

Diagnostiske Undersøgelser over Lucernebakterier.

I.

Morfologiske og kulturelle Karaktertræk.

Af Erik Petersen.

333. Beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur.

I denne og 3 følgende Beretninger fremlægges Resultaterne af en Undersøgelsesrække omfattende et større Antal forskellige Stammer af Lucernebakterier sammenlignet med forskellige Stammer af *Bacterium radiobacter*.

Arbejdet, der er planlagt og ledet af Afdelingsbestyrer, mag. scient. *Erik Petersen*, er udført paa Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske Afdeling med Bistand af Assistent, Frøken *Esther Christensen*.

Beretningen er udarbejdet af *Erik Petersen*.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur.

Indhold.

	Side
Indledning	505
I. Rendyrkning og Identificering af Stamkulturer..	507
II. Almindelig Cellemorfologi	511
1. Cellernes Form og Størrelse	512
2. Bevægelse og Bevægelsesorganer	514
III. Kulturelle Karaktertræk	517
1. Koloniernes Form, Størrelse og Struktur	517
2. Væksten paa alm. Standardsubstrater	519
3. Væksten paa differential-diagn. Substrater	521
IV. Cytologiske Forhold	529
1. Cytoplasmaet	530
2. Cellevæg og Slimdannelser	532
3. Reservenæringsstoffer	534
4. Cellekærner og Kærneækvivalenter	537
V. Afgivende Celleformer	538
1. Bakteroidformer	538
2. Ernæringsmodifikationer	542
3. Udviklingscyklus og Pleomorfi	544

Lige siden det af *Beijerinck* (1888) blev paavist, at Bælplanternes Evne til at udnytte Atmosfærens frie Kvælstof og overføre det i bundet Form er betinget af visse i Rodknoldene forekommende Bakterier, er der i Litteraturen fremkommet et overvældende Antal Arbejder vedrørende disse »Knoldbakterier« og deres Biologi, der synes at frembyde Problemer af hidtil uanet Karakter. Ikke alene i videnskabelig Henseende men ogsaa for det praktiske Landbrug har disse Undersøgelser været af den største Betydning, idet det har vist sig, at Knoldbakterierne undertiden ganske mangler eller kun forekommer ret sparsomt i Jordbunden, saaledes at Knolddannelsen og Kvælstofbindingen nedsættes meget betydeligt eller udebliver totalt. For under saadanne Forhold at opnaa tilfredsstillende Udbytte af Bælgplantedyrkningen er det nødvendigt at tilføre Jorden de manglende Bakterier, der til dette Formaal forhandles som særlige Kulturer (»Nitragin«, »Azotogen«), der tilføres Frøet umiddelbart før Udsaaningen.

Saafernt der ikke foreligger særlige Forhold, indeholder danske Agerjorder som Regel tilstrækkelig mange Knoldbakterier for saadanne Bælgplantearter, der har været dyrket her i Landet i Aarhundreder (Ært, Vikke, Kløver, Bønne o. s. v.). For Lucerne og Humleagtig Sneglebælg er Forholdet derimod et andet, idet den paagældende Bakterieart, der er fælles for de to ovennævnte Kulturplanter, ikke altid synes at forekomme i tilstrækkelig Mængde i danske Agerjorder, hvorfor det tilraades at tilføre Jorden denne specielle Bakterie sammen med Udsæden. — Dette sker bedst ved Podning med særlige Bakteriekulturer (»Bakteriekulturer til Lucerne«), der er blevet fremstillet paa Statens Planteavls-Laboratorium siden 1910 (siden 1922 ogsaa af forskellige private Laboratorier). Stamkulturer til dette Formaal isoleres hvert Aar direkte fra friske Rodknolde og rendyrkes videre i Reagensglas paa et dertil egnet Næringssubstrat (»Nitragin-Agar«), der fra Laboratoriet afgives til videre Forhandling eller udsendes direkte til Forbrugerne.

Da et gunstigt Resultat af Lucernedyrkningen i ikke ringe Grad er betinget af det anvendte Podemiddels Kvalitet, er det selvsagt af den største Betydning, at de fra Rodknoldene rendyrkede Bakterier underkastes en indgaaende Undersøgelse, inden de anvendes som »Stamkulturer« til Fremstilling af de i Han-

delen værende Nitragin-Præparater. Bælgplanternes Rodknolde indeholder nemlig foruden de specifikke Knoldbakterier tillige en rig Mikroflora af forskellige andre Bakteriearter, der kun undtagelsesvis vil kunne genkendes eller bestemmes ved en simpel mikroskopisk Undersøgelse. En særlig Fare frembyder en lille stavformet Bakterie, *Bacterium radiobacter*, der er overordentlig almindelig i Rodknoldene men ganske uden Evne til selv at fremkalde Knolddannelse. Muligheden for en Forveksling af Knoldbakterierne med sidstnævnte Bakterieart hidrører ikke alene fra en vidtgaaende Overensstemmelse med Hensyn til morfologiske og kulturelle Karaktertræk, men begunstiges tillige af den Omstændighed, at begge de paagældende Bakteriearter, Knoldbakterier saa vel som *Bacterium radiobacter*, er i Besiddelse af stærkt forslimede Cellevægge, der vanskeliggør en effektiv Adskillelse af de i Rodknoldene forekommende Bakteriekonglomerater. Der vil derfor let kunne indtræde det Tilfælde, at en tilsyneladende ren Koloni af Knoldbakterier indeholder et forholdsvis ringe Antal Celler af *Bacterium radiobacter*, der efter flere paa hinanden følgende Overpodninger i Reagensglas efterhaanden helt eller delvis vil kunne fortrænge de oprindeligt dominerende Knoldbakterier, uden at dette vil kunne paavises ved en mikroskopisk Undersøgelse af den paagældende Kultur, hvis Værdi som Podemiddel aftager i samme Forhold som *Bacterium radiobacter* bliver dominerende i Bakteriekulturen. I særlige Tilfælde vil Knoldbakterierne endog fortrænges totalt, saaledes at Kulturen nu er fuldstændig værdiløs som Podemiddel.

Skønt man allerede paa et tidligt Tidspunkt har haft sin Opmærksomhed henvendt paa denne Fare og erkendt Betydningen af en sikker og hurtig Differentialdiagnose mellem *Bacterium radiobacter* og de forskellige Grupper af Knoldbakterier, volder Problemet stadig nogen Vanskelighed ved Fremstillingen af Nitragin-Kulturer. Spørgsmaalet har derfor været taget op til en samlet Undersøgelse paa Statens Planteavls-Laboratorium, idet Bestræbelserne dels har været henvendt paa Differentialdiagnosen mellem Lucernebakterier og *Bacterium radiobacter*, dels paa Forekomsten af forskellige »Typer« af Lucernebakterier udvisende indbyrdes Forskelligheder med Hensyn til kulturelle og serologiske Karaktertræk, men dog alle knyttet sammen ved deres Evne til at fremkalde kvælstofbindende Knolde paa Rødderne af Lucerne.

I. Rendyrkning og Identificering af Stamkulturer.

Til den grundlæggende Rendyrkning anvendes bedst unge, friske Rodknolde. De renses først mekanisk ved kraftig Afbørstning under rindende Vand; derpaa kortvarig Behandling med Sublimatvand (2 ‰), Afskylning i sterilt Vand og hurtig Udvaskning i 96 ‰ Alkohol ($1\frac{1}{2}$ —1 Min.), der sluttelig fjernes ved hurtig Afbrænding over en svag Gasflamme. Den saaledes steriliserede Rodknold bringes derefter over i en steril Petriskaal med nogle Draaber steril, fysiologisk Kogsaltopløsning, hvorpaa den gennemskæres og udgnides i Væsken, saaledes at denne antager en svag mælket Karakter. Spredningen foretages paa sædvanlig Vis (5—6 Fortyndingsgrader) i et Gelatinesubstrat af følgende Sammensætning:

Ekstrakt af Lucernekimplanter ¹⁾	ca. 150 cm ³
Glukose (Teknisk Druesukker).....	10.0 g
Sekundært Kaliumfosfat.....	1.0 g
Slemmet Kridt.....	5.0 g
Gelatine.....	150.0 g
Ledningsvand.....	700 cm ³

Efter 20 Minutters Kogning tilsættes en pisket Æggehvide, hvorefter Substratet filtreres gennem Foldefilter og fordeles i bomuldslukkede Reagensglas, der steriliseres ved $1\frac{1}{2}$ Times Opvarmning i strømmende Vanddamp i tre paa hinanden følgende Dage.

Saafermt den ydre Sterilisering af Rodknoldene er foretaget omhyggeligt, vil Spredningen efter 5—6 Dages Forløb overvejende bestaa af Knoldbakterier, der fremtræder som punkt-

¹⁾ Fremstilling af Kimplante-Ekstrakt: Dyrkningen af Kimplanterne foregaar i dybe, glasserede Lurfade indeholdende rent, vandmættet Sand, der er dækket af et tyndt Lag (ca. 0.5 cm) slemmet Kridt. Frøene udsaaes i saa stor Mængde, at de danner et tykt, sammenhængende Lag over hele Sandfladen. Under gunstige Betingelser (ved 25° C, regelmæssig Vanding og senere rigelig Tilgang af Lys) forløber Spiringen meget hurtigt, saaledes at de fremkomne Kimplanter allerede efter nogle Dages Forløb danner en tæt sammenhængende Bevoksning paa 5—6 cm Højde, der let fjernes fra det underliggende Sandlag. Efter Udpresning i en Frugtpresse og Frafiltrering af det uopløste Plantemateriale hældes den klare, grønne Planteeekstrakt paa bomuldslukkede Kogekolber og steriliseres ved Autoklavering. — Efter nogen Tids Henstand fremkommer ofte et voluminøst Bundfald, der inden Brugen let fjernes ved Filtrering gennem vandsugende Bomuld.

Til hver Liter af ovennævnte Gelatinesubstrat benyttes en Ekstraktmængde svarende til 4 g Tørstof, d. v. s. ca. 100—150 cm³ af den vandige Ekstrakt.

formede eller kredsrunder, graalige, helrandede, fint granulerede Kolonier med meget langsom skaal- eller kraterformet Smeltning, der som Regel først bliver tydelig efter 8—10 Dages Forløb (Fig. 1).

Overpodningen fra velisolerede Kolonier og den videre Rendyrkning af Stamkulturene foregaar bedst paa følgende Substrat:

Kimplante-Ekstrakt.....	150	cm ³
Teknisk Druesukker.....	10.0	g
Asparagin	0.75	g
Sekundært Kaliumfosfat.....	0.10	g
Slemmet Kridt	10.0	g
Agar	20.0	g
Ledningsvand	800	cm ³

Efter at Agaren er opløst i den angivne Vandmængde, tilsættes Kimplante-Ekstrakten samt Kaliumfosfat og Asparagin. Derefter yderligere $\frac{1}{2}$ Times Kogning og sluttelig Tilsætning af Druesukker og Kridt. Ingen Filtrering og ingen speciel Indstilling af Reaktionen, der paa Grund af Substratets Indhold af Kalciumkarbonat og sekundært Kaliumfosfat vil være tydelig alkalisk. — Efter Fordeling paa bomuldslukkede Reagensglas steriliseres ved Autoklavering (120 ° C i 20 Min.).

Ved Dyrkning paa ovennævnte Næringssubstrat, der i det følgende kort betegnes som »Nitragin-Agar«, udviser Kulturerne efter et Par Dages Henstand en stearinlignende, fugtligslimet Belægning, der efterhaanden glider ned ad Agarfladen og samles i Glassets nedre Del som en homogen, hvidlig Bakteriemasse (»Kondensvandsbelægning«), der ved en mikroskopisk Undersøgelse viser sig at bestaa af korte, livligt bevægelige Smaastave, der senere gaar over i et ubevægeligt Udviklingsstadium bestaaende af længere, slankere Stavformer (Fig. 3, 4 og 5). Udviser den mikroskopiske Undersøgelse ikke dette Billede, der iøvrigt er fælles for saavel Knoldbakterier som *Bacterium radiobacter* og beslægtede Former, bør den paagældende Kultur straks kasseres uden yderligere Undersøgelse. Bestaar Kulturen derimod denne foreløbige Prøve, renses den yderligere 1—2 Gange ved fornyet Spredning i Nitragin-Gelatine, hvorefter man med nogenlunde Sikkerhed tør gaa ud fra, at Kulturen nu er befriet for enhver Indblanding af fremmede Bakterier og tjenlig til at underkastes det nedenfor beskrevne Podningsforsøg, hvis Resultat er absolut afgørende for Kulturens Anvendelighed til Nitraginfremstilling.

Podningsforsøget udføres i Laboratoriet under Anvendelse af sterile Lucerneplanter, der dyrkes i Reagensglas indeholdende et syntetisk, kvælstoffrit Agarsubstrat af følgende Sammensætning:

Sekundært Kaliumfosfat.....	0.5 g
Magniumsulfat.....	1.2 g
Natriumklorid.....	0.2 g
Ferrifosfat.....	1.0 g
Normalt Kalciumfosfat.....	2.0 g
Ferriklorid, 10 % Opløsning.....	3--4 Draaber
Agar.....	1.0 g
Ledningsvand.....	1 Liter

Substratet fordeles paa høje Reagensglas (18×2.5 cm) og autokla-
veres ved 120° C. i 15 Minutter.

De til Podningsforsøget bestemte Frø steriliseres ved Afskylning i 96 % Alkohol (ca. 1 Min.), kortvarig Behandling med 2 % Sublimat-
vand og sluttelig Afskylning i 4--5 Hold sterilt Vand. I hvert Reagens-
glas udsaaes 2--4 af de saaledes steriliserede Frø, der forsigtigt anbrin-
ges paa Agarfladen ved Hjælp af en udglødet Platinøsken. For at
beskytte Rødderne mod Lys omvikles den nederste Halvdel af Glassene
med hvidt Papir, hvorefter de henstilles under gunstigst mulige Tem-
peratur- og Belysningsforhold (i Sydvindue eller Drivhus).

Spiringen paa Agarfladen forløber normalt, og allerede efter ca.
3 Ugers Forløb vil de unge Planter, der nu har opnaaet en Højde paa
10--12 cm, være tjenlige til Podning. — Denne udføres lettest ved at
udgnde en ringe Mængde af Bakteriebelægningen fra en ung Agarkultur
omkring Plantens Rodhals samt i det tynde Væskelag mellem Agar-
substratet og Glassets indre Væg. Under gunstige Betingelser iagttages
allerede efter 5--7 Dages Forløb de første Tegn til Knolddannelse i
Form af en ensidet udviklet, lokal Opsvulmning af de yngre Rodgrene,
der i Løbet af nogle Dage udvikles til typiske Rodknolde.

I Tilfælde af positivt Resultat af Podningsforsøget er den
paagældende Bakteriestamme hermed paa fyldestgørende Maade
identificeret som en Lucernebakterie. Omvendt kan et negativt
Resultat dog ikke betragtes som endeligt afgørende, idet Knold-
dannelsen ikke alene afhænger af den til Forsøget benyttede
Bakteriestamme men tillige er betinget af saavel Plantens
Udviklingsgrad som af de forhaandenværende Dyrkningsbetin-
gelser. Utilfredsstillende Belysningsforhold samt Anvendelse af
daarligt udviklede Planter eller ældre Planter uden unge Rod-
grene medfører ofte et negativt Resultat, selv naar Forsøget
udføres med fuldt paalidelige Bakteriestammer, der under opti-
male Forsøgsbetingelser giver normal Knoldudvikling. Forsøget

maa derfor altid udføres med mindst 2 Parallelglas og om fornødent gentages under ændrede ydre Betingelser.

Naar en Bakteriestammes Evne til Knolddannelse er gennemprøvet med positivt Resultat, overføres den i steril Jord, idet Bakterierne i dette naturlige Substrat bevarer deres Vitalitet og Evne til Knolddannelse usvækket gennem et praktisk talt ubegrænset Tidsrum.

Til ovennævnte Formaal anvendes bedst en frugtbar Havejord med Tilsætning af 0.5% Mannit og 0.5% Kalciumkarbonat. Efter at være gennemfugtet med destilleret Vand til en passende Fugtighedsgrad (ca. 60% af Vandkapaciteten) fordeles Jorden i veltillukkede Freudenreichskolber (ca. 25 g i hver), der autoklaveres i 2 Timer ved 120° C.

Knoldbakteriernes Vækst i disse Jordkulturer foregaar ret hurtigt, saaledes at hele Jordportionen normalt er gennemvokset allerede efter 2—3 Dages Forløb. Saaframt der kun anvendes Kolber med veltilpasset Glashætte (Normalslibning maa foretrækkes), kan disse Kulturer opbevares ca. 1—2 Aar ved Stuetemperatur, uden at Fugtighedsforholdet i Kolberne undergaar nogen væsentlig Ændring. Men selv i ældre, ganske udtørrede Jordkulturer træffes endnu et meget stort Antal levende Bakterieceller, der hurtigt kommer til Udvikling, naar en ringe Mængde af de indtørrede Jordpartikler overføres til en frisk Agarflade. — Fordelen ved Anvendelse af saadanne Jordkulturer ligger i en betydelig Reduktion af det Arbejde, der ellers er knyttet til Vedligeholdelse af en stor Kultursamling; men iøvrigt maa det ogsaa formodes, at Faren for Tab af »Virulens« (d. v. s. den knolddannende Evne) er langt mindre ved Opbevaring i Jord, der er det for Knoldbakterierne naturlige Substrat, end ved fortsat Overpodning paa kunstigt fremstillede Næringssubstrater.

