ประสิทธิภาพการย่อยสลายไกลโฟเซตโดยแบคทีเรียและราที่แยกได้จากดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง

Efficiency of Glyphosate Biodegradation by Bacteria and Fungi Isolated from Cassava Fields

อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์[1*] จิตรา เกาะแก้ว[1] บุณฑริก ฉิมชาติ[1] กนกอร บุญพา[1] สนธยา ขำติ๊บ[1] มนต์ชัย มนัสสิลา[1] อำนาจ กะฐินเทศ[1] และธวัชชัย อินทร์บุญช่วย[2]

Amnat Eamvijarn[1*], Jitra Kokaew[1], Boontarik Chimchat[1], Kanokon Bunpha[1], Sontaya Khamtib[1], Monchai Manassila[1], Amnaj Katintet[1] and Tawatchai Inboonchuay[2]

Received: January 24, 2025
Revised: May 21, 2025
Accepted: June 4, 2025

Abstract: Glyphosate is a widely used herbicide that can accumulate and be detected in soil, water, and plants, posing environmental concerns. This study investigated the biodegradation of glyphosate by selecting bacteria and fungi isolated from cassava field soils with a history of glyphosate application. A total of 18 bacterial and fungal strains were screened for their ability to utilize glyphosate as a sole phosphorus and carbon source. Among them, *Bacillus pseudomycoides* (NMA-1), *Pseudomonas nitroreducens* (NMA-6) and Bacillus cereus (NMA-H1) exhibited significant growth with respective increases of 2,733.33%, 423.81% and 22.22%. Nine fungal strains of *Aspergillus* and *Trichoderma* also grew rapidly on media with glyphosate as a sole phosphorus source. The degradation of glyphosate at 50 mg/L revealed that *P. nitroreducens* (NMA-6), *P. nitroreducens* (NMA-5) and *B. pseudomycoides* (LRI-3) were able to degrade glyphosate by 51.25%, 49.45% and 32.58% respectively, within 7 days. Meanwhile, T. virens (GS515) and T. asperellum (GS552) degraded 55.53% and 33.13% of 1,690 mg/L of glyphosate within 15 days. Notably, *B. pseudomycoides* and *T. asperellum* are newly reported for glyphosate degradation. In contrast, *P. glycanilyticus* (LRI-4) and *T. harzianum* (GS485) showed no degradation ability. These findings highlight the potential of specific bacterial and fungal strains for glyphosate bioremediation.

Keywords: Bacteria, Degradation, Fungi, Glyphosate

บทคัดย่อ: ไกลโฟเซตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถสะสมในดิน น้ำ และพืช ก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ศึกษาการย่อยสลายไกลโฟเซตทางชีวภาพ โดยคัดเลือกแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากดินในแปลงปลูกมันสำปะหลังที่มีประวัติการใช้ไกลโฟเซต รวมทั้งหมด 18 สายพันธุ์ ถูกทดสอบความสามารถในการใช้ไกลโฟเซตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสและคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว พบว่า *Bacillus pseudomycoides*

[1]กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[1]Soil Science Research Group, Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

[2]ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2]Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author: am-nat@windowslive.com

(NMA-1) *Pseudomonas nitroreducens* (NMA-6) และ *B. cereus* (NMA-H1) มีการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีอัตราเติบโตเพิ่มขึ้น 2,733.33 423.81 และ 22.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบรา *Aspergillus* และ *Trichoderma* จำนวน 9 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้ไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส ผลการย่อยไกลโฟเซตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *P. nitroreducens* (NMA-6) P. nitroreducens (NMA-5) และ *B. pseudomycoides* (LRI-3) สามารถย่อยไกลโฟเซตได้ 51.25 49.45 และ 32.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน ขณะที่ *T. virens* (GS515) และ *T. asperellum* (GS552) สามารถย่อยไกลโฟเซตความเข้มข้น 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 55.53 และ 33.13 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 15 วัน ทั้งนี้ *B. pseudomycoides* และ *T. asperellum* เป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานการย่อยสลายไกลโฟเซตมาก่อน ในทางกลับกัน *P. glycanilyticus* (LRI-4) และ *T. harzianum* (GS485) ไม่สามารถย่อยไกลโฟเซตได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียและเชื้อราบางสายพันธุ์ในการย่อยสลายสารไกลโฟเซตทางชีวภาพ

