och den andra från en svensk åkerjord. Baserat på färg och kolonimorfologi erhöles sex distinkt olika isolat, tre från blandkulturen (Gly 1, 2 och 3) och tre från den svenska åkerjorden (Ulle 1, 2 och 3). Isolaten undersöktes med avseende på deras förmåga att bryta ner glyfosat. Resultaten visas i Figur 1.



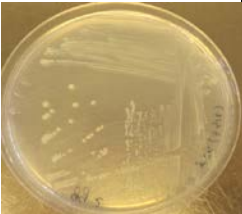
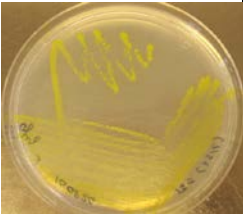
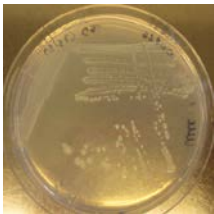
Figur 1. Nedbrytning av glyfosat med utvalda stammar från blandkulturen (Gly 1, 2 och 3) och från en svensk åkerjord (Ulle 1, 2 och 3). Nedbrytning med den ursprungliga blandkulturen och med *Pseudomonas* sp. 4ASW (positiv kontroll) undersöktes också.

Isolaten Gly 2, Gly 3 och Ulle 1, som gav den största nedbrytningen (100, 98 och 74 %) valdes ut för vidare undersökningar.

Karaktisering av de nya bakterieisolaten

Resultat från olika test för karaktisering av de tre utvalda bakterieisolaten visas i Tabell 1. Dessa resultat indikerade att de tre isolaten tillhör olika bakteriearter.

Tabell 1. Några karakteristika av de glyfosatnedbrytande isolaten.

Isolat	Gly 2	Gly 3	Ulle 1
Koloniutseende	vit, rund, jämn 	gul, rund, jämn 	vit, rund, jämn 
Form	stav	kort stav	stav
Oxidastest	negativ	negativ	negativ
Katalastest	positiv	positiv	negativ
Gramfärgning	negativ	positiv	negativ

Nedbrytning av glyfosat i sand och jord.

Isolaten Gly 2, Gly 3 och Ulle 1 odlades under 48 timmar i TSB medium (30 g/L) vid 25 °C på skakbord, skördades och tvättades två gånger med 0,9 % NaCl. En ymp sattes till fosfatfritt minimalmedium med 0,5 % Na-pyruvat och 0,5 % K-glukonat som kolkällor och inkuberades vid 25 °C under 4 timmar. Efter inkuberingen tillsattes 20 µg/mL glyfosat och 1 mL ymp (ca 10⁹ celler/g) till 10 g jord eller sand. Proven inkuberades i provrör vid 25 °C och analyserades med avseende på koncentrationen glyfosat efter två dygn (Tabell 2). I sanden erhöles den största nedbrytningen med Gly 2 (52 %), medan Ulle 1 och Gly 3 bröt ner 20 respektive 10 %. Knappt någon nedbrytning erhöles i jorden.

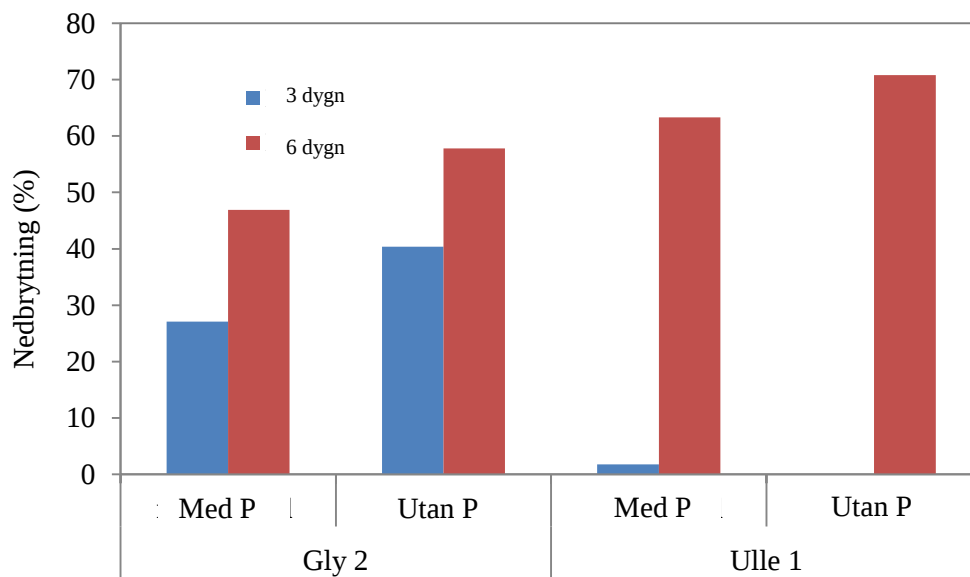
Tabell 2. Koncentration glyfosat efter inkubering under 2 dygn vid 25 °C i jord- och sandprover som ympats med Ulle 1, Gly 2 och Gly 3.

