

Om biologisk virkning og sønderdeling af thiourinstof i jord og staldgødning

Af H. L. JENSEN og E. BENDIXEN

Thiourinstof, $CS(NH_2)_2$, er i nyeste tid foreslået anvendt til bekæmpelse af fluelarver i møddinger. Efter oplysning fra forstander *H. Wichmand*, Statens Skadedyrslaboratorium, vil der kræves 25—40 g heraf pr. m^2 møddingoverflade, således at gødningen kan anslås til at få et gennemsnitsindhold på 25—40 g thiourinstof pr. ton. Der vil følgelig ved udbringning af 40 tons sådan gødning pr. ha tilføres marken ca. 1—2 kg thiourinstof pr. ha, forudsat at intet udvaskes med møgsaften eller sønderdeles under gødnings lagring i møddingen.

Skønt det således kun drejer sig om beskedne mængder thiourinstof, er det ønskeligt at være orienteret over dette stofs virkning i jordbunden, inden det tages i brug i praksis. Thiourinstof har udprægede fysiologiske giftvirkninger (bl. a. antithyroid-virkning), der betinger dets anvendelighed som larvicid, og det synes tillige at være et biologisk ret svært omsætteligt stof, der ved fortsat anvendelse kan tænkes ophobet i jorden med uheldige følger. Dets indflydelse på de mikrobiologiske livsprocesser er lidet kendt, men det vides selv i små mængder at hemme nitrifikationen og specielt iltningen af ammoniak til nitrit såvel i jord (*Quastel og Scholefield 1951*) som i renkultur (*Lees 1952, Jensen og Sørensen 1952*). Man har nævnt muligheden af at kunne benytte det til at bremse nitrifikationen i tropiske jorder og således forebygge nitratudvaskning i regntiden (*Lees 1953*). Endvidere eksisterer de muligheder, at thiourinstoffet kan optages af planterne og enten direkte skade væksten eller være farligt for mennesker og husdyr, og at det ved sin chelatdannende evne kan gøre tunge metaller, f. eks. kobber, utilgængelige for planterne.

En oversigt over vort sparsomme kendskab til thiourinstoffets biologiske sønderdelelighed er givet andetsteds (*Jensen 1957*).

Forskellige tidligere iagttagelser tyder på, at enkelte bakterier og svampe i ringe grad kan udnytte dets kvælstof og svovl som næringsstoffer eller omsætte det under svovlbrintedannelse. Kvantitative forsøg (*Jensen 1957*) har vist, at visse skimmel-svampe kan anvende thiourinstof som en mindreværdig kvælstofkilde, der kun tillader en langsom vækst og ikke udnyttes fuldstændigt; samtidig iltes i nogle tilfælde en del af dets svovl til sulfat. Visse svovlbakterier (*Thiobacillus*) kan som energikilde udnytte flere reducerede svovlforbindelser, så vidt vides dog ikke thiourinstof. Over dets bestandighed i jordbunden foreligger kun et par iagttagelser. Ifølge *Quastel og Scholefield (1951)* varer undertrykkelsen af nitrifikationen i jord under gennemstrømning med en 0.03 millimolær thiourinstofopløsning mindst 2—3 uger. *Fuller o. a. (1950)* fandt, at ved tilsætning af 0,02 pct. thiourinstof-kvælstof til alkalisk jord (Rt 7,9) hemmedes nitrifikationen fuldkomment i de første 5 og meget stærkt i de følgende 8 uger; derimod skete der en meget stærk ammoniakdannelse, idet summen af nitrat- og ammoniakkvælstof efter 90 dage var ca. 3½ gange så stor som i kontroljord. Den halve mængde thiourinstof (0,01 pct. kvælstof) hemmede kun nitrifikationen i 2 uger, og efter 11 uger var ca. 25 pct. af dets kvælstof omdannet til nitrat og ca. 30 pct. til ammoniak. Forsøg efter *Neubauer's* metode viste selv efter lang tids forløb udpræget skadevirkning af den sidstnævnte thiourinstofmængde overfor bygkimplanter. Helt andre resultater gav to gødningsforsøg i byg på jord af Rt 7,9 og 8,0, hvor tilførsel af 50 lb thiourinstofkvælstof pr. acre (= ca. 56 kg/ha) i begge tilfælde gav et merudbytte på 62 pct., men tilsvarende mængde svovlsur ammoniak kun 32 og 39 pct. *Frederick o. a. (1957)* anvendte den unægtelig drastiske tilsætning af 1 pct. thiourinstof til jord af Rt 6,1, hvor der foregik en langsom sønderdeling, idet kun 9 pct. af det tilsatte svovl iltedes til sulfat efter 21 uger; samtidig indtrådte en meget stærk og langvarig nedgang i antallet af jordens mikroorganismer. Gennemstrømningsforsøg med 0,5 pct. thiourinstofopløsning viste i 6 uger ingen sulfatdannelse, der heller ikke iagttoges i en mere frugtbar jord af Rt 7,7.

I nærværende arbejde omtales i tilslutning til en tidligere meddelelse (*Jensen 1957*) nogle forsøg over virkning og nedbrydning

af mindre mængder thiourinstof i dyrkede jorder samt dets holdbarhed i møddingen og dets indflydelse på dyrkede planter. Forsøgene i jord udførtes ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling, medens de kvantitative spektrofotometriske bestemmelser af thiourinstof i staldgødning og planter blev foretaget ved Kemikaliekontrollen.

Bestemmelser af thiourinstof i gødning

For at undersøge, hvorvidt thiourinstof sønderdeles eller udvaskes under gødningens lagring i møddingen, blev der på grundlag af den i Official Methods Of Analysis Of The Association Of Official Agricultural Chemists (1955) angivne metode til bestemmelse af thiourinstof i frugtsaft etc. udarbejdet en metode til kvantitativt at følge nedbrydningen og udvaskningen af thiourinstof.

Den anvendte analysemetode er en kolorimetrisk bestemmelse med Grote-reagens, som med thiourinstof giver en blå farve, der efter nærmere undersøgelser viste sig velegnet til kvantitativ bestemmelse heraf.