คำสำคัญ: แบคทีเรีย, การย่อยสลาย, รา, ไกลโฟเซต

คำนำ

ในปี พ.ศ. 2566 ประเทศไทยนำเข้าสารไกลโฟเซต (glyphosate, $C_3H_8NO_5P$) จำนวน 26.72 ล้านกิโลกรัม (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2567) เพื่อใช้ในการกำจัดวัชพืชฤดูเดียวและวัชพืชข้ามปี จัดเป็นสารประเภทดูดซึม (systemic herbicide) ไม่เลือกทำลาย สามารถกำจัดวัชพืชได้ทั้งประเภทใบแคบ ใบกว้าง และกก ได้อย่างมีประสิทธิภาพและราคาถูก จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ของเกษตรกรกันอย่างแพร่หลายทั้งในพืชไร่ พืชสวน และพื้นที่ที่ไม่ใช้ทำการเกษตร การใช้สารไกลโฟเซตที่ความเข้มข้นสูงกว่าอัตราแนะนำต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมและตกค้างของสารไกลโฟเซตในผลผลิตทางการเกษตร เนื้อสัตว์ มูลสัตว์ คน แหล่งน้ำ และดิน (Kanissery *et al.*, 2019) โดยสารไกลโฟเซตจะยึดเกาะกับอนุภาคดินและพบว่าสะสมในปริมาณมากบริเวณผิวหน้าดิน โดยจะตกค้างในดินได้ไม่เกิน 6 เดือน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของดิน รวมถึงกระบวนการทางชีวภาพในดิน (Vencill, 2002; Henderson *et al.*, 2010) มีการศึกษาผลกระทบของสารไกลโฟเซตต่อจุลินทรีย์ดิน พบว่าสารไกลโฟเซตมีผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ดิน ได้แก่ แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสีท โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Aspergills, Fusarium, Pythium, Penicillium* และ *Trichoderma* มีประชากรเพิ่มสูงขึ้น (Meriles *et al.*, 2006; Hadi *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเซตได้ การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) นี้เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารไกลโฟเซตให้เป็น aminomethylphosphonic acid (AMPA) ซาร์โคซีน (sarcosine) และไกลซีน (Liu *et al.*, 1991) และสามารถใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในการเจริญเติบโต โดยรายงานของ Fan *et al.* (2012) แยกแบคทีเรีย *Bacillus cereus* จากดินที่มีการปนเปื้อนสารไกลโฟเซตในประเทศจีน โดย *B. cereus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเซตความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร ได้ 94.13 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาเพียง 5 วัน และจากการศึกษายังพบว่ามีแบคทีเรียอื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ *Agrobacterium, Alcaligenes, Arthobacter, Alterbacter, Bacillus, Enterobacter, Geobacillus, Ochrobactrum, Pseudomonas* และ *Streptomycete* ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเซตได้เช่นกัน (Zhan *et al.*, 2018) นอกจากนี้ มีการศึกษาราดินหลายชนิด เช่น *Alternaria, Aspergillus, Bipolaris, Fusarium, Mucor, Penicillium* และ *Trichoderma* ที่ทนทานและย่อยสลายสารไกลโฟเซตได้ โดยใช้เป็นแหล่งของ

คาร์บอนและฟอสฟอรัสในการเจริญเติบโต (Eman *et al*., 2013; Spinelli *et al*., 2021) ดังนั้นการคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเซตจากพื้นที่ที่มีการใช้สารดังกล่าว จะช่วยระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการลดการตกค้างของสารไกลโฟเซตในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน ได้แก่ การกระจายขนาดอนุภาค (particle size distribution) โดยวิธี Pipette (Gee and Bauder, 1986) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (National soil survey center, 1996) อินทรียวัตถุ (organic matter) โดยวิธี Walkley-Black (Nelson and Sommers, 1996) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus) โดยวิธี Bray II (Bray and Kurtz, 1945) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable potassium) (Thomas, 1982) และค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchange capacity; CEC) โดยใช้การชะละลายแคตไอออนด้วยสารละลาย 1 M NH_4Oac ที่เป็นกลาง (pH 7.0) (Chapman, 1965)

2. การคัดแยกแบคทีเรียและเชื้อราจากดิน

คัดแยกแบคทีเรียและเชื้อราจากดินในแปลงปลูกมันสำปะหลังที่พ่นไกลโฟเซตในการกำจัดวัชพืชของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชลพบุรี ต.โคกตูม อ.เมือง จ.ลพบุรี และ ต.สุขไพบูลย์ อ.เสิงสาง จ.นครราชสีมา แยกแบคทีเรียจากดินด้วยวิธี plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิมายด์ (cycloheximide) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไนสแตติน (nystatin) และเชื้อราจากดินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose ammonium nitrate agar (GAN) ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) โดยชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10-5 ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่ความเข้มข้น 10-3 - 10-5 ใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร NA และ GAN เกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอ (กรมวิชาการเกษตร, 2566) เมื่อแบคทีเรียและเชื้อราเจริญขึ้นมาทำการแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปจำแนกสกุล-ชนิด และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเซต

3. การจำแนกสกุล-ชนิดของแบคทีเรียและรา

จำแนกแบคทีเรียและราด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล (molecular identification) โดยสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัด Genomic DNA mini kit (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan) ศึกษายีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ rP2 (5'-ACGGCTACCTTG TTACGACTT-3') (Weisburg *et al*., 1991) และสกัดดีเอ็นเอราด้วยชุดสกัด Axyprep multisource genomic DNA miniprep kit (Axygen® Inc., USA) ศึกษายีนบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') และ ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') (White *et al*., 1990; Gardes and Bruns, 1993) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information เพื่อจำแนกสกุลและชนิด

4. การทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสและคาร์บอนของแบคทีเรีย

การทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสและคาร์บอนของแบคทีเรีย ดำเนินการตามวิธีของ Massot *et al*. (2021) เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร 2 ชนิด คือ basal salt-glyphosate medium agar (MSA) โดยไม่เติม K_2HPO_4 ที่เป็นแหล่งของฟอสฟอรัส (MSA-P) และอาหาร MSA ที่เติมสารไกลโฟเซต ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (MSA-P Gly) เพื่อทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร 2 ชนิด คือ basal salt-glyphosate medium agar (MSA) โดยไม่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (MSA-C) และอาหาร

