

Bakterio-geografiske Studier.

Nogle Undersøgelser over
Azotobacters Forekomst i dansk Jord.

Af Thjelvar Molér.

Som de tilforladeligste Metoder for systematisk-diagnostiske Undersøgelser har man betragtet Serumreaktionerne (Agglutination, Præcipitinreaktion). Men bortset fra, at de ikke er helt specifikke («Gruppereaktioner») og saaledes ingenlunde kan give utvetydige Svar, frembyder de ogsaa tekniske Vanskeligheder. Blandt nyere Fremgangsmaader til Adskillelse af morfologisk identiske eller hinanden meget nærstaaende Bakterierformer fortjener først og fremmest den Metode at nævnes, som betjener sig af de respektive Organismers Evne eller Mangel paa Evne til at udnytte forskellige Kulstof- og Kvælstofkilder.

Den første, som benyttede denne Metode, var *Th. Smith*¹⁾, men først gennem *C. O. Jensens*²⁾ omfattende Undersøgelser over Tyfus-Coli-Gruppen viste det sig, hvilken stor Betydning denne Fremgangsmaade havde for Bakteriernes Systematik. Den Smith-Jensenske Grundsætning kunde i Korthed formuleres som: Bakterier, der med Hensyn til deres Spaltningsevne (eventuelt Produktion af Luftarter og Forandring af Brintionkoncentrationen) forholder sig paa samme Maade over for forskellige C- og N-Mole-

¹⁾ *Th. Smith*: The Fermentation Tube. The Wilder Quatercentury Book. Ithaca 1893.

²⁾ *C. O. Jensen*: Adskillelse og Gruppering af nærstaaende Bakterierformer ved deres Forhold til kemiske Forbindelser. Oversigt over Det kgl. danske Vid. Selsk. Forhandl. 1910, Side 156—182.

kyler, hører til samme systematiske Enhed. Dette lader sig anskueliggøre ved følgende Eksempel:

Gæringssskema for tre Bakterier af Tyfus-Coli-Gruppen
(sammenstillet efter *C. O. Jensen*).

0 = ingen Spaltning af Sukkerarten.

S = Spaltning af Sukkerarten med paafølgende Syredannelse.

G = Spaltning af Sukkerarten med paafølgende Luftudvikling.

<i>Bacterium</i>	Dekstrose	Maltose	Mellibiose	Lactose	Saccharose og Raffinose
<i>typhi</i>	S	S	S	0	0
<i>paratyphi B.</i>	SG	SG	SG	0	0
<i>coli</i>	SG	SG	SG	SG	SG

Allerede denne lille Tabel viser med al ønskelig Tydelighed, at man med denne Metode let kan adskille Bakterier fra hinanden, som i morfologisk Henseende er identiske, men som i fysiologisk og klinisk Henseende (ved deres eventuelle Patogenitet) forholder sig helt forskelligt. Ved at indføre en større Mængde Kulstof- (og Kvælstof-)kilder i Forsøgene er det lykkedes *C. O. Jensen* at fastslaa Forekomsten af et betydeligt Antal Stammer (Arter), som udgør Rene Linier, idet deres Spaltnings-evne synes at være uforanderlig.

Den Smith-Jensenske Gæringsmetode har hidtil alene fundet Anvendelse i den medicinsk-bakteriologiske Diagnostik. Imidlertid maa den betragtes som særlig egnet til Undersøgelse af Jordbunds bakterier, thi de Oplysninger, som vi faar om vedkommende Organismers Evne til at udnytte forskellige Kulstof- og Kvælstofkilder, er værdifulde, ikke blot fra et diagnostisk, men fremfor alt ogsaa fra et plantegeografisk Synspunkt. Jo større Evne en Bakterie har til at drage Nytte af forskellige Næringsstoffer, desto større er ogsaa dens Mulighed for, under i øvrigt lige Forhold, at faa større Udbredelse. Omvendt kan en Bakterie med stærkt specialiserede Næringskrav kun faa disse tilfredsstillende forholdsvis sjældent og er saaledes henvist til færre Lokaliteter.

Det er ud fra dette Synspunkt, at Forf. har udført nogle Gæringsforsøg med *Azotobacter*, hvilken Bakterie saa meget mere egner sig som Ledorganisme ved en bakterio-geografisk

Studie, som den i Almindelighed er yderst let kendelig paa sine store Celler. Hertil kommer, at næppe nogen anden Jordbakteries Forekomst gennem simple Metoder kan konstateres med større Sikkerhed end netop denne aërobe, kvælstofbindende Bakterie.

