

Statens Planteavlslaboratorium (Aage Henriksen)

Bakteriologisk afdeling (T. Vincents Nissen)

Undersøgelser over fungicidet benomyl i jord

I. Stabilitet og biologisk nedbrydning

(Persistence of benomyl in different soil types and microbial breakdown of the fungicide in soil and agar culture)

A. Helweg

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. Resumé	232
2. Indledning	234
3. Svampehæmmende forbindelser i <i>benomyl</i> behandlet jord	235
4. <i>Benomyls</i> bestandighed i jord	235
Metode til bestemmelse af <i>benomyl</i> koncentrationen	236
Bestandighed i ubehandlet, autoklaveret og bestrålet jord	236
Jordtypens indflydelse på <i>benomyls</i> bestandighed	238
5. Isolering af <i>benomyl</i> -nedbrydende organismer fra jord	239
6. Diskussion	241
7. Konklusion	242
8. English summary	242

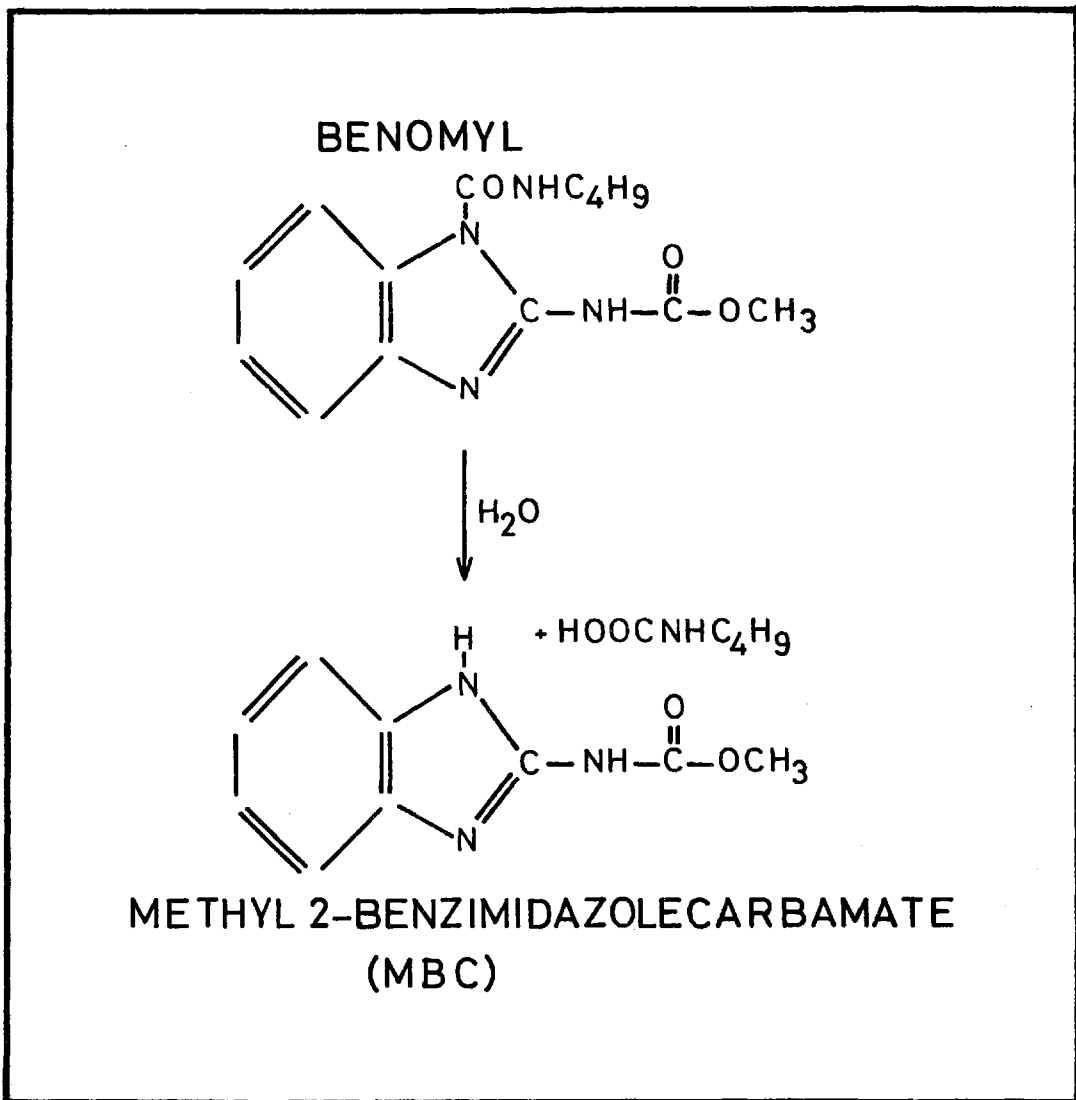
1. Resumé

Efter tilsætning af fungicidet *benomyl* til jord genfindes det ikke som *benomyl*, idet det hurtigt omdannes til det svampehæmmende (fungistatiske) nedbrydningsprodukt *methyl 2-benzimidazol carbaminsyre (MBC)*. Denne omdannelse ses allerede ved ekstrahering nogle få timer efter tilsætning.

Indflydelse af jordbundens mikroflora på bestandigheden af *benomyl* er undersøgt ved at tilsætte 100 ppm *benomyl* til 1) ubehandlet, 2) autoklaveret og 3) bestrålet jord (1 ppm = 1 mg/kg). Den mængde fungicid, som kunne ekstraheres er målt ved forsøgets start og efter inkubering i 3, 10, 17, 39 og 52 døgn. Den svampehæmmende virkning i ekstrakterne blev målt ved en biologisk test med en *Penicillium sp.* som testorganisme; virkningen faldt til ca. 50 pct. i ubehandlet jord efter 52 døgn, medens

der efter samme tidsrum var ca. 80 pct. tilbage i ekstrakter fra autoklaveret og bestrålet jord. Resultaterne tyder således på, at jordbundens mikroflora er medvirkende ved *benomyls* afgiftning.

