

## 土壤添加金針菇堆肥促進微生物分解丁基拉草的證據

黃振文<sup>1,2</sup> 葉彥良<sup>1</sup>

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系

2. 聯絡作者, 電子郵件: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; 傳真: 886-4-22851676

接受日期: 中華民國90年3月15日

### 摘要

黃振文、葉彥良. 2001. 土壤添加金針菇堆肥促進微生物分解丁基拉草的證據. 植病會刊10:45-54.

在含或不含 50 ppm 丁基拉草的土壤中添加金針菇堆肥, 可以大幅提升土壤中真菌、細菌及放線菌等微生物的族群量, 其中以 *Rhizopus* spp.、*Penicillium* spp.、*Trichoderma* spp.、*Streptomyces* spp. 及 *Bacillus* spp. 等菌類出現頻率較高。利用 Fluorescein diacetate (FDA) 的水解反應, 測定土壤中添加 0-5% (w/w) 金針菇堆肥及 0-500 ppm 丁基拉草後的土壤微生物活性, 結果發現隨著金針菇堆肥濃度的增加, 微生物活性呈現漸增的趨勢; 至於添加丁基拉草不同濃度間, 初期對微生物活性的影響並不顯著。在含有 50 ppm 丁基拉草的滅菌與未滅菌土壤中添加 5% (w/w) 滅菌與未滅菌金針菇堆肥, 發現添加未滅菌金針菇堆肥的處理組, 較添加滅過菌之金針菇堆肥的處理組, 更可降低丁基拉草毒傷豌豆主根的褐化率達 22% 以上。將出現頻率高的微生物配製成菌體懸浮液, 或將微生物堆肥 (在滅過菌之金針菇堆肥接種菌體懸浮液培養七天調製而成), 分別添加於含有 50 ppm 丁基拉草的土壤中, 發現微生物堆肥較單獨菌體懸浮液更具有紓解丁基拉草毒傷豌豆的功效; 其中以 *Rhizopus* sp. (F-101) 微生物堆肥的效果最佳。將不同土壤微生物分別接種於含有丁基拉草的馬鈴薯葡萄糖煎汁或營養煎汁中, 培養七天後, 利用丙酮及石油醚萃取丁基拉草殘留量, 經氣相層析儀 (Gas chromatography) 分析, 發現 *Rhizopus* sp. (F-101)、*Trichoderma hamatum* (F-104)、*T. aureoviride* (F-108)、*T. koningii* (F-115)、*Penicillium verrucosum* (F-116)、*Streptomyces* sp. (A-107)、*Streptomyces* sp. (A-112) 及 *Bacillus brevis* (B-109) 等菌株均具有分解丁基拉草的能力, 其中以 *Rhizopus* sp. (F-101) 分解丁基拉草的能力最強。

關鍵詞: 豌豆、除草劑、丁基拉草、生物分解作用、微生物堆肥、土壤添加物

### 緒言

土壤中除草劑的分解作用, 主要是藉由微生物參與分解的現象<sup>(9)</sup>。土壤微生物利用 氧化作用 (oxidation)、醚的裂解 (ether cleavage)、酯及醯胺的水解 (hydrolysis of ester and amide)、醇及醛的氧化 (oxidation of alcohol and aldehyde)、去烷基 (dealkylation)、羥化反應 (hydroxylation)、去鹵素基及還原 (reductive dehalogenation) 及芳香族環的裂解 (cleavage of aromatic ring) 等途徑, 將除草劑分解。微生物分解除草劑的主要目的是為了利用它們作為碳與氮的來源<sup>(22)</sup>。文獻指出可分解除草劑的微生物種類相當的多, 包括真菌、細菌及放線菌。Smith 和 Mortensen 兩氏<sup>(22)</sup> 由土壤分離獲得之 *Pseudomonas testosteroni*, 可以 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 作為碳的主要來源; 隨後他們將 *P. testosteroni* 噴佈於土壤中, 發現十八個月後該菌仍具

有促進 2,4-D 及 MCPA [(4-chloro-2-methylphenoxy) acetic acid] 分解的效果<sup>(23)</sup>。

土壤中殘留丁基拉草, 會對稻田裡作或後作的豌豆植株產生不利的影響<sup>(2)</sup>。黃和黃兩氏<sup>(3)</sup> 將豌豆種植在含有丁基拉草的土壤中, 四星期後, 發現豌豆幼苗的下位葉出現黃化的病徵外, 其主根及側根也呈現明顯褐化壞死的現象。黃氏等<sup>(5)</sup> 及葉與黃兩氏<sup>(6)</sup> 曾證明在眾多的農業廢棄物之中, 將金針菇堆肥以 5% (w/w) 的量添加於土壤中, 具有紓解拉草 (Alachlor) 及丁基拉草毒傷豌豆根系的效益。Beestman 與 Deming 氏<sup>(9)</sup> 曾比較丁基拉草在滅菌與未滅菌之土壤中, 其半衰期分別為 640+8 天和 11.4+0.3 天, 證明丁基拉草的微生物分解作用, 是其在土壤中消失的主要原因。

本研究的主要目的在於探討微生物在土壤添加金針菇堆肥紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效應中所扮演的角色, 祈能永續經營農田, 有效利用土壤微生物的資源。

## 材料與方法

### 供試土壤與除草劑

取台中縣大里市一年餘未曾噴灑除草劑的休耕農田之表土，置於網室中陰乾後，經孔徑 2 mm 的網篩篩除碎石雜質。然後，將土壤置於塑膠袋內，作為本研究供試之需。土壤經中興大學土壤調查試驗中心分析，確定大里土壤含砂粒 75.2%、粉粒 14.0% 及黏粒 10.8%，有機質 1.82%，酸鹼值為 5.4，歸屬於砂質壤土。供試用 32% 丁基拉草 (Butachlor, 化學名稱：2-chloro-2',6'-diethyl-N-(butoxymethyl)-acetanilide, 商品名：馬上除)，其標準品純度 98%，係得自美國孟山都公司 (Monsanto Company, St. Louis MO, U.S.A.)。

### 供試金針菇堆肥

金針菇堆肥 (spent golden mushroom compost; SGMC)，係取自台中縣霧峰鄉戴養菌場。將採收過金針菇的廢棄培養基質均勻打碎混拌後，以 2 mm 網篩篩除碎片雜質，經自然堆積一個月後晾乾，即為供試的金針菇堆肥。