*Beijerinck*¹⁾ anfører ved sin Beskrivelse af *Azotobacter chroococcum* en Mængde Kulstofforbindelser, som han har fundet kan udnyttes af denne Organisme. Men hans Forsøg var »Ophobningsforsøg«, og hans Iagttagelser angaar Raakulturer. At *Azotobacter chroococcum* i Renkultur kan fremvise en anden Assimilationsevne end i Raakultur, er blevet sandsynliggjort af *Krainsky*²⁾, som angiver, at f. Eks. Saccharose, som *Beijerinck* fandt let tilgængelig for denne Bakterie, ikke assimileres af den i Renkultur. Manglen paa Overensstemmelse i Forsøgsresultaterne angaaende *Azotobacters* Trang til Kulstoffs næringsmidler er særlig blevet paapeget af *Harald R. Christensen*³⁾, som endog fremsætter den Mulighed, at forskellige *Azotobacter*stammer forholder sig forskelligt over for de enkelte Kulstofforbindelser.

Gæringsforsøg.

For at udfinde, hvilke organiske Forbindelser *Azotobacter chroococcum* kan benytte til at dække sit Kulstofbehov, udførtes der den 10. Juni 1914 følgende Forsøg. 10 cm³ af en Næringsopløsning, bestaaende af Aqua dest. 100 ccm + 0.02 g K₂HO₃PO + 0.02 g CaO₂CO + 0.5 g af vedkommende organiske Forbindelse, blev fyldt paa 30 cm³-Flasker, som derpaa steriliseredes ved i to paa hinanden følgende Dage at underkastes 20 Minutters Kogning i Autoklave uden Overtryk og i Mellemtiden at henstaa i Termostat ved 37° C. At eventuelt forekommende sporebærende Bakterier i Næringsopløsningerne var blevet dræbte, fremgik af det negative Resultat af Udstrygningen paa Bouillon-Agar, som efter Forsøgets Afslutning blev fore-

¹⁾ *M. W. Beijerinck*: Ueber oligonitrophile Mikrobe. Centralbl. f. Bakt. II. Bd. 7 (1901), S. 570.

²⁾ *A. Krainsky*: *Azotobacter chroococcum* und seine Wirkung im Boden. Centralbl. f. Bakt. II. Bd. 20 (1908), S. 731.

³⁾ *Harald R. Christensen*: Om Binding af Luftens frie Kvælstof ved frit levende Mikroorganismer. Tidsskrift for Landbrugets Planteavl, 16. Bind, 1909, Side 312.

taget fra Kontrolflaskerne. Ved den anvendte Steriliseringsmetode bliver Sandsynligheden for en Spaltning af specielt Kulhydrater, som kan ventes at indtræde ved højere Temperatur og længere Varmeindvirkning, reduceret til et Minimum.

Tabel 1. *Azotobacter chroococcums* Evne til at benytte forskellige Kulstofkilder.

	Monohexoser				Pentoser			Disaccharider				Tri-saccharider
	Fruktose	Galaktose	Glykose	Mannose	Arabinose	Xylose	Ramnose	Lactose	Maltose	Saccharose	Cellobiose	Raffinose
Stamme 5323.	++	++	++	++	⊕	⊕	⊖	⊖	++	++	++	++
— Beijerinck	++	++	++	++	⊕	⊕	⊕	⊕	++	++	++	++
— Vogel	++	++	++	++	⊕	⊕	⊕	+	++	++	++	++
Kontrol	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Polysaccharider			Polyvalente Alkoholer						Poly-pentose	Cellulose 8-acet.	
	Amylum	Dextrin	Inulin	Glycerin 3-atom.	Erytrit 4-atom.	Adinit 5-atom.	Duleit 6-atom.	Mannit 6-atom.	Etyl-alkohol	Xylan		
Stamme 5323.	++	+	⊕	+	⊕	⊕	⊕	++	+	+	⊕	⊕
— Beijerinck	++	+	⊕	+	⊕	⊕	⊕	++	+	⊕	⊕	○
— Vogel	++	+	⊕	+	⊕	⊕	⊕	++	+	⊕	⊕	○
Kontrol	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Hver Flaske blev podet med en Øse (2 mm i Diameter) i fysiologisk Kogsaltopløsning opslemmet, 3 Dage gammel Azotobacterkultur fra Mannit-Agar. Da det allerede ved dette orienterende Forsøg var af Interesse at finde, om de forskellige Stammer i det store og hele besidder samme Evne til at drage Nytte af forskellige Kulstofkilder, anstilledes der tre parallelle Serier, hver paa tre Flasker af hver Næringsopløsning. Podningsmaterialet bestod af følgende Stammer: 1) en Stamme, som rendyrkedes af Jordbundsprøve Nr. 5323 fra Statens Plante-

avls-Laboratorium¹⁾; 2) en Stamme fra *Beijerinck*; 3) en Stamme fra *Vogel*; de sidstnævnte Stammer var godhedsfuldt overladte mig af Professor *Westermann*.

De med *Azotobacter-chroococcum*-Stammer podede Flasker henstode 10 Dage i Termostat ved 29° C. Forsøgsresultatet ses af Tabel 1, hvor ++ betyder meget stærk Vækst, + tydelig Vækst, ⊕ tvivlsom Vækst og ○ ingen Vækst. Som tvivlsomme er betegnet de Tilfælde, hvor der i den ene af de med samme Kulstofkilde forsynede Flasker (eller eventuelt i begge) kunde konstateres en svag Hindedannelse²⁾.