Jordtypens indflydelse på *benomyls* bestandighed blev undersøgt ved tilsætning af 100 ppm *benomyl* til 3 forskellige jordtyper med et humusindhold på henholdsvis 10,2 – 2,9 og 0,6 pct. Prøver blev underkastet ovennævnte biologiske test ved forsøgets start og med mellemrum i op til 6 måneder. Resultaterne viste, at der var hurtigst fald i *benomyl*koncentrationen i ekstrakter fra jorden med 10,2 pct. humus, langsommere i jorden med 2,9 pct. humus og kun et meget lille fald i jorden med 0,6 pct. humus. Efter ca. 6 måneders inkubering var koncentrationen i ekstrakter fra den humusrige jord under 10 pct. af den tilsatte. I jorden med



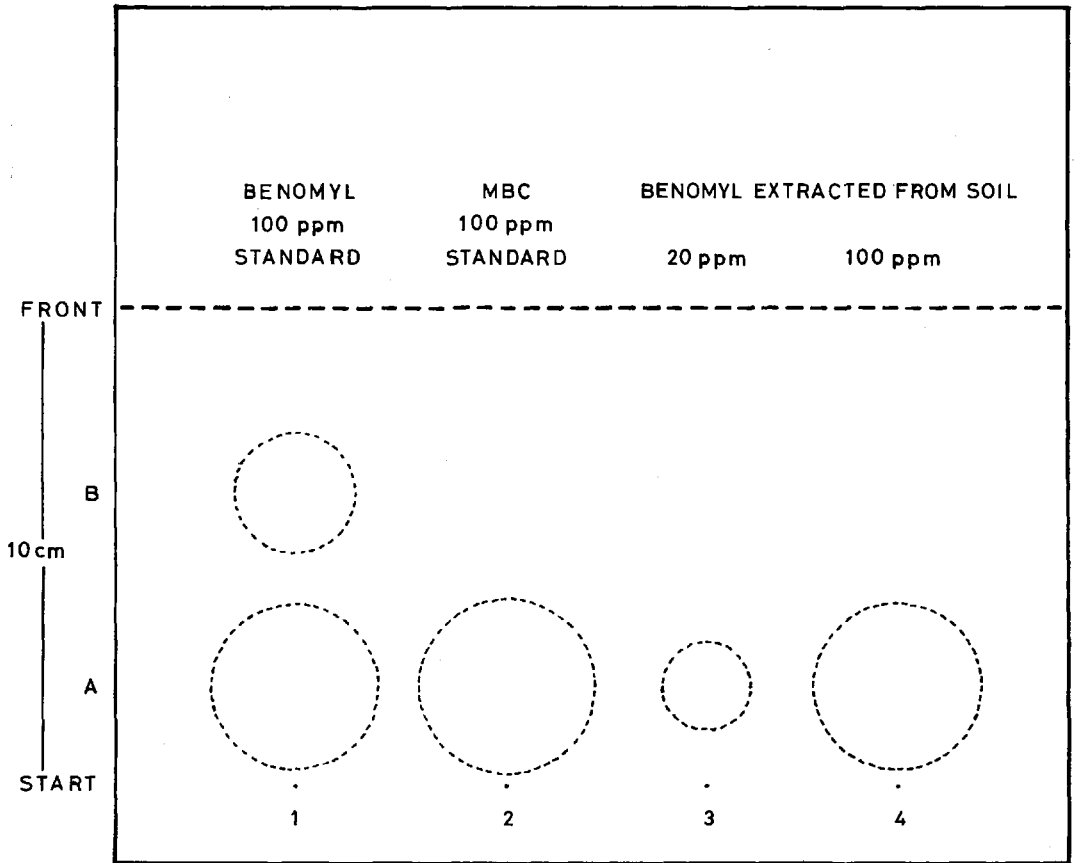
Figur. 1. Fungicidet *benomyl* og dets svampehæmmende nedbrydningsprodukt *methyl 2-benzimidazol carbaminsyre (MBC)*.

Structures of the fungicide *benomyl* and the breakdown product *methyl 2-benzimidazole carbamic acid (MBC)*.

2,9 pct. humus var koncentrationen faldet til ca. 30 pct., medens der i mineraljorden med kun 0,6 pct. humus stadig kunne ekstraheres ca. 75 pct. af den tilsatte fungicidmængde. Alle ekstrakter i denne undersøgelse blev chromatograferet for at konstatere hvilke svampehæm-

mende forbindelser der optrådte; kun nedbrydningsproduktet *MBC* blev fundet.

Fra jord som var behandlet med *benomyl* i ca. 6 mdr. blev der, ved spredning på et mineralsubstrat med *benomyl* som C- og N-kilde, isoleret 4 bakteriekolonier og 2 svampekolonier.



Figur 2. Tegning af et tyndtlagschromatogram, som er blevet fremkaldt ved at påsprøjte maltpeptonagar podet med *Penicillium sp.* Pletterne angiver beliggenheden af væksthæmmede zoner (se iverigt teksten). Ved 1 er påsat 0,02 ml af en 100 ppm *benomylopløsning* i ætylacetat, ved 2 0,02 ml af en 100 ppm *MBC-opløsning* i ætylacetat. 3 og 4 er påsat 0,02 ml af ætylacetatekstrakter fra jord tilsat henholdsvis 20 og 100 ppm *benomyl*.

Drawing of a thin-layer chromatogram applied with 0,02 ml per spot. 1: 100 ppm *benomyl* solution in ethylacetate, 2: 100 ppm *MBC* solution in ethylacetate, 3 and 4: soil extracted with ethylacetate two hours after addition of 20 and 100 ppm *benomyl* respectively. The chromatogram was visualized by spraying maltpeptone agar inoculated with *Penicillium sp.* on the chromatogram after development. The dotted circles refer to zones without growth of the fungi after incubation for three days at 25 °C.

Mikroorganismene var i stand til at vokse på *benomyl*-agaren og under væksten blev de uopløselige fungicidpartikler i agaren nedbrudt til forbindelser uden svampehæmmende virkning.

2. Indledning

Fungicidet *benomyl* (*methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazol Carbaminsyre*) er et systemisk middel med svampehæmmende (fungistatisk)

virkning. Midlet anvendes blandt andet til beskyttelse mod svampeangreb på jordbær, frugttræer og frugtbuske.

Benomyl er uopløselig i vand og ustabil i vandig suspension. Som vist i fig. 1 fraspalter *benomyl* i vand butylcarbamoylsidekæden under dannelse af *methyl 2-benzimidazol carbaminsyre (MBC)* (Kilgore and White 1970). Det dannede nedbrydningsprodukt *MBC* er en stabil

forbindelse, som er meget lidt opløselig i vand, og ligesom *benomyl* er *MBC* et effektivt fungicid (Clemons and Sisler 1969).

Undersøgelsen er et led i de forsøg, som udføres ved Bakteriologisk afdeling, Statens Plantevls-Laboratorium over pesticidernes bestandighed og nedbrydning i jordbunden. Dens formål var at klarlægge følgende spørgsmål: 1) Hvilke svampehæmmende forbindelser optræder i *benomyl*behandlet jord? 2) Er jordbundens mikroflora medvirkende ved *benomyls* nedbrydning? 3) Hvilken indflydelse har jordtypen på *benomyls* bestandighed? 4) Kan der isoleres *benomyl*nedbrydende organismer fra jord?