### 丁基拉草與金針菇堆肥對土壤微生物的影響

在含與不含 50 ppm 丁基拉草的大里土壤中，添加或不添加 5% (w/w) 金針菇堆肥，置於溫室中保持 12-15% 濕度，在添加的當天 (0天)、第 7 天、第 14 天、第 21 天及第 28 天，分別取 10 g 土壤，加入 90 ml 無菌 0.01% (w/w) 水瓊脂 (Difco, Lab., Detroit, MI, USA) 溶液中，均勻混合後，以無菌水系列稀釋後，將各稀釋液均勻塗抹在 Peptone-dextrose-rose begal agar (PDRA)、Nutrient agar (NA) 及 Chitin agar (CA) 等<sup>(12)</sup> 選擇性培養基中，分別測定各處理土壤中真菌、細菌及放線菌的數目。各處理均有三重複，每一重複是四個平板測得菌落數的平均值。將上述各處理所出現的不同真菌、細菌及放線菌，分別移植培養於 PDA 及 NA 上，並加以編號分類，選取出現頻度較高的真菌：F-101、F-104、F-108、F-115 及 F-116；細菌：B-109、B-112 及 B-117；放線菌：A-106、A-107 及 A-112，作為進一步的試驗及分析之用。至於真菌類 *Penicillium* 與 *Trichoderma* 兩屬的鑑定是分別依據 Ramirez<sup>(18)</sup> 及 Rifai<sup>(19)</sup> 的分類系統進行。此外，細菌屬名與種名的鑑定，是以 Biolog 自動菌類鑑定系統 (Microstation) 分析之。而放線菌的鑑定則是參考 Sykes 與 Skinner<sup>(24)</sup> 的分類系統。

### 丁基拉草與金針菇堆肥對土壤微生物活性的影響

將 Fluorescein diacetate (3',6'-diacetyl fluorescein [FDA]; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 溶於分析級丙酮 (Acetone) 中，配置成 2 mg/ml 之母液，儲存於 -20 中備用<sup>(20)</sup>。試驗分為兩部分：(1) 將供試土壤調配成含有

0、1、5、10、25、50、100、250、及 500 ppm 丁基拉草等 9 種處理；(2) 在供試土壤中添加 0、1、2、3、4 及 5% (w/w) 等不同比例之金針菇堆肥。將各處理土壤置於 25 中保持 15% (w/w) 含水量，於處理當天 (第 0 天) 起，每隔 2 天取樣一次，直至第 8 天止。FDA 水解反應之測定步驟是：取 4 g 的土壤，置於 250 ml 的三角燒瓶中，加入 100 ml 硫酸鈉緩衝溶液 (Sodium phosphate buffer, 60 mM, pH 7.6, 並經滅菌)，再加入 0.5 ml FDA 母液，使其最終濃度調成 10 µg/ml。隨後移置於 25 中，經 100 rpm 振盪培養 2 小時，再以離心機 (6000 rpm) 離心五分鐘後，以 3 µm 濾膜 (Millipore 出品) 過濾，取濾液以光電比色計 (Spectrophotometer, U-2000 Hitack) 在 490 nm 之下，觀測各處理的吸收值。

### 滅菌與未滅菌土壤添加金針菇堆肥紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效應

將 5% (w/w) 滅菌 (經 100 熱蒸氣處理 30 min，連續三次，每次間隔一天) 及未滅菌的金針菇堆肥，分別添加或不添加於含或不含 50 ppm 丁基拉草的滅菌及未滅菌土壤中，分別裝填於內徑 12 公分的花盆內，每盆有土壤 500 g，四盆為一處理，置於溫室內保持土壤溼潤 (12-15% w/w)，經七天後，於每盆中播種七粒豌豆種子 (台中十一號)，三星期後，每盆隨機拔取五棵豌豆植株，水洗後，記錄各處理間豌豆根部褐化的情形。

### 微生物紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效果評估

在含有 50 ppm 丁基拉草的滅菌土壤中，添加 5% (w/w) 各別接種過微生物 F-101, F-104, F-108, F-115, F-116, A-106, A-107, A-112, B-109, B-112, B-117 及 All (上述 11 菌株混在一起) 的滅菌金針菇堆肥，或直接在每 100 g 土壤中添加各菌株的懸浮液 15 ml (其中真菌、放線菌及細菌分別培養在 PDA 或 NA 上，再以無菌水配置成孢子或細胞懸浮液)，使得土壤中的真菌量為  $10^5$ - $10^6$  cfu/g dry soil；細菌量為  $10^8$ - $10^9$  cfu/g dry soil；放線菌量為  $10^4$ - $10^5$  cfu/g dry soil。此外，在含有如上述等量水分之土壤中分別添加滅菌與不滅菌之金針菇堆肥及不添加任何東西等三處理作為對照組，將各處理土壤分裝於內徑 12 公分的花盆內，經 7 天後，於每一花盆中播種七粒豌豆種子 (台中十一號)，三星期後，每盆隨機拔取五棵豌豆植株，水洗後，比較各處理間植株主根褐化的比例，各處理有四重複，每一重複為五棵植株測得數據之平均值。

### 微生物堆肥保護豌豆免於丁基拉草毒傷的效果評估

在含有 50 ppm 丁基拉草的土壤中，分別添加 5% (w/w) F-101, F-104, F-108, F-115, F-116, B-109, B-112, B-117, A-106, A-107 及 A-112 等單一微生物與 All (混合 11 菌株) 微生物堆肥 (由滅菌過之金針菇堆肥 20 g 分別加入 20

ml真菌：F-101、F-104、F-108；F-115及F-116；細菌：B-109、B-112及B-117；放線菌：A-106、A-107及A-112的懸浮液，培養七天後的混合物。其中加入真菌的量為 $10^5$ - $10^6$  cfu/ml，細菌的量為 $10^8$ - $10^9$  cfu/ml，放線菌為 $10^4$ - $10^5$  cfu/ml)。並以添加滅菌與不滅菌之金針菇堆肥及不添加任何東西等三處理作為對照組。隨後按前述的方法及重複數，經三星期後，分別調查各處理植株主根褐化的比例。

