

Om forekomst af Azotobacter i dyrkede jorder.

Ved H. L. Jensen.

432. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur.

Ved Statens Planteavls-Laboratoriums bakteriologiske Afdeling er planlagt en række undersøgelser over udbredelse af kvælstofbindende bakterier i danske jorder, med henblik på disse organismers betydning for jordens kvælstofbalance. Den nærværende beretning omhandler de resultater, der er fundet angående fritlevende, aerobe kvælstofbindere (*Azotobacter*).

Beretningen er udarbejdet af afdelingsbestyrer, dr. agro. H. L. Jensen.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur.

Indledning.

Udbredelse af de kvælstofbindende bakterier af slægten *Azotobacter* i jordbunden har været genstand for mange undersøgelser i alle verdensdele, da man i almindelighed, omend ofte med tvivlsom berettigelse, har tillagt disse organismer en fremragende betydning for dyrkede jorders kvælstofforsyning. For danske jorders vedkommende er spørgsmålet først studeret af *Christensen* (1914), som synes at have været den første til at påvise den iøjnefaldende korrelation mellem jordreaktionen og forekomsten af *Azotobacter*, således som det fremgår af følgende tal:

Jordens reaktion (lakmusprøve)	Antal jordprøver		ialt
	med <i>Azotobacter</i>	uden <i>Azotobacter</i>	
sur.....	1	21	22
neutral.....	7	43	50
svagt alkalisk.....	17	8	25
alkalisk.....	44	1	45
ialt.....	69	73	142

Omfattende undersøgelser over forekomsten af *Azotobacter* i forhold til jordens brintionkoncentration, bestemt ved elektrometrisk og kolorimetrisk måling, blev udført i Nordamerika af *Gainey* (1923), som fandt, at *Azotobacter* var relativt sjælden i jord af reaktionstal på 6.0 og derunder, medens iøvrigt hyppigheden steg med stigende reaktionstal, i overensstemmelse med *Christensen's* resultater. Dette er i det store og hele blevet bekræftet i mange senere undersøgelser og stemmer overens med, at de almindelige arter af *Azotobacter* (*chroococcum*, *beijerinckii*, *agile* og *vinelandii*) i renkultur vokser bedst ved pH 7.0—8.0 og ikke kan vokse i kvælstoffrit substrat ved pH under 6.0, der repræsenterer surhedsgrænsen for de kvælstofbindende enzymeres funktion. Derimod synes vækst i nogle tilfælde at kunne finde sted i substrat med bundet kvælstof (NH_4 eller NO_3) af betydeligt surere reaktion, som påvist af *Burk*, *Lineweaver* & *Horner* (1934) og *Csáky* (1949); dette er sandsynligvis forklaringen på den lejlighedsvis forekomst af *Azotobacter* i jord med lavere reaktionstal end 6.0. Den af *Starkey* og *De* (1939) beskrevne *Az. indicum* er ganske vist påfaldende ufølsom overfor reaktionen og kan endnu binde kvælstof ved pH 3.0—3.3, men synes at være en yderst sjælden art.

Christensen, hvis undersøgelser udelukkende tog sigte på *Azotobacter* som reagens på jordens reaktion og kalktrang, såvel som *Gainey*, påviste *Azotobacter* ved tilsætning af jord til en kvælstoffri mannitolopløsning, hvor azotobacterholdige jorder forårsager udvikling af en karakteristisk bakteriemembran (azotobacterhinden). Denne metode giver i hovedsagen kun oplysning om fraværelse eller tilstedeværelse af *Azotobacter* i den undersøgte jord, men ikke om dens mere eller mindre rigelige forekomst, endnu mindre om selve individantallet; netop dette sidste moment — *Azotobacter*-floraens tæthed i jorden — er imidlertid af afgørende betydning, når man ønsker oplysning om dens betydning som kvælstofbindende agens. I denne retning er undersøgelser af større betydning først udført af *Winogradsky* (1926, 1928), som anvendte dels mikroskopisk undersøgelse af jorden, dels kulturelle metoder, bl. a. podning af kvælstoffri, mannitholdig kiselsyre-gel med jord og tælling af de fremkomne *Azotobacter*-kolonier. Den sidste metode er i forskellige modifikationer

blevet anvendt af talrige andre forskere, som gennemgående har fundet, at *Azotobacter* i normale jorder kun findes i antal på nogle få til nogle tusinde pr. g jord, og tal på mere end 10.000 pr. g findes kun undtagelsesvis. Disse tal må ganske vist opfattes som minimumsværdier, da de talte kolonier kan stamme fra celle-aggregater såvel som fra enkelte celler; efter de mikroskopiske undersøgelser at dømme synes aggregaterne dog kun at bestå af forholdsvis få individer.

Siden *Christensen's* ovennævnte arbejde er udbredelsen af *Azotobacter* i danske jorder kun blevet undersøgt af *Weis & Bornbusch* (1914), som specielt studerede skovjorder, hvor *Azotobacter* kun fandtes rent undtagelsesvis, og af *Petersen* (1926), som blandt 30 agerjorder fandt *Azotobacter* i 12, hvoraf 2 med reaktionstal på 5.4—5.5. Angående *Azotobacter*-floraens tæthed i danske jorder med henblik på dens mulige betydning for kvælstofbalancen foreligger ingen angivelser. En sådan vurdering er forsøgt i det nærværende arbejde.

Udbredelse og antal af *Azotobacter* i jorden.

Der undersøgtes ialt 264 jordprøver, hvoraf 116 var indsendte til Statens Planteavls-Laboratorium til bestemmelse af reaktions-, fosforsyre- og kalital, medens resten var specielt udtagne prøver; 91 af disse stammede fra statens forsøgsstationer (Lyngby 12, Askov lermark 23, Askov sandmark 9, Lundgaard 4, Studsgaard 5, Borris 4, Tylstrup 4, marskforsøgene ved Ribe 5, marskforsøgene ved Højer 3, Aarslev 4, Tystofte 4, Jyndeved 3, Ødum 3, Blangstedgaard 2, Statens Væksthusforsøg 2). Der undersøgtes 123 prøver fra Sjælland, 102 fra Jylland, 20 fra Lolland-Falster, 10 fra Fyn, 3 fra Samsø, 3 fra Møn, 2 fra Bornholm, 1 fra Langeland. Det overvejende flertal af prøverne repræsenterede agerjorder; 13 stammede fra havejorder, nogle enkelte fra permanente græsmarker og udyrkede jorder.

