

Statens Planteavlslaboratorium (Aage Henriksen)  
Bakteriologisk afdeling (T. V. Nissen)

## Maleinhydrazids nedbrydning og indflydelse på respirationen i jord

*Persistense of Maleic Hydrazide in soil and its influence on CO<sub>2</sub>-liberation*

A. Helweg-Andersen

Maleinhydrazid benyttes både til bekæmpelse af ukrudt og til vækstregulering. Som ukrudtsmiddel bruges det til bekæmpelse af kvik og som vækstregulator til at hæmme dannelse af spirer og siderødder på grøntsager under opbevaring. Desuden bruges det til at hæmme væksten af græs og til at hindre dannelse af sideskud på tobak.

Maleinhydrazid (i det følgende benævnt MH) er et hvidt krystallinsk stof med smeltepunkt på 298° C. Det er ikke flygtigt, og opløseligheden i vand er mindre end 1 % (Lane, 1964). Handelspræparatet er normalt enten Na- eller mono- eller diethanolaminsalt som er mere opløseligt (Hoffmann et. al. 1964).

Den kemiske betegnelse for stoffet er 1,2-dihydropyridazin-3,6-dion (se fig. 1), og det blev syntetiseret i 1895 af Curtius og Foesterling. Midlets virkning som vækstregulator og ukrudtsmiddel blev opdaget af Schoene og Hoffman 1949.

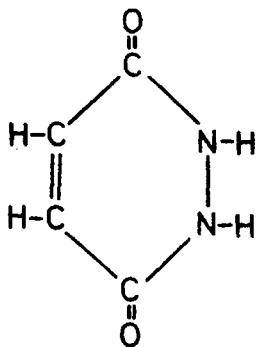


Fig. 1. Maleinhydrazid (Maleic Hydrazide)

Mange undersøgelser er foretaget vedrørende stoffets virkning som vækstregulator, men kun få har beskæftiget sig med stoffets nedbrydning i jord.

Med den foreliggende undersøgelse har det været hensigten at konstatere, om nedbrydningen er afhængig af jordbundens mikroorganismer, og på hvilken måde kuldioxidproduktionen i jord påvirkes. Desuden er nedbrydningen under naturlige forhold undersøgt.

### I. Maleinhydrazids nedbrydning i steril og usteril jord under laboratorieforhold

Nedbrydningen målt i havejord (pH 7,3) efter følgende plan:

Plan:

1. 100 g havejord + 100 ppm MH
2. 95 g havejord + 5 g »aktiv« jord  
(se nedenfor) + 100 ppm MH
3. 100 g havejord (autoklaveret) + 100 ppm MH
4. 95 g havejord (autoklaveret) + 5 g »aktiv« jord + 100 ppm MH
5. 50 g havejord (gammabestrålet) + 100 ppm MH

MH tilsættes alle led fra sterilfiltreret opløsning. Den lufttørrede jord tilsættes vand til 18 %. Fordampet vand erstattes under forsøget.

Autoklavering er udført 3 gange 1 time med een dags mellemrum ved 121° C. Den strålingssteriliserede jord er fremstillet ved gamma-

bestråling med 4 M.rad<sup>1</sup>. Denne dosis skulle være tilstrækkelig til at dræbe langt de fleste af jordbundens mikroorganismer (Cawse 1969). Der er desuden den fordel ved strålingssterilisering, at der ikke sker de voldsomme ændringer i jordens fysiske og kemiske egenskaber som ved autoklavering (Mc Laren et. al., 1962).

»Aktiv« jord til podning er havejord, som er inkuberet i 3 måneder med 224 ppm MH. Prøverne inkuberes ved 25° C i termostat. Forsøgsled 1 til 4 i 250 ml EM-kolber med vatprop, led 5 i cylindriske glas med skruelåg.

Ved prøveudtagning analyseres een kolbe fra hvert led. Til analysering benyttes en metode udarbejdet af Wood (1953), med visse ændringer beskrevet af Hoffman (1961-62).

ning af p-dimethylaminobenzaldehyd kan hydrazin-koncentrationen bestemmes kolorimetrisk, ved 455 m $\mu$ . Hydrazinmængden vil angive tilbageværende MH i jorden.

