

# Forsøg med en biologisk metode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn

Af Johannes Jørgensen \*)

Metoder til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af fungicider på korn har interesse i forbindelse med undersøgelser over afsvampningens kvalitet samt i forbindelse med undersøgelser af, om forbudet mod anvendelse af sædekorn til foder- eller brødkorn overtrædes.

En tilfredsstillende metode til afprøvning af afsvampningens kvalitet må kunne svare på, om et sædekornsparti er afsvampet, og i så tilfælde om der er anvendt tilstrækkelige mængder afsvampningsmiddel, og om afsvampningsmidlet er fordelt ensartet på kernerne. De to førstnævnte punkter kunne eventuelt besvares ved hjælp af en kemisk analyse af en gennemsnitsprøve af et sædekornsparti. Det sidste punkt ville kræve en undersøgelse af prøvens enkelte kerner, hvilket i praksis ikke lader sig gøre med en kemisk analyse.

Forskellige forskere (*Heatley*, 1944; *Mead*, 1945; *Machacek*, 1950; *Stapel* et al, 1961; *Kovacs*, 1963, m.fl.) har derfor interesseret sig for en biologisk metode til påvisning af svampe-dræbende midler på frø. Metoden går ud på at anbringe frø på agarplader med unge kulturer af svampe eller bakterier og at måle den hæmningszone, der dannes omkring de enkelte frø som følge af tilstedeværelsen af fungicider på frøets overflade. Fungiciderne vil diffundere ud i vækstmediet og danne en hæmningszone, hvis størrelse er afhængig af afsvampningsmidlernes giftighed, koncentration og af deres diffusionshastighed.

De fleste forskere har anvendt svampearter som testorganismer. *Kovacs* (1963) prøvede foruden 4 forskellige svampearter også 6 bakteriearter og fandt, at bakteriearterne *Corynebacterium rathay* (E. F. Smith) Dowson og *Pseudomonas medicaginis* Sackett var de bedst egnede til formålet, især fordi de var nemme at ar-

bejde med og meget hurtigvoksende. Dette medfører, at forureninger af testpladerne fra luften ingen rolle spiller, idet hæmningszonen allerede kan ses tydeligt 24 timer efter kernernes anbringelse på de nyspredte plader.

Formålet med de i det følgende omtalte forsøg var at undersøge denne biologiske metodes egnethed som rutinemetode til testning af sædefrø, idet det ved frøundersøgelse ofte er en fordel at have en hurtig metode til afgørelse af, om en prøve er afsvampet, og om den er afsvampet med tilstrækkelige mængder fungicid.

## Materialer og metoder

Ved undersøgelserne brugtes i alle tilfælde kulturer af *Corynebacterium rathay*, som blev dyrket på kødpeptonagar (KPA).

Til hvert forsøg fremstilles en koncentreret suspension af bakterier fra 24 timer gamle kulturer på kødpepton (KP). To dråber heraf blev tilsat 15 ml KPA i rørglas anbragt i vandbad ved 48°C. Hvert rørglas rystedes derefter kraftigt inden de 15 ml hældtes ud i plastikpetri-skåle med en diameter à 14 cm. Efter agarens størkning var skålene færdig til brug.

Til forsøgene anvendtes hovedsagelig kerner af Carlsbergbyg og Bonusbyg, som blev afsvampet med forskellige afsvampningsmidler. I de fleste tilfælde anvendtes afsvampningsmidlerne Tillantin 1875 og Panogen 8, men også andre midler blev anvendt.

Afsvampningen af bygprøver à 50 g blev foretaget i 150 ml kolber. Af tørbejdsen tilsattes den ønskede mængde, og kolberne rystedes i 30 min. eller mere. Af oliebejdserne afmålte den ønskede mængde, som blev opløst i 5 ml destilleret vand, som derefter blev tilsat kolberne under kraftig rystning. Efter tilsætningen rystedes i 30 min. Prøverne fik derefter lov til at ligge i et tyndt lag i åbne skåle ved stue-

\*) Adr.: Statsfrøkontrollen, Thorvaldsensvej 57, København V.

temperatur som regel i 24 timer, indtil den tilsatte vandmængde var fordampet.

Af de afsvampede prøver udtoges det ønskede antal kerner, som blev anbragt i petriskårle på agarpladerne med bakterier. Skålene var ikke fuldstændig plane i bunden, idet denne skrånede lidt opad ind mod centrum. Derfor anbragtes kernerne i en enkelt kreds efter skabelon, således at de kom til at ligge på et agarlag af ens tykkelse med en indbyrdes afstand af ca. 2,5 cm. De anbragtes på bugsiden med den ene ende pegende mod skålens centrum. (Se fig. 1).