Allerede det ovenfor refererede Forsøg viser, at *Azotobacter chroococcum* i Renkultur har en stor Evne til at udnytte Kulstofkilder af højst forskellig kemisk Beskaffenhed, hvad der er af største Betydning for denne Bakteries geografiske Udbredelse. Derimod fremgaar det, at Pentoserne ikke, saaledes som *Löh- nis*³⁾ anfører, hører til de for *Azotobacter* særlig egnede Kulstofkilder. Overensstemmelsen mellem de tre anvendte Stammer i gæringsfysiologisk Henseende er iøjnefaldende. Blot hvad angaar Laktosens Næringsværdi giver Forsøget Anledning til Tvivl i saa Henseende. Ikke een af de paa langt fra hinanden adskilte Steder isolerede Stammer har forholdt sig som af *Krainsky*⁴⁾ fundet, d. v. s. savnet Evne til at drage Nytte af Saccharose, Erytrit o. s. v.

¹⁾ Laboratoriebestyrelsen *Harald R. Christensen* har med største Beredvillighed stillet det meste af det her anvendte Undersøgningsmateriale til min Raadighed; herfor saa vel som for den velvillige Interesse, hvormed han har omfattet mit Arbejde, bringer jeg ham herved min hjerteligste Tak.

²⁾ Det kunde ved første Øjekast se ud, som om en Kvælstofbestemmelse var den sikreste Metode til at afgøre, om et Næringsstof kan udnyttes af *Azotobacter*. At dette imidlertid ikke er Tilfældet, fremgaar af følgende. *Azotobacter* holder saa godt Hus med sit fra Luften bundne Kvælstof, at Kvælstofmængden i en kraftig, 10 Dage gammel Hinde af denne Bakterie fra Overfladen af *Beijerincks* Mannitopløsning ved et Forsøg blot viste sig at bestaa af 0.00 mg (jvf. *Thjelvar Molér*: Ein Beitrag zur Kenntnis des durch *Azotobacter* fixierten Stickstoffes. Botaniska notiser för år 1915. Lund. S. 163—177). Den Bakterieu udvikling, der som iøjnefaldende Uklarhed, »Trübung«, er let at iagttage i en Kulturvædske, lader sig derfor ikke paavise gennem den almindeligt brugte Kvælstofbestemmelses-Metode.

³⁾ *F. Löhnis*: Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. 1910. S. 685.

⁴⁾ *A. Krainsky*, l. c.

Med de Kulstofforbindelser, som i det foregaaende Forsøg gav negative eller tvivlsomme Resultater — og dette gælder specielt Pentoserne og de 4- og 5-atomige Alkoholer — maatte Forsøget gentages. Dette skete den 7. Juli 1914 under de samme Forhold som tidligere. Foruden de tre til Podningsmaterialet benyttede Stammer indførtes endnu to, af hvilke den ene (Stamme Christensen) blev isoleret paa Statens Planteavls-Laboratorium (modtaget den 27. April 1914) og den anden isoleredes af mig selv fra Jordbundsprøve Nr. 5272. For at reducere Muligheden af, at den i forrige Forsøg konstaterede svage Azotobacterudvikling skulde fremkaldes af det i Luften forekommende bundne Kvælstof (Ammoniak), nedsattes Forsøgstiden nu til det halve, og Termostaten opstilledes i et Lokale, hvor der ikke foregik noget kemisk Laboratoriearbejde. Efter 5 Dages Forløb viste der sig følgende Resultat:

Tabel 2. *Azotobacter chroococcums* Evne til at benytte forskellige Kulstofkilder (Kontrollforsøg).

	Stamme 5223	Stamme 5272	Stamme Christensen	Stamme Beijerinck	Stamme Vogel
Laktose	○	○	○	+	+
Arabinose	○	○	○	○	○
Xylose	○	○	○	○	○
Ramnose	○	○	○	⊕	⊕
Dulcit	+	+	+	+	+
Adonit	○	○	○	○	○
Erytrit	+	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	+	+
Xylan	+	+	+	+	+
Cellulose 8-acet. ...	○	○	○	○	○
Kontrol (Saccharose)	++	++	++	++	++

