

Biologisk sønderdeling af ukrudtsmidler i jordbunden

III. Endothal

Ved H. L. JENSEN

698. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning er et led i de undersøgelser, der ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling foretages over jordbundsmikrofloraens evne til at nedbryde syntetiske kemikalier, der anvendes til ukrudtsbekæmpelse. Forsøgsarbejdet er ledet og beretningen er udarbejdet af forstander, dr. agro. H. L. Jensen.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

Endothal eller dinatrium-3,6-endoxohexahydroptalat har i de senere år tiltrukket sig nogen opmærksomhed som ukrudtsmiddel (CRAFTS 1961). I Danmark har man især anvendt det til bekæmpelse af kamille og gåseurt i rødkløverfrømarker samt til sprøjtning i bederoer, her bl.a. som en aktiv bestanddel af det kombinerede ukrudtsmiddel Murbetol. Det anvendes i mængder af få kg rent stof pr. hektar og rangerer i fareklasse A, da det blandt ukrudtsmidlerne ifl. DALGAARD MIKKELSEN & POULSEN (1962) kun overgås i giftighed af dinitro-ortho-cresol og dinitrobutylphenol. Dets indvirkning på jordens mikroflora er meget lidt kendt. KRATOCHVIL (1951) fandt ingen kendelig indflydelse af endothal i tilnærmelsesvis markdoser på jordens respiration; den anvendte metodik forekommer dog ikke helt pålidelig. En enkelt angivelse af AUDUS (1964, diagram uden kommentarer) tyder på en ret kortvarig eksistens (2-8 uger) i jordbunden, men om dets tilbøjelighed til at undergå mikrobiologisk sønderdeling synes der iøvrigt ingen oplysninger at foreligge. I den følgende beretning gøres der rede for undersøgelser over dette problem.

Metoder

Bakterier med evne til at udnytte endothal som kulstofkilde isoleredes fra jord, der i forvejen havde været behandlet med dette stof under mark- eller laboratorieforhold.

Som grundsubstrat anvendtes mest følgende opløsning: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05 eller 0,10 pct., K_2HPO_4 0,05 eller 0,10 pct., MgSO_4 0,02 pct., i fortyndet jordextrakt: 4 dele demineraliseret vand + 1 del jordextrakt, den sidste fremstillet ved at autoklavere 1 kg havejord med 2 liter ledningsvand. Rent endothal (der velvilligst var stillet til rådighed af Nordisk Alkali Biokemi A/S) blev sat til det autoklaverede grundsubstrat fra en sterilfiltreret stamopløsning, som regel til en endelig koncentration på 0,23 pct. = 0,01 molær. Et tilsvarende fast substrat med 2,0 pct. agar anvendtes til de endothalsønderdelende bakteriers isolation og videre dyrkning. Oftest foretoges der en spredning på selektiv endothal-agar direkte fra jorden; i nogle tilfælde anlagdes der først et ophobningsforsøg i flydende endothal-substrat og derefter spredning på agarsubstratet, hvor de endothal-udnyttende bakterier gav sig til kende ved deres relativt hurtige og kraftige vækst (sml. fig. 2).

De gængse bakteriologiske metoder anvendtes til bakteriernes identifikation. Til kvantitativ bestemmelse af deres vækst med endothal i renkultur dyrkedes bakterierne under kontinuerlig rystning i den ovennævnte jordextrakt-endothal-opløsning. Under væksten målte kulturernes optiske tæthed (O.D.-enheder som udtryk for bakteriemængden) til forskellig tid på et Coleman-Junior spektrofotometer ved en lysbølgelængde på 600 m μ .

Endothalens nedbrydning i jorden og de fundne bakteriers aktivitet heri bestemtes ved måling af kuldioxidproduktionen efter PETERSEN'S metode (1926), som regel med 4 parallelkolber. I nogle tilfælde foretoges der tillige spiringsforsøg med byg i dybe petriskåle indeholdende 50-70 g vandmættet jord tilsæt med 20 bygkerner; de fremkomne spirer taltes og vejedes efter 4 dage (duplikatskåle). Forsøgstemperaturen var 25°C hvor andet ikke er nævnt.

Experimentelle resultater

ORIENTERENDE FORSØG

Ophobningsforsøg i jordextrakt-endothalopløsning anstilledes med 8 forskellige jorder, der ikke havde været i berøring med endothal; disse forløb resultatløst, idet der ikke på tilsvarende agarsubstrat fremkom kolonier, der voksede bedre end på endothalfri kontrolagar. Derimod isoleredes der 4 virksomme bakteriestammer fra jord, der var behandlet med endothal ved Statens Ukrudtsforsøg. Heriblandt var der tre stammer af ikke-sporedannende, gramnegative stavbakterier, der efterhånden syntes at miste evnen til at angribe endothal og ikke undersøgtes nærmere. Den fjerde stamme var en ikke med sikkerhed identificerbar *Corynebacterium*-lignende organisme med gult pigment, i det følgende betegnet *Cor. E. 15*; denne bevarede til sammenligning med senere isolerede bakterier.

