

# Den biologiske metodes anvendelse til påvisning af fungicider på sædekorn

Nyere erfaringer

Af Georg Kovács

Meddelelse nr. 82 fra Plantepatologisk Afdeling, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

## A. Indledning

En enkelt og alligevel følsom metode til påvisning af fungicider på sædekorn og andre frø kan tjene forskellige formål:

1. For jordbrugeren er det vigtigst at kunne kontrollere, om bejdsningsanstalterne eller frøfirmaerne har behandlet sædefrøet eller ikke. Hvis ja: om det har fundet sted i den foreskrevne dosis, og om afsvampningsmidlet er jævnt fordelt, d.v.s. de enkelte frø har fået deres rigtige doser.

2. For afsvampningsanstalterne kan en sådan metode tjene dels til selvkontrol, dels, når det drejer sig om anskaffelse af nye bejdsapparater, til bedømmelse af disses arbejds-kvalitet.

3. Levnedsmiddelindustrien, især mølleindustrien, foderstoffabrikkerne og bryggerierne, kan anvende metoden til at undgå forarbejdelse af giftbehandlede korn.

4. I retsmedicinen kan en virkelig følsom kontrolmetode have en vis betydning.

5. Til sidst, men ikke mindst bør plantepatologiske institutioner og frøkontrollinstitutioner tage sådan en metode i anvendelse, især da de skal vurdere de af frøfirmaer indsendte frøpartiers sundhedstilstand. Her må man vente reelle resultater alene fra det frø, der ikke er behandlet med noget kemisk middel.

En sådan til praktisk formål anvendelig metode har nærværende forfatter udarbejdet for nogle år siden (Kovács 1963), og denne metode undersøgtes senere af Johannes Jørgensen (1966) med forskelligt behandlet og opbevaret sædekorn. Hans mangfoldige og meget præcist udførte undersøgelser er et værdifuldt bidrag til metodens anvendelighed.

I det følgende fremsættes mine nyere erfa-

ringer, der foruden at supplere de i Johannes Jørgensen's afhandling fremsatte konklusioner, også diskuterer de få punkter, hvor vore slutninger ikke helt stemmer overens.

Angående de forskere, der omtales i afhandlingens indledning, er det vist ikke uvæsentligt at påpege, at Heatley (1944) ikke har beskæftiget sig »med påvisning af svampedræbende midler på frø«. Heatley's store fortjeneste er den, at han videnskabeligt analyserede det for længst kendte agardiffusionsfænomen – beskrevet af Garré (1887) –, og han gjorde det herved muligt at standardisere og tage i medicinsk anvendelse det under krigen renfremstillede penicillin.

## B. En praktisk bemærkning vedrørende materiale og metoder

Der kan nu fås i handelen helt fladbundede plastik-petriskåle. Ved anvendelse af disse kan man bedre udnytte agaroverfladen; det er altså ikke nødvendigt at lægge de enkelte kerner i en enkelt kreds. I stedet for 10 frø kan man placere 14-16, og disse behøver ikke pege mod centrum. Herved er det muligt at lade skålene stå fast, mens kernerne lægges, og disse kan lægges parallelt med hinanden. Aflæsning af resultater, d.v.s. måling af hæmningszonedia-meterne, bliver herved mere enkelt.

## C. Faktorer, der influerer på hæmningszonernes størrelse

### 1. Agarkoncentrationen

Johannes Jørgensen afprøvede forskellige agarkoncentrationer, og – som det kunne ventes – øgedes hæmningszonerne med aftagende agarkoncentration. Årsagen til dette fænomen kan forklares på følgende måde:

Det fungicide stof diffunderer hurtigst i et substrat med mindre tørstofindhold; endvidere synker kernerne dybere ned i et blødt substrat. Her spiller de enkelte kernerets vægt, vægtfylde og form naturligvis også en rolle, og det fundne resultat genspejler eventuelt snarere forskellene i denne henseende end forskellene i stoffordelingen. Anvendelse af for hårdt agarsubstrat kan resultere i en for lille berøringsoverflade, og dette sammen med en langsommere diffusion medfører, at en eventuel ujævn bejdning ikke i tilstrækkelig grad kommer til udtryk. Er den smeltede agar særlig tyktflydende, størkner den for hurtigt, og man risikerer, at substratet bliver ujævnt. Derfor må det anbefales at anvende 1,5% agar, der i øvrigt bruges ved fremstillingen af de fleste substrater. Vil man undgå, at hæmningszonerne flyder sammen, er det bedst at vælge afstanden mellem kernerne efter behov.