MSA ที่เติมสารไกลโฟเซต ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (MSA-C Gly) เพื่อทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็น แหล่งของคาร์บอน โดยการเพาะจุลินทรีย์แบบจุด (spot inoculation) จำนวน 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดความกว้างของโคโลนี และประเมินประสิทธิภาพการเจริญของแบคทีเรีย (สมการที่ 1)

$$\%Growth = \frac{\text{Growth rate of colony on media - Growth rate of colony on media-P/-C} \times 100}{\text{Growth rate of colony on media-P/-C}} \quad \text{(สมการที่ 1)}$$

5. การทดสอบการใช้ไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสของรา

การทดสอบการใช้ไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสของรา ดำเนินการตามวิธีของ Spinelli *et al.*(2021) เลี้ยงราบนอาหาร czapek dox agar (CZA) โดยไม่เติม K_2HPO_4 ที่เป็นแหล่งของฟอสฟอรัส (CZA-P) และอาหาร CZA ที่เติมไกลโฟเซต ความเข้มข้น 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร (CZA-Gly) โดยการเพาะจุลินทรีย์แบบจุด จำนวน 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วัดความกว้างของโคโลนี และประเมินประสิทธิภาพการเจริญของรา (สมการที่ 1)

6. การทดสอบการย่อยสลายไกลโฟเซต

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสารไกลโฟเซต เลี้ยงในอาหาร MSB-Gly ที่เติมสารไกลโฟเซตความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีปริมาณ 10^8 CFU จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MSB-Gly ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ส่วนราเลี้ยงในอาหาร czapek dox broth (CZB-Gly) ที่เติมไกลโฟเซตความเข้มข้น 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร และราที่ใช้ทดสอบอายุ 7 วัน โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ในอาหาร CZB-Gly ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ นำชุดทดสอบทั้งหมดไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สำหรับแบคทีเรีย และ 14 วัน สำหรับรา (Carranza *et al.*, 2017; Massot *et al.*, 2021) กรองตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ตวงตัวอย่างปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นปิเปตตัวอย่างส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Hsiao *et al.*, 2007) ทำ derivatization ด้วย 0.02 M FMOC-Cl จำนวน 1 มิลลิลิตร และ 0.05 M borate buffer จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่าด้วยเครื่อง shaker homogenizer ที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที เติม diethyl ether จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่า 3 นาที ทิ้งส่วนของชั้นบน เติม HCl ความเข้มข้น 10% w/v จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองตัวอย่างด้วย PTFE (0.45 µm) ใส่ในขวด vial วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC-FLD ยี่ห้อ Agilent Technology รุ่น 1290 ประเทศสหรัฐอเมริกา (Garba *et al.*, 2018) แยกสารด้วยคอลัมน์ reverse phase C_{18} โมบายเฟส 50 mM KH_2PO_4 และ acetonitrile สภาวะการแยกสารไกลโฟเซตโดยใช้ gradient elution เมื่อ flow rate คงที่ ที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ mobile phase A คือ 50 mM KH2PO4 และ mobile phase B คือ acetonitrile เริ่ม flow โดยใช้สัดส่วน mobile phase A:B ที่ 70:30 และจากนาทีที่ 0 ไปนาทีที่ 5 ปรับอัตราส่วน A:B จาก 70:30 เป็น 50:50 จากนั้นนาทีที่ 5 ถึง 8 ปรับอัตราส่วน A:B จาก 50:50 เป็น 20:80 และนาทีที่ 8 ถึง 10 ปรับอัตราส่วน A:B จาก 20:80 มาเป็น 70:30

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

ผลการวิเคราะห์ดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดลพบุรีพบว่าเนื้อดินเป็นดินร่วน มีอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลาง เท่ากับ 17.7 กรัมต่อกิโลกรัม ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับปานกลาง เท่ากับ 17.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูง เท่ากับ 112.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความจุในการแลกเปลี่ยน

แคตไอออนอยู่ในระดับปานกลาง มีค่า pH เป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง (6.0 – 6.6) และผลการวิเคราะห์ดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดนครราชสีมา พบว่ามีเนื้อดินเป็นดินเหนียว มีอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลาง เท่ากับ 32.0 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูง เท่ากับ 86.6 และ 134.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนอยู่ในระดับสูง มีค่า pH เป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง (5.9 - 6.80)

