

# Mikrobiologisk omsætning af biuret

Ved *H. L. Jensen*

## 758. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning omhandler undersøgelser over den biologiske nedbrydning af plantegiftstoffet biuret under indvirkning af jordens mikroflora. Arbejdet er udført ved den bakteriologiske afdeling ved Statens Planteavls-Laboratorium i Lyngby under ledelse af forstander, dr. agro. *H. L. Jensen*, der tillige har udarbejdet beretningen.

Mr. *K. A. Kumaran*, B. Sc., University of Kerala, Indien, har udført en væsentlig del af det experimentelle arbejde, og værdifuld rådgivning skyldes Professor *Donald B. Johnstone*, University of Vermont, U.S.A., under et gæsteophold i efteråret 1964.

*Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur*

### Indledning

Biuret,  $\text{NH}(\text{CONH}_2)_2$ , har længe været kendt som en ret stærk plantegift, der opstår ved kondensation mellem to molekyler urinstof med udtrædelse af et molekyle ammoniak. Denne proces begynder, når urinstof udsættes for tør opvarmning til 140–150°C, medens der ved højere temperatur dannes andre kondensationsprodukter, bl.a. cyanursyre. Det er endvidere velkendt, at biuret er betydelig mere giftigt ved foliær optagelse end når det optages gennem rødderne. Af denne grund skal urea med mere end 0,6 pct. biuret ved udbud som kvælstofgødning i Danmark betegnes som uegnet til udsprøjtning. Urea fremstillet efter moderne industrielle metoder er som regel særdeles fattig på biuret, men desuagtet kommer visse mængder heraf stadig ud i det biologiske kredsløb, og med den stigende interesse for urea som kvælstofgødning bliver spørgsmålet om biurets videre skæbne ikke uden betydning, især da man kun kender relativt lidt til dets forhold overfor jordens mikroflora.

De ret fåtallige foreliggende undersøgelser over biurets forhold i jordbunden tyder ikke på nogen høj grad af modstandsdygtighed, omend det er mere bestandigt end det normalt meget let ammonificerbare urinstof. Dette har givet sig udtryk i, at man i markforsøg (*Collins & Aldrich* 1956) har søgt at anvende biuret som et ukrudtsmiddel med senere virkning som kvælstofgødning – tilsyneladende dog uden større held. Et meget ud-

førligt arbejde skyldes *Gadet* o.a. (1959). Biurets giftvirkning overfor byg i karforsøg begyndte her at aftage efter 5 uger og forsvandt helt efter 14 uger. Biuretmængder på 125 og 250 p.p.m. begyndte at nitrificeres efter 3 uger ved 28°C, og efter 11–15 uger var nitrifikationen næsten kvantitativ. Biuret hemmede ikke ammoniakdannelsen af urinstof, men syntes at hydrolyseres ligesom dette, omend langsommere.

Om sønderdelingens natur ved man kun meget lidt. Urease fra bælgplantefrø kan ifl. *Shaw & Kistiakowsky* (1950) spalte biuret under ammoniakdannelse ligesom urinstof, dog meget langsommere. Urease hos en typisk urinstofbakterie (*Bac. pasteurii*) er derimod ifl. *Larson & Kallio* (1954) aldeles urinstof-specifik og virkningsløs overfor biuret, og det samme gælder om et ureasepræparat isoleret fra jord af *Briggs & Segal* (1963). Den første meddelelse om udnyttelse af biuret som næringsstof skyldes vistnok *Czapek* (1902), der fandt det tjenligt som en kun middelmådig kvælstofkilde for skimmelsvampen *Aspergillus niger*. I meget omfattende kvalitative forsøg påviste *den Dooren de Jong* (1926), at adskillige bakterier, bl.a. så almindelige former som *Aerobacter arogenes*, *Escherichia coli* og *Mycobacterium phlei* kunne vokse ret godt på glucose-agar med biuret, hvorimod det var utjenligt som kulstofkilde. Noget lignende gælder ifl. *Steiner* (1959) om visse gærsvampe. *Wheldon & MacDonald* (1962) viste i

et nyere arbejde, at *Pseudomonas aeruginosa* kunne udnytte biuret med en noget langsommere væksthastighed end urinstof, og at celleextrakt fra biuretdyrkede bakterier kunne spalte biuret med kvantitativ frigørelse af dets kvælstof som ammoniak; et specifikt enzym »biuretase« mentes at være det virksomme agens.

Til nærmere oplysning om biurets biologiske tilgængelighed isolerede man i de nærværende forsøg et antal bakterier og svampe fra jord og plantedele ved spredning på selektivt substrat, og de organismer der her viste kraftig vækst med biuret som kvælstofkilde undersøgte nærmere i renkultur. Tillige anstilledes forsøg over biurets sønderdeling i jord under laboratorieforhold.

### Metoder

Til dyrkning fra jord og plantemateriale anvendtes et agarsubstrat indeholdende 2 pct. glucose foruden de gængse mineralske næringsstoffer samt 0,02–0,05 biuret, der her som i andre tilfælde blev sat til det forud steriliserede grundsubstrat fra en filtreret stamopløsning af biuretmonohydrat (Fluka, puriss. p.a.). Fra kolonier af svampe og bakterier der her voksede kraftigt i sammenligning med grundsubstrat uden biuret, fremstilledes renkulturer ved gentagen spredning på biuret-agar.

Til kvantitative vækstforsøg med svampene anvendtes følgende næringsopløsning: Glucose 10,0 g, biuret 0,2–0,4 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  10 g, Nacitrat 12 g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,4 g,  $\text{MgSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g,  $\text{CaCl}_2$  (eller Ca-glycerofosfat) 0,1 g,  $\text{FeCl}_3$  20 mg,  $\text{MnSO}_4$ ,  $4\text{H}_2\text{O}$  2,0 mg, alt i 1 liter demineraliseret vand. Glucose og biuret blev sat til det sterile grundsubstrat efter autoklavering, tillige med vækststoffer i form af 0,1 p.p.m. biotin samt 1,0 p.p.m. thiamin, Ca-pantothenat og nicotinsyre. – Til bakterierne anvendtes en lignende næringsstofopløsning, dog ofte uden citratstødpude (der undertrykte væksten af visse bakteriestammer) og med fosfatindholdet reduceret til 0,06 pct.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  + 0,04 pct.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Svampenes vækst i kvantitative forsøg bestemtes ved tørring og vejning af det frafiltrerede eller fracentrifugerede mycelium, og eventuelt bestemtes kvælstof heri. Bakteriernes vækst målt ved dyrkning i flydende substrat under kontinuerlig

rystning og måling af ukklarheden (»O.D.«-enheder af optisk tæthed) på et Coleman-Junior spektrofotometer ved  $\lambda = 600 \text{ m}\mu$ . Som mål for kvælstofassimilationen bestemtes kvælstofindholdet (mikro-Kjeldahl) i centrifugeret og vasket celle-materiale.