### 微生物分解丁基拉草的能力比較

在含有50 ppm丁基拉草的100 ml馬鈴薯葡萄糖煎汁培養液 (PDB；Difco lab.) 或營養煎汁培養液 (NB) 中，個別接種10ml F-101、F-104、F-108、F-115、F-116、B-109、B-112、B-117、A-106、A-107及A-112的微生物孢子或細胞懸浮液 (真菌： $10^5$ - $10^6$  cfu/ml，細菌： $10^8$ - $10^9$  cfu/ml，放線菌： $10^4$ - $10^5$  cfu/ml)，以蒸餾水充作對照組，置於25℃，無光照的定溫箱中振盪 (100 rpm) 培養，在第0天及第7天，依照Liu等人<sup>(14)</sup>的方法，逐一萃取丁基拉草的殘留量。將液體樣品100 ml置於250 ml的錐形瓶中，加入100 ml丙酮 (Acetone) 與石油醚 (light petroleum distillate; boiling range 60-80℃) 混合物 (1:1 (v/v)) 及2 g矽藻土 (Celite 545) 後，於超音波洗滌槽 (Branson 3210) 中處理30 min。將樣品以白瓷漏斗 (Buchner funnel) 過濾 (漏斗及濾紙皆預先以丙酮及石油醚處理過) 後，再將濾液移入500 ml的分液漏斗內，並注入100 ml硫酸鈉溶液 (50g/L) 及50 ml石油醚，充分振盪萃取後，取有機層；隨後再以60 ml硫酸鈉溶液清洗乙次，取有機層，加入10克無水硫酸鈉藉以去除水分，經過濾後，將體積濃縮至5 ml；取2 $\mu$ l溶液注入氣相層析儀 (Gas chromatography) 進行丁基拉草殘留量的分析。採用Chrompack CP9001氣相層析儀進行分析，分析管 (Column) 係為DB-5毛細管分析管 (30 m x 0.53 mm, 1.5 $\mu$ m, J&W Scientific)，分析管柱內流速為6 ml/min，注入口 (Injector) 溫度為220℃，分析管以190℃固定溫度分析，由溫度設定250℃的火燄離子偵測器 (FID: Flame ionization detector) 檢測丁基拉草的殘留量，並以 Sic Chromatocorder 12積分儀列印分析資料。

### 微生物配合金針菇堆肥分解丁基拉草的效果比較

在含有50 ppm丁基拉草的100 g滅菌土壤中，分別添加5% (w/w) (一) F-101、F-108、B-109、B-112及A-112等五種微生物堆肥；即將100 g滅菌之金針菇堆肥，分別加入100 ml F-101、F-108、B-109、B-112或A-112微生物的孢子或細胞懸浮液 (真菌： $10^5$ - $10^6$  cfu/ml，細菌： $10^8$ - $10^9$  cfu/ml，放線菌： $10^4$ - $10^5$  cfu/ml)，培養7天後的混合物；(二)F-101、F-108、B-109、B-112或A-112分別導入滅菌過之金針菇堆肥後，立即拌入土中。以添加或不添加滅菌過或未滅菌之金針菇堆肥等三處理作為對照組。經過七天

後，將上述各處理以前述的萃取方法及分析條件，各取10 g土樣進行分析丁基拉草之殘留量。

## 結果

### 丁基拉草與金針菇堆肥對於土壤微生物的影響

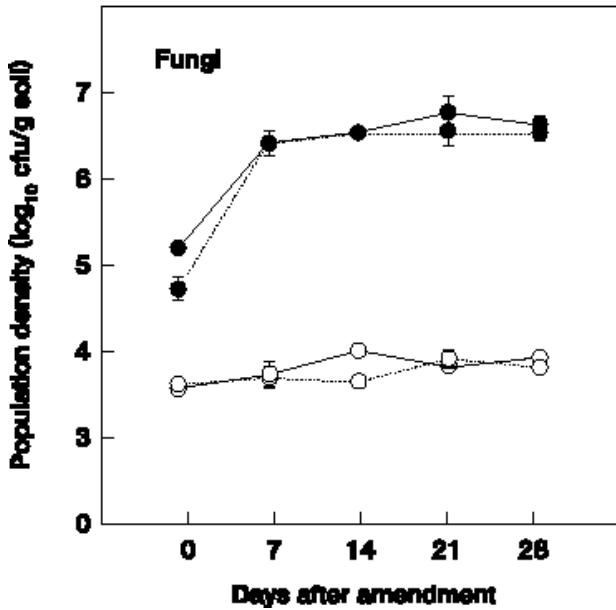
在含與不含50 ppm丁基拉草的大里土壤中，添加或不添加5% (w/w) SGMC，在添加的當天開始至第四週止，以土壤稀釋平板法，每週定時檢測土中真菌、細菌及放線菌的族群量。發現添加SGMC的處理組，在第0天時其真菌量是未添加SGMC處理組的百倍以上，顯示SGMC中原來就含有高量的真菌 (圖一)。隨後7至28天，真菌族群量皆維持在 $10^6$  cfu/g dry soil以上；此外土中添加50 ppm丁基拉草的處理組，其真菌族群量均略高於不加除草劑者，惟並不顯著。在細菌的族群量方面，於添加SGMC當天，各處理間並無太大差異；七天後，添加SGMC的處理組，細菌族群量呈大幅增加，顯示SGMC能顯著促進土中細菌的增殖 (圖二)。至於添加50 ppm丁基拉草者其族群量與未添加者相比較，並無顯著增加的跡象 (圖二)。在放線菌的族群量均如細菌般大幅提昇 (圖三)，顯示添加SGMC有利於真菌、細菌及放線菌等微生物的增殖。研究過程中，發現在添加丁基拉草與SGMC的土壤中，*Rhizopus* sp. (F-101)、*Trichoderma hamatum* (F-104)、*T. aureoviride* (F-108)、*T. koningii* (F-115)、*Penicillium verrucosum* (F-116)、*Streptomyces* sp. (A-106)、*Streptomyces* sp. (A-107)、*Streptomyces* sp. (A-112)、*Bacillus brevis* (B-109)、*Pseudomonas* sp. (B-112) 及*Bacillus* sp. (B-117) 等微生物在選擇性培養基平板上出現的頻率與菌量數量均顯著較其他微生物高。

### 丁基拉草及金針菇堆肥對土壤微生物活性的影響

以FDA的水解反應偵測土壤微生物的活性，發現土中加入丁基拉草後，第六天起隨著添加丁基拉草濃度增高，其FDA水解反應的紫外線吸收光譜值呈現上升的趨勢，尤其丁基拉草濃度在500 ppm時，土壤中微生物活性有明顯增加的現象 (表一)。土壤添加1-5% (w/w) SGMC後，各處理之FDA水解後的吸收光值隨處理後的天數增加而增加；此外添加SGMC濃度愈高者，其FDA水解反應的吸收光值就愈高，顯示SGMC具有促進土壤微生物活性增強的效果 (圖四)。