Tællingerne af *Azotobacter* udførtes efter en tidligere anvendt metode (*Jensen*, 1940) ved spredning på dextrin-glukose-agar af følgende sammensætning: dextrin 10.0 g, glukose 2.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $FeCl_3$ 0.1 g, Na_2MoO_4 0.005 g, $CaCO_3$ 2.0 g, agar 20.0 g, ledningsvand 1000 ml. Tilsætningen af glukose anvendtes, fordi flere stammer af *Az. beijerinckii* viste

sig at vokse dårligt og danne utydelige kolonier på ren dextrin-agar. På stivnet sterilt substrat i petriskåle (3 parallel-plader) spredtes ved hjælp af en svær platinnål 0.5 ml jordopslemning, som regel i en koncentration svarende til 0.1 eller 0.05 g jord; højere fortyndinger anvendtes i de forholdsvis få tilfælde, hvor der fandtes exceptionelt høje *Azotobacter*-antal (> 2000 pr. g jord). Efter fordampning af vandet i den tilsatte jordopslemning henstilledes skålene i thermostat ved 25° C. *Azotobacter*-kolonierne bliver i almindelighed efter to døgn (undertiden allerede efter 24—30 timer) synlige som mælkeagtige dråber, der hurtigt bliver sortbrune (*Az. chroococcum*) eller gullige (*Az. beijerinckii*). Tælling af kolonierne foretoges efter 5 døgn, på hvilket tidspunkt de opnår en anselig størrelse (6—8 mm på plader, hvor deres antal ikke overstiger 10—20) og er let kendelige ved deres tætte, uigennemsigtige beskaffenhed og deres karakteristiske pigment på baggrund af den tynde, sammenhængende vækst af ikke-kvælstofbindende bakterier, som dækker hele agarfladen. Det kan her bemærkes, at der i intet tilfælde sås kraftig vækst af andre organismer end *Azotobacter*; enkelte andre bakterier og gærsvampe, som dannede ret anselige, men stærkt slimede og gennemsigtige kolonier, viste sig i renkultur fuldstændig at mangle kvælstofbindende evne.

Tætheden af *Azotobacter* i jorden beregnedes som antal af formeringsdygtige celler (eller celle-aggregater) pr. g jord i foreliggende fugtig tilstand: gennemsnitligt antal kolonier på 3 fællesplader \times fortyndingsgraden. De således fundne tal varierede fra ingen til 80.000 pr. g jord. Antallet af jorder aftog hurtigt med stigende størrelsesorden af *Azotobacter*, således som følgende tal viser (sml. tabel 1):

<i>Azotobacter</i> pr. g.	Antal jordprøver
0	122
<100	71
100—1000	52
1000—10.000	16
>10.000	3

Ganske lignende tal er i nyere tid fundet af *Stöckli* (1944) i en undersøgelse af et stort antal jorder (1000) fra Schweiz. Der fandtes i de her behandlede jorder ingen kendelig forskel på

lerjorder og sandjorder, ej heller syntes *Azotobacter* at forekomme særlig rigeligt i jord under bælgplanteafgrøder, således som det ofte angives. Derimod fandtes en påfaldende rigdom på *Azotobacter* i havejorder, hvad også *Stöckli* iagttog; de tre jorder med mere end 10.000 *Azotobacter* pr. g var alle havejorder, og maximum (80.000) forekom i en havejord fra Statens Planteavlslaboratorium. Dog synes det ikke, som *Stöckli* antog, at komme særlig an på den intensive dyrkning af jorden; det foreliggende materiale omfatter ganske vist kun tre udyrkede jorder, men to af disse, en fra en nærmest ruderatplads ved Lyngby og en fra en naturlig græsmark nær Abed Planteavlsstation, udviste meget høje *Azotobacter*-tal, henholdsvis 1800 og 7500 pr. g.

Med hensyn til specielle jordbundsegenskaber fandtes der, som det var at vente, en meget tydelig korrelation mellem jordens reaktion og forekomsten såvel som tætheden af *Azotobacter*, som vist i tabel 1.

I jorder af pH under 6.0 ses *Azotobacter* kun at forekomme undtagelsesvis og ikke ved lavere reaktionstal end 5.8. Over pH 6.0 stiger hyppigheden jævnt, med et tilsyneladende vendepunkt i pH-gruppen 6.5—6.9, og ved reaktionstal på 7.5 og derover bliver forekomsten praktisk talt konstant, i fuld overensstemmelse med *Christensen's* og *Stöckli's* resultater. Også *Azotobacter*-tallenes størrelsesorden stiger med reaktionstallet; medens en tæthed på under 100 pr. g er aldeles dominerende ved reaktionstal under 6.5, bliver tal på hundreder gradvis mere almindelige efterhånden som reaktionstallet stiger fra 6.5 til 7.4, og ved pH over 7.5 og især over 8 er denne størrelsesorden fremherskende, medens endnu højere tætheder i alle tilfælde er relativt fåtallige.

Et mere præcist udtryk for sammenhængen mellem reaktionen og *Azotobacter*-tætheden fås, når man i de azotobacterholdige jorder beregner korrelationskoefficienten (efter formlen

$$r = \frac{\Sigma dx \cdot dy}{\sqrt{\Sigma dx^2 \cdot \Sigma dy^2}}$$

hvor $\Sigma dx \cdot dy$ betegner summen af produkterne af de samvarende afvigelser fra gennemsnittet, og Σdx^2 og Σdy^2 summerne af afvigelsernes kvadrater) mellem reaktionstallet og *logaritmen* til *Azotobacter*-tætheden, hvilket giver en retlinet regression. (Sml.