Der foretages steriliteitsprøve på autoklaveret jord (led 3) og på strålingssteriliseret jord (led 5). For led 3's vedkommende på kød-pepton agar og malt-pepton agar, for led 5 på kød-pepton agar, malt-pepton agar og i kød-pepton bouillon.

## Resultater

Maleinhydrazid-koncentrationen i de udtagne prøver fremgår af fig. 2. Det ses, at nedbrydningen i den ubehandlede jord (led 1) foregår

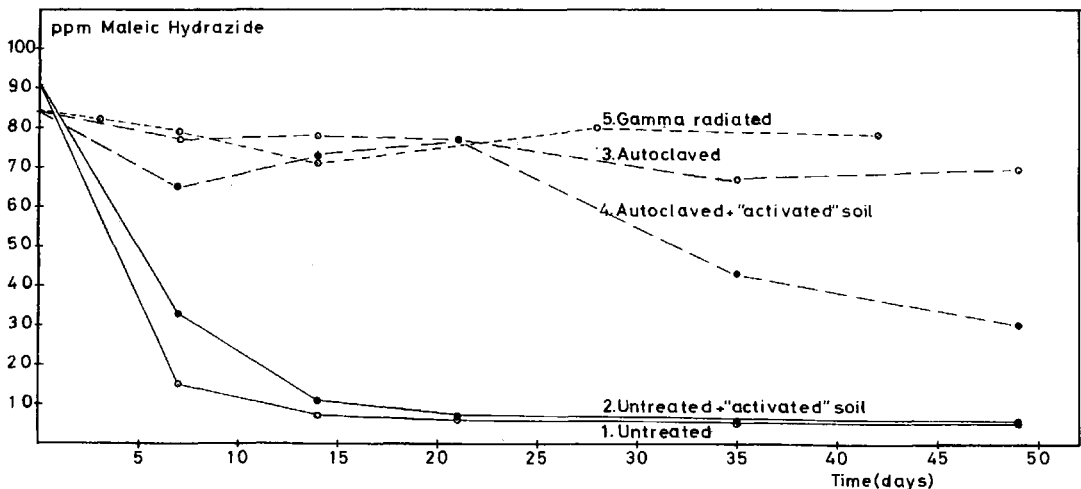


Fig. 2. Maleinhydrazids bestandighed i jord. 1. Ubehandlet, 2. Ubehandlet + »aktiveret« jord, 3. Autoklaveret, 4. Autoklaveret + »aktiveret« jord, 5. Gammabestrålet.

(Persistence of Maleic Hydrazide in soil. 1. Untreated, 2. Untreated + »activated« soil, 3. Autoclaved, 4. Autoclaved + »activated« soil, 5. Gamma radiated.)

MH ekstraheres fra jorden med vand. Efter centrifugering koges supernatanten med HCl og koncentreret NaOH henholdsvis 30 min. og 1 time for at fjerne de forbindelser, der kan influere på resultatet. Ved tilsætning af zink til den stærkt basiske opløsning og opvarmning til 190° C vil hydrazin blive frigjort. Hydrazin destilleres af og opsamles i 1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ved tilsæt-

hurtigt, idet mindre end 10 % genfindes efter 14 dage. Podning med »aktiv« jord (led 2) forøgede ikke nedbrydningshastigheden.

I den autoklaverede jord (led 3) foregår ikke noget væsentligt fald i MH-koncentrationen, hvorimod nedbrydningen er tydelig, hvis den autoklaverede jord tilsættes »aktiv« jord (led 4).

1. Gammabestråling af jordprøverne er udført af landbrugsafdelingen, AEK, Risø.

Gamma-bestråling af jorden forhindrer tilsyneladende også nedbrydningen af MH, idet der ikke sker koncentrationsfald af betydning i løbet af forsøgsperioden (led 5).