Hvad der først og fremmest er iøjnefaldende, er Overensstemmelsen mellem de tre af danske Jordbundsprøver isolerede *Azotobacter*-Stammer. Forsøget bekræfter, at denne Bakterie i Renkultur ikke i Pentoserne besidder de passende Kulstofkilder, som foranledigede *Löhnis* til at antage, at disse Sukkerarter, som gennem Pektinstofferne tilføres Jorden i rigelig Mængde, skulde være særlig egnede dertil. At Pentoserne dog ikke er fuldstændig ubrugelige, fremgaar af den Maade, hvorpaa Stammerne Beijerinck og Vogel forholder sig over for Ramnose. Parallelismen mellem disse to Stammer er paa-

faldende i Betragtning af begge Stammers Evne til i nogen Grad at udnytte Laktose, og man turde paa Grund heraf være berettiget til at anse dem for identiske. Paa den anden Side viser der sig en fuldkommen Overensstemmelse mellem de tre danske *Azotobacter*-Stammer indbyrdes. Der rejser sig da det Spørgsmaal, om Uligheden mellem disse to Grupper er saa stor, at den kræver en systematisk Sondring af *Azotobacter chroococcum* i to Former. Efter mine endnu ikke afsluttede Undersøgelser herom er dette ikke nødvendigt¹⁾. En vis laktosespaltende Evne turde findes hos alle ældre Stammer, idet der efter al Sandsynlighed under »Kulturen« foregaar en Forskydning af den enzymatiske Evne. Det er snarere overraskende, at Forandringen af Enzymvirksomheden ikke strækker sig længere, end det har vist sig i de to Forsøg; man kunde vente, at en Afgivelse paa eet Punkt medførte, at Spaltningsevnen ændredes paa flere Punkter. Stammerne Beijerinck og Vogels Forhold over for Ramnose afgiver ikke nogen Støtte for en saadan Antagelse. De af mig udførte Gæringsforsøg gør det sandsynligt, at *Azotobacter chroococcum* er et, systematisk set, specielt ensartet Begreb: de undersøgte danske Stammer hører til samme Form, som sikkert ogsaa er identisk med den »mellemeuropæiske«.

Da Cellobiose og Glykose, der begge er Spaltningsprodukter af Cellulose, har vist sig at være fortræffelige Kulstofkilder for *Azotobacter chroococcum*, ligger det antageligt nær, at denne Bakterie maaske gennem Enzymproduktion kan drage Nytte af de i Jorden i største Udstrækning forekommende Polysaccharider. Cellulose 8-acetat, som faas gennem Cellulosens Nedbrydning ved den kemiske Fremstilling af Cellobiose, kunde, som det fremgaar af Tabel 1, ikke udnyttes af *Azotobacter chroococcum*. Dette hindrer dog ikke, at der hos denne Bakterie kan findes cellulosespaltende Enzymer, efter som Celluloserens Arbejdsmaade endnu er temmelig, for ikke at sige helt, uoplyst.

¹⁾ Prof. *Beijerinck* har overladt Serumlaboratoriet en *Azotobacter*-Stamme med stor Evne til at udnytte Laktose. Om denne Stamme skal opfattes som en selvstændig *Azotobacter chroococcum*-Form, har det ikke været mig muligt at afgøre.

Da den i det foregaaende benyttede Metode paa Grund af Cellulosens Uopløselighed ikke lod sig anvende, benyttedes følgende Fremgangsmaade: Kemisk ren Cellulose fremstilledes gennem en Fældning med HCl af en ammoniakholdig Kobberkarbonatopløsning, hvori det reneste Filtrerpapir opløstes fuldstændigt. Efter gentagne Dekanteringer og 3 Døgn's Dialyse i rindende Ledningsvand (tilsidst Aqua destillata) fik jeg et Produkt, som ikke gav Spor af Reaktion over for AgNO_3 , og som ikke heller indeholdt noget Cu (konstateret ved Flammereaktion). Med denne fældede, kemisk rene Cellulose fremstilledes Cellulose-Agar efter *Mc Beth* og *Scales*¹⁾, og efter at dette Produkt var blevet steriliseret paa samme Maade som i det foregaaende Forsøg, fordeltes det i Petri-Skaale. Til Agaren i tre af de seks ved Forsøget anvendte Skaale sattes 1 pCt. af henholdsvis Cellobiose, Glykose og Mannit, og paa det størknede Substrat anlagdes Stregkulturer med *A. chroococcum* (Stamme Nr. 5323). Efter 5 Dages Ophold i Termostat ved 29° C. viste det sig, at der var indtraadt kraftig Vækst i de Skaale, hvor de opløselige Kulhydrater var blevet tilsatte, medens de øvrige saavel makroskopisk som mikroskopisk var uforandrede. Efter yderligere 15 Dages Opbevaring i Stuetemperatur havde *Azotobacter* antaget sin typiske brunsorte Farve og blev nu fotograferet. Nogen cellulosespaltende Evne turde denne kvælstofbindende Bakterie, efter hvad Forsøget har udvist, ikke besidde.