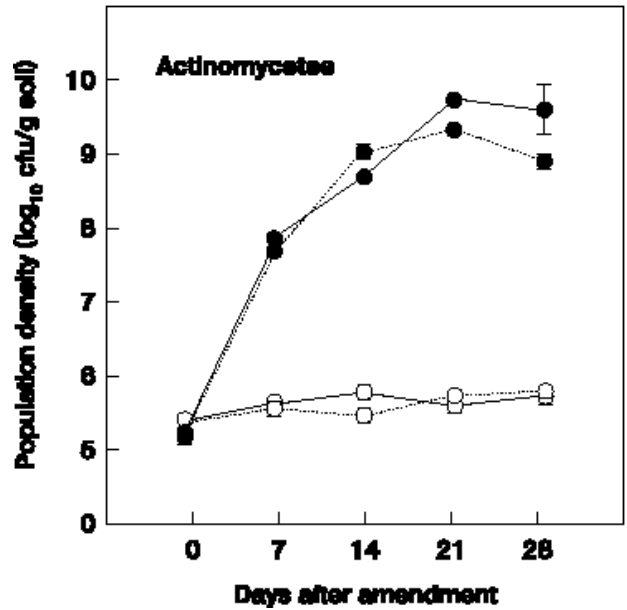
### 滅菌與未滅菌土壤添加金針菇堆肥紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效應

將滅菌與未滅菌的SGMC分別添加或不添加於含有50 ppm丁基拉草的滅菌或未滅菌土壤中，使土壤中SGMC含



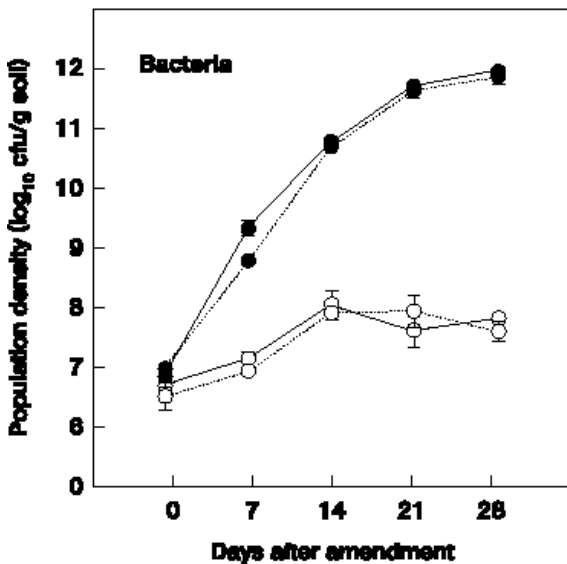
圖一、在含與不含50 ppm丁基拉草的土壤中，分別添加與不添加5% (w/w) 金針菇堆肥後，四星期內土壤中真菌族群的變化情形。

Fig. 1. Fluctuation of fungal populations in soils containing 0 and 50ppm of butachlor amended with and without 5% (w/w) spent golden mushroom compost (SGMC) for 0, 7, 14, 21 and 28 days in the greenhouse. ( No amendment, Amendment, No butachlor, 50ppm butachlor)



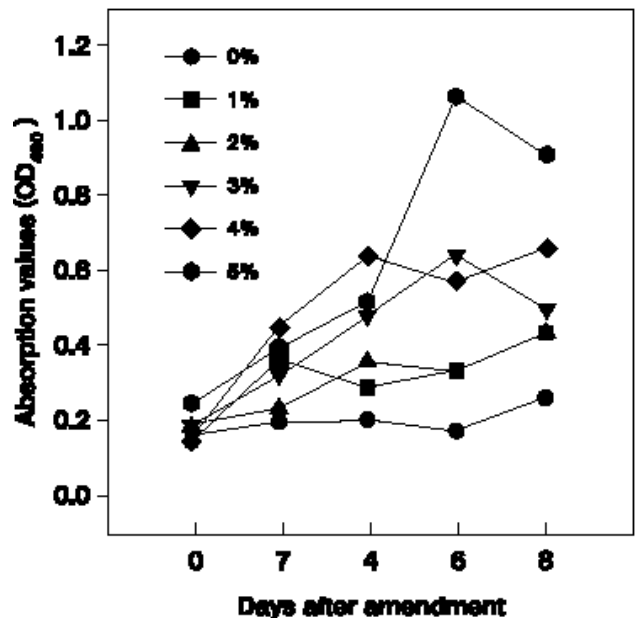
圖三、在含與不含50 ppm丁基拉草的土壤中，分別添加與不添加5% (w/w) 金針菇生長堆肥後，四星期內土壤中放線菌族群的變化情形。

Fig. 3. Fluctuation of actinomycetes populations in soils containing 0 and 50 ppm of butachlor amended with and without 5% (w/w) spent golden mushroom compost (SGMC) for 0, 7, 14, 21 and 28 days in the greenhouse. ( No amendment, Amendment, No butachlor, 50ppm butachlor)



圖二、在含與不含50 ppm丁基拉草的土壤中，分別添加與不添加5% (w/w) 金針菇生長堆肥後，四星期內土壤中細菌族群的變化情形。

Fig. 2. Fluctuation of bacterial populations in soils containing 0 and 50ppm of butachlor amended with and without 5% (w/w) spent golden mushroom compost (SGMC) for 0, 7, 14, 21 and 28 days in the greenhouse. ( No amendment, Amendment, No butachlor, 50ppm butachlor)



圖四、以FDA的水解反應偵測土壤中添加0-5% (w/w) 金針菇堆肥後，八天內土壤微生物活性的變化。

Fig. 4. Activity of soil microbes in soils amended with 0-5% (w/w) spent golden mushroom compost (SGMC) detected by hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) for 8 days.

表一、以FDA的水解反應偵測，當土壤中含有不同濃度的丁基拉草時，八天內土壤微生物活性的變化

Table 1. Variation of activity of soil microbes in soils containing different concentrations of butachlor detected by hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) for 8 days

Concentration of butachlor (ppm)	Absorptive values (at 490 nm)				
	0 day	2 days	4 days	6 days	8 days
0	0.169	0.212	0.208	0.180	0.267
1	0.179	0.253	0.214	0.204	0.261
5	0.208	0.207	0.229	0.208	0.243
10	0.188	0.261	0.248	0.234	0.235
25	0.159	0.211	0.226	0.257	0.286
50	0.191	0.219	0.212	0.207	0.260
100	0.140	0.268	0.260	0.300	0.334
250	0.177	0.251	0.286	0.296	0.460
500	0.172	0.245	0.350	0.470	0.518

量為百分之五 (w/w)，經七天後，種植豌豆三星期後，比較豌豆根部褐化情形，發現植株種於滅菌土者其主根褐化率為100%；惟種在未滅菌土者，其主根褐化率則為87.49% (表二)。此外，不論是在滅菌或未滅菌的土壤中添加未經滅菌的SGMC，皆較添加滅菌SGMC的處理組，可顯著地 (p=0.05) 降低豌豆主根褐化率達22%以上。