Foruden at vokse godt med endothal som kulstofkilde viste de fundne bakterier sig også aktive heroverfor i selve jorden. Som eksempel kan anføres et forsøg med en lerjord fra laboratoriets have samt en neutral agerjord fra Virumgaard, tilsat endothal med og uden en tynd cellesuspension af *Cor. E. 15*. Resultaterne (fig. 1) viser, at i havejorden påvirker den store dosis på 1000 p.p.m. endothal ikke CO₂-produktionen kendeligt de første dage, men efter ca. en uges forløb stiger CO₂-kurven ganske brat; når der tillige »podes« med *Cor. E. 15*, indtræder stigningen allerede den første dag, for derefter gradvis at aftage, og efter 8-10 dages forløb når den daglige CO₂-produktion omtrent det samme niveau som i kontroljorden uden endothal. Agerjorden forholder sig noget lignende, dog sker der ingen spontan stigning i CO₂-produktionen uden bakteriepodning. Overskuddet af CO₂ i de to endothalbehandlede og »podede« jorder over kontroljorden er 64-66 mg/50 g, hvilket svarer til 83-86 pct. af kulstoffet i det tilsatte endothal. At afgøre om hele dette overskud virkelig stammer fra sønderdelt endothal ville kræve forsøg med C¹⁴-mærket stof, men at endothalet i alle tilfælde er undergået en stærk nedbrydning, bekræftes af et spiringsforsøg efter CO₂-forsøgets afslutning:

Behandling	Havejord		Agerjord	
	spiring pct.	vægt af spirer g	spiring pct.	vægt af spirer g
Ingen tilsætning.....	100	1.40	70	1.10
Endothal 1000 p.p.m....	70	1.10	0	—
do. + Cor. E. 15.....	90	1.60	35	0.50

Endothalens giftvirkning synes her helt ophævet i den »podede« havejord, delvis ophævet i den »upodede« havejord og den »podede« agerjord, men er bevaret i den sidste uden podning. Andre forsøg viste, at jorder, der ligesom den ovennævnte havejord var

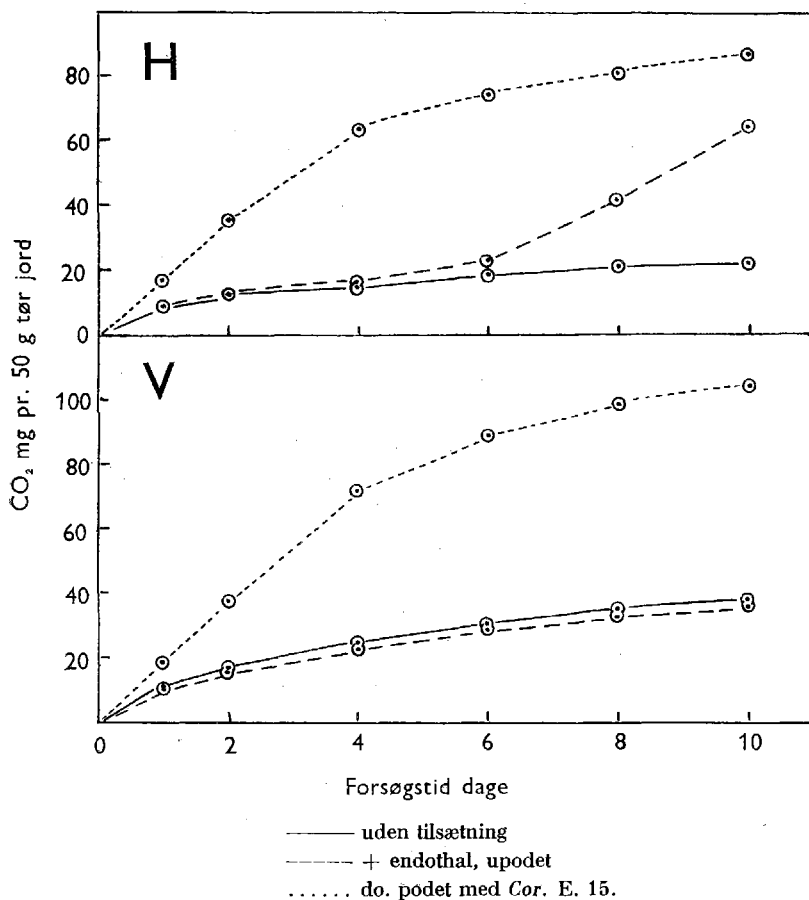


Fig. 1. CO₂-produktion i havejord (H) og agerjord fra Virumgaard (V).

spontant aktiveret ved endothaltilsætning, fremmede nedbrydningen heraf i ikke-aktiveret jord på samme måde som renkulturerne.

DE ENDOTHALSØNDERDELENDE BAKTERIER

Efter de orienterende forsøg isoleredes der en række bakterier med evne til at udnytte endothal fra forskellige i det følgende omtalte jorder, alle ved direkte spredning på endothal-agar. Flertallet af de isolerede stammer kunne identificeres som mere eller mindre varierende typer af *Arthrobacter globiformis*, en af de hyppigst forekommende jordbundsorganismer (BREED o.a. 1957). De følgende tolv stammer undersøgte nærmere:

Betegnelse:	Oprindelse:
E.A.	Lerjord fra Askov forsøgsstation
E.C.1	Lavmosejord fra Centralgaarden
E.G.1	Lerjord fra Gamby, Fyn
E.H.1	Lerjord fra laboratoriets have
E.M.1	Marskjord fra Højer
E.R.3	Let lerjord fra Risby, Sjælland
E.S.	Let lerjord fra Sengeløse, Sjælland
E. St	Sandjord fra Studsgaard forsøgsstation
E.U.2	Lerjord, Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde
E.U.3	Lerjord, Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde
E.U.4	Lerjord, Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde
E.V.1	Let lerjord fra Virumgaard

Isolaterne E.A., E.H.1 og E.V.1 stammede fra jord der var aktiveret ved endothalbehandling i laboratoriet, E.C.1, E.M.1 og E.St fra jord der på lignende måde var aktiveret i kasseforsøg ved Statens Ukrudtsforsøg, E.R.3, E.S og E.U.2-4 fra markforsøg med endothal udført af Statens Ukrudtsforsøg. Særlig opmærksomhed fortjener stammen E.G.1, der blev isoleret fra en jord behandlet med Murbetol som omtalt i sidste afsnit.