Da de udførte Gæringsforsøg har vist, at *Azotobacter chroococcum* maa opfattes som en særdeles vel afgrænset Art, er det af Interesse at sammenligne den med andre Bakterierformer, der er blevet regnede til samme Slægt. Jeg indskrænkede fra Begyndelsen af min Opgave til en Sammenligning mellem *A. chroococcum* paa den ene Side og *A. Beijerincki*, *A. Winelandii* og *A. agile* paa den anden Side. Da de to sidstnævnte Arter udskiller det af dem producerede Farvestof til deres Omgivelse, synes dette at tyde paa en Stofomsætning af hel anden Art og tillige at forudsætte en Enzymvirksomhed, som er afvigende fra *Azotobacter chroococcum*. *A. Beijerincki* danner ikke noget Farvestof og skulde egentlig blot heri adskille sig fra *A. chroococcum*. Dens Opdager, *Lipman*, angiver endog at have isoleret

¹⁾ J. G. *Mc Beth* and F. M. *Scales*: The Destruction of Cellulosa by Bacteria. Wash. 1913.

den fra en Raakultur, som stammede fra Jord i Landbohøjskolens Have i København. Imidlertid synes *A. Beijerinckis* Eksistens mærkeligt nok ikke at være hævet over enhver Tvivl. Blandt det meget store Antal *Azotobacter*-Stammer, jeg har undersøgt i henholdsvis Raa- og Renkultur, og som hidrører fra forskellige Egne i Danmark, er det ikke lykkedes at finde nogen Form, som ikke før eller senere antog en brunsort Farve. Under Arbejdet med disse Undersøgelser indgik der til Serumlaboratoriet fra *Kraals* Laboratorium i Wien en Bakterie under Navn af *A. Beijerincki*; det viste sig imidlertid (den 20.

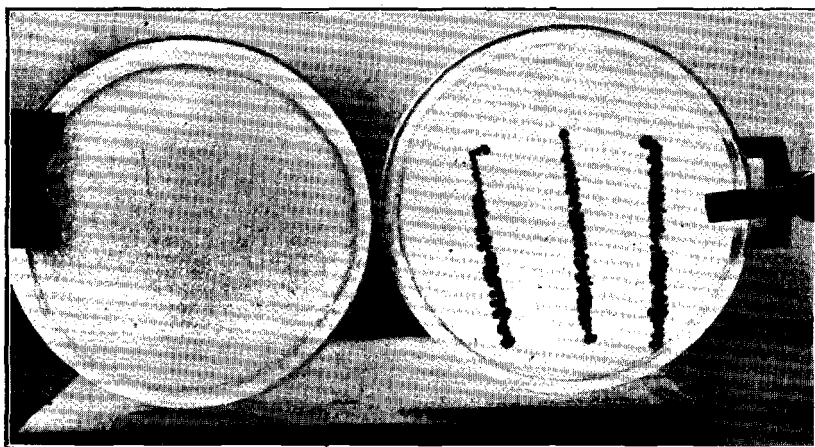


Fig. 1. Stregkulturer af *Azotobacter chroococcum*. I Petri-Skaalen til venstre kun Cellulose-Agar; til højre Cellulose-Agar + 1 pCt. Cellobiose.

Juni 1914), at det ikke var andet end en sporebærende Form af *Bacterium Megaterium*-Typen, der i Udseende mindede om en *Azotobacter*. Paa Grund af den under Verdenskrigen vanskelige Forbindelse med Amerika henvendte Serumlaboratoriets Direktør, Prof., Dr. C. O. Jensen sig til Prof. *Beijerinck* i Delft, der dog vel turde formodes at maatte være i Besiddelse af den efter ham opkaldte Art. Den af Prof. *Beijerinck* i den Anledning indsendte Bakterie var ligeledes en *Megaterium*form! I en skriftlig Meddelelse siger han selv, at den Bakterie, som han havde modtaget fra *Löhnis*, »sandsynligvis har været *B. megaterium*, og om Kvælstofbinding er der naturligvis ikke Tale«.

Da *Azotobacter Beijerinckis* Eksistens saaledes endnu maa

siges at være underkastet Tvivl, opererede jeg ved mine sammenlignende Forsøg udelukkende med *A. chroococcum*, *A. Winelandii* og *A. agile*. Forsøgene iværksattes (den 20. Oktober 1914) paa følgende Maade: 10 cm³ af de respektive Næringsopløsninger (2 pCt.) afpipetteredes i 20 cm³-Flasker. Disse undersøgte efter 10 Dages Henstand i Termostat (28° C.) med følgende Resultat:

Tabel 3. Sammenligning mellem Gæringsevnen hos *Azotobacter*-Arterne.

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. Winelandii</i>	<i>A. agile</i>
Fruktose	++	++	++
Galaktose	++	++	++
Glykose	++	++	++
Mannose	++	++	++
Arabinose	○	+	+
Xylose	⊕	+	+
Ramnose	⊕	+	+
Laktose	○	++	++
Maltose	++	++	++
Saccharose	++	++	++
Cellobiose	++	++	++
Raffinose	++	++	++
Amylum (solubile)....	++	+	+
Inulin	++	+	+
Dextrin	+	+	+
Glycerin	+	+	+
Erytrit	⊕	+++!	+++!
Adonit	○	○	○
Dulcit	+	+	+
Mannit	++	++	++
Xylan	+	+	+
Amygdalin	○	○	○
Glykogen	○	○	○
Kontrol (ikke podet)...	○	○	○

I højeste Grad iøjnefaldende er Overensstemmelsen i Gæringsevne hos *A. Winelandii* og *A. agile*.