3. Svampehæmmende forbindelser i *benomyl*behandlet jord

Ved hjælp af en tyndtlags-chromatografisk adskillelse kombineret med en biologisk testning (Peterson and Edginton 1969) er det undersøgt, om *benomyl* eller nedbrydningsproduktet *MBC* optræder i jorden.

Metode: 0,02 ml af de ekstrakter, der skal undersøges, sættes på en silicagelplade, som løbevæske anvendes hexan/ætylacetat/methanol 10:10:1. Efter afdampning af løbevæsken fremkaldes pladen ved at påsprøjte et tyndt lag af en sporesuspension af *Penicillium sp.* i en opløsning af 1 pct. glucose og 0,2 pct. KNO_3 . Suspensionen blandes med en 1,5 pct. smeltet maltagar i forholdet 7,5:10, lige før suspensionen sprøjtes på pladen. Efter 3 dages inkubering i fugtigt kammer ved 25° C vil pladen være dækket af svampevækst, og eventuelle svampehæmmende forbindelser fra ekstrakten vil optræde som pletter uden svampevækst på chromatogrammet.

For at undersøge hvor hurtigt *benomyl* omdannes til *MBC* i jord, blev en jord tilsat henholdsvis 20 og 100 ppm *benomyl* (1 ppm = 1 mg/kg) fra en ætylacetatopløsning. Efter blanding blev jorderne tilsat 18 ml vand pr. 100 g lufttør jord og ekstraheret med ætylacetat efter to timers henstand. 0,02 ml af de to ekstrakter blev chromatograferet, som beskrevet ovenfor. Som kontrol blev rene ætylacetatopløsninger med 100 ppm af henholdsvis *benomyl* og ned-

brydningsproduktet *MBC* chromatograferet på samme plade.

Resultat: Figur 2 viser en tegning af et chromatogram fremkaldt ved påsprøjtning af en sporesuspension af *Penicillium sp.* Fra venstre er påsat 0,02 ml af henholdsvis 1) 100 ppm *benomyl* i ætylacetat, 2) 100 ppm *MBC* i ætylacetat, 3) ætylacetatekstrakt fra jord tilsat 20 ppm *benomyl* og 4) ætylacetatekstrakt fra jord tilsat 100 ppm *benomyl*.

Pletten ved B stammer fra *benomyl* og pletterne ved A fra nedbrydningsproduktet *MBC*, idet resultaterne sammenlignes med undersøgelser af Kilgore and White (1970), Clemons and Sisler (1969) og Peterson and Edginton (1969), som har vist, at en tilsvarende omdannelse fra *benomyl* til *MBC* finder sted i vand.

Resultatet, som fremgår af figur 2, viser således, at den svampehæmmende virkning i jord behandlet med *benomyl* stammer fra nedbrydningsproduktet *MBC*. Hvor der i det følgende tales om *benomyl* i jord, er det altså egentlig *MBC*, som udøver den svampehæmmende virkning. Iøvrigt ses ved 1, at alene opbevaring og chromatografering af den tekniske *benomyl* forårsager, at en del omdannes til *MBC*.

4. *Benomyls* bestandighed i jord

Hine et al. (1969) har undersøgt bestandigheden af *benomyl* i jord, dels under kontrollerede forhold i laboratorieforsøg og dels i vandede bomuldsmarker.

Prøver af *benomyl*behandlede jorder blev udtaget med mellemrum, og ved kunstig infektion med den plantepatogene svamp *Phymatotrichum omnivorum* og biologisk test med *Penicillium expansum* blev jorderne undersøgt for rester af fungicidet.

Hines laboratorieforsøg viste, at efter 112 døgn inkubering ved temperaturer fra 16 til 40° C var der stadig fungistatisk virkning i jord behandlet med 10 og 100 ppm *benomyl*. Efter 135 døgn ved 40° C var virkningen forsvundet i jord behandlet med 10 ppm, og den biologiske test viste, at ved samme temperatur var koncentrationen i jord behandlet med 100 ppm *benomyl* faldet til ca. 30 ppm. I de jorder som

var blevet inkuberet ved 16° C, var der ikke sket noget tydeligt fald i koncentrationen.

126 døgn efter at en vandet bomuldsmark var blevet behandlet med *benomyl*, svarende til ca. 50, ca. 28 og ca. 15 ppm *benomyl* i de øverste 10 cm, viste forsøgene af *Hine et al.* (1969), at der stadig var rester efter 50 og 28 ppm (rester på henholdsvis ca. 10 og ca. 4 ppm), hvorimod der ikke kunne spores rester efter 15 ppm.

Forsøgene af *Hine et al.* viser således en ret langvarig svampehæmmende virkning i jorden efter en *benomyl*-behandling, men giver ikke svar på hvilke faktorer, der medvirker ved fjernelse af fungicidets virkning.

Undersøgelser af *Hock et al.* (1970) og af *Schreiber et al.* (1971) tyder på, at jordtypen har stor indflydelse på *benomyls* tilgængelighed for planter.

Schreiber et al. (1971) undersøgte *benomyls* optagelse i elmefrøplanter dyrket i forskellige blandinger af jord, tørvejord, sand og peralite behandlet med *benomyl*. Til bestemmelse af hvor meget fungicid der blev optaget i planterne blev udskårne blad-, bark- og vedstykker anbragt på agarplader podet med *Ceratosystis ulmi*. Zoner uden vækst omkring vævsstykkerne viste den optagne fungicidmængde.

Resultatet af undersøgelsen viste, at planterne optog mest *benomyl*, når de blev dyrket i sand, mindre i blandinger af peralite og tørvejord eller peralite og jord og mindst i jord og tørvejord. Konklusionen blev, at tørvejorden gav den laveste *benomyloptagelse* i planterne; der var altså ikke så meget *benomyl* til rådighed for planterne i et substrat med stort indhold af organisk stof.

Undersøgelser af *Hock et al.* (1970) viste samme resultat, idet de også fandt, at planter dyrket i sand optog mest *benomyl*, medens optagelsen var mindre fra jord og fra en blanding af jord, tørvejord og peralite. Der blev iøvrigt fundet betydelige rester af *benomyl* i planterne, selv 110 døgn efter at jorden var behandlet.

For at klarlægge hvilke faktorer, der er af betydning ved fjernelsen af *benomyl* fra jor-

den er her, som beskrevet i de følgende afsnit, målt nedbrydningen i ubehandlet, bestrålet og autoklaveret jord og endvidere er nedbrydningen i jorder med forskellige humusindhold sammenlignet.