I ganske tidlige vækststadier optrådte bakterierne som uregelmæssigt formede, tildels lidt forgrenede stave af ca. 0,8-1,0 μ diameter og ret varierende længde, i typisk vinkellejring eller små uregelmæssige klynger, ubevægelige og uden endosporer. Gramfarvningen var variabel men overvejende negativ. I løbet af et til to døgn overgik stavene til de for *Arthrobacter* karakteristiske kort-ovale eller kugleformede celler. I deres almindelige morfologi

lignede de meget de af MULDER & ANTHEUNISSE (1963) afbildede *Arthrobacter*-arter. Deres vækst på gunstige agarsubstrater, især indeholdende 1 pct. glucose, var meget hurtig og kraftig og fremtrådte efter et par dage som en fyldig, glat, blød, hvid belægning; en lignende men noget svagere vækst opstod på jordextrakt-agar med 0.01 M endothal. Vækst fandt sted over et temperaturinterval fra 2-3°C til over 37°C. Den sidste temperatur var dog over optimum, og væksten ved den laveste temperatur var meget langsom, men rigelig efter 6 uger. pH-intervallet for vækst strakte sig fra pH ca. 5,0 til over 7,5. Ligesom på agar voksede de hurtigt og kraftigt i flydende substrat under kontinuerlig rystning. Under disse forhold syntes glucose og endothal at være omtrent lige gode næringsstoffer, som det fremgår af følgende forsøg med 5 stammer i jordextrakt-grundssubstrat:

Kulstofkilde	Tæthed (O.D.) efter 2 dage
Endothal 0,01 M	0.37 — 0.63
Glucose 0.0125 M	0.38 — 0.74
Grundssubstrat alene	0.01 — 0.03

I flere tilfælde var væksten næsten maximal efter 24 timer, men aftog efter 3 døgn (autolyse?). En nærmere beskrivelse af bakteriernes egenskaber vil iøvrigt blive givet andetsteds.

Renkulturerne var i stand til meget hurtigt at tilintetgøre endothalens giftighed, således som det fremgår af et orienterende forsøg, hvor stammen E.V.1 dyrkedes under kontinuerlig rystning i 20-ml portioner af jordextrakt-substrat + 0,01 M endothal i 300-ml koniske kolber podet med en enkelt dråbe tynd cellesuspension. Efter 24, 48 og 96 timers vækst udtoges to kolber, og bakterierne skiltes fra substratet ved kraftig centrifugering (20,000 x g i 15 min. ved 0°C). Centrifugaterne fra 24- og 48-timers kulturerne opbevarede frosne til den 4. dag, da der foretoges spiringsforsøg med 2 x 17,5 ml af hvert centrifugat i 70 g neutral havejord. Som kontrol tjente jord fugtet med rent vand og med en frisk 0,05 M endothalopløsning. Resultat:

	Kulturcentrifugater efter			Kontrol	
	24 h.	48 h.	96 h.	vand	endothalopl.
Spiring %.....	98	95	93	90	20
Vægt af spirer g....	1.13	1.20	1.30	1.15	0.04

Allerede efter 24 timer var således centrifugatets hemningsvirkning forsvundet.

Fra Risby-jorden isoleredes endvidere to stammer af aktive bakterier (E.R.7 og E.R.14), der meget lignede den ovenfor omtalte *Cor. E. 15*. I jordextrakt-endothal-opløsning voksede de ligesom *Art. globiformis* kraftigt, omend noget langsommere. Som omtalt nedenfor viste de sig som friskisolerede også at være aktive i jord, men syntes ellers tilbøjelige til gradvis at miste evnen til endothal-sønderdeling i renkultur.

SØNDERDELING AF ENDOTHAL I JORD

Nedbrydningen af endothal i jord, målt ved CO_2 -produktion og spiringsforsøg, undersøgtes (1) i jord, der forud havde været behandlet eller ikke behandlet med endothal i markforsøg, (2) i jord der ikke tidligere havde været i kontakt med endothal, men hvortil der blev sat en mindre mængde forudbehandlet jord som aktive-rende agens, og (3) i lignende jord, der »podedes« med renkulturer af endothalsønderdelende bakterier.

Tabel 1 viser resultaterne af forsøg (juni 1963) med tre endothal-behandlede jordprøver fra markforsøg samt de tilsvarende ubehandlede. Følgende jorder anvendtes: (a), en lerjord af pH 6,8 fra forsøg i rødkløver, Risby, sprøjtet med 25 liter endothalopløsning i december 1962. – (b), en let lerjord af pH 7,4 fra tilsvarende forsøg, Sengeløse, sprøjtet på samme tidspunkt. – (c), en svær lerjord fra Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde, samme forsøg og behandling.

Den ubehandlede jord fra Risby-forsøget viser først efter 11 dage forløb en svagt stigende CO_2 -produktion med endothaltilsætning sammenlignet med kontroljorden, men i den forud endothalbehandlede jord sker der efter 2 dage en meget stærk CO_2 -produktion, der bliver ganske svag efter en uge; på dette tidspunkt er der frigjort et overskud af CO_2 svarende til henved 90 pct. af kulstoffet i det tilsatte endothal. Den ubehandlede jord fra Sengeløse er noget mere aktiv uden dog at kunne måle sig med den forud endothalbehandlede, og endelig er i forsøget fra Statens Ukrudtsforsøg, Skovlunde, den ubehandlede og den endothalbehandlede jord omtrent lige aktive. I alle tre forsøg viser de forud endothalbehandlede jor-

Tabel 1. CO₂-produktion fra endotal 500 p.p.m. i jord behandlet og ikke behandlet med endotal i markforsøg.