Ammoniak og nitrat i jord bestemtes ved ekstraktion af jorden med 1-n KCl ved pH 2,0 og destillation først med magnesiumoxid alene og derefter med Devarda-legering. Kulsyreproduktionsforsøg i jord udførtes efter Petersen (1926).

**Biuretsønderdelende mikroorganismer i renkultur**  
*Svampe.* – Et betydeligt antal biuretforgørende svampe isoleredes fra jord, mest fra laboratoriets have og fra Virumgaard, efter forudgående inkubation med tilsætning af biuret og ofte tillige med glucose eller cellulose. Nogle andre blev isolerede fra forskellige bladmaterialer (se nedenfor). Der fandtes repræsentanter for følgende svampeslægter og -arter (fra jord hvor ikke andet er nævnt), der alle voksede kraftigt på glucose-biuret-agar i sammenligning med agar uden tilsat kvælstof:

1) *Coniothyrium fuckelii*. – 2) *Penicillium lilacinum*. – 3) *P. vermiculatum*. – 4) *P. janthinellum*. – 5) *P. variabile*, fra æbleblade såvel som jord. – 6) *Alternaria* sp. (*tenuis*?), fra kastanieblade. – 7) *Macrosporium* (?) sp., fra æbleblade. – 8) *Humicola grisea*. – 9) *Paecilomyces* sp. – 10) *Myrothecium verrucaria*. – 11) *Cladosporium herbarum*. – 12) *Aureobasidium pullulans*, fra forskelligt bladmateriale, og endelig 13) en ikke artsidentificeret grøn penicillium fra ahornblade.

Særlig hyppigt optrådte *Coniothyrium fuckelii* samt den lyserøde *Penicillium lilacinum* og den gule *Penicillium vermiculatum*, endvidere *Aureobasidium pullulans*, der ikke iagttoges i spredninger fra jord, men desto hyppigere fra blade.

Fleere af isolaterne er velvilligst identificerede af lektor, cand. mag. M. Skytte Christiansen og cand. polyt. F. Gilbert Nielsen, Danmarks Tekniske Højskole. Ved den endelige identifikation viste det sig, at et par af svampene i en foreløbig meddelelse (Jensen & Kumaran 1965) var fejlagtigt bestemt som *Penicillium luteum* for *P. vermiculatum* og *Pestalozzia* (?) sp. for *Myrothecium verrucaria*.

Ved dyrkning i næringsopløsning med fosfat-citrat-puffer og bestemmelse af mycelvægten viste samtlige isolater sig typisk acidofile, idet alle kunne vokse ved pH 3,0 og adskillige derunder, medens pH 4-5 repræsenterede optimum og flere stammer kunne ikke vokse ved pH 7 eller derover (se tabel 1).

Tabel 1. Biuretsønderdelende svampes vækst ved forskellig reaktion

| Svamp  | Substrat - pH |              |              |
|--|---------------|--------------|--------------|
|  | mini-<br>mum  | opti-<br>mum | maxi-<br>mum |
| <i>Alternaria</i> sp. ( <i>tenuis</i> ?) . . . | 2,0-3,0       | 4,0          | >9,1         |
| <i>Cladosporium herbarum</i> . . .             | 2,0-3,0       | 5,0          | 6,0-7,0      |
| <i>Coniothyrium fuckelii</i> . . . . .         | ca. 2,0       | 5,0          | 6,0-7,0      |
| <i>Hormodendrum</i> sp. . . . .                | <3,0          | 5,0          | 6,0-7,0      |
| <i>Macrosporium</i> sp. . . . .                | 2,0-3,0       | 4,0          | 8,0-9,1      |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> . . . . .        | 3,0-4,0       | 5,0          | >9,1         |
| <i>Paecilomyces</i> sp. . . . .                | <2,3          | 5,0          | 6,0-7,0      |
| <i>Penicillium lilacinum</i> . . . . .         | 2,0-3,0       | 5,0          | 8,0-9,1      |
| » <i>variabile</i> (jord) . . . . .            | 2,0-3,0       | 4,0          | >8,6         |
| » » (æbleblade) . . . . .                      | 2,0-3,0       | 4,0-5,0      | 8,0-9,1      |
| » <i>vermiculatum</i> A. . . . .               | <2,0          | 4,0-5,0      | 6,0-7,0      |
| » » B. . . . .                                 | ca. 2,5       | 4,0          | 7,0-8,0      |
| » sp. (ahornblade) . . . . .                   | 2,0-3,0       | 5,0          | 7,0-8,0      |

De kraftigere voksende svampe kunne optage hovedparten af biuretkvælstoffet, således som det fremgår af nogle forsøg gengivet i Tabel 2: duplikatkulturer i 50 ml næringsopløsning af pH 5,0 med 0,02 pct. biuret = 3,47 mg N pr. kultur. Her genfindes i myceliet indtil 4/5 af det tilsatte kvælstof.

Tabel 2. Assimilation af biuret-kvælstof i mycelium af tre svampe

| Svampeart                      | Vækst-<br>tid<br>dage | Mycel-<br>tørstof<br>mg/50 ml | N i mycelium*) |                     |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------|---------------------|
|                                |                       |                               | mg/50 ml       | pct. af<br>biuret-N |
| <i>Penicillium</i> . . . . .   | 5                     | 50                            | 2,66           | 76                  |
| <i>variable</i> . . . . .      | 8                     | 81                            | 2,59           | 75                  |
| <i>Penicillium</i> . . . . .   | 7                     | 90                            | 2,56           | 74                  |
| <i>vermiculatum</i>            | 12                    | 207                           | 2,93           | 84                  |
| <i>Penicillium</i> . . . . .   | 7                     | 72                            | 2,55           | 73                  |
| <i>lilacinum</i> (?) . . . . . | 14                    | 118                           | 2,35           | 63                  |

\*) Med fradrag af kvælstof i mycel fra kontrolkulturer i substrat uden kvælstoftilsætning: 0,02-0,33 mg/50 ml. - Den tilsatte mængde biuret svarer til 3,47 mg N/50 ml.

stof, og lignende tal (60-80 pct. genfundet N) fandtes i kulturer med den dobbelte biuretdosis; åbenbart assimileres såvel imidgruppens som de to amidgrupperes kvælstof.

I en anden forsøgsrække sammenlignedes biuret som kvælstofkilde med ammoniumsulfat ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) og urinstof (rent  $\text{NH}_2\text{-N}$ ) i koncentrationer der repræsenterede ækvivalente mængder kvælstof: ammoniumsulfat 0,082 pct., urinstof 0,037 pct., biuret 0,05 pct., svarende til 8,66 mg N/50 ml. Næringsopløsningen i dette forsøg indeholdt intet citrat og kun 0,1 pct. fosfat, og som vækststofkilde anvendtes jordextrakt (10 vol.-pct. af næringsopløsningen). Resultaterne ses i Tabel 3 og viser, at stort set er biuret og urinstof ligeværdige kvælstofkilder, undtagen for *P. vermiculatum*, medens *Coniothyrium fuckelii* til gengæld synes at udnytte biuret noget bedre.