Mine Resultater frembyder paa dette Punkt en Bekræftelse af *Löhnis'* og *Westermanns*¹⁾ Anskuelse, at *A. Winelandii*, som efter *Lipman* skal være stærkt udbredt i dyrket Jord i Amerika (New Jersey), er identisk med *A. agile*, som *Beijerinck* stødte

¹⁾ *F. Löhnis* und *T. Westermann*: Ueber stickstofffixierende Bakterien. IV. Centralbl. f. Bakt. II. Bd. 22. S. 234—254.

paa i en Kanal i Delft. Den amerikanske og europæiske »Arts« Samhørighed sandsynliggøres ogsaa derved, at det Farvestof, som fra Bakterielegermerne diffunderer ud i Næringsvædskerne, fremviser de samme fysiske og kemiske Egenskaber. Mine Undersøgelser afgiver ingen Støtte for *Lipmans* Angivelse af, at Farvestoffet hos *A. Winelandii* skulde udmærke sig ved en særlig gulrød Tone: en saadan viste sig nemlig i gamle Kulturer af begge »Arterne«. Hverken en orienterende spektroskopisk Undersøgelse af Farvestoffet¹⁾ eller dettes ensartede Kvælstofindhold²⁾ afgiver noget Holdepunkt for den Antagelse, at de to »Arter« ikke skulde høre til samme systematiske Enhed.

Sammenligner vi nu Gæringsevnen hos *A. agile-Winelandii* paa den ene Side med Gæringsevnen hos *A. chroococcum* paa den anden Side (Tabel 3), ser vi, at Ligheden er umiskendelig. Pentoserne synes imidlertid at være adskilligt lettere tilgængelige for den første af de to Arter end for den sidste. Særlig paafaldende er dog *A. agile-Winelandii*s Udnyttelse af Laktose og Erytrit; kun Stivelse og Inulin synes bedre egnede til at dække *A. chroococcum*s Kulstofbehov. Da Laktose ikke (i det mindste under visse Betingelser) er utilgængelig for *A. chroococcum*, og ligeledes Erytrit i nogen Grad turde kunne udnyttes af den, er Forskellen mellem denne Art og *A. agile-Winelandii* ikke større end, at man ogsaa gæringsfysiologisk maa anse det for rigtigt at henføre dem begge til samme Slægt, *Azotobacter*, hvilket *Beijerinck* ogsaa allerede har gjort af morfologiske Grunde.

Gennem *Beijerincks* i sin Enkelthed geniale Ophobningsmetode har man faaet et Middel til let at forvise sig om Forekomsten af *Azotobacter chroococcum* i forskellige Jorder. Man behøver blot til *Beijerincks* Mannitopløsning (2 pCt. Mannit + 0.02 pCt. K_2HPO_4) at sætte nogle Gram af den Jord, som skal undersøges. Indeholder Jorden *Azotobacter chroococcum*, saa udvikler denne Bakterie sig allerede i Løbet af et Par Dage i en Hinde paa Overfladen af Mannitopløsningen, hvis Kulturerne opbevares ved den kvælstofbindende Organismes Optimal-

¹⁾ Mine Undersøgelser over *Azotobacter*-Farvestoffets Natur vil der blive gjort Rede for i en særlig Meddelelse.

²⁾ Jvf. *Molér*, l. c., Side 175.

temperatur, 25—29° C. Forekomsten af *Azotobacter chroococcum* staar i nøjeste Sammenhæng med Jordens Reaktion og Indhold af basiske Stoffer. De videst gaaende Undersøgelser over Forbindelsen mellem *Azotobacters* Forekomst og Jordens Reaktion og Basicitet er blevet udførte af *Harald R. Christensen*¹⁾; de resulterede i hans i praktisk Henseende betydningsfulde Metode til Konstatering af Jordens Kalktrang.