微生物紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效果

在含有50 ppm丁基拉草的滅菌土壤中，添加百分之五 (w/w) 接種過微生物的滅菌SGMC，或直接在土壤中添

表二、在含與不含50 ppm丁基拉草的滅菌及未滅菌土壤中，分別添加與不添加5% (w/w) 滅菌過或未滅菌金針菇堆肥(SGMC)，對豌豆主根褐化率的影響

Table 2. Effect of disinfested and non-disinfested soils containing 50ppm butachlor amended with or without 5% (w/w) sterilized or non-sterilized spent golden mushroom compost (SGMC) on injury severity of tap roots of garden pea seedlings (cv. TC-11) for 21 days

Treatment	Injury severity (%)
Non-butachlor in soil	0.00 g <sup>1</sup>
Non-butachlor in autoclaved soil	0.00 g
Non-butachlor+SGMC in soil	0.00 g
Non-butachlor+sterilized-SGMC in autoclaved soil	0.00 g
Butachlor+sterilized-SGMC in autoclaved soil	28.75 c
Butachlor+SGMC in autoclaved soil	3.08 e
Butachlor+SGMC in soil	0.31 f
Butachlor+sterilized-SGMC in soil	22.85 cd
Butachlor in soil	87.49 b
Butachlor in sterilized soil	100.00 a

1.Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.

加菌類的懸浮液，經七天後種植豌豆，三星期後拔取豌豆，比較微生物與微生物配合SGMC，對於紓解除草劑毒傷豌豆根系效應的差異。結果發現添加微生物的處理組中，除了F-101及F-104外，若與不添加任何東西的對照組相較，其餘微生物都具有紓解丁基拉草對豌豆的毒傷作用 (圖五)，然而微生物配合SGMC後，F-101紓解丁基拉草毒傷豌豆的功效卻最為顯著，且已接近添加未滅菌之SGMC的效果。

微生物堆肥保護豌豆免於丁基拉草毒傷的效果

在含有50 ppm丁基拉草的土壤中，分別添加單一微生物為主的微生物堆肥，經七天後播種豌豆，於三星期後拔取豌豆植株，比較各微生物堆肥對於紓解豌豆根部褐化現象的差異。發現F-101、B-117及All (混合11菌株) 等參種堆肥的表現最好 (圖六)，它們紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效能均相當於添加未經滅菌的SGMC處理。

微生物分解丁基拉草的能力比較

在含有50 ppm丁基拉草的PDB或NB中，各別接種供

表三、土壤微生物在培養液中分解丁基拉草能力之比較<sup>1</sup>

Table 3. Comparison of degradation of butachlor by different soil microbes in liquid media<sup>1</sup>

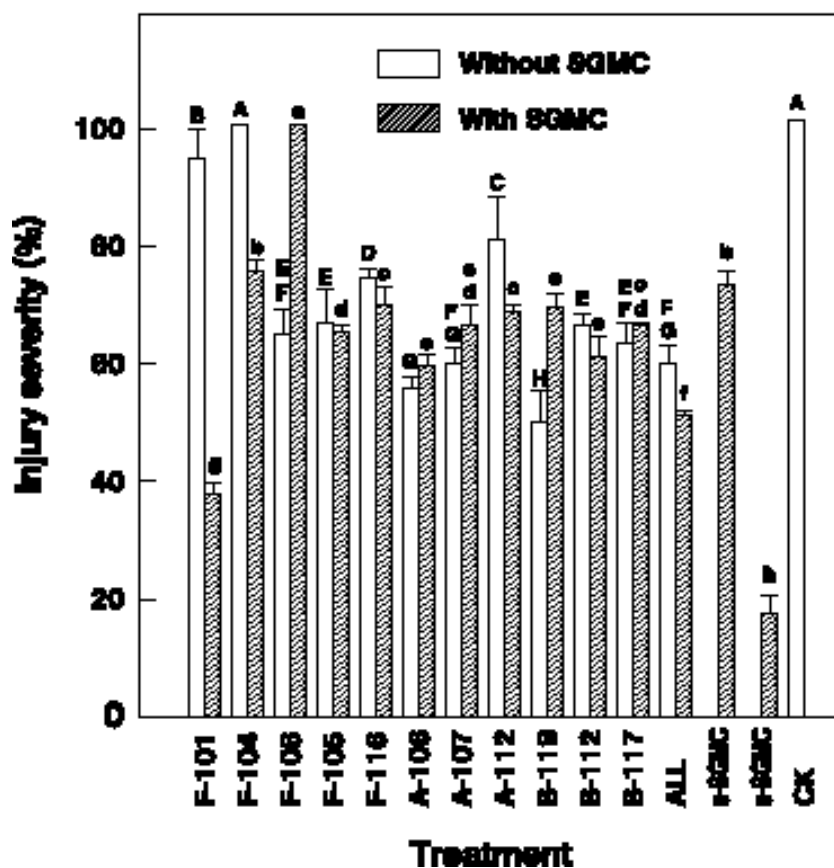
Microorganism	Concentration of butachlor residue (ppm) <sup>2</sup>		Degradation of butachlor <sup>3</sup> (%)
	0 day	7 days	
<i>Rhizopus</i> sp. (F-101)	40.84	2.14	94.75 a <sup>3</sup>
<i>Trichoderma hamatum</i> (F-104)	43.17	7.64	82.31 b
<i>T. aureoviride</i> (F-108)	40.32	10.46	74.0 c
<i>T. koningii</i> (F-115)	40.00	13.47	66.34 d
<i>Penicillium verrucosum</i> (F-116)	37.15	11.16	69.96 d
<i>Streptomyces</i> sp. (A-106)	31.82	26.91	15.41 h
<i>Streptomyces</i> sp. (A-107)	33.20	18.41	44.54 f
<i>Streptomyces</i> sp. (A-112)	30.51	17.32	43.26 f
<i>Bacillus bevis</i> (B-109)	47.09	17.80	62.19 e
<i>Bacillus</i> sp. (B-117)	24.34	19.03	21.80 g
<i>Pseudomonas</i> sp. (B-112)	20.97	17.92	14.55 h
None (PDB as a control)	49.42	43.83	11.31 I
None (NB as a control)	48.45	41.38	14.59 h

<sup>1</sup> Fungi, bacteria, and actinomycetes were cultured in PDB, NB and PDB, respectively, containing 50ppm butachlor for 7 days. Ten milliliters of spore suspension of fungi (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/ml) and cell suspension of bacteria (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> cfu/ml) and actinomycetes (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> cfu/ml) were used to inoculate 100 ml of liquid medium.