En særstilling indtager *Aureobasidium* (syn. *Pullularia*) *pullulans*, der forekommer særlig hyppigt

Tabel 3. Vækst af forskellige svampe med ækvivalente mængder kvælstof (17,3 mg N/100 ml) som ammoniumsulfat, urinstof og biuret

| Svamp                                | Vækst-<br>tid<br>dage | Myceltørstof mg/40 ml<br>substrat                               |        |     | - N |
|--------------------------------------|-----------------------|---|--------|-----|-----|
|                                      |                       | ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>urin-<br>stof | biuret | -   |     |
| <i>Coniothyrium<br/>fuckelii</i>     | 3                     | 42  | 44     | 74  | —   |
|                                      | 5                     | —   | —      | —   | 6   |
|                                      | 7                     | 110   | 108    | 131 | —   |
|                                      | 10                    | 107   | 88     | 91  | 10  |
| <i>Humicola<br/>grisea</i>           | 15                    | 128   | 105    | 153 | —   |
|                                      | 5                     | 14  | 19     | 11  | 14  |
|                                      | 7                     | 27  | 41     | 38  | 26  |
| <i>Myrothecium<br/>verrucaria</i>    | 15                    | 69  | 130    | 113 | —   |
|                                      | 4                     | 26  | 21     | 27  | —   |
|                                      | 7                     | 165   | 207    | 183 | —   |
| <i>Penicillium<br/>vermiculatum</i>  | 9                     | —   | 284    | 278 | —   |
|                                      | 20                    | 133   | 180    | 253 | —   |
|                                      | 4                     | 64  | 36     | 42  | 13  |
| <i>Penicillium<br/>lilacinum</i> (?) | 7                     | 130   | 171    | 106 | 21  |
|                                      | 9                     | 194   | 222    | 99  | 19  |
|                                      | 20                    | 248   | 211    | 160 | 23  |
| <i>Penicillium<br/>lilacinum</i> (?) | 4                     | 119   | 88     | 56  | —   |
|                                      | 7                     | 169   | 168    | 165 | 7   |
|                                      | 9                     | 184   | 165    | 190 | 8   |
|                                      | 20                    | 155   | 198    | 194 | 12  |

på faldent løv og andre plantedele, hvor den synes at indlede sønderdelingsprocessernes første fase. Tillige med forskellige andre samlingskulturer (omtalt senere) prøvedes tre stammer af *A. pullulans* for vækst på glucose-biuret-agar hvor der indtrådte en langsom men kraftig vækst (se fig. 1). Disse stammer var isolerede på et selektivt substrat med sulfaninsyre som kvælstofkilde (Jensen 1963); 4 ikke-selektivt isolerede stammer viste derimod ingen tegn på at udnytte biuret. (De sidste kulturer var venligst stillet til rådighed af lic. agro. J. P. Skou, afdelingen for landbrugsforsøg ved AEK, Risø). Til nærmere oplysning om forholdet mellem sulfaminat- og biuretudnyttelse isoleredes der i efteråret 1964 yderligere 7 stammer af *A. pullulans* fra løv af ahorn, blommetræ, eg, bøg, kastanie og røn ved spredning på glucose-biuret-agar. Alle stammer viste sig i stand til at vokse lige kraf-

tigt med biuret og sulfaminsyre som kvælstofkilde. Om nogen årsagssammenhæng mellem evnerne til at udnytte disse to ret usædvanlige næringsstoffer lader der sig foreløbig intet sige.

En nærmere undersøgelse af biuretsønderdelings biokemiske mekanisme er ikke forsøgt indenfor det her refererede arbejdes rammer. Dog foretoges nogle orienterende forsøg, hvor man lod biuret-dyrket mycelium af forskellige svampe virke på opløsninger af urinstof og biuret og iagttog den stedfindende ammoniakdannelse. Svampene dyrkedes i (som regel)  $4 \times 50$  ml opløsning med 2,0 pct. glucose, 0,04 biuret og citratstødpude ved pH 5. Kulturerne podedes med en tæt suspension af konidier og inkuberedes under rystning ved  $25^\circ\text{C}$ , indtil en kraftig submers vækst af mycelium var indtrådt, som regel efter 3 til 5 dage. Det disperse mycelium frafiltreredes, vaskedes og resuspenderedes i  $M/15 \text{ K}_2\text{HPO}_4$ , og suspensionen deltes i aliquoter, der tilsattes urinstof og biuret foruden en kontrolsuspension. Mycelsuspensionerne rystedes mekanisk ved stuetemperatur 4–6 timer, og med mellemrum prøvedes væskefasen kvalitativt for ammoniak med Nessler's reagens; i nogle tilfælde bestemtes  $\text{NH}_4\text{-N}$  efter forsøgets afslutning kvantitativt i 0,2 ml suspensionsvædske efter Conway's mikrodifusionsmetode. Resultaterne ses i tabel 4.

Omend disse resultater er meget fåtallige og foreløbige, giver de en klar antydning af, at svampene assimilerer biuret uden forudgående omdannelse til ammoniak, ligesom tilfældet er med urinstof hos visse gærsvampe (Steiner & Kating 1957) og med biuret hos een af disse (*Torulopsis utilis* ifl. Steiner 1959). Derimod spaltes de alle urinstof under ammoniakdannelse og indeholder altså en urease, men denne synes hverken at være et konstitutivt enzym eller et der induceres af biuret, da ammoniakreaktionen i urinstofopløsning hos alle svampene først blev tydelig efter 2–3 timers forløb; dette kunne tyde på, at ureasen ikke tager del i biuretnedbrydningen (sml. Wheldon & MacDonald 1962). Det må her erindres, at vort kendskab til de lavere svampes urease kun er meget ufuldkomment. I forsøget med *Alternaria* sp. er det værd at lægge mærke til, at ammoniakdannelsen er stærkere i alkalisk end i sur fosfat-opløs-

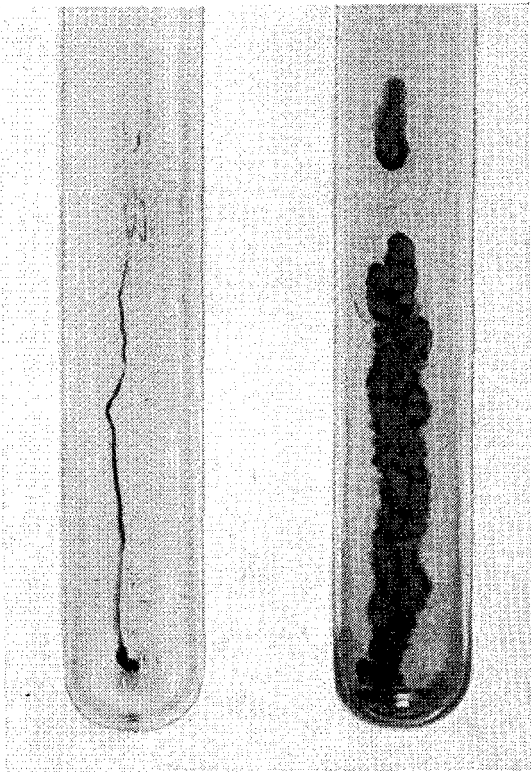


Fig. 1. *Aureobasidium pullulans* (L. 1) på glucose-agar uden kvælstof (t.v.) og 0,1 pct. biuret (t.h.), 15 dage ved  $25^\circ\text{C}$ . Ca.  $\frac{5}{4}$  nat. størrelse. (Fot. Frank Hejndorf, Statens plantepatologiske Forsøg).