Forsøgssted	Forsøgs- tid dage	CO ₂ , mg pr. 50 g tør jord				Endotal-C % frigjort som CO ₂ *	
		ubehandlet		behandlet		ube- handlet	be- handlet
		uden tils.	+endo- thal	uden tils.	+endo- thal		
Risby	1	18	16	15	19	—	(10)
	2	32	27	25	44	—	50
	3	40	36	32	56	—	63
	4	47	43	37	64	—	71
	6	59	56	46	77	—	81
	7	64	62	47	81	—	89
	11	75	82	—	—	18	—
	14	82	95	—	—	34	—
Sengeløse	1	10	10	6	10	—	(10)
	2	19	22	13	34	(8)	55
	3	25	30	17	42	13	66
	4	30	41	21	48	29	71
	6	39	52	26	56	34	80
	7	43	56	28	59	34	82
	11	56	72	—	—	42	—
	14	64	81	—	—	44	—
Skovlunde	1	13	14	11	14	—	(8)
	2	20	35	17	35	39	47
	5	32	57	28	52	65	63
	7	37	63	32	57	68	65
	10	44	72	38	64	73	68

* Overskud over »uden tilsætning«.

der sig allerede efter 2 døgn at frigøre et CO₂-overskud, der svarer til ca. halvdelen af det tilsatte endothalkulstof.

I forsøg af denne type foreligger den mulighed, at jord fra de ubehandlede parceller kan være inficeret med endothalsønderdelende bakterier fra de behandlede forsøgsled gennem markbearbejdningen (sml. sidste afsnit). Der anstilledes derfor nogle forsøg med helt »endotalfremmede« jorder: en let lerjord af pH ca. 7,0 fra laboratoriets have og en lignende omtrent neutral agerjord fra Virumgaard, begge med og uden tilsætning af 25% af den tilsvarende jord, aktiveret gennem længere tids opbevaring i laboratoriet i fugtig tilstand og med endothaltilsætning (fra disse isoleredes *Arthrobacter*-stammerne E.H.1 og E.V.1). Til havejorden blev der

Tabel 2. CO₂-produktion fra endothal (500 p.p.m.) i jord med og uden tilsætning af forud endothalaktiveret jord

Jord og tilsætning	Forsøgstid dage	CO ₂ mg pr.	Endothal-C
		50 g tør jord	% frigjort som CO ₂
A. Havejord uden tilsætning.....	10	40	—
+ Endothal.....	10	46	15
+ 25% aktiv havejord.....	10	45	—
do.+ endothal.....	10	76	80
+ 10% aktiv Studsgaard-jord .	8	34	—
do.+ endothal.....	8	63	76
+ 10% aktiv marskjord.....	8	37	—
do.+ endothal.....	8	66	76
+ 10% aktiv lavmosejord.....	8	41	—
do.+ endothal.....	8	64	71
B. Virumgaard-jord uden tils.....	10	28	—
+ endothal.....	10	31	(8)
+ 25% aktiv Virumg.-jord....	10	26	—
do.+ endothal.....	10	55	76

Spiringsforsøg efter CO₂-forsøgets afslutning (10 dage)

Tilsætning	Havejord (A)		Virumgaard-jord (B)	
	spiring	vægt af	spiring	vægt af
	%	spirer g	%	spirer g
Aktiv jord (kontrol).....	100	1.40	93	1.22
Endothal.....	35	0.25	8	0.30
Aktiv jord+ endothal.....	90	1.35	93	1.38

desuden sat 10% af tre forskellige jorder, der var aktiverede i kasseforsøg ved Statens Ukrudtsforsøg; en sandjord fra Studsgaard, en marskjord fra Højer og en lavmosejord fra Centralgaarden (sml. s. 557). Resultaterne ses i tabel 2.

I begge jorder uden aktiverende tilsætning sker der kun en ubetydelig (om overhovedet signifikant) CO₂-produktion fra tilsat endothal. Når aktiveret jord tilsættes, svarer CO₂-overskuddet efter 8-10 dage til ca. 70-80% af endothalkulstoffet. I overensstemmelse hermed viser spiringsforsøgene en stærk hemningsvirkning af endothal alene, men ingen hvor der tillige er tilsat aktiveret jord.

Forsøgene over aktivering af jord med renkulturer indledtes med den ovennævnte havejord samt en let lerjord fra Askov, af

Tabel 3. CO₂-produktion fra endothal (1000 p.p.m.) i ikke-aktiveret jord med og uden podning med *Arthrobacter globiformis* E.U.3

Forsøgstid dage	CO ₂ mg pr. 50 g tør jord					
	Havejord			Askov-jord		
	uden tilsætning	endothal upodet	endothal podet	uden tilsætning	endothal upodet	endothal podet
1	11	14	45	8	9	36
2	17	19	58	12	13	52
3	20	23	67	15	16	59
5	26	29	80	21	22	71
7	30	33	—	24	25	—
10	34	38	—	29	30	—
15	42	46	—	36	38	—
		Endothal-C frigjort som CO ₂ %				
1	—	(8)	44	—	—	35
5	—	(8)	71	—	—	64

pH 6,4. Som »podemateriale« anvendtes den fra Skovlunde-jord isolerede stamme E.U.3. Resultaterne ses i tabel 3 og viser, at processen forløber ganske som i det foregående forsøg. Uden podning sker der kun en ubetydelig endothalnedbrydning i havejorden og næppe nogen i Askov-jorden. Fra denne sidste kunne der heller ikke ved forsøgets afslutning ved spredning på endothalagar påvises endothalsønderdelende bakterier; disse optrådte først efter længere tids henstand, og herfra isoleredes stammen E.A.1. Bakteriepodningen resulterer derimod i en forøget CO₂-produktion, der svarer til ca. 40% endothal-kulstof efter 24 timer og 60-70% efter 5 dage; på dette tidspunkt viser også spiringsforsøgene, at hemningsvirkningen er ophævet.

