

# Om rodknoldbakteriernes forhold overfor visse ukrudtsmidler

Ved *H. L. Jensen*

## 858. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning indeholder resultater af undersøgelser over ukrudtsmidlers indflydelse på væksten af lucerne-, kløver- og ærtegruppens rodknoldbakterier i renkultur samt iagttagelser over nogle af midlernes virkning på bestanden af lucerne- og kløverbakterier i jord opbevaret under laboratoriebetlinger. Undersøgelserne er udført ved Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdeling (Lyngby) under ledelse af forstander, dr. agro. *H. L. Jensen*, der har udarbejdet beretningen, medens det experimentelle arbejde skyldes laboratorieassistenterne, fru *Minna Schrøder* og frk. *Anna-Lise Hansen*.

*Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur*

### Indledning

I det komplicerede spørgsmål om forholdet mellem kemiske bekæmpelsesmidler og jordbundens mikroorganismer indgår bl.a. disse tildels stærkt giftige forbindelsers mulige skadevirkning overfor bælgeplanternes rodknoldbakterier, både de der forekommer som naturlig bestanddel af mikrofloraen og de der tilføres som podemidler («nitragin») specielt til lucerne. For pødekulturerne anvendelse er ikke mindst forholdet mellem bakterierne og forskellige fungicider til beskyttelse mod svampeangreb af indlysende betydning. Dette har været genstand for adskillige undersøgelser, først vistnok af *Erik J. Petersen* (1927) og i senere år ikke mindst fra polsk side (se bl.a. *Jakubziak & Golebiowska* 1963, *Golebiowska & Kaszubiak* 1965). Som helhed gælder det, at dithiocarbamat- og thiuramforbindelser er forholdsvis uskadelige for bakterierne i modsætning til de stærkt giftige kviksølvforbindelser. Her må åbenbart fordelene ved podning og afsvampning afvejes mod hinanden i valget af fungicider.

Herbiciderne forholder sig noget anderledes, idet disse ikke lokaliseres til frøene og kommer i konflikt med eventuelle pødekulturer, men kan tænkes at ramme den naturlige knoldbakteriebestand i jorden. Dette gælder først og fremmest de egentlige jordherbicider såsom Dalapon og TCA, men også rester af hormonmidler, DNOC, Dinoseb etc., og der foreligger den mulighed, at sprøj-

temidler anvendt i kornmarker med kløver-udlæg eller i ærtemarken kan translokere til rodsystemerne og påvirke rodknoldenes opståen og kvælstofbindende funktion. Et afgørende moment må her blive herbicidets relative giftighed overfor værtplanter og rodknoldbakterier.

Om de sidstes herbicidfølsomhed i renkultur foreligger der adskillige undersøgelser, dog med ret uoverensstemmende resultater. Nogle tidligere arbejder er refereret af *Jensen & Petersen* (1952), som fandt at 2,4-D og MCPA først i 10-40 mM koncentration helt undertrykte væksten af forskellige rhizobier på agarsubstrat, medens DNOC havde samme virkning allerede ved 1-10 mM. I alle tilfælde bevirkede dog lavere koncentrationer en kendelig væksthæmning. Andre forsøg (*Fletcher* 1956, *Fletcher & Alcorn* 1958) viste dog vækststandsning ved væsentlig lavere koncentration af 2,4-D, hvad der tyder på at herbicidtolerancen i høj grad afhænger af forsøgsbetingelser såvel som arts- og stammespecificitet. Ifølge *Hart & Larson* (1966) er gramnegative bakterier (og deriblandt rhizobierne) mere følsomme end grampositive, og aerobe bakterier langt mere følsomme end anaerobe. I respirationsforsøg med celleduspensioner af *Rhizobium meliloti* fandt *Johnson & Colmer* (1956) en stærkt hæmning af 18,5 mM 2,4-D på iltoptagelsen. Denne hæmningsvirkning neutraliseredes ved tilsætning af magnesiumsulfat forud for 2,4-D og beroede åbenbart på, at Mg-

ioner blev utilgængelige ved kompleksbinding til 2,4-D, altså en helt anden mekanisme end den abnorme vækststovvirkning overfor højere planter.

Det samlede system af bælgrplanter og rhizobier skades med hensyn til rodknolddannelse, kvælstofbinding og stofproduktion ved meget lavere koncentrationer af herbicider og specielt 2,4-D, end de der tillader vækst af rhizobierne i renkultur. Omend det er vanskeligt at skelne mellem de to komponenters reaktion overfor herbicidet, synes dog plantevævet at være langt det følsomste (Fletcher & Alcorn 1958, Jordan et al. 1966, Mickovski 1966). Et meget vigtigt men endnu kun lidet udforsket område er den mulighed, at rhizobierne selv kan delvis sønderdele og derved inaktivere herbicidet uden egentlig at udnytte det som næringsstof. Den første iagttagelse heraf skyldtes Nilsson (1957) i forsøg med lucerneplanter i reagensglaskulturer podet med *R. meliloti*. For ganske nylig har Jordan og medarbejdere<sup>1</sup> i forsøg med MCPB mærket med <sup>14</sup>C i carboxyl-gruppen påvist, at flere rhizobier kan frigøre <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> under samtidig dannelse af 2,4-D der ikke kunne udnyttes som næringsstof; der synes at være tale om afkortning af sidekæden (ved  $\beta$ -oxidation?) uden ophævelse af giftvirkningen.