Undersøgelsen omfatter 60 forskellige Stammer af Lucernebakterier isoleret paa Statens Planteavls-Laboratorium og anvendt til Nitragin-Fremstilling i Aarene 1918—38, idet der hvert Efteraar foretages Rendyrkning og Gennemprøvning af 2—3 nye Stammer, der fortrinsvis anvendes til Nitragin-fremstillingen det følgende Foraar. De ældste af Stammerne er altsaa 15—20 Aar, men har ikke desto mindre bevaret de oprindelige morfologiske og kulturelle Egenskaber næsten uændret, lige som de stadig er i Besiddelse af en kraftig knolddannende Evne. Nummereringen af Stammerne er fortløbende: Nr. 1—3 er isoleret i 1918, Nr. 59—60 i 1937. Af de til Sammenligning benyttede Stammer af *Bacterium radiobacter*

hidrører den ene fra *Králs* bakteriologiske Museum i Wien og angives at være *Beijerinck* og *van Deldens* Originalstamme; en anden Stamme hidrører fra »The National Collection of Type Cultures, London« (Stamme »*Delft*«), medens en tredje Stamme (»*S. P. L.*«) er isoleret fra en dansk Agerjord. Saavel i morfologisk som kulturel Henseende stemmer de to sidsnævnte Stammer ret godt overens med *Radiobacter*-Stammen fra *Král*. — En 4. *Radiobacter*-Stamme, der ligeledes hidrører fra *Králs* Samling og angives at være isoleret af Professor *Söhngen* i Holland, afviger derimod saa stærkt i flere af de vigtigste Karaktertræk, at der maa formodes at foreligge en Fejlbestemmelse eller Forurening, hvorfor denne Stamme ganske er ladet ude af Betragtning i den følgende Beretning.

Med Hensyn til Nomenklatur bemærkes sluttelig følgende: Medens man tidligere forenede samtlige Knoldbakterier til een, højst to forskellige Arter (*Bacterium radicola*, *Pseudomonas radicola*), samler man i nyere Tid samtlige Knoldbakterier i en særlig Slægt, *Rhizobium*, omfattende 8 forskellige Arter, af hvilke den hos Lucerne og Sneglebælg forekommende Art betegnes som *Rhizobium meliloti* (*Bergey* 1937). *Bacterium radiobacter* henføres ifølge en nyere Terminologi til Slægten *Achromobacter*, hvorfor den — navnlig i amerikanske Haand- og Lærebøger — undertiden opføres under den mindre velklin- gende Betegnelse *Achromobacter radiobacter* (sml. *Bergey* 1937, Side 230). — I det følgende betegnes Lucernebakterierne kort ved Bogstavet L, efterfulgt af den paagældende Stammes Løbe-Nr. (altsaa L_1 — L_{60}), *Radiobacter*-Stammerne derimod som henholds- vis *Radiobacter Král*, *Radiobacter Delft* og *Radiobacter S. P. L.*

II. Almindelig Cellemorfologi.

I morfologisk Henseende frembyder Lucernebakterierne ikke saadanne Ejendommeligheder, der muliggør en sikker Bestemmelse alene ved en mikroskopisk Undersøgelse, medens de dog paa den anden Side er i Besiddelse af visse morfo- logiske Egenskaber af konstant Karakter, der med Fordel vil kunne anvendes ved Artsdiagnosen.

1. Cellernes Form og Størrelse.

Ved mikroskopisk Undersøgelse af unge Kulturer paa Nitragin-Agar træffes overvejende smaa, ellipsoidiske Celler, der ved Undersøgelse i levende Tilstand (alm. ufarvet Præparat eller i »hængende Draabe«) udviser en karakteristisk Egenbevægelse, der bedst sammenlignes med den »dansende« Bevægelse af sværmende Myg. Denne Celletype er navnlig overvejende i ganske unge Bakteriebelægninger, der er opstaaet ved direkte Spiring af Podemateriale stammende fra ældre Kulturer. Allerede i 1 Døgn gl. Kulturer er Billedet dog noget ændret, idet der nu tillige optræder længere Stavformer med en mere rolig »sejlende« Bevægelse, der i Løbet af kort Tid gaar over i et ubevægeligt Udviklingsstadium indhyllet i mer eller mindre kraftigt udviklede Slimmasser, der undertiden fremtræder som en velafgrænset Slimkappe, der formodentlig virker som et Beskyttelseslag om de indesluttede Celler (»Kapselceller«, »Mikrocyster« — se Side 533 og 545). Naar dette ubevægelige Hvilestadium er naaet, er Formeringsevnen betydeligt nedsat eller helt ophævet, og Cellerne holder sig nu ret uændrede i denne Tilstand i længere Tid. Med tiltagende Alder indtræder dog sluttelig en Kontraktion af Protoplasmaet til uregelmæssige eller kugleformede Smaaklumper, der er særligt modtagelige for Farvestoffer og derved giver Anledning til den bælteformede Cellestruktur, der er saa karakteristisk for ældre Kulturer paa Nitragin-Agar (Sml. Fig. 9 og 22. — Videre se Side 544).

Cellernes videre Udvikling efter Overpodning paa nyt Substrat er afhængig af Podematerialets Alder og Udviklingsstadium. Yngre Stavformer — saavel bevægelige som ubevægelige — der overpodes paa nyt Substrat, deler sig straks videre ved simpel Tvedeling, idet de direkte omdannes til sværmende Smaaceller. Bestaar Udsædsmaterialet derimod af ældre Celler med Protoplasmaklumper i bælteformet Struktur, frigøres disse og omdannes til ubevægelige Smaakugler, de saakaldte »Præ-Sværmere«, der atter hurtigt gaar over i de ovenfor beskrevne ellipsoidiske Sværmceller. Ogsaa uden Overpodning paa nyt Substrat iagttages i ældre Kulturer undertiden en hel eller delvis Opløsning af den oprindelige Bakteriecelle, hvorved de omtalte Protoplasmaklumper frigøres og udvikles videre til nye Bakterieceller i selve den oprindelige Moderkultur.

Man har fra forskellig Side villet betragte de nævnte Protoplasma-kulper som særlige Formeringsceller («Gonidier»), der skulde være skikket til Opretholdelse og Formering af Arten, naar den sædvanlige vegetative Formering er gaaet i Staa (*Bewley* og *Hutchinson* 1920, m. fl.) — Hvorvidt disse Dannelser maa tydes som regulære Formeringsceller, forekommer dog tvivlsomt; muligvis maa de snarere sammenlignes med de hos visse Aktinomycefer forekommende »Fragmentationssporer« eller de stærkt sammenskrumpne Protoplasma-kulper, der f. Eks. er almindelige i gamle Kulturer af Pestbakterien (*Schultz* 1901 o. a.). Sml. iøvrigt Side 549.

I yngre Udviklingsstadier træffes Cellerne udelukkende enkeltvis eller parvis, medens Cellerne i det ubevægelige Stavstadium ofte forekommer i Pallisadelejring (Fig. 12). Ret almindelig er endvidere den ejendommelige stjerneformede Lejring af større Stavformer under Dannelsen af de saakaldte »Bakterierosetter«, der tidligere blev anset for et typisk Karaktertræk for *Bacterium radiobacter*, men som ifølge nyere Undersøgelser af *Stapp* og *Bartels* (1931) ligeledes er almindelig hos den nærstaaende *Phytomonas tumefaciens*, hvor Fænomenet kan fremkaldes eksperimentelt ved Dyrkning paa Substrater med Tilsætning af Jærn- eller Manganforbindelser. Ifølge *Stapp* og *Bartels* repræsenterer denne Lejringsform muligvis et Led i en primitiv Kønsproces, hvis nærmere Enkeltheder iøvrigt er ukendt (Fig. 7).

Som allerede ovenfor omtalt er Cellernes Størrelse afhængig af Kulturens Alder og Udviklingsgrad. Cellediameteren ligger dog i alle Tilfælde omkring $0.8\ \mu$, medens Længden ifølge *Bewley* og *Hutchinson* varierer omkring følgende Middeltal:

Præ-Sværmere	ca. $0.8-1.0\ \mu$
Unge ellipsoidiske Sværmceller	$1.5-2.0\ \mu$
Bevægelige Stavformer	$2.5-3.0\ \mu$
Ubevægelige Stavformer	ca. $3\ \mu$

Det maa dog understreges, at de enkelte Udviklingsstadier ikke er saa skarpt afgrænsede, som ovennævnte Tal lader formode; som oftest glider de næsten umærkeligt over i hinanden, lige som der iøvrigt ogsaa paa dette Omraade kan være nogen Forskel mellem de forskellige Stammer af Lucernebakterier.

Ovennævnte engelske Angivelser er efterprøvet ved indgaaende Maalinger af Cellerne af en af de danske Stammer (L_{25} , isoleret 1923), dyrket paa Nitragin-Agar ved 25°C . Udmaalingen af Celledimensionerne er foretaget paa en Række Mikrofotografier

af ufikserede Celler, optaget ved Hjælp af Zeiss's Mikrofotografiapparat »Phoku« (Optisk Udstyr: Zeiss's Apochromat Immersion 120 $\times$, num. Apertur 1.30, Phoku-Negativlinse 6.3). Det originale Negativ repræsenterer altsaa en Forstørrelse paa $120 \times 6.3 = 756$. Ved Fremstillingen af de positive Billeder er Negativet imidlertid forstørret op, saaledes at de til Udmaalingen benyttede Billeder svarer til en Forstørrelse paa $3600 \times$. Cellernes Dimensioner er derefter maalt ud med en Millimeter-maalestok og sluttelig omregnet i μ .

De herved opnaaede Resultater stemmer for Længdemaale-nes Vedkommende ret tilfredsstillende med de engelske Angivelser, medens Cellediameteren for den danske Stamme synes at være lidt mindre end de tilsvarende engelske Maal (0.8 μ som Middeltal af 513 Celler). Det maa dog understreges, at Opgørelser af denne Art ifølge Sagens Natur kommer til at bero paa et subjektivt Skøn: Grænserne mellem de af *Bewley* og *Hutchinson* opstillede Udviklingsstadier er jo ikke skarpt afstukne, men flyder umærkeligt over i hinanden, navnlig mellem »Ellipso-idiske Sværmceller« og »Bevægelige Stavformer«, hvor man i Praksis ofte vil støde paa Vanskeligheder ved Placering af Grænsetilfældene.

Foretages den talmæssige Opgørelse af Materialet som Helhed, uden Hensyntagen til Udviklingsstadier, faas følgende Værdier:

Længde, Maksimum	3.06 μ
Længde, Minimum	0.83 μ
Længde, Gennemsnit	1.79 μ
Cellediameter	0.78 μ
Antal maalte Celler.....	339

Den her registrerede Minimumslængde svarer ret nøje til Maalene for »Præ-Sværmene«, medens Cellerne af Maksimums-størrelse maa antages at repræsentere saavel bevægelige som ubevægelige Stavformer. — Det maa dog udtrykkeligt under-streges, at de anførte Tal kun har Gyldighed under de ved Forsøget benyttede »Standardbetingelser«, idet saavel Cellernes Form som Størrelse er stærkt afhængig af de forhaanden-værende ydre Kaar.

2. Bevægelse og Bevægelsesorganer.

I unge Agarkulturer (1 Døgn) udfører Cellerne en livlig Bevægelse, der bedst iagttages i hængende Draabe over et

hulslebet Objektglas. Som ovenfor omtalt er Bevægelsen af ret særpræget Karakter: De unge Sværnceller livligt dansende, de større Stavformer derimod med en mere »sejlende« Bevægelse.

Fra denne almengyldige og i alle Haand- og Lærebøger opstillede Karakteristik er dog paa Statens Planteavls-Laboratorium konstateret en enkelt meget bemærkelsesværdig Undtagelse, idet Stammerne L_{23} og L_{24} — begge isoleret i 1922 af den daværende Leder af den bakteriologiske Afdeling, Professor K. A. Bondorff — saavel i Isolationsaaret som i de nærmest følgende Aar viste sig ganske ubevægelige, lige som de ogsaa paa andre morfologiske og kulturelle Omraader syntes at indtage en Særstilling (Korte, mere plumpe Celleformer: se Fig. 11. — Mere vandet Vækst paa Nitragin-Agar: se Side 519. — Gelatinesmeltning: se Side 518 samt Fig. 1. — Fysiologiske og serologiske Forhold: se senere Forsøgsberetninger). Det laa under disse Forhold nær at formode en Fejlbestemmelse eller Forurening; det afgørende Podningsforsøg gav imidlertid stedse positivt Resultat (Knolddannelse i Løbet af 5—6 Dage), lige som det heller ikke var muligt ved simpel Pladespredning at paavise ringeste Forurening med andre Bakteriearter. — Der foreligger altsaa her en særlig »Type« af Lucernebakterier, tydeligt forskellig fra den almindeligt forekommende.

I Løbet af nogle Aar gennemgik denne ubevægelige Type en gennemgribende Ændring: Endnu i 1927 fremkom ved Spredning af de gamle Stamkulturer (Jordkulturer, podet 1922) kun slimet-vandede Kolonier indeholdende ubevægelige Celleformer. Fra disse Spredninger anlagdes nye Jordkulturer, der henstod urørt til April 1928, da en Spredningsanalyse udviste et overvældende Flertal af de almindelige stearinlignende Kolonier indeholdende bevægelige Stavformer, samt enkelte Kolonier af den oprindelige »vandede« Type med Celler uden Evne til aktiv Bevægelse. Ved fortsat serievis Overpodning og Spredning fra sidstnævnte Kolonier konstateredes en udpræget Tendens til at gaa over i den sædvanlige »stearinagtige« Type med bevægelige Celler. For at bevare den oprindelige »24-Type« konstant, var det derfor nødvendigt med korte Mellemrum at »stabilisere« Typen ved Spredning og Overpodning. — Trods disse Anstrengelser er det dog ikke lykkedes at bevare denne Type, der er af saa stor Interesse ikke alene i Kraft af de

afvigende kulturelle og serologiske Karaktertræk, men ogsaa i særlig Grad paa Grund af det afvigende Forhold med Hensyn til Bevægelighed, der ellers anses for et af de mest stabile Karaktertræk i den bakteriologiske Diagnostik. — Ved Afslutning af nærværende Undersøgelse (Sommeren 1939) er Stammen L_{23} gaaet definitivt tabt, medens L_{24} kun udviser bevægelige Celleformer af normal Form og Størrelse, lige som ogsaa de kulturelle og biologiske Egenskaber udviser god Overensstemmelse med den almindeligt forekommende Type.

I Aarenes Løb er gentagne Gange gjort Forsøg paa at genfinde den oprindelige »24-Type« paa samme Lokaltet som ved den første Isolation i 1922 (Landbohøjskolens Forsøgsmark). Herved er rendyrket forskellige Stammer (L_{28} , L_{36} , L_{58} og L_{59}), der vel i flere Henseender slutter sig nær til L_{23} og L_{24} i den oprindelige Form, men som dog alle udviser normal Bevægelsesintensitet.

Ogsaa enkelte andre Stammer, isoleret fra tilsyneladende »vildtvoksende« Lucerneplanter paa forskellige nordsjællandske Lokalteter, udviser en lignende slimet-vandet Konsistens som L_{23} og L_{24} i Isolationsaaret. Lige som »Landbohøjskolestammerne« udviser disse »vilde« Stammer (L_{30} , L_{31} , L_{32} , L_{33} og L_{34} , alle isoleret 1929—30) forskellige Stammeejendommeligheder, der gentagne Gange vil blive omtalt i denne og følgende Forsøgsberetninger. — Ogsaa for disse Stammers Vedkommende er Bevægelsesintensiteten imidlertid ganske normal.

Med Hensyn til den tekniske Paavisning af Lucernebakteriernes Bevægelsesorganer (Svingtraade, Cilier) bemærkes iøvrigt følgende:

I ufarvet Tilstand saa vel som i de sædvanlige Tørpræparater er Cilierne ganske usynlige, og heller ikke en Undersøgelse i Mørkgrundsbelysning (Zeiss's Cardioid-Kondensor 1925, Apochromat Immersion »X«, $60\times$, Apertur 1.05, nedblændet til Apertur 0.85), der ellers med Fordel anvendes til dette Formaal, giver helt sikre Resultater. — Harrison og Barlow (1907) anbefaler en speciel sukkerholdig Opløsning af Genti-anaviolet som særlig velegnet og bekvem til Ciliepaavisning hos Knoldbakterier; trods talrige Forsøg under varierende Forsøgsbetingelser har denne Metode dog stedse givet negativt Resultat. Derimod lykkes Paavisningen let ved Forsølvning af

Cilierne efter *Zettlows* Metode eller ved Hjælp af enhver anden af de almindelige Ciliefarvningsmetoder (*Casares Gill*, *Peppler* el. a.; se *Ficker* 1923, Side 329). Ogsaa uden Anvendelse af særlige Bejdsningsmidler opnaas undertiden et tilfredsstillende Resultat ved Fiksering i Isedikke-Alkohol (1—2 Min.), Afskyling i Ledningsvand og Farvning med Bengal-Rosa i 2—5 Minutter. Metoden, der vistnok ikke tidligere har været angivet, giver smukke og klare Præparater, men synes desværre at være af ret lunefuld Karakter.