Tabel 1.
 Forholdet mellem jordens reaktion og forekomsten og tætheden af
Azotobacter.

pH	Antal jorder med <i>Azotobacter</i> -tæthed pr. g.:						<i>Azotobacter</i> -holdige jorder, pct.
	0	<100	100- 1000	1000- 10.000	10.000- 100.000	ialt	
4.5.....	1						
4.6.....							
4.7.....							
4.8.....	2						
4.9.....	1						
5.0.....	1						
5.1.....	1						
5.2.....	2						
5.3.....	3						
5.4.....	5						
5.5.....	5						
5.6.....	5						
5.7.....	6						
5.8.....	2	2					
5.9.....	4	2					
6.0.....	8	4					
6.1.....	3	3					
6.2.....	10	1					
6.3.....	9	3					
6.4.....	10	3	1				
6.5.....	5	2	1				
6.6.....	6	4	1				
6.7.....	6	4	3				
6.8.....	8	6	2	1			
6.9.....	6	6	3				
7.0.....	2	6	3				
7.1.....	1	5	2	1			
7.2.....	7	1	1	2			
7.3.....		5	3	1			
7.4.....	1	3	4		1		
7.5.....		4	1	1			
7.6.....	2	2	4	1			
7.7.....		1	4	2	1		
7.8.....		1	3	2			
7.9.....		2	4		1		
8.0.....		1	3	2			
8.1.....			5				
8.2.....			2				
8.3.....			2				
8.4.....				2			
8.5.....				1			
<6.0.....	38	4				42	9.5 ± 4.52
6.0—6.4.....	40	14	1			55	27.3 ± 6.01
6.5—6.9.....	31	22	10	1		64	51.6 ± 6.25
7.0—7.4.....	11	20	13	4	1	49	77.6 ± 5.96
7.5—7.9.....	2	10	16	6	2	36	94.4 ± 5.42
8.0—8.5.....		1	12	5		18	100
Ialt.....	122	71	52	16	3	264	53.8 ± 3.07
pct.....	46.2	26.9	19.7	6.1	1.1	100	

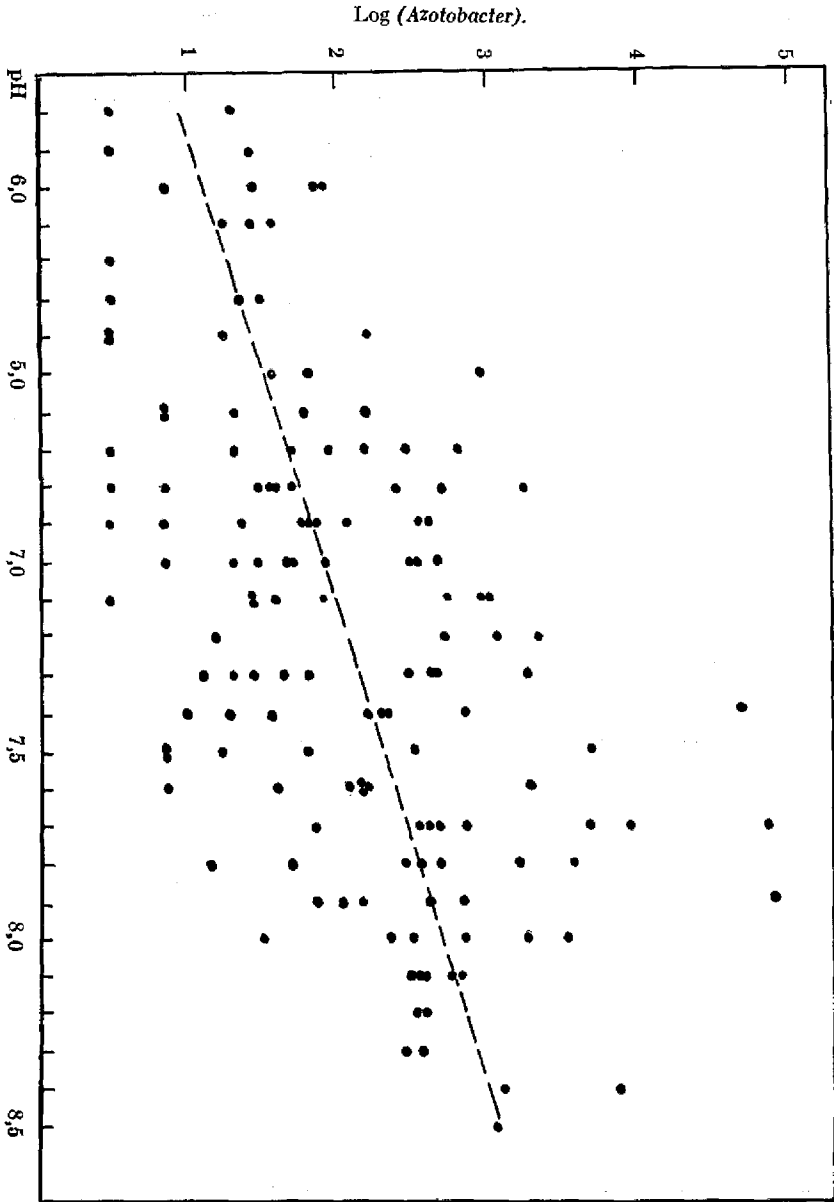


Fig. 1. Regression mellem pH og log (*Azotobacter*) i 142 azotobacterholdige jorder af pH 5.5—8.5. Regressionskoefficient for log (*Azotobacter*) med hensyn til pH: $R = +0.782 \pm 0.0982$. Regressionsligning: $Y = 2.05 + 0.782 (x - 7.19)$.

fig. 1). I de 142 azotobacterholdige jorder fandtes korrelationskoefficienten (r) mellem pH og log (*Azotobacter*):

$$r = + 0.537 \pm 0.060,$$

altså en særdeles tydelig omend langt fra fuldkommen korrelation.

Det er en kendt sag, at voksemediets indhold af fosfat udøver en stærk indflydelse på væksten af *Azotobacter*, som af denne grund jævnlig har været forsøgt anvendt som reagens på jordens indhold af tilgængelig fosforsyre (se f. ex. *Petersen*, 1933). Man kunne derfor vente at finde en positiv korrelation mellem fosforsyretallene og forekomsten såvel som tætheden af *Azotobacter*, hvilket også *Stöckli* (1944) iagttog. Her syntes dog ret udviklede forhold at gøre sig gældende. Indenfor det område af reaktionsskalaen (pH 5.8 til 7.5), hvor *Azotobacter* ikke er konstant manglende eller praktisk talt konstant tilstede, fandtes der ingen signifikant forskel på fosforsyretallene i de azotobacterfrie og de azotobacterholdige jorder, således som det fremgår af opdelingen i tabel 2, bortset fra pH-gruppen 7.0—7.5, hvor den gennemsnitlige forskel på fosforsyretallene dog kun er ringe, og hvor variationsvidden i begge retninger er størst for de azotobacterholdige jorders vedkommende.