#### Herbiciders virkning overfor rhizobier i renkultur

Som fortsættelse af tidligere nærmest kvalitative forsøg (Jensen & Petersen 1952) undersøgte man nogle almindeligt anvendte ukrudtsmidlers virkning på væksten af forskellige rodknoldbakterier under såvidt muligt optimale dyrkningsvilkår. Bakterierne omfattede 7 stammer af *R. meliloti*, desuden 5 stammer af *R. trifolii* og 3 af *R. leguminosarum*, heraf to fra markært (Tylstrup og U.311) og en fra hestebønne (U.402). Stammer uden nærmere angivelse er isolerede i Lyngby, medens de med R., U. og Gr. betegnede er modtaget fra henholdsvis Rothamsted Experimental Station, Landbrugshøjskolens mikrobiologiske institut i Uppsala og Instituut voor Bodemvruchtbaarheid i Groningen, Holland. I alle tilfælde var der tale om typiske og effektive stammer.

1. Personlig meddelelse fra professor D. C. Jordan, University of Ontario, Guelph, Canada.

Dyrkningssubstratet havde følgende sammensætning: Glucose 10,0 g, asparagin 1,0 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 0,80 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g, MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 0,20 g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,05 g, FeSO<sub>4</sub>, 4 H<sub>2</sub>O 10 mg, MnSO<sub>4</sub>, 4 H<sub>2</sub>O 1,0 mg, biotin 0,10 mg, alt i 1000 ml demineraliseret vand. I nogle forsøg suppleredes biotinet med en vitaminblanding der indbefattede thiamin og pantothen-syre, begge 1,0 mg/1000 ml, da andre forsøg (Jensen & Schrøder 1967) havde vist, at visse rhizobier, bl.a. ærte-stammen U. 311, krævede de nævnte vitaminer for optimal vækst, men moderate koncentrationer af trichloracetat, dichlorpropionat og nogle analoge chlorforbindelser forbedrede væksten i pantothen-syrefrit substrat, idet de syntes at virke som erstatning for pantothen-syrens aktive gruppe,  $\beta$ -alanin.

Grundsubstratet incl. biotin steriliseredes ved autoklaving, og hertil sattes glucose, vitaminblanding og herbicider i form af steril-filtrerede stamopløsninger. Af herbiciderne anvendtes 2,4-dichlor-phenoxyeddikesyre (2,4-D), dinitro-orthocresol (DNOC), trichloreddikesyre (TCA) og 2,2-dichlorpropionsyre (det aktive stof i Dalapon), alle som natriumsalte af de rene syrer. I foreliggende form anvendtes de ikke-ioniserede stoffer maleinhydrazid og pyrazon (det aktive stof i Pyramin (Fischer 1964)).

Substratet dispenseredes i mængder på 50 ml i 300-ml koniske kolber (in duplo) der podedes med een dråbe cellesuspension fra 2-døgns kulturer på almindelig nitragin-agar og adjusteret til samme optiske tæthed i samtlige forsøg. Kulturerne dyrkedes under kontinuerlig rystning ved 25-27°C, og til forskellig tid (indtil 5 dage) målttes vækstgraden som optisk tæthed (O.D.) ved en bølgelængde på 600 m $\mu$ , med sterilt substrat som blindværdi. I det mere eller mindre stærkt gule DNOC-substrat indtrådte der ofte farveforandringer fra gult til rødbrunt som omtalt senere. For at kompensere for mulige fejl hidrørende herfra udførtes målingen på cellemateriale der var vasket frit for farvestof ved centrifugering og re-suspenderet i rent vand svarende til prøvens oprindelige rumfang.

Overfor 2,4-D (tabel 1) falder de 7 stammer af *R. meliloti* i to ret tydelige grupper. I den første har 0,1 mM 2,4-D næppe nogen sikker virkning, og 1,0 mM bevirker en tydelig men relativt svag

nedgang i vækst; 10 mM har en stærk tidlig hæmning, som dog er på vej til at udlignes i de følgende to dage. De to noget svagere voksende stammer i Gruppen II hæmmes meget stærkt af den højeste koncentration af 2,4-D men næppe af de lavere. Noget lignende gælder for de 5 *R. trifolii*-stammer, dog i mere udpræget grad: den ene stamme undertrykkes helt af 1,0 mM 2,4-D, og de andre hæmmes i nogen grad, selv ved den laveste koncentration.

Tabel 1. Hæmningsvirkning af 2,4-dichlorphenoxyeddisyre (2,4-D, Na-salt) på vækst af *R. meliloti* og *R. trifolii*

Bakterieart og stamme	Vækst dage	O.D. i substrat med 2,4-D				
		mM p.p.m.	0	0,10	1,0	10,0
			0	23	223	2230
<i>R. meliloti</i>	2	0,92	0,91	0,81	0,16	
Gruppe I	3	1,12	1,28	1,18	0,66	
(5 stk.) <sup>1</sup>	4	1,41	1,32	1,06	0,83	
<i>R. meliloti</i>	2	0,75	0,67	0,62	0,05	
Gruppe II	3	0,97	0,84	0,74	0,09	
(2 stk.) <sup>2</sup>	4	0,94	0,82	0,74	0,11	
<i>R. trifolii</i>	3	0,85	0,25	0	0	
Agdell (R)	4	1,13	1,21	0	0	
<i>R. trifolii</i>	3	0,36	—	0,66	0	
CC. 229 (R)	4	1,27	0,78	0,80	0	
<i>R. trifolii</i>	2	1,19	1,17	0,61	0	
Borris a	3	1,40	1,15	0,93	0	
<i>R. trifolii</i>	2	1,16	1,19	0,75	0,01	
Ødum a	3	1,41	1,10	1,11	0,05	