Uanset den benyttede Fremgangsmaade finder man hos de unge Sværmceller kun en enkelt lang Cilie anbragt i den ene Cellepol, undertiden dog forskudt svagt til Siden i Forhold til Cellens Længdeakse (Fig. 3). Ogsaa de større bevægelige Stavformer udviser et Billede af lignende Karakter, idet man dog iagttager Celler, der er forsynet med to Svingtraade udgaende fra samme Cellepol, eller endog Celler med Svingtraade udgaende fra hele Celleoverfladen («*peritriche*» Cilier — se en af Cellerne i Fig. 3).

III. Kulturelle Karaktertræk.

Medens det mikroskopiske Billede af de enkelte Bakterierceller som Regel kun frembyder faa Holdepunkter af diagnostisk Værdi, giver Iagttagelsen af den makroskopisk synlige Vækst paa eller i bestemte Næringssubstrater ofte Oplysninger af afgørende Betydning for den differentialdiagnostiske Bakteriesystematik, ikke alene naar Bakterierne optræder i velafgrænsede Kolonier, men ogsaa naar de danner en tæt sammenhængende Bevoksning («Belægning») paa det paagældende Substrat. — Summen af disse makroskopisk synlige Karaktertræk betegnes som den paagældende Bakteriearts »kulturelle Egenskaber«.

1. Koloniernes Form, Størrelse og Struktur.

Kolonier paa Nitragin-Agar (7 Døgn ved 25 ° C.). Kredsrunde, 2—5 mm i Diameter, hele, helrandede, hvælvede, fugtigt-slimede, med glat, glinsende Overflade og fint granuleret indre Struktur, af Konsistens og Udseende omtrent som Stearin-draaber, der befinder sig paa Overgang fra fast til flydende Tilstandsform.

Tydelig Stammevariation, især fremtrædende hos de tidligere omtalte »Landbohøjskolestammer« samt de »vilde« Stammer, der alle danner noget større og hurtigere voksende Kolonier af mere vandet Konsistens.

Kolonier paa Lucerneekstrakt-Gelatine (7 Døgn ved 20 ° C.). Punktformede eller kredsrunde, 0.5—1 mm i Diameter, hvidlige, med fingranuleret Struktur. Svag Gelatinesmeltning, hvorved Kolonierne efterhaanden synker ned i Substratet under Dannelsen af et bælteformet Randparti af grovkornet eller »frynset« Struktur (Fig. 1).

Tydelig Stammevariation, navnlig repræsenteret af de ældre Landbohøjskolestammer (L_{23} og L_{24}), der overhovedet ikke frembyder ringeste Tegn paa Gelatinesmeltning. Kolonierne, der udviser en slaaende Lighed med Kolonier af *Bacterium radiobacter*, forbliver liggende paa Overfladen som hvælvede eller endog halvkugleformede, fugtigt glinsende Slimdraaber af mere vandet Karakter end hos den almindeligt forekommende Type af Lucernebakterier (Fig. 1).

I denne Forbindelse er der Grund til at fremhæve, at den gelatinesmeltende Egenskab synes at være særlig let tilgængelig for arveligt konstante Ændringer af mutationslignende Karakter. Ved Spredning af ældre Jordkulturer af gelatinesmeltende Stammer vil man næsten altid kunne »fraspalte« og videredyrke ikke-smeltende »Mutantformer«, der bortset fra denne Forandring iøvrigt udviser Overensstemmelse med den oprindelige »Stamform«¹⁾. Omvendt fraspalter de ikke-smeltende Stammer (L_{23} og L_{24}) regelmæssigt et stort Antal smeltende Kolonier, hvis Efterkommere bevarer den gelatinesmeltende Evne usvækket, samtidig med at de ogsaa paa andre Punkter nærmer sig den sædvanlige Hovedtype. — De i Litteraturen foreliggende Uoverensstemmelser med Hensyn til Lucernebakteriernes gelatinesmeltende Evne finder formodentlig herved sin naturlige Forklaring.

¹⁾ I Overensstemmelse med bakteriologisk Sprogbrug anvendes her og i det følgende Betegnelsen »Mutation« og »Mutanter« om springvist opstaaede og arveligt konstante Ændringer af den oprindelige Type. Det maa dog udtrykkeligt fremhæves, at Fænomener af denne Art ikke kan sidestilles med de hos højere Organismer forekommende Mutationer. — Betegnelsen »Bakteriemutation« har imidlertid for længst vundet fast Indpas i den bakteriologiske Terminologi og vil næppe i Øjeblikket kunne erstattes af andre Betegnelser af sprogligt set mere uangribelig Karakter.

2. Væksten paa de almindelige Standardsubstrater.

Ved Dyrkning paa de i Bakteriologien hyppigst anvendte Standardsubstrater udviser Lucernebakterierne følgende kulturelle Karaktertræk:

Nitragin-Agar (Stregkultur). Kraftigt voksende, stearinlignende Belægning af smøragtig Konsistens, langsomt nedglidende i Reagensglasset.

Stammevariation stærkt fremtrædende hos Landbohøjskolestammerne og de »vilde« Stammer, der danner en mere slimet vandet, graalig eller næsten vandklar Belægning, der er nedglidende allerede efter 1—2 Døgn. Makroskopisk næppe til at skelne fra unge Kulturer af *Bacterium radiobacter*. — Stammevariationen er som Regel af meget iøjnefaldende Natur. Ved Bestemmelse af Væksttypen paa Nitragin-Agar maa det dog tilraades at benytte en ikke for frisk fremstillet Agarflade, hvor Kondensvandet allerede delvis er dampet bort. Anvendes derimod vaade, friskt fremstillede Flader, udviskes Forskellen i Væksttype noget, idet den ret faste, stearinlignende Belægning, der er karakteristisk for Flertallet af Stammerne, under disse Betingelser antager en mere flydende Karakter, der let vil kunne give Anledning til en fejlagtig Vurdering af Typen.

Kød-Pepton-Agar (Stregkultur). Moderat Vækst, indskrænket til selve Podestregen. Ingen eller kun svag Kondensvandsbelægning.

Stammeforskellen betydeligt svagere fremtrædende end paa Nitragin-Agar.

Lucerneekstrakt-Gelatine (Stikkultur). Hvidlig eller graalig, flad Overfladevækst og svag, men tydelig Udvikling i Stikkanalen. Hos langt det overvejende Antal Stammer iagttages en svag Gelatinesmelting, der viser sig efter 2—3 Ugers Henstand som en svag Indsænkning af Bakteriebelægningen omkring Overfladen af Stikkanalen.

Tydelig Stammevariation. Ældre Landbohøjskolestammer: Som ovenstaaende, men uden Gelatinesmelting.

Om Tab, resp. Erhvervelse af gelatinesmeltende Evne, sammenlign ovenfor Side 518.

Kød-Pepton-Gelatine (Stikkultur). Betydeligt svagere Udvikling, men iøvrigt som foregaaende Substrat.

Kvælstoffri Mannit-Agar (Ashby's Agar). Ret god,

graalig eller næsten vandklar, slimet Belægning, efterhaanden noget nedglidende.

Ingen iøjnefaldende Stammeforskel.

Kalcium - Glycerofosfat - Mannit - Agar. Ret kraftig, slimet-vandet Belægning af mælkeagtig Farve.

Ingen Stammeforskel.

Bouillon (Difco). Svag Vækst, uden Hinde eller Ringdannelse men med svag sløragtig Overfladevækst naar Kulturerne henstaar urørt i 2—3 Uger. Iøvrigt diffus Plumring med lille, hvidligt, finkornet Bundfald.

Ingen Stammeforskel.

Mælk (Uden Indikatorilsætning, 4 Uger ved 25° C.). Ingen Hindedannelse, men hos alle Stammer en tydelig Koagulation under Dannelsen af en skarpt afsat Serumzone i øverste Del af Kulturen. Ingen Ændring af Mælkens Farve og ingen Peptonisering selv efter 8 Ugers Forløb. Hos samtlige Stammer konstateres en tydelig Reaktionsforskydning i sur Retning: Begyndelsesreaktion p_H ca. 6.5; efter 4 Ugers Henstand p_H 5.5—5.8 (bestemt elektrometrisk med Kinhydronelektroden). Koagulationen maa herefter antages at bero paa Syredannelse under Væksten.

Ingen Stammeforskel.

Kartoffel (4 Uger ved 25° C.). Som oftest ret kraftig, flad Belægning, hvidlig, graalig eller farveløs. Kartoffelstykkets Konsistens bevares uændret, men undertiden iagttages en svag graalig Misfarvning.

Nogen Stammevariation, idet navnlig L_{31} og L_{34} (men ikke L_{24} og L_{36}) til Tider udviser en mere mørkfarvet Belægning end de øvrige Stammer.

De her anførte Karaktertræk er dog af lidet konstant Natur: Selv hos en og samme Stamme iagttages efter Omstændighederne snart en relativ tør, velafgrænset Belægning, snart en mere yppig, fugtig-slimet Vækst, der ret hurtigt breder sig over hele Kartoffelfladen. Lignende Forhold gør sig gældende med Hensyn til Bakteriebelægningens Farve og den ovenfor omtalte blygraa Misfarvning af Kartoffelstykket. Resultatet afhænger i ikke ringe Grad af den anvendte Fremgangsmaade ved Kartoffelstykkernes Tilberedning og Sterilisering. Den blygraa Misfarvning af Kartoffelstykket, der undertiden iagttages selv i upodede Kontrolglas, kan indskrænkes meget betydeligt

ved kortvarig Dampkogning af Kartoflerne, inden de skæres i Stykker og autoklaveres. Men ogsaa saavel Modningsgraden som Kartoffelsorten synes at spille en afgørende Rolle. Ved sammenlignende Undersøgelser bør man derfor saa vidt muligt anvende fuldt udviklede Knolde af en og samme Kartoffelsort, f. Eks. King Edward, der efter de hidtidige Erfaringer synes at give de mest konstante Resultater¹⁾.

Som Helhed betragtet kan Væksten paa Kartoffel altsaa kun betegnes som et lidet stabilt Karaktertræk, der i hvert Fald ikke er af den afgørende differentialdiagnostiske Værdi, som navnlig tillægges den af *Lohnis* og *Roy Hansen* (1918).

3. Væksten paa specielle, differentialdiagnostiske Substrater.

Foruden med de ovenfor anførte Standardsubstrater er endvidere udført Forsøg med forskellige Substrater af mere speciel Karakter. Af de talrige Forsøg og lagttagelser fremdrages følgende:

Kongorødt-Agar. Ifølge *Kellerman* (1911) er tilsyneladende rene Kulturer af Knoldbakterier undertiden iblandet et større eller mindre Antal Celler af *Bacterium tumefaciens*, der lige som *Bacterium radiobacter* ofte forekommer i Rodknoldene sammen med de egentlige Knoldbakterier. Som diagnostisk Hjælpemiddel anbefales følgende Substrat (*Kellermans »Kongorødt-Agar«*):

Saccharose	10.0 g
Sek. Kaliumfosfat.....	1.0 g
Magniumsulfat	0.2 g
Kongorødt	0.1 g
Agar	15.0 g
Destilleret Vand.....	1 Liter

Ved Anlægning af Pladekulturer (resp. Spredninger) paa dette Substrat angives Knoldbakterierne at danne farveløse, *Bacterium tumefaciens* derimod mørkerøde Kolonier. — Ifølge nyere Undersøgelser danner *Bacterium radiobacter* imidlertid ligeledes næsten farveløse Kolonier, saaledes at Substratets Værdi til Adskillelse af Knoldbakterier og *Radiobacter*-Gruppen i hvert Fald maa betegnes som tvivlsom. (*Riker, Banfield,*

¹⁾ Ogsaa *Cutler, Ward* og *Dunkley* (1937) finder, at Bakterievæksten paa Kartoffel er stærkt afhængig af Kartoffelsort og Modningsgrad, særlig for farvestofdannende Bakterier. Som bedste Kartoffelsort angives Majestic, men ogsaa King Edward anses for tilfredsstillende.

Wright, Keitt og Sagen 1930, Side 528. — Sml. ogsaa Fred, Baldwin og Mc Coy 1932, Side 118).

Til nærmere Belysning af Spørgsmaalet er udført Forsøg omfattende samtlige Stammer af Lucernebakterier og *Bacterium radiobacter*. Forsøgene, der anlægges som Pladeudstrygninger i Petriskaale (2—3 Fortyndingsgrader), opgøres efter 5 Dages Henstand ved 20° C. med følgende Resultat:

Samtlige Stammer af Lucernebakterier: Svag Vækst. Kolonierne i 2. Fortyndingsgrad punktformede, kun ca. 0.1—0.2 mm i Diameter, næsten farveløse.

Samtlige *Radiobacter*-Stammer: Ret kraftig Vækst allerede efter 2 Døgn. Kolonierne ca. 2—3 mm i Diameter, tydeligt rosafarvede.

Ved Anvendelse af en stærkere Opløsning af Kongorødt bliver Forskellen mellem de to Grupper endnu mere fremtrædende. Forøges Koncentrationen til 0.3 g Kongorødt pr. Liter, registreres efter 3 Dages Henstand følgende:

Samtlige Lucernebakterier: Meget tynd, sammenhængende Vækst paa den stærkest bestrøgne Agarplade, men ingen synlig Udvikling af Enkelt-Kolonier i de følgende Fortyndingsgrader.

Samtlige *Radiobacter*-Stammer: Ret kraftig Udvikling af sammenhængende Bakteriebelægning paa Plade Nr. 1 og Udvikling af velisolerede Kolonier, ca. 1—2 mm i Diameter i de følgende Fortyndingsgrader. — Hele Bakterievæksten kraftig mørkerød.

En Forlængelse af Forsøgstiden giver ingen principiel Ændring af det her beskrevne Billede: Efter 6—8 Dages Forløb udviser samtlige Lucernebakterier smaa, punktformede, ret kraftigt farvede Enkelt-Kolonier, der dog med Lethed adskilles fra de langt stærkere udviklede *Radiobacter*-Kolonier. En saadan Forlængelse af Forsøgstiden afslører imidlertid nogen Forskel mellem de forskellige Grupper af Lucernebakterier, idet enkelte (bl. a. særlig L_{31} , men ikke L_{24} eller L_{36}) udviser en noget kraftigere Koloniudvikling end de øvrige Stammer uden iøvrigt i saa Henseende at kunne maale sig med *Radiobacter*-Stammerne. — Da den tilstræbte Forskel i Vækstbilledet mellem Lucernebakterierne og *Bacterium radiobacter* imidlertid er særdeles tydelig og skarp allerede efter 2 Døgn, maa det anbefales at indskrænke Forsøgstiden til dette Tidsrum.

Krystalviolet-Agar. I de senere Aar har man fra forskellige Side søgt at udarbejde differentialdiagnostiske Nærings-

substrater for Knoldbakterier ved Tilsætning af forskellige Farvestoffer af Trifenyl-Methan-Gruppen, der med saa stort Held er blevet benyttet til lignende Formaal ved Adskillelse af nærstaaende Bakteriegrupper i den bakteriologiske Mælke- og Drikkevandsanalyse.

Anderson (1929) anbefaler til ovennævnte Formaal at anvende Ashby's kvælstoffri Mannit-Agar med Tilsætning af Krystalviolet i Koncentrationen 1 : 10 000 — 1 : 15 000, der angives at virke dræbende paa *Bacterium radiobacter* men derimod ikke paa Lucernebakterierne. — Tilsvarende Forsøg er udført adskillige Gange paa Statens Planteavls-Laboratorium i den af Anderson anbefalede Form (Adskilt Sterilisation af Næringssubstrat og Farveopløsning, der først sammenblandes umiddelbart før Brugen. Pladekultur i Petriskaale). — Eksempelvis anføres følgende Forsøgsserie, udført med 4 forskellige Stammer af Lucernebakterier og 3 *Radiobacter*-Stammer (Farvestofkoncentration: 1 : 10 000; Forsøgslid: 1 Uge ved 20° C. — Krydsenes Antal betegner Vækstintensiteten):

Bakteriestamme.	Vækstintensitet.	Anm.
Samtlige Stammer af Lucernebakterier.	÷ el. ×	} Enkeltkolonier kun synlige med Lup.
<i>Radiobacter</i> Král.	×	
<i>Radiobacter</i> Delft.	××	} Enkeltkolonier ca. 1 mm i Diameter.
<i>Radiobacter</i> S. P. L.	××	

Ganske i Modstrid med Andersons Angivelser er Væksten af i hvert Fald de to af *Radiobacter*-Stammerne langt stærkere end af Lucernebakterierne. Disse sidstnævnte udviser en ringe Stammevariation, idet navnlig de »vilde« Stammer samt de sidst isolerede Landbohøjskolestammer vokser lidt kraftigere end de øvrige, medens omvendt *Radiobacter* Král udviser en svagere Vækstintensitet end de to andre *Radiobacter*-Stammer.

Værdien af dette Substrat maa herefter betegnes som tvivlsom.

Et andet differentialdiagnostisk Næringssubstrat, ligeledes indeholdende Krystalviolet, er angivet af Leonard (l. c. 1931, Side 35 — smk. ogsaa Fred, Baldwin og Mc Coy 1932, Side 42):

Jord-Ekstrakt	1000	cm ³
Sek. Kaliumfosfat	1.0	g
Natriumnitrat	1.0	g
Glycerin	10.0	g
Agar	12.5	g

Reaktionen indstilles paa pH 6.8. Sterilisering ved Autoklaving ($120^{\circ} C.$ i 20 Min.). Før Anvendelsen tilsættes en steril, vandig Opløsning af Krystalviolet, saaledes at Farvestofkoncentrationen i det færdige Substrat bliver 1 : 80000.