Om nogen anden *Azotobacter*art end *A. chroococcum* forekommer i den danske Mikroflora, er et Spørgsmaal af lige saa stor teoretisk som praktisk Interesse. En særlig Betydning maatte det nemlig have, om *A. agile-Winelandii* blev fundet her, da denne Art ved sin større kvælstofbindende Evne og sin Egenskab: at kunne udskille opløselige Kvælstofforbindelser, maa betragtes som økonomisk fordelagtigere. Ved Konstateringen af *A. chroococcums* Forekomst gennem Podning af *Beijerincks* Mannitopløsning med Jord foreligger der utvivlsomt den Mulighed, at denne Bakterie tager i den Grad Overhaand, at andre Arter ikke kan udvikle sig. For at undgaa dette og prøve, om *A. agile-Winelandii* kunde findes, benyttede jeg mig af denne Arts fra *A. chroococcum* afvigende Gæringsevne. Ved at erstatte Mannit med Laktose og Erytrit (jvf. Tabel 4) bliver *A. chroococcum* holdt tilbage, saa at *A. agile-Winelandii*, hvis den findes, faar Lejlighed til at udvikle sig. Et saadant Forsøg udførtes den 12. Marts 1915 med 34 friske Jordbundsprøver fra forskellige Dele af Landet, som jeg modtog fra Statens Planteavlslaboratorium. Under sterile Kauteler sattes 5 g af hver Jordbundsprøve til 50 cm³ steril Næringsopløsning (1 pCt. Mannit + 0.02 pCt. K₂HPO₄; Ledningsvand) og blev 10 Dage deri. Efter denne Tids Forløb var der i en Del af Kulturerne indtraadt meget kraftig Vækst; for Sammenlignings og Kontrols Skyld var en Prøve af hver Jord blevet overført i Mannit og Ramnose. Da imidlertid en saa stor Mængde som 5 g Jord kunde tænkes at indeholde tilstrækkelig meget af opløseligt Kvælstof til Udvikling af ikke-kvælstofsamlende Bakterier, foretoges en Omstikning af Kulturerne til frisk, steril Nærings-

¹⁾ *Harald R. Christensen*: Nyere Principper i Jordbundsforskningen (Afsnittet: Undersøgelser over *Azotobacter chroococcums* Forekomst og Udbredelse i danske Jorder), Tidsskrift for Landbrugets Planteavl, 13. Bind, 1906, og i Studier over Jordbundsbeskaffenhedens Indflydelse paa Bakterielivet og Stofomsætningen i Jordbunden, Tidsskrift for Planteavl, 21. Bind, 1914.

Tabel 4. Azotobacters Forekomst i forskellige Jordprøver.

Forsøgsnummer	Jordbundsprøve fra	Reaktion paa Lakmus	Udvikling af Azotobacter				Amøber i Mannit = m Ramnose = r, o.s.v.	Anmærkninger
			Mannit	Ramnose	Laktose	Erytrit		
1	Frenderup, Stege	neutral	+	○	○	+	e	{ Ingen Hinde- dannelse
2	— — — — —	neutral	++	○	○	++	e l	
3	— — — — —	neutral	○	○	○	○	—	
4	— — — — —	neutral	○	○	○	○	—	{ Skimmelsvamp- Hyfer i l
5	Horsens, Skorping	sur	○	○	○	○	—	
6	— — — — —	svagt sur	○	○	○	○	—	
7	Eskebjerg, Svebølle	svagt sur	○	○	○	○	—	
8	— — — — —	svagt sur	○	○	○	○	—	
9	— — — — —	stærkt sur	○	○	○	○	—	
10	— — — — —	stærkt sur	○	○	○	○	—	do.
11	Manderup, Skibby	svagt alk.	++	○	○	○	m	do.
12	— — — — —	alkalisk	++	○	○	○	m	do.
13	— — — — —	svagt alk.	++	○	○	○	m l	do.
14	— — — — —	svagt alk.	++	○	○	○	—	do.
15	Stureby, Præstø	svagt alk.	++	○	○	○	—	do.
16	— — — — —	stærkt alk.	++	+	+	+	—	
17	Holbæk Slot, Holbæk	neutral	○	○	○	○	—	
18	Torbenfeldt, Mørkøv	neutral	○	○	○	○	—	
19	— — — — —	svagt alk.	++	○	○	○	—	
20	— — — — —	neutral	+	+	+	+	—	
21	— — — — —	svagt alk.	++	++	++	++	m r l e	
22	Løvenborg, Regstrup	stærkt sur	○	○	○	○	—	
23	— — — — —	alkalisk	++	+	+	+	—	
24	— — — — —	svagt alk.	++	+	+	+	—	
25	— — — — —	sur	○	○	○	○	—	
26	Mosegaard, Storehedinge	stærkt alk.	++	++	+	+	—	Meget svag Vækst i e do.
27	— — — — —	svagt alk.	++	++	+	+	—	
28	— — — — —	svagt alk.	+	++	++	++	—	
29	Gislingeborg, Gislinge	stærkt alk.	++	○	○	○	—	Kraftig Vækst i l
30	— — — — —	stærkt alk.	++	○	○	○	—	
31	— — — — —	stærkt alk.	++	○	○	○	—	
32	Flinterupgaard, Fuglede	alkalisk	++	○	○	○	—	{ Jordprøven ind- tørret; ca. 5 Aar gammel!
33	Ugledige, Mern	svagt alk.	○	○	○	○	—	
34	Gottrup, Humlum	alkalisk	+	++	++	++	—	
35	Halle (Tyskland)	alkalisk	++	+	++	+	m r l e	

opløsning. Efter 5 Dages Ophold i Termostat (28° C.) foretoges mikroskopisk Undersøgelse af hver Kolbe, og det konstateredes, om der havde udviklet sig Azotobacter eller andre Mikroorganismer. Da jeg tidligere har iagttaget, at der i Raakulturer kan optræde Amøber, som truer de kvælstofsamlende Bakteriers

Eksistens, blev disse Protozoers Forekomst anmærket i hvert enkelt Tilfælde.