Organism	Matrix	Glyfosatkoncentration (µg/g)	
		Ursprunglig	Efter 2 dygns inkubation
Ulle 1	Sand	1,52 ± 0,00	1,23 ± 0,01
	Jord	1,16 ± 0,03	1,25 ± 0,03
Gly 3	Sand	1,37 ± 0,21	1,25 ± 0,03
	Jord	1,41 ± 0,01	1,28 ± 0,01
Gly 2	Sand	1,54 ± 0,03	0,74 ±
	Jord		0,90 ± 0,13

Resultaten visar att de testade mikroorganismernas kapacitet att bryta ner glyfosat är god i sand för Gly 2 men otillräcklig för Ulle 1 och Gly 3 och otillräcklig för alla tre isolaten i jord.

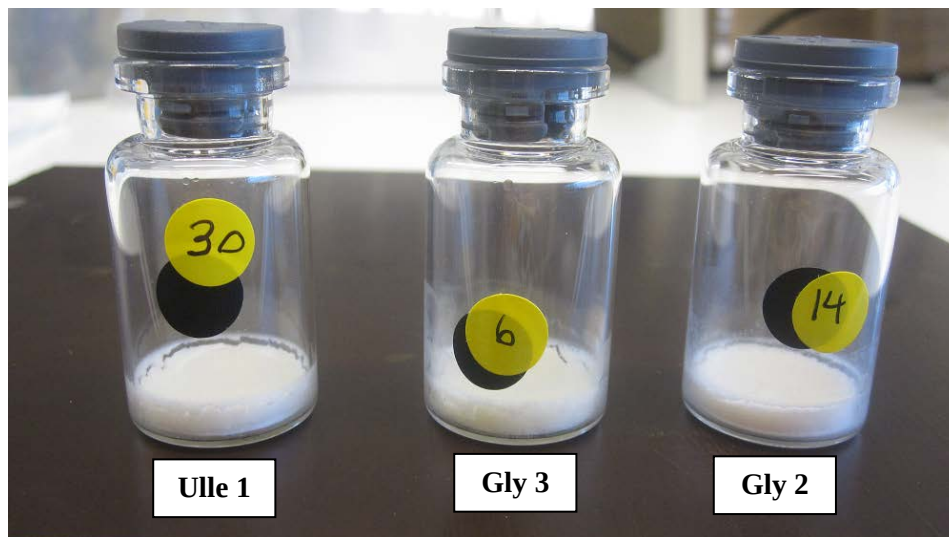
Fosforbrist för induktion av glyfosatnedbrytande enzymer.

Tidigare studier har visat att fosforbrist kan öka upptag och nedbrytning av glyfosat (Dick & Quinn, 1995). Därför inkuberades cellerna i minimalmedium utan fosfat med 1 % pyruvat i 16 timmar innan glyfosat (20 µg/mL) sattes till som enda fosforkälla. Denna fosforbrist ökade nedbrytningen hos Gly 2 från 27 till 40 % efter 3 dygn och från 47 till 58 % efter 6 dygn (Figur 2). För Ulle 1 erhöles knappt någon nedbrytning efter 3 dygn men celler med fosforbrist var något mer effektiva jämfört med kontroll utan fosforbrist efter 6 dygn. Gly 3 bröt ner mindre än 10 % efter 6 dygn, utan skillnad mellan behandlingarna (data visas inte).