Metode til bestemmelse af *benomyl*-koncentrationen i jord

Til analysen for *benomyl* er fungicidets svampehæmmende virkning overfor en udvalgt *Penicillium sp.* fra Bakteriologisk afdelings kultursamling benyttet. Den blev blandt en række undersøgte mikroorganismer fundet mest følsom. *Lacroix et Terlain* (1970) angiver også en *Penicillium sp.* som mest følsom overfor *benomyl*.

Til analysen udtages 10 g jord, som ekstraheres med 2 gange 30 ml ætylacetat. Ekstrakterne inddampes under vakuum ved 40° C til ca. 6 ml, fyldes op til 10 ml med ætylacetat og opuges i autoklaverede filtrerpapirskiver (Whatman 13 mm diameter). Hver skive opsluger ca. 11 mg ekstrakt.

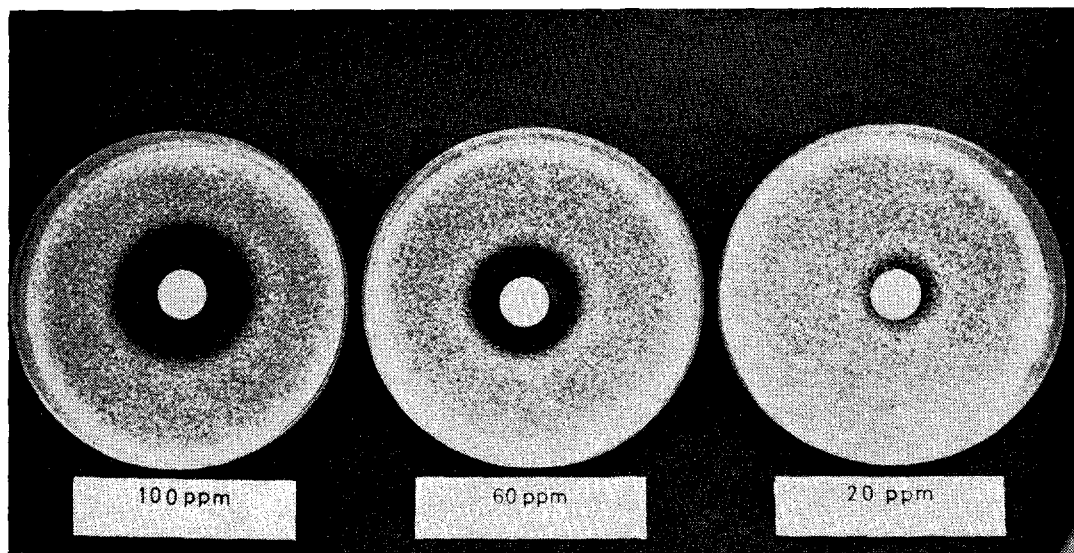
Skiverne, som har opsuget den *benomyl*-holdige ekstrakt, anbringes midt på plader af maltpeptonagar (pH 5,1), som umiddelbart forinden er podet med *Penicillium sp.* (*Kovács* 1967).

Pladerne inkuberes i 3 dage ved 25° C; efter dette tidsrum er pladen dækket af svampevækst, og en eventuel svampehæmmende virkning af ekstrakten, der er opsuget i filtrerpapirskiven, vil vise sig ved en vækstfri zone rundt om skiven. Figur 3 viser resultatet af en sådan biologisk test; filtrerpapirskiverne har her opsuget ætylacetatekstrakter fra jord, som var tilsat henholdsvis 100, 60 og 20 ppm *benomyl*.

Benomyls bestandighed i ubehandlet, autoklaveret og bestrålet jord

Mikrofloraens indflydelse på *benomyls* bestandighed undersøgtes i jord behandlet efter følgende plan:

1. 100 g jord (ubehandlet) tilsat 10 mg *benomyl* (100 ppm)
2. 100 g jord (autoklaveret) tilsat 10 mg *benomyl* (100 ppm)



Figur 3. Biologisk test for *benomyl*koncentrationen i jord. I filterpapirskiverne er der opsøget ætylacetatekstrakter fra jord, som var tilsat henholdsvis 100, 60 og 20 ppm *benomyl*. Skiverne er anbragt på plader af maltpeptonagar podet med en *benomylfølsom* svamp (*Penicillium sp.*). Efter 3 dages inkubation ved 25 °C viser diameteren af den vækstoffri zone omkring filterpapirskiven koncentrationen af fungicid i ekstrakten.

Fungistatic effect in soils containing 100, 60 and 20 ppm benomyl, measured by a bioassay. The soils were extracted with ethylacetate, the extracts were concentrated by evaporation and absorbed by discs of filter paper. The discs were placed on plates of maltpepton agar inoculated with spores of *Penicillium sp.* After 3 days of incubation at 25 °C a zone without mycelium was formed around the disc; the width of the zone is depending upon the concentration of fungicide.

3. 50 g jord (bestrålet) tilsat 5 mg *benomyl* 100 ppm).

Autoklavering af jord er foretaget 3 gange 1 time med én dags mellemrum ved 120 °C og strålingsbehandling med en dosis på 4 Mrad. (McLaren *et al.* 1962). Disse behandlinger forårsager en væsentlig nedsættelse af kimtallet; opnåelse af absolut sterilitet i jord er meget vanskelig.

Til undersøgelsen er benyttet lufttørret havejord fra Statens Planteavlslaboratorium med pH (H₂O) 7,2 og følgende tekstur: Ler 6,9 pct., silt 13,4 pct., finsand 42,8 pct., grovsand 34,0 pct. og humus 2,9 pct.