Fremstilling af Grote-reagens. I en 50 ml erlenmeyerkolbe opløses 0,5 g natriumnitroprussid ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 10 ml destilleret vand. Når det er helt opløst, tilsættes nøjagtig 1,5 g af en blanding bestående af 0,5 g hydroxylaminhydrochlorid og 1,0 g natriumbikarbonat (p. a.). Under tilsætningen, der skal foretages langsomt, da der forekommer en kraftig kuldioxydudvikling, må kolben ikke rystes. Når luftudviklingen er næsten ophørt, tilsættes 0,10 ml. brom (p. a.) (11 små dråber). Efter henstand i nogle timer filtreres vædsken og fortyndes med destilleret vand til 25,0 ml. Reagenset skal henstå ved stuetemperatur i 5—10 timer, hvorefter det opbevares i isskab. AOAC angiver, at reagenset under disse betingelser er holdbart i nogle uger, men på kemikaliekontrollen har man opbevaret et reagens i ca. et år og stadig fundet det anvendeligt. Reagenset skal være farvet mørkt mahogni-brunt; dersom det er grønligt, er det uanvendeligt. Reagenset må afprøves, før det tages i brug. Hertil benyttes et fortyndet Grote-reagens: 1 del koncentreret reagens + 4 dele

destilleret vand. 1 ml heraf sættes til en opløsning af 0,5 mg thiourinstof i 10 ml destilleret vand + 1 dråbe iseddikesyre. Hvis reagenset er anvendeligt, skal der fremkomme en stærk blå farve i løbet af 5 minutter. Grote-reagens anvendes altid fortyndet (1 : 4 som ovenfor). Det fortyndede reagens er kun holdbart een dag.

Fremstilling af standardkurve. I 100 ml målekolber opløses varierende mængder thiourinstof (p. a.) i destilleret vand. For at

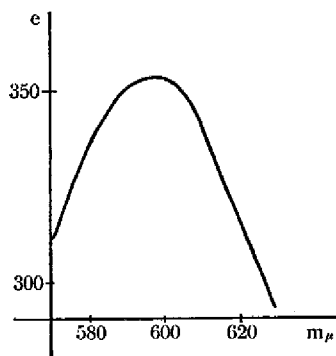


Fig. 1. Maximal extinktionskoefficient (e) i måleopløsning indeholdende 0.1187 mg thiourinstof

få en passende farvestyrke fremstilles opløsninger indeholdende mellem 0,5 og 2,5 mg thiourinstof i 100,00 ml destilleret vand. 40,00 ml af disse opløsninger pipetteres over i 50 ml målekolber; hertil sættes 4,0 ml af en 25 % natriumacetatopløsning, hvorpå kolberne fyldes op til mærket med destilleret vand.

Til fremstilling af de færdige måleopløsninger afpipetteres 10,00 ml af hver målekolbe over i Pyrex-reagensglas med glasprop, og der tilsættes 1,00 ml fortyndet Grote-reagens. Efter omrystning anbringes reagensglassene i et vandbad ved $50^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ i 15 minutter. Målingerne foretages på et Beckman Quartz-spectrophometer, Model DU., i 1,00 cm kuvetter af Corex-glas, ved $600 m_{\mu}$ og spaltevidde 0,05 mm.

Til fastlæggelse af den maximale e-værdi er anvendt en måleopløsning indeholdende 0,1187 mg thiourinstof. Resultatet ses i fig. 1, hvoraf fremgår, at maksimum ligger ved 600 μ .

Farven er ikke stabil; til bestemmelse af det tidspunkt, hvor den maksimale farvestyrke opnås, blev der foretaget nogle målinger til varierende tidspunkter, idet begyndelsestidspunktet blev sat til sammenblandingsøjeblikket. De første 15 minutter blev ikke undersøgt, idet denne tid går med opvarmning og fremkaldelse af farven. Som det fremgår af fig. 2, opnås den maksimale farvestyrke først efter 15 minutters henstand ved stuetemperatur, hvorefter farvestyrken igen aftager.

Ved måling af forskellige mængder thiourinstof fandtes som gengivet i fig. 3 en målt e-værdi på 0,300 at svare til 0,100 mg thiourinstof i den nævnte måleopløsning, idet alle opløsningerne er målt overfor en referencekuvette indeholdende destilleret vand.

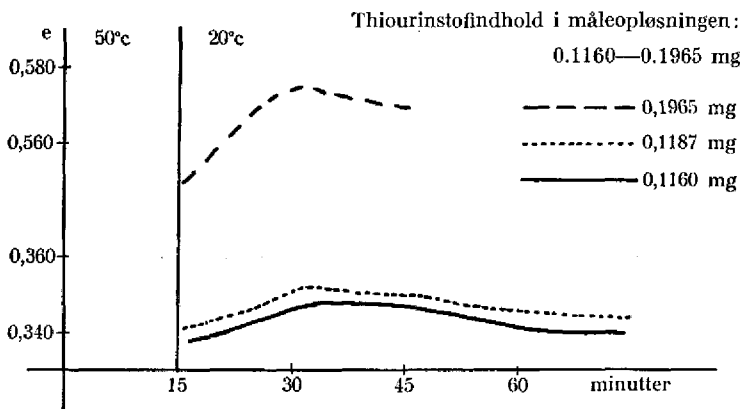


Fig. 2. Extinktionskoefficientens afhængighed af tiden.

Forsøget med at følge nedbrydningen eller udvaskningen af thiourinstof i gødning udførtes på to fritbeliggende møddinger, der var stillet til rådighed for Statens Skadedyrslaboratorium på Faurholm (Hillerød) og Rødskinnegaard (Frerslev). Behandling og prøveudtagning af gødningen blev foretaget af Statens Skadedyrslaboratorium.

Hver mødding havde et areal på 6 m^2 og en højde på ca. 1 m og blev vandet (juni 1957) med 125 g thiourinstof opløst i 5 liter

vand pr. m². Ved forsøgets slutning var højden henholdsvis ca. 50 cm og ca. 75 cm.

Ved prøveudtagningen, der foretoges henholdsvis 1, 14 og ca. 100 dage efter vandingen, blev der skåret et snit gennem møddingen på 30 × 30 cm, og den optagne gødning blev anbragt i galvaniserede eller emaljerede spande. Gødningen fra Faurholm blev opsamlet som henholdsvis øverste, mellemste og nederste lag, medens gødningen fra Rødskinnegaard blev opsamlet i fire lag.

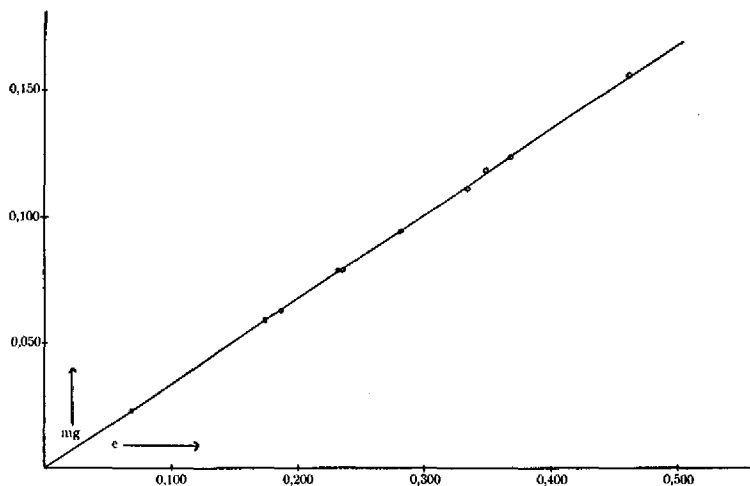


Fig. 3. Justeringskurve til bestemmelse af thiourinstof

Desuden blev der til to emaljerede spande hver indeholdende 10 kg gødning tilsat 13,5 g thiourinstof opløst i 225 ml vand. Disse spande blev anbragt nedgravet i møddingen på Rødskinnegaard, og indholdet blev analyseret henholdsvis 14 og 94 dage efter vandingen.