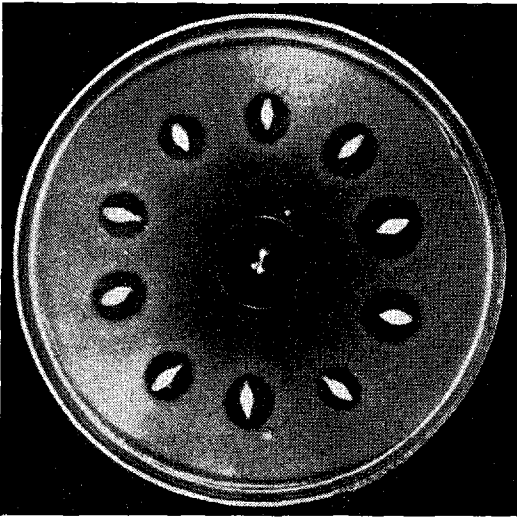


Fig. 1. Testplade 24 timer efter anbringelsen af afsvampede bygkerner ca.  $\frac{1}{2}$  nat. str.

24 timer efter kernernes anbringelse på agarpladen blev de dannede hæmningszoner målt ved diameteren parallelt med kernernes længdeakse, hvorefter der beregnedes gennemsnit af zonediameter samt middelfejl på denne.

## Resultater

### a. Forskellige undersøgelser vedrørende testens udførelse

Hæmningszonen omkring kernerne er ikke helt cirkulær, fordi kernernes berøringsflade med agaren er lidt aflang. Forskellen mellem længste og korteste diameter var som regel ca. 10 procent. Variationen på de to diametre var ens,

og der blev derfor i hovedparten af forsøgene kun målt den længste diameter.

Agarlagets tykkelse har stor indflydelse på zonediameteren, idet aftagende tykkelse forøger zonediameteren. Meget tynde agarlag er vanskelige at fremstille i tilstrækkelig ensartet tykkelse. Ved sammenligning af 15,0, 17,5 og 20,0 ml agar pr. skål fandtes ved brug af Tillantin 1875 som afsvampningsmiddel, at 15,0 ml var mest hensigtsmæssig, idet zonediameteren her var størst, uden at variation på denne var væsentlig større end hos de større mængder.

For at lette fordelingen af agaren i skålene blev disse forsøgsvis opvarmet til  $40^{\circ}\text{C}$  inden ophældningen. Denne fremgangsmåde blev forladt igen, idet plastikskålene ved denne temperatur blev noget vandskyende, hvilket vanskeliggjorde fordelingen af agaren.

Koncentrationen af agaren i mediet er også af afgørende betydning for størrelsen af zonediameteren, idet denne øges ved aftagende koncentration. I forsøgene anvendtes fra 1,25-2,00 procent agar. Den anvendte koncentration vil afhænge af, hvilket afsvampningsmiddel der arbejdes med, idet der skal tilstræbes en passende zonediameter, således at zonerne ikke flyder sammen.

Bakteriekoncentrationen i agarmediet har især ved lav koncentration en del indflydelse på zonediameteren, således at zonediameteren bliver mindre, når bakteriekoncentrationen forøges. Det er derfor vigtigt, at der ved samme forsøg bruges lige store bakteriekoncentrationer i alle testplader. Vil man kunne sammenligne direkte mellem forsøg, er det nødvendigt at bruge ens koncentration fra forsøg til forsøg, og i sådanne tilfælde må der foretages kimtælling. Men i almindelighed vil det være tilstrækkeligt at benytte en standardiseret fremgangsmåde ved fremstillingen af bakteriesuspensionen og blot efterse, at pladerne er ensartede indenfor hvert forsøg.

Zonediameteren målt som nævnt 24 timer efter, at kernerne var anbragt i skålene. Forsøgsvis blev foretaget senere aflæsninger, hvilket viste, at zonediameteren ret hurtig formindskedes. Allerede efter 48 timer er diame-

teren formindsket med 2-3 mm. Ved længere tids udsættelse af målingerne formindskes diameteren stadig, men i langsommere tempo.

*b. Indflydelsen af fungicidernes koncentration på zonediameterens størrelse*

Til belysning af indflydelsen af afsvampningsmidlets koncentration på zonediameteren udførtes nogle forsøg med tørbejdse (Tillantin 1875), hvoraf der anvendtes varierende mængder. For hver mængde testedes 100 kerner. Resultaterne fra to forsøg er vist i fig. 2. De to kurver er omtrent ens af form, men beliggenheden er ret forskellig, hvilket skyldes, at der anvendtes forskellig agartykkelse i de to forsøg. De lodrette streger angiver  $3 \times$  middelfejlen på gennemsnittet på begge sider af kurvens punkter.

Det ses, at tilvæksten i zonediameteren er stærkest i begyndelsen, og at stigningen er væsentlig svagere, når mængden overstiger den anbefalede mængde af afsvampningsmidlet. Det fremgår også af kurverne, at de forskellige

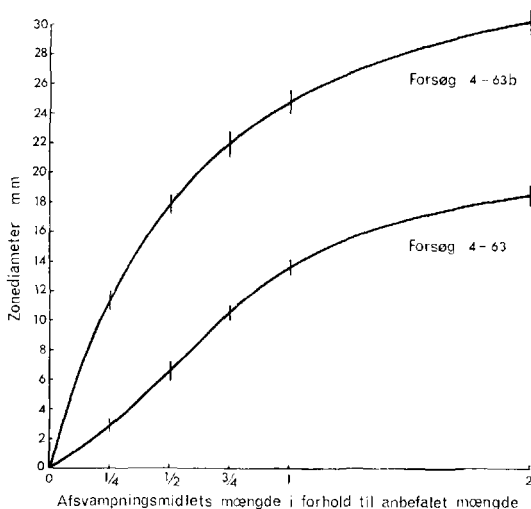


Fig. 2. Zonediameterens afhængighed af afsvampningsmidlets koncentration på kernerne. Som afsvampningsmiddel benyttedes i begge forsøg Tillantin 1875. Den store forskel mellem zonediameterne i de to forsøg skyldes, at der ikke blev benyttet samme koncentration af agar i mediet.