1. Gennemsnit af stammerne L.5, L.40, L.42, HS.8, Tr. 1.

2. Gennemsnit af stammerne L.3a (Uppsala) og St. 105.

DNOC har betydelig større væksthæmmende virkning (tabel 2). *R. meliloti* viser stærkt nedsat vækst med 1,0 mM DNOC efter 2 dage, hvorefter hæmningen gradvis overvindes, og det samme er i mere udpræget grad tilfældet ved den dobbelte DNOC-koncentration (2,0 mM). Af de to prøvede *R. trifolii*-stammer er den ene (Agdell) meget følsom og undertrykkes helt af 0,1 mM

DNOC, medens den anden er nærmest mere modstandsdygtig end lucerne-stammerne. Alle tre stammer af *R. leguminosarum* hæmmes svagt ved 0,10 og tildels endda ved 0,01 mM DNOC, medens stigende hæmning ses ved 1,0 mM og næsten fuldstændig undertrykkelse af væksten ved 2,0 mM DNOC. Den påfaldende vækstforøgelse efter 3 til 5 dages vækst står muligvis i forbindelse med omdannelse til en mindre giftig modifikation af DNOC-molekylet, der giver sig til kende ved ændring af den rent gule DNOC-farve til brunlig, som ovenfor bemærket. Den opståede forbindelse er endnu ikke identificeret; muligvis er der tale om reduktion af den ene NO<sub>2</sub>-gruppe til en NH<sub>2</sub>-gruppe. Fig. 1 viser et eksempel.

Tabel 2. Hæmningsvirkning af dinitro-ortho-cresol (DNOC, som Na-salt) på vækst af *R. meliloti*, *R. trifolii* og *R. leguminosarum*

Bakterie- art og stamme	Vækst dage	O.D. i substrat med DNOC					
		mM p.p.m.	0	0,01	0,10	1,0	2,0
			0	2,2	22	220	440
<i>R. meliloti</i>	2	0,77	0,80	0,54	0,08	0,02	
gns. af 5	3	0,89	0,94	0,96	0,64	0,19	
stammer <sup>1</sup>	4	0,97	0,99	0,92	0,76	0,31 <sup>2</sup>	
<i>R. trifolii</i>	2	0,61	0,52	0,01	0	0	
Agdell (R)	3	0,72	0,70	0,01	0	0	
	4	—	—	0,01	0	0	
<i>R. trifolii</i>	2	0,18	0,02	0	0	0	
K. 8 (Gr)	4	0,93	0,84	0,92	0,91	0,79	
	5	0,91	0,86	1,04	0,97	0,79	
<i>R. legumin.</i>	2	0,19	0,14	0,19	0,03	0	
402 (U)	3	0,80	0,54	0,65	0,56	0	
	4	0,83	0,75	0,41	0,50	0	
<i>R. legumin.</i>	2	0,81	0,27	0,47	0,13	0,01	
311 (U)	3	0,87	0,76	0,45	0,17	—	
	4	0,90	0,69	0,41	0,16	0,02	
<i>R. legumin.</i>	2	0,82	0,72	0,22	0,08	0,01	
<i>Tylstrup</i>	3	0,87	0,78	0,59	0,05	0,05	
	4	0,86	0,71	0,77	0,73	0,09	

1. L.5, L. 40, L.42, L.94, HS.8.

2. L.94 og HS.8 stærkest vækst (O.D. henholdsvis 0,42 og 0,50).

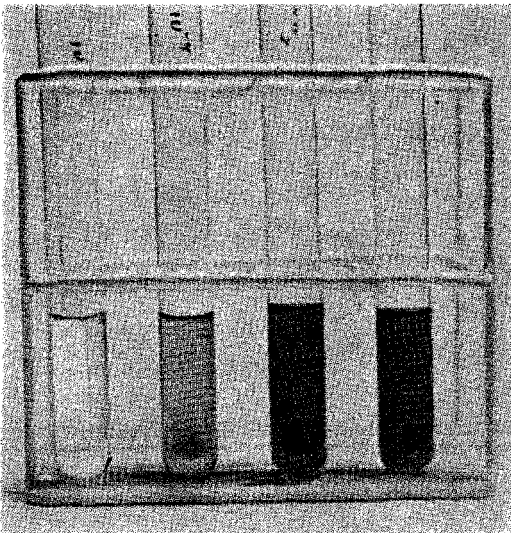
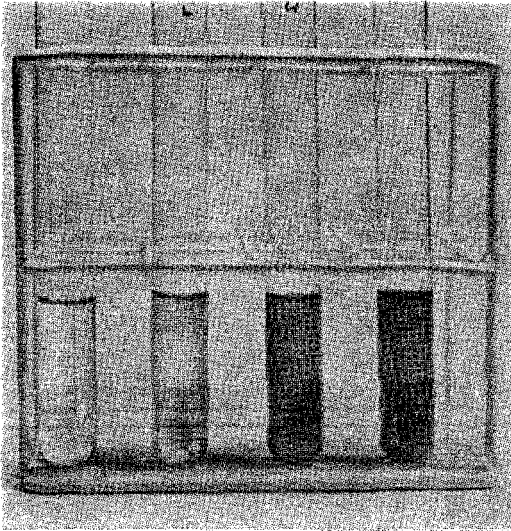


Fig. 1. Substrat med DNOC: 0,01 - 0,10 - 1,0 - 2,0 mM.  
 Øverste række: Upodet substrat.  
 Nederste række: Podet med *R. trifolii* K.8, 5  
 dages vækst.