Analyse: En spand med gødning vejes, overhældes med så meget vand som muligt og henstilles under hyppig omrøring i et døgn. Dersom der er rigelig vædske i gødningen efter denne behandling, skilles vædskelaget fra til analyse. Dersom det er umuligt at hælde rigeligt vædske fra, røres gødningen efter forbehandlingen kraftigt op, og der afvejes 1 kg i en kolbe. Efter til-

sætning af 1 liter vand rystes kraftigt gentagne gange, hvorefter kolben anbringes i isskab i 1 døgn. Herefter hældes vædske­laget fra til analyse. Til 200 ml af vædske­laget sættes i en 250 ml måle­kolbe 2,5 g citronsyre og 2,1 g kaliumcitrat, og når luftudviklin­gen er ophørt, fyldes op til mærket med vand. Efter omryst­ning henstilles målekolben i isskab i et døgn.

Ca. 100 ml af det øverste lag i målekolben centrifugeres i 1 time ved 3200 omdr. pr. min., hvorefter vædske­laget hældes fra, tilsættes ca. 1 g Filter-cel (L. Light & Co. Ltd.) og filtreres gen­nem et glasfilter (G. 3) ved sugning. Af filtratet afpipetteres 40,00 ml over i en 50 ml målekolbe, hvorefter der tilsættes 4,0 ml 25 pct. natriumacetatopløsning og fyldes op til mærket med des­tilleret vand. Af denne opløsning fremstilles i et pyrex-reagens­glas med glasprop måleopløsningen bestående af 10,00 ml opløs­ning tilsat 1,00 ml fortyndet Grote-reagens. Efter opvarmning i vandbad ved $50^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ i 15 min. henstilles måleopløsningen i 15 min. ved stuetemperatur, hvorefter den straks måles som ved fremstilling af standardkurven overfor en referencekuvette med destilleret vand. Samtidig måles, ligeledes overfor referencekuvet­ten, en reagensblanko bestående af 10,00 ml destilleret vand tilsat 1,00 ml fortyndet Grote-reagens, samt en blanko bestående af 10,00 ml opløsning fra 50 ml målekolben tilsat 1,00 ml destilleret vand. Summen af e-værdierne fra reagensblanko og blanko træk­kes fra den e-værdi, der er målt i analysens måleopløsning; her­ved fås den e-værdi, der svarer til thiourinstofindholdet i denne måleopløsning.

Ved at sætte thiourinstof til en prøve på 200 g af en blanding bestående af 1 kg gødning udrørt med 4 kg vand genfandt­es ved ovennævnte fremgangsmetode over 80 pct. af det tilsatte thio­urinstof:

Tilsat thiourinstof	Genfundet thiourinstof	
mg	mg	%
8.8	7.7	88
26.3	26.0	99

Derimod giver ubehandlet gødning e-værdi, der svarer til maksimalt 25 mg thiourinstof pr. kg gødning. Således gav en prøve på tør halm uden thiourinstoftilsætning en e-værdi, der

svarer til 20 mg thiourinstof pr. kg. Grænsen for påvisning af thiourinstof i det givne materiale må derfor sættes til 30 mg pr. kg. Alle beregnede værdier under 30 mg pr. kg er derfor i nedenstående forsøgsresultat betegnet som nul.

Tabel 1. Bestemmelser af thiourinstof i staldgødning

Forsøgssted	Dage efter vanding	Thiourinstof mg/kg gødning i gødningslag			
		øverste	mellemste	nederste	
Faurholm	1	252	0	0	
	14	70	0	0	
	95	0	0	0	
Rødskinnegaard	0	1	2	3	4
	14	265	0	0	0
	14	40	72	0	0
	94	0	0	0	0
do. (spandeprover)	14	840			
	94	280			

Forsøgsresultatet ses af tabel 1, hvoraf det fremgår, at thiourinstofindholdet efter 14 dages forløb er faldet meget stærkt. På den ene mødding var indholdet i det mellemste lag steget efter 14 dage, hvilket tyder på, at der er tale om både udvaskning og nedbrydning. Da der aldrig kunne påvises thiourinstof i møddingens nederste lag, synes dog den sidste faktor at have spillet hovedrollen. I spandeproverne, hvor udvaskning var udelukket, var der selv efter 94 dages forløb påviselige rester af thiourinstof, men sonderdeling har tydeligvis fundet sted.

Thiourinstoffets virkning og omsætning i jorden

Til oplysning om thiourinstoffets indflydelse på den samlede biologiske stofomsætning i jorden udførtes efter *Petersen's* (1926) metode nogle kulsyreproduktionsforsøg i jord med og uden tilsætning af let sønderdeleligt organisk materiale (lucerne-mel) samt varierende mængder thiourinstof; forsøgene foretoges alle ved 25° C i jord af ca. $\frac{2}{3}$ til $\frac{3}{4}$ vandmætningsgrad. Resultaterne ses i tabel 2—4 og viser, at bortset fra lidt hemning i to af

forsøgene (tabel 2 og 4) uden lucernemeltillsætning har thiourinstoffet ingen kendelig indflydelse på stofomsætningens intensitet. Man tør derfor gå ud fra, at de mindre mængder thiourinstof, hvorom der normalt vil blive tale i praksis, vil være betydningsløse i denne henseende; forsøgene lader endvidere formode, at omsætningsprocesserne i møddingen næppe heller vil påvirkes af thiourinstof i mængder på ca. 25 mg pr. kg. Ved afslutningen af det første forsøg bestemtes tillige nitratkvælstof, der viser en ringe nedgang, hvor thiourinstof var tilsat uden lucernemel.

Tabel 2. Kulsyreproduktion i lerjord (havejord), Rt 7,2, med og uden 0,5 pct. lucernemel og thiourinstof svarende til 5 og 12 kg/ha. Nitratbestemmelse efter Devarda-metoden.