Et lignende forsøg med flere bakteriestammer i en moderat sur lerjord fra Virumgaard gav de i tabel 4 anførte resultater. De tre *A. globiformis*-stammer forholder sig ganske som i neutral jord, idet de giver et CO₂-overskud svarende til ca. 50% endothalkulstof efter 1 døgn og ca. 80% efter 8 døgn. De to stammer af corynebakterier har en lignende men langsommere virkning. Den spiringshemmende virkning ophæves helt af *Arthrobacter*-stammerne efter 8 dage og helt eller delvis af corynebakterierne efter 14 dage. Jordens reaktion bliver her kendeligt mindre sur i forsøgets løb, især med endothaltilsætning, måske fordi endothalet som natriumsalt af en organisk syre har fysiologisk alkalisk karakter.

Tabel 4. CO₂-produktion fra endothal (500 p.p.m.) i sur lerjord (Virumgaard) podet med forskellige stammer af endothalsønderdelende bakterier.

Forsøgs- tid dage	uden til- sætning	uden upodet	CO ₂ mg pr. 50 g tør jord +endothal og podning						
			Art. E.H.1	Art. E.R.3	Art. E.V.1	Cor. E.R.14	Cor. E. 15		
1	8	9	27	26	26	10	8		
2	15	16	38	38	37	19	16		
4	26	27	56	55	54	35	31		
6	31	33	62	62	60	45	42		
8	36	38	68	68	66	53	52		
11	42	46	—	—	—	63	64		
14	48	52	—	—	—	71	74		
			Endothal-C % frigjort som CO ₂						
1	—	—	50	47	47	—	—		
8	—	(5)	83	83	78	44	42		
14	—	10	—	—	—	60	68		

pH før forsøget, 5.0. Efter fors. u. tils. 5.5, +endothal, 5.7-5.8

Spiringsforsøg efter CO₂-forsøgets afslutning -

Efter 8 dage	+ Art. E.H.1	+ Art. E.R.3	+ Art. E.V.1	
Spiring %.....	85	90	90	
Vægt af spirer g. .	1.22	1.35	1.30	
Efter 14 dage	+Cor. E.R. 14	+Cor. E. 15	Upodet	Uden tils.
Spiring %.....	68	90	10	85
Vægt af spirer g. .	0.88	1.30	0.02	1.22

Forsøget gentoges med de samme fem stammer i en stærkere sur jord, hvis reaktion (oprindeligt pH 4,7) ændredes i mindre udpræget grad, som det ses i tabel 5. Ved pH-niveauet 4,9-5,1 er kun to stammer virksomme: *A. globiformis* E.V.1 (der også i renkultur viste sig som den mest syreresistente og kunne vokse ved pH omkring 5,0), samt den ene corynebakterie. CO₂-produktionen tyder på en meget vidtgående nedbrydning af endothalet; *Art. E.V.1* synes endog at give total iltning. Dog må det bemærkes, at samtlige andre forsøgsled med endothaltilsætning viser en svagt forøget CO₂-udskillelse i sammenligning med jorden uden tilsætning; man kan ikke afvise den mulighed, at endothal ligesom nitrophenolerne (sml. JENSEN 1964) kan stimulere mikrofloraens respiration ved dette pH-niveau uden selv at omsættes.

Tabel 5. CO₂-produktion fra endothal (500 p.p.m.) i stærk sur lerjord (Virumgaard) podet med forskellige stammer af endothalsønderdelende bakterier

Forsøgs- tid dage	uden til- sætn.	uden upodet	CO ₂ mg pr. 50 g tør jord + endothal og podning				
			Art. E.H.1	Art. E.R.3	Cor. E.V.1	Cor. E.R.14	Cor. E.15
1	6	7	7	7	11	7	7
3	12	16	15	15	37	30	15
5	19	23	22	22	51	48	23
8	27	32	31	32	63	60	32
12	36	41	41	41	75	70	42
			Endothal-C % frigjort som CO ₂ -				
3	—	(10)	(8)	(8)	65	47	(8)
12	—	(13)	(13)	(13)	100	89	(16)
pH efter forsøg	4.5	4.9	4.9	5.0	5.1	5.1	4.9

Sluttelig udførtes et par forsøg til oplysning om relationen mellem CO₂-frigørelsen og ophævelsen af endothalets spiringshemmende virkning. Hertil anvendtes den før omtalte havejord samt en moderat sur Virumgaard-jord (pH 5,4), begge med 500 p.p.m. endothal og desuden 0,5 ml af en tynd (O.D. 0,05) celsesuspension af *A. globiformis* E.V.1 pr. 100 g lufttør jord. Til forskellig tid udtoges der to fælleskolber, jorden opvarmedes 15 min. i strømmende damp for at afbryde de endothalsønderdelende bakteriers virksomhed, og tilsåedes med byg til spiringsforsøg; opvarmningen viste sig ikke at påvirke spiringen i påviselig grad. Resultaterne ses i tabel 6 og tabel 7.