I modsætning til DNOC er trichloracetat på-faldende uskadeligt, som det fremgår af tabel 3. Overfor *R. meliloti* er virkningen af 1,0 mM TCA næppe kendelig, 10 mM forårsager kun en moderat eller slet ingen væksthæmning, og 20 mM kun en lidt stærkere for de to stammers vedkommen-

de. *R. trifolii* og *R. leguminosarum* er noget mere følsomme men vokser endnu ret godt med 10 mM TCA, og først den dobbelte koncentration undertrykker næsten al vækst af ærtestammen 311 (U). Dette var forøvrigt en af de stammer, hvor den væksthæmmende virkning af trichloracetat, dichlorpropionat og især  $\beta$ -monochlorpropionat var mest kendelig i substrat uden pantothen-syre eller  $\beta$ -alanin, hvortil  $\beta$ -monochlorpropionat er en struktur analog (Jensen & Schrøder 1967).

Tabel 3. Hæmningsvirkning af trichloracetat på vækst af *R. meliloti*, *R. trifolii* og *R. leguminosarum*

Bakterieart og stamme	O.D. i substrat m. trichloracetat Vækst- dage	mM			
		0 p.p.m.	1,0 185	10,0 1850	20,0 3700
<i>R. meliloti</i>	2	1,13	1,18	0,99	0,94
L. 40	3	1,52	1,41	1,19	1,04
<i>R. meliloti</i>	2	0,96	0,90	0,80	0,73
HS. 8	3	1,41	1,22	1,08	1,02
<i>R. meliloti</i>	2	0,84	0,94	0,87	0,35
Tr. 1	3	0,99	1,04	1,05	0,78
<i>R. trifolii</i>	3	1,47	1,37	0,43	
Borris a	4	1,48	1,35	0,68	
<i>R. leguminos.</i>	3	1,47	1,37	0,55	
402 (Uppsala)	4	1,40	1,26	0,87	
<i>R. leguminos.</i>	2	1,05	0,96	0,09	0,01
311 (Uppsala) <sup>1</sup>	3	1,25	1,29	0,38	0,06

1. Substrat suppleret med thiamin og pantothen-syre (cf. Jensen & Schrøder 1967).

Dichlorpropionat (tabel 4) forholder sig i alt væsentligt som trichloracetat, dog med en noget stærkere hæmningsvirkning ved 10 og 20 mM koncentration, hvilket igen er mest kendeligt i stammen 311 (U).

I tabel 5 ses resultaterne af et forsøg med maeleinhydrazid, der ikke før synes at have været prøvet overfor rhizobier. På grund af dets relativt ringe opløselighed lod det sig ikke gøre at prøve koncentrationer over 10 mM, som dog undertrykte næsten al vækst af to lucerne- og en kløver-

bakteriestamme og hæmmede alle tre stærkt ved den halve koncentration (5 mM). Den anden *R. trifolii*-stamme påvirkedes meget lidt af 5 mM maleinhydrazid og tilsyneladende kun forbigående af 10 mM, et typisk eksempel på stammespecificitet, sml. DNOC overfor *R. trifolii* Agdell og K. 8 (tabel 2).

Tabel 4. Hæmningsvirkning af dichlorpropionat på vækst af *R. meliloti*, *R. trifolii* og *R. leguminosarum*

Bakterieart og stamme	Vækst dage	O.D. i substrat m. dichlorpropionat				
		mM p.p.m.	0	1,0	10,0	20,0
			0	165	1650	3300
<i>R. meliloti</i>	2	0,81	0,83	0,51	0,20	
L. 40	3	0,93	0,98	0,75	0,70	
<i>R. meliloti</i>	2	0,82	0,68	0,06	0,03	
HS. 8	3	1,48	1,24	0,83	0,05	
<i>R. meliloti</i>	2	0,88	1,12	0,23	0,08	
Tr. 1	3	1,01	1,17	0,25	0,10	
<i>R. trifolii</i>	2	0,61	0,75	0,04		
Borris a	3	1,35	1,21	0,47		
<i>R. leguminos.</i>	3	1,09	1,15	0,61		
402 (Uppsala)	4	1,26	1,07	0,90		
<i>R. leguminos.</i>	2	1,04	0,78	0,05	0	
311 (Uppsala) <sup>1</sup>	3	1,26	1,01	0,22	0,02	

1. Substrat suppleret med thiamin og pantothensyre (cf. Jensen & Schrøder 1967).

Endelig har man udført nogle forsøg med rent pyrazon<sup>1</sup>, der er endnu mindre opløseligt end maleinhydrazid og kun blev prøvet i koncentrationer indtil 400 p.p.m. = 1,81 mM. Resultaterne i tabel 6 viser, at pyrazon er ret giftigt overfor *R. trifolii* og *R. leguminosarum*, idet den forholdsvis lave maksimumkoncentration næsten helt standser væksten af tre stammer, medens den halve koncentration bevirker en stærk hæmning i tidlige vækststadier. De to *R. meliloti*-stammer og *R. leguminosarum* T er mere modstandsdygtige men hæmmes dog kendeligt ved mM 0,90 og endnu mere ved 1,81 mM. De to *R. leguminosarum*-stammer afgiver igen et godt eksempel på stammespecificitet.