## 2. Bakteriekoncentrationen

Den iagttagelse, at bakteriekoncentrationen har en del indflydelse på zonediametere, er rigtig, men afvigelsen ytrer sig først ved meget lave og meget høje bakteriekoncentrationer. Om man fra en væsekultur tager 2 eller 4 dråber (eller f.eks. 100.000 eller 200.000 bakterieceller) til 15 ml agarsubstrat pr. petriskål, spiller ingen rolle. Kimtælling og – på basis af denne – en regulering af bakteriekoncentrationen er ikke tilstrækkelig hensigtsmæssig, fordi denne ikke giver oplysning om de levende og de døde cellers antal (undtagen ved fluorescensmikroskopi). Derfor kan man være fuldstændig enig med *Johannes Jørgensen's* tilføjelse: »Men i almindelighed vil det være tilstrækkeligt at benytte en standardiseret fremgangsmåde ved fremstillingen af bakteriesuspensionen«. Dette vil jeg kun bekræfte med det bevis, at man ved standardisering og dosering af antibiotika – hvor nøjagtighed er en selvfølge – altid anvender en 1 døgn gammel kultur uden kimtælling.

## 3. Forsøgstidens længde

Jeg har ikke konstateret, at hæmningszonerne

blev mindre efter 2-3 dages forløb, hvorfor den af *Johannes Jørgensen* beskrevne iagttagelse, at zonediametere aftog efter 48 timers forløb, må have sin årsag i to ting. Den ene er, at stamkulturen muligvis er blevet forurennet, og at den fremmede bakterieart har formeret sig, en art, der voksede langsommere, men var mindre følsom over for det undersøgte præparat end stamkulturen. Derfor viste der sig bakterievækst inden for den først opståede hæmningszone. Den anden mulighed er, at der er opstået mutanter, som har formeret sig. Derfor er det rigtigst at forny stamkulturen ved en spredning efter hver 4.-5. passage. Opbevaring i form af frysetørret stof er også praktisk. Men det simpleste er at aflæse resultaterne allerede efter 1 døgn forløb.

## D. Metodens nøjagtighed

De forskellige bejdsemidlers sammenligning i *Johannes Jørgensen's* undersøgelse vidner både om et meget omhyggeligt arbejde og metodens fine følsomhed. Middelfejlen på hæmningszonerens diameter varierer mellem 0,22 og 0,56 mm. Man kan ikke forvente mere nøjagtige resultater af en biologisk metode. Det må nemlig tages i betragtning, at en direkte måling af zonediametere ikke giver større mulighed end 1 mm nøjagtighed (men en større nøjagtighed er heller ikke nødvendig). Man kan opnå lidt finere værdier – 0,5 mm nøjagtighed – ved hjælp af et mikrofilmaflæsningsapparat (jeg så et sådant i anvendelse ved Pasteur Institutets antibiotika-afdeling i Paris), og det pågældende apparat betyder navnlig en lettelse i arbejdets udførelse.

»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 zonediametrene« skriver *Johannes Jørgensen*. Jeg mener at kunne forklare fænomenets vigtigste årsag – per analogiam – med erfaringer fra antibiotikaforskningen. Det er for det første af betydning, hvilken slags Hg-forbindelse der er tale om, da de enkelte stoffers diffusionshastighed er omvendt proportional

med deres molekylestørrelse. Endvidere må præparaternes fysiske beskaffenhed spille en rolle: jo mindre partiklerne, der udgør den aktive bestanddel, er, jo større er diffusionshastigheden, og jo større bliver hæmningszonen, idet et bakteriostatisk kvantum vil gøre sig gældende på et større område, inden bakterierne forering bliver synlig.