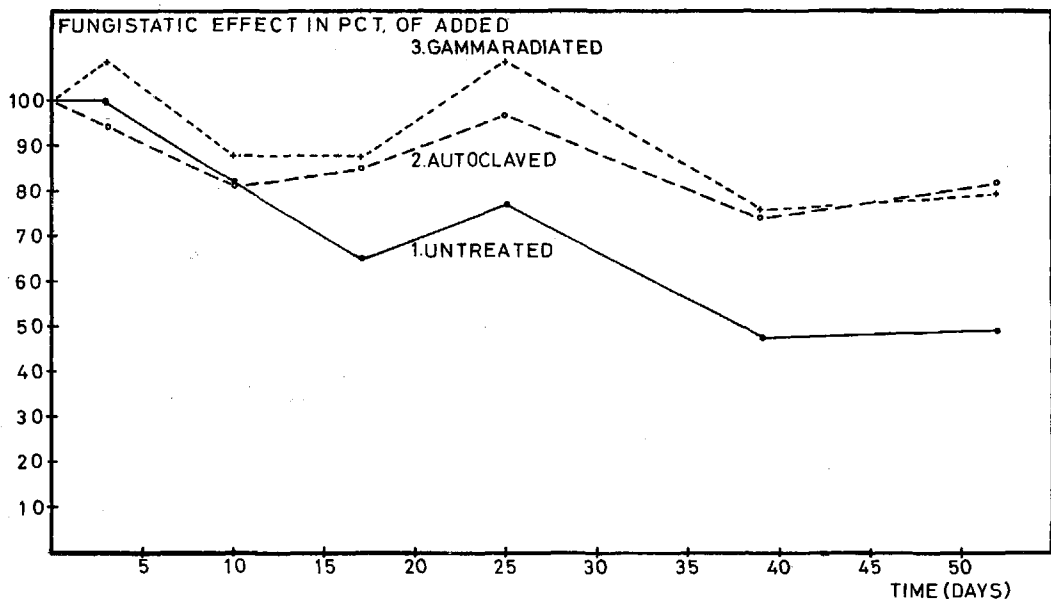
Ved forsøgets start tilsattes 18 ml vand pr. 100 g tør jord, svarende til ca. 40 pct. af markkapaciteten. Prøverne blev inkuberet ved 25 °C i termostat og fordampet vand erstattet i forsøgsperioden.

Der anvendtes teknisk *benomyl* som før til sætning blev suspenderet i vand ved behandling med ultralyd, og steriliseret ved bestråling med 4 Mrad.; behandlingen ændrede ikke *benomyls* svampehæmmende virkning overfor *Penicillium sp.*

Led 1 og 2 (se ovenfor) er inkuberet i 250 ml Erlenmeyerkolber, som er lukket med vatpropper. Led 3 er inkuberet i 100 ml cylindriske glas med skruelåg. Fra hvert led blev udtaget én kolbe til analyse ved forsøgets start samt efter 3, 10, 17, 39 og 52 døgn.

Resultat: Faldet i den svampehæmmende virkning i ekstrakter fra ubehandlet, autoklavret og bestrålet jord tilsat 100 ppm *benomyl* er vist i figur 4. Resultaterne er angivet som pct. af den ekstraherede fungicidmængde ved forsøgets start.

Resultaterne viser et hurtigere fald i ekstrak-



Figur 4. Bestandighed af den svampehæmmende virkning i ubehandlet, autoklaveret og bestrålet jord tilsat 100 ppm *benomyl*. Analyseret ved at ekstrahere jordprøverne med ætylacetat og måle ekstrakternes hæmningsvirkning overfor *Penicillium sp.*, som vist i figur 2. Analysen er udført ved forsøgets start og med mellemrum i indtil 52 dage.

Fungistatic effect in extracts from untreated, autolaved and radiated soil added 100 ppm *benomyl*. The soils were incubated at 25°C and bioassayed with *Penicillium sp.* on the first day and periodically up to 52 days.

terne fra ubehandlet jord end fra autoklaveret og bestrålet jord. Ved sidste udtagning efter 52 døgn inkubation, er den svampehæmmende virkning i ekstrakten fra den ubehandlede jord faldet til ca. 50 pct., medens virkningen i ekstrakter fra autoklaveret og bestrålet jord kun er faldet til ca. 80 pct.

Jordtypens indflydelse på benomyls bestandighed
 For at undersøge hvilken indflydelse jordtypen har på faldet i den fungicidmængde, som kan ekstraheres fra jord, blev følgende tre jorder med vidt forskelligt humusindhold inkuberet med 100 ppm *benomyl*:

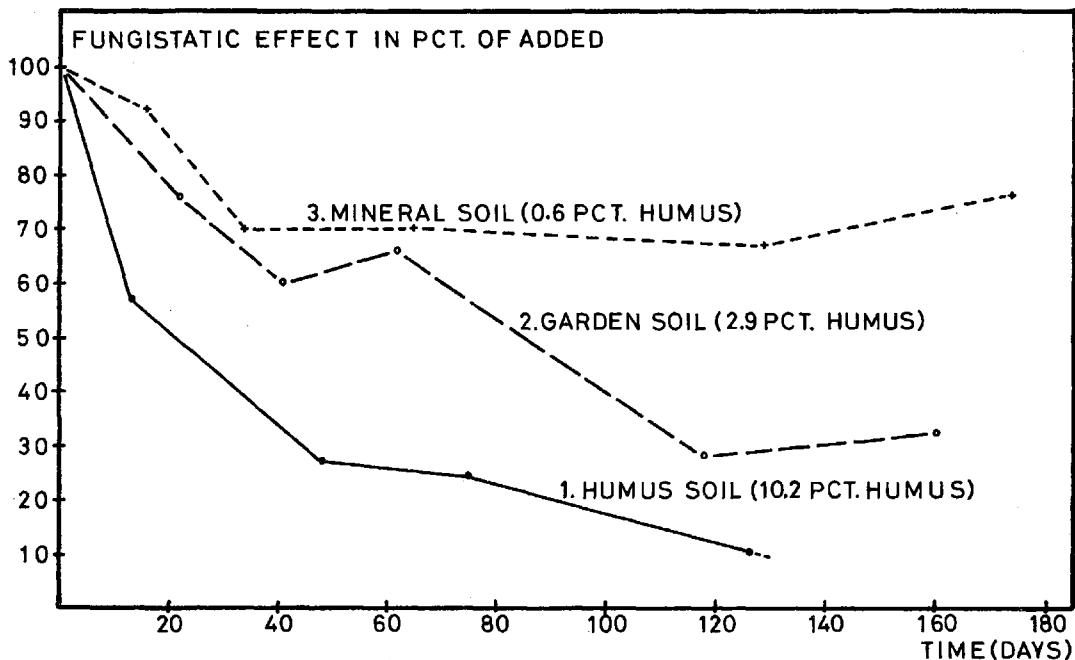
1. Dyndjord fra Lammefjorden, udtaget i 0-20 cm dybde, med indhold på 10,2 pct. humus, 6,7 pct. ler, 19,9 pct. silt, 38,9 pct. finsand, 24,1 pct. grovsand og med pH (H₂O) 7,7.
2. Havejord fra Statens Planteavlslaboratorium, udtaget i 0-20 cm dybde, med 2,9 pct.

humus og øvrige analysedata som beskrevet i det foregående afsnit.

3. Mineraljord fra Højer, udtaget i 60-90 cm dybde, med indhold på 0,6 pct. humus, 6,4 pct. ler, 3,4 pct. silt, 89,2 pct. finsand, 0,4 pct. grovsand og med pH (H₂O) 8,1.