Tabel 4. Ammoniakdannelse fra urinstof og biuret af biuret-dyrket svampemycelium

| Svamp   | Forsøgstid, timer | Substrat          | Kvalitativt | NH <sub>4</sub> -N<br>µg/ml | pct. af<br>substrat-N |
|---|-------------------|-------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------|
| <i>Penicillium<br/>variable</i>                   | 3                 | Biuret 0,2 pct.   | —           |                             |                       |
|   |                   | » 0,1 »           | —           |                             |                       |
|   |                   | N-fri kontrol     | —           |                             |                       |
| <i>Penicillium<br/>lilacinum</i>                  | 7,5               | Urinstof 0,2 pct. | +++         | 330                         | 35                    |
|   |                   | Biuret 0,2 pct.   | (+)         | 8                           | —                     |
|   |                   | N-fri kontrol     | (+)         | 6                           | —                     |
| <i>Penicillium<br/>sp. fra æbleblade</i>          | 7,5               | Urinstof 0,2 pct. | +++         | 556                         | 60                    |
|   |                   | Biuret 0,2 pct.   | (+)         | 7                           | —                     |
|   |                   | N-fri kontrol     | (+)         | 5                           | —                     |
| <i>Alternaria<br/>(tenuis ?)</i>                  | 8                 | Urinstof 0,2 pct. | +++         | 385                         | 42                    |
|   |                   | Biuret 0,2 pct.   | (+)         | (27)                        | —                     |
|   |                   | N-fri kontrol     | (+)         | 12                          | —                     |
| Samme i<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -opl.  | 8                 | Urinstof 0,2 pct. | +++         | 530                         | 58                    |
|   |                   | Biuret 0,2 pct.   | (+)         | 20                          | —                     |
|   |                   | N-fri kontrol     | (+)         | 12                          | —                     |
| <i>Macrosporium<br/>(?) sp. fra<br/>æbleblade</i> | 6                 | Urinstof 0,2 pct. | ++          |                             |                       |
|   |                   | Biuret 0,2 pct.   | —           |                             |                       |
|   |                   | N-fri kontrol     | —           |                             |                       |

\*) Tal i parentes: dårligt overensstemmende duplikatforsøg.

ning, hvilket kunne tyde på, at svampens urease ligesom bakterierne er virksomst ved neutral eller svagt alkalisk reaktion.

**Bakterier.** – Fra jord og plantemateriale isoleredes to grupper af biuretforbrugende bakterier. Den første omfattede 5 stammer af bevægelige, ikke-sporédannende, gramnegative stave, der voksede kraftigt på de gængse bakteriologiske substrater og dannede et lyst okkergult, uopløseligt pigment. To stammer, St og V.a, isoleredes fra jord fra henholdsvis Studsgaard og Lyngby forsøgsstationer, de andre tre fra ahorn-, ege- og æbletræblade sammen med de ovenfor omtalte stammer af *Aureobasidium pullulans*; i det hele taget forekom bakterier af denne type ofte i spredninger af jord på biuret-agar. Stammerne lod sig identificere som *Pseudomonas trifolii* (Bergey 1957)\*).

I glucose-biuret (0,04 pct.)-opløsning med citratstødpude ved pH 7,8 voksede 4 stammer kraftigt under kontinuerlig rystning (tabel 5). Maximal tæthed nåedes allerede efter to døgn, og i vasket cellediment kunne mere end 4/5 af biuret-

kvælstoffet genfindes, dvs. alle tre kvælstofatomer kan assimileres. I andre forsøg fandtes 90–92 pct. biuretkvælstof assimileret, og biuret-reaktionen i cellenæringsopløsningen blev negativ allerede efter 36 timer.

Et andet forsøg udførtes i det samme substrat men med begyndelses-pH varierende mellem 4,0 og 8,0–9,5. Som det fremgår af tabel 6, vokser alle stammer over et ganske bredt pH-interval, idet en af dem kan indlede vækst ved pH 4,0, to ved pH 9,5, og alle kan vokse ved pH 5,0 og ca. 8; gennemgående synes væksten bedst mellem pH 5,0 og 6,0. – I fosfat-stødpude af pH 7,0 viste en suspension af vaskede celler dyrkede i biuret-substrat efter 2–4 timer kun svag ammoniakdannelse fra biuret, men betydelig hurtigere og kraftigere fra urinstof.

En anden type af bakterier kom ligeledes hyppigt frem i spredninger på glucose-biuret-agar, hvor de viste sig som runde, ophøjede, glatte, hvidlige og slimede kolonier. Der isoleredes 2 stammer fra sur Virumgaard-jord efter ophobning i glucosebiuret-opløsning, 4 fra svagt sur jord i et sønderdelingsforsøg med biuret (se tabel 9), 2 fra jord med cellulose og biuret (se tabel 10), og ende-

\*) Ikke at forveksle med kløverslægtens knoldbakterier, *Rhizobium trifolii*.

Tabel 5. Vækst af 4 stammer af *Pseudomonas trifolii* med biuret som kvælstofkilde

| Dyrkningstid timer | Optisk tæthed (O.D.) | Biuret-N fundet i celler, pct. |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 24                 | 0,06-0,18            | —                              |
| 42                 | 0,66-0,78            | 81-85                          |
| 48                 | 0,64-0,79            | —                              |
| 54                 | 0,72-0,83            | 81-82                          |

O.D. i substrat uden biuret 72 timer: < 0,01

lig 6 fra sand med unge rødkløverplanter i reagensglasforsøg podet med to jordprøver fra Statens plantepatologiske Forsøg. Samtlige stammer var ikke-sporiddannende, bevægelige, gramnegative stavbakterier, der voksede sparsomt og ukarakteristisk på almindelig kødpepton-agar, -bouillon og -gelatine, men hurtigt og kraftigt på »nitragin-agar« (med glucose, asparagin og lucernekimplanteextract), hvor deres vækst ganske lignede hurtigtvoksende rodknoldbakteriers, især kløver-, ærte- og bønnebakterierne, og i mælk dannede de tillige den for mange knoldbakterier karakteristiske klare overfladezone. Dog kunne de ikke med sikkerhed henføres til knoldbakterierne (*Rhizo-*

*bium*), bl.a. fordi ingen af isolaterne fra rødkløver-rhizosfæren dannede rodknolde på kløverkimplanter. På den anden side adskilte de sig på flere væsentlige punkter fra *Agrobacterium radiobacter*, der står knoldbakterierne meget nær (Pettersen 1940). Indtil videre kan man måske bedst betegne dem »kvasi-rhizobier«.