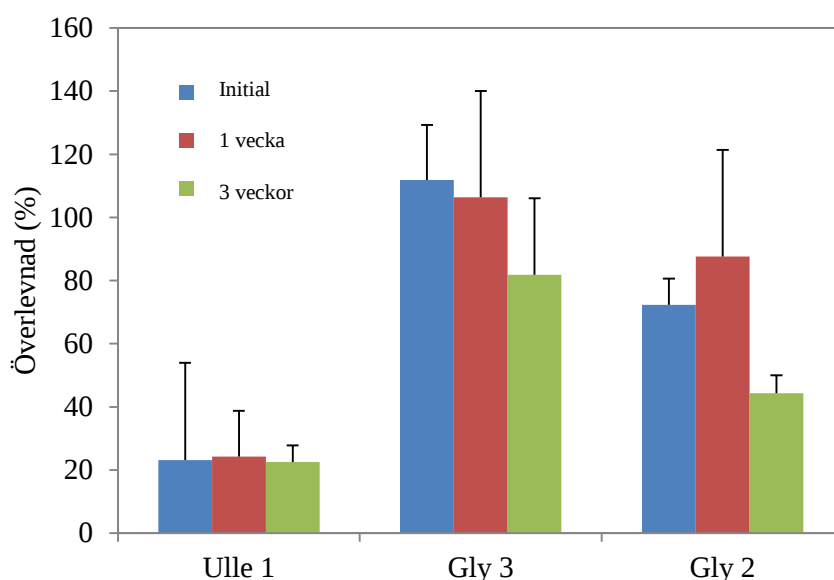


Figur 2. Glyfosatnedbrytning (%) i flytande medium av Gly 2 och Ulle 1 med eller utan brist på fosfor. Den initiala glyfosatkonzentrationen var 20 µg/mL.

Formulering. Stammarna frystorkades med sackaros (10 %) som bärrmaterial. Den erhållna produkten var av god kvalitet för alla stammar, dvs. den visade inga tecken på kollaps eller krympning (Figur 3). Överlevnaden efter frystorkningen varierade mellan stammarna, med störst överlevnad för Gly 3, följt av Gly 2 och Ulle 1 (Figur 4). Sackaros var det enda bärrmaterialet som undersöktes i detta experiment. Andra material är dock tänkbara (Wessman, et al., 2011). Det är viktigt att de formulerade bakterierna förblir levande även under lagring. Jämfört med antalet levande celler omedelbart efter frystorkningen var överlevnaden 93 % för Ulle 1 efter tre veckors lagring vid 25 °C. För Gly 3 och Gly 2 var överlevnaden 73 respektive 50 %.



Figur 3. Frystorkad produkt av stammarna med 10 % sackaros som bärare.



Figur 4. Överlevnad omedelbart efter frystorkning och efter 1 och 3 veckors lagring vid 25 °C, låg luftfuktighet och i vakuum.

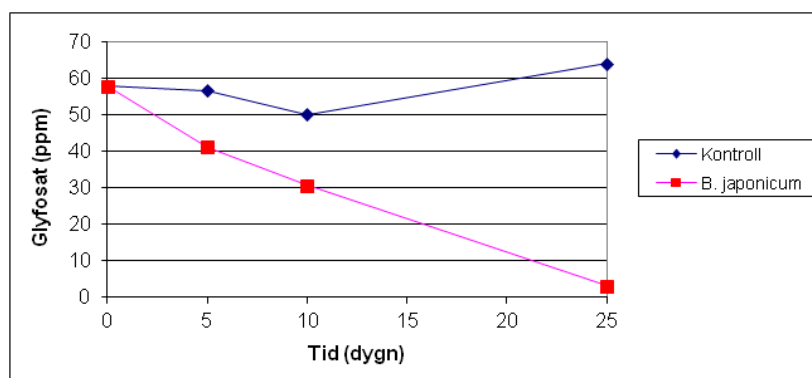
Identifiering och karakterisering av de nya bakterieisolaten. Stammarna identifierades baserat på 16S rRNA genom jämförelse med sekvenser i GenBank vid the National Centre for Biotechnology Information (NCBI—<http://www.ncbi.nih.gov/>). Sekvenser från Gly 2 visade 99 % identitet med *Ochrobactrum anthropi* och *Ochrobactrum haematophilum*. *Ochrobactrum anthropi* klassificeras som tillhörande skyddsklass 2 (German Collection of Microorganisms, www.dsmz.de) och har beskrivits som en opportunistisk humanpatogen (Chain et al., 2011). Gly 2 studerades därför inte mer i detta projekt. Gly 3 var identisk med *Microbacterium oxydans* och Ulle 1 var till 99 % identisk med *Brevundimonas* sp.