## II. Maleinhydrazids indflydelse på CO<sub>2</sub>-udskillelsen fra jord<sup>1</sup>

1. 50 g jord
2. 50 g jord + 500 ppm Maleinhydrazid
3. 50 g jord + 1 % halm
4. 50 g jord + 1 % halm + 500 ppm Maleinhydrazid
5. 50 g jord + 1 % halm + 2,5 % »aktiv« jord
6. 50 g jord + 1 % halm + 2,5 % »aktiv« jord + 500 ppm Maleinhydrazid

Målingerne udføres på havejord (pH 7,3). Led 3, 4, 5 og 6 er tilsat 1 % pulveriseret hvedehalm. MH-koncentrationen i led 2, 4 og 6 er 500 ppm, og til podning af led 5 og 6 er

benyttet jord, der har været inkuberet i 6 måneder med 224 ppm MH. Alle led tilsættes 18 % vand og inkuberes i termostat ved 25° C. 4 gentagelser i hvert led.

Til måling af CO<sub>2</sub>-udskillelsen er benyttet den af Petersen (1926) beskrevne metode.

50 g jord anbringes i kurve af kobbernet som fastgøres til gummipropper og nedsænkes i 2 l Erlenmeyer-kolber med Ba(OH)<sub>2</sub> i bunden af kolben. Den udskilte CO<sub>2</sub>-mængde vil optages i Ba(OH)<sub>2</sub>. Ved titrering med HCl med kendt normalitet kan den udskilte CO<sub>2</sub>-mængde bestemmes. Thymolblåt benyttes som indikator.

### Resultat:

I fig. 3 ses den totale CO<sub>2</sub>-mængde udskilt fra 50 g jord. MH stimulerer tydeligt CO<sub>2</sub>-udskillelsen, når jorden tilsættes halm (led 4 og 6). MH stimulerer kun svagt i jord uden halm (led 2). Den »aktive« jord påvirkede den totale

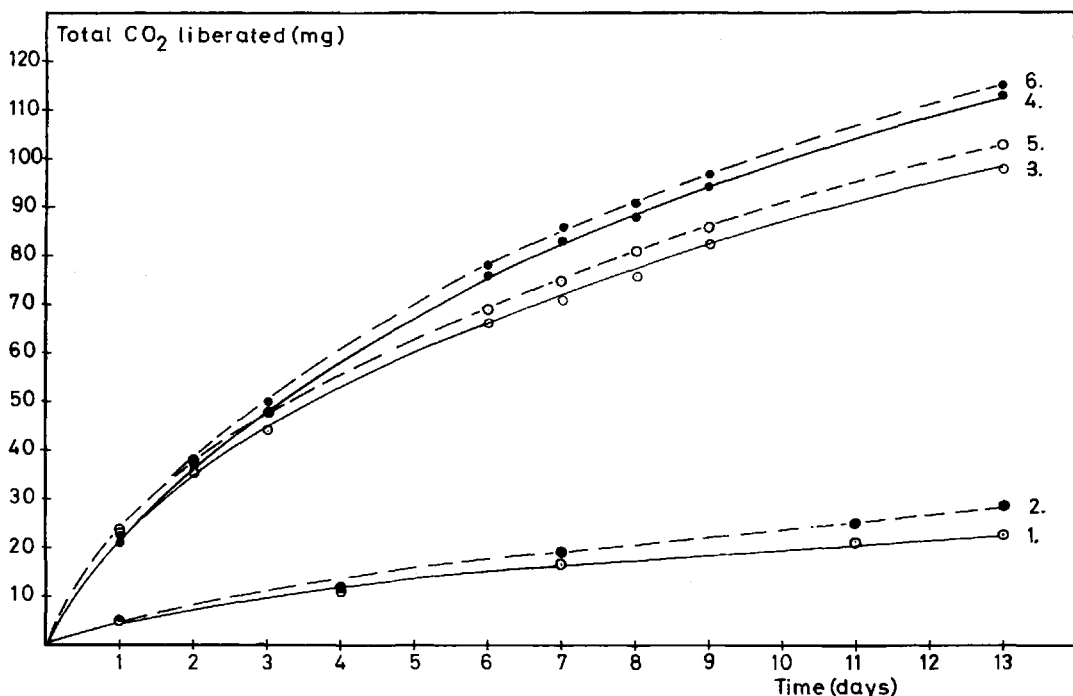


Fig. 3. Total mængde CO<sub>2</sub> udskilt fra: 1. Jord, 2. Jord + MH, 3. Jord + halm, 4. Jord + halm + MH. 5. Jord + halm + »aktiveret« jord, 6. Jord + halm + »aktiveret« jord + MH.