	Forsøgs- tid dage	÷ lucernemel			+ lucernemel		
		thiourinstof mg/kg			thiourinstof mg/kg		
		0	2	4.8	0	2	4.8
CO ₂ mg/50 g jord	1	8	8	8	64	63	64
	2	—	—	—	114	111	114
	4	19	18	18	162	155	158
	6	24	22	23	185	178	181
	8	31	28	28	201	194	195
	14	44	38	37	236	229	227
NO ₃ -N mg/kg Maximal korrektion ¹	14	21	18	17	42	43	44
	—	—	1.2	2.9	—	1.2	2.9

1. Se side 508

Tabel 3. Kulsyreproduktion i lerjord (havejord), Rt 7,2, med og uden 0,5 pct. lucernemel og thiourinstof svarende til 25—50—100 kg/ha.

	Forsøgs- tid dage	÷ lucernemel				+ lucernemel			
		thiourinstof mg/kg				thiourinstof mg/kg			
		0	10	20	40	0	10	20	40
CO ₂ mg/50 g jord	1	12	12	12	12	68	68	68	69
	2	17	17	17	18	113	111	111	115
	5	27	28	27	29	171	168	165	172
	7	32	33	32	35	189	186	183	191
	12	41	43	41	47	219	215	212	221
	14	44	46	44	50	227	223	220	228

Tabel 4. Kulsyreproduktion i lerjord, Rt 5,4, med og uden 0,5 pct. lucernemel og thiourinstof svarende til 5—25—50 kg/ha.

	Forsøgs- tid dage	÷ lucernemel				+ lucernemel			
		thiourinstof mg/kg				thiourinstof mg/kg			
		0	2	10	20	0	2	10	20
CO ₂ mg/50 g jord	1	6	6	5	5	42	46	44	47
	3	10	13	9	9	98	103	102	105
	5	15	18	13	13	132	140	138	132
	7	18	21	16	16	147	156	154	150
	10	22	25	19	19	163	174	172	167
	14	27	31	24	24	180	191	188	184

Da nitrifikationsprocessen er særlig følsom overfor thiourinstof, anstilledes der nogle nitrifikationsforsøg, hvor jordportioner med ca. $\frac{2}{3}$ vandmætningsgrad opbevarede ved 25° C i glaskrukker med løstsiddende plasticlåg eller for mindre portioners vedkommende i mælkeflasker med gennemborede, vatlukkede gummipropper. I de første forsøg, der anstilledes med en svagt alkalisk lerjord fra laboratoriets have, bestemtes nitrat efter Devarda-metoden: ekstraktion af jorden med 1,0-molær kaliumchlorid ved pH ca. 1, destillation først med magnesiumoxyd til fjernelse af ammoniakken, derpå med Devarda-legering til reduktion af nitraten. Det viste sig imidlertid, at thiourinstof spalttes under ammoniakdannelse ved påvirkning af Devarda-legeringen. I nogle kontrolforsøg med opløsninger indeholdende fra 1 til 20 mg thiourinstof, der behandlede som nitratanalyse, fraspaltedes der kun forsvindende mængder ammoniak ved destillation med magnesiumoxyd alene, men ved den påfølgende destillation med Devarda-legering gik der ammoniak over i mængder svarende til 57—75 pct. af thiourinstoffets kvælstof. En thiourinstofholdig jordekstrakt må altså ventes at vise for høje resultater, og der er derfor i tabellerne 2, 5 og 6 anført en tilnærmelsesvis »maksimalkorrektion« svarende til 80 pct. af kvælstoffet i den tilsatte mængde thiourinstof.

Gad og Benjaminsen's (1957) metode til nitratbestemmelse lod sig overhovedet ikke anvende i nærværelse af thiourinstof; dette

forhindrede nitrats reduktion til nitrit, formodentlig ved at inaktivere cupriionerne, der virker som katalysator for denne proces. Senere bestemtes nitrat derfor efter xylenolmetoden i den af *Sørensen* (1956) beskrevne modifikation. Hertil ekstraheredes 10 g lufttør jord ved rystning en time med 20 ml 0,2 pct. sølvacetatopløsning, og af filtratet anvendtes en aliquot på 1—3 ml til selve nitratbestemmelsen. Xylenolmetodens resultater påvirkedes ikke kendeligt af thiourinstof og viste i thiourinstoffrie jorder en smuk overensstemmelse med Devardametodens.

I det første kortvarige forsøg (tabel 5) har thiourinstoffet ingen synlig indflydelse på nitrifikationen, der imidlertid her er ret langsom, selv med tilsætning af ammoniumsulfat. Et andet forsøg, kun med ammoniumsulfatilsætning, udførtes derfor i den samme jord, der i forvejen var vasket omtrent nitratfri ved gentagen ekstraktion med destilleret vand. Som vist i tabel 6 bevirker alle tre mængder thiourinstof en tydelig omend langtfra fuldkommen hemning af nitrifikationen i de første 4 uger, men efter knap 8 uger er nedgangen i nitratindhold afløst af en stigning i sammenligning med kontroljorden. Overskuddet af nitratkvælstof over summen af tilsat ammoniak- og thiourinstofkvælstof er efter 53 og 105 dage adskilligt større i de thiourinstofbehandlede end i kontroljorden; thiourinstoffet synes således at have stimuleret mineraliseringen af jordens organiske kvælstof. Efter 53 dage foretoges en kvalitativ prøve for thiourinstof med Grote's reagens. I 4 ml ekstrakt af lige dele jord og vand (+ lidt kaliumsulfat for at få et klart filtrat) fremkom der ved tilsætning af 4 dråber Grote-reagens i intet tilfælde nogen synlig reaktion for thiourinstof, der således syntes at være enten bundet af jorden eller undergået kemisk eller biologisk sønderdeling; dette stemmer overens med, at hemningsvirkningen nu er ophørt. I ekstrakter af jord kort tid (1—2 timer) efter tilsætning af 2 mg/kg thiourinstof sås en netop synlig blå farve, medens 5 mg/kg viste en tydelig, 10 mg/kg en stærk og 20 mg/kg en særdeles kraftig reaktion. I de påfølgende forsøg (tabel 7—9) foretoges sådanne prøver regelmæssigt, og de ovennævnte farvestyrker er her angivet ved tegnene henholdsvis (+), +, ++ og + + +.