De tre jorder blev tilsat *benomyl* i vandig suspension. Efter blanding blev jorden tilsat vand til 50 pct. af vandkapaciteten og inkuberet ved 25°C i flasker med 100 g jord i hver. En flaske fra hver jord blev med mellemrum udtaget til analyse. Dyndjorden blev analyseret efter 13, 48, 75, 126 og 174 døgn; havejorden efter 22, 41, 62, 118 og 160 døgn og mineraljorden efter 16, 34, 65, 129 og 174 døgn inkubation. Alle jorder blev desuden analyseret ved forsøgets start.

Resultat: Figur 5 viser faldet i den svampehæmmende virkning i ekstrakter fra de tre jorder. Det fremgår af resultatet, at den svampe-



Figur 5. Bestandighed af den svampehæmmende virkning i 3 forskellige jordtyper tilsat 100 ppm *benomyl*. 1: Dyndjord med 10,2 pct. humus; 2: Havejord med 2,9 pct. humus; 3: Mineraljord med 0,6 pct. humus. Analyseret ved at ekstrahere jordprøverne med ætylacetat og måle ekstrakternes hæmningsvirkning overfor *Penicillium sp.*, som vist i figur 2. Analysen er udført ved forsøgets start og med mellemrum i indtil 6 måneder.

Fungistatic effect in extracts from different soil-types added 100 ppm *benomyl*. The soils were incubated at 25 °C and bioassayed with *Penicillium sp.* on the first day and periodically up to 6 months. 1: Humus-rich soil with 10.2 pct. humus; 2: Garden soil with 2.9 pct. humus; 3: Mineral soil with 0.6 pct. humus.

hæmmende virkning falder hurtigst i ekstrakterne fra dyndjorden; efter 126 døgn inkubation er virkningen således faldet til ca. 10 pct. af den tilsatte, efter 174 døgn kunne der ikke måles rester af fungicidet med den biologiske test. Efter 160 døgn inkubation af havejorden er virkningen i ekstrakterne faldet til ca. 30 pct., ekstrakter fra mineraljorden viser derimod stadig et højt indhold af fungicidet, efter 174 døgn inkubation kunne der stadig ekstraheres ca. 75 pct. af den tilsatte fungicidmængde.

Det er yderligere undersøgt, om flere svampehæmmende forbindelser optræder under fungicidets nedbrydning. Til dette formål blev ekstrakterne chromatograferet på silicagel-plader og fremkaldt ved påsprøjtning af en suspension af *Penicillium sp.*, som beskrevet foran.

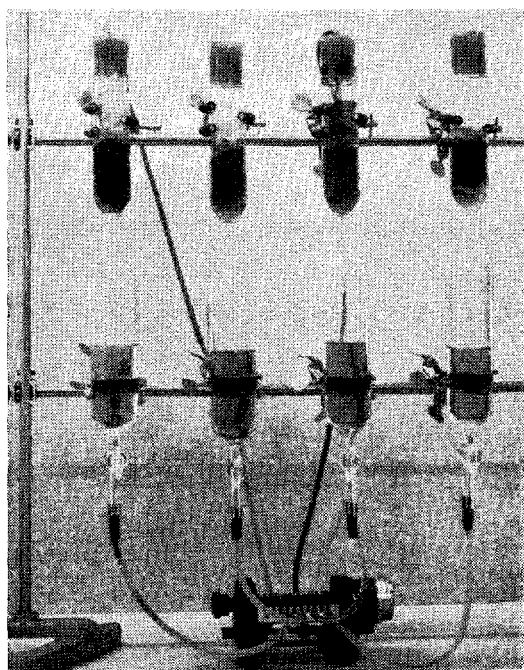
I alle ekstrakterne stammede den svampe-

hæmmende virkning fra nedbrydningsproduktet *MBC*, idet pletter uden svampevækst kun optrådte på chromatogrammerne, hvor *MBC* ifølge figur 2 er beliggende.

5. Isolering af benomyl-nedbrydende organismer fra jord

Metode: Organismer, som kan nedbryde *benomyl*, blev isoleret fra jord, som gennem ca. 6 neder var blevet behandlet med *benomyl*holdigt vand i et perfusionsapparat, der ses i figur 6 (Wright and Clark 1969). En slangepumpe til-dryppede kontinuerligt *benomyl*holdigt vand fra de nederste beholdere til overfladen af jord-søjlerne i de øverste beholdere.

Fortyndinger af den *benomyl*behandlede jord blev spredt på overfladen af et agarsubstrat, der var tilsat 400 ppm *benomyl* som væsentligste



Figur 6. Perfusionsapparat benyttet til ophobning af *benomyl*-nedbrydende organismer i jord. Nederst ses en slangepumpe, som fra reservoirerne i midten af billedet tildrypper pesticidholdigt vand til de fire jordsøjler i de øverste beholdere.

Soil perfusion apparatus used for enrichment of soil with *benomyl*-degrading microorganisms. A peristaltic pump at the lower part of the picture adds pesticide-containing water from the reservoirs to the soil columns in the top.

C- og N-kilde. Substratet blev fremstillet af 600 ml 0,06 M Na_2HPO_4 , 400 ml 0,06 M KH_2PO_4 , 20 mg FeSO_4 , 200 mg MgSO_4 , 7 H_2O , 100 ml jordekstrakt og 15 g agar, pH 7,0 (Anderson 1970)¹.

Den sterile, smeltede agar blev tilsat *benomyl*, som var suspenderet i vand ved ultralyd-behandling og steriliseret ved bestråling med 4 Mrad. På grund af fungicidets lave opløselighed i vand giver de tilsatte 400 ppm substratet et meget tåget og uigennemsigtigt udseende. Pladerne blev inkuberet ved 25° C i termostat.

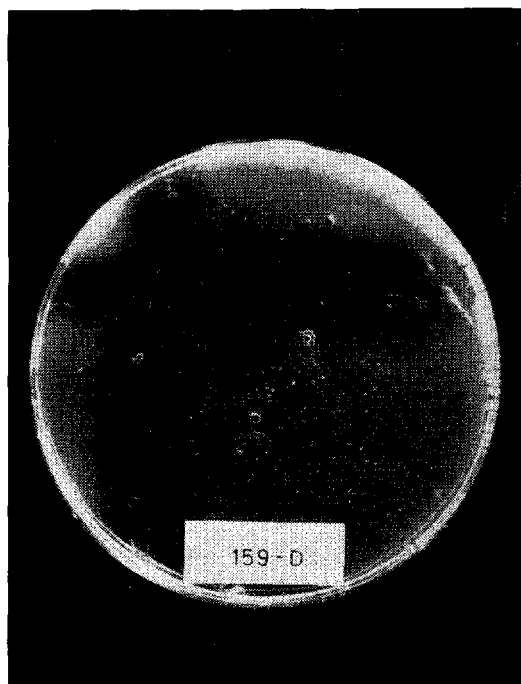
Resultat: Efter ca. 2 måneders inkubering

¹) Personlig meddelelse, Dr. J. R. Anderson, Jealotts Hill Bracknell, Berks., England.

fremkom enkelte kolonier omgivet af en klar zone, hvor den suspenderede *benomyl* var forsvundet. Gentagne overpodninger til friske *benomyl*-substrater resulterede i isolering af fire kolonier af bakterier og to svampekolonier. Ingen af de isolerede organismer er endnu identificeret.