Glyfosatnedbrytning med *Microbacterium oxydans* (Gly 3) och *Brevundimonas* sp. (Ulle 1)

Glyfosatnedbrytning med *Microbacterium oxydans* (Gly 3) och *Brevundimonas* sp. (Ulle 1) blev inte mer effektiv genom att byta substrat (pyruvat, glykos, gluconat). Nedbrytningen av glyfosat som enda fosfatkälla eller i närvaro av andra fosforkällor var försumbar. Dessa två bakteriestammar var därför inte lämpliga för vårt ändamål och studerades inte vidare.

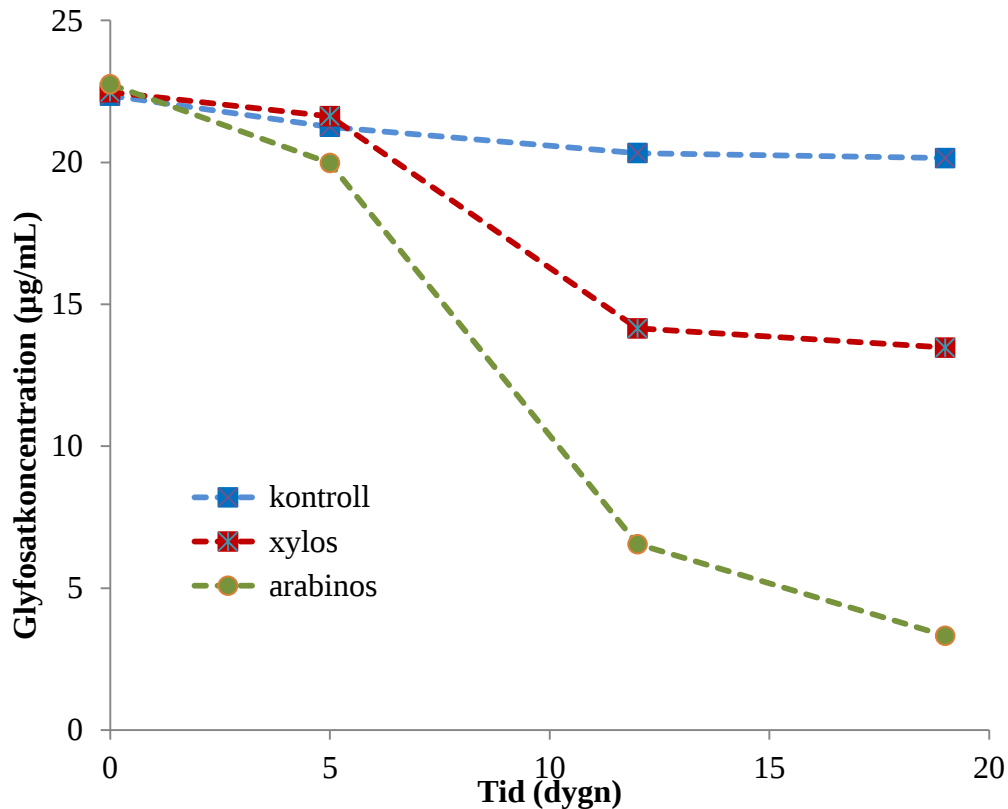
En glyfosatnedbrytande *Bradyrhizobium japonicum*