Tabel 2.
Fosforsyretal og forekomst af *Azotobacter* i jord af forskellig reaktion.

pH-klasse	Azotobacter-frie jorder				Azotobacter-holdige jorder			
	antal	Ft			antal	Ft		
		mini-mum	maxi-mum	gennemsnit		mini-mum	maxi-mum	gennemsnit
5.8—6.4...	28	1.1	13.6	5.2 ± 0.57	12	2.5	6.5	4.3 ± 0.41
6.5—6.9...	24	2.1	13.2	5.2 ± 0.51	32	1.8	13.2	6.2 ± 0.54
7.0—7.5...	10	3.4	7.4	5.0 ± 0.38	36	2.1	30.4	8.1 ± 1.05

Forekomsten af *Azotobacter* i og for sig synes således ikke at afhænge af fosfatindholdet udtrykt ved fosforsyretallet indenfor de her fundne grænser. Derimod fandtes der i 121 azotobacter-

holdige jorder, for hvilke der forelå bestemmelser af fosforsyretilstand såvel som reaktionstal, en ret lille men signifikant korrelation mellem Ft og log (*Azotobacter*):

$$r = + 0.378 \pm 0.078.$$

Korrelationskoefficienten mellem pH og log (*Azotobacter*) i de samme jorder var $r = + 0.472 \pm 0.071$, hvilket ikke er betydningsfuldt forskelligt fra den værdi (0.537 ± 0.060) der fandtes i samtlige 142 jorder. Mellem pH og Ft i de 121 jorder fandtes ingen signifikant korrelation ($r = +0.143$). Værdierne af de to første korrelationskoefficienter ændres derfor kun i ringe grad, når man efter Fisher (1944) beregner de *partielle* korrelationskoefficienter mellem log (*Azotobacter*) og henholdsvis pH og Ft, hvorved den ene af de to sidste faktorer elimineres, så at man får udtryk for den korrelation, som skulle ventes, hvis enten pH eller Ft havde været konstant. Man får da:

Partiel korrelation mellem pH og log (*Azotobacter*), Ft elimineret:

$$r = + 0.459 \pm 0.0721, \text{ og}$$

Partiel korrelation mellem Ft og log (*Azotobacter*), pH elimineret:

$$r = + 0.358 \pm 0.0796.$$

Da disse to værdier ikke er betydningsfuldt forskellige, synes det berettiget at slutte, at for de azotobacterholdige jorders vedkommende afhænger tætheden af *Azotobacter*, indenfor pH-intervallet fra 5.8 til 8.5, i lige grad af reaktionen og af fosforsyreindholdet. Men da korrelationen i begge tilfælde kun er meget ufuldstændig, er andre faktorer øjensynlig af lignende eller større betydning, og noget lignende må gælde for selve forekomsten af *Azotobacter*, som ikke sjældent mangler i neutrale eller svagt alkaliske jorder med ret højt fosforsyretilstand. F. eks. forekom *Azotobacter* ikke i nogen af de 12 jordprøver fra Lyngby forsøgsstation, tiltrods for deres ikke ugunstige reaktion (pH 6.0—6.9) og ret høje fosforsyretilstand (Ft 4.0—13.6). I de meget nærliggende jorder fra Statens Væksthusforsøg og Statens Planteavlslaboratorium fandtes *Azotobacter* derimod i store mængder.

Det kunne ligge nær at vente en sammenhæng mellem Azo-

tobacter-floraens yppighed og jordens indhold af *organisk stof*. I 80 af de undersøgte jorder foretoges derfor bestemmelse af organisk stof efter *Bondorff's* (1946) modification af *Allen's* dikromatmetode. Der fandtes kun en ubetydelig forskel på det gennemsnitlige humusindhold i jorder med og uden *Azotobacter*:

	pct. humus:		
	minimum	maximum	gennemsnit
<i>Azotobacter</i> -frie jorder (21).....	1.07	3.56	2.61 ± 0.131
<i>Azotobacter</i> -holdige jorder (59).....	1.27	8.42	3.25 ± 0.203

Ej heller fandtes der nogen signifikant korrelation mellem humusindhold og log (*Azotobacter*) i den sidste gruppe ($r = + 0.199 \pm 0.125$). Ganske vist udviste et par havejorder med 7.0—7.5 pct. humus meget høje *Azotobacter*-tal, men den azotobacterrigeste af alle jorder indeholdt kun 3.09 pct. humus. Indholdet af de tungt omsættelige humusbestanddele synes således uden større betydning for *Azotobacter*-floraen, som derimod i ganske overordentlig grad påvirkes af *tilgængelige* organiske næringsstoffer (se nedenfor).

En medvirkende årsag til mangel på *Azotobacter* i jord, som ellers skulle frembyde relativt gunstige betingelser, kan muligvis søges i *antibiotiske* fænomener. *Nickell & Burkholder* (1947) fandt talrige *Actinomyces*-arter i stand til at danne stoffer, som hemmede væksten af *Azotobacter*, og som under visse omstændigheder også kunne opstå i jord. (Sml. *Pochon & Tchan* (1947), som i visse jorder angav at kunne påvise forekomst af vandopløselige, termolabile stoffer, der udviste væksthemming overfor *Azotobacter*). Til sammenligning anstilledes forsøg med 25 stammer af *Actinomyces*, isoleret fra danske jorder; disse prøvedes for væksthemming overfor *Azotobacter* på to agarsubstrater: jordextrakt-agar med 1 pct. glukose, og lucerneextrakt-asparagin-glukoseagar til dyrkning af knoldbakterier («nitraginagar»). Plader af steril agar podedes ved centrum med luftsporer af de forskellige actinomyceter, og efter 7—8 dages vækst anlagdes stregkulturer af *Azotobacter* (4 stammer af *Az. chroococcum* og 2 af *Az. beijerinckii*) fra petriskålens rand ind til actinomycet-kolonien. Efter 1—2 døgn giver dannelsen af antibiotiske stoffer sig til kende ved undertrykkelse af væksten af *Azotobacter* i en

kortere eller længere afstand fra actinomyceten. Som det fremgår af tabel 3, udviser mange actinomyceter på nitraginagar en meget stærk hemning overfor *Az. chroococcum*, medens især den ene stamme af *Az. beijerinckii* er mere resistent. På jordextrakt-agar er hemningen sjældnere og svagere, men optræder dog i adskillige tilfælde. Også en *Penicillium* og en sporedannende bakterie af *Bac. mesentericus*-gruppen forårsagede stærk hemning på begge substrater. Det af svampen dannede hemningsstof synes ikke at være penicillin, da en penicillindannende stamme af *Penicillium notatum* ikke viste nogen kendelig væksthemming.