Disse bakteriers påfaldende lighed med de autentiske rodknoldbakterier gav anledning til at prøve et antal af laboratoriets righoldige samling af *Rhizobium*-stammer overfor biuret og urinstof som kvælstofkilder (Jensen & Schröder 1965). Urinstof viste sig som en god kvælstofkilde for samtlige 120 undersøgte stammer. Derimod viste 32 lucernebakteriestammer sig alle ude af stand til at udnytte biuret, ligeså 10 stammer af *Agrobacterium radiobacter*, der undersøgtes til sammenligning. Det store flertal af andre stammer udnyttede derimod biuret, omend væksten var langsommere og i regelen noget svagere end med urinstof. Fig. 2 giver et indtryk af kulturernes udseende, hvorved er at bemærke, at kællingetandstammen undtagelsesvis ikke udnytter biuret, og at denne og lucerne-stammen her ser ud som på kontrolsubstrat uden tilsat kvælstofkilde.

Tabel 6. Vækst af 4 stammer af *Pseudomonas trifolii* i glucose-biuret-opløsning ved forskellig pH (4,0-9,5). — Stamme I fra Studsgaard-jord. — II, fra ahornblade. — III, fra egeblade. IV, fra æbleblade

| pH ved start | Stamme I   |      |     | pH efter vækst | pH ved start | Stamme II  |     |     | pH efter vækst |
|--------------|------------|------|-----|----------------|--------------|------------|-----|-----|----------------|
|              | O.D. efter |      |     |                |              | O.D. efter |     |     |                |
|              | 24 h       | 42 h |     |                | 24 h         | 44 h       |     |     |                |
| 4,0          | 0,04       | 0,95 | 5,1 | 4,0            | 0            | 0          | 4,1 | 4,1 |                |
| 5,0          | 0,06       | 0,95 | 6,4 | 5,0            | 0,08         | 0,90       | 6,6 | 6,6 |                |
| 6,0          | 0,06       | 0,79 | 6,6 | 6,0            | 0,08         | 0,61       | 6,6 | 6,6 |                |
| 7,0          | 0,08       | 0,84 | 8,2 | 7,0            | 0,10         | 0,61       | 6,6 | 6,6 |                |
| 7,8          | 0,07       | 0,84 | 8,5 | 8,0            | 0,14         | 0,76       | 7,8 | 7,8 |                |
| 8,2          | 0,05       | 0,86 | 8,5 | 9,5            | 0,09         | 0,81       | 7,8 | 7,8 |                |

| pH ved start | Stamme III |      |     | pH efter vækst | pH ved start | Stamme IV  |     |     | pH efter vækst |
|--------------|------------|------|-----|----------------|--------------|------------|-----|-----|----------------|
|              | O.D. efter |      |     |                |              | O.D. efter |     |     |                |
|              | 24 h       | 44 h |     |                | 24 h         | 42 h       |     |     |                |
| 3,8          | 0          | 0    | 4,0 | 4,0            | 0            | 0,01       | 3,8 | 3,8 |                |
| 5,0          | 0,16       | 0,95 | 6,5 | 5,0            | 0,73         | 0,98       | 6,6 | 6,6 |                |
| 5,9          | 0,16       | 0,90 | 6,6 | 6,0            | 0,49         | 0,96       | 7,2 | 7,2 |                |
| 6,8          | 0,18       | 0,83 | 7,0 | 7,0            | 0,27         | 0,83       | 7,9 | 7,9 |                |
| 7,8          | 0,15       | 0,84 | 7,6 | 8,0            | 0,21         | 0,75       | 8,2 | 8,2 |                |
| 8,5          | 0,01       | 0,02 | 8,4 | 9,5            | 0,03         | 0,82       | 8,1 | 8,1 |                |

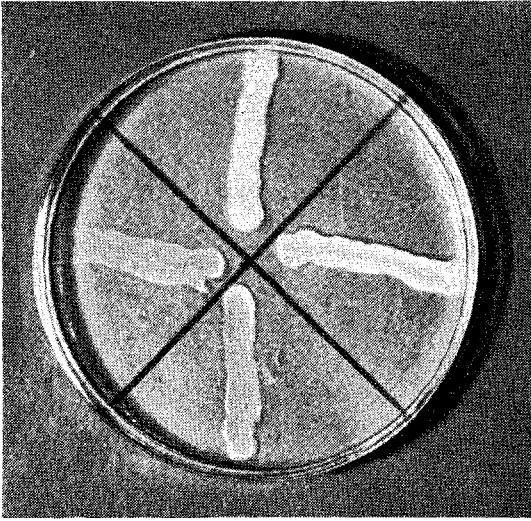


Fig. 2. Vækst af 4 knoldbakteriestammer på glucose-biuret-agar, 6 dage ved 25°C. Fra oven i urviserens retning: 1) *Rhizobium trifolii* (rødkløver). - 2. *Rh. leguminosarum* (ært). - 3) *Rh. meliloti* (lucerne). - 4. *Rhizobium* fra alm. kællingetand (en af de få ikke-biuret-udnyttende stammer fra denne værtplante). Væksten af de to sidste stammer er ikke synligt forskellig fra den svage vækst på glucose-agar uden tilsat kvælstofnæring. Ca. 1/2 nat. størrelse.

(Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor).