ผลการวิเคราะห์สารไกลโฟเซตที่ตกค้างในดินพบว่า ดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดลพบุรี พบสารไกลโฟเซต ในดินตั้งแต่ 1.06 ถึง 1.24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน และดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดนครราชสีมา พบสารไกลโฟเซต ในดินตั้งแต่ 1.82 ถึง 2.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งหลังจากพ่นสารไกลโฟเซต 60 วัน พบว่าปริมาณสารไกลโฟเซตจะลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Henderson *et al.* (2010) ที่พบว่าสารไกลโฟเซต มีค่าครึ่งชีวิตในดินนานถึง 197 วัน ทั้งนี้การคงอยู่ของสารไกลโฟเซตในดินขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีดิน และสภาพภูมิอากาศ และ Albers *et al.* (2009) รายงานว่าสารไกลโฟเซตจะถูกดูดซับโดยกรดฮิวมิก และมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรียวัตถุในดินอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าหลังจากพ่นสารไกลโฟเซต 80 วัน พบว่าสารไกลโฟเซตประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ถูกดูดซับโดยกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคในดินทราย และจะถูกปลดปล่อยได้ง่ายกว่าสารไกลโฟเซตที่ถูกดูดซับโดยผลึกของเหล็กและอะลูมินัมออกไซด์ในดินเหนียว

การจำแนกสกุล-ชนิดของแบคทีเรียและรา

การจำแนกสกุล-ชนิด ด้วยเทคนิคอณูชีววิทยาของแบคทีเรีย จำนวน 9 สายพันธุ์ จำแนกเป็น *Arthrobacter* sp. (LRI-1), *Bacillus cereus* (LRI-2), *B. pseudomycoides* (LRI-3, NMA-1), *B. cereus* (NMA-H1), *Paenibacillus glycanilyticus* (LRI-4), *Paenibacillus phyllosphaerae* (NMA-10) และ *Pseudomonas nitroreducens* (NMA-5, NMA-6) และรา จำนวน 9 สายพันธุ์ จำแนกเป็น *Aspergillus tamarii* (GS544-1), *Aspergillus terreus* (GS481-2, GS483, GS488-4), *Trichoderma asperellum* (GS517, GS549, GS552), *Trichoderma harzianum* (GS485) และ *Trichoderma virens* (GS515) ซึ่งผลการจำแนกของแบคทีเรียและราทั้งหมดมีค่าเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์ (identity percentage) อยู่ในช่วง 99.18 – 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นอยู่กับระยะทางวิวัฒนาการ (evolutionary distance) นั้น วิเคราะห์จากค่าเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์จะให้ค่าประมาณที่เป็นประโยชน์ ซึ่งโดยปกติจะพิจารณาว่าสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกันหรือเป็นชนิดเดียวกัน เมื่อเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์มีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (Pearson, 2013)

Table 1 Bacteria and fungi isolated from soil in Lopburi City District, Lopburi and Soeng Sang District, Nakhon Ratcha-

Strain	Identified Species	Identity percentage	Accession number
LRI-1	*Arthrobacter* sp.	99.18	KY082713.1
LRI-2	*Bacillus cereus*	99.93	MK574960.1
LRI-3	*Bacillus pseudomycoides*	100	MN421118.1
NMA-1	*Bacillus pseudomycoides*	99.43	MG780243.1
NMA-H1	*Bacillus cereus*	99.50	MW548688.1
LRI-4	*Paenibacillus glycanilyticus*	99.44	KY660619.1
NMA-10	*Paenibacillus phyllosphaerae*	99.58	NR_043008.1
NMA-5	*Pseudomonas nitroreducens*	99.64	MH324395.1
NMA-6	*Pseudomonas nitroreducens*	99.93	MH324395.1
GS544-1	*Aspergillus tamarii*	99.49	MK638758.1

Table 1 (continue)

Strain	Identified Species	Identity percentage	Accession number
GS481-2	*Aspergillus terreus*	99.22	OP268179.1
GS483	*Aspergillus terreus*	99.36	MN623249.1
GS488-4	*Aspergillus terreus*	99.36	MT316343.1
GS 517	*Trichoderma asperellum*	100	MT529846.1
GS549	*Trichoderma asperellum*	100	MG171157.1
GS 552	*Trichoderma asperellum*	100	MT529846.1
GS485	*Trichoderma harzianum*	100	MT529404.1
GS 515	*Trichoderma virens*	100	MT529862.1

การทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสและคาร์บอนของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียได้ จำนวน 9 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบการบนอาหาร MSA-P และ MSA-P Gly ที่เติมสารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส พบว่า แบคทีเรียเจริญบนอาหาร MSA-P Gly ได้ดีกว่าบนอาหาร MSA-P อยู่ระหว่าง 2.04 – 2,733.33 เปอร์เซ็นต์โดย *Bacillus pseudomycoides* (NMA-1) เจริญได้สูงสุดถึง 2,733.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา *B. pseudomycoides* (LRI-3), *Pseudomonas nitroreducens* (NMA-6, NMA-5) เท่ากับ 2,033.33, 423.81 และ 284.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ *Arthrobacter* sp. (LRI-1) เจริญได้น้อยสุดเพียง 2.04 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) ในทางเดียวกันเมื่อใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของคาร์บอนบนอาหาร MSA-C และ MSA-C Gly จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียเจริญบนอาหาร MSA-C Gly ได้ดีกว่าบนอาหาร MSA-C โดย *B. pseudomycoides* (LRI-3) เจริญได้สูงสุด มีความกว้างของโคโลนี 1.73±0.67 มิลลิเมตร รองลงมา *P. nitroreducens* (NMA-6, NMA-5) และ *Bacillus pseudomycoides* (NMA-1) เท่ากับ 1.43±0.03, 1.05±0.13 และ 0.57±0.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่า *Bacillus cereus* (LRI-2) และ *Paenibacillus phyllosphaerae* (NMA-10) มีการเจริญบนอาหาร MSA-C Gly และ MSA-C เท่ากัน มีความกว้างของโคโลนี 0.25 และ 0.10 มิลลิเมตร เมื่อประเมินประสิทธิภาพการเจริญการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของคาร์บอนบนอาหารของแบคทีเรีย พบว่าอยู่ในช่วง 0 – 1,333.33 เปอร์เซ็นต์ โดย *P. nitroreducens* (NMA-6) เจริญได้สูงสุดถึง 1,333.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา *P. nitroreducens* (NMA-5), *B. pseudomycoides* (LRI-3, NMA-1) เท่ากับ 231.58, 193.79 และ 78.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2) ผลการศึกษาสอดคล้องกับที่มีรายงานพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเซต เช่น *B. aryabhattai, B. cereus, B. megaterium* และ *B. subtilis* (Fan *et al*., 2012; Singh *et al*., 2019) ส่วน *B. pseudomycoides* พบเป็นครั้งแรกที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเซต ขณะที่ *P. nitroreducens* ที่แยกได้จากดินในสวนปาล์มน้ำมันที่มีการใช้สารไกลโฟเซตมาอย่างต่อเนื่อง พบว่า มียีนต้านทานสารไกลโฟเซต (Tan *et al*., 2020) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอื่นอีกหลายชนิดที่สามารถเปลี่ยนสารไกลโฟเซตให้เป็น aminomethylphosphonic acid (AMPA) ซาร์โคซีน (sarcosine) ไกลซีน ฟอสเฟต และฟอร์มัลดีไฮด์ เพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน ฟอสฟอรัส และไนโตรเจนในการเจริญ ตัวอย่างเช่น *Agrobacterium radiobacter, Arthrobacter atrocyaneus, Comamonas odontotermitis, Enterobacter cloacae, Geobacillus caldoxylosilyticus, Ochrobactrum anthropi, Pseudomonas pseudomallei* และ *Streptomycete* sp. (Zhan *et al*., 2018)

Table 2 Diametric measurements of bacterial colonies after 7 days of growth on MSA without K2HPO4 and glucose but supplemented with glyphosate 50 mg/L at 30 °C.

Bacterial strain	Glyphosate as a P source			Glyphosate as a C source		
	MSA-P	MSA-P Gly	% Growth	MSA-C	MSA-C Gly	% Growth
Arthrobacter sp. (LRI-1)	0.49±0.02*	0.50±0.00	2.04	0.50±0.09	0.60±0.09	20.00
Bacillus cereus (LRI-2)	0.88±0.06	1.30±0.41	47.17	0.25±0.05	0.25±0.00	0.00
Bacillus pseudomycoides (LRI-3)	0.15±0.00	3.20±0.35	2033.33	0.59±0.07	1.73±0.67	193.79
Bacillus pseudomycoides (NMA-1)	0.10±0.00	2.83±0.06	2733.33	0.32±0.03	0.57±0.06	78.95
Bacillus cereus (NMA-H1)	0.90±0.09	1.10±1.04	22.22	0.31±0.01	0.32±0.03	2.70
Paenibacillus glycanilyticus (LRI-4)	0.57±0.06	0.70±0.17	23.53	0.13±0.03	0.18±0.03	37.50
Paenibacillus phyllosphaerae (NMA-10)	0.53±0.06	0.63±0.03	18.75	0.10±0.00	0.10±0.00	0.00
Pseudomonas nitroreducens (NMA-5)	0.73±0.06	2.82±0.26	284.09	0.32±0.03	1.05±0.13	231.58
Pseudomonas nitroreducens (NMA-6)	0.70±0.10	3.67±0.31	423.81	0.10±0.00	1.43±0.03	1333.33

*mean±SD

การทดสอบการใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสของรา

ราสกุล *Aspergillus* และ *Trichoderma* สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ มูลสัตว์ พืช เศษซากพืชและสัตว์ ทะเล ทะเลทราย และอากาศ ส่วนใหญ่เจริญและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถพบได้ทุกภูมิภาคทั่วโลก (Týskiewicz *et al*., 2022; Zakaria, 2024) มีรายงานว่า *A. flavus, A. niger, A. oryzae, A. tamarii* และ *A. terreus* สามารถทนทานและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเซต โดยที่ *A. flavus, A. niger* และ *A. terreus* สามารถทนทานได้ถึง 10,000 ppm (Eman *et al*., 2013) ในทางเดียวกันมีงานวิจัยพบว่า สปอร์รา *Trichoderma viride* มีปริมาณเพิ่มขึ้นในดินที่มีไกลโฟเซตและสามารถย่อยสลายไกลโฟเซตได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 28 วัน (Arfarita *et al*., 2016) การทดลองนี้คัดเลือกรา จำนวน 9 สายพันธุ์ ทดสอบบนอาหาร czapek dox agar (CZA) อาหารที่ตัดแหล่งของฟอสฟอรัส (CZA-P) และอาหาร CZA ที่เติมสารไกลโฟเซตความเข้มข้น 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร (CZA-Gly) พบว่า ราทั้ง 9 สายพันธุ์เจริญได้ดีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 9 เซนติเมตร ยกเว้น *A. tamarii* (GS544-1) มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร CZA-Gly ได้เพียง 8.70 เซนติเมตร (Figure 1) ทั้งนี้ลักษณะโคโลนีของรามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อตัดหรือเติมสารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส โดยพบว่า เส้นใยเชื้อรา (mycelium) ทุกสายพันธุ์ บนอาหาร CZA-P มีสีเข้มมากขึ้น ขณะที่บนอาหาร CZA-Gly มีสีจางลง เมื่อเทียบกับเส้นใยเชื้อราบนอาหาร CZA ขณะที่ปริมาณสปอร์ของรา *Trichoderma harzianum* (GS-485), *T. asperellum* (GS-517, GS-549, GS-552) บนอาหาร CZA-P เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารอื่น ๆ (Figure 1) ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Johri *et al*. (2015) รายงานว่าฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญในการเจริญเติบโตและการสร้างส่วนขยายพันธุ์ การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การสะสมพลังงาน และการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา