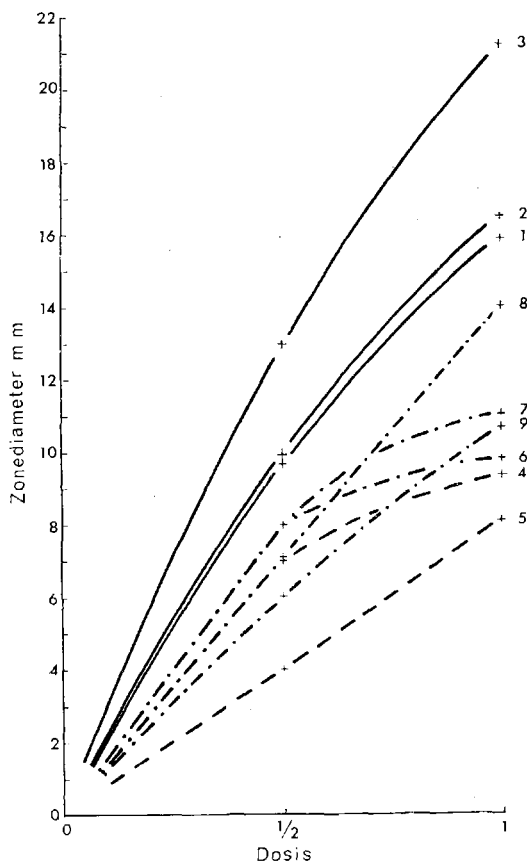


Fig. 3. Hæmningszonens diameter ved anvendelse af forskellige afsvampningsmidler i halv og hel dosis. 1-3 tørbejdser, 4-5 fugtbejdser og 6-9 oliebejdser.

mængder alle har givet zonediameter, der er signifikant forskellige fra hinanden.

I fig. 3 er angivet resultaterne fra et lignende forsøg med 9 forskellige afsvampningsmidler, nemlig 3 tørbejdser, 2 vådbejdser og 4 oliebejdser. Af hvert middel anvendtes den på etiketten anbefalede mængde samt det halve af denne mængde. På grundlag af nulpunktet og disse to forsøgsled er kurverne i fig. 3 tegnet. Der målt 30 zoner pr. forsøgsled.

Figuren viser, at zonediameteren for alle afsvampningsmidlers vedkommende er mindre, hvor den halve mængde er anvendt, end hvor

den normale mængde afsvampningsmiddel er anvendt. Stigningen er ikke ens for alle kemikalier, men forskellen i zonediameteren ved de to mængder af det enkelte afsvampningsmiddel er signifikant i alle tilfælde. Tørbejdserne har gennemgående givet de største zoner, medens fugtbejdserne har givet de mindste zoner. Middelfejlen på gennemsnittene varierede i dette forsøg mellem 0,22 og 0,56 mm.

Ved gentagelse af forsøget opnåedes i det væsentlige de samme resultater med kun små forskydninger mellem afsvampningsmidlernes indbyrdes placering.

Kviksølvindholdet er ikke ens i de 9 afsvampningsmidler, men forskellene mellem de mængder kviksølv, der er i de forskellige midler, kan ikke alene forklare de fundne forskelle mellem zonediameterene.

### c. Indflydelsen af kernerens vandindhold på zonediameterens størrelse

For at undersøge, om det afsvampede korns vandindhold ved testens udførelse har betydning for den dannede hæmningszone, blev der udført tre forsøg, hvor prøver af byg indstilledes til forskelligt vandindhold. Prøver af byg med 14-16 procent vand blev dels nedtørret til 9-10 procent vandindhold dels fugtet med destilleret vand for at opnå et vandindhold på omkring 22 procent. Efter regulering af vandprocenten blev prøverne anbragt i lukkede glas eller plastikposer, hvori de henstod nogle dage, inden de blev afsvampet med Tillantin 1875 eller Panogen 8. Efter afsvampningen med Panogen 8 blev prøverne stillet til tørring for at lade den med afsvampningsmidlet tilsatte vandmængde fordampe, men det lykkedes ikke altid at opnå den ønskede vandprocent i prøverne med det højeste og det laveste vandindhold.

Samtidig med, at kernerne blev anbragt på agarpladerne, blev der foretaget vandbestemelse i udtagne parallelprøver.