Eftersom Gly 2 kan vara en opportunistisk humanpatogen och eftersom Gly 3 (*Microbacterium oxydans*) och Ulle 1 (*Brevundimonas* sp.) har för låg kapacitet att bryta ner glyfosat, undersökte vi om de kunde ersättas med en annan organism tillhörande skyddsklass 1. Bakterier tillhörande släktena *Rhizobium* och *Bradyrhizobium* har sedan länge spridits ut på åkermark för att öka kvävefixeringen hos baljväxter. Det har också rapporterats att de kan bryta ner glyfosat (Zabaloy & Gómez, 2005). Därför undersökte vi förmågan att bryta ner glyfosat hos nio arter tillhörande dessa släkten från kultursamlingen vid institutionen för mikrobiologi, SLU. En av dessa, *Bradyrhizobium japonicum* 10169, kunde bryta ner glyfosat – även i närvaro av oorganiskt fosfor (Figur 5).



Figur 5. Nedbrytning av glyfosat i lösning med *Bradyrhizobium japonicum* 10169 från kultursamlingen vid institutionen för mikrobiologi, SLU.

Bradyrhizobium japonicum 10169 kunde bryta ner glyfosat med mannitol som substrat. Nedbrytningen var emellertid mycket långsam, vilket inte duger för den tänkta tillämpningen. Eftersom arabinos och pentoser som substrat ofta föredras av Bradyrhizobier (Bergey's manual of determinative bacteriology) undersökte vi nedbrytning av glyfosat i närvaro av arabinos och xylos. Glyfosat bröts ner i medier med dessa substrat och snabbast med arabinos, men fortfarande krävdes 3-4 veckors inkubering för att erhålla fullständig nedbrytning. (Figur 6).

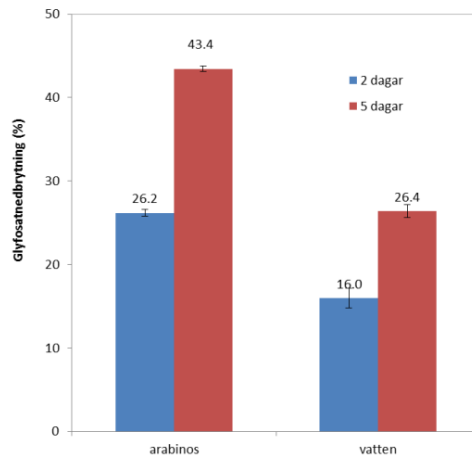


Figur 6. Nedbrytning av glyfosat i lösning med *Bradyrhizobium japonicum* 10169 från kultursamlingen vid institutionen för mikrobiologi, SLU med xylos eller arabinos som substrat.

Nedbrytning i sand efter tillsats av *Bradyrhizobium japonicum* 10169

Bradyrhizobium japonicum 10169 odlades i lösning med arabinos (10 g/l) som substrat. Cellerna koncentrerades med centrifugering och tvättades två gånger med sterilt ledningsvatten, varefter de återsuspenderades i sterilt ledningsvatten eller substrat, båda innehållande, glyfosat. En portion sattes till 10 g sand för att ge 20 µg/g glyfosat och $5,6 \times 10^7$ bakterier/g sand. Därefter inkuberades sanden vid 25 °C, och prover för analys av glyfosat togs efter 2 och 5 dygn.

Tillsats av substrat gav en större nedbrytning jämfört med när bara vatten tillsattes, 43,4 % nedbrytning med substrat jämfört med 26,4 % med vatten efter 5 dygn (Figur 7).



Figur 7. Nedbrytning av glyfosat i sand med *Bradyrhizobium japonicum* 10169 med tillsats av rikt substrat eller vatten.

Diskussion

Konceptet med samtidig tillsats av glyfosat och glyfosatnedbrytande mikroorganismer fungerar i princip eftersom det kan ge en väsentligt snabbare nedbrytning av herbiciden jämfört med nedbrytningshastigheten utan tillsats av mikroorganismer. Det är också möjligt att isolera naturligt förekommande mikroorganismer som kan bryta ner glyfosat, trots närvaro av höga koncentrationer av kväve och fosfor. Den mest effektiva organismen vi kunde isolera, *Ochrobactrum anthropi*, visade sig dock tillhöra skyddsklass 2 och har beskrivits som en opportunistisk humanpatogen. Den kan därför inte användas för praktisk applikation i fält och studerades därför inte mer i detta projekt.