Både i *Johannes Jørgensen's* og i nærværende forfatters forsøg blev der anvendt de såkaldte normale doser, d.v.s. doser, der anbefales i præparaternes varedeklaration. Disse normale doser er ikke reguleret efter en i hvert tilfælde gyldig veldefineret biologisk ækvivalens, og dette faktum er i sig selv tilstrækkelig årsag til, at man ikke kan forvente lige store hæmningszoner ved samtidig undersøgelse af forskellige præparater.

En vigtig konklusion er – og *Johannes Jørgensen's* undersøgelser bekræfter det –, at metoden er velegnet til at kontrollere tørbejdsernes forhold på frø, men i mindre grad fugtbejdser og »oliebejdser« som Panogen.

#### **E. Den biologiske metodes anvendelighed til påvisning af fungicider på sædekorn opbevaret flere måneder efter afsvampningen**

Vedrørende testmetodens anvendelighed over for sædekorn opbevaret flere måneder efter afsvampningen stiller *Johannes Jørgensen* meget høje krav. Til undersøgelsen anvendte han byggprøver på 50 g, der blev afsvampet og opbevaret i papirposer anbragt i papæsker, som kun var dækket af et stykke gaze for at tillade eventuel fordampning af afsvampningsmidlerne. I praksis opbevares sædekorn imidlertid i sække, og kernerne har derfor egentlig ikke nogen »fri« overflade, hvorfor fordampningsmuligheden er langt mindre. At *Johannes Jørgensen* konstaterer en betydelig mindre mængde kviksølv efter flere måneders forløb, skyldes først og fremmest en kraftig fordampning af kviksølvet. Da denne er mest intensiv i begyndelsen, finder man ikke hele mængden af Hg, selv om man påbegynder forsøget kort tid efter bejdningen.

Den kendsgerning, at kviksølv fordamper hurtigt, m.a.o. at hæmningszonerne bliver mindre omkring de for længere tid siden bejdsede kerner, viser ikke metodens svaghed, men tværtimod dens pålidelighed. Man må dog ikke se bort fra den mulighed, at en del af bejdsningsmidlet under opbevaringen kan diffundere så dybt, at det ikke når tilbage til overfladen og herfra ud i agarsubstratet. Den dybt diffunderede del går dog ikke nødvendigvis tabt, set fra sygdomsbekæmpelsens standpunkt. Det kan forholdsvis let kontrolleres, om det alene drejer sig om fordampning eller tillige om en dybere diffusion ind i kernerne. Fremgangsmåden er følgende:

Udgangsmaterialet er et for flere måneder siden afsvampet frøparti og et frisk behandlet, i øvrig stammende fra det samme frøparti, behandlet med samme middel etc. For en kvantitativ bestemmelses skyld er det hensigtsmæssigt at behandle frøet med normal dosis, men samtidig at sørge for parallelle forsøgsled, f.eks. forsøgsled behandlet med 20, 40, 60 og 80% af normal dosis. Disse bliver hver for sig malet meget fint i en elektrisk kaffemølle (maletiden ens!). De malede prøver blandes derefter med vand i forholdet 1:3. Der afpipetteres lige store mængder, simpelt hen dråber, af denne tynde, grødagtige masse, og disse dråber anvendes til den kendte agardiffusionsmetodik, bedst cylindermetoden. Porcelæns-, glas- eller metalcylindre placeres på overfladen af den bakterieinokulerede agar og cylindrene fyldes derpå med »grøden«: 2 dråber i hver cylinder. Den såkaldte brøndmetode, hvor der udstanses runde skiver fra det inokulerede agarsubstrat, og hvor de således frembragte huller fyldes med undersøgelsesmaterialet, kan ikke anbefales. Man måtte i så tilfælde anvende mindst 3 mm tykt agarlag, og herved blev hæmningszonerne betydeligt mindre end ved den sædvanlige metode. Anvendelse af den tredje form af diffusionsmetoder, hvor man bruger filterpapirskiver, vædet med undersøgelsesmaterialet, egner sig heller ikke. Den er ved disse undersøgelser både besværlig og upålidelig; »grøden« skal filtreres, og da flertallet af bejdsmidlerne ikke opløses