Tabel 5. Nitrifikationsforsøg i lerjord (havejord), Rt 7,5, med og uden 50 mg/kg som $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ og thiourinstof svarende til 5 og 10 kg/ha. NO_3 -bestemmelse efter Devarda-metoden

	Forsøgs- tid dage	÷ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
		thiourinstof mg/kg			thiourinstof mg/kg		
		0	2	4	0	2	4
NO_3 -N mg/kg	0	10	8	10	10	9	9
	7	19	20	18	30	24	29
	14	28	26	29	37	38	39
Maximalkorrektion		—	0.6	1.2	—	0.6	1.2

Tabel 6. Nitrifikationsforsøg i lerjord (havejord), Rt 7,2, +0,05 pct. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 106$ mg NH_4 -N pr. kg, og thiourinstof svarende til 10–25–50 kg/ha. — NO_3 -N ved forsøgets begyndelse: 3 mg/kg. Nitratbestemmelse efter Devarda-metoden

	Forsøgs- tid dage	Thiourinstof mg/kg			
		0	4	10	20
NO_3 -N mg/kg	7 ¹	++++	++++	+++	++
	14	85	63	53	34
	28	72	48	58	51
	53	135	153	157	163
	105	145	165	168	167
Maximalkorrektion	14–28	—	1.2	3.0	5.9
Overskud af NO_3 -N over tilsat NH_4 -N + thiourinstof -N	53	29	47	47	50
	105	39	58	58	54

1. Kvalitativ prøve med diphenylamin-svovlsyre i jordextrakt (1:1) (Sml. tabel 7, 8, 9.)

Sluttelig udførtes et forsøg i en svagt sur lerjord (Rt 5,9) fra Virumgaard og desuden til sammenligning i en stærkt sur sandjord (Rt 4,7) fra Lundgaard; da der i den sidste kun kunne ventes meget svag nitrifikation, blev der ikke tilsat ekstra ammoniak i form af ammoniumsulfat. Resultaterne findes i tabel 7 og viser,

at i begge jorder forsvinder den oprindeligt tydelige thiourinstofreaktion allerede efter en uge. I den svagt sure lerjord virker thiourinstoffet ligesom i foregående forsøg med stigende koncentration noget hemmende på nitratdannelsen de første 2—4 uger, men efter 6 uger er forskellen praktisk talt udlignet. I den stærkt sure sandjord hemmer thiourinstoffet i nogen grad den i sig selv svage nitrifikation de første 4 uger, men den samlede kvælstofmobilisation (sum af nitrat- og ammoniakkvælstof) påvirkes ikke.

Tabel 7. Nitrifikationsforsøg i lerjord, Rt 5,9, + 0,04 pct. ammoniumsulfat (= 85 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ pr. kg), og i sandjord, Rt 4,7 uden ammoniumsulfat: Thiourinstof sv. t. 5—10—25 kg/ha. $\text{NO}_3\text{-N}$ ved forsøgets begyndelse: Lerjord 2,5 mg/kg, sandjord 1,0 mg/kg. $\text{NH}_4\text{-N}$ i sandjord: 6,7 mg/kg

	Forsøgstid dage	Thiourinstof mg/kg			
		0	2	4	10
I. <i>Lerjord</i> Thiourinstofreaktion	0 7—42	÷ ÷	(+) ÷	+ ÷	++ ÷
$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/kg	7	20	16	14	8
	14	57	45	41	23
	28	116	105	106	80
	42	136	124	134	129
II. <i>Sandjord</i> Thiourinstofreaktion	0 7—28	÷ ÷	— —	+ ÷	++ ÷
$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/kg	7	(+)	—	(+)	(+)
	14	+	—	(+)	(+)
	28	6	—	5	3
$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/kg	28	23	—	25	27

Gennemgående synes således thiourinstof i mængder svarende til 5 til 25 kg/ha kun at bevirke en forbigående og ikke særlig stærk hemning af nitrifikationen.

Efter de forudgående forsøg at dømme forsvinder thiourinstof i mængder på 2 til 20 mg/kg ret hurtigt fra jordekstrakten, men det lader sig ikke afgøre, om dette skyldes virkelig sønderdeling

eller langsom binding af thiourinstoffet. Hemningsvirkningens gradvise ophævelse kunne dog tyde på, at det efterhånden nedbrydes; den fortsatte hemning efter thiourinstofreaktionens forsvinden skyldes muligvis dannelse af giftige mellemprodukter. Til nærmere oplysning om thiourinstoffets sønderdeling udførtes et par forsøg med større mængder i jord uden ekstra ammoniaktilsætning. Heri bestemtes dannelsen af nitrat (efter xylenolmetoden) og henimod forsøgenes afslutning tillige ammoniak og sulfat, det sidste som eventuelt iltningsprodukt af thiourinstoffets svovl (sml. *Frederick* o. a. 1957). Til sulfatbestemmelse rystedes 100—150 g fugtig jord en time med 200 ml 0,5 molær kaliumchloridopløsning, hvorpå der filtreredes på en Büchnertragt, og jorden vaskedes på filteret med 4×50 ml af samme opløsning. I det samlede filtrat bestemtes sulfat gravimetrisk efter fældning med bariumchlorid. Da der på dette tidspunkt kun var begrænsede mængder jord til rådighed, anvendtes filtratet fra sulfatfældningen til ammoniakbestemmelse ved destillation med magnesiumoxyd. Til forskellig tid foretoges tillige kimtællinger (bakterier plus actinomyceter) ved spredning på glucose-caseinagar.

Til det første forsøg (tabel 8) anvendtes den ovennævnte omtrent neutrale, nitratudvaskede og lufttørrede havejord med og uden tilsætning af 0,02 pct. thiourinstof. Til et tredje forsøgsled sattes tillige som »podejord« 2 pct. ligeledes nitratudvasket jord fra et indledende forsøg, hvor 0,02 pct. thiourinstof var forsvundet efter ca. $3\frac{1}{2}$ måneds henstand; hvis dette skyldes en biologisk proces, måtte »podejorden« ventes at være beriget med aktive organismer og således fremskynde omsætningen.

Den ret store mængde thiourinstof ses at undertrykke nitrifikationen næsten fuldstændigt de første 70 dage. På dette tidspunkt er imidlertid thiourinstofreaktionen omtrent helt forsvundet, og efter 98 dage indtræder en tydelig og efter 140 dage en meget stærk stigning i nitratindholdet. Tillige ses efter 98 dage en stærk ophobning af ammoniakkvælstof, der er næsten fuldstændig nitrificeret ved forsøgets afslutning. Dannelsen af ammoniak og derpå nitrat giver sig også til kende i reaktionstillenes ændring. Overskuddet af nitrat- plus ammoniakkvælstof over kontroljorden efter 98 og 140 dage svarer til henholdsvis 71—75 og

75—90 pct. af det tilsatte kvælstof. Dette overskud stammer antagelig fra selve thiourinstoffet og ikke fra stimuleret humus-sønderdeling, da også thiourinstoffets svovl synes at være mineraliseret, omend i mindre omfang end dets kvælstof: sulfatbestemmelserne viser her en stigning svarende til ca. halvdelen (47—54 pct.) af thiourinstofsvovlet; ejendommeligt nok sker der ingen mærkbar stigning fra 98 til 140 dage. En aldeles sikker afgørelse af det fundne sulfats oprindelse ville dog kræve forsøg med thiourinstof »mærket« med radioaktivt svovl. »Podejorden« påvirker tydeligt nok hverken nitrifikationen eller thiourinstoffets forsvinden, hvilket tyder på, at det sidste tildels sker ad rent kemisk vej (omend svovlets iltning sandsynligvis er en biologisk proces). Endelig ser man, at thiourinstoftilsætningen har bewirket en kendelig formindskelse af bakterietallene, der først er udlignet ved forsøgets afslutning.