Skønt man ikke fra forsøgene med renkulturer på kunstigt agarsubstrat kan slutte direkte til forholdene i naturlig jord, tør man regne med den mulighed, at udviklingen af *Azotobacter* bl. a. vil kunne hemmes af antibiotiske stoffer dannede af de organismer, der besørger nedbrydningen af de komplekse organiske materialer i jorden.

Tabel 3.
Antibiotisk virkning af actinomyceter overfor
Azotobacter.

Antal actinomyceter visende hemningsvirkning:						
overfor <i>Azotobacter</i> :	på nitragin-agar:			på jordextrakt-agar:		
	+	++	+++	+	++	+++
<i>chroococcum</i> 6.....	2	4	13	3	1	1
» 155.....	2	5	15	4	1	—
» 210.....	1	2	15	3	1	—
» 222.....	3	5	8	4	2	—
<i>beijerinckii</i> 131.....	—	—	—	1	—	—
» 249.....	3	2	5	1	—	—

+: svag hemning, *Azotobacter* undertrykt < 10 mm.
 ++: stærk » » » 10—20 mm
 +++: m. st. » » » > 20 mm

De fundne arter af *Azotobacter* og deres kvælstofbindende evne.

Azotobacter-floraen i de undersøgte jorder repræsenteredes ganske overvejende af *Az. chroococcum*, som er let kendelig ved sin hurtige dannelse af mørkt, i ældre kulturer næsten sort

pigment. Jævnligt sås også kolonier af typer, der nærmest svarer til *Az. beijerinckii*, med et karakteristisk gulligt pigment, der i gamle kulturer kan blive lyst kanelbrunt. Disse stammer forekom især i jorder fra Jylland; bl. a. indeholdt samtlige jordprøver fra Askov lermark og sandmark kun denne type. Der var ialt 21 jorder, som alene indeholdt *Az. beijerinckii*. Disse jorder var gennemgående af en noget surere reaktion end de, som indeholdt *Az. chroococcum*:

pH-klasse	Antal jordprøver med	
	<i>Az. beijerinckii</i>	<i>Az. chroococcum</i>
5.8—6.4.....	5	14
6.5—6.9.....	8	25
7.0—7.5.....	8	33
>7.5	0	52

Også fosforsyretallene i disse jorder var gennemgående lavere end i de azotobacterholdige jorder som helhed, idet de udviste et gennemsnitligt fosforsyretal på 4.0 ± 0.345 , imod 7.2 ± 0.425 i samtlige 121 prøver. *Az. beijerinckii* synes således fortrinsvis at findes i neutrale eller svagt sure jorder med forholdsvis lavt fosforsyreindhold. Dette stemmer godt med, at *Az. beijerinckii* ifl. Yamagata & Itano (1923) forekommer hyppigst i neutral jord og i renkultur vokser bedre ved svagt sur reaktion end *Az. chroococcum*, omend begge arters vækst standser ved pH 6.0.

Arter svarende til *Az. agile* og *Az. vinelandii* fandtes ikke.

Fra de undersøgte jorder isoleredes et antal stammer af *Az. chroococcum* og *Az. beijerinckii*; 15 af de første og 9 af de sidste prøvedes for kvælstofbindende evne ved dyrkning i følgende substrat: glukose 20.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4$ 0.5 g, $CaCO_3$ 2.0 g, $FeSO_4$ 0.10 g, NaCl 0.5 g, Na_2MoO_4 0.005 g, ledningsvand 1000 ml. Substratet anvendtes i portioner på 30 ml. i 300 c.c. erlenmeyerkolber, med og uden tilsætning af 0.1 pct. agar, som ifl. Rippel (1936) har en stærkt stimulerende virkning på væksten af *Azotobacter*. Efter sterilisation ved $115^\circ C$ henstod substratet før podning mindst natten over, hvilket som påpeget af Rippel også forbedrer væksten. Som podemateriale anvendtes en dråbe af en opslemning af 24 timer gamle celler af *Azotobacter* i sterilt ledningsvand. Efter incubation ved $25^\circ C$, alm. 6 dage, noget længere for de langsomt voksende stammers vedkommende, ud-

Tabel 4,
Azotobacter-stammers kvælstofbinding i renkultur.

Stamme- nr.	Inc. dage	Glukoseforbrug, mg pr. kultur		N-binding, mg pr. kultur		N-binding, mg pr. g forbrugt glukose	
		—agar	+ agar	—agar	+ agar	—agar	+ agar
<i>Az. chroococcum.</i>							
6	6	551	551	8.69	9.01	15.8	16.3
		551	551	8.74	9.84	15.8	17.8
84	5	76	393	0.75	3.73	9.9	9.5
		47	394	0.64	3.72	13.6	9.7
93	5	57	526	0.68	7.13	11.9	13.8
		—	526	—	7.16	—	13.6
114	6	278	598	2.95	7.70	10.6	12.9
		282	598	2.93	7.67	10.4	12.8
115	7	498	593	7.53	7.98	15.1	13.5
		544	593	7.55	8.46	13.9	14.3
118	11	569	569	6.61	6.51	11.6	11.4
		569	569	6.71	6.81	11.8	12.0
123	8	212	557	2.11	7.76	10.0	13.9
		261	558	2.83	7.96	10.8	14.3
151	8	593	593	8.12	8.80	13.9	14.8
		593	593	8.22	8.82	13.9	14.9
155	11	569	569	4.99	6.37	8.8	11.3
		569	569	7.09	6.84	12.8	12.0
163	6	598	598	7.94	7.76	13.3	13.0
		598	598	7.94	8.09	13.3	13.5
176	6	542	480	5.75	6.78	10.6	13.6
		552	523	4.65	7.10	8.4	14.1
191	7	281	243	3.35	4.94	14.4	13.8
		321	287	3.73	3.58	11.2	13.0
210	6	135	650	2.17	9.44	16.1	14.5
	11	548	607	9.53	9.47	17.5	15.6
212	6	88	598	0.99	7.63	11.0	12.8
		135	598	1.43	7.65	10.6	12.8
222	10	325	607	3.60	8.65	11.1	14.3
		(0)	607	(0.06)	8.74	—	14.4

fortsættes

Tabes 4, fortsat. *Azotobacter*-stammers kvælstofbinding i renkultur.