Resultaterne fra forsøgene er vist i fig. 4. Det ses, at zonediameteren aftager nogenlunde jævnt med stigende vandindhold i kornet. Formindskelsen er af en sådan størrelsesorden, at man

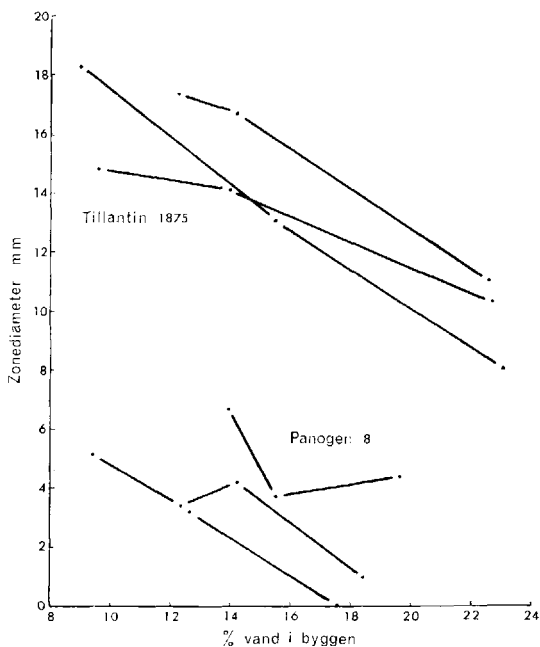


Fig. 4 Zonediameterens afhængighed af det testede korns vandindhold vist ved tre forsøg med Tillantin 1875 og Panogen 8.

ikke kan se bort fra forskelle i vandindhold, hvis man ønsker et blot nogenlunde sikkert udtryk for den mængde afsvampningsmiddel, der findes på kernerne.

### d. Testmetodens anvendelighed ved undersøgelse af sædekorn opbevaret flere måneder efter afsvampningens gennemførelse

For at belyse, om testmetoden kan anvendes til afsvampet sædekorn, som har været opbevaret i kortere eller længere tid efter afsvampningens gennemførelse, blev der udført et opbevaringsforsøg med byg afsvampet med Tillantin 1875 og Panogen 8. Til forsøget anvendtes prøver af byg på 50 g, der blev afsvampet med de anbefalede mængder af de to midler. Prøverne blev opbevaret i papirposer anbragt i papæsker kun dækket af et stykke gaze for at tillade eventuel fordampning af afsvampningsmidlerne.

Ved forsøgets begyndelse afvejes alle prøver, og en tredjedel af prøverne blev straks afsvam-

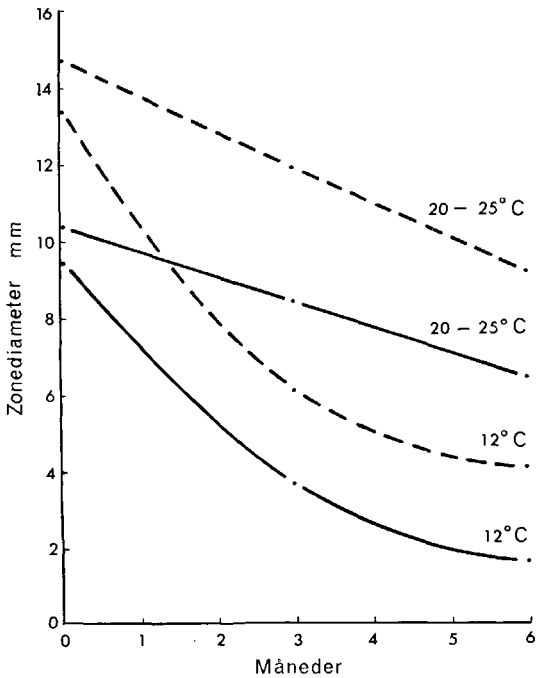


Fig. 5. Zonediameterens afhængighed af opbevaringstiden for kornet efter afsvampningen ----- Tillantin 1875 og — Panogen 8.

pet. En tredjedel blev afsvampet efter 3 måneders forløb, og sidste tredjedel af prøverne blev afsvampet efter 6 måneders forløb d.v.s. umiddelbart før forsøgets afslutning. Der var 3 gentagelser af hvert forsøgsled.

Halvdelen af prøverne blev efter afsvampning opbevaret ved 12°C i et ret fugtigt rum, medens den anden halvdel blev opbevaret ved 20-25°C. Inden afsvampningen opbevarede prøverne ved 20-25°C.

Der blev anbragt parallelprøver til vandbestemmelse på de to opbevaringssteder. En gang om måneden udtoges en prøve fra hvert sted til vandbestemmelse.

Seks måneder efter forsøgets begyndelse blev 60 kerner fra hver prøve testet på agarplader. Prøverne henstod derefter ved henholdsvis 12° og 20-25°C i to uger, hvorefter der blev foretaget en kemisk analyse for indhold af kviksølv på en del af prøverne repræsenterende de fleste forsøgsled. Ved analyserne benyttedes de af

Stapel et al (1961) anførte analysemetoder A og C.

Resultaterne af testen på agarpladerne er vist i fig. 5. Det ses som i de før omtalte forsøg, at zonediameteren er større for Tillantin 1875 end for Panogen 8. Zonediameteren falder omtrent lige stærkt for de to midler ved opbevaring efter afsvampningen. Som det fremgår af figuren, er der en afgørende forskel mellem prøverne opbevaret ved 12°C og prøverne opbevaret ved 20-25°C, idet zonediameteren er betydelig mindre efter opbevaring ved den lave temperatur.