Substratet angives at være meget effektivt til Adskillelse af Knoldbakterier og *Bacterium radiobacter*, idet sidstnævnte danner store Kolonier med mørkeblaat eller violet Centralparti og lysere Periferi, medens Knoldbakteriernes Kolonier er smaa og ensfarvet violette.

Gentagne Forsøg paa Statens Planteavls-Laboratorium viser kun delvis Overensstemmelse med ovennævnte Angivelser. Væksten af *Bacterium radiobacter* svarer ret nøje til *Leonards* Beskrivelse; derimod udviser Lucernebakterierne en tydelig Stammeforskel, idet Flertallet (derimellem L_{25}) danner de af *Leonard* beskrevne, smaa kompakte Koloniformer, hvorimod andre Stammer (bl. a. L_{31} og L_{36}) danner større Kolonier, 0.5—1.0 cm i Diameter, bestaaende af et kompakt Centralparti af ren blaa Farve, omgivet af en lysere, slimet-vandet Periferi. Endvidere iagttages undertiden en Udspaltning af afvigende »Mutantformer«, idet Stammer, der iøvrigt forholder sig som L_{25} , ved Spredning paa *Leonards* Agar fraspalter enkelte Kolonier af den slimet-vandede Type, uden at dette iøvrigt er forbundet med Tab af den knolddannende Evne eller andre Ændringer af bestaaende fysiologiske Karaktertræk. — Ved en samtidig Undersøgelse af Cellemateriale fra de forskellige Pladekulturer udviser *Radiobacter*-Stammerne ret normal Celleform, hvorimod Lucernebakterierne — uanset Kolonitype — karakteriseres ved Tilstedeværelsen af talrige »Involutionsformer« af stærkt afvigende Karakter.

Anvendelsen af *Leonards* Agar til differentialdiagnostiske Formaal kan herefter kun anbefales i Forbindelse med en mikroskopisk Kontrol af Celleformen, idet man samtidig erindrer, at Fremkomsten af større, vandede Kolonier ikke behøver at tyde paa en Forveksling eller Forurening med *Bacterium radiobacter*, men meget vel kan bero paa Stammeforskelligheder eller Afspaltning af »Mutantformer« af afvigende Karakter.

I Tilslutning til foregaaende Forsøg er sluttelig udført en Række Undersøgelser paa Nitragin-Agar med Tilsætning af forskellige Mængder af Krystalviolet. Forsøgene opgøres efter 3 Ugers Henstand ved $25^{\circ} C.$ med de i Tabel 1 opførte Resultater.

Tabel 1. Vækstintensitet paa Nitragin-Agar med Tilsætning af varierende Mængder af Krystalviolet. Krydsenes Antal betegner den relative Vækstintensitet.

Bakteriestammer	Farvekoncentration					
	1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000	1 : 8000	1 : 16000	1 : 40000
L_{24}	÷	÷	×	×	×	×
L_{25}	÷	(×)	×	×	×	×
L_{31}	÷	×	×	×(×)	×	×
L_{36}	÷	÷	(×)	×	×	×
L_{38}	÷	÷	×	(×)	×	×
L_{60}	÷	(×)	(×)	×	×	×
<i>Radiobacter</i> Krål ...	÷	×	×	×	×	×
<i>Radiobacter</i> S.P.L. ...	÷	×	×	×	×	×

Som det vil ses, er *Bacterium radiobacter* S. P. L. noget mindre ømfindtlig over for Farvestoftilsætningen end de øvrige undersøgte Bakteriestammer. Herefter følger *Radiobacter* Krål samt L_{31} og L_{24} , der udviser kraftig Vækst ved Koncentrationen 1 : 8000, medens de øvrige Stammer af Lucernebakterier først opnaar maksimal Udvikling ved Fortyndingsgraden 1 : 40000. — Den mikroskopiske Undersøgelse af Kulturerne viser navnlig i middelstærke Koncentrationer (1 : 4000—1 : 16000) talrige forgrenede Celler med tydeligt nedsat eller helt manglende Spiringsevne, der utvivlsomt maa betragtes som »Involutionsformer« af degenerativ Karakter. Fænomenet er navnlig tydeligt fremtrædende hos samtlige Stammer af Lucernebakterier, i ringere Grad derimod hos *Radiobacter*-Stammerne. Eksempelvis kan anføres Fortyndingsgraden 1 : 16000, hvor den mikroskopiske Undersøgelse efter 4 Dages Henstand giver følgende Resultat:

L_{24} : Kun forholdsvis faa Involutionsformer.

L_{25} og L_{31} : Talrige Involutionsformer.

L_{36} , L_{58} og L_{60} : Overvejende Involutionsformer (Fig. 20).

Radiobacter-Stammerne: Celler af næsten normal Karakter.

Som Resultat af samtlige Forsøg med Tilsætning af Krystalviolet fremgaar altsaa, at differentialdiagnostiske Substrater af denne Karakter ikke er særligt velegnede til Adskillelse af Lucernebakterier og *Bacterium radiobacter* og i hvert Fald kun kan benyttes i Forbindelse med en mikroskopisk Undersøgelse af Celleformen. Endvidere er der ganske aabenbart en tydelig indbyrdes Forskel mellem de undersøgte Stammer af Lucernebakterier, der staar i Korrelation til andre, morfologiske og kulturelle Karaktertræk. Resultatet svarer saaledes ret nøje til nogle tidligere Undersøgelser af Wright (1925) vedrørende Sojabønnebakterierne, der paa serologisk Grundlag kan inddeles i to vel adskilte Grupper, af hvilke den ene hæmmes totalt ved en Krystalviolet-Koncentration omkring 1:50 000, medens den anden taaler Koncentrationen 1:10 000. — Hvorvidt disse Egenskaber er af ganske fast Karakter, forekommer dog noget tvivlsomt. Burke og Burkey (1925) angiver saaledes et udpræget Tilfælde af eksperimentelt fremkaldt »Tilvænnning« til højere Koncentrationer af Krystalviolet, der dog atter hurtigt udviskes ved kortvarig Dyrkning paa farvestoffrit Substrat. I Tilslutning til Churchman (1912, 1921) maa man vistnok regne med, at almindelige Kulturer af Knoldbakterier indeholder Celler med forskellig Resistens over for Krystalviolet. Ved Dyrkning i Substrater med høj Farvestofkoncentration sker der en »Ophobning« af de mere resistente Celler, der maaske kun har været yderst svagt repræsenteret i den oprindelige »Bakteriepopulation«. Hele Spørgsmaalet hænger aabenbart nøje sammen med Fremkomsten af de saakaldte »Bakteriemutationer« og disses konstante Karakter. Sammenlign Side 518.

Selv om de her fremdragne Ejendommeligheder ikke kan frakendes en vis diagnostisk Betydning, er det dog paa sin Plads at advare mod en rigoristisk Afgørelse af Arts- eller Stammespørgsmaal paa Grundlag af Karaktertræk, der aabenbart er af ret ustabil Natur.

Medens nogle Bakteriologer betragter Knoldbakterierne som staaende nær *Azotobacter*-Gruppen (Bergey 1936), peger man fra

anden Side paa visse Tilknytningspunkter til *Coli-Aerogenes*-Gruppen (Fred, Baldwin og Mc Coy 1932), idet man bl. a. henviser til, at den for *Azotobacter*-Gruppen karakteristiske Kvælstofbinding ikke synes at kunne iværksættes af Knoldbakterierne i fritlevende Tilstand men kun i nøje Symbiose med de til Bakterierne svarende Bælgplantearter. — Under Henvisning til dette formodede Slægtskabsforhold med *Coli Aerogenes*-Gruppen er derfor udført endnu et Par Forsøgsrækker med følgende Substrater, der har vist sig at være af særlig Værdi ved Differentialdiagnostiken af *Bact. Coli*:

Galde - Pepton - Laktose - Gentianaviolet - Bouillon.
Fremstillingen af Substratet foregaar efter følgende Recept:

- | | |
|---|--|
| a) 50 g Oksegalde | } Steriliseres ved Auto-
klavering. |
| 10 g Pepton | |
| 1 Liter dest. Vand | |
| b) 10 g Laktose | |
| 10 cm ³ dest. Vand | |
| 4 cm ³ 1 % vandig Opl. af Gentianaviolet | |

Opløsning b koges i 5 Minutter og sammenblandes med a. — Henstand til Bundfældning, Frahældning paa sterile Reagensglas og slutte-
lig Sterilisation i strømmende Vanddamp (20 Minutter i 3 paa hinanden
følgende Dage).

Undersøgelsen omfatter samtlige Stammer af Lucerne-
bakterier samt de tidligere omtalte *Radiobacter*-Stammer. For-
søget opgøres efter 6 Dage ved 25° C. med følgende Resultat:

Samtlige Stammer af Lucernebakterier: Kun meget svag Vækst
i Form af et finkornet Bundfald; den ovenstaaende Væske ganske
klar.

Radiobacter-Stammerne: Lidt stærkere Vækst; mere grovfnugget
Bundfald samt enkelte grove, hindeagtige Fnug i den ovenstaaende
Væske.

Betydeligt større Forskel opnaas ved Dyrkning i samme
Substrat med Tilsætning af 1.5 % Agar (ligeledes Sterilisering
i strømmende Vanddamp). — Forsøget anlægges her som Plade-
kulturer (Udstrykning i to Fortyndingsgrader), der efter 6 Dages
Henstand ved 25° C. giver følgende Resultat:

Samtlige Stammer af Lucernebakterier: Meget ringe Vækst.
Kolonierne i 2. Fortyndingsgrad kun synlige med Lup.

Radiobacter-Stammerne: God Vækst. Kolonier makroskopisk synlige allerede efter 1—2 Døgn. — Efter 6 Døgn: vandet-fugtige, kreds-runde Kolonier, 2—3 mm i Diameter: homogen, finkornet Struktur, mørkeviolet Centrum og lysere Periferi.

Da de her registrerede Egenskaber synes at være af konstant Karakter for samtlige Bakteriestammer i saavel *Radicicola* som *Radiobacter*-Gruppen, vil det nævnte Agarsubstrat utvivlsomt med Fordel kunne anvendes ved Artsdiagnosen.

Eosin-Metylenblaat-Agar (Difco's Standardsubstrater): Ogsaa denne Undersøgelserække anlægges som Udstrygningskulturer i Petriskaale, der efter 5 Dages Forsøgstid giver følgende Resultat:

Bakteriestammer	Vækstintensitet	Anm.
»Vilde« Stammer samt de sidst isolerede Landbohøjskolestammer	×	Enkelt-Kolonier synlige i Lup.
Øvrige Stammer af Lucernebakterier	÷	Spiring af Udsædsmaterialet kun synlig i Mikroskop
<i>Radiobacter</i> -Stammerne	×××	Enkelt-Kolonier 1—2 mm i Diameter.

Selv under Hensyntagen til den svagt antydede Stammevariation hos Lucernebakterierne er Forskellen i Vækstintensitet mellem Knoldbakterierne og *Radiobacter*-Gruppen saa stor, at Substratet vil kunne anvendes til diagnostisk Brug.

Succinat-Agar. Som Grundlag for Forsøgene benyttes et stødpudefattigt Agarsubstrat indeholdende 1 % Natriumsuccinat + 1 % af en 0.5 % vandig Opløsning af Brombymolblaat. (Nærmere vedrørende Sammensætning og Fremstilling, se en følgende Afhandling). Forsøgene anlægges som Pladekulturer i Petriskaale (2 Fortyndingsgrader), der efter 5 Døgn udviser følgende Resultat:

Samtlige Stammer af Lucernebakterier: Kun svag Vækst; Kolonierne smaa, punktformede, ca. 0.2 mm i Diameter, kompakte, af mælkeagtig Farve og Konsistens. Enkelte Stammer (Nr. 31—36) lidt kraftigere, mere vandet Vækst. — I alle Tilfælde typisk Udvikling af »Kapselceller« (sammenlign Side 544).

Radiobacter-Stammerne: Kraftig Vækst med store, veludviklede, hvælvede eller endog halvkugleformede Kolonier, 3—5 cm i Diameter, med lys, vandklar Rand og kompakt, stearinlignende Centrum. Ligeledes tydelig Dannelse af »Kapselceller«, om end noget svagere end hos Lucernebakterierne.

I Lighed med de foregaaende Substrater frembyder Succinat-Agar altsaa ulige bedre Vækstbetingelser for *Bacterium radiobacter* end for Lucernebakterier. — Substratet vil herefter ligeledes kunne anvendes til diagnostisk Brug.

Coffein-Agar. Lige som forrige Forsøgsserie anlægges denne Undersøgelsesrække fortrinsvis med morfologiske Formaal, til Studiet af forgrenede »Bakteroidformer« (sammenlign Side 542). Som Næringssubstrat benyttes den sædvanlige Nitrugin-Agar med Tilsætning af forskellige Coffeinmængder. Forsøget, der anlægges som Stregkulturer i Reagensglas, giver efter 6 Døgn de i Tabel 2 opførte Resultater.

Tabel 2. Forsøg med Coffeintilsætning.

Koncentration %	0	0.1	0.3	0.5	1.0
Vækst- intensitet	Alle Stammer: Normal			Alle Stammer: Lidt svagere Vækst	
Mikroskopisk Udseende	Samtlige Stammer: Normalt Udseende		Lucernebakterier: Stavene lidt større end normalt. Enkelte Bakte- roider. <i>B. radiobacter</i> : Samtlige Celler meget lange, enkelte næsten traadformede. Meget tal- rige Forgøreninger.		Samtlige Stammer: Cellerne omtrent af normal Form og Størrelse.
Bevægeli- ghed	Lucerne- bakterier	Normal		Nedsat	Ubevægelig
	<i>Bacterium radiobacter</i>	Normal	Forøget		Nedsat

Vækstintensiteten ved de forskellige Coffeinkoncentrationer frembyder aabenbart kun svage Muligheder for en sikker Adskillelse mellem Lucernebakterier og *Bacterium radiobacter*. Derimod iagttages i de middelstærke Koncentrationer nogen Forskel med Hensyn til Cellernes Form og Størrelse, der ganske vist ikke er af helt afgørende Karakter, men som dog i Tvivlstilfælde vil være til nogen Vejledning ved Artsdiagnosen.

IV. Cytologiske Forhold.

De cytologiske Karaktertræk hos Bakterierne frembyder som Regel ikke Holdepunkter af større diagnostisk Værdi. For

Fuldstændighedens Skyld er dog i nærværende Beretning medtaget enkelte Undersøgelser af cytologisk Natur, der særligt tjener til at belyse saadanne Forhold, der kan tænkes at være af Betydning ved Differentialdiagnosen mellem Lucernebakterien og *Bacterium radiobacter*.

1. Cytoplasmaet.

Hos ganske unge Celler bestaar Cytoplasmaet af en homogen Masse uden Indlejring af nogen Art. I intet Tilfælde iagttages med Sikkerhed en specifik Cytoplasmastruktur; den alveolære Cellebygning, der er almindelig i ældre Udviklingsstadier, skyldes vistnok altid Tilstedeværelse af Vakuoler og Reservenæringsstoffer af forskellig Art (sammenlign nedenfor Side 534).

Med Hensyn til Cytoplasmaets Forhold over for de almindelige Farvestoffer og Reagenser bemærkes iøvrigt følgende:

Arthur Meyers Jod-Jodkaliumopløsning (2:1:200): Straagul eller gulbrun Farvetone.

Fortyndet Karbolfuksin, vandig Fuksin samt vandig Krystalviolet (1 % Opløsning): Smukke, vel gennemfarvede Præparater, i stærkt slimede Kulturer dog med nogen Tendens til Overfarvning (Fig. 4 og 5).

Loefflers Metylenblaat samt vandig Safranin: Noget svagere Farvning, navnlig hvor det drejer sig om ældre Kulturer.

Giemsas Azur-Eosin (Fiksering med Metylalkohol): Cytoplasmaet antager en ren himmelblaa Farve, medens de omlejrende Slimmasser farves intensivt rødviolette.

Fenyl-Erythrosin (*Gangulee* 1926) samt Bengal-Rosa (1 g Farvestof + 0.01 g CaCl_2 opløst i 100 cm^3 5 % vandig Fenolopløsning): Smukke, klare Præparater uden Overfarvning af nogen Art, selv efter længere Tids Indvirkning af Farveopløsningen. — Kan navnlig anbefales, hvor det drejer sig om at opnaa en skarp og præcis Farvning af selve Cellerne uden Hensyntagen til de omlejrende Slimmasser (se Fig. 7, 8 og 9).

Cyanochin: Kan særlig anbefales som »Negativ-Metode« i følgende Form: Lidt Bakteriemateriale udrøres paa et velpudset Objektglas i en lille Draabe Cyanochin (1 % vandig Opløsning); Væsken stryges ud i et ganske tyndt Lag, lufttørres uden Fiksering og monteres paa sædvanlig Vis i Kanada-balsam eller Cederolie (NB. Ingen Vandafskylning!). — Cellerne

fremtræder ved denne Metode smukt lysrosa, medens Baggrunden farves ren himmelblaa (Fig. 10 og 11).