(Total CO<sub>2</sub> liberated from: 1. Soil, 2. Soil + MH, 3. Soil + halm, 4. Soil + halm + MH, 5. Soil + halm + »activated« soil, 6. Soil + halm + »activated« soil + MH.)

1. Indledende undersøgelser udført af forstander dr. agro H. L. Jensen.

ånding (led 5 og 6), men forøgede tilsyneladende ikke den stimulering, der fremkommer ved tilsætning af MH.

I ovenstående forsøg er jordens pH målt ved forsøgets start og afslutning. Resultatet fremgår af tabel 1.

*Tabel 1. pH i havejord med og uden Maleinhydrazid. Målingerne er udført umiddelbart efter tilsætning og efter 13 dages inkubation ved 25° C*

(pH in garden soil with and without Maleic Hydrazide. The pH is measured just after addition of MH, and after incubation for 13 days at 25° C)

	pH start	pH slut		pH start	pH slut
1. —MH	7,2	7,1	4. +MH	6,9	7,3
2. +MH	6,8	7,1	5. —MH	7,3	7,3
3. —MH	7,3	7,4	6. +MH	6,9	7,2

Af tabel 1 fremgår det, at ved tilsætning af 500 ppm MH falder jordens pH. Ved forsøgets afslutning, 13 dage senere, er pH igen på højde med ubehandlet. Det tyder på, at størstedelen af den tilsatte MH er forsvundet, hvad der også bekræftes af nedbryningstiden i fig. 2 og tabel 2.

### III. Nedbrydning af Maleinhydrazid på friland

Forsøget er udført i en lermuldet jord ved Statens Planteavlslaboratorium, pH 5,5.

MH tilføres som monoethanalaminsalt (20%, handelspræparat<sup>1)</sup>) ved udsprøjtning i en vand-

mængde svarende til 500 l/ha. Parcelstørrelse 2 m<sup>2</sup>, 3 fællesparceller.

Der tilføres henholdsvis 5 og 10 kg virksomt stof pr. ha. Prøver udtages med jordbor i 0-10 og 10-20 cm's dybde. Behandling blev udført 11. april 1969 og prøver er udtaget efter 12, 80, 129 og 189 dage. Jorden opbevares lufttørret til analysering, som udføres efter den tidligere beskrevne metode.

Det fremgår af tabel 2, at størstedelen af den tilsatte MH nedbrydes hurtigt, som også vist af Hoffman et. al. (1962) og Levi et. al. (1952). MH blev ikke fundet i prøverne udtaget i 10-20 cm's dybde.

### Forsøg på isolering af aktive organismer og sporing af nedbrydningsprodukter

Ophobning af aktive organismer er uden held forsøgt både i jord og væskekultur. Til semikvantitativ måling af MH-koncentrationen i væskekultur og til identifikation af eventuelle nedbrydningsprodukter er benyttet tyndtlagskromatografi på cellulose. Løbemiddel 5:1:4 butanol, eddikesyre og vand (Greulich et. al. (1961)). Til fremkaldelse påsprøjtes 1:1 blanding af 1% FeCl<sub>3</sub> og 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Andrea, 1958). Det er ikke lykkedes at finde nedbrydningsprodukter, som stammer fra MH ved denne metode.