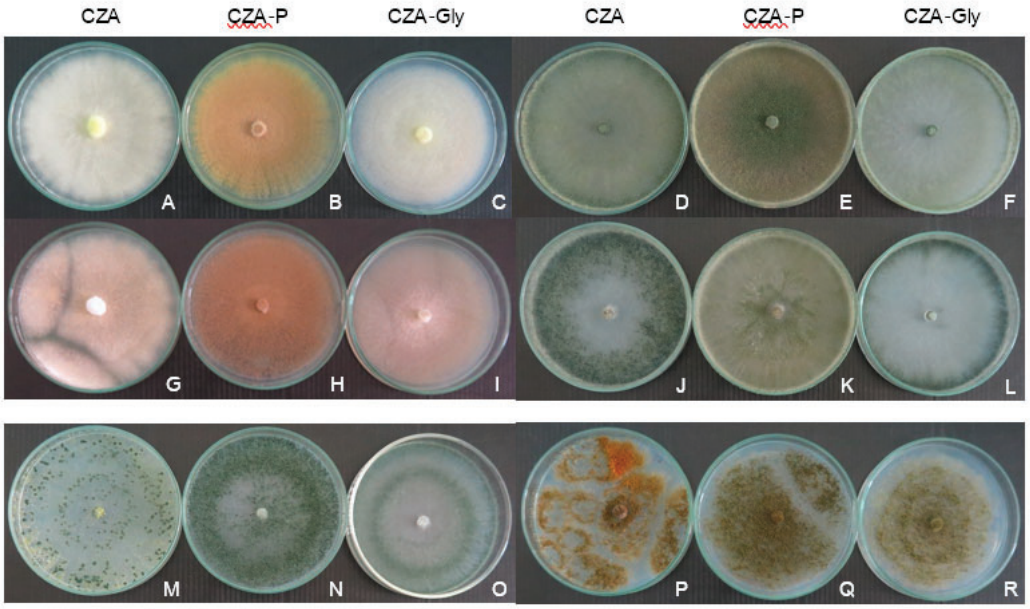


Figure 1 Fungal colonies on CZA, CZA-P and CZA containing 1,690 mg/L of glyphosate (CZA-Gly) at 14 days of incubation. *Aspergillus terreus* (GS-483) (A, B, C), *Trichoderma harzianum* (GS-485) (D, E, F), *A. terreus* (GS-488-4) (G, H, I), *T. virens* (GS-515) (J, K, L), *T. asperellum* (GS-517) (M, N, O), and *A. tamarii* (GS544-1) (O, Q, R).

การทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเซต

การย่อยสลายสารไกลโฟเซตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า แบคทีเรีย จำนวน 7 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลาย โดยที่ *P. nitroreducens* (NMA-6) มีการย่อยได้สูงสุด 51.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *P. nitroreducens* (NMA-5), *B. pseudomycoides* (LRI-3) และ *P. phyllosphaerae* (NMA-10) มีการย่อยได้ 49.45, 32.58 และ 24.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* (LRI-2) และ *P. glycanilyticus* (LRI-4) ที่ไม่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเซตได้ และเมื่อทดสอบกับรา พบว่า รา *T. virens* (GS515) สามารถย่อยสารไกลโฟเซตได้สูงสุด 55.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *T. asperellum* (GS517), *T. asperellum* (GS552) และ *A. tamarii* (GS544-1) มีการย่อยได้ 33.13, 22.84 และ 21.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 3) ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีรายงานว่ารา *T. asperellum* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเซต ขณะที่ *P. glycanilyticus* (LRI-4) และ *T. harzianum* (GS485) ไม่มีความสามารถในการย่อยสารไกลโฟเซต ทั้งนี้ประสิทธิภาพการย่อยสลายมีความแตกต่างขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียและราแต่ละชนิดมีกลไกและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเซตแตกต่างกัน โดยจะผลิตเอนไซม์ glyphosate oxidoreductase, carbon-phosphorus lyase (c-p lyase) และ sarcosine oxidase เพื่อเปลี่ยนไกลโฟเซตให้เป็นคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสสำหรับใช้ในการเจริญ (Castrejón-Godínez *et al.*, 2021) การแยกแบคทีเรียส่วนใหญ่จะแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนหรือมีการใช้สารไกลโฟเซตมาอย่างต่อเนื่อง โดยมีงานวิจัยของ Fan *et al.* (2012) แยกแบคทีเรีย *B. cereus* จากดินที่มีการปนเปื้อนสารไกลโฟเซต เมื่อนำไปทดสอบการย่อยสารไกลโฟเซตที่ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร สามารถย่อยได้ 94.13 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาเพียง 5 วัน ในทางเดียวกันมีรายงานพบว่ารา *Trichoderma viride* และ *Aspergillus terreus* มีประสิทธิภาพในการย่อยไกลโฟเซตได้ดีเช่นกัน (Arfarita *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2020)