<sup>2</sup> Concentrations of butachlor residue in the liquid media were measured at 0-day and 7<sup>th</sup> day after inoculation with different microbes.

<sup>3</sup> Degradation (%)=[(butachlor residue at 0 day-butachlor residue at 7th day) / butachlor residue at 0 day] X 100.

<sup>4</sup> Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not different (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖五、在添加與未添加5% (w/w) 滅菌金針菇堆肥且含有50 ppm丁基拉草的消毒土壤中，11種微生物紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效果。(ALL：混合11菌株微生物，s-SGMC：滅菌金針菇堆肥不添加微生物，n-SGMC：未滅菌金針菇堆肥不添加微生物，CK：滅菌土壤未添加任何東西)

**Fig. 5.** Effect of eleven soil microorganisms (F-101: *Rhizopus* sp., F-104: *Trichoderma hamatum*, F-108: *T. aureoviride*, F-115: *T. koningii*, F-116: *Penicillium verrucosum*, A-106: *Streptomyces* sp., A-107: *Streptomyces* sp., A-112: *Streptomyces* sp., B-109: *Bacillus brevis*, B-112: *Pseudomonas* sp., B-117: *Bacillus* sp.) on alleviating phytotoxicity of butachlor to roots of garden pea seedlings grown in disinfested soil amended with/without 5% (w/w) sterilized spent golden mushroom compost (SGMC) for 21 days in the greenhouse (ALL: the mixture of eleven soil microorganisms, s-SGMC: sterilized SGMC, n-SGMC: nonsterilized SGMC, CK: disinfested soil only).

試微生物，在培養的第0天及第7天，萃取培養液中的丁基拉草，再以氣相層析儀檢測殘留量，以純度98%的純品作為標準曲線，發現第0天的回收率有高有低，最高為PDB的空白對照組，約有98.84%的回收率，最低為接種B-117的處理組，只有41.94%的回收率(表三)。七天後，發現接種F-101 (*Rhizopus* sp.) 者，丁基拉草的殘留量只剩2.14 ppm，其七天內的代謝效能高達94.75%，而最差者為B-112 (*Pseudomonas* sp.)，和對照空白組相比較，幾乎完全無分解的能力。

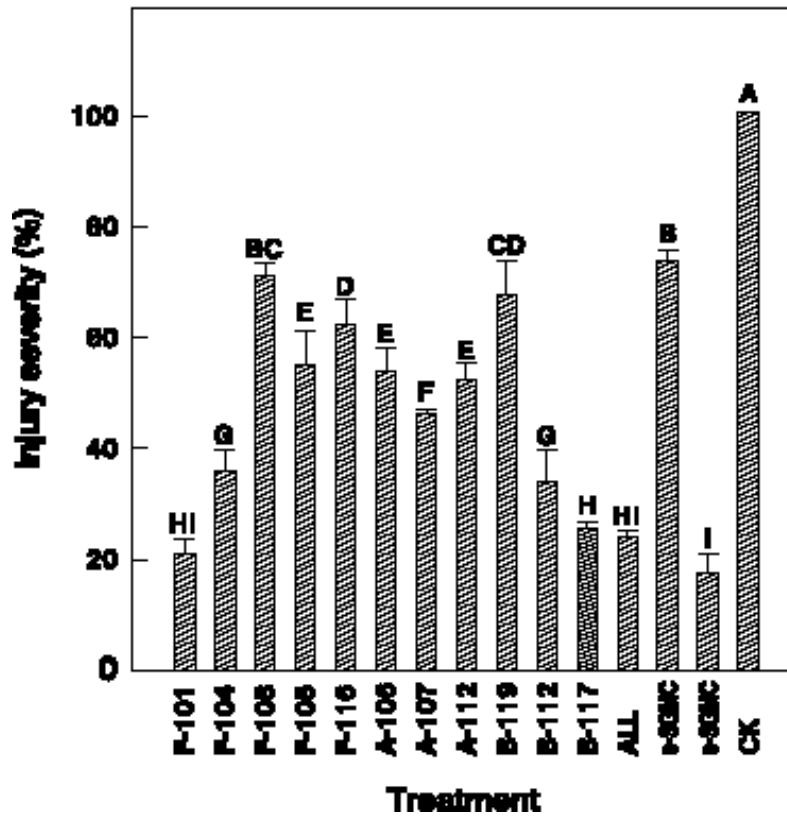
#### 微生物配合金針菇堆肥分解丁基拉草的效果比較

在含有50 ppm丁基拉草的100 g滅菌土壤中，分別添加微生物堆肥或微生物配合滅菌SGMC，惟不做七天的發酵處理，待七天後萃取各處理中殘留的丁基拉草，發現經過發酵的微生物堆肥，其代謝丁基拉草的能力皆較微生物

配合滅菌SGMC不經發酵的混合物為強(圖七)。在對照組中，未經滅菌的SGMC也較滅菌之SGMC，更具有顯著地( $p=0.05$ )降解丁基拉草的效能。

## 討 論

學者們曾針對丁基拉草的半衰期進行研究，並發表許多不同的結果，其中發現半衰期有20至35天者<sup>(1)</sup>，亦有9至14天者<sup>(9)</sup>，一般的結論大多認為丁基拉草不易長期殘留於土中。筆者證明土壤中，若含有50 ppm以上的丁基拉草，即使經過一個月以上的時間，再種植豌豆亦會導致豌豆植株矮化及根部的褐化(未發表資料)。此外丁基拉草尚可間接促進植物病原菌，如*Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*及*Colletotrichum*危害作物及降低作物生產力<sup>(7,8,9)</sup>。Masaphy等氏<sup>(16)</sup>發現在田土中添加棉花、麥稈及具分解纖維能力



圖六、在含有50 ppm丁基拉草的消毒土壤中，添加12種微生物堆肥對於丁基拉草毒傷豌豆根系的效。 (ALL：混合11菌株微生物，s-SGMC：滅菌金針菇堆肥不添加微生物，n-SGMC：未滅菌金針菇堆肥不添加微生物，CK：滅菌土壤未添加任何東西)