Benian's Kongometode. Cellerne udrøres i en lille Draabe frisk fremstillet vandig Kongo-Opløsning (2 %), udstryges i tyndt Lag og lufttørres uden Fiksering; derefter kortvarig Behandling (10—20 Sekunder) med Saltsyre-Alkohol (1 : 100), Lufttørring uden Fiksering eller Vandafskylning og sluttelig Indlejring i Kanadabalsam. — Cellerne fremtræder ved denne Metode ganske ufarvede men med meget tydelige Konturer i skarp Kontrast til den himmelblaa Baggrund; i stærkt slimdannende Kulturer iagttages Slimmasserne som ufarvede, ikke skarpt afgrænsede Masser, ofte udvisende en netagtig Struktur, der formodentlig er opstaaet under Præparationen (Fig. 12).

Harrison og Barlow's Farveopløsning (l. c. 1907). Kan efter Omstændighederne anvendes saavel som positiv som negativ Metode. Anbefales til Paavisning af Slimproduktionen samt de i ældre Kulturer optrædende »Kapselceller« (Fig. 6).

Vitalfarvning. Til Farvning af Cellerne i levende Tilstand anvendes bedst en fortyndet Opløsning af Krystalviolet. I Praksis fremstilles Præparatet paa følgende Vis: Paa et velpudset Objektglas overføres en yderst ringe Mængde vandig Krystalviolet (1 % Opløsning), der udstryges i ganske tyndt Lag, saaledes at Glasset efter Indtørring af Farveopløsningen har antaget en svag violet Farve. Efter Tilsætning af en lille Draabe vandig Opslemning af den paagældende Bakte-riekultur tilkittes Præparatet ved at bestryge Dægglassets Rande med en Blanding af smeltet Parafin og Vaseline. — Cellerne er til en Begyndelse kun meget svagt farvede men optager efterhaanden mere af Farvestoffet, saaledes at man i Løbet af kort Tid let finder alle ønskede Afskygninger med Hensyn til Farveintensitet. Metoden giver med nogen Øvelse smukke Præparater af saavel Cytoplasmaet som Reservenæringsstoffer og Kapseldannelser.

Ziehl-Neelsen-Farvning og Gram-Farvning. Begge stedse negativt Resultat.

Kiskalt-Farvning (Som Gram-Farvning, men Affarvning med Amylalkohol i Stedet for med absolut Alkohol). Stedse smukt farvede Præparater, fri for Urenheder eller Udsældninger af enhver Art. Metoden er navnlig at anbefale ved Fremstilling af farvede Præparater direkte fra Rodknoldene, hvor de sæd-

vanlige Farvningsmetoder ellers er tilbøjelig til at give en stærk Overfarvning af Celler og Cellerester hidrørende fra Værtplanten, der ofte helt skjuler de indesluttede Bakterieceller (Bakteroid-Præparater, se Fig. 2).

2. Cellevæg og Stimdannelser.

Selve den unge Cellevæg er ofte vanskelig at paavise med Sikkerhed; de bedste Resultater opnaas ved Iagttagelse i Mørk-grundsbelysning (Zeiss's Cardioid-Kondensor 1925, Immersionslinse »X«), idet Cellevæggen her fremtræder som en skarpt afgrænset, lysende Linie. — Til Paavisning i farvede Præparater kan eventuelt benyttes Delafields Hæmatoxylin efter forudgaaende Fiksering i Sublimat-Alkohol eller Iseddike-Alkohol. Som specifik Vægfarvningsmetode kan endvidere anbefales den af Gutstein (1925) angivne »Ektoplasmafarvning«, der i foreliggende Tilfælde udføres i følgende, let ændrede Form:

1. Tynd Udstrygning paa Objektglas, Lufttørring og Flammefiksering.
2. Farvning med 2% vandig Brillantgrønt (2 Min.) — Vandafskylning.
3. Behandling med 3% vandig Tanninopløsning (3—5 Min.) — Kraftig Vandafskylning.
4. Farvning med 1% vandig Saffraninopløsning (1 Min.) — Vandafskylning, Tørring, Indlejring.

Metoden giver som oftest tilfredsstillende Resultater, idet Cytoplasmaet farves grønt, medens Cellevæggen i saavel yngre som ældre Udviklingsstadier antager en tydelig rød Farve.

En mikrokemisk Undersøgelse af Cellevæggen udført efter de sædvanlige gangbare Metoder giver følgende Resultat:

Klorzink-Jod: Reaktionen usikker; vistnok svag lyseblaa Farve.

Jod-Jodkalium: Vægge noget stærkere farvede end Cytoplasmaet, gule eller gulbrune, rettende sig efter Koncentrationen af det benyttede Reagens.

Jod-Svovlsyre: Svag blaaviolet Farve (usikker).

Kogning i Svovlsyre (5 % H_2SO_4 i 2 Timer): Cellevægge deformerede eller opløste. — Efter Udvaskning paa Centrifuge: Negativ Reaktion med Jod-Svovlsyre.

Kobberilte-Ammoniak: Membraner deformerede eller totalt opløste efter $\frac{1}{2}$ Time.

Millons Reagens: Negativ Reaktion.

Chitosan-Reaktion efter van Wisselingh: Total Deformering eller Opløsning — Jodreaktion stedse negativ.

Cellevæggen bestaar altsaa hverken af ren Cellulose, proteinagtige Stoffer eller Chitin men sandsynligvis af »Hemicellulose« eller dermed beslægtede Stoffer.

Naar Kulturerne er 1—2 Døgn, sker der en Forslimning af Cellevæggens yderste Lag, hvorved opstaar en mer eller mindre veludviklet Slimkappe, der som Regel lader sig paavise ved følgende Kapselfarvningsmetode (Kapselfarvning efter *Hiss*, se *Ficker* 1923, Side 345).

1. Tørring, Fiksering og Farvning med Krystalviolet (Konc. alkoholisk Opløsning, ev. fortyndet 1:10) — Opvarmning $\frac{1}{2}$ Min. til begyndende Dampudvikling.
2. Afskylning i en 20% vandig Opløsning af Kobbersulfat. (N. B. Ingen Vandafskylning).
3. Tørring og Indlejring i Kanadabalsam.

Det forslimede ydre Lag af Cellevæggen viser sig ved denne Farvningsmetode som en ret smal, lysviolet Bræmme omkring den enkelte Bakteriecelle (Fig. 13 og 14). — Efter yderligere $\frac{1}{2}$ —1 Døgn's Forløb iagttages uden om disse svagt farvede Slimkapper ofte mægtigt udviklede formløse Slimmasser, der farves intensivt saavel ved simpel Farvning med fortyndet Karbolfuksin, Krystalviolet eller vandig Fuksin som med *Giemsa's* Azur-Eosin, *Harrison* og *Barlow's* Farve samt efter *Hiss's* ovenfor omtalte Kapselfarvning. Ifølge nyere Undersøgelser (*Kramár* 1921—22, *Hopkins*, *Peterson* og *Fred* 1930) bestaar denne »Grundsubstans« af en gummilignende, kvælstoffri Forbindelse, der ved Hydrolyse giver reducerende Sukkerarter — for Lucernebakteriernes Vedkommende udelukkende Dekstrose, der kan udkrystalliseres fra de hydrolyserede Slimmasser og identificeres i polariseret Lys.

Omkring de enkelte, stavformede Celler i ældre Kulturer (5—10 Døgn) ses tillige en velafgrænset Slimkappe, der i dette Udviklingsstrin farves særligt smukt ved forsigtig Behandling med fortyndet Krystalviolet, fortyndet Karbolfuksin, vandig Fuksin eller Saffranin samt ved Farvning efter *Harrison* og *Barlow* (Fig. 6). Ganske utvivlsomt svarer disse for Lucernebakterierne meget karakteristiske Celledannelser til de af *Gibson* (1927) omtalte »Cyster«, der behandles mere indgaaende i et følgende Afsnit.

3. Reservenæringsstoffer.

Medens unge Sværmceller som tidligere omtalt udviser en fuldstændig homogen Struktur, indeholder ældre Celler (navnlig de ubevægelige Stavformer) stærkt lysbrydende Smaakorn, der repræsenterer Reservesoffer af forskellig Art. — En mikrokemisk Analyse efter de af *Arthur Meyer* (1912) angivne Metoder giver følgende Resultat:

a. *Volutin*. Med dette Navn betegner *Arthur Meyer* et hos Bakterier og Svampe almindeligt forekommende Reservestof, der lige som Cellekærnen hos højere Organismer udviser en meget stærk Affinitet over for basiske Anilinfarvestoffer, men i Modsætning til Kromatinsubstansen affarves det ikke ved paafølgende Behandling med fortyndede Syrer. I kemisk Henseende er Volutinet en Nukleinsyreforbindelse, men nærmere Enkeltheder om dets kemiske Sammensætning foreligger ikke. Det er uopløseligt i Alkohol, Æter og Kloroform, men opløses let i kogende Vand eller ved kortvarig Behandling med fortyndede Syrer eller Alkalier (5 % H_2SO_4 , resp. 5 % Na_2CO_3 i 5—10 Minutter). — Paa Grundlag af ovennævnte Reaktionen udføres den mikrokemiske Volutinpaavisning med følgende Resultat:

Neissers Kornfarvning: Celler gulbrune, med talrige mørkeblaa Smaakorn.

Giemsa's Azur-Eosin (Fiksering i Metylalkohol): Lyseblaat Cytoplasma med karmosinrøde (metakromatiske) Smaakorn.

Metylenblaat 1:10—1 % Svovlsyre. Inden Syrebehandlingen: Cytoplasmaet lyseblaat, med intensivt farvede mørkeblaa Smaakorn. Efter Syrebehandlingen: Cellevægge og Cytoplasma fuldstændigt affarvede, medens de nævnte Smaakorn er svulmet op uden nævneværdig Formindskelse af den oprindelige Farveintensitet.

Metylenblaat 1:10—5 % Natriumkarbonat: Cytoplasmaet affarves straks, de stærkt farvede Smaakorn først efter længere Tids Forløb.

Metylenblaat 1:10—Jod-Jodkalium—Natriumkarbonat. Efter Jodbehandlingen: Intensivt farvede Smaakorn. Efter Sodatilsætningen: Total Affarvning.

Karbolfuksin—1 % Svovlsyre—5 % Svovlsyre. Efter Behandling med 1 % Svovlsyre: Intensivt farvede Smaakorn i god Kontrast til det ufarvede Cytoplasma. Efter Tilsætning af 5 % Svovlsyre: Total Affarvning af Smaakornene.

Kogning—Karbolfuksin—1 % Svovlsyre. Efter Kogning i 5 Minutter, Farvning i 5 Min. og Tilsætning af 1 % Svovlsyre: Total

Affarvning af hele Cellen og samtlige Celle-Elementer, Smaakornene opløste.

5 % Svovlsyre—Karbolfuksin—1 % Svovlsyre. Total Affarvning og Opløsning af Smaakornene.

Metylenblaat-Phosphin. Præparatet tørres, flammefikseres og farves 1 Minut med 1 % Karbolmetylenblaat; derefter Differentiering i 1 % vandig Phosphin, Vandafskylning, Tørring og Indlejring i Kanadabalsam: Cytoplasmaet gult, Smaakornene grønne. (*Schumachers Reaktion*).

Samtlige Undersøgelser viser altsaa, at Cellerne indeholder Volutindraaber eller Volutinkorn, der efter Udfaldet af den sidst anførte Reaktion maa antages overvejende at bestaa af fri Nukleinsyre (*Schumacher 1925. Sammenlign ogsaa Stapp 1936*).

b. Fedt. Ifølge *Arthur Meyer* er Fedt det hos Bakterierne hyppigst forekommende Reservestof. Det aflejres i Cellerne som ret store, kugleformede Draaber, der er stærkere lysbrydende end de øvrige Cellebestanddele. Ved høj Indstilling af Mikroskopet fremtræder de noget lysere, ved dyb Indstilling noget mørkere end det øvrige Celleindhold.

I kemisk Henseende udmærker Fedtdraaberne sig ved følgende Egenskaber: De er opløselige i Iseddike og Kloralhydrat, men paavirkes ikke ved Behandling med Alkohol eller Kloroform (*Arthur Meyer 1912, Side 227*). De farves ikke af vandige Anilinfarvestoffer men intensivt af kogende Karbolfuksin, der fastholdes efter Behandling med 5 % Svovlsyre. Med Dimetyl-Parafenylene-Diaminbase og α -Naftol i fortyndet Sodaopløsning giver Fedtdraaber en meget kraftig Blaafarvning (»Naftolblaat-Reaktionen«), medens Dimetyl-Amido-Azobenzol og Sudan III giver de velkendte smørgule, respektiv gulrøde Farvereaktioner. Videre se *Arthur Meyer (1912)* samt *Eisenberg (1909)*.

Allerede en Undersøgelse af levende, ufarvet Materiale lader formode Tilstedeværelsen af Fedt i Form af stærkt lysbrydende Korn, der navnlig i de ubevægelige Stavformer er af meget iøjnefaldende Karakter. Den endelige Verifikation fremgaar af følgende mikrokemiske Reaktioner:

Behandling med Kloralhydrat: Kornene flyder sammen under Dannelsen af en homogen Masse, der efterhaanden synes at gaa i Opløsning.

Iseddike: Kornene opløses efterhaanden, efterladende et Hulrum, der ved høj Indstilling af Mikroskopet fremtræder noget mørkere end Cytoplasmaet.

Metystenblaat 1:10 (Fugtigt Præparat): Kornene farveløse, Cytoplasmaet lyseblaat, Volutinkornene mørkeblaa.

Giemsas Azur-Eosin: Fedtdraaberne farves ikke, men Cellerne fremtræder med alveolær Struktur og metakromatisk farvede Volutinkorn.

Karbolfuksin, 5 % Svovlsyre: Efter Opvarmning med Karbolfuksin til begyndende Kogning, 5 Min. Henstand og Affarvning i 5 % Svovlsyre: Fedtmasserne intensivt røde, de øvrige Cellebestanddele affarvede.

Dimetyl-Amido-Azobenzol: Tydelig Gulfarvning.

Metystenblaat, Sudan III: Cytoplasmaet lyseblaat; Volutinkorn mørkeblaa, Fedtdraaber tydeligt røde.

Naftolblaat-Reaktionen. En ringe Mængde af en ung Agarbelægning udrøres i en Draabe frisk fremstillet Opløsning af Dimetyl-Parafenylen-Diaminbase (1 % vandig Opløsning), hvortil sættes en Øskenfuld α -Naftol, opløst i 1 % Sodaopløsning. — Efter nogle Minutters Henstand antager de formentlige Fedtdraaber en ren mørkeblaa Farve.

Det maa herefter betragtes som fastslaaet, at de store, lysbrydende Masser, der navnlig er fremherskende i de ubevægelige Stavformer, bestaar af Fedt.

c. Glykogen og Iogen. Stivelseslignende Reservestoffer aflejres ret almindeligt i Bakterieceller i Form af mer eller mindre tyktflydende Draaber, der kun i ringe Grad er modtagelige for de sædvanlige Bakteriefarvestoffer. De opløses let ved Behandling med Diastase eller ved kortvarig Kogning med fortyndede Syrer. Paa Grundlag af Forholdet over for Jod-Jodkalium skelnes mellem Iogen og Glykogen, af hvilke førstnævnte farves mørkeblaa allerede efter Tilsætning af en yderst ringe Mængde Jod-Jodkalium, medens Glykogenet efter Tilsætning af en lidt stærkere Opløsning antager en dyb rødbrun Farve.

I foreliggende Tilfælde er Undersøgelsen gennemført med følgende Resultat:

Jod-Jodkalium, svag Koncentration (2:1:200). Bakterierne røres ud i en lille Draabe Vand, hvorefter tilsættes saa meget Jod-Jodkalium, at Draaben netop antager en svag gullig Farve: Cytoplasmaet farves svagt gult, medens Fedtdraaberne farves noget stærkere. I intet Tilfælde iagttages blaalt farvede Korn. — Efter yderligere Jodtilsætning farves Fedtdraaberne smukt gyldentbrune; derimod mangler ethvert Tegn paa Forekomsten af Glykogen.

Kontrollforsøg: a) Forsøg med *Bacillus asterosporus* (fra Kråls Kultursamling), der af Arthur Meyer (1903, S. 78) benyttes som For-

søgsobjekt til Demonstration af positiv Glykogenreaktion: Kornene antager en karakteristisk rødbrun Farve, der udelukker enhver Forveksling med de hos Lucernebakterierne forekommende, gulligt farvede Fedtdraaber. — b) Forsøg med *Bac. amylobacter* (= *Clostridium Pastorianum*, fra Ophobningskultur af *Azotobacter* i Beijerincks kvælstoffri Mannitopløsning): Allerede efter ganske ringe Jodtilsætning giver de sporulerende Celler den karakteristiske blaa Iogen-Reaktion.

Bests Glykogenfarvning (se Hartmann og Schilling 1917, S. 263): Negativt Resultat.

Tannin-Ferriklorid (se Arthur Meyer 1920, S. 263): Ligeledes negativt Resultat. — Det maa dog bemærkes, at heller ikke Kontrolforsøgene med *Bacillus asterosporus* giver tydelig positiv Reaktion.

Som Hovedresultat af samtlige her refererede Undersøgelser fremgaar altsaa, at der i Cellerne af Lucernebakterier aflejres Volutin samt navnlig Fedt, der paa Grund af Reaktionen med Karbolsuksin-Svovlsyre (se ovenfor Side 536) kan give Anledning til den i Litteraturen undertiden forekommende Angivelse, at Knoldbakterierne skulde være delvis syrefaste ved Farvning efter Ziehl-Neelsen. — Derimod aflejres der ikke Reservestoffer af stivelseslignende Karakter; de i Litteraturen forekommende Angivelser i modsat Retning skyldes formodentlig en Forveksling med Fedtdraaber, der ved Anvendelse af en for stærk Opløsning af Jod-Jodkalium giver en gyldenbrun Farve, men aldrig den for Glykogendraaber karakteristiske rødbrune Reaktion.