1. Venligst stillet til rådighed af Badilin A/S, København.

Tabel 5. Hæmningsvirkning af maleinhydrazid på vækst af *R. meliloti* og *R. trifolii*

Bakterieart og stamme	Vækst dage	O.D. i substrat m. maleinhydrazid				
		mM p.p.m.	0	2	5	10
			0	224	560	1120
<i>R. meliloti</i>	3	1,28	1,33	0,12	0,02	
L. 40	4	1,40	1,47	0,32	0,02	
	5	1,46	1,49	0,48	0	
<i>R. meliloti</i>	2	1,33	1,32	0,20	0,01	
HS. 8	3	1,43	1,50	0,49	0,01	
	4	1,49	1,49	0,70	0,01	
<i>R. trifolii</i>	2	1,25	1,05	0,08	0	
Borris a	3	1,23	1,30	0,38	0,01	
	4	1,19	1,19	0,98	0,03	
<i>R. trifolii</i>	3	1,40	1,37	1,06	0,12	
PF - 2b	4	1,39	1,30	1,26	0,50	
	5	1,30	1,30	1,10	0,89	

Tabel 6. Vækst af *R. meliloti*, *R. trifolii* og *R. leguminosarum* i substrat med pyrazon

Bakterie- art og stamme	Vækst dage	O.D. i substrat med pyrazon					
		mM p.p.m.	0	0,23	0,45	0,90	1,81
			0	50	100	200	400
<i>R. meliloti</i>	2	0,80	0,56	0,61	0,30	0,14	
L. 40	3	0,98	0,96	0,96	0,93	0,83	
	4	1,11	0,97	0,99	0,93	0,94	
<i>R. meliloti</i>	2	1,05	1,02	1,11	1,05	0,56	
HS. 8	3	1,42	1,33	1,40	1,34	1,31	
	4	1,40	1,40	1,43	1,46	1,43	
<i>R. trifolii</i>	2	0,87	0,78	0,47	0,03	0	
PF - 2b	3	0,98	0,98	0,97	0,24	0,02	
	4	1,05	1,01	1,18	0,65	0	
<i>R. trifolii</i>	2	1,30	1,30	1,05	0,07	0,01	
Ødum a	3	1,31	1,23	1,14	0,44	0,03	
	4	1,36	1,25	1,06	1,08	0,03	
<i>R. legumin.</i>	2	1,35	1,41	0,80	0,37	0,23	
T	3	1,35	1,25	1,13	0,91	0,68	
	4	1,41	1,71	1,16	0,99	0,78	
<i>R. legumin.</i>	2	0,87	0,94	0,74	0,05	0,02	
402	3	1,20	1,25	1,13	0,12	0,03	
(Uppsala)	4	1,31	1,14	0,93	0,46	0,02	

Det kan her tilføjes, at igangværende forsøg ved den bakteriologiske afdeling har vist evne hos visse ikke-identificerede bakterier til at nedbryde pyrazon, selv om der ikke i kulturer på kunstigt substrat synes at ske nogen tilbundsgående sønderdeling. Dette tyder stærkt på, at pyraminets ret langsomme inaktivering ialtfald tildels er en biologisk proces.

### Agttagelser over nogle herbiciders indflydelse på *R. Meliloti* og *R. Trifolii* i naturlig jord

Af det foregående ser man, at under gunstige betingelser skades knoldbakteriernes vækst næppe af de undersøgte herbicider i følgende koncentrationer:

Herbucid	mM	p.p.m.	Sv. t. Markdosis	
			kg/ha <sup>1</sup>	kg/ha (max.)
2,4-D.....	0,10	23	55	2,5
DNOC.....	0,01	2	5	1,5-2,5
TCA.....	1,0	185	362	20
DCP (Dalapon)	1,0	165	312	15
Maleinhydrazid.	2,0	224	560	7
Pyrazon.....	0,23	50	125	4

1. Beregnet pr. 2.500 tons jord til 20 cm dybde. Markdosis beregnet som kg virksomt stof pr. ha.

Bortset fra DNOC er disse mængder rundt regnet 10-20 gange så høje som de praktisk anvendte markdoser. Til stærk hæmning eller fuldstændig undertrykkelse af væksten kræves koncentrationer endnu en størrelsesorden højere (10-20x). Man tør dog ikke heraf slutte, at langt mindre mængder end disse vil være uskadelige for rhizobiernes eksistens i jorden, hvor de enten befinder sig i latent tilstand eller vokser under langt mindre gunstige ernæringsforhold end i laboratorieforsøgene. Til orientering herom udførtes nogle tællinger af *R. meliloti* og *R. trifolii* i jord der opbevaredes under laboratorieforhold og med tilsætning af nogle af de vigtigste herbicider i mængder væsentlig højere end anvendt i praksis. Til disse forsøg anvendtes følgende jorder:

1. Middelsvær lerjord fra lucernemark, Rt 6,9, Tystofte forsøgsstation.
2. Svær lerjord, Rt 6,8, fra Dinoseb-behandlet parcel, Ødum forsøgsstation.

3. Humusrig sandjord, Rt 6,6, fra Borris forsøgsstation.
4. Svær lerjord, Rt 6,8, fra Rønhave forsøgsstation.
5. Middelsvær lerjord, Rt 6,8, fra kløvermark, Godthåb, Skanderborg.