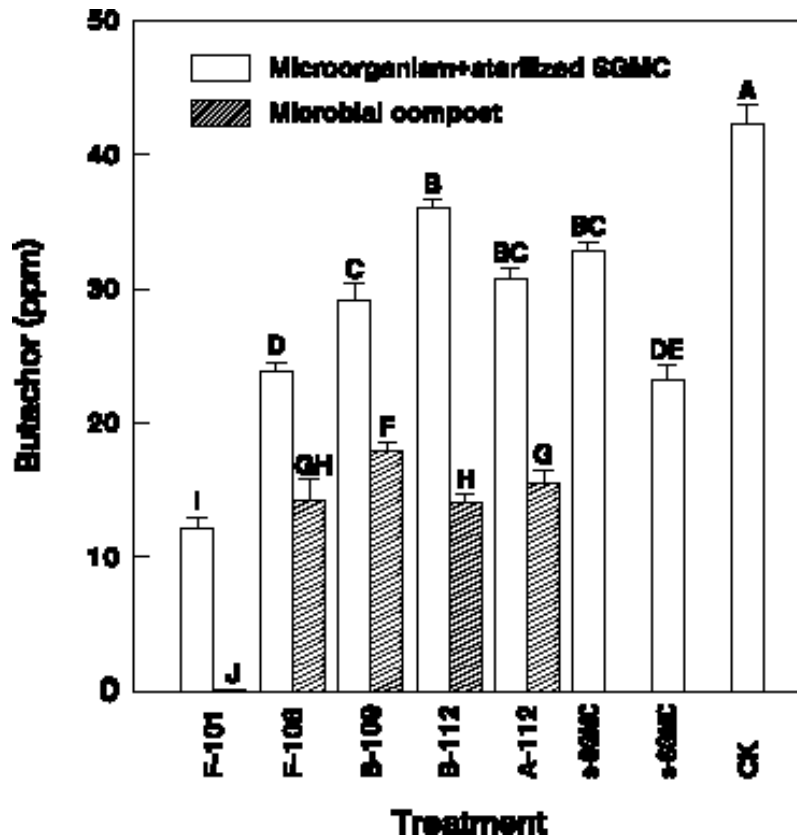
Fig. 6. Effect of twelve microbial composts on alleviating phytotoxicity of butalchlor to roots of garden pea seedlings grown in disinfested soil with 50ppm butachlor. (F-101: *Rhizopus* sp., F-104: *Trichoderma hamatum*, F-108: *T. aureoviride*, F-115: *T. koningii*, F-116: *Penicillium verrucosum*, A-106: *Streptomyces* sp., A-107: *Streptomyces* sp., A-112: *Streptomyces* sp., B-109: *Bacillus brevis*, B-112: *Pseudomonas* sp., B-117: *Bacillus* sp., All: a mixture of eleven isolates; s-SGMC: sterilized SGMC; n-SGMC: nonsterilized SGMC; CK: disinfested soil only).

的真菌 (*Pleurotus pulmonarius*) 之混合堆肥，可加速土中草脫淨 (Atrazine) 的代謝，因而認為此種組合堆肥，對於除草劑兼具有吸附與微生物分解的作用。本試驗證明添加未滅菌的金針菇堆肥 (SGMC) 可減輕丁基拉草毒傷豌豆根系的效應 (表二)。

土壤中蘊含有大量的微生物可有效利用土中殘留的除草劑作為主要能源，進而分解土中的除草劑 (15,17,25)。本研究發現SGMC中，原本就含有高量的真菌 (圖一)，經分離鑑定後發現大多為 *Rhizopus* spp.。由於SGMC含有豐富的有機質，是促進土壤微生物大量繁殖的最佳基質。Kunc氏 (13) 認為土壤中的有機質可以調控微生物分解除草劑之酵素的生合成及活性。Shea氏 (21) 指出土壤添加物可以增強土壤微生物的活性與適應能力，進而減輕除草劑的殘留量毒傷作物根系。Duah-Yentumi及Kuwatsuka兩氏 (10) 發現堆肥及氮磷鉀等添加物可縮短殺丹 (Benthiocarb) 除草劑在土中分解的停滯期。Schäfer與Rosswall (20) 兩氏認為FDA的水解反應能有效偵測土中或水中微生物的總活性。本試

驗利用FDA的水解反應，證明土中添加SGMC除本身含有豐富微生物相外，亦可增進土壤微生物的活性 (圖四)。

在含有50 ppm丁基拉草的滅菌土中添加微生物懸浮液、微生物與滅菌SGMC混合物或微生物堆肥，發現微生物堆肥減輕豌豆毒傷的效能較單一微生物與滅過菌之SGMC更具有優異降解丁基拉草毒害的效果 (圖五、六、七)；然而在純微生物的處理組中，混合多種微生物的處理效果表現最佳，至於單一微生物的分解效能卻較不理想 (圖五)。黃氏等 (4) 曾證明添加5% (w/w) THC-23微生物堆肥與未滅菌SGMC，均具有極顯著紓解拉草毒傷豌豆根系的功效；而單獨使用 *T. harzianum* T23孢子懸浮液卻不具有減緩拉草毒傷豌豆根系的效果。顯然，將土壤微生物導入SGMC才能夠相輔相成，有效發揮降解丁基拉草毒傷豌豆的功效。本研究試驗過程中，在含50 ppm丁基拉草的滅菌土壤中添加5% (w/w) 滅菌SGMC與微生物懸浮液，筆者等發現 *Streptomyces* sp. (A-112) 可以利用SGMC作為生長基質，並可以肉眼見到菌體大量增殖的現象，顯示



圖七、在含有50 ppm 丁基拉草的100 g滅菌土壤中分別接種5% (w/w) 滅菌金針菇堆肥與10 ml微生物懸浮液的混合物，或5% (w/w) 微生物堆肥，於第七天時，回收各處理土中丁基拉草的殘留量比較。(接種濃度，真菌： $10^5$ - $10^6$  cfu/ml；細菌： $10^8$ - $10^9$  cfu/ml；放線菌： $10^4$ - $10^5$  cfu/ml)

**Fig. 7.** Comparison of butachlor residues recovered from 100g disinfested soil containing 50ppm butachlor 7 days after inoculation with 5% (w/w) mixture of sterilized SGMC and cell suspension or 5% (w/w) microbial composts. (Microbes, F-101: *Rhizopus* sp., F-108: *Trichoderma aureoviride*, B-109: *Bacillus brevis*, B-112: *Pseudomonas* sp., A-112: *Streptomyces* sp., s-SGMC: sterilized SGMC, n-SGMC: nonsterilized SGMC. Concentration, fungi: $10^5$ - $10^6$  cfu/ml; bacteria: $10^8$ - $10^9$  cfu/ml; actinomycetes:  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml. CK: disinfested soil)