Två andra isolat, *Microbacterium oxydans* och *Brevundimonas* sp., bröt ner glyfosat men med för låg hastighet för vår tilltänkta applikation. Glyfosatnedbrytningen blev inte mer effektiv vid odling på olika substrat (pyruvat, glykos, gluconat). Nedbrytningen av glyfosat som enda fosfatkälla eller i närvaro av andra fosforkällor var försumbar. Dessa två bakteriestammar var därför inte heller lämpliga för vårt ändamål och studerades därför inte vidare.

För att finna nya glyfosatnedbrytande bakterier undersökte vi förmågan att bryta ner glyfosat hos nio arter tillhörande släktena *Rhizobium* och *Bradyrhizobium* från kultursamlingen vid institutionen för mikrobiologi, SLU. En av dessa, *Bradyrhizobium japonicum* 10169, kunde bryta ner glyfosat – även i närvaro av oorganiskt fosfor. Nedbrytningen var emellertid mycket långsam men ökade när bakterien odlades på arabinos och xylos. Tillsats av bakterien till sand tillsammans med arabinos som substrat gav 43,4 % nedbrytning efter 5 dygn. *Bradyrhizobium japonicum* 10169 är därför en lovande organism för den tilltänkta applikationen, men mer studier krävs för att finna hur dess kapacitet att bryta ner glyfosat kan ökas ytterligare. En möjlig väg kan vara att identifiera det enzym som katalyserar glyfosatnedbrytningen och därefter undersöka om odling i närvaro av detta enzyms naturliga substrat ökar enzymets mängd eller aktivitet i bakterien.

Referenser

Bergström, L. & Stenström, J. 1998. Environmental fate of chemicals in soil. *AMBIO* 27, 16-23.

Castillo, MdP, Torstensson, L. & Stenström, J. 2008. Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. *J Agric Food Chem* **56**(15), 6206–6219.

Chain PSG, Lang DM, Commerci DJ, *et al.* 2011. Genome of *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188T, a versatile opportunistic pathogen and symbiont of several eukaryotic hosts. *J Bacteriol* **193**, 4274-4275.

Dick RE & Quinn J.P. 1995. Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiol Lett* **134**, 177-182.

KEMI. 2012. Försålda kvantiteter av bekämpningsmedel

2011. http://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/Statistik/ForsaldaBKM/forsalda_bkm_2011.pdf

Nedelkoska, T.V. & Low, G.K.C. 2004. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta* **511**(1), 145-153.

Pizzul, L., Castillo, MdP & Stenström, J. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* **20**(6), 751-759.

Quinn, J.P., Peden J.M.M. & Dick, R.E. 1989. Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**(3), 283-287.

Singh, B.K. & Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 428–471.

Spanoghe, P., Claeys, J., Pinoy, L. & Steurbaut, W. 2005. Rainfastness and adsorption of herbicides on hard surfaces. *Pest Manag Sci* **61**, 793–798.

Ternan, N.G., Mc Grath, J.W., Mc Mullan, G. & Quinn, J.P. 1996. Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* **14**, 635-647.

Törnquist, M., Kreuger, J. & Ulén, B. 2002. Förekomst av bekämpningsmedel i svenska vatten 1985-2001. Sammanställning av en databas. Resultat från monitoring och riktad provtagning i yt-, grund- och dricksvatten. Ekohydrologi 65 Uppsala 2002, Avdelningen för vattenvårdslära, SLU.

Wessman, P., Mahlin, D., Akhtar, S., Rubino, S., Leifer, K., Kessler, V. & Håkansson, S. 2011. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *J Sci Food Agric* **91**(14), 2518-2528.

Zabaloy, M.C. & Gómez, M.A. 2005. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth *Biol Fertil Soils* **42**: 83–88.

Önneby, K., Jonsson, A. & Stenström, J. 2010. A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide-degrading microorganisms. *Biodegradation* **21**(1), 21-29.