Stamme- nr.	Inc. dage	Glukoseforbrug, mg pr. kultur		N-binding, mg pr. kultur		N-binding, mg pr. g forbrugt glukose	
		—agar	+ agar	—agar	+ agar	—agar	+ agar
<i>Az. beijerinckii.</i>							
57	10	112	242	1.39	4.25	12.4	17.6
		118	311	1.39	4.92	11.6	15.8
77	23	465	562	5.20	6.67	11.2	11.9
		500	562	5.87	6.72	11.4	12.0
127	11	230	598	3.03	7.25	13.0	12.1
		254	598	2.79	7.29	11.0	12.2
128	14	242	598	3.59	8.05	14.8	13.4
		272	598	4.23	8.10	15.6	13.6
131	10	111	461	0.82	4.40	7.4	9.5
		122	607	1.21	6.27	9.9	10.3
133	9	104	194	1.43	3.09	10.9	16.0
		108	527	3.50	7.50	15.6	14.2
178	7	283	442	1.02	5.04	3.6	11.4
		290	453	1.21	5.54	4.2	12.2
185	12	62	50	0.26	0.75	4.2	15.0
		83	—	0.30	—	3.6	—
194	8	61	55	0.32	0.76	13.4	13.8
		61	107	0.85	1.50	13.9	14.3
215	6	37	470	0.50	5.00	9.4	10.6
		61	540	0.57	5.91	13.5	10.9

førtes der glukosebestemmelse efter *Lane & Eynon* i en alikvot af kulturen (dobbelkultur af hver stamme), medens resten anvendtes til kvælstofbestemmelse efter *Kjeldahl*: forbrænding med CuO og K_2SO_4 , kogning 3 timer efter grønfarvning, titrering med $n/28 \text{ H}_2\text{SO}_4$ og NaOH i kulsyre-fri opløsning med methyl-rødt-methylenblåt som indikator. Kulturer analyserede umiddelbart efter podningen tjente til bestemmelse af begyndelsesindhold af glukose og som blindbestemmelser af kvælstof i substrat + podemateriale + reagenser.

Som det fremgår af tabel 4, binder de forskellige stammer af *Az. chroococcum* fra ca. 9 til ca. 18 (gennemsnitlig 13.7) mg kvælstof pr. g forbrugt glukose, hvilket svarer til det sædvanlige

kvælstofudbytte i gunstigt substrat. Agar-tilsætningen fremmer i flere tilfælde kvælstofbindingens omfang betydeligt, men har ingen væsentlig indflydelse på dens økonomi, udtrykt i mg kvælstof pr. g forbrugt glukose. Agarens virkning synes således at bestå i en simpel væksthfremskyndelse (sml. *Rippel*, 1936). På de langsommere voksende stammer af *Az. beijerinckii* er den fremmende virkning af agaren endnu mere udpræget; to stammer (nr. 185 og nr. 194) binder overhovedet kun meget lidt kvælstof, men udviser et tilsvarende ringe sukkerforbrug, og beregnet pr. g glukose er, i alt fald i substrat med agar, kvælstofbindingen af samme størrelsesorden som hos *Az. chroococcum*. I nogle tilfælde (nr. 57, 178, 185) forøger agar-tilsætningen ikke alene væksthastigheden, men også kvælstofbindingen pr. vægtenhed glukose. Som helhed synes således de *Azotobacter*-former, der forekommer i danske kulturjorder, at besidde kraftig kvælstofbindende evne.

Formering af *Azotobacter* og kvælstofbinding i jord.

I jord, der frembyder gunstige vækstbetingelser for *Azotobacter*, kan denne formere sig overordentlig stærkt ved tilsætning af tilgængelige organiske næringsstoffer, såsom sukkerarter eller salte af organiske syrer. Kvælstofbinding kan da ofte påvises analytisk, hvortil dog som regel kræves omsætning af forholdsvis store stofmængder og en tilsvarende enorm formering af *Azotobacter* (se f. eks. *Jensen*, 1940). Da man må vente, at forsyningen med tilgængelig kulstofnæring ved siden af reaktion og fosforsyreindhold er en af de vigtigste faktorer, der bestemmer *Azotobacter*-floraens tæthed, udførtes der nogle forsøg med jord, hvortil der sattes små mængder organisk stof af sådan karakter (alkoholer og organiske syrer), som kan ventes at opstå ved mikrobiel nedbrydning af komplekse organiske materialer, og *Azotobacter*-floraens udslag herfor bestemtes ved kimtælling på dextrin-agar med korte tidsmellemlum efter tilsætningen.

I et indledende forsøg anvendtes den meget azotobacterrige havejord fra Statens Planteavls-Laboratorium. Portioner på 150 g fugtig jord (ca. 20 pct. vand) anbragtes i glasskåle med tilsætning af: A) intet, B) 0.1 pct. calciumlaktat, C) 0.1 pct. natriumacetat, D) 0.1 pct. æthylalkohol. Resultatet findes i Tabel 5.

Tabel 5.

Formering af *Azotobacter* i jord med 0.1 pct. organisk stof.

Inkubation, timer	<i>Azotobacter</i> , 1000 pr. g jord med tilsætning af:			
	Ca- lactat	Na- acetat	æthylalkohol	kontrol
0	—	—	—	38
16	(> 2.000)	(> 2.000)	(> 2.000)	43
42	5.800	1.800	30.500	—
70	6.300	—	7.900	39

Allerede efter 16 timer viser jorden med de organiske stoffer en helt explosiv formering af *Azotobacter*, og denne når efter 42 timer en størrelsesorden (indtil 30 mill. pr. g), der aldrig ses under naturlige forhold. Da særlig æthylalkohol synes at udnyttes hurtigt og iøvrigt er kendt som et udmærket næringsstof for *Azotobacter*, gentoges forsøget med flere jorder tilsat æthylalkohol i lavere men varierende koncentration. Resultaterne af disse forsøg findes i tabel 6.

