

Biologisk sønderdeling af ukrudtsmidler i jordbunden.

IV. Dinitro-ortho-cresol.

Ved *H. L. Jensen*

757. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning er et led i Statens Planteavlslaboratoriums undersøgelser over mikroorganismernes betydning for ukrudtsmidlers inaktivering. Det experimentelle arbejde er udført ved laboratoriets bakteriologiske afdeling i Lyngby under ledelse af forstander, dr. agro. *H. L. Jensen*, der har udarbejdet beretningen.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

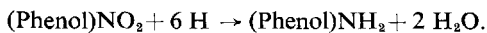
Omend »hormonmidlerne«, især 2,4-D og 4K-2M, er kvantitativt langt de vigtigste ukrudtsmidler i dansk jordbrug såvel som i global målestok, spiller de såkaldte »gule midler« en ikke uvæsentlig rolle som mindre selektive bekæmpelsesmidler og repræsenteres af to forbindelser: 4,6-dinitro-ortho-cresol (DNOC) og 4,6-dinitro-(sec.)butylphenol (DNBP, dinoseb). Begge anvendes som regel i form af ammonium- elleraminsalte i mængder af 1,5-2,5 kg rent stof pr. ha. og er de stærkest giftige blandt de i Danmark anerkendte ukrudtsbekæmpelses- og tvangsmodningsmidler. I kraft af deres stærke biokemiske virkning på levende væsners stofskifte (assimilationshemmning og respirationsstimulering) som de har til fælles med andre nitrophenoler, kan de udøve en påfaldende virkning på jordbundsmikrofloraens respiration i både positiv og negativ retning (*Jensen* 1964) og kan virke dræbende på adskillige af de mere følsomme medlemmer af mikrofloraen.

I sammenligning med de omfattende undersøgelser, der foreligger over mikrobiel sønderdeling af hormonmidlerne (*Audus* 1964), er vi kun meget dårligt orienterede om de tilsvarende forhold, der gælder for de to dinitrophenoler. Begge men især DNBP synes at høre til de mere modstandsdygtige ukrudtsmidler. Nogle af de første angivelser skyldes *Petersen & Hammarlund* (1953), der fandt at giftigheden af DNOC overfor indikatorplanter forsvandt efter ca. 8 uger i svagt

alkalisk jord (pH 7,8) men først efter 8-12 uger i svagt sur jord (pH 6,0): de tilsvarende tal for DNBP var 5-6 måneder i alkalisk og (åbenbart langt) mere end et halvt år i sur jord. Der var her tale om jordprøver, der opbevarede under laboratorieforhold uden mulighed for udvaskning med regnvand. *Audus* (1964) har skematisk for DNOC angivet en lignende holdbarhed i jord (10-16 uger), men omtaler intet tilsvarende om DNBP. En betydelig hurtigere inaktivering af DNOC iagttog *Riepma* (1956) overfor indikatorplanter i løbet af 5 uger under ikke helt klart beskrevne forsøgsbetingelser. *Bruinsma* (1960) fandt endog den spiringshemmende virkning af DNOC forsvundet efter 10-14 dage i laboratorieforsøg med en blanding af sand, tørv og kompost, og selv i steriliseret jord skete dette efter 3 uger (om jorden forblev steril under forsøget ses dog ikke tydeligt); i jorden kunne der ikke udover DNOC påvises andre phenolforbindelser som mellemprodukter ved DNOCnedbrydningen. Om alle disse forsøg gælder det, at DNOC tilsattes jorden i langt højere koncentrationer end i praksis: 20-50 p.p.m. svarende til 50-125 kg aktivt stof pr. ha, eller næsten 100 gange markdosis. Dog må det erindres, at under markforhold fordeles stoffet langt fra ensartet i pløjelagsdybden (= 2500 tons/ha), og lokalt kan der meget vel blive tale om koncentrationer svarende til laboratorieforsøgene.

Inaktivering er efter alt at dømme en biologisk proces, der katalyseres af jordbundens mikro-

flora, men om de virksomme organismers natur ved man meget lidt. Nitrophenoler i almindelighed kan i mange tilfælde reduceres ad biologisk vej til de tilsvarende aminoforbindinger efter ske-maet:



Adskillige enzymer fra bakterier såvel højere organismer kan hidføre denne proces. Herpå beror det at parathion, som er en diethyl-svovl-fosfater af para-nitrophenol, kan miste størstedelen af sin giftighed i vommen hos drøvtyggere, idet vomfloraen reducerer parathion til det ret ugiftige aminoparathion (*Andersen & Karlog* 1963). Direkte udnyttelse af nitrophenoler som kulstof- og/eller kvælstofkilder kendes kun hos få bakterier. Nogle ældre og mest kvalitative angivelser er nævnt af *Gundersen & Jensen* (1956). Senere har *Cain* (1958) og *Cartwright & Cain* (1959) berettet om *Nocardia*-arter samt stammer af *Pseudomonas fluorescens*, der udnytter nitrobenzoesyre, og *Germanier & Wuhrmann* (1963) har ligeledes fundet flere *Pseudomonas*-stammer, der udnytter nitrophenol og nitrobenzoesyre samt en *Nocardia* der udnytter 2,4-dinitrophenol. Alle de nævnte forfattere fandt som identificerbare stofskifteprodukter overvejende nitrit og ammoniak i vekslende forhold, *Germanier* og *Wuhrmann* (1963) tillige små mængder nitrat (!). En uidentificeret *Nocardia* kan ifl. *Villanueva* (1960) udnytte bl.a. nitrobenzoesyre og tillige (*Villanueva & Garcia-Acha* 1961) para-nitrophenol som eneste kulstof- og kvælstofkilde, men uden nitritfrigørelse; den omtales som isoleret fra inaktiveringsforsøg med DNOC, men der nævnes intet om dens evne til at omsætte dette stof.