4. Cellekærner og Kærneækvivalenter.

Spørgsmaalet om Kærneforholdet hos Bakterierne har gennem Aarene givet Anledning til megen Diskussion, idet Kærnepaavisning i Bakteriecellen er forbundet med meget store tekniske Vanskeligheder. Man har fra forskellig Side endog helt villet benægte Tilstedeværelsen af Cellekærner hos Bakterierne, der i Stedet herfor menes at være udstyret med et saakaldt »Chromidialsystem« af chromatinlignende Substans, der til Tider opløses diffust i Cytoplasmaet, medens det i andre Udviklingsstadier kondenseres til kærnelignende Smaakorn (Guilhermond 1906 m. fl.; se Arthur Meyer 1912).

Ogsaa for Knoldbakteriernes Vedkommende foreligger modstridende Beretninger, formodentlig hidrørende fra Forveksling med de ovenfor omtalte Volutinkorn. Dette Usikkerhedsmoment kan dog reduceres betydeligt ved først at opløse Volutinet ved Kogning og derpaa at behandle Præparatet i Overensstemmelse

med de sædvanlige Kærnefarvningsmetoder (Hæmatoxylinfarvning efter Heidenhain eller Delafield). — I de saaledes fremstillede Præparater iagttages ofte Bakterieceller med 1 eller 2 intensivt farvede Smaakorn, der muligvis vil kunne tydes som Cellekærner eller Kærneækvivalenter. Imidlertid synes de ikke ved Hydrolyse med fortyndet Saltsyre og paafølgende Behandling med Schiff's Aldehydreagens at give den af *Feulgen* (1929) udarbejdede »Nuklealreaktion«, der ellers er karakteristisk for alle ægte Cellekærner indeholdende Tymonukleinsyre. Heller ikke *Milovidov* (1935) har hos Knoldbakterierne kunnet opnaa tydelig Nuklealreaktion men kun en svag diffus Farvning, der dog først bliver tydelig ved massevis Sammenhobning af Bakteriecellerne. Tydningen af de omtalte stærkt farvede Smaakorn som Cellekærner maa altsaa foreløbig betragtes som problematisk. — Hele Forholdet er dog ifølge Sagens Natur absolut uanvendeligt som diagnostisk Karaktertræk og skal derfor ikke uddybes nøjere i denne Forbindelse.

V. Afvigende Celleformer.

Lige som alle andre Mikroorganismer er Knoldbakterierne af overordentlig plastisk Karakter, idet Cellernes Form, Størrelse og Udvikling i høj Grad er afhængig af de forhaandenværende Dyrkningsbetingelser. Forholdet kompliceres yderligere derved, at en Del af Udviklingskredsen — i hvert Fald under visse Betingelser — foregaar i Bælgplanternes Rodknolde, hvor Bakterierne antager en anden Form end den, der er velkendt fra Renkulturer paa kunstigt Substrat.

1. Bakteroidformerne.

Infektionen af de unge Bælgplanter foregaar gennem Rodhaarene, hvis Cellevægge bringes i Opløsning ved enzymatisk Virksomhed af de i Jordbunden frit levende Knoldbakterier. Efter saaledes at være trængt ind i Værtplanten, paabegynder Bakterierne en livlig Celledeling i Rodhaarene, der efterhaanden opfyldes af smaa stavformede Bakterier, sammenholdt af en geléagtig Grunds substans. Herved fremkommer den saakaldte »Infektionstraad«, der efterhaanden bryder sig Vej frem til det egentlige Rodvæv, hvis Celler paa Grund af Bakterievirksomheden pirres til forøget Vækst og Celledeling og herved foraar-

sager Dannelsen af de for vedkommende Bælgplanteart karakteristiske Rodknolde.

Under Indflydelse af Værtplanten tiltager Bakteriecellerne i Rodknoldene betydeligt i Størrelse og omdannes sluttelig til plumpe, uregelmæssige Celleformer, de saakaldte »Bakteroider«, der hos visse Bælgplanter, f. Eks. Ært, udmærker sig ved en meget kraftig Forgrening, medens de hos Lucernen fortrinsvis optræder som opsvulmede Kølleformer med kamret (»alveolær«) Struktur (Fig. 2). De farves lige saa intensivt af basiske Anilin-farvestoffer som de tilsvarende Stavformer i Renkulturer; særlig den saakaldte Kiskalt-Farvning giver som tidligere omtalt meget smukke og klare Præparater uden nævneværdig Medfarvning af Celle-Elementer fra Rodvævet.

Af ældre Bakteriologer betragtedes Bakteroiderne som en kvælstofbindende »Arbejdsform«, tilpasset Livet i Knoldene og udrustet med særlig Evne til Kvælstofbinding fra Luften (*Nobbe* og *Hiltner* 1893. — Se *Löhnis* 1927, Side 25). I nyere Tid hælder man dog mere til den Anskuelse, at Bakteroiderne er Degenerationsformer, der før eller senere vil gaa i Opløsning under Frigørelse af det i Cellesubstansen fastlagte Kvælstof, der herved gøres tilgængeligt for Værtplanten. I skarp Mod-sætning hertil staar endelig en tredie Anskuelse, der under Indflydelse af de nyere Teorier vedrørende Bakteriernes »Pleomorfi« vil tyde Bakteroiderne som Beholdere (»Gonidiangier«) for særlige Formeringsceller (»Gonidier«), der atter skulde være i Stand til at gendanne de sædvanlige Stavformer (*Löhnis* 1916, 1921, *Thornton* og *Gangulee* 1926, *Gibson* 1928, *Kås* 1927 m. fl.).

Skønt Spørgsmaalet om Bakteroidernes Funktion og videre Skæbne saaledes næppe kan siges at være endeligt besvaret, bør det dog understreges, at det hidtil ikke er lykkedes med Sikkerhed at følge den videre Udvikling af Bakteroiderne direkte under Mikroskopet. *De Rossi* (1907, Side 310) mener at have iagttaget deres Omdannelse til slimede Masser, hvorfra efter flere Dages Forløb atter udvikledes smaa Stavformer, men senere Forfattere har dog forgæves søgt at faa Bakteroiderne til at spire paa kunstigt Substrat. *Müller* og *Stapp* (1925) har som de første foretaget talrige Eencelle-Isolationer af Bakteroider uden at konstatere ringeste Tegn paa Udvikling, hvorfor de betragter Bakteroiderne som »Teratologiske Celleformer«. Spørgsmaalet er senere bl. a. undersøgt af *Fred*, *Baldwin* og

Mc Coy (1932, Side 56) der af 10 Bakteroidceller, isoleret ved Eencelle-Teknik, kun fandt Udvikling i 2 Tilfælde, samt Almon (1933), der kun registrerer Udvikling i 1 Tilfælde af 411¹⁾. — Ogsaa egne Forsøg tyder i samme Retning: Af 11 Eencelle-Isolationer af Bakteroidformer, foretaget paa Agarplade med *Peterfis* Mikromanipulator, iagttoges kun i et enkelt Tilfælde en begyndende Udvikling, der dog gik i Staa allerede efter at den første Celledeling var tilendebragt; de øvrige 10 Celler afblegedes stærkt efter et Par Dages Forløb og var sluttelig kun til at skelne som utydelige Skyggeformer.

Ved Vurdering af de her refererede Resultater maa det dog erindres, at et negativt Spiringsforsøg aldrig er helt beviskraftigt; dette gælder ikke mindst ved Eencelle-Isolationer, der meget ofte udviser er paafaldende ringe Spiringsevne (5—10 %), selv i saadanne Tilfælde, hvor de isolerede Celler er ganske unge og i enhver Henseende af typisk Karakter. For Bakteroidformernes Vedkommende afhænger Resultatet utvivlsomt endvidere af det til Isolationsforsøgene benyttede Celle-materiale: Tages dette fra ganske unge Rodknoide, finder man her alle Udviklingsstadier repræsenteret, lige fra stærkt omdannede Bakteroidformer til mere regelmæssige Stavformer, der ikke afviger væsentligt fra de i Renkulturer forekommende Udviklingsstadier; ret naturligt maa en saadan Bakteriepoptation selvfølgelig ogsaa udvise en ret vidtgaende Variation med Hensyn til Cellernes Vitalitet, hvilket formodentlig er den naturlige Forklaring paa de tilsyneladende uoverensstemmende Forsøgsresultater.

¹⁾ Ved Eencelle-Isolation forstaar man en Isolationsteknik, hvor man ved Hjælp af et kompliceret mekanisk Apparat (en »Mikromanipulator«) udpræparerer og isolerer een ganske bestemt Bakteriecele af en Bakterieblanding, følger dens videre Udvikling Trin for Trin under Mikroskopet og sluttelig — ligeledes under mikroskopisk Kontrol — afpoder den fremkomne Mikrokoloni og fører den over i nyt, sterilt Substrat. En saadan Renkultur, om hvilken man med absolut Sikkerhed ved, at den nedstammer fra een og kun een, under Mikroskopet kontrolleret Bakteriecele, betegnes som en »Eencellekultur«. — Metoden giver altsaa absolut Sikkerhed, men kræver til Gengæld saavel et kostbart Apparat som en ikke ringe teknisk Færdighed. Ved visse Undersøgelser af speciel Karakter maa saadanne »Eencellekulturer« betragtes som et uafviseligt Krav, lige som Metoden i det hele taget giver meget stor Betyggelse ved den primære Rendyrkning af Knoldbakterier, hvor den store Fare jo netop ligger i Muligheden for en latent Forurening med *Bacterium radiobacter*.

Alle Forhold taget i Betragtning maa i hvert Fald de mest typiske Bakteroider vistnok betragtes som hendøende Celleformer, medens Spiringsevnen er delvis bevaret i de mindre omdannede Udviklingsstadier.

Foruden i Rodknoldene træffes Bakteroiderne undertiden i Renkulturer paa kunstigt Substrat, hvor de oftest optræder som stærkt forgrenede eller opsvulmede Celler uden den ejendommelige kamrede Struktur, der er karakteristisk for de i Rodknoldene forekommende Bakteroider. Fænomenet kan iøvrigt være noget forskelligt udviklet hos de forskellige Stammer af Lucernebakterier. Særlig bemærkelsesværdig i saa Henseende er Stamme Nr. 59B, isoleret 1936 ved Spredning fra Rodknolde, opstaaet spontant (uden forudgaaende Podning) ved Dyrkning af Lucerneplanter i Kar med Jord, stammende fra Landbohøjskolens Forsøgsmark (Fig. 15).

Fra 6 veludviklede og velisolerede Kolonier af normalt Udseende anlægges Kulturer paa Nitragin-Agar; af disse 6 Kulturer udvikles de 5 til den sædvanlige Kulturtype med livligt bevægelige Sværmceller, medens den 6. udviser mindre Bevægelighed men et paafaldende stort Antal forgrenede Celleformer, der i 3-Dages Kulturer andrager ca. 5—8 % af det samlede Celleantal. Denne udsædvanlige Tendens til Bakteroiddannelse, der iøvrigt ikke var forbundet med synlige Afvigelser i kulturel eller biologisk Henseende (Podningsforsøg paa sterile Lucerneplanter), bevaredes dog kun nogle faa Kulturgenerationer og forsvandt sluttelig totalt efter 5 paa hinanden følgende Overpodninger paa Nitragin-Agar, foretaget med ca. 6 Dages Mellemrum¹⁾.

Ekperimentelt begunstiges Bakteroiddannelsen i Renkulturer ved Dyrkning i flydende Substrat, muligvis som Følge af den formindskede Iltspænding i Væskeskulturer sammenlignet med Overfladekulturer paa Agarsubstrat. Endvidere fremmes Bakteroiddannelsen ved Tilsætning af Ekstrakt af Bælglplantefrø eller Kimplanter, ved Nærværelse af forskellige Sukkerarter samt organiske Syrer (*Fred, Baldwin og Mc Coy 1932, Side 62*). En lignende Virkning udøves af visse uorganiske Forbindelser (Magniumklorid og Caesiumklorid — *Müller og Stapp 1925*) samt Plantealkaloider, af hvilke navnlig Coffein har vist sig

¹⁾ Den paagældende Kultur blev først isoleret paa et Tidspunkt, hvor det sammenlignende eksperimentelle Arbejde allerede i Hovedsagen var tilendebragt. Fraregnet det her anførte er denne Bakteriestamme, der ellers i andre Henseender er fuldstændig normal, ikke medtaget ved Forsøgsopgørelserne.

overordentlig virksom (*Zipfel* 1911, *Barthel* 1921, 1922). — Sml. de tidligere anførte Forsøg med Tilsætning af Krystalviolet (Side 525) og Coffein (Side 529). — Hvorvidt disse eksperimentelt fremkaldte uregelmæssige Celleformer i enhver Henseende kan sidestilles med de naturligt forekommende Bakteroider med typisk »alveolær« Struktur maa dog vistnok betragtes som tvivlsomt.

2. Ernæringsmodifikationer.

Som allerede ovenfor omtalt, er Lucernebakteriernes Form og Størrelse i høj Grad afhængig af de forhaandenværende Dyrkningsbetingelser. Hvilke Former man vil betragte som »normale« og hvilke man vil indrubricere under Betegnelsen »Ernæringsmodifikationer« kan ofte være vanskeligt at afgøre, men rent vedtægtsmæssigt betragter man dog de Udviklingsstadier, der iagttages ved optimal Cellevækst og Celledeling, som de for Arten karakteristiske »Normalformer«. For Lucernebakteriernes Vedkommende maa man i Overensstemmelse hermed betragte den ovenfor (Side 512) beskrevne Vækst og Udvikling paa »Nitragin-Agar« ved 25° C. som den »normale« — en Opfattelse, der yderligere understøttes ved Dyrkningsforsøg i steril Jord, idet Lucernebakterierne under disse »naturlige« Forhold udviser ganske samme Form, Størrelse og Udviklingsgang som i optimalt udviklede Agarkulturer (*Thornton og Gangulee* 1926).

En ganske ringe Ændring i Substratets Sammensætning eller Reaktion medfører ofte en iøjnefaldende Ændring af den fremherskende Celleform. Ifølge *Bewley og Hutchinson* (1920) inducerer Magnium- eller Kalciumkarbonat Dannelsen af ellipsoidiske Sværme-celler¹⁾. Klorider, Sulfater og Nitrater synes derimod at være uden nævneværdig Virkning.

¹⁾ Ifølge *Thornton og Gangulee* (1926) fremmes Dannelsen af smaa, bevægelige Sværme-celler stærkt ved Dyrkning i Mælk med Tilsætning af en ringe Mængde Kalciumfosfat. Forholdet menes at være af praktisk Betydning ved Lucernefrøets Podning med Nitragin-Kulturer, hvorfor man bl. a. i England anbefaler ved Podning af Udsæden at opslemme Bakteriekulturerne i Mælk med Tilsætning af en ringe Mængde Kalciumfosfat: herved begunstiges Dannelsen af sværmende Smaaceller, hvilket igen skulde medføre en hurtigere Udvikling af de i Jordbunden overførte Knoldbakterier og større Mulighed for en kraftig Infektion af de unge Lucerneplanter (*Thornton* 1929). — Ved Anvendelse af en tilstrækkelig Podemængde stammende fra unge livskraftige Bakteriekulturer er denne Fremgangsmaade formentlig uden større Betydning for Opnaaelse af et tilfredsstillende Resultat.

Med Hensyn til Celleformen paa de almindelige Kultur-substrater bemærkes iøvrigt følgende:

Kød-Pepton-Agar (Difco): Talrige uregelmæssige Stavformer, navnlig stærkt fremtrædende i ganske unge (18—24 Timer gl.) Kulturer. Iøvrigt ret stærk Stammevariation, hvis Yderpunkter repræsenteres af

L_{25} : Cellerne af ret normal Størrelse, undertiden forgrenede, samt

L_{31} : Cellerne næsten alle ubevægelige, stærkt forstørrede og kølleformet opsvulmede eller forgrenede (se Fig. 16, 17 og 21).

Kød-Pepton-Bouillon (Difco): Cellerne i unge Kulturer livligt bevægelige, de stavformede Udviklingsstadier ofte noget uregelmæssige, kølleformet opsvulmede eller forgrenede (NB. Ogsaa de forgrenede Celler ses ofte i livlig Bevægelse) — Ingen Stammeforskel.

Kartoffel: Selv i ganske unge Kulturer er Cellerne overvejende korte og plumpe, ofte nærmende sig Kugleformen, næsten alle ubevægelige. Talrige uregelmæssige Celler, ofte med Opsvulmninger og Forgreninger. Med Alderen nogen Tendens til at gaa over i afblegede »Skyggeformer«. — Ingen Stammeforskel (Fig. 18).

Ashby's Agar: Sværmedannedelsen stærkt formindsket. Efter 2—3 Dage udelukkende plumpe, ubevægelige, opsvulmede Kortstave. — Ingen Stammeforskel (Fig. 19).

Mælk: Stærk Sværmedannedelse, navnlig i yngre Kulturer (sammenlign ovenfor); senere ubevægelige Smaastave. Større Stavformer (saavel bevægelige som ubevægelige) optræder kun sjældent; ingen uregelmæssige eller forgrenede Celler. — Ingen Stammeforskel.