Vi finder her i alle tilfælde, mindst udpræget i sandjorden fra Tylstrup og lerjorden fra Abed, en kraftig formering af *Azotobacter* ved de højere alkoholkoncentrationer, og i jorderne fra Tystofte og Blangstedgaard er en formering allerede indtrådt ved 0.004—0.005 pct. alkohol. Formeringshastigheden stiger tillige i et langt stærkere forhold end alkoholkoncentrationen, og 0.04—0.05 pct. alkohol giver i fire jorder anledning til langt højere *Azotobacter*-tal, end man nogensinde finder i naturlige jorder. Alkoholkoncentrationen synes således for hver jord at have en vis »tærskelværdi«, som må overskrides, førend formeringen af *Azotobacter* når et betydeligt omfang. Man kunne formode, at det her drejer sig om forholdet mellem tilsat alkohol og disponibelt mineralsk kvælstof (nitrat og ammoniak) i jorden (sml. *Winogradsky* (1926), som angiver, at C:N-forhold snævrere end 100:1 hindrer formering af *Azotobacter*), og at den stærke formering først indtræder, når det tilstedeværende ammoniak og nitrat er opbrugt af ikke-kvælstofbindende organismer. Dette er imidlertid ikke tilfældet, således som det fremgår af nogle nitratbestemmelser ved forsøgets afslutning i tre jorder, hvor nitraten i intet tilfælde var opbrugt; i jorden fra Ødum synes overhovedet intet nitratforbrug at have fundet sted. Forsøgene viser således

Tabel 6.
Formering af *Azotobacter* i jord med tilsætning af æthylalkohol.

Jord	Inkuba- tion, timer	Antal <i>Azotobacter</i> pr. g jord med pct. alkohol:			
		0	0.002	0.01	0.04
Havejord, Lyngby, pH 7.9, Ft 18.2		0	0.002	0.01	0.04
	0	38.000	—	—	—
	18	43.400	40.000	266.000	12.330.000
	42	42.600	33.000	242.000	3.470.000
Lerjord, Tystofte, pH 7.3, Ft 6.9.		0	0.004	0.02	0.04
	0	60	—	—	—
	20	77	446	8.600	3.300
	68	110	160	31.400	(> 100.000)
	115	100	46	23.800	136.000
	190	—	—	15.300	2.060.000
Sandjord, Tylstrup, pH 7.2, Ft 8.4.		0	0.005	0.02	0.05
	20	40	27	170	2.300
	35	34	40	70	1.300
	72	63	30	80	1.700
Lerjord, Ødum, pH 7.3, Ft 8.9.		0		0.01	0.05
	0	440		—	—
	18	490		2.100	79.000
	44	370		5.400	103.000
	72	340		770	67.000
NO ₃ -N, p. p. m.	72	45.2		44.1	45.2
Lerjord, Blangsted- gaard, pH 7.6, Ft 7.1		0	0.005	0.01	0.05
	0	140	—	—	—
	18	180	370	1.940	5.000
	42	180	360	1.730	177.000
	70	100	650	1.540	750.000
NO ₃ -N, p. p. m.	70	43.2	44.4	34.6	17.4
Lerjord, Abed, pH 7.6, Ft 5.1.		0	0.005	0.01	0.05
	0	40	—	—	—
	18	33	23	(<100)	3.300
	42	37	33	70	11.400
	72	13	27	27	5.300
NO ₃ -N, p. p. m.	72	33.8			19.7

ganske utvetydigt, at en livlig formering af *Azotobacter* kan finde sted i jord af betydeligt nitratindhold, omend det er en kendt sag, at nitrat- og ammoniakgødskning tenderer til at reducere *Azotobacter*-floraen (se f. eks. *Ziemięcka* (1933) og *Stöckli* (1944)).

Den tilsyneladende uoverensstemmelse med *Winogradsky's* resultater må sandsynligvis forklares derhen, at i *Winogradsky's* forsøg bestemtes formeringen af *Azotobacter* ikke egentlig kvantitativt, men alene ved bedømmelse af det mikroskopiske billede i farvede præparater af jordopslemning. En formering af en størrelsesorden som den her iagttagne — nogle hundredetusinder eller få millioner pr. g — lader sig herved ikke påvise med blot nogenlunde sikkerhed i normale jorder, der ved mikroskopisk tælling udviser bakterietal på flere hundrede millioner eller vel oftere et par milliarder pr. g.

Det fremgår endvidere klart af forsøgene, at i jord af gunstig reaktion og fosforsyreindhold repræsenterer det organiske næringsstof (*in casu* æthylalkohol) en begrænsende faktor for *Azotobacter*-væksten, hvilket for en stor del forklarer den mangelfulde korrelation mellem *Azotobacter*-tæthed, reaktionstal og fosforsyretal. I og for sig er den stærke formering af *Azotobacter* med forholdsvis små mængder organisk stof teoretisk let forklarlig. En alkoholdosis på 0.01 pct. svarer til 100 γ alkohol = 52 γ kulstof pr. g jord. En enkelt *Azotobacter*-celle kan anslås til at have et volumen på 5 μ^3 ; hvis man regner med en vægtfylde på 1 og et tørstofindhold på 20 pct., hvori 50 pct. kulstof, vil en million *Azotobacter*-celler således repræsentere 0.5 γ cellekulstof. Der vil altså af de 52 γ alkohol-kulstof kunne dannes ikke mindre end 26 millioner *Azotobacter*-celler, forudsat at 25 pct. af alkoholen anvendes til cellesyntese og resten til respiration. Man får således det indtryk, at den almindelige tæthed af *Azotobacter* i jorden — mindre end tusinde pr. g — må svare til omsætning af meget små mængder organisk stof og en tilsvarende ubetydelig kvælstofbinding. Mængder af energimateriale svarende til de her anvendte koncentrationer på 0.01 til 0.05 pct. alkohol bliver øjensynlig ikke tilgængelige i en enkelt dosis under naturlige forhold, da man i så fald skulle vente at finde langt højere *Azotobacter*-tal end de virkelig forekommende. Der

anstilledes nu et mere langvarigt forsøg med periodisk tilsætning af små mængder alkohol til jorden, hvorved man såvidt muligt søgte at efterligne forholdene i en jord, hvor energimateriale gradvis bliver tilgængeligt for *Azotobacter* gennem mikrobiel nedbrydning af andre stoffer. Samtidig søgtes det oplyst, hvorvidt en analytisk påviselig kvælstofbinding indtræder, når *Azotobacter*-tætheden kunstigt holdes på et noget højere niveau, end man finder under naturlige forhold.