Lufttørret og sigtet jord blev tilsat vand til ca. 2/3 vandkapacitet og opbevaret i glasflasker med gennemborede, vatlukkede gummipropper ved 25-27°C; derefter bestemte man tætheden af lucerne- og/eller kløver-rhizobier ved podning med jordopslemning i stigende fortynding på reagensglaskultur af sterile kimplanter som beskrevet i en forudgående beretning (Jensen 1969). Tabel 7 viser en oversigt over resultaterne.

Det må bemærkes, at af forskellige grunde (bl.a. gik en del forsøg tabt på grund af uheldige vækstforhold) kunne forsøgene ikke gennemføres i så stort omfang som ønskeligt. Hertil kommer, at især i tællingerne af lucerne-rhizobierne var rodknolddannelsen ofte uregelmæssig og med talrige »spring« i fortyndingsrækken, af hvilke grunde forsøgene nærmest har karakter af demonstrationsdyrkning. Sammenligning mellem antal knoldbærende og ikke-knoldbærende planter podede med jord med og uden herbicid-tilsætning viser dog som helhed ingen tydelige tegn på aftagende knolddannelse hvor herbicider er tilsat. Kun i Tystofte-jorden med 50 p.p.m. TCA (125 kg/ha eller 4-5 gange markdosis) synes der at være sket en nedgang i tætheden af *R. meliloti* efter 9 og 106 dage (på det sidste tidspunkt må herbicidet ventes at være forlængst nedbrudt). Måske er noget lignende tilfældet med kløver-rhizobierne i Godthåb-jorden efter 46 dage med 20 p.p.m. MCPA (= 50 kg/ha eller ca. 20 gange markdosis); derimod ses ingen forskel efter 112 dage, hvor hormonmidlet ligesom TCA må ventes forsvundet for længe siden.

En vis interesse knytter sig til forsøgene med Dinoseb, der i nogle af disse forsøg prøvedes i form af natriumsalt af rent dinitrobutylphenol, der var stillet til rådighed af A/S Kemisk Værk, Køge. I forsøgene med jord fra Tystofte og Ødum viser det ingen udprægede virkninger på rhizobierne, men syntes efter de lange forsøgstider (20 og

Tabel 7. Rodknolddannelse på lucerne- og rødkløver i agar-sandkultur podede med stigende fortyndinger af jord tilsat forskellige herbicider

Jord, plante, herbicid, forsøgstid dage	Antal planter med (+) og uden (÷) knolddannelse ved fortynding (reciprok) af jordsuspensionen					
	100	1.000	5.000	10.000	50.000	—
Tystofte-jord	100	1.000	5.000	10.000	50.000	—
Lucerne, u. tils. 0 dage.....	12+	9+, 3÷	4+, 8÷	3+, 9÷	3+, 9÷	—
+DNOC 20 p.p.m. 14 dage	10+	4+, 6÷	3+, 7÷	1+, 8÷	3+, 7÷	—
+DNBP 20 p.p.m. 14 dage	9+, 1÷	10+	3+, 7÷	10÷	10÷	—
U, tils. 268 dage.....	2+, 10÷	12÷	2+, 10÷	12÷	12÷	—
+DNBP 20 p.p.m. 268 d.	7+, 3÷	12÷	1+, 11÷	12÷	12÷	—
Tystofte, kløver,	100	1.000	5.000	10.000	50.000	—
u. tils. 0 dage.....	12+	12+	12+	12+	12+	—
DNOC 20 p.p.m. 14 d.....	10+	11+	12+	11+	12+	—
DNBP 20 p.p.m. 14 d.....	12+	12+	12+	12+	12+	—
Ødum, lucerne,	10	100	1.000	10.000	50.000	100.000
u. tils. 140 dage	Sporadisk knolddannelse fra 1:100 til 1:10.000 uden					
DNBP 20 p.p.m. 140 d.	signifikant forskel mellem ± DNBP					
Ødum, kløver,	10	100	1.000	10.000	50.000	100.000
u. tils. 140 d.....	9+, 1÷	10+	10+	12+	10÷	10÷
DNBP 20 p.p.m. 140 d....	10+	10+	10+	10+	4+, 6÷	4+, 6÷
Borris, kløver,	10	100	1.000	10.000	50.000	—
u. tils. 32 dage.....	12+	12+	12+	10+	12+	—
DNOC 20 p.p.m. 32 d.....	12+	12+	12+	12+	8+, 4÷	—
Tystofte, lucerne,	10	100	1.000	10.000	100.000	200.000
u. tils. 5 dage.....	—	10+	10+	10+	4+, 6÷	3+, 7÷
2,4-D 20 p.p.m. 5 d.....	—	10+	10+	10+	8+, 2÷	6+, 4÷
u. tils. 32 d.....	—	12+	12+	10+, 2÷	2+, 10÷	12÷
2,4-D 20 p.p.m. 32 d.....	—	10+, 2÷	12+	12+	6+, 6÷	4+, 8÷
u. tils. 77 d.....	—	12+	12+	2+, 10÷	12÷	12÷
2,4-D 20 p.p.m. 77 d.....	—	12+	10+, 2÷	12÷	12÷	12÷
Tystofte, lucerne,	—	—	1.000	10.000	100.000	200.000
u. tils. 9 dage.....	—	—	10+	10+	4+, 6÷	1÷
TCA 50 p.p.m. 9 d.....	—	—	10+	10+	10÷	10÷
u. tils. 106 d.....	—	—	—	4+, 6÷	2+, 10÷	3+, 8÷
TCA 50 p.p.m. 106 d.....	—	—	2+, 6÷	3+, 6÷	7÷	—
Rønhave, lucerne,	100	1.000	10.000	50.000	100.000	200.000
u. tils. 24 dage.....	—	6+, 2÷	8+	4+, 4÷	4+, 4÷	8÷
MCPA 20 p.p.m. 24 d.....	—	6+	6+, 2÷	2+, 4÷	2+, 6÷	2+, 6÷
u. tils. 41 d.....	—	11+	11+	2+, 10÷	12÷	12÷
MCPA 20 p.p.m. 41 d....	—	12+	12+	6+, 6÷	12÷	12÷
u. tils. 77 d.....	—	10+	6+, 4÷	—	2+, 10÷	3+, 9÷
MCPA 20 p.p.m. 77 d....	—	9+, 1÷	10+, 2÷	—	1+, 9÷	2+, 8÷
Godthåb, kløver,	100	1.000	10.000	50.000	100.000	200.000
u. tils. 0 dage.....	—	12+	12+	9+, 3÷	7+, 2÷	6+, 6÷
u. tils. 46 d.....	—	—	8+	10+	6+, 4÷	6+, 8÷
2,4-D 20 p.p.m. 46 d.....	—	—	10+	6+, 8÷	12÷	14÷
u. tils. 112 d.....	—	12+	9+, 3÷	4+, 8÷	4+, 8÷	—
2,4-D 20 p.p.m. 112 d....	—	12+	11+, 1÷	10+, 2÷	5+, 5÷	—