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย จำนวน 9 สายพันธุ์และเชื้อรา จำนวน 9 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหารสังเคราะห์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และมีรายงานความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น แห้งแล้ง น้ำท่วม แหล่งอาหารไม่สมบูรณ์ ความเป็นกรดสูง เป็นต้น ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียและเชื้อรามาใช้ประโยชน์ในการฟื้นฟูดินจึงเป็นแนวทางสำคัญในการลดการปนเปื้อนสารไกลโฟเซตและทำให้ดินเหมาะสมกับการทำการเกษตรในปัจจุบัน

Table 3 Biodegradation of glyphosate by bacterial isolates on MSB-Gly and fungal isolates on CZB supplemented with 1,690 mg/L of glyphosate.

Strain	Percentage degradation
Bacteria	
Arthrobacter sp. (LRI-1)	5.49
Bacillus cereus (NMA-H1)	17.59
Bacillus cereus (LRI-2)	0.00
Bacillus pseudomycoides (LRI-3)	32.58
Bacillus pseudomycoides (NMA-1)	17.22
Paenibacillus glycanilyticus (LRI-4)	0.00
Paenibacillus phyllosphaerae (NMA-10)	24.16
Pseudomonas nitroreducens (NMA-5)	49.45
Pseudomonas nitroreducens (NMA-6)	51.25
Fungi	
Aspergillus tamarii (GS544-1)	21.40
Aspergillus terreus (GS481-2)	7.07
Aspergillus terreus (GS483)	10.14
Aspergillus terreus (GS488-4)	11.43
Trichoderma asperellum (GS517)	22.84
Trichoderma asperellum (GS549)	12.86
Trichoderma asperellum (GS552)	33.13
Trichoderma harzianum (GS485)	0.00
Trichoderma virens (GS515)	55.53

สรุป

คัดเลือกแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ และเชื้อรา 9 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสและคาร์บอน แบคทีเรีย *Bacillus pseudomycoides* (NMA-1) และ *B. pseudomycoides* (LRI-3) เจริญได้สูงสุดเมื่อใช้สารไกลโฟเซตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสและคาร์บอน รองลงมาเป็น *Pseudomonas nitroreducens* (NMA-6) และ *P. nitroreducens* (NMA-5) ขณะที่รา *Aspergillus* และ *Trichoderma* ทั้ง 9 สายพันธุ์ เจริญได้ดีบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเซตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัส ในการทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเซต แบคทีเรีย *P. nitroreducens* (NMA-6) มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ 51.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *P. nitroreducens* (NMA-5), *B. pseudomycoides* (LRI-3) และ *P. phyllosphaerae* (NMA-10) ส่วนรา

T. virens (GS515) สามารถย่อยสารไกลโฟเซตได้สูงสุดที่ 55.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *T. asperellum* (GS517), *T. asperellum* (GS552) และ *A. tamarii* (GS544-1) ซึ่ง *Bacillus pseudomycoides* และ *T. asperellum* ยังไม่เคยมีรายงานการทดสอบการย่อยสลายสารไกลโฟเซต ขณะที่ *B. cereus* (LRI-2), *P. glycanilyticus* (LRI-4) และ *T. harzianum* (GS485) ไม่สามารถย่อยสารไกลโฟเซตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2566. คู่มือตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร. 62 หน้า..

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2567. สรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร-ปี-2566 รายชื่อวัตถุอันตราย. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://shorturl.at/2G1nu (19 พฤศจิกายน 2567).

Albers, C.N., G.T. Banta, P.E. Hansen and O.S. Jacobsen. 2009. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil-comparing different soils and humic substances. Environmental Pollution 157 (10): 2865–2870.

Arfarita, N.D., Djuhari, B. Prasetya and T. Imai. 2016. The application of Trichoderma viride strain FRP 3 for biodegradation of glyphosate herbicide in contaminated land. AGRIVITA Journal of Agricultural Science 38(3): 275-281.

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available form of phosphorus in soil. Soil Science 59: 39 - 45.

Carranza, C.S., C.L. Barberis, S.M. Chiacchiera and C.E. Magnoli. 2017. Assessment of growth of *Aspergillus* spp. from agricultural soils in the presence of glyphosate. Revista Argentina de Microbiología 49(4): 384-393.

Castrejón-Godínez, M.L., E. Tovar-Sánchez, L. Valencia-Cuevas, M.E. Rosas-Ramírez, A. Rodríguez and P. Mussali-Galante. 2021. Glyphosate pollution treatment and microbial degradation alternatives, a review. Microorganisms 9: 2322.

Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. pp. 891-901. *In:* C.A. Black, (Ed.). Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy No. 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Eman, A., A. Abdel-Megeed, A.A. Suliman, M.W. Sadik and E.N. Sholkamy. 2013. Biodegradation of glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh area. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2(8): 359-381.

Fan, J., G. Yang, H. Zhao, G. Shi, Y. Geng, T. Hou and K. Tao. 2012. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. The Journal of General and Applied Microbiology 58: 263-271.

Garba, J., A.W. Samsuri, R. Othman and M.S.A Hamdani. 2018. Simplified method for derivatization of extractable glyphosate

and aminomethylphosphonic acid and their determination by high performance liquid chromatography. Environmental Research and Technology 1(2): 19-30.

Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2(2): 113–118.

Gee, G.W. and J.W. Bauder. 1986. Particle size analysis. In: Methods of Soil Analysis, Part A. Klute (ed.). 2 Ed., Vol. 9 nd. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. 1206 p.

Johri, A.K., R. Oelmüller, M. Dua, V. Yadav, M. Kumar, N. Tuteja, A. Varma, P. Bonfante, B.L. Persson and R.M. Stroud. 2015. Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects. Frontiers in Microbiology 6: 984.

Hadi, F., A. Mousavi, K.A. Noghabi, H.G. Tabar and A.H. Salmanian. 2013. New bacterial strain of the genus Ochrobactrum with glyphosate-degrading activity. Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 48: 208-213.

Henderson, A. M., J.A. Gervais, B. Luukinen, K. Buhl, D. Stone, A. Strid, A. Cross and J. Jenkins. 2010. Glyphosate technical fact sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. http://npic.orst.edu/factsheets/archive/glyphotech.html.

Hsiao, C.L., C.C. Young and C.Y. Wang. 2007. Screening and identification of glufosinate-degrading bacteria from glufosinate-treated soils. Weed Science 55(6): 631-637.

Kanissery, R., B. Gairhe, D. Kadyampakeni, O. Batuman and F. Alferez. 2019. Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. Plants 8: 499.

Liu, C.M., P.A. McLean, C.C. Sookdeo and F.C. Cannon. 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. Applied and Environmental Microbiology 57(6): 1799–1804.

Massot, F., P. Gkorezis, J.V. Hamme, D. Marino, B.S. Trifunovic, G. Vukovic, J. d'Haen, I. Pintelon, A.M. Giulietti, L. Merini, J. Vangronsveld and S. Thijs. 2021. Isolation, biochemical and genomic characterization of glyphosate tolerant bacteria to perform microbe-assisted phytoremediation. Frontiers in Microbiology 11: 598507.

Meriles, J.M., S.V.V. Gil, R.J. Haro, G.J March and C.A. Guzman. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. Journal of Phytopathology 154(5): 309-316.

National Soil Survey Center. 1996. Soil Survey Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations. Report No. 42, Version 3.0 Natural Resources Conservation Service, United States, Department of Agriculture, Lincoln, Nebraska.

Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon and organic

matter. pp. 961-1010. *In*: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke and R.H. Loeppert (Eds.). Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Method. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Pearson W.R. 2013. An introduction to sequence similarity ("Homology") searching current protocols in bioinformatics 3. Current Protocols in Bioinformatics Chapter 3: Unit3.1.

Singh, S., V. Kumar and J. Singh. 2019. Kinetic study of the biodegradation of glyphosate by indigenous soil bacterial isolates in presence of humic acid, Fe(III) and Cu(II) ions. Journal of Environmental Chemical Engineering 7: 103098.

Singh, S., V. Kumar, J.P.K. Gill, S. Datta, S. Singh, V. Dhaka, D. Kapoor, A.B. Wani, D.S. Dhanjal, M. Kumar, S.L. Harikumar and J. Singh. 2020. Herbicide glyphosate: toxicity and microbial degradation. International Journal of Environmental Research and Public Health 17: 7519

Spinelli, V., A. Ceci, C.D. Bosco, A. Gentili and A.M. Persiani. 2021. Glyphosate-eating fungi: study on fungal saprotrophic strains' ability to tolerate and utilise glyphosate as a nutritional source and on the ability of *Purpureocillium lilacinum* to degrade it. Microorganisms 9: 2179.

Tan, X.L., R.Y. Othman and C.H. Teo. 2020. Isolation and functional characterization of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase gene from glyphosate-tolerant Pseudomonas nitroreducens strains FY43 and FY47. 3 Biotech 10: 183.

Thomas, G.W. 1982. Exchangeable cations. pp. 159-165. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, eds. Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Týskiewicz, R., A. Nowak, E. Ozimek and J. Jaroszuk-Sciset. 2022. Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. International Journal of Molecular Sciences 23: 2329.

Vencill, W. K. 2002. Herbicide Handbook, 8th ed. Weed Science Society of America, Lawrence,Kansas. 493 p.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology173(2): 697-703.

White, T.J., T.D. Bruns, S.B. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York.

Zakaria, L. 2024. An overview of Aspergillus species associated with plant diseases. Pathogens 13: 813.

Zhan, H., Y. Feng, X. Fan and S. Chen. 2018. Recent advances in glyphosate biodegradation. Applied Microbiology and Biotechnology 102(12): 5033-5043.