*Streptomyces* sp. (A-112) 與SGMC有高度的親和性。惟可否利用兩者間的此項特性，進而開發兼具有紓解丁基拉草毒傷豌豆根系與抑制根部病害功效的微生物堆肥，則有待進一步的探討。

### 謝 誌

本研究承蒙 國科會研究計畫 (NSC85-2321-B-005-011) 經費補助，謹此致謝。

### 引用文獻

1. 陳建志. 1976. 除草劑丁基拉草 (Butachlor) 之光分解及其在土壤中變化之研究. 台灣大學農化所碩士論文。
2. 黃振文. 1993. 殺草劑對豌豆幼苗生長與其根部病原菌的影響. 植保會刊35:163-175。
3. 黃振文、黃錦河. 1995. 殺草劑促進豌豆立枯病發生的

機制. 植保會刊37: 107-116。

4. 黃振文、胡建國、石信德. 1996. 土壤微生物在金針菇太空包廢棄堆肥紓解拉草毒傷豌豆根系所扮演的角色. 植病會刊5: 137-147。
5. 黃振文、胡建國、曾德賜、黃錦河. 1995. 土壤添加金針菇太空包廢棄堆肥紓解拉草毒傷豌豆幼苗的效應. 植病會刊4: 76-82。
6. 葉彥良、黃振文. 1996. 有機添加物紓解丁基拉草毒傷豌豆根系的效應. 植病會刊5: 33-37。
7. Altman, J., and Campbell, C. L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 361-385.
8. Altman, J., and Rovira, A. D. 1989. Herbicide-pathogen interactions in soilborne root diseases. *Can. J. Pl. Pathol.* 11: 166-172.
9. Beestman, G. B., and Deming, J. M. 1974. Dissipation of acenailide herbicides from soils. *Agron. J.* 66: 308-313.
10. Duah-Yentumi, S., and Kuwatsuka, S. 1982. Microbial



- degradation of benthocarb, MCPA and 2,4-D herbicides in pre-fused soil amended with organic matter and chemical fertilizer. *Soil Sci. Plant Nutr.* 28: 19-26.
11. Horsfall, J. E. 1979. Iatrogenic disease: mechanisms of action. Pages 343-355 in: *Plant Disease- An Advanced Treatise*. Vol. IV. J. E. Horsfall, and E. B. Cowling, eds. Academic Press, New York.
  12. Johnson, L. F., and Curl, E. A. 1972. *Methods for Research on the Ecology of Soil Borne Plant Pathogens*. Burgess Publishing Co., St. Paul. MN. 247pp.
  13. Kunc, F. 1992. Organic substrates and microbial conversion of herbicides in soil. *Dev. Agric. Managed-For. Ecol.* 25:155-164.
  14. Liu, W., Xu, H., and Chen, Z. 1991. Method for the determination of butachlor residues in water, soil and rice. *Pestic. Sci.* 33: 81-86.
  15. Loidl, M., Hinteregger, C., Ditzelmuller, G., Ferschl, A., and Streichsbier, F. 1990. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-borne *Pseudomonas acidovorans* strains. *Arch. Microbiol.* 155: 56-61.
  16. Masaphy, S., Levanon, D., and Henis, Y. 1996. Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 56: 207-214.
  17. Parekh, K. R., Walker, A., Roberts, S. J., and Welch, S. J. 1994. Rapid degradation of the trazine herbicide metatriton by a *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 467-475.
  18. Ramirez, C. 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical press, Amsterdam. New York. Oxford. 874 pp.
  19. Rifai M. A. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. *Mycological paper No.* 116.
  20. Schnurer, J., and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1256-1261.
  21. Shea, P. J. 1986. Detoxification of herbicide residues in soil. *Weed Sci.* 33(suppl. 2): 33-41.
  22. Smith, A. E., and Mortensen, K. 1991. Degradation of waste 2,4-D residues using a soil bacterium in a sprayer tank system. *Can. J. Soil Sci.* 74: 243-246.
  23. Smith, A. E., Mortensen, K., Aubin, A. J., and Molloy, M. M. 1994. Degradation of MCPA, 2, 4-D, and other phenoxyalkanoic acid herbicides using an isolated soil bacterium. *J. Agric. Food Chem.* 42: 401-405.
  24. Sykes, G., and Skinner, F. A. 1973. *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. Academic Press, New York. 339 pp.
  25. Tal, A., and Rubin, B. 1993. Metabolism of EPTC by pure bacterial culture isolated from thiocarbamate-treated soil. *Pestic. Sci.* 39: 207-212.

**ABSTRACT**

Huang, J. W.,<sup>1,2</sup> and Yeh, Y. L.<sup>1</sup> 2001. Evidence for enhancing microbial degradation of butachlor by amendment of soil with spent golden mushroom compost. *Plant Pathol. Bull.* 10:45-54. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C., <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail:jwhuang @dragon.nchu.edu.tw ; FAX:886-4-22851676.)

Spent golden mushroom compost (SGMC) was able to stimulate proliferation of microbial populations, especially *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp., and *Bacillus* spp. in the amended soil with or without 50ppm butachlor (2-chloro-2',6'-diethyl-N-(butoxymethyl)-acetanilide). Detecting microbial activity in soils containing 0-500ppm butachlor and 0-5% (w/w) SGMC by spectrophotometric determination of the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA), hydrolysis was found to increase with increasing concentrations of SGMC. However, the doses of butachlor didn't significantly affect microbial activity. Amendment of disinfested or non-disinfested soil containing 50ppm butachlor with non-sterilized SGMC could reduce more than 22% injury severity of tap roots of garden pea compared to amendment with sterilized SGMC. Among many predominant microorganisms isolated from the amended soil, *Rhizopus* sp.(F-101), *Trichoderma hamatum* (F-104), *T. aureoviride* (F-108), *T. koningii* (F-115), *Penicillium verrucosum* (F-116), *Streptomyces* sp. (A-107), *Streptomyces* sp. (A-112), and *Bacillus brevis* (B-109) were able to degrade butachlor in potato dextrose broth (PDB), or nutrient broth (NB). Especially, *Rhizopus* sp. (F-101), *Trichoderma hamatum* (F-104), *T. aureoviride* (F-108), *T. koningii* (F-115) and *Penicillium verrucosum* (F-116) were better than others in ability to degrade butachlor. Amendment of autoclaved or non-autoclaved soil with F-101 microbial compost, sterilized SGMC inoculated with *Rhizopus* sp. (F-101) and incubated for 7 days at 28 °C, was the same effective in alleviating root injury of garden pea seedlings by butachlor as amendment with non-sterilized SGMC.

Key words : biodegradation, butachlor, garden pea, herbicide, microbial compost, soil amendment.