Agar med Tilsætning af forskellige organiske Forbindelser. Af de til Forgæringsundersøgelserne benyttede organiske Forbindelser (se en følgende Forsøgsberetning) er der paa dette Sted navnlig Grund til at fremhæve følgende:

Mannit: Virker stærkt fremmede paa Dannelsen af uregelmæssigt opsvulmede eller forgrenede Celleformer.

Sorbit: Næsten alle Cellerne svagt pæreformede eller tilspidsede ved begge Cellepoler; enkelte stærkere opsvulmede eller forgrenede.

Laktose: Cellerne let opsvulmede, enkelte med Forgreninger.

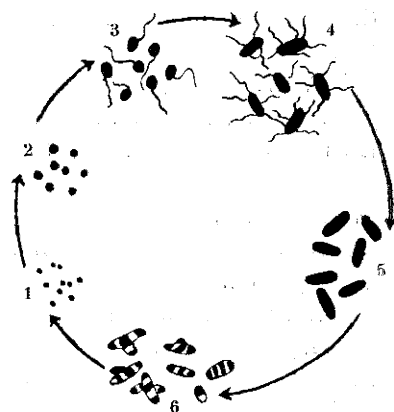
Salicin: Navnlig i yngre Kulturer talrige uregelmæssige Celler; i ældre Stadier typiske »Kapselceller« samt stærkt opsvulmede eller forgrenede Celleformer.

Natriumsuccinat; Cellerne i yngre Kulturer noget større end paa Nitragin-Agar, mere plumpe, ofte noget uregelmæssige; i ældre Kulturer typiske »Kapselceller« med dobbelt-kontureret Cellevæg (se Side 528).

I øvrigt er de ovennævnte organiske Stoffers Indflydelse paa Celleformen noget varierende fra Stamme til Stamme. Eksempelvis kan nævnes, at den af Mannit fremkaldte Formændring (Opsvulmning og Forgøring) er særlig stærkt fremtrædende hos L_{36} , medens omvendt Celleformen hos L_{25} ikke paavirkes i nævneværdig Grad.

3. Udviklingscyklus og Pleomorfi.

Som allerede tidligere omtalt har forskellige nyere Forfattere — saaledes navnlig *Bewley* og *Hutchinson* (1920) — villet hævde, at Knoldbakterierne gennemløber en regelbunden cyklisk Udvikling, der i grove Træk kan skematiseres ved den nedenfor gengivne Tekstfigur. Denne Opfattelse er senere nærmere uddybet af *Thornton* og *Gangulee* (1926), der ved Dyrkningsforsøg i steril Jord har kunnet paavise en Udviklingsgang nøje svarende til den af *Bewley* og *Hutchinson* angivne, samt *Gangulee* (1926), der fandt, at alle de nævnte Udviklingsstadier optræder samtidigt selv i ganske unge Kulturer, men at de bevægelige »Kokformer« er procentvis overvejende under Forsøgsbetingelser, der er optimale for Cellevekst og Celledeling. — Som allerede tidligere omtalt er lignende Forhold genfundet ved nærværende Undersøgelse; hvorvidt man saa iøvrigt vil betegne dette Forhold som veritabel »Pleomorfi« eller kun opfatte det som et specielt Udtryk for den almen-gyldige Regel, at Cellernes Form og Størrelse i enhver Bakteriekultur er underkastet en cyklisk Variation betinget af Kulturens



Skematisk Fremstilling af Knoldbakteriernes Udviklingscyklus.

1. Frigjorte Smaakorn. 2. Ubevægelige »Præ-Sværmer«. 3. Sværmende Smaastave. 4. Sværmende større Stave. 5. Ubevægelige Stavformer med homogen Struktur. 6. Ubevægelige ældre Stavformer med bælteformet Struktur.

(Efter *Thornton* og *Gangulee*).

Alder, bliver i sidste Instans selvfølgelig et Spørgsmaal af ren konventionel Karakter. — Sammenlign *Henrici* (1928) samt *Clark* (1928).

Stærkere udtalt kommer de nyere Teorier vedrørende Bakteriernes Pleomorfi til Udtryk i et Arbejde af *Gibson* (1928), der helt og fuldt slutter sig til de af *Löhnis* (1916, 1921, 1923) fremsatte Teorier, ifølge hvilke Bakterierne ikke alene formerer sig ved simpel Tvedeling, men tillige ved Knopskydning (som Gærceller) eller ved Uddannelse af særlige Formeringsceller, de saakaldte »Gonidier«, der opstaar i specielle Moderceller, ofte af usædvanlig Form og Størrelse (»Gonidiangier«). I visse Tilfælde er disse Gonidier af saa ringe Størrelse, at de er i Stand til at passere Bakteriefiltre af Infusoriejord eller uglasseret Porcellænsmasse (Berkefeld- resp. Chamberland-Filtre), der ellers er i Stand til at tilbageholde Bakterieceller af den sædvanlige Størrelsesorden (»Filtrerbare Udviklingsstadier«). Endvidere hævdes Knoldbakterierne at være i Besiddelse af særlige Hvileformer, de saakaldte »Mikro-Cyster«, lige som de i visse Udviklingsstadier skulde smelte sammen til amorge Slimmasser (*Löhnis's* »Symplasma«), i hvilke senere opstaar velafrænsede Smaakorn (Regenerationskorn, »regenerative units«), der angives at gendanne de sædvanlige vegetative Celleformer. — Ogsaa *Kás* (1927) slutter sig for Knoldbakteriernes Vedkommende til disse nyere Pleomorfiteorier, idet han tillige angiver, at de af ham konstaterede Gonidier er mere modstandsdygtige mod Udtørring end de sædvanlige vegetative Celler, og at de navnlig opstaar ved langsom Udtørring af Agar- eller Gelatinesubstrater.

Skønt dette interessante og i sine Konsekvenser meget vidtrækkende Problem falder noget uden for Rammerne af nærværende Undersøgelse, skal dog omtales et enkelt Forhold, nemlig Forekomsten af de af *Gibson* beskrevne »Mikro-Cyster«, der efter de hidtidige Iagttagelser synes at være af nogen diagnostisk Værdi.

Undersøger man ufarvede Præparater fra 1—2 Uger gamle Kulturer paa Nitragin-Agar, iagttages kun de sædvanlige vegetative Celler, overvejende repræsenteret af store, ubevægelige Stavformer af regelmæssig Karakter. Anvendes derimod en let Farvning med fortyndet Karbolfuksin (N. B: Undgaa Overfarvning!) eller Farvning efter den af *Barlow* angivne Metodik,

iagttages, at et meget stort Antal af Cellerne er omgivet af en mer eller mindre velafrænset Slimkappe, der farves intensivt af de paagældende Farvestoffer, medens Cellernes Cytoplasma kun farves relativt svagt (Fig. 6). Celler af denne Karakter er i det foregaaende betegnet som »Kapselceller«. En Sammenligning med de af *Gibson* offentliggjorte Mikrofotografier (l. c. Fig. 11 og 13) lader imidlertid ingen Tvivl om, at vi her staar over for Dannelser af identisk Karakter. — Om disse »Mikrocyster« og deres biologiske Egenskaber bemærkes iøvrigt følgende:

Cellernes Oprindelse lader sig ikke studere ved kontinuerlig Undersøgelse i hængende Draabe eller Agarblok, idet »Mikrocysterne« som før nævnt kun kan skelnes fra de sædvanlige Stavformer i farvede Præparater. En omhyggelig Gennemgang af vitalfarvede Præparater fra 5—10 Dages Kulturer lader dog ingen Tvivl om Oprindelsen, idet man her finder alle Udviklingsstadier fra de sædvanlige ubevægelige Stavformer, omgivet af et tyndt kapsellignende Slimlag, til de færdigdannede »Mikrocyster«, omgivet af velafrænsede Vægge med tydelig Dobbeltkontur.

Fremkomsten af »Mikrocyster« er stærkt afhængig af det anvendte Substrat. Typiske Udviklingsstadier iagttages med stor Regelmæssighed paa Nitragin-Agar og Succinat-Agar, men mangler paa Kartoffel, Kød-Pepton-Agar, Ashby's Agar samt alle Gelatinesubstrater.

Mikrocysternes Spiring forløber ifl. *Gibson* polært: Cystevæggen gennembrydes, og den unge Kimstav vokser ud ganske som ved polær Spiring af de hos *Bacillus*-Arterne forekommende Endosporer (se *Gibson*, Fig. 13). Dette Forhold er netop afgørende for *Gibsons* Opfattelse af de nævnte Dannelsers morfologiske Karakter: »The reason why such forms are classed as mikrocysts is that their further development consists of a germination similar in every way to that of spores« (l. c. Side 81). — Ifølge egne Iagttagelser er *Gibsons* Angivelser dog ikke af almengyldig Karakter, idet »Spiringsprocessen« langt oftere foregaar ved en simultan Opløsning af »Cystevæggen«, hvorved den indesluttede Bakteriecelle gradvis frigøres uden Sprængning eller Gennemvoksning af den omgivende Membran. (Vitalfarvning samt direkte kontinuerlige Undersøgelser under Mikroskopet af Cellemateriale fra 6—8 Dage gl. Kulturer paa Succinat-Agar,

hvor de modne Cyster som ovenfor nævnt er særdeles tydelige selv i ufarvet Tilstand). — Samtidig maa dog bemærkes, at man ret ofte ser saavel den af *Gibson* angivne Spiringsmaade som de af ham beskrevne tomme Cystehylstre, enten dette nu skyldes, at »Hylsteret« er en efterladt Rest fra en forudgaaende Spiringsproces eller er opstaaet ved Præparationen, idet den indesluttede Bakteriecelle herved er presset ud af Membranen.

Med Hensyn til Mikrocystrernes biologiske Egenskaber bemærker *Gibson*, at de ikke er i Besiddelse af større Resistens over for ekstreme Temperaturer end de sædvanlige Celleformer, men nærmere Oplysninger om dertil svarende Forsøg mangler totalt. Til nærmere Belysning af dette Forhold er derfor anstillet et Opvarmningsforsøg med Cellemateriale af forskellig Alder, hidrørende fra Kulturer paa Nitragin-Agar og Succinat-Agar (Stamme L_{25}). Forsøgene, der er udført i Overensstemmelse med den af Forf. tidligere beskrevne Metodik (l. c. 1933) giver de i Tabel 3 opførte Resultater:

Tabel 3. Lucernebakteriernes Termoresistens.

Opvarmningstid (Min.)	Bakteriematerialets Oprindelse og Alder			
	Nitragin-Agar		Succinat-Agar	
	2 Døgn	15 Døgn	2 Døgn	15 Døgn
5	+	+	+	+
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+
20	+	+	+	+
25	+	+	+	+
30	+ ÷	+ ÷	+	÷
35	+ ÷	+ ÷	+	÷
40	÷	÷	÷	÷

I Overensstemmelse med *Gibsons* Angivelser er »Mikrocysterne« altsaa ikke i Besiddelse af større Termoresistens end de sædvanlige vegetative Celleformer.

Til nærmere Undersøgelse af Cellernes Resistens over for Udtørring anvendes følgende Teknik: Cellematerialet udstryges i tyndt Lag paa sterile Glassplinter, der opbevares ved 25° C. i sterile, bomuldslukkede Reagensglas. Med nogle Dages — senere nogle Ugers — Mellemrum undersøges Vitaliteten af det

udtørrede Cellemateriale, idet to af Glassplinterne anbringes paa en frisk fremstillet Flade af Nitragin-Agar, medens to andre overføres i Druesukker-Bouillon.

Tabel 4. Lucernebakteriernes Resistens over for Udtørring.

Udtørnings- periodens Længde	Bakteriematerialets Oprindelse og Alder			
	Nitragin-Agar		Succinat-Agar	
	2 Døgn	15 Døgn	2 Døgn	15 Døgn
3 Døgn	+	+	+	+
5 »	+	+	+	+
7 »	+	+	+	+
18 »	+	+	+	+
4 Uger	+	+	+	+
6 »	+	+	+	+
8 »	+	+	+	+
11 »	+	+	÷	+
35 »	÷	+	÷	÷
42 »	÷	+ ÷	÷	÷

Som det fremgaar af Tabel 4, udmærker Lucernebakterierne sig ved en ganske overordentlig stor Resistens over for Udtørring, ganske uanset om Cellerne stammer fra unge eller noget ældre Kulturer med tydelig Udvikling af »Mikrocyster«. I begge Forsøgsserier konstateres dog en større Resistens hos det ældre Cellemateriale, mærkeligt nok mere fremtrædende i Forsøgsserien paa Nitragin-Agar end paa Succinat-Agar, der iøvrigt ogsaa for de yngre Celler udviser lidt mindre Resistens end i Parallelserien paa Nitragin-Agar. — Alle Forhold taget i Betragtning maa man herefter være berettiget til at betragte »Mikrocysterne« som særlige Resistensformer, der i visse Tilfælde kan være af Betydning for Opretholdelsen af Arten, særlig ved Udtørring af de øvre Jordlag, der tjener som Vokseplads for Bakterierne.

Om »Mikrocysternes« diagnostiske Værdi, se en senere Forsøgsberetning.

Sluttelig et Par Bemærkninger om den tidligere omtalte Teori vedrørende Knoldbakteriernes Formering ved »Gonidier«, der har været fremsat af forskellige Forfattere fra ældre Tider til de seneste Aar (*Laurent* 1890, *Morck* 1891, *Mazé* 1898, *Bewley* og *Hutchinson* 1920, *Thornton* og *Gangulee* 1926, *Gan-*

gulee 1926, *Kás* 1927, *Gibson* 1928, *Israilsky* 1929, *Israilsky* og *Leonowitsch* 1933 m. fl.). — Saa vidt det kan ses af den foreliggende Litteratur, hviler Hovedparten af de hidtidige Arbejder paa dette Omraade dog kun paa mer eller mindre velbegrundede Formodninger og Kombinationer uden at støttes af de absolut nødvendige Iagttagelser af Udviklingsgangen i hængende Draabe eller Agarblok. Fejlkilderne er mangfoldige, og meget ofte foreligger der sikkert Forveksling med udstødte Draaber eller Korn af Volutin eller Fedt, medens det i andre Tilfælde kan dreje sig om kondenserede men stadig udviklingsdygtige Protoplasmaabrokker, som man med stor Regelmæssighed finder i aldrende Kulturer af praktisk talt alle Bakteriearter, uden at man dog derfor er berettiget til at tale om Formeringsceller af specifik Karakter.

Om selve Forekomsten af saadanne »gonidielignende« Smaakorn i Renkulturer af Lucernebakterier vil der næppe kunne rejses større Diskussion, idet de genfindes med stor Regelmæssighed hos samtlige Stammer selv efter gentagne Spredninger. De optræder mer eller mindre hyppigt paa en Række forskellige Substrater, dog fortrinsvis i aldrende Kulturer (4--5 Døgn eller mere). En særlig karakteristisk Form iagttages paa Succinat-Agar, hvor man ofte ser store, sammenhængende Klumper af »Mikrocyster«, der er under Opløsning i selve den aldrende Moderkultur, hvorved opstaar plasmodielignende Dannelser omsluttende stærkt lysbrydende Smaakorn af velafgrænset Karakter. I sin mest udprægede Form udviser Fænomenet en slaaende Lighed med *Löhnis's* »Symplasmadannelser« med Uddifferentiering af Regenerationskorn (»regenerative units«, se Fig. 23). Om denne Tydning er rigtig, eller om det kun drejer sig om en degenerativ Opløsningsproces (»Autolyse«) under Frigørelse af ikke-udviklingsdygtige Cellebestanddele (Reservestoffer eller hendøende Protoplasma-klumper), lader sig som før nævnt kun afgøre ved Spiringsforsøg med levende, ufarvet Materiale. — Forsøg af denne Art er udført i ret stor Udstrækning paa Statens Planteavls-Laboratorium, men hidtil uden afgørende Resultat. En enkelt Undersøgelsesrække (November 1939) er muligvis af nogen Interesse:

Som Forsøgsmateriale benyttes lidt af Bakteriebelægningen fra en 7 Døgn gl. Kultur paa Succinat-Agar, der i farvede Præparater udviser et Billede ganske svarende til Fig 23. Materialet udstryges paa en frisk

fremstillet Flade af Druesukker-Agar, hvorfra under aseptiske Betingelser udskæres en Blok, ca. 5×5 mm, der anbringes i hængende Stilling paa et sterilt Dækglas, der atter monteres over et »Fugtigt Kammer«. Præparatet anbringes paa et stort Mikroskopstativ med Objektfører og Noniusinddeling, hvorefter udvælges et Synsfelt omfattende 8 gonidielignende Smaakorn, der aftegnes ved $1800 \times$ Mikroskopforstørrelse. Præparatet forbliver urørt paa Mikroskopet, der anbringes i Termostat ved 30° C. Udviklingen følges gennem ca. 3 Døgn ved stadige mikroskopiske Undersøgelser, der som Regel foretages med 3—4 Timers Mellemrum. (Natintervallerne dog paa 5—6 Timer). Resultatet kan kort gengives saaledes:

24 Timer: Hovedparten af de overførte Normalceller i Spiring.
— Kornene uforandrede.

40 Timer: Væksten af de unge Normalceller fortsat under Dannelsen af Smaakolonier. — 5 af de iagttagne Smaakorn uændrede, hvorimod de 3 synes at udvise en svag Forøgelse i Størrelse.

50 Timer: De 5 af Smaakornene stadig uændrede, medens de 3 nu udviser en meget tydelig Ændring i Størrelse og Lysbrydning.