Udnyttelse af DNOC synes kun at være nærmere undersøgt af *Gundersen & Jensen* (1956), der fra DNOC-behandlet jord isolerede en variant af *Corynebacterium* (efter nugældende nomenklatur *Arthrobacter*) *simplex*, der i renkultur kunne omsætte p-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol og 2,4,6-trinitrophenol (picrinsyre) under frigørelse af nitrit. *Teuteberg* (1964) har for nylig kort omtalt en ikke nærmere beskrevet bakterie,

der kan angribe DNOC foruden at kunne danne rigeligt nitrit af 2,4-dinitrophenol. Hverken denne eller den ovenfor omtalte *A. simplex* angreb DNBP. Bakterier med evne hertil er kun omtalt kort af *Douros & Reid* (1956) i en foreløbig meddelelse, der ikke synes at være fulgt af nogen nærmere oplysninger.

I den nærværende beretning omtales en række undersøgelser over nedbrydning af DNOC i jord-bunden under indvirkning af forskellige mikroorganismer. En mere indgående behandling af disse organismers egenskaber vil fremkomme senere, såvel som undersøgelser over omsætning af DNBP.

Metoder

Sønderdelingsforsøg og ophobningsforsøg med DNOC-sønderdelende bakterier foretoges i fugtig jord (ca. 2/3 vandkapacitet) med tilsætning af (alm.) 50 p.p.m. DNOC, her som i alle andre tilfælde i form af natriumsalt. Portioner på 200 til 500 g fugtig jord opbevarede ved 25°C i 250- eller 500-ml mælkeflasker med gennemborede, vatlukkede korkpropper.

Til ophobning og fortsat dyrkning i flydende substrat anvendtes en simpel grundopløsning af 0,1 pct. K_2HPO_4 i en blanding af 9 rumfang ledningsvand og 1 rumfang jordextrakt (1 kg havejord autoklaveret med 2 liter ledningsvand). Til det sterile grundsubstrat sattes 0,2 millimol DNOC fra en steril stamopløsning. Substratet anvendtes dels i portioner af 50 ml 300-ml erlenmeyerkolber til ophobningsforsøg, dels i 5-ml portioner i reagensglas til fortyndings- og tællingsforsøg. Vækst af DNOC-sønderdelende bakterier viste sig dels ved affarvning af den gule DNOC-opløsning og dels ved fremkomst af nitritreaktion (rød farve med Gries' reagens).

Til rendyrkning af bakterierne tjente et fast substrat svarende til den ovennævnte DNOC-opløsning, uden jordextrakt, men med 2 pct. agar, ofte tillige en ringe mængde gæreks-trakt (0,01-0,02 pct.) for at sikre forsyning med eventuelt krævede vækststoffer.

Nogen speciel metode til kvantitative bestemmelser af DNOC i jord synes ikke at foreligge. I de fleste forsøg med DNOC-nedbrydning i jord

foretages en simpel semi-kvantitativ bestemmelse gennem måling af farvestyrken i en jordextrakt af 5 g fugtig jord med 10 ml 1-mol KCl tilsat en spatelfuld calcium- eller magnesiumcarbonat (for at sikre neutral reaktion). Efter et par timers henstand med jævnlig rystning filtreredes suspensionen gennem filtrerpapir, og i det klare filtrat målttes lystransmissionen ved $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ på et Coleman-Junior spektrofotometer, med en tilsvarende ekstrakt fra DNOC-fri jord som blindværdi (100 pct. transmission).

I nogle forsøg anvendtes en mere kvantitativ metode, der skyldes mag. scient. fru *Grethe Laurrup-Larsen*, væsentlig på grundlag af angivelser af *Bruinsma* (1960) og *Parker* (1949): 40 g fugtig jord ekstraheredes med $3 \times 30 \text{ ml}$ destilleret vand under rystning 30 min. i en 300-ml erlenmeyerkolbe. Supernatanterne dekanteredes fra jorden og kombineredes, og de ca. 150 ml jordextrakt centrifugeredes 15 min. ved $20.000 \times g$. Supernatanten herfra overførtes til en 250-ml målekolbe, og sedimentet vaskedes på centrifugen 3 gange med vand der først havde gennemskyllet jorden i erlenmeyerkolberne. Alt vaskevandet overførtes til målekolben, der slutte- lig fyldtes op til volumen med destilleret vand. Den DNOC-holdige jordextrakt filtreredes ende- lig på en büchnertragt for at fjerne meget lette partikler.

Til spektrophotometrisk bestemmelse af DNOC ekstraheredes efter *Parker* (1949) 10 ml jordex- trakt med 10 ml methylethylketon i en skilletragt under tilsætning af en blanding af NaCl og Na_2CO_3 i forholdet 9:1. I den organiske fase målttes lystransmissionen (T: %) ved $\lambda = 432 \text{ m}\mu$ på et Bausch & Lomb spektrophotometer (Spec- tronic 50).

Ekstrakter fra jord med tilsætning af kendte mængder DNOC viste sig at give forskellige standardkurver for jord af forskelligt pH, idet forskellige mængder DNOC blev tilbageholdt absorbtivt i jorden. Målingerne i forskellige jor- der kan således ikke sammenlignes direkte, men må ses i relation til bestemmelse af DNOC i hver jord ved forsøgets begyndelse. Det må også be- mærkes, at hverken denne eller de foregående simple metoder er specifikke for DNOC, men

vil indbefatte eventuelle gulfarvede nedbryd- ningsprodukter heraf.

Forsøgsresultater

A). — *Isolation af DNOC-sønderdelende bakte- rier.* — Til de første isolationsforsøg anvendtes en række jorder fra karforsøg ved laboratoriets jordbundskemiske afdeling: (1) Humusjord fra Aamosen ved Lyngby, pH 6,6. — (2) Lerjord fra Askov forsøgsstation, pH 6,4. — (3) Lerjord fra Lyngby forsøgsstation, pH 7,0. — (4) Hu- musrig sandjord fra Saunte (Nordsjælland), pH 6,5. — (5) Svær lerjord fra Sakskøbing, pH 7,3. — (6) Humusrig lerjord fra Thisted, pH 7,7. — (7) Sandjord fra Ølstykke, pH 5,8.