Tabel 8. Lystransmission i ekstrakt af jorde med 20 p.p.m. dinitrobutylphenol under opbevaring

Ødum-jord		Tystofte-jord		Borris-jord <sup>1</sup>	
dage	trans. pct.	dage	trans. pct.	dage	trans. pct.
0	59-61	0	47-49	0	57-58
46	60-60	42	53-54	46	61-67
96	62-63	84	54-55	60	60-62
136	64-71	156	60-61	166	62-64
229	54-66	234	68-69	271	50-62
543	75-80	533	69-78	543	74-76

1. Kontrollforsøg med 50 p.p.m. DNOC: Transmission 95-100 pct. efter 60 dage.

38 uger) endnu at være tilstede i uomsat form (gul farve i jordekstrakt). Dinoseb synes i sammenligning med DNOC at være langt bestandigere i jordbunden (Petersen & Hammarlund 1953) og heller ikke at kunne tjene som næringsstof for mikroorganismer (Jensen & Laurup-Larsen 1967). Dets store holdbarhed fremgår også af nogle forsøg med Ødum- og Tystofte-jordee, der opbevarede i længere tid efter tællingsforsøgenes afslutning. Semikvantitative bestemmelser ved måling af lystransmissionen i jordekstrakter som tidligere beskrevet (Jensen 1966) viste først efter henved 9 måneder en kendelig nedgang i jordekstraktens farvestyrke, men langt fra nogen kvantitativ forsvinden. Til sammenligning anstilledes et forsøg med Borris-jord (uden rhizobium-tælling) + 50 p.p.m. DNOC, der forsvandt efter 60 dage, hvilket svarer til resultater af tidligere forsøg (Jensen 1966). Til sammenligning med Petersen & Hammarlund's (1953) resultater må bemærkes, at der i deres forsøg var tale om Dinoseb-mængder der mere nærmer sig til praksis men dog først forsvandt efter henved 6 måneder i alkalisk og endnu senere i sur jord.

### Oversigt

Omend der findes betydelig variation mellem forskellige arter og måske især stammer af rodknoldbakterier, er de åbenbart i stand til at tåle forholdsvis betydelige mængder af de her prøvede herbicider (2,4-D, DNOC, TCA, Dalapon, maleinhydrazid og pyrazon), idet deres vækst under gunstige kulturbetingelser først begynder at hæm-

mes ved koncentrationer, der omregnede til kg aktivt stof pr. ha ville svare til 20-50 gange den maximale markdosis (måske bortset fra den stærkest bakteriostatisk forbindelse: DNOC). Fuldstændigt undertrykkes væksten først ved en endnu 10-20 gange højere koncentration. Stærkest giftvirkning har DNOC, efterfulgt af pyrazon, det aktive stof i Pyramin. Mindst giftige er TCA, Dalapon og maleinhydrazid, medens 2,4-D synes at indtage en mellemstilling. Gennemgående synes lucerne-gruppens bakterier (*R. meliloti*) noget mere modstandsdygtige end kløver-gruppens (*R. trifolii*) og ærte-vikke-gruppens (*R. leguminosarum*).

I jord opbevaret under laboratorieforhold synes 2,4-D, MCPA, DNOC, Dinoseb og TCA ikke at have nogen kendelig indflydelse på tætheden af *R. meliloti* og *R. trifolii*, selv i mængder der overskrider den praktiske markdosis 10-20 gange. Noget skadelig virkning af de prøvede ukrudtsmidler overfor knoldbakteriefloraen under praktiske dyrkningsvilkår er der således ikke grund til at vente, omend de foretagne undersøgelser er af foreløbig og kun rent orienterende karakter.