I begge forsøg hemmes spiringen i upodet jord med endothal næsten fuldstændigt i 7-8 dage. Podningen med aktive bakterier bevirker ligesom i de forudgående forsøg en øjeblikkelig stigning i CO₂-produktionen, svarende til 26-30 % af endothalkulstoffet efter eet døgn og ca. 70 % efter en uge. Allerede efter det første døgn er her tegn på en begyndende inaktivering af endothalet; denne proces fortsættes med nogen uregelmæssighed i de følgende dage, indtil spiringsprocenten efter 7-8 dage er blevet normal. Spirernes udvikling udtrykt ved deres vægt er dog endnu på dette tidspunkt noget hæmmet, muligvis af små residua af endothal eller eventuelt giftige nedbrydningsprodukter, der ikke kan sønderdeles i den

Tabel 6. CO₂-produktion og spiringshemning i havejord + endotal (500 p.p.m.) med og uden podning med *A. globiformis* E.V.1

Forsøgstid dage		1	2	3	5	7
CO ₂ mg pr. 50 g tør jord	Uden tilsætning	12	18	21	27	32
	+ endotal upodet	12	18	22	27	32
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	22	36	43	52	58
Endotal-C % som CO ₂	+ endotal upodet	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	26	49	58	66	68
Spiring %	Uden tilsætning	—	—	—	—	82
	+ endotal upodet	—	0	—	0	5
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	15	80	70	—	82
Vægt af spirer g	Uden tilsætning	—	—	—	—	1.27
	+ endotal upodet	—	—	—	—	0.01
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	0.02	0.35	0.48	—	0.98

Spiringsforsøg ved CO₂-forsøgets indledning (0 dage):

	Uden tilsætning	+ endotal
Spiring %	90	0
Vægt af spirer g . .	1.30	—

Tabel 7. CO₂-produktion og spiringshemning i sur lerjord (Virumgaard) + endotal 500 p.p.m. med og uden podning med *A. globiformis* E.V.1

Forsøgstid dage		1	2	3	4	6	8
CO ₂ mg pr. 50 g tør jord	Uden tilsætning	3.9	6.2	8.6	9.8	12	14
	+ endotal upodet	4.2	6.5	8.7	10	13	14
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	15	25	32	35	39	42
Endotal-C % som CO ₂	+ endotal upodet	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	30	49	61	66	71	73
Spiring %	Uden tilsætning	—	—	—	—	—	88
	+ endotal upodet	—	0	—	12	—	3
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	12	68	60	50	68	95
Vægt af spirer g	Uden tilsætning	—	—	—	—	—	1.20
	+ endotal upodet	—	—	—	0.01	—	<0.01
	do. + <i>Art.</i> E.V.1	0.03	0.16	0.30	0.22	1.16	0.90

Spiringsforsøg ved CO₂-forsøgets indledning (0 dage):

	Uden tilsætning	+ endotal
Spiring %	90	0
Vægt af spirer g . .	1.13	(0)

partielsteriliserede jord. I det hele taget er i disse forsøg endothalnedbrydningen efter CO_2 -produktionen at dømme knapt så stærkt som i nogle af de forudgående.

ENDOTHALSØNDERDELLENDE BAKTERIERS FOREKOMST UNDER MARKFORHOLD

De forudgående forsøg viser, at i jord med tilsætning af endothal opbygges der efterhånden en population af endothalsønderdelende bakterier, hvilket er tilfældet såvel med de i laboratoriet behandlede jorder som med prøverne fra markforsøgene i Risby, Sengeløse og Skovlunde. I de forsøg, der er gengivet i fig. 1 samt tabelterne 1-7, begynder denne aktivering overfor endothal dog kun undtagelsesvis indenfor et par uger, hvilket kunne tyde på, at de aktive bakterier opstår ved en induceret mutationsproces snarere end simpel opformering af allerede eksisterende organismer med latent evne til endothalsønderdeling.

Til nærmere oplysning om en sådan aktiv mikrofloras opståen i marken under indflydelse af de i praksis anvendte endothalholdige ukrudtsmidler anstilledes der en række kimtællingsforsøg fra forskellige jorder med eller uden behandling med disse midler. Spredning foretoges på jordextrakt-endothal-agar, fortynding 1:10 og 1:100, i duplikat-petriskåle, der inkuberedes indtil 10 dage og undersøgte for fremkomst af kraftigt voksende kolonier med endothalsønderdelende evne (fig. 2 viser et godt eksempel herpå).

I en første serie undersøgte 25 tilfældigt udtagne jordprøver blandt de, der indsendtes til laboratoriets jordbundskemiske afdeling; deraf stammede 13 fra Jylland, 10 fra Sjælland og to fra Fyn. Blandt prøverne var der 12 lerjorder, 9 sandjorder og 4 humusjorder, af pH fra 5,1 til 7,9. I de allerfleste tilfælde sås ingen tegn på forekomst af endothalforbrugende bakterier. Af og til fremkom der nogle ret kraftigt voksende kolonier, der imidlertid i subkulturer viste sig at vokse lige godt på jordextrakt-agar med og uden endothal – i et par tilfælde fordi de udnyttede selve agaren som kulstofkilde. Virkeligt endothalsønderdelende bakterier (*A. globiformis* E.G.1) fandtes kun og endda fåtallige i en lerjord fra Gamby (Fyn), der stammede fra et båndsprøjtningforsøg med Murbetol (sml. s. 557).