Prøver på 100 g fugtig jord med 50 eller 100 p.p.m. DNOC og for de sure jorders vedkom- mende tillige $\pm 1,0$ pct. calciumcarbonat in- kuberedes ved 25°C , og periodisk iagttoges jord- ekstraktens farve kvalitativt. For flere prøvers vedkommende varede det et år eller mere, inden ekstrakten blev farveløs som tegn på at DNOC var forsvundet. (Efter alt at dømme var 100 p.p.m. en vel høj koncentration). På dette tidspunkt anlagdes der ophobningskulturer i erlenmeyer- kolber med 50 ml DNOC-opløsning podet med 5 g jord. Efter affarvning, som her indtrådte ret hurtigt, fjernedes opløsningen ved centrifuge- ring, og det aktive sediment opslemmedes igen i frisk DNOC-opløsning. Efter at denne proces var gentaget 3 gange, foretoges der udstrykning på DNOC-agar, hvor der hurtigt fremkom en sparsom vækst af små farveløse bakteriekolonier, samtidig med at den gule farve forsvandt og nitrit begyndte at ophobes i agaren. Ved gen- tagen spredning isoleredes der fra hver jord en stamme af DNOC-sønderdelende bakterier, her betegnede som A.1, A.2, ... A.7, svarende til de ovennævnte jorder.

Stammerne viste stor indbyrdes lighed og syntes at repræsentere en ikke hidtil beskrevet art af slægten *Arthrobacter* (*Breed* o. a. 1957). Morfo- logisk viste de sig i unge kulturer som ret små, noget uregelmæssige, ubevægelige, ikke-spore- dannende stave af variabel Gram-reaktion og optrædende i den for coryneforme bakterier ka- rakteristiske vinkellejring, medens cellerne i ældre

kulturer efterhånden blev kortere til helt coccoide. Mest karakteristisk i kulturel henseende var egentlig den konstant svage og langsomme vækst på gængse bakteriologiske substrater, og fysiologisk udmærkede de sig kun ved deres evne til at bruge DNOC som samtidig kulstof- og kvælstofkilde under udskillelse af nitrit. Under gunstige forhold gav væksten sig til kende inden for få dage ved den gule farves forsvinden fra faste og flydende substrater. Foruden DNOC kunne også 2,4-dinitrophenol og picrinsyre udnyttes, men bl.a. ikke p-nitrophenol eller DNBP.

Ligesom *A. simplex* (Gundersen & Jensen 1956) var disse bakterier stærkt følsomme overfor sur reaktion. I gær-extrakt-DNOC-opløsning indtrådte vækst og nitritdannelse kun indenfor et pH-interval mellem pH 6,7 og 8,4. Kun A.5 voksede ved pH 6,7, og kun A.4 og A.5 voksede ved pH 8,4, resten mellem pH 6,9 og 8,0. Væksten begyndte hurtigst ved pH 7,3-7,8 og ved en DNOC-koncentration på ca. 0,1 millimol; den øverste koncentrationsgrænse syntes at ligge ved 1,0 millimol eller lidt derover, men her blev af-farvningen først fuldstændig efter 3 til 4 uger. *A. simplex* kunne derimod endnu vokse i opløsning med 2-4 millimol DNOC.

En anden type af DNOC-sønderdelende bakterier med helt andre egenskaber fandtes i en sur lerjord fra Virumgaard (pH 5,2-5,4) der inkuberedes med 50 p.p.m. DNOC. Her begyndte den gule farve at svinde efter ca. 10 uger, men forsvandt først helt efter 5 måneder. En fornyet dosis DNOC forsvandt næsten helt efter 20 dage (lystransmission 94 pct., straks efter DNOC-tilsætningen 28 pct.), og en tredje dosis forsvandt efter 12 dage (transmiss. 92 pct.). Fra den nu umiskendeligt »aktiverede« jord anlagdes ophobningskulturer i 50 ml. DNOC-opløsning, der affarvedes efter 5-6 dage, og en ny DNOC-tilsætning forsvandt efter 2 dage. Ved gentagen spredning på DNOC-agar vekslede med almindelig kødextrakt-pepton-agar fik man sluttelig renkulturer af to aktive bakteriestammer (i det følgende betegnet V.1 og V.3).

Bakterierne syntes at tilhøre den righoldige slægt *Pseudomonas*, men kunne ikke henføres til nogen bestemt art. I morfologisk henseende var

de middelstore, ikke-sporedannende, gramnegative stave, bevægelige ved 1-3 polære flageller. De voksede hurtigt og kraftigt på de almindelige bakteriologiske substrater og dannede en hvid slimet og glat belægning på agar, særligt rigeligt ved tilsætning af 1-2 pct. glucose. Opløseligt fluorescerende pigment dannedes ikke, syredannelse af sukkerarter var lidet fremtrædende, og gelatine smeltedes ikke. I modsætning til den forrige gruppe og til *A. simplex* voksede disse bakterier på DNOC over et bredt pH-interval. I gær-extrakt-DNOC-opløsning standsede væksten ved sur reaktion mellem pH 4,0 og 4,4 og ved alkalisk reaktion mellem pH 8,0 og 8,4. Ligesom *Arthrobacter*-stammerne udnyttede de DNOC som samtidig kulstof- og kvælstofkilde med udskillelse af nitrit som det vigtigste stofskifteprodukt. Foruden DNOC kunne p-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol og picrinsyre omsættes, men ikke DNBP.