Isolering af aktive organismer er forsøgt i væskekultur og ved pladespredning fra MH-

*Tabel 2. Koncentrationen af Maleinhydrazid i markforsøg efter behandling med 5 og 10 kg virksomt stof pr. ha. Jordprøver udtaget efter 12, 80, 129 og 189 dage i 0-10 og 10-20 cm's dybde*

(Concentration of Maleic Hydrazide in a field experiment treated with 5 and 10 kg a.i./ha. Samples taken 12, 80, 129 and 189 days after treatment. Soil depths 0-10 and 10-20 cm. (1 kg/ha = 0.75 ppm))

		Resultat			
Behandling 11. april		Efter 12 dage	Efter 80 dage	Efter 129 dage	Efter 189 dage
5 kg/ha,	0-10 cm = 3,75 ppm. . . .	0,35 ppm	spor	0	—
»	10-20 cm » . . . .	0	0	0	—
10 kg/ha,	0-10 cm = 7,5 ppm. . . . .	0,55 ppm	spor	spor	spor
»	10-20 cm » . . . . .	0	0	0	—

1.) Stillet til rådighed af Kemisk Værk Køge A/S.

behandlet jord. Maleinhydrazid er i substraterne søgt benyttet som C- eller N-kilde, uden at det endnu har været muligt at isolere organismer, som kan nedbryde MH.

Lembeck et. al. (1957) har isoleret to bakterier, som kunne udnytte diethanolamin-saltet af MH som N- og C-kilde. De fundne organismer er ikke typiske jordbakterier. Der sås en vis afgiftning af stoffet forårsaget af mikroorganismene, men det er sandsynligvis ikke MH molekylet der udnyttes, men diethanolaminet.

### Diskussion

De foreliggende undersøgelser tyder på, at Maleinhydrazids nedbrydning er afhængig af jordbundens mikroorganismer, idet nedbrydningen ikke finder sted i autoklaveret og strålingssteriliseret jord.

Det ses af åndingsforsøget, at Maleinhydrazid tydeligt forøger CO<sub>2</sub>-produktionen, når der sættes halm til jorden. Denne iagttagelse kan tydes derhen, at MH's nitrogenindhold bliver tilgængelig for jordbundens mikroflora. Nitrogen vil hurtigt blive en begrænsende faktor for mikroorganismernes aktivitet, når jorden tilsættes halm.

Teorien støttes af, at Levi et. al. (1952) observerede, at MH i nogle tilfælde kan virke som gødningsstof.

Podning med »aktiveret« jord fremmede ikke den CO<sub>2</sub>-udskillelse, som er betinget af MH-tilsætningen, som f.eks. vist for Endothal af Jensen (1964). Nedbrydningen forløb heller ikke hurtigere efter tilsætning af »aktiv« jord. Hvis aktive organismer findes i den tilsatte jord, er deres vækstmuligheder tilsyneladende begrænsede.

Efter Jensen (1969) og Fletcher (1960) har MH kun ringe skadelig indflydelse på mikrofloraen. En hæmning af CO<sub>2</sub>-udskillelsen på grund af midlets giftvirkning, som det f.eks. er vist for DNOC af Jensen (1964), var derfor heller ikke ventet.

I den foreliggende undersøgelse har det endnu ikke ved ophobning og isoleringsforsøg været muligt at finde aktive organismer. Der

er heller ikke endnu med sikkerhed isoleret nedbrydningsprodukter. Disse ukendte faktorer søges yderligere undersøgt.

### Oversigt

Under laboratorieforhold faldt koncentrationen af Maleinhydrazid i jord fra 100 til 5 ppm på ca. 3 uger. Nedbrydningen formodes at være afhængig af jordbundens mikroorganismer, fordi den ikke finder sted i autoklaveret eller strålingssteriliseret jord. Nedbrydningshastigheden blev ikke forøget ved tilsætning af »aktiveret« jord.

MH forøgede CO<sub>2</sub>-udskillelsen fra jord tilsat halm. Tilsætning af »aktiveret« jord forøgede ikke denne stimulering.

Maleinhydrazid blev også hurtigt nedbrudt under naturlige forhold. Efter behandling med 5 og 10 kg virksomt stof/ha var koncentrationen faldet til ca. 10 % efter 12 dage, og efter 80 dage fandtes kun spor. MH blev ikke fundet under 10 cm's jorddybde.

Det har endnu ikke været muligt at isolere organismer, som kunne udnytte Maleinhydrazid som N- eller C-kilde, ligesom nedbrydningsprodukter heller ikke med sikkerhed er fundet.