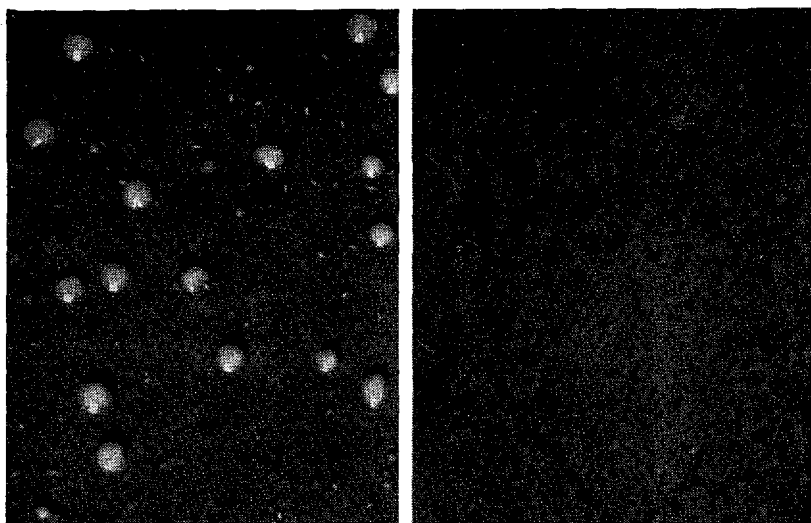


Fig. 2. Bakterietælling på jordextrakt-endothal-agar, 4 d. 25°C, fort. 1:100. Jord fra sprøjtningforsøg ved Aarslev forsøgsstation (sml. tabel 8, A.1). Murbetol-behandlet jord (t. v.) og ubehandlet jord (t. h.). Ca. naturlig størrelse (Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor).

I en anden forsøgsserie i foråret 1964 undersøgte der jordprøver fra 12 markforsøg, hvor der var anvendt endothalholdige ukrudtsmidler. Halvdelen af disse forsøg var anlagt ved statens forsøgsstationer, hvor der tillige blev udtaget prøver fra ubehandlede parceller. Spredningen fandt sted få dage efter prøveudtagningen. De øvrige prøver stammede fra behandlede parceller i båndsprøjtningforsøg i bederoer udført under landbo- og husmandsforeningernes kemikalieudvalg og var velvilligst skaffet til veje af konsulent J. Lindegaard, Odense. Resultaterne findes i tabel 8 og viser, at ca. et år efter endothalbehandlingen findes der konstant en mere eller mindre rigelig flora af endothalsønderdelende bakterier (tilsyneladende alle *A. globiformis*). Kun i eet tilfælde (forsøg B. 6) er floraen meget sparsom; en lignende sparsom forekomst ses i de ubehandlede parceller fra forsøgsstationerne – sandsynligvis som resultat af en infektion med markredskaberne under markbearbejdningen. Forsøget A.6 frembyder interesse fordi de endothalsønderdelende bakteriers formering her, måske med undtagelse af to dage mellem prøveudtagning 15/4 og spredning 17/4, skete ved

Tabel 8. Forekomst af endothalsønderdelende bakterier i jord behandlet med endothalholdige ukrudtsmidler i marken.

Lokalitet og behandling	»Positive« kolonier på endothal-agar	
	Fort. 1:10	Fort. 1-100
A. Forsøgsstationerne		
1. Forsøg i bederoer, Aarslev forsøgsstation. Lerjord, pH 6.2-6.4. Udtaget 2-4-1964.		
a) Sprøjtet med Murbetol 1-5-1963.....	> tællelig	33-39
b) Ubehandlet.....	12-26	1-2
2. Forsøg i bederoer, Studsgaard forsøgsstation. Sandjord, pH 5.6-5.9. Udtaget 7-4-1964.		
a) Sprøjtet med Murbetol 7-5-1963.....	> tællelig	35-39
b) Ubehandlet.....	0-2	0-1
3. Forsøg i bederoer, Ødum forsøgsstation. Lerjord, pH 6.5-6.7. Udtaget 10-4-1964.		
a) Sprøjtet med Murbetol 15-5-1963.....	> tællelig	46-54
b) Ubehandlet.....	7-11	0-1
4. Forsøg i bederoer, Jyndeved forsøgsstation. Sandjord, pH 6.2. Udtaget 15-4-1964.		
a) Sprøjtet med Murbetol 15-4-1963.....	> tællelig	41-43
b) Ubehandlet.....	7-8	2-6
5. Forsøg i bederoer, Tystofte forsøgsstation. Lerjord, pH 6.8-6.9. Udtaget 15-4-1964.		
a) Sprøjtet med Murbetol 13-5-1963.....	> tællelig	55-57
b) Ubehandlet.....	16-21	3-4
6. Forsøg i rødkløver, Frankerup, udstationeret fra Tystofte. Svær lerjord, pH 6.8-7.6. Udtaget 15-4-1964.		
a) Sprøjtet 3-1-1964 m. Endothal Weedkiller..	> tællelig	77-106
b) Ubehandlet.....	0-1	0-0
B. Kemikalieudvalgets forsøg, Fyn 1963*		
7. Let lerjord, pH 6.7 (Markv. Andersen, Biskorup).	> tællelig	39-40
8. Svær lerjord, pH 6.5. (Voldgaard, Vollerslev)...	26-36	2-3
9. Svær lerjord, pH 7.0 (Juhl Jensen, Haagerup) ..	118-155	5-7
10. Svær lerjord, pH 6.3 (Fraugdegaard, Marlev)...	87-105	7-7
11. Let lerjord, pH 7.2 (St. Lyndelse, Højrup).....	84-104	10-16
12. Let lerjord, pH 6.5 (Sandholm, St. Lyndelse)...	3-5	0-0

* I alle disse forsøg blev der sprøjtet med Murbetol i den sidste uge af april 1963. Prøverne blev udtaget 9-4-1964 og undersøgt et par uger senere.

en fremherskende lav temperatur. Ved det nærmeste meteorologiske observationssted (Tystofte forsøgsstation) var de gennemsnitlige daglige temperaturminima og -maxima ifl. velvillig opgivelse fra forstander Frede Rasmussen følgende:

	Januar	Februar	Marts	April 1-8.	April 9-15.
Minimum gens....	÷ 2.4	÷ 2.9	÷ 2.3	1.2	6.4
Maximum gens...	2.0	2.5	2.1	6.4	6.9

Jordtemperaturen på forsøgsstedet kendes ikke, men må have været tilsvarende lav, sandsynligvis med noget mindre udsving. I denne forbindelse er det sikkert ikke uden betydning, at *A. globiformis* har et særdeles lavt temperaturminimum for vækst.