En nærmere beskrivelse af de her fundne bakteriers egenskaber og stofskifteprocesser vil følge senere. Det samme gælder for en *Nocardia* (*opaca?*), der tidligere var isoleret fra jord med tilsætning af 2,4-dinitrophenol (Jensen 1964) og som kunne udnytte DNOC i glucoseholdigt substrat, men tilsyneladende ikke som eneste kulstof- og kvælstofkilde, endvidere en *A. simplex*-lignende organisme, der blev isoleret fra en markjord, medens nærværende beretning var under udarbejdelse.

B. — DNOC-sønderdelende bakterier i jord behandlet med DNOC i markforsøg. — I jord hvor der sprøjtes med DNOC under markforhold kunne man vente, at en flora af DNOC-sønderdelende bakterier ville opstå ligesom i laboratorieforsøgene. Til oplysning herom udførtes der i efteråret 1964 en række tilnærmelsesvis bestemmelser af de DNOC-sønderdelende bakteriers tæthed i jord fra forsøg med forskellige ukrudtsmidler ved 9 forsøgsstationer. Jordprøver blev udtaget fra ubehandlede og DNOC-sprøjtede parceller i to forsøgs-serier: (1) forsøg 63-545, i vintersæd, sprøjtning med DNOC omkring 1. november 1963, og (2) forsøg 64-568, i vårhvede, sprøjtning med DNOC i maj 1964. I nogle tilfælde medtoges tillige kontrolprøver fra marker

udenfor forsøgene. I de frisk udtagne jordprøver udførtes der bakterietællingsforsøg ved fortynding i jordextrakt-DNOC-opløsning, eventuelt efter nogle dages opbevaring i kølerum indtil undersøgelsen kunne finde sted. Den laveste fortynding (1:10) var en opslerning af 5,0 g frisk (ikke tørret) jord i 50 ml. DNOC-substrat i 300-ml erlenmeyerkolber, og herfra podedes der i reagensglas med 5,0 ml substrat i fortyndinger

Tabel 1. Forekomst af DNOC-sønderdelende bakterier i markforsøg med DNOC-sprøjtning

Forsøgssted	Højeste fortynding med affarvning af DNOC		
	DNOC- ubesprøjtet	ubehandlet	udenfor forsøg
	(a)	(b)	(c)
1. Svær lerj., Blangstedgaard pH 6,8-6,9. Fors. 63-545. Prøveudtagning 16/9 1964	10^{-5} - 10^{-6}	10^{-3}	—
2. Lerjord, Tystofte forsøgsstation. pH 6,8. Fors. 545. Prøveudtagning 17/9 1964 (c: 2/10-64)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-1}
3. Lerjord, Aarslev Forsøgsstation. pH (a-b) 6,8, (c) 6,5. Fors. 545. Prøveudtagning 25/9-64 (c: 26/10 1964)	10^{-8}	10^{-4}	10^{-2}
4. Sandjord, Tylstrup forsøgsstation, pH 6,0-6,2. Fors. 545. Prøveudtagning 28/9 1964	10^{-7}	10^{-3}	—
5. Svær lerjord. Marskfors. Højer. pH 7,7. Fors. 568. Prøveudtagning 28/9-64	10^{-5}	10^{-5}	—
6. Let lerjord, Roskilde Forsøgsstation. pH 6,4-6,9. Forsøg 568. Prøveudtagning 1/10 1964	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}
7. Svær lerj., Ødum forsøgsstation. pH 6,7-6,8. Forsøg 568. Prøveudtagning 5/10 1964	10^{-4}	10^{-2}	—
8. Svær lerj., Rønhave forsøgsst. pH 7,1-7,2 (c 6,7). Prøveudtagning 13/10 64	10^{-2}	(ingen)	(ingen)
9. Sandjord, Borris forsøgsst. pH 5,9-6,8. Fors. 568. Prøveudtagning 15/10-64	10^{-4}	10^{-3}	(ingen)

stigende med potenser af 10 indtil 10^{-6} - 10^{-8} . Duplikat-kulturer henstilledes ved 25°C i 28-30 dage og iagttoes for tegn på DNOC-sønderdeling: affarvning og eventuelt fremkomst af nitritreaktion. Den højeste fortynding hvor affarvning fandt sted indenfor inkubationsperioden blev taget som mål for de aktive bakteriers tæthed.

Resultaterne ses i tabel 1 og giver som helhed vidnesbyrd om forekomst i samtlige jorder af bakterier, der kan sønderdele DNOC eller udvikle evne hertil under ca. en måneds inkubationstid; de aktive bakteriers tæthed forøges tydeligt ved DNOC-sprøjtningen, hvilket forhold træder særlig tydeligt frem, når jord fra forsøgene med ukrudtsmidler sammenlignes med kontroljordprøver herudenfor (nr. 2, 3, 6, 8 og 9). Årsagen til den sommetider ubetydelige forskel mellem DNOC-sprøjtede og ubehandlede parceller i samme forsøg er sandsynligvis den, at overførelse af aktive bakterier fra de behandlede parceller let finder sted under jordbearbejdningen. Om forsøget ved Tystofte (2) oplystes desuden, 'at parcelskellene var sprøjtede med den DNOC-holdige Shell Weedkiller. Kun i to ubehandlede jorder fra Rønhave fremkom ingen vækst af DNOC-sønderdelende bakterier i den lavest prøvede fortynding (1:10).

C. — *Nedbrydning af DNOC i jord under laboratoriebetæingelser.* — En række laboratorieforsøg anstilledes med de forskelligt behandlede jordprøver fra de ovennævnte forsøg. Jorderne opbevaredes her i fugtig tilstand (ca. 2/3 vandkapacitet) i mælkeflasker ved 25°C med tilsætning af 50 p.p.m. DNOC, og nedbrydningen heraf fulgtes semi-kvantitativt ved måling af lystransmissionen i jordextrakt som beskrevet s. 151. Resultaterne ses i tabel 2 og viser, at de undersøgte jorder falder stort set i tre klasser. I jord fra Tystofte, Roskilde og Tylstrup og især fra det første forsøgssted begynder jordextrakten meget hurtigt at affarves uden væsentlig forskel på de DNOC-sprøjtede og ubehandlede forsøgsled (i Tystofte-forsøget endda hurtigst i ubehandlet jord, men her gør sig dog det ovennævnte særlige forhold gældende). De to kontrolprøver udenfor forsøgene i Tystofte og Roskilde, hvor der kan regnes

ikke at være sket nogen infektion fra DNOC-behandlede naboparceller, viser da også kun en ringe eller ingen aftagen af jordextraktens farvestyrke gennem 8-10 ugers forsøgstid.