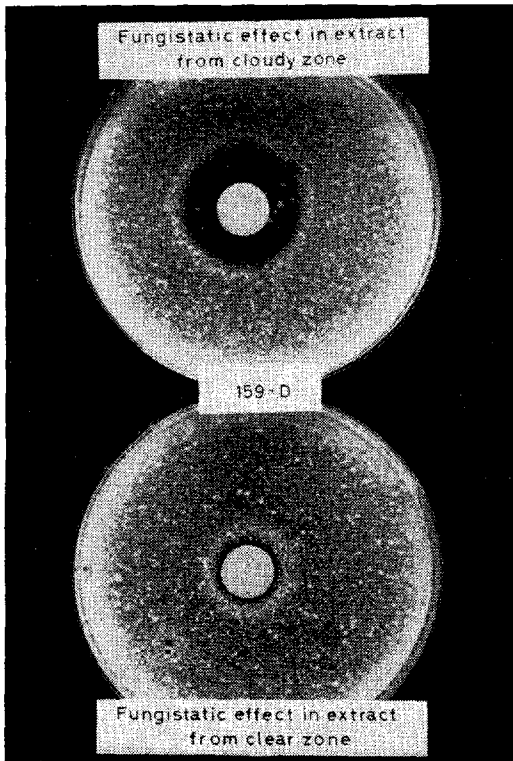
I figur 7 ses en Petriskål med *benomyl*-agar 2 måneder efter stregpodning med en af de isolerede bakterier (159D). Det fremgår af billedet, at organismens vækst har resulteret i en klaring af agaren.

For at undersøge om den svampehæmmende virkning er fjernet i de klare zoner, blev det sammenlignet, om ekstrakter fra den klare og



Figur 7. Mineralagar tilsat 400 ppm *benomyl*, fotograferet 2 måneder efter stregpodning med en bakterie (159D). Bakterien har under sin vækst, fjernet de uopløselige *benomyl*-partikler i agaren, der ses derfor klare zoner hvor bakterien har vokset.

Mineral agar containing 400 ppm *benomyl* inoculated with streaks of bacterial strain 159D. The photo was taken after two months of incubation. Clear zones where the insoluble *benomyl* particles have been removed can be seen where the bacteria have grown.



Figur 8. Væksthæmning af *Penicillium sp.* forårsaget af ekstrakter af den klare og uklare agar vist i figur 7. Nederst ses hæmningsvirkningen i ekstrakt fra den klare zone, hvor bakterien har vokset og øverst virkningen i ekstrakten fra den uklare agar.

Fungistatic effect in extracts from clear and cloudy agar shown in figure 7. Cores were cut out from the clear and cloudy agar and extracted with ethylacetate (1:20 w/v), bioassayed as shown in figure 2. The lowest dish shows the fungistatic effect in extract from clear zone where the bacteria has grown, and on top is shown the effect in extract from the cloudy agar.

uklare agar havde samme svampehæmmende virkning overfor *Penicillium sp.*

Agarskiver på 5 mm i diameter blev udskåret fra klare og uklare zoner og ekstraheret med ætylacetat i forholdet 1:20 (vægt/volumen). Ekstrakterne blev opsøgt i sterile filtrerpapirskiver, som blev bragt på overfladen af maltpepton-agar podet med *Penicillium sp.*, som tidligere beskrevet.

Figur 8 viser resultatet af denne test. Den svampehæmmende virkning er tydeligt mindre i den klare zone omkring stregpodningen end i den uklare agar. Ekstrakten fra den klare zone (nederste skål) viser næsten ingen svampehæmmende virkning, medens ekstrakten fra den uklare agar, som vist på den øverste skål, giver en tydelig hæmning af testsvampens vækst omkring filtrerpapirskiven. Bakteriens vækst har således resulteret i nedbrydning af *benomyl* til forbindelser uden svampehæmmende virkning.

6. Diskussion

Ved tyndtlags-chromatografisk adskillelse af ekstrakter fra jord tilsat *benomyl* viste det sig, at kun det svampehæmmende nedbrydningsprodukt *methyl-2-benzimidazol carbaminsyre (MBC)* blev genfundet (se figur 2). Da *benomyl* ifølge *Kilgore and White (1970)*, *Clemons and Sisler (1969)* og *Peterson and Edgington (1969)* er ustabil i vandig suspension og her vil fraspalte *butylcarbamoylsidekæden* under dannelse af det nævnte *MBC*, (se figur 1) er dette resultat ikke overraskende.

Faldet i den svampehæmmende virkning blev sammenlignet henholdsvis i ubehandlet, autoklaveret og bestrålet jord, som var tilsat 100 ppm *benomyl*. Resultatern af denne undersøgelse, der er vist i figur 4, tyder på, at nedbrydningen er biologisk, idet der er hurtigere fald i den svampehæmmende virkning i ekstrakter fra den ubehandlede end fra autoklaveret og bestrålet jord.

En del af faldet, i den mængde fungicid, der kan ekstraheres fra jorden, kan muligvis skyldes, at *benomyl* adsorberes til jordpartikler og derfor er vanskeligt at ekstrahere.

Ved at undersøge jordtypens indflydelse på bestandigheden af 100 ppm *benomyl* er fundet en tydelig indflydelse af jordtypen på faldet i *benomyl*koncentrationen. Resultatet er vist i figur 5; der ses hurtigst fald i ekstrakter fra dyndjord med 10,2 pct. humus, noget langsommere i havejord med 2,9 pct. humus og kun et meget lille fald i mineraljord med 0,6 pct. humus. Hvorvidt disse resultater viser den reelle nedbrydning i dyndjorden, eller om en væsent-

lig del af faldet her skyldes, at fungicidet med tiden adsorberes til jordpartikler og derfor ikke kan ekstraheres, giver undersøgelsen ikke noget svar på. Men ved sammenligning med undersøgelserne af *Hock et al.* (1970) og *Schreiber et al.* (1971) samt oplysninger fra *C. J. Delp* (1972)¹, har adsorptionen sandsynligvis betydning for fjernelsen af den svampehæmmende virkning. Årsagen til den langvarige virkning i mineraljorden er muligvis, at der i denne jord er ekstremt dårligt miljø for mikrofloraen.