Tabel 8. Nedbrydning af thiourinstof i neutral lerjord (havejord)
Ved forsøgets begyndelse: Rt 7,2, NO₃-N 2 mg/kg, SO₄-S 14 mg/kg

	Forsøgs-tid dage	Uden tilsætning		+ 0.02% thiourinstof		do. + »podejord«	
		NO ₃ -N mg/kg	thio.-reakt. ¹	NO ₃ -N mg/kg	thio.-reakt.	NO ₃ -N mg/kg	thio.-reakt.
	11	++++	÷	÷	+++	+	+++
	21	45	÷	5	+++	8	+++
	42	70	÷	7	++	7	++
	70	66	÷	7	(+)	8	(+)
	98	64	÷	18	÷	24	÷
	140	80	÷	145	÷	135	÷
NH ₄ -N mg/kg	98	3		101		98	
	140	3		4		3	
SO ₄ -S mg/kg	98	13		58		56	
	140	19		59		61	
Rt	98	6.8		7.2		7.1	
	140	6.7		6.3		6.2	
Kimtall. mill./gm	21	58		28		22	
	98	35		19		19	
	140	36		37		36	

¹ Reaktion med Grote's reagens i jordekstrakt (1:1).

Tabel 9. Nedbrydning af thiourinstof i svagt sur lerjord
 Ved forsøgets begyndelse: Rt 5,6, NO₃-N(0), NH₄-N 13 mg/kg, SO₄-S
 8 mg/kg

	Forsøgs- tid dage	Uden tilsetning		0.02 % thiourinstof	
		NO ₃ -N mg/kg	thiourinstof -reaktion	NO ₃ -N mg/kg	thiourinstof -reaktion
	7	+	÷	÷	+++
	21	19	÷	0	+++
	42	41	÷	0	+++
	70	53	÷	0	+++
	91	55	÷	0	++
	125	68	÷	0	++
	150	++++	÷	÷	+
	180	78	÷	(1)	(+)
NH ₄ -N mg/kg	180	4		94	
SO ₄ -S mg/kg	180	13		35	
Rt	91	5.3		6.1	
	180	5.2—5.3		5.8—5.9	
Kimtal mill./g	21	26	-27	(2.4)—(3.6) ¹	
	42	39	-43	(<1)—(1.2)	
	125	24	-25	(1.2)—(5.7)	
	176	15	-22	(2)—(7)	

¹ Tællingerne usikre på grund af stærk svampevækst

Et lignende forsøg udførtes i en moderat sur lerjord (Rt 5,6) fra Virungaard, ligeledes nitratudvasket, med og uden 0,02 pct. thiourinstof (tabel 9). Ved denne for salpeterbakterierne mindre gunstige reaktion forhindrer thiourinstoffet nitrifikationen fuldstændigt i næsten et halvt år og forsvinder langsommere end i neutral jord. Efter 180 dage er der dog meget lidt thiourinstof tilbage (farvereaktionens styrke tydede på ca. 2—5 mg/kg), og sulfatbestemmelserne viser et overskud over kontroljord svarende til ca. 25 pct. af thiourinstofsvovlet. Nitratdannelsen i kontroljorden ses at være kompenseret af en endda lidt stærkere ammoniakdannelse i jord + thiourinstof. Det er usikkert, hvorvidt det fundne ammoniakkvælstof alene repræsenterer ikke-nitrificeret humuskvælstof eller indbefatter noget thiourinstofkvælstof (afgørelse heraf ville kræve thiourinstof mærket med N¹⁵), men det sidste forekommer sandsynligt i betragtning af sulfatdannel-

sen ved thiourinstoffilsætning. Det synes også tvivlsomt, hvorvidt humuskvælstoffet her er mineraliseret lige så stærkt som i kontroljorden, da thiourinstoffilsætningen gennem hele forsøgstiden forårsagede en påfaldende nedgang i antallet af bakterier + actinomyceter (sml. *Frederick* o. a. 1957). Tællingerne var dog usikre på grund af en stærk udvikling af svampekolonier på agarpladerne; særlig fremtrædende var en gul *Penicillium*, der i renkultur viste sig at kunne udnytte thiourinstof som kvælstofkilde, omend ikke i større omfang end de andetsteds omtalte svampe (*Jensen* 1957).

Nedbrydningsforsøgene tyder således på, at thiourinstof selv i en mængde svarende til 500 kg/ha sønderdeles og forsvinder fra jorden i løbet af 3—6 måneder, men forårsager voldsomme forstyrrelser i kvælstofomsætningens forløb og mikrofloraens sammensætning. Decimeringen af bakteriefloraen og i nogle tilfælde stimulation af nitrifikationen (tabel 6) kunne tyde på, at thiourinstof i moderate mængder bevirker en mild »partielsterilisation«, der erfaringsmæssigt følges af en forøget kvælstofmobilisation. Dette forklarer muligvis den overraskende kvælstofvirkning af thiourinstof i *Fuller* og medarbejderes (1950) gødningsforsøg.

I tilslutning til de forudgående forsøg anstilledes nogle iagttagelser over thiourinstoffets indflydelse på kobberets tilgængelighed. Til et første forsøg udvalgte 8 ret kobberfattige jorder, der fugtedes med en opløsning af thiourinstof svarende til 20 mg/kg, og efter 3 døgn henstand bestemtes kobber biologisk med *Aspergillus niger* (se *Henriksen* 1957). Resultat:

	Jord nr.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Asp.eu:.....								
Kontrol.....	0.6	0.8—1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6—2.0	2.5
+ Thiourinstof.....	1.0	1.0	1.0—1.3	1.3	1.6	1.3	2.0—2.5	2.5

Thiourinstofbehandlingen synes her nærmest at have forårsaget en svag stigning i indholdet af svampetilgængeligt kobber.

Desuden udførtes der i resten af jorderne efter nitrifikationsforsøget tabel 7 af afdelingsbestyrer Aage Henriksen kemiske

kobberbestemmelser efter komplexonmetoden (se *Henriksen 1957*). Disse bestemmelser viste ingen antydning af, at thiourinstof gør kobber utilgængeligt:

Thiourinstoftilsætning mg/kg	0	2	4	10
K _{cu} i lerjord (42 dage).....	3.7	3.7	3.7	3.7
» i sandjord (28 dage).....	3.0	—	3.0	3.0

Andre forsøg viste, at ekstraktion med 0,02 molær thiourinstofopløsning kun fjernede minimale mængder kobber fra jorden. Der er således ingen grund til at formode, at moderate mængder thiourinstof vil ændre jordens kobbertilstand.