Forskellen mellem prøverne opbevaret ved de to temperaturer skyldes antagelig delvis forskelle i vandindhold, idet, som det ses af tabel 1, vandindholdet i prøverne opbevaret ved 12°C steg fra 12,1 pct. til 17,6 pct. i de seks måneder, medens det i prøverne opbevaret ved 20-25°C faldt fra 12,1 til 8,6 pct.

Tabel 1. Ændringer i vandindholdet i de opbevarede prøver ved 12° og 20-25°C

| Opbevaringstid efter afsvampning | Procent vand i prøver ved |      |
|----------------------------------|---------------------------|------|
|                                  | 12°C                      | 20°C |
| Ingen .....                      | 12,1                      | 12,1 |
| 1 måneders opbevaring...         | 14,2                      | 11,6 |
| 2 måneders opbevaring..          | 15,5                      | 11,6 |
| 3 » » ..                         | 16,1                      | 10,8 |
| 4 » » ..                         | 15,9                      | 9,8  |
| 5 » » ..                         | 17,0                      | 9,3  |
| 6 » » ..                         | 17,6                      | 8,6  |

Selv hos de prøver, hvor vandindholdet faldt under opbevaringen, aftog zonediameteren, hvorfor man kan konkludere, at de ændringer, der sker under opbevaringen, vil formindske zonediameteren ved test på agarplader.

Tabel 2. Rest af kviksølv i afsvampet byg efter forskellig opbevaringstid

| Opbevaringstid | Procent af tilsat Hg genfundet i analysen |        |           |        |
|----------------|-------------------------------------------|--------|-----------|--------|
|                | Tillantin 1875                            |        | Panogen 8 |        |
|                | 12°                                       | 20-25° | 12°       | 20-25° |
| Ingen .....    | 82,9                                      | 82,9   | 81,3      | 81,3   |
| 14 dage.....   | 56,1                                      | —      | 66,6      | —      |
| 3½ måned...    | 63,3                                      | —      | 52,8      | —      |
| 6½ måned...    | 57,3                                      | 63,4   | 62,0      | 66,4   |

— = ingen data

Kviksølvindholdet blev bestemt i prøver fra de fleste forsøgsled, og i tabel 2 er angivet de mængder, der blev fundet i forhold til den mængde, der blev tilsat ved afsvampningen. I de prøver, der blev analyseret straks efter afsvampningens gennemførelse, blev der fundet godt 80 procent af den tilsatte mængde, medens der i de andre prøver blev fundet fra 53 til 66 procent. Årsagen til, at ikke alt kviksølv genfindes ved analyse af nylig afsvampede prøver, er ikke kendt, men vedrørende diskussion heraf henvises til *Stapel et al (1961)*. Forskellen mellem de prøver, der blev analyseret efter afsvampning, og de, der blev opbevaret i kortere eller længere tid, viser, at der er sket et tab af kviksølv under opbevaringen. Tabet ser ud til at være sket i løbet af de første 14 dage, og der er ingen klar forskel i tabet ved opbevaring ved de to temperaturer.

Bestemmelse af kviksølvmængden blev også foretaget ved dithizonmetoden, men kun fire prøver, der var afsvampet med Tillantin 1875, gav reaktion for indhold af kviksølv. De nylig afsvampede prøver gav kraftig reaktion, medens een prøve opbevaret i 14 dage ved 12°C og een prøve opbevaret i 6½ måned ved 20-25°C gav svag reaktion.

Resultaterne tyder på, at den mindre zonediameter efter opbevaring af afsvampet korn delvis skyldes tab af kviksølv ved fordampning, men det ser ud til, at nedgangen i diameteren også skyldes andre forhold herunder måske kviksølvet diffusion ind i kernerne. Resultaterne af analysen ved dithizonmetoden kunne også tyde på, at en stor del af kviksølvet ikke findes på overfladen af kernerne efter nogen tids opbevaring.

#### e. Overførsel af fungicider fra kerne til kerne i uensartet afsvampede prøver

For at belyse, i hvor stor udstrækning bejdsemidlerne overføres fra kerne til kerne under transport og behandling, blev der fremstillet en uensartet afsvampet prøve ved at blande afsvampet og uafsvampet materiale. Til disse forsøg anvendtes tørbejdsemidlet Tillantin 1875. Efter blandingen drejedes prøverne i kolber, og