Tre andre jordprøver (Borris, Højer og Ødum) viser det forhold, som man på forhånd ville være tilbøjelig til at vente, idet DNOC-farven forsvinder væsentlig hurtigere i jord fra de DNOC-sprøjtede end fra de ubehandlede parceller; i Ødum-jorden sker dette dog først efter en påfaldende lang latensperiode. I kontrol-jorden fra Borris udenfor forsøget er DNOC-nedbrydningen ligesom i de to foregående tilfælde kun meget svag.

Blandt de tre sidste jorder viser Aarslev-forsøget kun en langsom nedbrydning, der først

tager fart efter 6 ugers forløb, og der er ingen kendelig forskel på DNOC-sprøjtet og ubehandlet jord, hvad der virker ret overraskende i betragtning af den rigelige forekomst af DNOC-sønderdelende bakterier i kimtællingsforsøget (sml. tabel 1). Endelig ses der i de to jorder fra Blangstedgaard og Rønhave ingen sikre tegn på aktivitet efter henholdsvis 8 og 14 uger. Rønhave-jorden var, som det fremgår af tabel 1, særdeles fattig på DNOC-sønderdelende bakterier, men dette gælder ikke for Blangstedgaard-jorden. Jorderne fra begge lokaliteter (dog ikke fra Rønhave udenfor forsøget) antog ved tilsætningen af vand og DNOC-opløsning en ret uheldig, klæget og klumpet beskaffenhed, der muligvis gav dårlig luftadgang til jordaggregaternes indre og derved

Tabel 2. Nedbrydning af DNOC (50 p.p.m.) målt ved lystransmission i ekstrakt af jord fra (a) DNOC-sprøjtede, (b) ubehandlede parceller og (c) kontroljord udenfor forsøget, samme lokalitet (sml. tabel 1)

Tystofte				Roskilde				Tylstrup		
dage	lystrans. pct.			dage	lystrans. pct.			dage	lystrans. pct.	
	a	b	c		a	b	c		a	b
0	—	28	21	0	—	26	—	0	—	25
7	44	87	—	14	44	46	31	15	56	56
14	68	94	21	21	65	67	—	21	52	50
21	80	90	23	28	86	88	36	—	—	—
42	93	96	—	35	96	96	—	42	85	81
70	—	—	27	56	—	—	37	60	94	98

Borris				Højer			Ødum		
dage	lystrans. pct.			dage	lystrans. pct.		dage	lystrans. pct.	
	a	b	c		a	b		a	b
0	—	21	—	0	—	28	0	—	24
8	71	34	32	—	—	—	7	31	36
15	96	87	31	14	32	28	—	—	—
21	100	99	30	21	40	31	21	32	36
—	—	—	—	28	61	32	—	—	—
42	—	—	43	42	100	39	56	90	41
—	—	—	—	—	—	—	70	99	46

Aarslev			Blangstedgaard				Rønhave			
dage	lystrans. pct.		dage	lystrans. pct.			dage	lystrans. pct.		
	a	b		a	b	a rep.*)		a	b	c
0	—	25	0	—	25	25	0	—	—	—
15	35	38	14	30	34	24	14	33	30	41
21	33	31	21	27	27	—	28	35	38	36
42	38	40	42	32	35	26	—	—	—	—
60	98	97	63	28	29	—	56	32	37	41
84	—	—	84	29	31	—	—	—	—	—

måske ugunstige betingelser for de udpræget aerobe DNOC-sønderdelende bakteriers virksomhed.

Nogle supplerende forsøg anstilledes til oplysning om uheldig jordstruktur og dermed følgende hemmet luftadgang som mulig årsag til den langsomme nedbrydning i de sidste to eller tre jorder. En gentagelse af forsøget med Blangstedgaard-jorden med lavere vandindhold og særdeles åben struktur (se tabel 2) gav dog samme resultat som første gang. To andre forsøg udførtes med (1) en neutral lerjord fra laboratoriets have, tilsat 20 pct. DNOC-behandlet jord fra Tystofte-forsøget, og (2) en meget svær lerjord fra Statens Marskforsøg, Ribe, tilsat 10 pct. DNOC-behandlet jord fra Højer-forsøget, begge ved to fugtighedsgrader, hvoraf den højeste gav især marskjorden en særdeles ubekvem struktur. Resultaterne (tabel 3) viser dog ingen hemmet men snarere en fremskyndet DNOC-nedbrydning ved den højere fugtighedsgrad. Den ringe aktivitet i Blangstedgaard- og Rønhavejorderne må således bero på endnu uopklarede forhold.

Tabel 3. Supplerende forsøg over nedbrydning af DNOC i jord af forskellig fugtighedsgrad og tilsvarende »god« og »dårlig« struktur

Dage	Havejord lystrans. pct.		Marskjord lystrans. pct.	
	16 pct. H ₂ O	20 pct. H ₂ O	25 pct. H ₂ O	35 pct. H ₂ O
0	20	21	26	28
7	23	22	37	35
12	28	40	71	81
28	80	92	97	95

Virksomheden af gentagen DNOC-tilsætning prøvedes med de stærkt aktive jorder fra Borris, Roskilde og Tystofte. Efter den første forsøgsperiodes afslutning (henholdsvis 21, 35 og 42 dage, sml. tabel 2) lod man jorden tørres delvis i nogle timer ved stuetemperatur for derefter at tilsætte nyt DNOC (50 p.p.m.) samt vand til oprindelig fugtighedsgrad. Under den påfølgende inkubation viste der sig især i Borris-jorden en kendelig fremskyndet nedbrydning:

Dage	Lystransmission pct. i jord		
	Borris	Roskilde	Tystofte
0	26	26	28
2	48	29	28
6	94	30	82
14	99	42	97
28	—	99	—

En tredje tilsætning af DNOC medførte ingen yderligere fremskyndelse af DNOC-nedbrydningen, enten fordi jorderne allerede bar en maximal flora af DNOC-sønderdelende bakterier eller fordi nitritophobning (der blev tydelig i perioden efter tredje tilsætning) nu begyndte at udøve en hemmende virkning.