Forsøg over thiourinstoffets virkning på dyrkede planter

For at undersøge, om thiourinstof kan optages af voksende planter, foretoges der kvantitative bestemmelser af thiourinstof i gulerødder sået den 7. maj 1956 i frugtbar havejord ved Statens Skadedyrslaboratorium. Ved såningen vandedes med en thiourinstofopløsning svarende til 60 kg thiourinstof pr. ha. Der iagttoges ingen skadevirkning på planterne, der endda syntes at vokse bedre end de ikke thiourinstofvandede. Gulerødderne høstes i sidste halvdel af september 1956.

Residuebestemmelse af thiourinstof: Indhøstede gulerødder blev skilt fra toppen, hvorefter rod og top blev behandlet hver for sig. Ca. 1 kg rod (eller top) findeles i en kødhakkemaskine og blandes. Der afvejes 333 g, der i en »Magimax« blandes med 500 ml 0,25 pct. natriumbikarbonatopløsning (for at forhindre eventuel enzymatisk spaltning). Det samlede udtræk hældes i en 1-liter målekolbe og tilsættes 10,0 g citronsyre og 8,4 g kaliumcitrat, hvorefter der fyldes op til mærket med destilleret vand, der har været anvendt til at afskylle magimaxglasset med. Efter omrystning henstilles målekolben 1 døgn i isskab.

Ca. 100 ml af det øverste lag i målekolben centrifugeres i 1 time ved 3200 omdr. pr. min., hvorefter vædskelaget hældes fra, tilsættes ca. 1 g filter-cel (L. Light & Co. Ltd.) og filtreres gennem

et glasfilter (G. 3) ved sugning. Der filtreres så meget, at der kan afpipetteres 40,00 ml over i en 50 ml målekolbe; der tilsættes 4,0 ml 25 pct. natriumacetatopløsning, hvorpå der fyldes op til mærket med destilleret vand. Af denne opløsning fremstilles i et pyrex-reagensglas med glasprop måleopløsningen bestående af 10,00 ml opløsning tilsat 1,00 ml fortyndet Grote-reagens. Efter opvarmning i vandbad ved $50^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ i 15 min. henstilles måleopløsningen i 15 min. ved stuetemperatur, og spektrofotometrisk måling udføres som i gødning.

Samtidig måles overfor referencekuvetten med destilleret vand en reagensblanko bestående af 10,00 ml destilleret vand tilsat 1,00 ml fortyndet Grote-reagens, samt en blanko bestående af 10,00 ml opløsning fra 50 ml målekolben tilsat 1,00 ml destilleret vand. Summen af e-værdierne fra en reagensblanko og blanko trækkes fra den e-værdi, der er målt i analysens måleopløsning, og herved fås den e-værdi, der svarer til thiourinstofindholdet i denne måleopløsning. Det forsøgte at affarve planteekstrakten ved kromatografi eller filtrering gennem kul; tabet af thiourinstof var herved ret betydeligt, men ved fremstilling af blanko som ovenfor nævnt, har det i alle tilfælde været muligt at måle den blå farve.

Tabel 10. Genvinding af thiourinstof i gulerodsmateriale

Materiale	Thiourinstof tilsat		Thiourinstof genfundet	
	mg	ppm	mg	%
Rod	4.0	30	2.4	60
	8.0	60	5.8	72
	12.1	80	9.8	81
Top	8.8	100	6.7	76
	17.5	200	13.9	79

Ved at tilsætte thiourinstof til findelt materiale har man ved ovennævnte fremgangsmåde genfundet 60—81 pct. alt efter koncentrationen (tabel 10). Man kan heraf antage, at bestemmelsens følsomhed ligger omkring 25 ppm, og forsøg på at gøre metoden mere følsom ved at koncentrere planteudtrækket, bl. andet ved destillation i vakuum eller udrystning med andre opløsningsmidler, gav for store tab. De målte e-værdier for reagensblanko

+ blanko svarer for roden til maksimalt 5 ppm og for toppen til maksimalt 10 ppm, således at disse værdier er grænsen for påvisning af spor af thiourinstof i det givne plantemateriale. Der blev ikke i det behandlede plantemateriale påvist thiourinstof.

Til yderligere oplysning om thiourinstoffets virkning på højere planter blev der i forsøg med ukrudtsmidler ved Statens Ukrudtsforsøg samt Aarslev og Jynde vad forsøgsstationer i sommeren 1957 indlagt iagttagelsesstriber med 2,0 kg thiourinstof pr. ha. Ingen af stederne iagttoges der nogen indflydelse på 12 forskellige plantearter. Endvidere udførtes der ved Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde, tillige kasseforsøg med byg og rød kløver i jord af Rt. 7,6 og 8,1 med tilførsel af 0-2-5-10-50 kg thiourinstof pr. ha. Forsøgene blev såede den 12. juni (byg) og 13. juni (kløver) 1957 og høstede den 31. juli. Ifølge opgivelser fra afdelingsbestyrer H. Ingvar Petersen iagttoges synlig skadevirkning kun på rød kløver med 50 kg/ha thiourinstof, hvilket også gav sig udtryk i høstudbyttet:

		Thiourinstof kg/ha				
		0	2	5	10	50
Grønmasse g, gns. af 3 fælleskasser og to jordreaktioner.	Byg.....	317	329	357	346	335
	Kløver.....	298	366	336	327	226

Kun nedgangen i udbytte af kløver med 50 kg thiourinstof syntes signifikant.

Umiddelbart efter høstningen modtoges plantematerialet ved Statens Planteavlslaboratorium. Af hver prøve uddressedes en portion saft (ca. 20 ml), hvori der udførtes en papirchromatografisk bestemmelse af thiourinstof efter *Kjær og Rubinstein* (1953).¹ Indtil bestemmelsen kunne finde sted, opbevarede saften i dybfrossen tilstand. Selv i saft fra planterne ved den højeste thiourinstofdosis (50 kg/ha) koncentreret 20× ved tørring i vacuumdesiccator kunne der ikke på chromatogrammet ses nogen reaktion for thiourinstof, der således heller ikke her synes at være optaget af planterne.