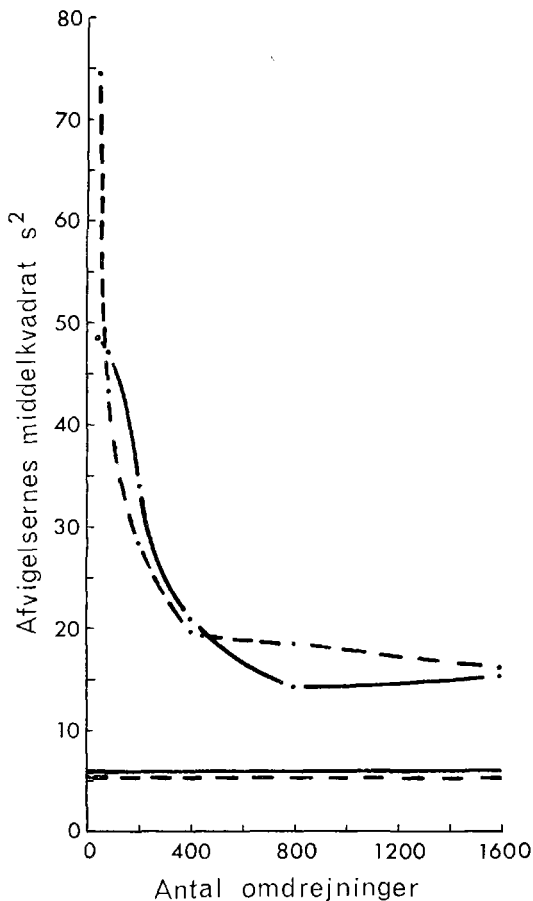


Fig. 6. Overførsel af Tillantin 1875 fra kerne til kerne i uensartet afsvampede prøver vist ved to forsøg. — = forsøg a; ---- = forsøg b. De to vandrette linier viser  $s^2$  for de ensartede afsvampede prøver.

efter henholdsvis 40, 80, 200, 400, 800 og 1600 roteringer udtoges 100 kerner, som testedes på agarplader.

I fig. 6 er angivet resultaterne fra to forsøg. Kurverne viser middeltkvadratet på afvigelserne fra den gennemsnitlige zonediameter. Under de første 400 omdrejning sker der stor overførsel fra kerne til kerne, men herefter er overførselen ringe. Selv efter 1600 omdrejninger var variation i zonediameteren betydelig større for den uensartet afsvampede prøve end for kontrolprøven.

Disse resultater tyder på, at uensartet afsvampet prøver og frøpartier ikke vil blive egaliseret under forsendelse. Det er heller ikke sandsynligt, at rystelse under transport af sække med afsvampet korn og omhældning af dette vil medvirke væsentligt til en egalisering.

*f. Testmetodens anvendelse på såsædsprøver af vinterhvede*

For at få et indtryk af testmetodens anvendelighed prøvedes den på et antal af de til statsfrøkontrollen indsendte såsædsprøver af vinterhvede. Der blev tilfældigt udtaget 44 prøver, om hvilke der kunne skaffes oplysninger om det anvendte afsvampningsmiddel. Af disse 44 prøver testedes 100 kerner, og ved alle forsøg anvendtes som kontrol en standardprøve afsvampet på laboratoriet med samme middel, som de testede prøver var afsvampet med. Vandindholdet i prøverne blev ikke bestemt, men da alle, inclusive kontrolprøven, havde været opbevaret i laboratoriet gennem nogle uger, må det formodes, at deres vandindhold har været omtrent ens. Efter testen blev de enkelte prøvers gennemsnitlige zonediameter beregnet.

Tabel 3. Fordelingen af 44 såsædspartier af hvede efter mængden af afsvampningsmiddel på kernerne målt ved hæmningszonens diameter

| Zonediameter i procent af kontrol | Antal partier |
|-----------------------------------|---------------|
| 0.....                            | 1             |
| 1- 20.....                        | 3             |
| 21- 40.....                       | 9             |
| 41- 60.....                       | 16            |
| 61- 80.....                       | 9             |
| 81-100.....                       | 5             |
| >100.....                         | 1             |

Resultaterne er angivet i tabel 3, hvoraf det fremgår, at der er stor spredning med hensyn til zonediameteren. I tabellen er kontrolprøvens zonediameter sat til 100. Den største gruppe ligger med en relativ zonediameter fra 41 til 60, medens gruppernes størrelse aftager jævnt til begge sider. De fleste prøver blev testet i januar og februar 1965, altså ca. 5 måneder efter at prøverne var blevet afsvampet, medens

kontrolprøverne blev afsvampet umiddelbart før testens udførelse. Dette er antagelig forklaringen på, at de fleste prøver gav relativt små zonediametre.

Alle de testede prøver blev undersøgt for tilstedeværelsen af smitstof af forskellige svampe efter inkubation på fugtigt filterpapir ved 8-10°C i 14 dage og på maltextraktagar ved 22°C i 10 dage.

Forekomsten af *Fusarium*- og *Helminthosporium*arter tilsammen lå for de fleste prøver fra 0-5 pct., og ingen havde over 10 pct. af frøene med disse arter. Den hyppigste *Fusarium*art var *F. poae*. Langt den hyppigste svampeart var *Alternaria tenuis*. For hyppigheden af denne arts forekomst kunne der konstateres en tendens til nedgang med tiltagende zonediameter.

**Diskussion og konklusioner**

Den undersøgte biologiske testmetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn må betragtes som velegnet til formålet under visse forhold.

Variationen på hæmningszonens diameter er på en velafsvampet prøve meget lille indenfor den enkelte test. Hæmningszonens diameter varierer en del fra test til test. Især agarlagets tykkelse, agarens koncentration og bakteriekoncentrationen i agaren er afgørende for zonediameterens størrelse. Det vil være nødvendigt i alle tests at have en eller flere kontrolprøver med kendte mængder fungicid for at undgå fejlbestemmelser.