D). — *Virksomheden af renkulturer af DNOC-sønderdelende bakterier i jord.* — De forudgående forsøg viser, at DNOC-behandling af jorden normalt medfører en forøget tæthed (dvs. formering) af DNOC-sønderdelende bakterier i jorden og en hurtigere nedbrydning af DNOC end i ikke-behandlede jorder. Omvendt skulle en tilførsel af DNOC-sønderdelende bakterier fra renkulturer til jorden (»podning«) resultere i nedbrydning af DNOC uden den latensperiode, der normalt optræder, når DNOC sættes til ikke forud behandlet jord. Til belysning heraf anstilledes et par sådanne »podnings«-forsøg med de to hovedgrupper af DNOC-sønderdelende bakterier: den meget syretolerante *Pseudomonas* sp. og de udpræget syrefølsomme *Arthrobacter* sp. (repræsenteret ved stammen nr. 5 fra Sakskjøbing-jord) samt den tidligere studerede *Arthrobacter simplex* var. DNOC (Gundersen & Jensen 1956), der ikke efter ca. 10 års dyrkning på kunstigt substrat havde mistet evnen til at udnytte DNOC.

Ligesom de foregående udførtes disse forsøg i mælkeflasker med jord af ca. 2/3 vandkapacitet og tilsætning af 50 p.p.m. DNOC, med og uden podning med en meget tynd suspension (1,0 ml pr. 100 g jord) af bakterieceller dyrkede på mineral-agar + DNOC. Ved forsøgets indledning samt med ugentlige intervaller bestemtes DNOC kvantitativt efter den foran (p. 151) beskrevne metode.

I det første forsøg (tabel 4) anvendtes tre

Tabel 4. Virkning af bakteriepodning (*Pseudomonas* V. 1) på nedbrydning af DNOC (50 p.p.m.) i stærkt sur jord

pH	Podning	DNOC p.p.m. efter dage			
		0	7	14	21
5,1	Upodet		32	24	23
	Podet	38	0	0	0
4,5	Upodet		29	19	15
	Podet	42	0	0	0
4,1	Upodet		30	22	19
	Podet	40	7	0	0

stærkt sure jordprøver fra ukalkede parceller i et gammelt kalkforsøg ved Virumgaard, podede med *Pseudomonas* V.1. Ved alle tre pH-trin ses DNOC hurtigt at forsvinde fra podet jord, i den sureste jord næsten og i de to andre fuldstændigt efter en uge. Også uden podning er der nogen nedgang i DNOC-koncentrationen, endog ret stærk efter 3 uger, hvorved man må erindre, at de to stammer af *Pseudomonas* var isolerede netop fra jord fra dette forsøg. Det aftagende DNOC-indhold må tages som udtryk for, at den naturligt forekommende sparsomme flora af syretolerante DNOC-sønderdelende bakterier nu er begyndt at komme til udvikling.

I det andet forsøg (tabel 5) anvendtes en neutral lerjord fra laboratoriets have samt en svagt og en moderat sur lerjord fra Virumgaard, alle tre podede med de to arter af *Arthrobacter*. Resultaterne er utvetydige: begge organismer fjerner DNOC praktisk talt fuldstændigt fra den

neutrale jord i løbet af en uge, men har ingen påviselig virkning i de to jorder af pH under 7. Om begge forsøg gælder det for det første, at de to bakterieslægter udviser samme forhold overfor pH i jord og i renkultur: *Pseudomonas* standser i kunstigt substrat først sin vækst i pH-intervallet mellem 4,0 og 4,4, og i jord er den endnu virksom ved pH 4,1. De to *Arthrobacter*-arter udnytter i kunstigt substrat ikke DNOC ved pH under 6,7-6,9, og i jord nedbryder de DNOC hurtigt ved pH 7,0 men ikke ved pH 6,3 eller derunder. For det andet må det bemærkes, at i det første forsøg blev kun ca. 80 pct. og i det andet kun 60-70 pct. af det tilsatte DNOC genfundet i vandig ekstrakt ved forsøgenes indledning. Om bakterierne er i stand til at metabolisere det absorbtivt tilbageholdte DNOC er foreløbig et åbent spørgsmål.

E). — *Iagttagelser over dinitrobutylphenol.* — Som ovenfor nævnt viste ingen af de DNOC-sønderdelende bakterier tegn på at kunne udnytte eller omsætte dinitrobutylphenol. Et stort antal ophobningskulturer blev anlagt i jordextrakt-opløsning som anvendt i de ovenfor omtalte forsøg, men med ca. 0,1-0,2 millimol DNBP. Substrat dels i erlenmeyerkolber og dels i reagensglas podedes med talrige jorder, såvel de hvorfra de DNOC-sønderdelende bakterier var isolerede som fra DNBP-sprøjtede parceller i forsøg ved Borris, Højer og Ødum forsøgsstationer og

Tabel 5. Virkning af bakteriepodning (*Arthrobacter* 5 og *Arthrobacter simplex* var. DNOC) på nedbrydning af DNOC (50 p.p.m.) i neutral og svagt sur jord