Til nærmere belysning af forannævnte resultater er der startet undersøgelser, hvori der benyttes ¹⁴C-mærket *MBC*.

Som en bekræftelse på at mikrofloraen tager del i fjernelsen af *benomyls* svampehæmmende virkning fra jorden, er der isoleret *benomyl*-nedbrydende organismer fra en jord, som gennem ca. et halvt år var behandlet med *benomyl*. Organismerne blev isoleret på en mineralagar med *benomyl* som C- og N-kilde, og var i stand til at omdanne de uopløselige *benomyl*partikler i agaren til ikke-svampehæmmende forbindelser (se figur 7 og 8).

7. Konklusion

De opnåede resultater viser, at den svampehæmmende virkning i *benomyl*behandlet jord skyldes nedbrydningsproduktet *MBC*. Undersøgelsen tyder endvidere på, at jordbundens mikroflora er af betydning ved fjernelse af *benomyls* virkning fra jord. Denne konklusion underbygges af, at der fra jord blev isoleret mikroorganismer, som var i stand til at nedbryde *benomyl* i agar.

Jordens indhold af organisk stof ser også ud til at have stor betydning, idet et højere humusindhold i jorden medførte hurtigere fald i den ekstraherbare *benomyl*koncentration.

Selv om denne undersøgelse således viser, at *benomyl*koncentrationen under visse forhold falder ret hurtigt, må det sandsynligvis ventes, at midlet vil være ret stabilt på friland under danske forhold.

¹) Personlig meddelelse: *Dr. C. J. Delp*, DuPont de Nemours, Wilmington Delaware, USA.

Erkendtlighed

Teknisk *benomyl* og *MBC* er stillet til rådighed af DuPont de Nemours. Bestråling af jorder og suspensioner er udført ved Atomenergikommissionens Forsøgsanlæg, Risø. Ved forsøgenes udførelse har laboratorieassistent Marianne Bach medvirket. Forfatteren takker hermed for hjælpen.

8. Summary

After addition of the fungicide *benomyl* to soil, the only fungistatic compound that could be extracted was the breakdown product methyl 2-benzimidazole carbamic acid (*MBC*); even when extracted a few hours after addition the whole amount of *benomyl* was converted to *MBC*. The compounds were separated on thin-layer plates and visualized by spraying a suspension of *Penicillium sp.* on the developed chromatogram (figure 2).

The fungistatic effect in extracts from respectively untreated, autoclaved and radiated soil was measured at intervals up to 52 days incubation with 100 ppm *benomyl*. *Benomyl* was added from a suspension in water sterilized by radiation, incubation temperature 25°C. The fungistatic effect in the extracts was measured by a bioassay, using a *Penicillium sp.* as test-organism, the bioassay is shown in figure 3.

The results from this experiment shown in figure 4 indicate that the decrease in fungistatic effect is related to microbial activity. After 52 days incubation extracts from the untreated soil contained about 50 pct. of the original fungistatic effect, while the effect in extracts from autoclaved and radiated soil was 80 pct. of the original.

The soil type also influenced the decrease in concentration of fungicide in extracts. 100 ppm *benomyl* was added to three different soil types: a humus-rich soil with 10.2 pct. humus, a garden soil with 2.9 pct. humus and a mineral soil with 0.6 pct. humus, incubated at 25°C.

Figure 5 shows the amount of fungicide that could be extracted at intervals during incubation of the soil for six months. The concentration of fungicide decreased at a faster rate in extracts from humus-rich soil than from garden soil and slowest in extracts from mineral soil. After six months of incubation the fungistatic effect in the extracts was below 10 pct. from humus soil, from garden soil about 30 pct., and from mineral soil

there could still be extracted about 75 pct. of the amount added.

From soil treated with *benomyl* in a soil perfusion apparatus (figure 6) four colonies of bacteria and two colonies of fungi were isolated.

The organisms were isolated and grown on a mineral agar with soil extract and 400 ppm *benomyl* as source of carbon and nitrogen. Addition of the insoluble fungicide made the agar very cloudy and as shown in figure 7 growth of the organisms resulted in clearance of the cloudy agar. In figure 8 is compared the fungistatic effect in extracts from the clear zones with extracts from the cloudy agar, it is shown that the fungistatic effect has been almost removed in the clear zones where the bacteria has grown.

Litteraturliste

- Clemons, G. P. and Sisler, H. D.* (1969): Formation of a Fungitoxic Derivative from Benlate. *Phytopathology*, Vol. 59, 705-706.
- Hine, R. B.; Johnson, D. L. and Wenger, G. J.* (1969): The Persistence of Two Benzimidazole Fungicides in Soil and Their Fungistatic Activity Against *Phytophthora omnivorum*. *Phytopathology*, Vol. 59, 798-801.
- Hock, W. K.; Schreiber, L. R. and Roberts, B. R.* (1970): Factors Influencing Uptake, Concentration and Persistence of Benomyl in American Elm Seedlings. *Phytopathology*, Vol. 60, 1619-1622.
- Kilgore, W. W. and White, E. R.* (1970): Decomposition of the Systemic Fungicide 1991 (Benlate). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 5, 67-69.
- Kovács, Georg* (1967): Den biologiske metodes anvendelse til påvisning af fungicider på sædekorn. *Nyere erfaringer. Tidsskrift for Planteavl. Bd. 71*, 392-395.
- Lacroix, L. et Terlain, B.* (1970): Etude d'une methode biologique pour l'identification et le dosage de residus de fungicides organiques sur les vegetaux. VII^e Congres International de la Protection des Plantes. Paris Sept. 744-745.
- McLaren, A. D.; Luse, R. A. and Skujins, J. J.* (1962): Sterilization of Soil by Irradiation and Some Further Observations on Soil Enzyme Activity. *Soil Science Society Proc.*, Vol. 26, 371-377.
- Peterson, C. A. and Edgington, L. V.* (1969): Quantitative Estimation of the Fungicide Benomyl Using a Bioautograph Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 17, 898-899.
- Schreiber, L. R.; Hock, W. K. and Roberts, B. R.* (1971): Influence of Planting Media and Soil Sterilization on the Uptake of Benomyl by American Elm Seedlings. *Phytopathology*, Vol. 61, 1512-1515.
- Wright, S. J. L. and Clark, C. G.* (1969): Controlled Soil Perfusion with a Multi-Channel Peristaltic Pump. *Weed Research*, Vol. 9, 65-68.

Manuskript modtaget den 25. oktober 1972.