### Summary

*Persistense of Maleic Hydrazide in soil and its influence on CO<sub>2</sub>-liberation*

The concentration of Maleic Hydrazide in the garden soil decreased under laboratory conditions from 100 to 5 ppm in 3 weeks. No break-down occurred in soils sterilized by autoclaving or by gamma radiation. According to these results it is assumed that the break-down is related to microbial attack.

The rate of break-down did not increase after inoculation with soil earlier treated with Maleic Hydrazide.

The CO<sub>2</sub>-liberation from soil was increased when mixing MH with the soil, especially if halm was also incorporated. Inoculation with soil earlier treated with MH did not increase this stimulation.

In a field experiment the disappearance also rapidly took place. 5 and 10 kg a.i./ha decreased to about 10 pct. of the original dose after 12 days, and only traces was found after 80 days. MH was not found below 10 cm.

It has not yet been possible to isolate organisms

able to use MH as a sole source of C or N. Neither have metabolites been found.

### Litteraturliste

- Andrea, W. A.* (1958). The estimation of Maleic hydrazide by paper chromatography. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 36: 71-74.
- Cawse, P. A.* (1969). The use of gamma radiation in soil research. R 6061, The United Kingdom Atomic Energy Authority.
- Curtius, T. and Foesterling, H. A.* (1895). *J. Praktische Chem.* 51, 371.
- Fletcher, W. W.* (1960). The effect of herbicides on micro-organisms. *Herbicides and the Soil.* Blackwell Sci. Publ., pp 20-62.
- Greulach, V. A. and Haesloop, J. G.* (1961). A paper chromatographic technique for hydrazides and certain metabolites. *Anal. Chem.*, 33, 1446-47.
- Hoffman, J.* (1961). Spectrophotometric determination of maleic hydrazide in tobaccos. *J. Assoc. Official Agr. Chemists*, 44, 723-25.
- Hoffman, J., Parups, E. V. and Carson, R. B.* (1962). Analysis for maleic hydrazide. *J. Agr. Food Chem.*, 10, 6, 453-455.
- Hoffman, J. and Parups, E. V.* (1964). Mode of action of maleic hydrazide in relation to residues in crops and soils. *Residue Reviews*, 7, 96-113.
- Jensen, H. L.* (1964). Biologisk sønderdeling af ukrudtsmidler i jordbunden. *Endothal. Tidsskr. f. Planteavl*, 68, 4, 553-71.
- Jensen, H. L.* (1964). Om indvirkning af Dinitro-Ortho-Cresol, Dinitrobutylphenol og 2,4 Dinitrophenol på jordrespirationen. *Tidsskr. f. Planteavl*, 68, 2, 185-195.
- Jensen, H. L.* (1969). Om rodknoldbakteriernes forhold overfor visse ukrudtsmidler. *Tidsskr. f. Planteavl*, 73, 309-17.
- Lane, R.* (1964). Maleic Hydrazide. *Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulators and Food Additives, Vol IV, Herbicides.*
- Laren, A. D. Mc., Luse, R. A. and Skujins, J. J.* (1962). Sterilisation of soil by irradiation and some further observations on soil enzyme activity. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 26, 371-77.
- Lembeck, W. L. and Colmer, A. R.* (1957). Aspects of decomposition and utilization of maleic hydrazide by bacteria. *Weeds*, vol. V, 1, 34-39.
- Levi, E. and Crafts, A. S.* (1952). Toxicity of maleic hydrazide in California soils. *Hilgardia*, 21, 431-440.
- Petersen, E. J.* (1926). Undersøgelser over forholdet mellem jordens kulstyreproduktion kemiske tilstandsform og mikrobiologiske aktivitet. *Tidsskr. f. Planteavl*, 32, 625-671.
- Schoene, D. L. and Hoffman, O. L.* (1949). *Science*, 109, 588-590.
- Wood, P. R.* (1953). Determination of maleic hydrazide residues in plant and animal tissue. *Analytical Chem.*, vol. 25, 12, 1879-1883.