### Summary

*The effect of some herbicides on root nodule bacteria*  
Strains of *Rhizobium meliloti*, *R. trifolii* and *R. leguminosarum* were grown under constant agitation in liquid medium with varying concentration (0.01-20.0 mM) of the following herbicides: 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D), dinitro-ortho-cresol (DNOC), trichloroacetate (TCA), 2,2-dichloropropionate (Dalapon), maleic hydrazide and phenylamino-chloropyridazone (Pyrazon, the active constituent of Pyramin). Compared in terms of molar concentration, DNOC and Pyrazon appeared to be the most toxic and maleic hydrazide, Dalapon and TCA the least toxic compounds, with 2,4-D holding an intermediate position, all in spite of considerable variation between strains as well as between species. As a whole the strains of *R. meliloti* showed more resistance than the rest.

Apart from DNOC none of the compounds appeared to cause any significant growth depression at concentrations not exceeding 0.1-0.2 mM, and concentrations roughly 10 to 20 times higher (or more) were required for complete growth suppression. The inhibitory effect mostly appeared as early growth retardation that gradually was wholly or partly over-



come. In some cases DNOC was converted into an unidentified brown compound.

Tentative dilution counts on lucerne and clover seedlings in test tube cultures showed no evidence that 2,4-D, MCPA, DNOC, Dinoseb or TCA in doses 10 to 20 times exceeding the normal field application caused any significant decrease in the density of *R. meliloti* and *R. trifolii* in soils incubated under laboratory conditions. Dinoseb added at the rate of 20 p.p.m. was seen to persist for more than 18 months in these soils, while even higher doses of DNOC disappeared within two or three months.

### Litteraturhenvisninger

- Fisher, A., 1964. - Die Wirkungsweise von PYRAMIN. - Vorträge anlässlich der wissenschaftlichen Aussprache über chemische Unkrautbekämpfung in Zuckerrüben mit PYRAMIN, pp. 19-24. - Udg. Badische Anilin- und Soda-Fabrik AG. Ludwigshafen am Rhein.
- Fletcher, W. W., 1956. - Effect of »hormone herbicides« on the growth of *Rhizobium trifolii*. - Nature v. 177:1244.
- Fletcher, W. W., & Alcorn, J. W. S., 1958. - The effect of translocated herbicides on rhizobia and the nodulation of legumes. - I »Nutrition of the Legumes«, pp. 284-288. Ed. E. G. Hallsworth. (Brutterworth's Scientific Publications, London).
- Golebiowska, J., & Kaszubiak, H., 1965. - Sensitivity of *Rhizobium* to the action of thiuram and phenylmercuric acetate. - Ann. Inst. Pasteur Suppl. No. 3:152-160.
- Hart, L. T., & Larson, A. D., 1966. - Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on different metabolic types of bacteria. - Bull. Env. Contm. Toxicol. v. 1:108-120.
- Jakubisiak, B., & Golebiowska, J., 1968. - Influence of fungicides on *Rhizobium*. - Acta Microbiol. Polon. v. 12:196-202.
- Jensen, H. L., & Petersen, H. Ingv., 1952. - Decomposition of hormone herbicides by bacteria. - Acta Agr. Scand. v. 2:215-231.
- Jensen, H. L., & Laurrup-Larsen, Grete, 1967. - Microorganisms that decompose nitro-aromatic compounds, with special reference to dinitro-orthocresol. - Acta Agr. Scand. v. 17:115-126.
- Jensen, H. L., & Schröder, Minna, 1967. - Growth-promoting effect of chloro-substituted aliphatic acids in root-nodule bacteria. - Arch. Mikrobiol. v. 58: 127-133.
- Jensen, H. L., 1966. - Biologisk sønderdeling af ukrudtsmidler i jordbunden. IV. Dinitro-ortho-cresol. - Tidsskr. f. Planteavl v. 70:149-159.
- Jensen, H. L., 1969. - Lucerne- og kløverrodknoldbakteriernes forekomst i danske landbrugsjorder. - Tidsskr. f. Planteavl (i trykken).
- Johnson, E. J., & Colmer, A. R., 1956. - Relationships between magnesium and the physiological effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on *Azotobacter vine-landii* and *Rhizobium meliloti*. - J. Bact. v. 73:139-143.
- Jordan, D. C., Garcia, M. M., & Garrard, R. H., 1966. - Effect of selected herbicides on N-fixation and nodulation in *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot trefoil). - IX. Int. Congr. Microbiol., Moscow, Abstracts of Papers, p. 282.
- Mickovski, M. D. (1966). - The influence of hormone herbicides upon the growth of some species of rhizobia as well as upon the germination and nodulation by *Medicago sativa* and *Trifolium repens*. (Serbisk m. engelsk resumé). - Annuaire Fac. d'Agric. et de Sylv. Skopje v. 19:5-26.
- Nilsson, P. E., 1957. - The influence of antibiotics and antagonists on symbiotic nitrogen fixation in legume cultures. - Kungl. Lantbrukshögsk. Ann. (Uppsala) v. 23:219-253.
- Petersen, H. Ingv., & Hammarlund, Anne, 1953. - Årsoversigt for Statens Ukrudtsforsøg 1952. - Tidsskr. f. Planteavl v. 56:702-711.
- Petersen, E. J., 1927. - Knoldbakterier og Afsvampningsmidler. (139. Meddelelse A.) - Tidsskr. f. Planteavl v. 33:510-511.