60 Timer: De 3 Korn i tydelig Deling, de 5 stadig uændrede. — Hovedparten af Agarblokken er nu overdækket af en sammenhængende Bevoksning af normale Stavformer, der næsten helt omslutter de under Iagttagelse værende Smaakorn.

74 Timer: Udviklingen af saavel de iagttagne Smaakorn som iøvrigt af hele Bakteriebelægningen synes helt at være gaaet i Staa, formodentlig paa Grund af Substratets Udtømmning for Næringsstoffer samt Ophobning af Stofskifteprodukter. — Forsøget hermed afsluttet.

I ovennævnte Forsøgsserie er altsaa med Sikkerhed fastslaaet en langsomt forløbende Udvikling af enkelte gonidielignende Smaakorn. Dette er dog det hidtil eneste positive Resultat, som man — navnlig paa Baggrund af det langt overvejende Antal negative Resultater — sikkert foreløbig bør betragte med Forbehold, da man ikke kan afvise den Mulighed, at de tre »Smaakorn«, der udviste Vækst og Celledeling, kan have været degenererede Dværgceller, opstaaet ved en abnormt forløbende Celledeling, saaledes som man lejlighedsvis kan iagttage i enhver normal Bakteriekultur. — Navnlig paa et Omraade som dette, hvor Fejlkilderne er mangfoldige, og hvor de iagttagne Celle-Elementer ligger tæt ved Grænsen for Mikroskopets optiske Ydeevne, gør man vel i at modtage enhver ny Meddelelse — saa vel som sine egne Iagttagelser — med afventende Forbehold.

Ifølge *Löwnis* og hans Skole skal de formentlige »Gonidier«

være »filtrerbare« — en Angivelse, der for Knoldbakteriernes Vedkommende er støttet af *Almon* og *Baldwin* (1932) samt *Israilsky* og *Leonowitsch* (1933), hvorimod *Barthel* og *Bjälfe* (1933) stedse kun har opnaaet negativt Resultat. — Spørgsmaalet har været medinddraget i nærværende Undersøgelse ved følgende Forsøg:

Serie I. Substrat: Kaliumglycerofosfat-Mannitopløsning i Chamberlandkolber (30 cm³ i hver), podet med Bakteriestamme L₂₅. Efter henholdsvis 1, 3, 5 og 10 Dages Forløb udtages en Kolbe, hvis Indhold rystes ud i 100 cm³ steril Druesukker-Bouillon. Derefter Filtrering gennem et Chamberland-Pasteur-Filter (Porøsitet: L₈) samt Aftapning i bomuldslukkede, sterile Reagensglas.

Forsøgene opgøres efter 30 Dages Henstand ved 25° C., stedse dog med negativt Resultat, idet samtlige Filtrater holder sig sterile og ganske klare, uden Bundfald eller Udfnugning af nogen Art.

Serie II. Substrat: Druesukker-Bouillon. Iøvrigt samme Forsøgsplan som foregaaende.

Ligeledes negativt Resultat.

Serie III. Substrat: Succinat-Opløsning (samme Sammensætning som anvendt til Succinat-Agar). Samme Forsøgsplan som de to foregaaende Serier.

Ligeledes negativt Resultat.

I Tilslutning til *Barthel* og *Bjälfe* (1933) har det altsaa ikke været muligt ved disse Undersøgelser at paavise Tilstedeværelsen af filtrerbare Udviklingsstadier hos Lucernebakterierne. — Hermed er dog selvfølgelig ikke sagt, at saadanne overhovedet ikke forekommer, idet deres Optræden kan være afhængig af visse ydre Betingelser, der ikke har været til Stede ved ovenstaaende Forsøg. Bl. a. maa man have sin Opmærksomhed henvendt paa en mulig Bakteriofagvirkning, der ifølge Erfaringer fra andre Grene af Bakteriologien ofte inducerer saavel Fremkomsten af filtrerbare, bakteriofagresistente Udviklingsformer som stærkt afvigende Mutations- eller »Dissociations«-Former af konstant Karakter (*Hadley* 1928, 1933, *Hoder* 1933).

Tilbage bliver endnu det Spørgsmaal, om de smaa ellipsoid- eller kugleformede Sværme-celler, der er karakteristisk for nypodede Kulturer, fortrinsvis er opstaaet som »Gonidier« ved en endogen Nydannelsesproces inden for de ældre Stavformer med paafølgende Frigørelse enten i selve den oprindelige Moderkultur eller i hvert Fald ved Overpodning paa nyt Substrat. Til Støtte for denne Opfattelse, der navnlig er hævdet af nyere

engelske Forfattere, taler bl. a. den Omstændighed, at man lejlighedsvis har iagttaget større Stavformer indeholdende smaa, velafgrænsede Kugleformer, der medens de endnu er beliggende i Moderzellen er forsynede med veludviklede Svingtraade og iøvrigt af samme Størrelse som de fritsværmende Ellipsoid- eller Kugleformer (Thornton 1929).

Egne Iagttagelser, fortrinsvis anstillede paa farvede Præparater, tyder ligeledes paa, at de stærkt farvede Bælter og Smaakorn, der navnlig fremtræder tydeligt i ældre Kulturer ved Farvning med Bengal-Rosa, frigøres allerede i Moderkulturen og derved gaar over i de engelske Forfatters »Præ-Sværmer«-Stadium (Fig. 22). Det maa dog betones, at det hidtil ikke er lykkedes ved direkte Undersøgelse i hængende Agarblok eller hængende Draabe at opnaa en sikker Verifikation af denne Antagelse.

Vor nuværende Viden m. H. t. Knoldbakteriernes Udvikling og eventuelle »Pleomorfi« kan altsaa kort sammenfattes saaledes:

Adskillige Iagttagelser fra de senere Aar tyder paa, at denne Bakterigruppe udviser mere komplicerede Forhold end tidligere antaget. Noget helt sikkert herom vides dog ikke, idet Anskuelse staar mod Anskuelse, Forsøg mod Forsøg. Utvivlsomt fortjener hele dette Spørgsmaal en mere indgaaende Behandling, end det har været muligt i foreliggende Arbejde. Undersøgelsen vil imidlertid blive fortsat og udvidet, navnlig med Henblik paa Forekomsten af mutationslignende Fænomener og Fremkomsten af »Dissociationsformer« uden knolddannende Evne, der er af afgørende Betydning for Fremstilling og Kontrol af effektive Nitragin-Kulturer til Brug for Praksis.

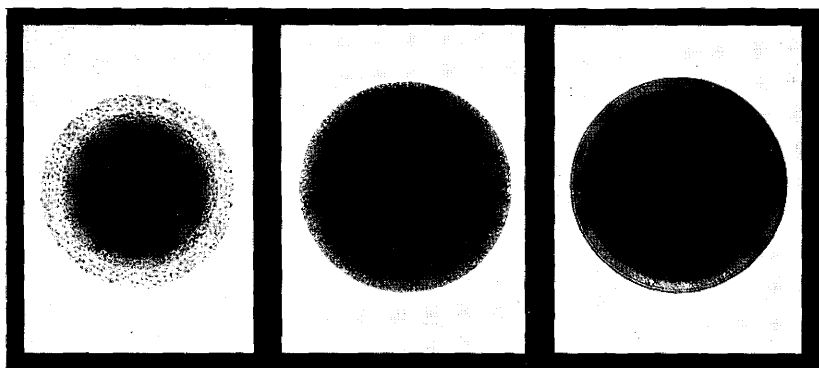
Litteraturfortegnelse.

Se en følgende Forsøgsberetning.

Billedfortegnelse.

Fig. 1. Kolonier paa Nitragin-Gelatine, 12 Døgn ved 20° C. — a: L_{25} (smeltende Koloni). b: L_{24} (ikke-smeltende). c: *Bacterium radiobacter* Král (ikke smeltende). 60×.

Fig. 2. Bakteroider fra ung Lucerneplante. Kiskalt-Farvning, 1500×.



a

b

Fig. 1.

c

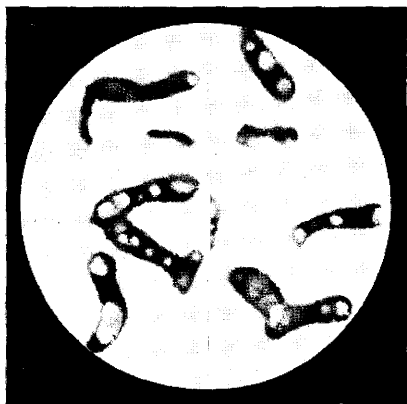


Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 4.



Fig. 5.



Fig. 6.

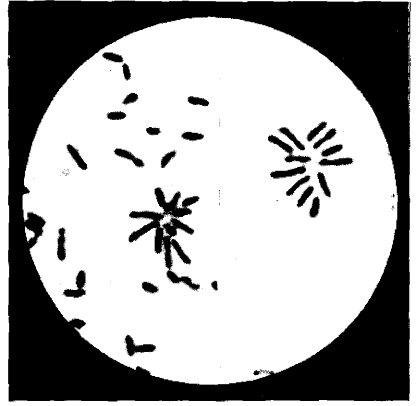


Fig. 7.



Fig. 8.

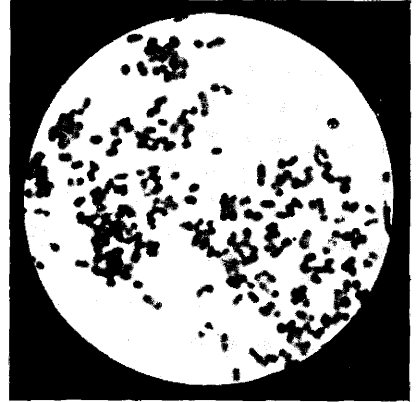


Fig. 9.

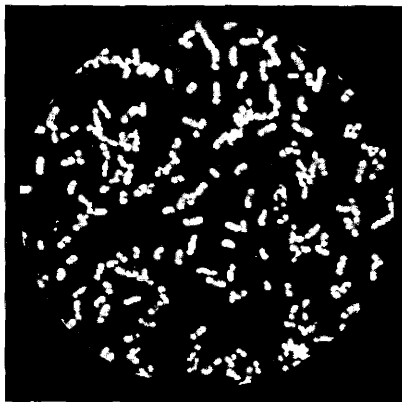


Fig. 10.

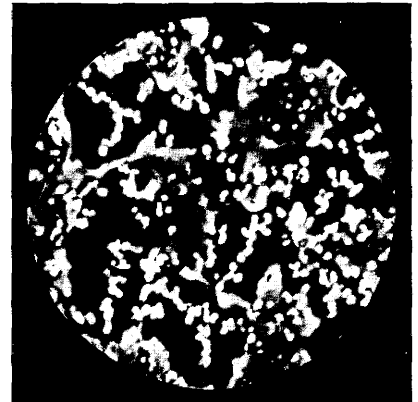


Fig. 11.

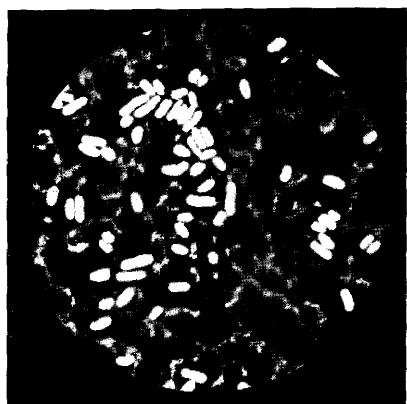


Fig. 12.



Fig. 13.

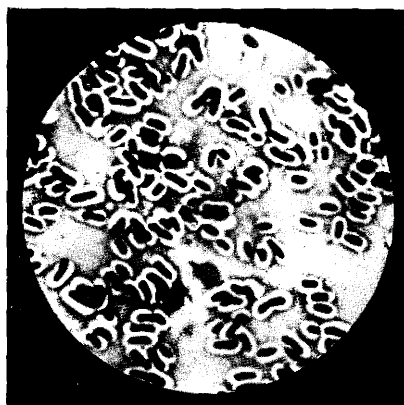


Fig. 14.

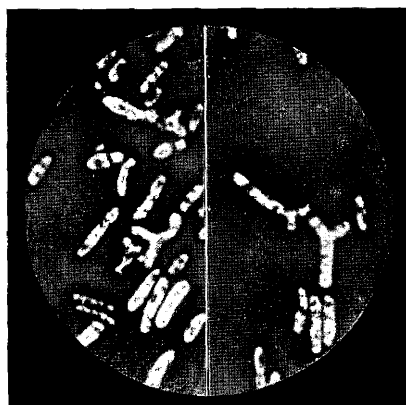


Fig. 15.



Fig. 16.



Fig. 17.



Fig. 18.

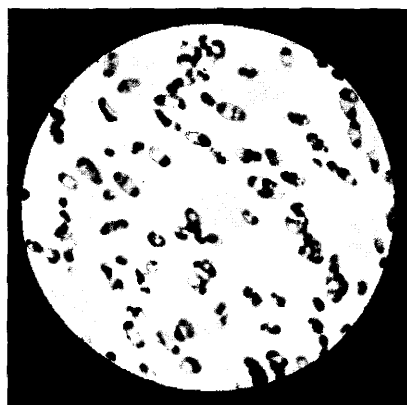


Fig. 19.



Fig. 20.



Fig. 21.

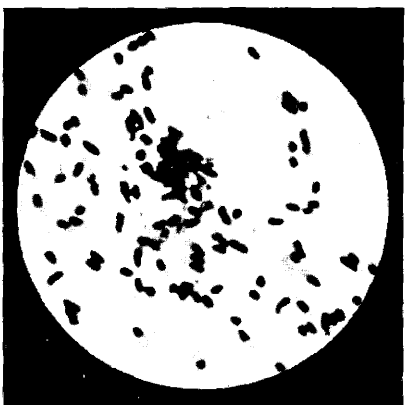


Fig. 22.

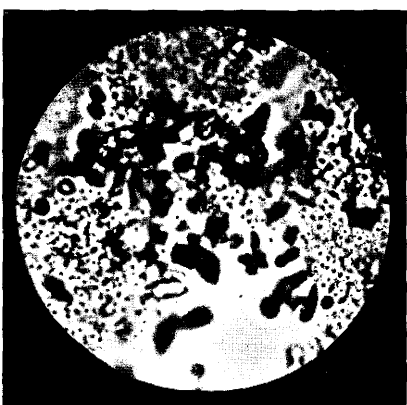


Fig. 23.

- Fig. 3. L_{25} . Sværmende Celler. Nitragin-Agar, 1 Døgn. Ciliefarvning efter *Zellnow*. 1500 $\times$.
- Fig. 4. L_{25} . Unge Stavformer. Nitragin-Agar, 1 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 5. L_{25} . Ældre Stavformer. Nitragin-Agar, 3 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 6. L_{25} . Kapselceller. Nitragin-Agar, 8 Døgn. Farvet efter *Harrison* og *Barlow*. 1500 $\times$.
- Fig. 7. L_{25} . Stavformer i Stjernelejrning. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Bengal-Rosa. 1500 $\times$.
- Fig. 8. L_{25} . Længere Stavformer. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Bengal-Rosa. ca. 1000 $\times$.
- Fig. 9. L_{25} . Korte Stavformer med stærkt farvede Smaakorn. Nitragin-Agar, 16 Døgn. Bengal-Rosa. 1500 $\times$.
- Fig. 10. L_{25} . Unge, sværmende Stavformer. Ingen Slimproduktion. Nitragin-Agar, 1 Døgn. Cyanochin. 1200 $\times$.
- Fig. 11. L_{24} . Unge, uhevægelige Stavformer. Kraftig Slimproduktion. Nitragin-Agar, 1 Døgn. Cyanochin. 1200 $\times$.
- Fig. 12. L_{25} . Kortere og længere Stavformer; delvis Pallisadelejrning. Svag Slimproduktion. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Kongo-Præparat. 1500 $\times$.
- Fig. 13. L_{31} . Stavformede Celler med forslimede Cellevægge. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Farvning efter *Hiss*. 1500 $\times$.
- Fig. 14. L_{42} . Mutantform med stærk Slimdannelse. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Farvning efter *Hiss*. 1500 $\times$.
- Fig. 15. L_{59B} . Bakteroidformer, optrædende spontant paa kunstigt Substrat. Nitragin-Agar, 2 Døgn. Cyanochin. 1500 $\times$.
- Fig. 16. L_{36} . Uregelmæssige og forgrenede Stavformer. Kød-Pepton-Agar, 1 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 17. L_{25} . Korte, regelmæssige Stavformer. Kød-Pepton-Agar, 3 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 18. L_{25} . Uregelmæssige Celleformer. Kartoffelkultur, 6 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 19. L_{25} . Korte, plumpe Celleformer. Ashby's Agar, 2 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 20. L_{36} . Uregelmæssige og forgrenede Celleformer. Nitragin-Agar + Krystalviolet 1:16000, 3 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 21. L_{31} . Uregelmæssige og forgrenede Celleformer. Kød-Pepton-Agar, 1 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.
- Fig. 22. L_{25} . Stavformede Celler i Opløsning under Frigørelse af intensivt farvede Protoplasmaklumper (»Regenerationsdannelser«). Fra en sekundær Koloni paa Nitragin-Agar, 14 Døgn. Bengal-Rosa. 1500 $\times$.
- Fig. 23. L_{25} . Celler i Opløsning under Frigørelse af Smaakorn (»regenerative units«). Succinat-Agar, 8 Døgn. Fort. Karbol-fuksin. 1500 $\times$.