Jord	Podning	DNOC p.p.m. efter dage				
		0	7	14	21	28
Havejord, pH 7,0	Upodet	35	35	31	37	(23)
	<i>Arth. 5</i>	—	0	0	—	—
	<i>Arth. simplex</i>	—	(5)	0	—	—
Virumgaardjord, pH 6,3	Upodet	32	32	30	33	30
	<i>Arth. 5</i>	—	34	26	32	23
	<i>Arth. simplex</i>	—	32	34	32	31
Virumgaardjord pH 5,6	Upodet	30	31	35	31	28
	<i>Arth. 5</i>	—	30	30	31	28
	<i>Arth. simplex</i>	—	33	33	30	28

Tal i parentes: usikre bestemmelser.

ved Statens Ukrudtsforsøg i Skovlunde. Selv efter henstand af kulturerne i mere end et år (med erstatning af fordampet vand) sås der i intet tilfælde nogen affarvning af substratet eller optræden af en nitritreaktion stærkere end de spor, der kunne tilskrives absorption af små mængder kvælstofilter fra atmosfæren.

Foreløbig tyder resultaterne altså på, at dinitrobutylphenol overhovedet ikke kan omsættes af mikroorganismer under aerobe forhold. I substrat med tilsætning af glucose viste der sig ofte en ændring af DNBP-farven, der over brunlige og violette farvetoner gik over til fuldstændig affarvning og dannelse af et produkt, der syntes at være en aromatisk aminoforbindelse, muligvis opstået ved reduktion af nitrogrupperne i DNBP. En lignende affarvning indtrådte hurtigt, når DNBP (eller DNOC) blev sat til kraftigt gærende kulturer af smørsyrebakterier. Under anaerobe betingelser kan DNBP således utvivlsomt undergå visse biokemiske omsætninger. Fortsatte undersøgelser må gå ud på at identificere reduktionsprodukterne og at bestemme mulighederne for deres videre sønderdeling, når aerobe betingelser er til stede.

Oversigt

Det fremgår af forsøgsresultaterne, at bakterier med evne til at omsætte DNOC er almindeligt udbredt i danske landbrugsjorder, men at de kun langsomt kommer til udvikling hvor der ikke tidligere er tilført DNOC. Der er hidtil kun fundet 3 typer af sådanne bakterier: (1) en svagt voksende *Arthrobacter* sp. der synes at være langt den almindeligst forekommende, (2) en varietet af den hurtigt voksende *Arthrobacter simplex*, og (3) en hurtigt voksende og udpræget syretolerant *Pseudomonas* sp. De to sidste er kun fundet en eller to gange, og kun den tredje er i stand til at sønderdele DNOC ved pH væsentligt under 7,0 i renkultur såvel som i jord, hvor den er virksom endnu ved pH mellem 4,0 og 4,4.

De DNOC-sønderdelende bakterier findes under markforhold gennemgående rigeligst i forud DNOC-behandlet jord, for hvilken det også er typisk, at tilsat DNOC under laboratoriebetingelser sønderdeles hurtigere end ikke forudbe-

handlet jord; her går der undertiden forud for nedbrydningen en latensperiode på flere uger indtil et par måneder. Denne langsomme aktivering kunne tyde på, at der ikke sker en simpel formering af nogle sporadisk forekommende organismer med DNOC-sønderdelende enzymer, men snarere at sådanne opstår ved en mutationsproces, og at mulighederne herfor kun findes hos et meget begrænset antal organismer.

De fundne bakterier kan under gunstige betingelser nedbryde DNOC i jorden med en sådan hastighed, at 50 p.p.m. (= 125 kg/ha eller 100 gange markdosis) forsvinder i løbet af en uge. Sådanne optimale forhold kan dog vel sjældent ventes under markforhold, f.eks. ikke ved lav temperatur og specielt ikke i jord af pH under 7, hvor den almindeligst forekommende type (*Arthrobacter* sp.) ikke formår at gøre sig gældende. Dette i forbindelse med den i almindelighed langsomme aktivering af jorden ved den første tilførsel af DNOC tillader den slutning, at DNOC (i overensstemmelse med erfaringer fra praksis) må henregnes til de moderat resistente ukrudtsmidler.

Selv om der i dyrket jord altid må ventes at eksistere en mikrobiologisk mekanisme der muliggør nedbrydning af DNOC, bliver der endnu nogle problemer tilbage. Under den første langsomme aktivering kunne der tænkes mulighed for optagelse af DNOC i afgrøderne. Hidtil synes rester heraf ifl. *Gustafson* (1960) dog ikke at være iagttaget, og det forekommer også sandsynligt, at optaget DNOC vil transformeres yderligere i selve plantevævet. Som før nævnt synes der ikke i jorder at opstå omdannelsesprodukter af DNOC. På den anden side ved vi ikke med sikkerhed, hvad der sker med det absorbtivt bundne DNOC i jorden — et spørgsmål der venter på udvikling af en metode til exakt totalbestemmelse af DNOC i jord. Endvidere står vi overfor spørgsmålet om sekundære plante-fysiologiske virkninger på kulturplanterne. I visse tilfælde kan DNOC hidføre en udbytteforøgelse udover den, der skyldes ukrudtsbekæmpelse — en virkning som *Bruinsma* (1963) har forklaret som en forskydning af planternes vækstrytme med forlængelse af det vegetative

stadium. Dette kunne tænkes at medføre ændringer i afgrødens kvalitet i ernæringsmæssig henseende: indhold af mineralstoffer og protein, forholdet mellem de forskellige aminosyrer, osv. — altsammen problemer, der bør skænktes opmærksomhed i fremtidig forskning og vel også gælder andre bekæmpelsesmidler.

Dinitrobutylphenol omsættes åbenbart på en helt anden måde end DNOC til trods for stor lighed i molekylestrukturen og fortjener en speciel undersøgelse, ikke mindst i betragtning af dets efter alt at dømme betydelig større holdbarhed.