1. De chromatografiske bestemmelser udførtes af dr. agro. *Henning Sørensen*.

OVERSIGT

Det fremgår af de foretagne undersøgelser over staldgødning, at thiourinstof i en mængde på 125 g/m² (ca. 3—5 gange mere end den til bekæmpelse af fluelarver foreskrevne) forsvinder fra møddingen i løbet af ca. 3 måneder. Såvel udvaskning som nedbrydning synes at spille en rolle, sandsynligvis dog især det sidste. Den nedre grænse for kvantitativ bestemmelse af thiourinstof var ca. 30 mg pr. kg gødning, således at der højst vil tilføres jorden ca. 1,2 kg thiourinstof pr. ha ved anvendelse af 40 tons staldgødning.

I mængder på 2 til 20 mg/kg (5—50 kg/ha) påvirker thiourinstof ikke kendeligt den biologiske sønderdeling af organisk stof i jorden og medfører kun en forbigående delvis hemning af nitrifikationen. Under gunstige betingelser (vel gennemluftet jord ved 25°C) forsvinder de nævnte mængder thiourinstof fra jorden i løbet af få uger. Større mængder thiourinstof (200 mg/kg) undertrykker nitrifikationen næsten fuldstændigt i lang tid, men sønderdeles dog i løbet af 3 til 6 måneder under dannelse af ammoniak, nitrat og sulfat. Der fandtes ingen tegn på, at thiourinstof fjerner kobber fra jorden eller gør det utilgængeligt.

I gulerødder vandede med thiourinstofopløsning (60 kg/ha) kunne der ikke påvises optagelse af thiourinstof (den nedre grænse for kvantitativ bestemmelse i plantematerialet var 5—10 p.p.m.). Jagttagelser i marken viste ingen skadevirkning af 2 kg/ha thiourinstof overfor 12 plantearter. Kasseforsøg ved Statens Ukrudtsforsøg viste først skadevirkning af 50 kg/ha thiourinstof overfor rødkløver, men ikke byg. Heller ikke i saften fra disse planter kunne der påvises optagelse af thiourinstof.

Man tør derfor antage, at anvendelsen af de foreskrevne mængder thiourinstof (25—40 g pr. m²) som fluelarvicid i møddingen ikke vil medføre uheldige virkninger i marken, omend der muligvis kan være grund til at fraråde anvendelse af ekstraordinært store mængder thiourinstofbehandlet staldgødning i havebruget.

SUMMARY

Biological Effects and Decomposition of Thiourea in Farmyard Manure and Soil

Thiourea was added to dungheaps in amounts approx. 5 times as high (125 g/m²) as those recommended as fly larvicide. A spectrophotometric method for thiourea determination by means of Grote's reagent was developed by the junior author. The analysis showed a rapid decrease in thiourea concentration after two weeks. No thiourea (in amounts exceeding 30 p.p.m. which represented the lower limit of analytical accuracy) could be detected after three months. Leaching as well as decomposition, but apparently chiefly the latter, seemed responsible for the loss of thiourea. An application of 40 tons of such manure will add at the most 1.2 kg/ha thiourea to the soil.

Experiments in soil showed that 2 to 20 p.p.m. thiourea did not appreciably influence the decomposition of organic matter as measured by the rate of carbon dioxide production. The same quantities of thiourea caused a partial and temporary inhibition of nitrification and seemed, as judged by qualitative tests, to disappear from the soil within a few weeks. The inhibition was sometimes followed by an apparent stimulation of nitrification. Heavier applications of thiourea (200 p.p.m.) suppressed nitrification completely for up to six months and caused in neutral soils a minor and in acid soil a very drastic decrease in the numbers of bacteria and actinomycetes. The thiourea reaction disappeared from the soil extract after ten weeks to six months; a heavy accumulation of ammonium-nitrogen took place, and nitrification became active in neutral soil after the disappearance of the thiourea reaction. At the same time some 25 to 50 pct. of the thiourea sulphur was converted into sulphate. No evidence was found that minor amounts of the thiourea remove copper from the soil or render it unavailable, according to bio-assay with *Aspergillus niger* or extraction with versenate.

No uptake of thiourea, in quantities exceeding 5—10 p.p.m., could be detected in carrots watered with thiourea (60 kg/ha). Field observations showed no harmful effects of 2 kg/ha thiourea towards several agricultural crops. Greenhouse experiments showed that 50 kg/ha thiourea caused damage to red clover but not to barley; doses of 10 kg/ha or less were harmless to both plants. No uptake of thiourea could be detected chromatographically in the expressed juice of plants treated with the highest dose of thiourea.

The experimental results justify the conclusion that no harmful effects in the field can be expected to result from the use of farmyard manure treated with thiourea in the recommended amounts.

LITTERATURHENVISNINGER

- Association of Official Agricultural Chemists* (1955). — *Official Methods of Analysis*. 8. Udg. (New York): 509—512.
- Frederick, L. R., Starkey, R. L., og Segal, W.* (1957). — Decomposability of some organic sulfur compounds in soil. — *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 21 : 287—292.
- Fuller, W. H., Caster, A. B., og McGeorge, W. T.* (1950). — Behavior of nitrogenous fertilizers in alkaline calcareous soils. — *Arizona Agr. Exp. Stat. Techn. Bull.* No. 120.
- Gad, Inger, og Benjaminsen, J.* (1957). — Kolorimetrisk bestemmelse af nitrat i jord. — *Tidsskr. f. Planteavl* 61 : 119—132.
- Henriksen, A.* (1957). — Kobberbestemmelser i jord sammenlignet med virkningen af kobbergødskning. — *Tidsskr. f. Planteavl*. 61 : 685—717.
- Jensen, H. L., og Sørensen, H.* (1952). — Influence of some organic sulphur compounds and enzyme inhibitors on *Nitrosomonas europaea*. — *Acta Agr. Scandinavia* 2: 295—304.
- Jensen, H. L.* (1957). — Biological transformation of thiourea. — *Archiv f. Mikrobiologic* 28: 145—152.
- Kjær, A., og Rubinstein, K.* (1953). — Paper chromatography of thioureas. — *Acta Chem. Scand.* 7: 528—536.
- Lees, H.* (1952). — The biochemistry of the nitrifying organisms. I. The ammonia-oxidizing systems of *Nitrosomonas*. — *Biochem. Journal* 52: 134—139.
- Lees, H.* (1953). — Nitrification in soil and culture. — VI. Congresso Internazionale di Microbiologia (Roma), Riassunti delle Comunicazioni III: 124—125.
- Petersen, E. J.* (1926). — Undersøgelser over Forholdet mellem Jordens Kulsyreproduktion, kemiske Tilstandsform og mikrobiologiske Aktivitet. — *Tidsskr. f. Planteavl* 32: 625—672.
- Quastel, J. H., og Scholefield, P. G.* (1951). — Biochemistry of nitrification in soil. — *Bacteriological Reviews* 15: 1—53.
- Sørensen, Chr.* (1956). — The xylenol method and determination of nitrate in beets. — *Physiologia Plantarum* 9: 304—320.