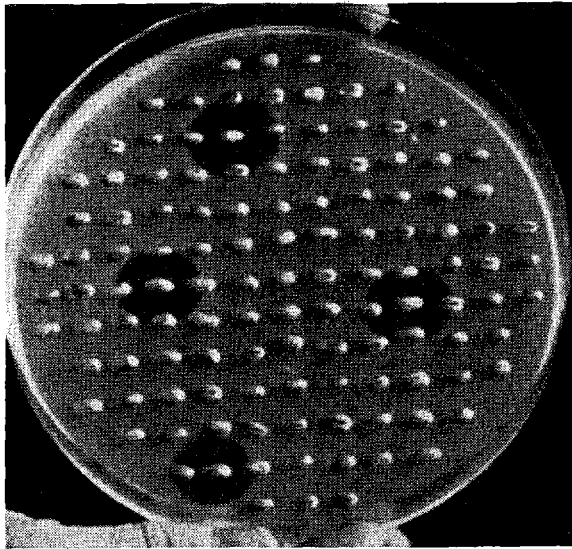


Fig. 1. Hæmningszonerne afslører iblanding af 4 kviksølvbejdsede kerner blandt den ubehandlede hvede.  $\frac{1}{2}$  nat. st.

fuldstændigt, men kun danner en suspension, er der stor risiko for, at filtreringen vil forfalske resultatet.

Anvendes den anbefalede cylindermetode parallelt med de samme forsøgsled med hele kerner vil man få et talmæssigt udtryk for, om der under opbevaringen alene har været tale om fordampning af kviksølv eller tillige om en diffusion af kviksølv fra kernernes overflade til kernernes indre.

#### F. Den biologiske metodes pålidelighed

I løbet af nærværende forfatters undersøgelser er der afprøvet så mange frøpartier i forskellige kombinationer, at de inddragne kerner antal ligger mellem 8- og 10.000. Det vigtigste resultat kan sammenfattes som følger:

Til afgørelse af spørgsmålet om, hvorvidt et frøparti er eller ikke er behandlet med et fungicid, er metoden fuldstændig sikker. Det samme gælder, når det drejer sig om iblanding af afsvampede partier i brød- eller foderkorn. Ganske vist er man i så tilfælde nødt til at bruge væsentligt større prøver til påvisning af eventuelle små iblandinger, men man kan til

at begynde med nøjes med en kvalitativ undersøgelse. Der kan placeres helt op til 120 kerner pr. petriskål (14 cm i diam.), og kernerne behøver endda ikke at lægges så omhyggeligt som ellers (fig. 1). Metoden udført på denne måde er ikke arbejdskrævende. Konstaterer man blot én hæmningszone omkring en kerne blandt de undersøgte frøpartier, så behøver man kun at fortsætte de videre, kvantitative undersøgelser af disse.

#### Litteratur

- Garré, C.: La diffusion dans des milieux des cultures gélifiées. – Korrespondenzbl. Schweiz. Aerzte 17: 385. 1887.
- Heatley, N. G.: A Method for the Assay of Penicillin. – Biochem. J. 38: 61-65. 1944.
- Jørgensen, Johannes: Forsøg med en biologisk metode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af fungicider på sædekorn. – Tidsskr. Planteavl 70: 244-253. 1966.
- Kovács, Georg: Biologiske metoders anvendelse til påvisning af fungiciders tilstedeværelse og bestemmelse af deres kvantitative forhold på sædefrø. – Ugeskr. Landm. 108: 598-602. 1963.