Summary

Biological Decomposition of Herbicides in the Soil. IV Dinitro-ortho-cresol

A variety of *Arthrobacter simplex* isolated from soil was previously in this laboratory found capable of metabolizing the herbicide dinitro-ortho-cresol (DNOC). Two further types of bacteria with the same property were isolated from several DNOC-treated soils. The first type seemed to be widely distributed in cultivated soils and was represented by small, irregularly rod-shaped bacteria largely conforming to *Arthrobacter* but not identifiable as species. They grow rather poorly in routine bacteriological media and showed no striking biochemical activity beyond their ability to utilize DNOC as simultaneous carbon and nitrogen source, with excretion of most of the surplus nitrogen as nitrite. Growth with DNOC took place within a pH-interval from approximately neutral to alkaline (pH 8.0-8.4) reaction. The second type was found only in an acid loam field soil and appeared to be vigorously growing, non-fluorescent *Pseudomonas*, which attacked DNOC within a pH-interval from approx. 4 to 8.

Soil samples from herbicide experiments at nine field experimental stations where DNOC had been applied were found constantly to harbour DNOC-decomposing bacteria, often in higher density in DNOC-treated than in untreated plots, and always higher than in samples from soil outside the experiment. When samples from such experiments were incubated in the laboratory with addition of 50 p.p.m. DNOC the herbicide mostly disappeared from the soil within one to two months, as judged from measurements of the colour intensity of the soil extract. Usually the colour disappeared more rapidly

in soil from DNOC-treated than from untreated plots or soil outside the herbicide experiment. In a couple of instance the DNOC-colour persisted for two to three months, without any immediate explanation offering itself.

Inoculation experiments with the three types of bacteria in soil with 50 p.p.m. DNOC showed an accelerating effect on the disappearance of DNOC from the soil, within pH-limits that approximately corresponded to the pH-tolerance of the different organisms for growth with DNOC *in vitro* (rapid effect of the two *Arthrobacter*-types at pH 7.0, none at pH 6.3 and less, whereas *Pseudomonas* is active at pH 4.1).

DNOC may thus after its application be decomposed by microorganisms that seem to be regularly present in the soil, particularly if previously treated with DNOC. The decomposition can take place over the whole pH-range to be expected in normal cultivated soils but may be preceded by quite a long latency period, particularly in previously untreated soil. In a general way DNOC may be considered as a moderately resistant herbicide, not least in microhabitats where a relatively high concentration may be found, owing to irregular distribution in the soil. This in connection with the powerful influence of DNOC (as of other nitro-phenols) in plant metabolism suggests that its possible influence on the growth rate and chemical composition (and hence nutritive quality of crop plants) should not be overlooked, even if no actual residues of DNOC may be detected in the crop.

None of the DNOC-decomposing bacteria had any effect on dinitro-butyl-phenol, and no aerobic organisms capable of attacking this compound were found in enrichment experiments. Evidence was found, however, that dinitro-butyl-phenol would undergo certain reductive changes under anaerobic conditions.

Litteraturhenvisninger

- Andersen, A. M. & Karlog, O. (1963): Elimination of parathion in cows after oral and dermal administration. *Acta Vet. Scand.*, v. 4: 156-167.
- Audus, L. J. (1964): *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*. Academic Press, London and 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.

- Bruinsma, J.* (1960): The action of 4,6-dinitro-o-cresol (DNOC) in soil. *Plant and Soil*, v. 12: 249-258.
- Bruinsma, J.* (1963): The effect of a spray with 4,6-dinitro-o-cresol (DNOC) on nitrogen nutrition and yield of winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant and Soil*, v. 18 : 1-20.
- Cain, R. B.* (1958): The microbial metabolism of nitro-aromatic compounds. *J. Gen. Microbiol.*, v. 19 : 1-14.
- Cartwright, N. J. & Cain, R. B.* (1959): Bacterial degradation of the nitrobenzoic acids. *Biochem. J.*, v. 71 : 248-261.
- Douros, J. D. & Reid, J. J.* (1956): Decomposition of certain herbicides by soil microflora. *Bact. Proceedings 1956* : 23-24.
- Garcia-Acha, v., & Villanueva, J. R.* (1962): Utilizacion del acido p-nitrobenzoico por *Nocardia V* como unica fuente de carbono y nitrogeno. *Microbiol. Espan.* 15 : 165-169.
- Germainer, R., & Wuhrmann, K.* (1963): Über den aeroben mikrobiellen Abbau aromatischer Nitroverbindungen. *Path. et Microbiol.* 26 : 569-578.
- Gundersen, K., & Jensen, H. L.* (1956): A soil bacterium decomposing aromatic nitro-compounds. *Acta Agr. Scand.*, v. 6 : 100-114.
- Gustafson, M.* (1960): Bekämpelsesmedelsrester i gröda och jord. En litteraturöversikt. *Kungl. Skogs- och Lantbruksakad. Tidskr. Suppl. nr. 4* (107 pp).
- Jensen, H. L.* (1964): Om indvirkning af dinitro-ortho-cresol, dinitrobutylphenol og 2,4-dinitrophenol på jordrespirationen. *Tidsskr. Planteavl*, v. 68: 185-195.
- Parker, V. H.* (1949): A method for the routine estimation of 3:5-dinitro-o-cresol (DNOC). *The Analyst*, v. 74: 646-647.
- Petersen, H. Inv., & Hammarlund, Anne* (1953): Års-oversigt for Statens Ukrudtsforsøg 1952. *Tidsskr. Planteavl*, v. 56: 702-711.
- Riepma, S.* (1956): De wirking van DNC via de grond. *Mededel. Landbouwhogeschool van de Staat te Gent*, v. 21: 619-626.
- Teuteberg, A.* (1964): Untersuchungen über den Abbau von Halogen-nitrobenzolen durch Bodenbakterien. *Arch. Mikrobiol.*, v. 48: 21-49.
- Villanueva, J. R.* (1960): The growth of *Nocardia V* on various aromatic compounds. *Microbiol. Espan*, v. 13: 387-391.