Allerede et flygtigt Blik paa Tabel 4 afgiver en kraftig Støtte for den af *Harald R. Christensen* (l. c.) opgivne Forbindelse mellem Azotobacters Forekomst og Jordens Basicitet. I sure Jorder synes overhovedet ingen Azotobacterform at komme til Udvikling. I fem af de undersøgte Jordprøver (No. 3, 4, 17, 18, 33) med neutral-sv. alkalisk Reaktion fandtes der ikke Azotobacter. Anledningen hertil maa ikke søges i, at disse Jorder ikke var tjenlige til Udvikling af Azotobacter, men Forklaringen maa være af spredningsbiologisk Natur. At dette virkelig er Tilfældet, fremgaar af, at alle disse Jordprøver ved Podning efter *Harald R. Christensens* Metode foranledigede Azotobacterudvikling. Størst Interesse i Forsøget frembyder imidlertid de Jordprøver, som viste kraftig Azotobacterudvikling i Ramnose og Laktose, eventuelt Erytrit, idet Muligheden for i dem at forefinde *A. agile-Winelandii* eller nye kvælstofbindende Bakteriearter her ikke var ringe. Til nærmere Undersøgelse viste det sig bedst at overføre de paagældende Bakterier paa fast Substrat. Den hertil anvendte Agar rensedes paa følgende Maade: Til en mættet Opløsning af almindelig Agar i nydestilleret Vand blev der sat saa store Mængder *Sulfas magnesicus* (i Substans), at Hovedmassen af Agar ved Afkøling udfældedes som fine Fnug. Efter Filtrering og omhyggelig Udvaskning med 30—40° destilleret Vand gentoges samme Behandling endnu en Gang. Det nu fremkomne Produkt opløstes og fældedes dernæst med Alkohol (96 pCt.). Efter Filtrering og Udvaskning med ren Alkohol fremkom der et snehvidt Produkt, som anvendtes efter Tørring og afgav et fuldstændig vandklart Substrat. Efter Tilsætning af 1 pCt. henholdsvis Mannit, Ramnose, Laktose og Erytrit blev der i almindelige Prøver fremstillet Skraa-Agar. Ved Podning med Renkultur af *Azotobacter chroococcum* viste det sig, at der paa Mannitsubstrat ikke fandt nogen Udvikling af denne Organisme Sted, naar dette tilberedtes med destilleret Vand.

Om dette skal tilskrives Manglen paa uundgaelige, minimale Mængder af bundet Kvælstof, eller at nogle nødvendige Mineralsalte fattedes, kunde ikke bestemt afgøres. Ved at erstatte det destillerede Vand med almindeligt Ledningsvand frem

kom der imidlertid et godt Næringssubstrat for *Azotobacter chroococcum*.

Da en Undersøgelse af Tabel 4 viste, at der i syv af de undersøgte Jordbundsprøver (20, 21, 24, 26, 27, 28, 35) udvikledes *Azotobacter* uden Hensyn til Kulstofkildernes kemiske Beskaffenhed, underkastedes to af dem (21 og 28) Spredning paa de respektive Agar-Substrater. I Nr. 21 havde Udviklingen tilsyneladende været lige kraftig i alle Næringsopløsninger, i Nr. 28 svagere i Mannit end i de øvrige. Trods gentagne Spredninger i Petri-Skaale (April og Maj 1915) og Udtagning af »mistænkte« Kolonier kunde der dog ikke eftervises nogen anden *Azotobacter*art end *A. chroococcum* med mere eller mindre stærk Pigmentering. *A. agile-Winelandii* blev lige saa lidt konstateret i disse to Prøver som i nogen af de øvrige, hvor en Udvikling fandt Sted i Laktose. Men hvorledes skal vi forklare den svagere Udvikling af *Azotobacter chroococcum* i Mannit end i Laktose ved Nr. 28 og 34? Enten har vi her at gøre med den »Laktose-*Azotobacter*«, som *Beijerinck* endnu ikke har beskrevet nærmere, eller ogsaa kan den stærke Udvikling i Laktose forklares gennem en Symbiose eller Metabiose, som den typiske *Azotobacter chroococcum* i de paagældende Raa-kulturer har indgaaet med andre Mikroorganismer.

Den foran refererede Undersøgelse er blevet udført paa Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Serumlaboratorium. Til Laboratoriets Chef, Hr. Prof., Dr. med. *C. O. Jensen*, staar jeg i den største Taknemmelighedsgæld saavel for Bistand med Raad og Daad ved Arbejdet som for den Velvilje, han stedse har vist mig.