Forsøg med en kraftigt biuret-voksende stamme af *Rh. leguminosarum* (fra lathyrus) viste stærk ammoniakdannelse fra urinstof allerede efter 15 minutter i suspensioner af vaskede celler, uanset den kvælstofkilde (nitrat, ammoniak, asparagin, urin-

Tabel 7. Vækst af 4 stammer af »kvasi-rhizobier« med urinstof og biuret

| Stamme   | N-kilde  | Optisk tæthed (O.D.) eft. dage |      |      |      |
|----------|----------|--------------------------------|------|------|------|
|          |          | 1                              | 2    | 3    | 4    |
| Vir. B.a | Urinstof | 0,55                           | 0,63 | 0,45 | 0,45 |
|          | Biuret   | 0,22                           | 1,19 | 1,24 | 1,04 |
|          | - N      | —                              | —    | —    | 0,07 |
| Vir. B.b | Urinstof | 0,33                           | 0,74 | 0,60 | 0,54 |
|          | Biuret   | 0,16                           | 1,45 | 1,35 | 1,35 |
|          | - N      | —                              | —    | —    | 0,07 |
| Kl. 2b   | Urinstof | 0,23                           | 0,97 | 1,50 | 1,42 |
|          | Biuret   | 0,17                           | 0,59 | 1,42 | 1,30 |
|          | - N      | —                              | —    | —    | 0,11 |
| Kl. 3c   | Urinstof | 0,27                           | 1,35 | 1,50 | 1,35 |
|          | Biuret   | 0,11                           | 0,38 | 0,44 | 0,40 |
|          | - N      | —                              | —    | —    | 0,09 |

stof eller biuret) hvormed de var producerede, men kun biuretdyrkede celler gav tydelig ammoniakdannelse fra biuret indenfor 2 til 3 timer. Rodknoldbakteriernes urease synes således at være et konstitutivt enzym, medens det biuretspaltende enzym er typisk inducerbart eller »adaptivt«.

I tabel 7 ses resultaterne af et vækstforsøg med 4 stammer af »kvasi-rhizobier«, to fra Virumgaard-jord og to fra kløver-rhizosfæren, i glucoseopløsning med de nødvendige vækststoffer samt urinstof og biuret repræsenterende ækvivalente mængder kvælstof (0,023 og 0,041 pct.). Det er påfaldende, at de to første stammer vokser meget kraftigere med biuret end med urinstof (hvor væksten endda går tilbage efter den 2. dag), mens stammen 2b forholder sig som de fleste »rigtige« rhizobier, og 3c viser en ret svag omend fuldtud signifikant vækst med biuret.

Det var faktisk iagttagelsen af de fleste rhizobiers evne til at vokse med biuret som kvælstofkilde, der førte til isolationen af de to stammer 2b og 3c fra kløver-rhizosfæren i et forsøg på ad denne vej at isolere knoldbakterier direkte fra jorden, hvilket ellers er en næsten håbløs opgave.

Bortset fra rodknoldbakterierne og et par stammer af *Aureobasidium pullulans* (se s. 163) viste en række andre samlingskulturer af bakterier, svampe og actinomyceter i kvalitative forsøg ingen tegn på at kunne udnytte biuret, med undtagelse af en stamme af *Arthrobacter globiformis* (R.3), der tidligere havde vist sig at kunne udnytte ukrudtsmidlet endothal; væksten med biuret var dog kun langsom og svag (O.D. efter 12 dage 0,31 og 0,07 henholdsvis med og uden biuret).

#### Omsætningsforsøg med biuret i jord.

Til oplysning om biurets tjenlighed som kvælstofkilde for den totale jordbundsmikroflora udførtes et par forsøg hvor kuldioxidproduktionen målt i jord med kvælstoffattigt resp. praktisk talt kvælstoffrit organisk stof med og uden supplerende tilsætning af biuret, begge ved ca. 2/3 vandkapacitet og 25°C med 4 til 6 parallelkolber.

I det første forsøg (tabel 8) anvendtes en stærkt sur lerjord (pH 4,2) tilsat 2,0 pct. finmalet hvedehalm ±100 p.p.m. biuret. Kuldioxidproduktionen med tilsat halm ses at stige allerede fra den

første dag, og fra den 3.–5. dag begynder der at vise sig en beskeden men umiskendelig fremmede virkning af biurettilsætningen. Forøgelsen er stærkest efter 10–12 dage, og henimod forsøgets afslutning er den daglige CO<sub>2</sub>-udskillelse omtrent ens med og uden biuret. I jorden med biuret alene er der i sammenligning med kontroljorden et ringe CO<sub>2</sub>-overskud, hvis årsag er uklar; muligvis stammer det tildels fra selve biurettet, hvis fuldstændige hydrolyse til ammoniak og kulsyre ville resultere i 3,6 mg CO<sub>2</sub> pr. 50 g jord. Forøgelsen i CO<sub>2</sub>-produktion over jord + halm alene (når hensyn tages til den lidt stærkere produktion i jord + biuret) er ganske vist kun ringe (43 mg CO<sub>2</sub>), men næppe mindre end der kunne ventes at svare til fuldstændig assimilation af de 1,73 mg kvælstof pr. 50 g jord med 100 p.p.m. biuret. Hvis denne mængde kvælstof anvendes til syntese af mikrobetørstof med 10 pct. kvælstof og 50 pct. kulstof, vil der forbruges 8,7 mg kulstof/50 g jord, medens de udskille 43 mg CO<sub>2</sub> svarer til 11,6 mg kulstof. Dette giver en samlet omsætning af 8,7 + 11,6 = 20,3 mg C, hvoraf 43 pct. er brugt til cellesyntese og 57 pct. til respiration – et forhold der synes ganske normalt for en økonomisk arbejdende population af aerobe mikroorganismer.

I det andet forsøg anvendtes en neutral have-

Tabel 8. CO<sub>2</sub>-produktion i sur lerjord ± 2,0 pct. hvedehalm og 100 p.p.m. biuret

| Forsøgstid, dage | Uden tilsætning | CO <sub>2</sub> mg/50 g tør jord |               | Biuret alene |
|------------------|-----------------|----------------------------------|---------------|--------------|
|                  |                 | Halm alene                       | Halm + biuret |              |
| 1                | 5               | 28                               | 29            | 5            |
| 3                | 11              | 93                               | 98            | 11           |
| 5                | 14              | 137                              | 148           | 15           |
| 7                | 16              | 163                              | 181           | 18           |
| 10               | 20              | 196                              | 222           | 23           |
| 12               | 22              | 214                              | 249           | 27           |
| 14               | 24              | 235                              | 275           | 30           |
| 16               | 27              | 252                              | 295           | 33           |
| 18               | 28              | 265                              | 312           | 34           |
| 21               | 30              | 288                              | 338           | 37           |

CO<sub>2</sub>-forøgelse for halm alene: 288—30 = 258 mg/50 g  
 » » » halm + biuret: 338—37 = 301 mg/50  
 » » » halm + biuret: 338—37 = 301 mg/50 g  
 » » » biuret netto: 301—258 = 43 mg/50 g

Tabel 9. CO<sub>2</sub>-produktion i neutral havejord med 0,5 pct. cellulose og 200 p.p.m. biuret

| Forsøgstid, dage | Uden tilsætning | CO <sub>2</sub> mg/50 g tør jord |                    |
|------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------|
|                  |                 | cellulose                        | cellulose + biuret |
| 1                | 12              | 11                               | 11                 |
| 3                | 23              | 28                               | 24                 |
| 5                | 26              | 40                               | 33                 |
| 7                | 29              | 56                               | 56                 |
| 8                | 32              | 69                               | 88                 |
| 9                | 33              | 81                               | 113                |
| 10               | 34              | 92                               | 134                |
| 14               | —               | 100                              | 150                |
| 16               | 36              | 108                              | 162                |