Oversigt

De her udførte forsøg viser tydeligt, at ved behandling med endothal beriges jorden efterhånden med bakterier, der er i stand til at udnytte dette ukrudtsmiddel som kulstofkilde. Organismer med evne hertil synes ikke normalt at forekomme i dyrkede jorder, men først at udvikle denne evne efter en vis latensperiode.

Relativt få mikroorganismer synes at kunne tilpasse sig til udnyttelse af endothal, men for visse af dem repræsenterer ukrudtsmidlet en lige så god kulstofkilde som glucose. Fra et økologisk synspunkt er det bemærkelsesværdigt, at de hyppigst fundne endothalsønderdelende bakterier er stammer af en af de allermest udbredte jordbundsorganismer: *Arthrobacter globiformis*, der tillige med beslægtede former udgør en betydelig del af jordbundens levende masse. Når bakterierne endnu kan påvises ca. et år efter endothaltilførselen, må det bl.a. tilskrives deres store tilpasningsdygtighed: udnyttelse af et meget stort antal organiske stoffer som kulstofkilde, et vidt temperaturinterval (ca. 2°C til mere end 37°C) for vækst og en tilsvarende ringe følsomhed for varierende reaktion (vækst fra pH ca. 5 til over 7,5). Den sidste egenskab medfører, at selv om der ikke er fundet svampe blandt de endothalsønderdelende organismer, vil jordreaktionen næppe umuliggøre nedbrydning af endothal i nogen dyrket jord.

I laboratorieforsøg med jord, der engang er aktiveret overfor endothal, enten ved behandling hermed eller ved direkte »pod-

ning« med endothalsønderdelende bakterier, nedbrydes selv doser på 500 p.p.m. endothal under gunstige betingelser så hurtigt, at hemningsvirkningen overfor indikatorplanter forsvinder på ca. en uge. Dette er en nedbrydningshastighed, der nærmest kan sammenlignes med allylalkoholens (JENSEN 1961). Det er endvidere bemærkelsesværdigt, at sådanne enorme doser på et par hundrede gange den i praksis anvendte mængde endothal ikke synes at påvirke jordbundsmikrofloraens samlede stofskifte målt ved CO₂-produktionen i ikke-aktiveret jord.

Alt i alt tør således endothalet til trods for sin store giftighed overfor højere organismer regnes blandt de bekæmpelsesmidler, der frembyder mindst fare for uønskede bivirkninger i jordbunden.

SUMMARY

Biological decomposition of herbicides in the soil. III. Endothal

The herbicide endothal (disodium-3,6-endoxohexahydrophthalate) was rapidly decomposed in soil and *in vitro* by various groups of bacteria, most prominent among which were a number of strains of *Arthrobacter globiformis*.

Soils that had not previously been in contact with endothal did not readily decompose that compound and did not seem to harbour organisms able to do so. Such organisms, however, appeared after incubation periods of some weeks, possibly as induced mutants. In soils that had in this way been spontaneously activated or had been "inoculated" with active bacteria the breakdown of added endothal began immediately. The decomposition of 500 to 1000 p.p.m. endothal proceeded so rapidly that excess amounts of carbon dioxide corresponding to 70-80% of the carbon in the added endothal could be recovered within a week at 25°C. Concurrent with this breakdown the inhibitory effect on barley seedlings as indicator plants was abolished. One strain of *A. globiformis* was active in soil of pH about 5.0, and all were capable of growth at 2-3°C. Doses of 500 to 1000 p.p.m. endothal, which is about two to five hundred times the amounts applied in practice, did not appear to influence the gross respiration of the microflora in non-activated soil.

Soils treated with endothal in field experiments were constantly found to harbour endothal-decomposing bacteria in varying numbers after periods up to one year. Such organisms were not normally detected in soils that had not been treated with endothal; sporadic occurrence in untreated plots from field experiments with endothal was probably due to infection from the treated plots through soil cultivation.

Endothal appears upon the whole to be among those herbicides that are most readily removed from the soil by microbiological activity.

LITTERATURHENVISNINGER

- Audus, L. J.*, 1964: The Physiology and Biochemistry of Herbicides. Academic Press, London & New York.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R.*, 1957: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Crafts, A. S.*, 1961: The Chemistry and Mode of Action of Herbicides. Interscience Publishers, New York - London.
- Dalgaard-Mikkelsen, S., & Poulsen, E.*, 1962: Toxicity of herbicides. Pharmacological Reviews v. 14: 225-250.
- Jensen, H. L.*, 1961: Biologisk sønderdeling af ukrudtsmidler i jordbunden. II. Allylalkohol. Tidsskr. f. Planteavl v. 65: 185-198.
- Jensen, H. L.* (1964): Om indvirkning af dinitro-ortho-cresol, dinitrobutylphenol og 2,4-dinitrophenol på jordrespirationen. Tidsskr. f. Planteavl (i trykken).
- Kratochvil, D. E.*, 1951: Determinations of the effect of several herbicides on soil microorganisms. Weeds v. 1: 25-31.
- Mulder, E. G., & Antheunisse, J.*, 1963: Morphologie, physiologie et écologie des Arthrobacter. Ann. Inst. Pasteur v. 105: 46-74.
- Petersen, E. J.*, 1926: Undersøgelser over Forholdet mellem Jordens Kulsyreproduktion, kemiske Tilstandsform og mikrobiologiske Aktivitet. Tidsskr. f. Planteavl v. 32: 625-671.