Hæmningszonens diameter varierer fra fungicid til fungicid, således at tørbejdserne gennemgående giver de største zoner, medens vådbejdserne og oliebejdserne giver mindre zoner. Det er derfor nødvendigt ved denne metode at kende, hvilket afsvampningsmiddel en given prøve er afsvampet med, for at en kvalitativ bestemmelse kan foretages. Det skal bemærkes, at de enkelte afsvampningsmidlers rækkefølge med hensyn til zonediameterens størrelse ikke bestemmes alene af deres procentiske indhold af Hg, men også af andre egenskaber ved midlerne.

Det testede korns vandindhold har stor betydning for hæmningszonens diameter, idet denne aftager med stigende vandindhold. Man må derfor sikre sig, at kontrolprøven altid har samme procentiske vandindhold som det korn, der skal testes.

Korn opbevaret en periode efter afsvampningens gennemførelse giver mindre hæmningszoner end nyafsvampet korn. Årsagen hertil skal især søges i, at en del af kviksølvet fordampes, og en del diffunderer ind i kernerne. Dette forhold gør det vanskeligt ved hjælp af denne metode at foretage en kvantitativ bedømmelse af afsvampningsmidlet på kernerne med en rimelig sikkerhed.

Formålet med undersøgelserne var først og fremmest at undersøge den biologiske metodes egnethed til at afgøre, om en kornprøve er afsvampet, idet det ved sundheds- og spiringsundersøgelser af frø ofte er nødvendigt at have kendskab hertil. Stort set er metoden tilfredsstillende til dette formål.

Testmetoden er særlig velegnet ved testning af nyafsvampet korn med kendt vandindhold og kendt afsvampningsmiddel. Den vil derfor også være velegnet til at teste bejdsapparaters effektivitet, hvor testen kan foretages straks efter bejdsningen, og resultaterne kan sammenlignes med en kontrolprøve af samme materiale.

Hvis der ved afsvampningen ikke har været benyttet helt minimale mængder af fungicidet, vil man ved hjælp af metoden med ret stor sikkerhed kunne afgøre, om en prøve har været afsvampet eller ikke, selv om prøven har været opbevaret gennem nogle måneder efter afsvampningens gennemførelse.

Prøver af foderkorn med iblanding af afsvampet korn vil også kunne findes med ret stor sikkerhed. Meget små iblandinger vil dog vanskeligt kunne påvises, med mindre man bruger væsentlig større arbejdsprøver end her anvendt. Men herved bliver metoden meget arbejdskrævende.

Derimod er metoden ikke særlig velegnet til en kvantitativ bestemmelse af de fungicidmængder, der er anvendt til såsæd i almindelighed, selv om bejds tidspunkt, fungicidets navn

og kornets vandindhold kendes. Der er for mange forhold, der har indflydelse på zonediameterens størrelse til at en rimelig sikker kvantitativ bestemmelse kan foretages, især hvis der er relativ små eller relativ store mængder fungicid på kernerne. Ved undersøgelse af et stort antal prøver vil man dog uden tvivl kunne finde frem til bejdsanlæg, som ikke bruger de mængder af afsvampningsmidlerne, der skal bruges, og som ikke fordeler dem ensartet på såsæden. Yderligere undersøgelser, især over hvad der sker ved fungiciderne på korn opbevaret under forskellige forhold, er nødvendige, før metoden kan anvendes til en kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn opbevaret efter behandlingen.

### Sammendrag

En biologisk metode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn blev afprøvet. Metoden består i at måle den hæmningszone, der dannes på en agarplade omkring afsvampede kerner, når *Corynebacterium rathay* anvendes som testorganisme.

En række forhold over indflydelse på hæmningszonens diameter, hvilket nødvendiggør, at der altid som kontrol benyttes en prøve, der umiddelbart i forvejen er afsvampet med en kendt mængde af det samme fungicid som den testede prøve.

De forskellige fungicider danner uens zonestørrelse, hvilket tilsyneladende ikke alene skyldes deres forskellige procentiske indhold af kviksølv. Det testede korns vandindhold har stor indflydelse på zonediameterens størrelse, og sædekorn opbevaret efter afsvampningens gennemførelse giver mindre hæmningszoner end nyafsvampet korn.

Overførsel af fungicider fra kerne til kerne ved omrystning er ringe, således at en forsendelse af en uensartet afsvampet prøve næppe ændrer væsentlig på fungicidets fordeling i prøven.

44 prøver af udsædspartier af vinterhvede blev testet ved hjælp af metoden. Zonediameteren i procent af kontrolprøven varierende mellem 0 og 102. 16 af prøverne lå med en re-



lativ zonediameter mellem 41 og 60, medens ialt 34 lå mellem 21 og 80.

Der konkluderes, at metoden er velegnet til afprøvning af nyafsvampet sædekorn, f.eks. i forbindelse med afprøvning af bejdseapparaters effektivitet, samt til kvalitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn. Den er også velegnet af afsløring af iblandinger af afsvampet korn i brødkorn forudsat, at iblandingerne ikke er meget små, idet den nødvendige prøvestørrelse da vil gøre afprøvningen meget arbejdskrævende. Metoden er derimod mindre velegnet til en kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn, som har været opbevaret i nogen tid efter behandlingen.