CO<sub>2</sub>-forøgelse for cellulose alene: 108—36 = 72 mg  
 » » » cellulose + biuret: 162—36 = 126 mg  
 » » » biuret netto: 126—72 = 54 mg

jord med tilsætning af 0,5 pct. cellulose i form af meget findelt filterpapir suppleret med 200 p.p.m. biuret. Som det fremgår af tallene i tabel 9 er virkningen af biuretkvælstoffet her ikke så lidt tydeligere. I den første uges tid er der nærmest tale om en vis hemning, der afløses af stimulering efter 8–9 dage. Den langsommere virkning af biurettet i sammenligning med det forrige forsøg skyldes muligvis, at der her må opbygges en population af mikroorganismer, der kombinerer evnen til biuretassimilation og cellulosesønderdeling. Ved forsøgets afslutning er biurettets fremmede virkning endnu kendelig, og sandsynligvis er alt biuretkvælstof (her 3,47 mg N/50 g jord) endnu ikke assimileret. Fuldstændig assimilation under de samme betingelser som ovenfor beregnet ville medføre assimilation af 17,3 mg kulstof, medens der kun svarer 14,7 mg kulstof til de 54 mg CO<sub>2</sub>, der er dannet som overskud for biuret i sammenligning med cellulose alene. Teoretisk ville man få en total-omsætning af 17,3 + 14,7 = 32,0 mg kulstof, hvoraf 54 pct. til cellesyntese og 46 pct. til respiration. (Det siger sig selv at disse beregninger ikke kan gøre krav på nogen nøjagtighed, bl.a. fordi man ikke kan afgøre om jordens egne kvælstofforbindelser udnyttes i lige grad med og uden biurettilsætning. Dog giver tallene en forestilling om størrelsesordenen af de stofmængder, hvorom der kan være tale).



Fra jorden med cellulose og biuret foretoges nogle spredninger på et tilsvarende agarsubstrat med biuret og findelt cellulose. Foruden forskellige svampe fremkom der her talrige små, hvide, kompakte kolonier af en actinomycet, tilsyneladende en *Micromonospora*-art, omgivne af tydelige klare zoner hvor cellulosen var opløst. Dette var det eneste tilfælde, hvor der sås sikre tegn på udnyttelse af biuret hos en actinomycet.

Endelig udførtes der i en svagt sur lerjord fra Virungaard (pH 6,3) et sønderdelingsforsøg med biuret alene i mængder på 50 – 100 – 200 p.p.m. Jordprøverne med og uden biurettilsætning opbevaredes (duplikatflasker) under samme betingelser som i CO<sub>2</sub>-forsøgene: moderat fugtig jord, temperatur 25° C. Med mellemrum bestemtes ammoniak- og nitratkvælstof som mål for biuretomsætningen. Resultaterne (tabel 10) viser i overensstemmelse med angivelser af *Gadet* o.a. (1959) at biuretkvælstof begynder at nitrificeres i løbet af et par uger, og processen er omtrent fuldstændig efter to måneder, omend billedet på dette tidspunkt tilsløres noget af de svingende nitratmæng-

der, der henimod forsøgets afslutning kunne tyde på delvis tab af kvælstof. Spiringsforsøg med byg viste, at biurettets hemmende virkning udtrykt ved spirernes vægt var meget betydelig ved forsøgets indledning, men var helt forsvundet efter 45 og 80 dage; spiringsprocenten påvirkedes derimod ikke væsentligt.

### Oversigt

Selv om evnen til at omsætte og udnytte biuret åbenbart ikke er særlig almindelig blandt mikroorganismene, findes denne egenskab hos adskillige grupper af svampe og bakterier, såsom *Penicillium* spp., *Coniothyrium*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Macrosporium* og *Aureobasidium pullulans*, *Pseudomonas trifolii* foruden de mærkelige »kvasirrhizobier« og selve rodknoldbakterierne. Alle disse organismer forekommer vidt udbredte i jord og på planter, og en videregående undersøgelse ville sikkert afsløre biurettudnyttelse i mange andre organismer. Kombinationen af svampe med optimal reaktion ved pH 4 – 5 og bakterier som *Ps. trifolii* med et vækstinterval der strækker sig til pH

Tabel 10. Mineralisering af biuret i svagt sur lerjord

| Biuret tilsat               |                    | Mineral-N p.p.m. efter dage |    |      |       |     |       |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|----|------|-------|-----|-------|
| p.p.m.                      |                    | 0                           | 15 | 30   | 45    | 60  | 80    |
| 0                           | NH <sub>4</sub> -N | 1                           | 0  | 0    | 4     | 10  | 4     |
|                             | NO <sub>3</sub> -N | 6                           | 13 | 24   | 46    | 41  | 38    |
|                             | Ialt               | 7                           | 13 | 24   | 50    | 51  | 42    |
| 50<br>= 17,4                | NH <sub>4</sub> -N | 1                           | 0  | 0    | 2     | 9   | 4     |
|                             | NO <sub>3</sub> -N | 7                           | 26 | 28   | 62    | 59  | 57    |
|                             | Ialt               | 8                           | 26 | 28   | 64    | 68  | 61    |
| p.p.m. N                    | Over 0             |                             | 13 | 4    | 14    | 17  | 19    |
| pct. biuret-N mineraliseret |                    |                             | 75 | (23) | 80    | 99  | (109) |
| 100<br>= 34,7               | NH <sub>4</sub> -N | 1                           | 0  | 0    | 5     | 8   | 4     |
|                             | NO <sub>3</sub> -N | 7                           | 28 | 35   | 73    | 66  | 68    |
|                             | Ialt               | 8                           | 28 | 35   | 78    | 74  | 72    |
| p.p.m. N                    | Over 0             |                             | 15 | 11   | 28    | 23  | 30    |
| pct. biuret-N mineraliseret |                    |                             | 43 | 32   | 81    | 63  | 86    |
| 200<br>= 69,4               | NH <sub>4</sub> -N | 1                           | 0  | 13   | 5     | 8   | 4     |
|                             | NO <sub>3</sub> -N | 7                           | 42 | 44   | 117   | 100 | 83    |
|                             | Ialt               | 8                           | 42 | 57   | 122   | 108 | 87    |
| p.p.m. N                    | Over 0             |                             | 29 | 33   | 72    | 55  | 45    |
| pct. biuret-N mineraliseret |                    |                             | 42 | 48   | (104) | 82  | 79    |

over 8 giver mulighed for omsætning af biuret ved ethvert reaktionstalsniveau, der kan træffes i dyrkede jorder, og hertil kommer, at visse bakterier (*Ps. trifolii*) kan opnå maximal vækst med biuret som kvælstofkilde i løbet af mindre end to døgn. Biuretet må således karakteriseres som et under gunstige omstændigheder særdeles let metaboliserbart stof.

Selve den biokemiske mekanisme ved biuretets udnyttelse er ikke kendt i enkeltheder. Det synes dog sikkert, at mikroorganismers og højere planter urease ikke spiller nogen rolle i denne proces – eller i alt fald ikke nogen primær rolle i betragtning af, at mange stærkt ureaseaktive bakterier ganske mangler evne til at omsætte biuret.

Endvidere ser man, at den samlede jordbundsflora hurtigt indstiller sig på udnyttelse af biuret i nærværelse af kvælstoffattigt stof, således som det fremgår af kulisyreproduktionsforsøgene i tabel 8–9, og at også uden extra organisk stof kan biuret mængder så store som 200 p.p.m. (= 500 kg/ha) mineraliseres i løbet af 2 til 3 måneder (tabel 10). Når hertil kommer, at biuret ikke fastholdes absorbtivt af jorden (ifl. *Gadet* o.a. 1959), synes det klart, at der ikke kan være nogen fare for kumulativ virkning af de små mængder biuret, der kan tilføres jorden med eventuelt biuret-holdig urea.

Biuretets relativt lette omsættelighed bidrager tillige til at forklare, at dets giftighed er størst ved foliær optagelse efter udsprøjtning og mindre ved tilførsel til jorden, hvor det bliver udsat for jordens mikroorganismer inden det kommer til optagelse i rødderne. Ikke mindst i røddernes umiddelbare omgivelser, rhizosfæren, kan man vente, at biuretet vil angribes af den stærkt aktive bakterieflora, der regelmæssigt findes her – og som hos bælgplanterne indbefatter de ofte biuretmetaboliserende rodknoldbakterier.

## Summary

### *Transformation of biuret by microorganisms*

Various fungi and bacteria capable of using biuret as nitrogen source were isolated from soil and leaf material in selective media. Prominent among the fungi were *Coniosporium fuckelii*, *Penicillium* spp. (particularly *P. vermiculatum* and *P. lilacinum*), and *Aureobasi-*

*dium pullulans*, further *Myrothecium verrucaria*, *Humicola grisea*, *Alternaria* sp. and *Macrosporium* (?) sp. All grew over a wide pH-range with typical optima at pH 4,0–5,0. Approximately 60 to 85 pct. of the biuret-nitrogen could be recovered in the mycelium. Biuret-grown and washed mycelia produced ammonia from urea although the urease did not appear to be a constitutive enzyme; ammonia formation from biuret could not be detected with certainty.

The most frequently encountered group of biuret-utilizing bacteria were strains of *Pseudomonas trifolii*. Pure cultures could under favourable conditions attain maximum growth in glucose-biuret medium within less than 48 hours when 80–85 pct. of the biuret nitrogen was assimilated in the cell material. Growth could be initiated from pH approx. 4 to above 8, with apparent optimum at pH 5 to 6. Washed biuret-grown cells produced ammonia more rapidly from urea than from biuret.

Another group was represented by bacteria that culturally resembled the rapidly growing type of legume root nodule bacteria (*Rhizobium*) but were not definitely identifiable as such and were also different from *Agrobacterium radiobacter*. Two strains of these »quasi-rhizobia« grew even better with biuret than with urea as nitrogen source. Another series of experiments showed that many strains of genuine rhizobia were capable of utilizing biuret although this nitrogen source was mostly inferior to urea.

Except for the rhizobia and certain strains of *Aureobasidium pullulans*, stock cultures of several fungi, actinomycetes and bacteria showed very little or no evidence of metabolizing biuret.

Experiments in soil showed that the total soil microflora was able to utilize biuret for the decomposition of straw and pure cellulose, as evidenced by the production of carbon dioxide, and that nitrogen in biuret added in doses of 50–100–200 p.p.m. not accompanied by other organic substances was nitrified to the extent of 80–100 pct. in the course of two to three months.

The results as a whole show that there can be no risk of the biuret from synthetic urea fertilizer accumulating in the soil. At the same time they seem to offer some explanation for the well-known fact that the phytotoxic effect of biuret is considerably greater by foliar application than by uptake through the root.

## Litteraturhenvisninger

*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (7th ed.) Williams & Wilkins Co., Baltimore.

- Briggs, M. H., & Segal, Leah*, 1963. Preparation and properties of a free soil enzyme. *Life Sc.* v. 2: 69-72.
- Collins, H. A., & Aldrich, R. J.*, 1956. A preliminary study of 2,3,6-trichlorobenzoic acid and biuret for weed control in field corn. *N. E. Weed Control Congr. Proc.* v. 10: 1-5.
- Czapek, F.*, 1902. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Pflanzen. *Beitr. Chem. Physiol. u. Path.* v. 1: 538-560.
- Den Dooren de Jong, L. E.*, 1926. Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. (Thesis, Delft). Nijgh & van Ditmar's Uitgevers Mij., Rotterdam.
- Gadet, R., Soubies, L., & Fourcassie, F.*, 1959. Recherches sur les effets toxiques du biuret et sur l'évolution de ce composé dans les sols. *Ann. Agronomiques* v. 6: 609-660.
- Jensen, H. L.*, 1963. Sulphamic acid as a nitrogen source for microorganisms. *J. Appl. Bact.* v. 20: 253-261.
- Jensen, H. L., & Kumaran, K.*, 1965. Transformation microbiologique du biuret. *Ann. Inst. Pasteur* v. 109: 184-190.
- Jensen, H. L., & Schröder, Minna*, 1965. Urea and biuret as nitrogen sources for *Rhizobium* spp. *Ann. Appl. Bact.* v. 28: 473-478.
- Larson, A. D., & Kallio, R. E.*, 1954. Purification and properties of bacterial urease. *J. Bact.* v. 68: 67-73.
- Petersen, E. J.*, 1926. Undersøgelser over Jordens Kulsyreproduktion, kemiske Tilstandsform og mikrobiologiske Aktivitet. *Tidsskr. f. Planteavl* v. 32: 625-671.
- Petersen, E. J.*, 1940. Diagnostiske Undersøgelser over Lucernebakterier. *Tidsskr. f. Planteavl* v. 44: 504-553.
- Shaw, W. H. L., & Kistiakowsky, G. B.*, 1950. Specificity of urease activity. *J. Amer. Chem. Soc.* v. 72: 634-635.
- Steiner, M., & Kating, H.*, 1957. Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* v. 28: 173-190.
- Steiner, M.*, 1959. The utilization of amine and amide nitrogen by *Endomycopsis vernalis* and other yeasts. *Symp. Soc. Exp. Biol. XII: Utilization of Nitrogen and its Compounds by Plants*, pp. 171-192. Cambridge University Press.
- Wheldon, G. H., & MacDonald, R. E.*, 1962. Utilization of biuret by *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature (London)* v. 196: 596-597.