Forfatteren ønsker at bringe en tak til professor *N. Fabritius Buchwald*, Plantepatologisk laboratorium, Den kgl. veterinær- og landbohøjskole for modtagelse af en kultur af *Corynebacterium rathay* (E. F. Smith) Dowson og til lic. agro *G. Kovacs* samme sted for værdifuld hjælp ved arbejdets påbegyndelse. Endvidere bringes en tak til agronomerne *H. Elbæk Petersen*, A/S Agro-Kemi og *E. Nøddegaard*, Statens plantepatologiske forsøg for hjælp ved fremskaffelse af bejdsemidler. De kemiske analyser for kviksølv blev udført af Kemikaliekontrollen.

## Litteratur

- Halfon-Meiri, A. and Dishon, L.*: A biological method for testing the efficiency of peanut seed treatments. Pl. Disease Rep. 48: 853-854. 1964.
- Heatley, N. G.*: A method for the assay of Penicillin. Biochem. J. 38: 61-65. 1944.
- Kovacs, G.*: Biologiske metoders anvendelse til påvisning af fungiciders tilstedeværelse og bestemmelse af deres kvantitative forhold på sædekorn. Ugeskr. Landmænd nr. 38. 1963.
- Machacek, J. E.*: An agar-sheet method of testing the efficiency of seed treating machines. Can. Journ. Res. Sect. C. 28: 739-744. 1950.
- Mead, H. W.*: A biological method of detecting the presence of fungicides on seeds. Sci. Agric. 25: 458-460. 1945.
- Stapel, Chr., Skou, J. P. og Martins, O. A.*: Undersøgelser over den erhvervsmæssige afsvampning. Tidsskr. Planteavl 65: 64-113, 1961.

## Summary

*Title of paper: Experiments with a biological assay method for qualitative and quantitative determination of fungicides on seeds of cereals*

The purpose of this work was to elucidate the possibilities of using a bioassay for qualitative and quantitative determination of fungicides on seeds of cereals when *Corynebacterium rathay* (E. F. Smith) Dowson was used as test organism. This organism was earlier found to be susceptible to mercurial fungicides (Kowacs, 1963).

The test organism was stored at 5°C in meat peptone agar. 24 hours before each test the organism was transferred to meat peptone and incubated at room temperature. The test was carried out in plastic Petri dishes measuring 14 cm in diameter. For each dish were prepared 15 ml 48°C warm meat peptone agar to which were added two drops of a 24 hour old culture of the test organism. When the bacteria had been added to all test tubes with the 15 ml meat peptone agar, the tubes were shaken, and the agar was poured into the dishes.

For the experiments were used seeds of barley treated with Tillantin 1875 or Panogen or – in certain cases – with other fungicides of the same types. In each dish were placed 10 seeds on the ventral side with the one end pointing to the center of the dish. Usually 100 seeds were used for each experimental unit.

The inhibition zone was measured 24 hours after the seeds had been placed on the agar. Usually only the diameter parallel to the axis of the seed was measured.

It was found that increasing thickness of the agar layer, increasing concentration of agar in the medium and increasing concentration of bacteria in the medium decrease the size of the inhibition zone.

All the fungicides gave inhibition zones the size of which varied much from fungicide to fungicide. In all cases there was a significant difference in the size of the inhibition zones between seeds treated with half the recommended dose and those treated with the recommended dose.

The water content of the seeds tested had a pronounced influence on the size of the inhibition zone which was decreased by increasing water content.

Seeds stored for up to six months after fungicidal treatment produced smaller zones than did newly treated seeds apparently partly due to evaporation

of the active compound of the fungicide, and partly to diffusion of the compound into the seeds.

A mixture of untreated seeds and seeds treated with the recommended dose of Tillantin 1875 in the proportion 1:1 was rotated slowly up to 1600 times. Samples of 100 seeds were taken after 40, 80, 200, 400, 800 and 1600 rotations and were tested for the distribution of the fungicide on the seeds. Even after the 1600 rotations the mixed sample had a significant larger variance of the zone diameter than an evenly treated sample.

44 samples from commercial seed lots of winter wheat were tested by the method using samples of wheat treated with the fungicides in the laboratory as control. The average zone diameters of the collected samples varied from 0 til about 100 per cent of the zone diameter of the respective control samples. Most of the samples had zone diameters

of 20 to 80 per cent of the control samples. The main reason for the small zones is probably that the test was carried out several months after the commercial seed lots had been treated.

It is concluded that the bioassay method used in these experiments is suitable for qualitative and quantitative determination of fungicides on newly treated samples when the mark of fungicide used and the water content of the seeds are known. Also it is a good qualitative method for determining the presence of fungicides in commercial seed lots and for determining the uniformity of the distribution of fungicides within a seed lot. However, until more work has been done on the effect of storage and of variations in water content of seed, the method cannot be considered suitable for quantitative measures of fungicides on seeds stored after treatment.