Der anvendtes hertil en let lermuld fra Tystofte forsøgsstation (sml. tabel 6, forsøg 2). Duplikat-portioner på 500 g lufttør jord tilsattes 11 pct. vand og anbragtes i 500-c. c-flasker med løstsiddende låg. Yderligere tilsattes pr. glas:

- A: intet (kontrol)
 B: 0.02 g (0.004 pct.) æthylalkohol ugentlig.
 C: 0.10 » (0.02 pct.) » » »

Jordportionerne opbevarede ved 25° C, og fordampningstabet erstattedes ugentlig ved tilsætning af destilleret vand sammen med alkoholen. To eller tre dage efter hver alkoholtilsætning udførtes tællinger af *Azotobacter* på dextrin-agar. Forsøget, der fortsattes gennem 108 dage (16 alkoholtilsætninger) gav imidlertid ret uklare resultater. I kontroljorden holdt *Azotobacter*-tætheden sig ret konstant omkring 30 til 100 pr. g. I jorden med 0.004 pct. alkohol sås kun en ubetydelig formering ved forsøgets begyndelse; efter 7 uger forhøjedes dosen til 0.008 pct. og efter 12 uger yderligere til 0.016 pct.; til trods herfor indtrådte ingen formering af *Azotobacter*, som efter 11 uger overhovedet ikke længere kunne påvises i jorden, hvilket kunne tyde på, at antibiotiske fænomener har gjort sig gældende. I jorden med 0.02 pct. alkohol sås en kraftig formering (2000—3000 pr. g) efter den første tilsætning, men ligesom i den første jord aftog tallene i de følgende uger; da alkoholdosis efter 7 uger forhøjedes til 0.04 pct., opstod der igen ret høje men noget variable tal (2000—50.000 pr. g), stigende til 40.000—340.000, da dosis efter 12 uger yderligere forhøjedes til 0.08 pct. Ved forsøgets slutning beregnes, under hensyntagen til bortfjernelsen af de små mængder jord, der var brugt til *Azotobacter*-tælling, at der ialt var tilsat til jord B: 0.761 g alkohol, og til C: 3.79 g. Hvis hele alkoholmængden var udnyttet af *Azotobacter*-floraen alene, skulle man

vente kvælstoffbinding på ca. 15—30 mg pr. kg jord i B og 75—150 mg i C, hvilken sidste værdi let skulle kunne påvises analytisk (tre stammer af *Azotobacter* i renkultur viste sig at binde 10—18 mg kvælstof pr. g tilsat alkohol). Kvælstofbestemmelser i nogle af jordprøverne efter *Carsten Olsen* (1927) viste imidlertid ingen kendelig forøgelse af kvælstofindholdet:

	mg N pr. kg tørjord	Signifikant forskel, mg
Før forsøget.....	1223	
Efter forsøget: A (kontrol).....	1237	P 0.05: 11.4
» » C (0.76 pct. alkohol)	1233	P 0.01: 15.4
» » C » »	1226	

Den tilsyneladende forøgelse af kontroljordens kvælstofindhold kan næppe udlægges som kvælstoffbinding, og selv i jord C med det ret høje antal *Azotobacter* kan kvælstoffbinding ikke påvises (sml. tidligere forsøg (*Jensen*, 1940), hvor en jord med halmtilsætning under aerob opbevaring i 3 måneder udviste en *Azotobacter*-tæthed på flere millioner pr. g, uden at der indtrådte nogen påviselig kvælstoffbinding).

Da kvælstoffbindingsprocessen hos *Azotobacter* i hovedsagen er identisk med opbygning af cellemateriale, og bundet kvælstof i jorden med god tilnærmelse kan bestemmes netop som cellemateriale (*Jensen*, 1940), er det muligt at udføre en skønsmæssig beregning af det antal *Azotobacter*-celler, der er nødvendigt som *minimum* for en kvælstoffbinding af givet omfang. Hvis vi ligesom før antager, at hver *Azotobacter*-celle har et gennemsnitligt rumfang på $5 \mu^3$, med 20 pct. tørstof og 10 pct. kvælstof heri, vil 10 millioner *Azotobacter*-celler indeholde 1 γ kvælstof. En binding af blot 2.5 kg kvælstof pr. ha årlig vil altså, dersom man regner med 2500 tons jord pr. ha, svare til 1 γ kvælstof, eller 10 mill. *Azotobacter* pr. g jord. Forudsætter man, at vækstbetingelser er tilstede 200 dage årlig, må der altså dannes $10,000,000/200 = 50,000$ *Azotobacter*-celler pr. døgn; dette ville f. eks. kunne realiseres, hvis en *Azotobacter*-population på ca. 2000 pr. g fornyer sig selv ved deling af hver celle med en times mellemrum — en forudsætning som forøvrigt kun ville gælde under ret gunstige temperatur- og fugtighedsforhold. En kvælstoffbinding på 25 kg pr. ha, som der ofte regnes med, ville følgelig

kræve en 10 gange tættere population (20.000 pr. g). Da kun ca. 7 pct. af de undersøgte jorder har vist *Azotobacter*-tæthed på mere end 1000 pr. g, og kun ca. 1 pct. på mere end 10.000 pr. g, synes det berettiget at slutte, at kun i et ganske lille fåtal af jorder kan man vente en kvælstofbinding, der kan måles i kilogram pr. ha årlig.

Det må ganske vist erindres, at *Azotobacter*-tætheden i jorden udtrykt ved tælling på agarplader angiver et minimum og ikke nødvendigvis det absolutte antal organismer i jorden, da en del af de talte kolonier utvivlsomt hidrører fra celle-aggregater og ikke fra individuelle celler. I jord, hvor *Azotobacter* var så talrig, at en nogenlunde sikker mikroskopisk tælling kunne udføres, fandtes dog ingen meget stor forskel på pladetælling og de mikroskopisk bestemte *Azotobacter*-tal (*Jensen*, 1940), og desuden gør et andet vigtigt moment sig gældende: den foranstående beregning hviler på den forudsætning, at de opståede *Azotobacter*-celler tager alt deres kvælstof fra atmosfæren. I kulturjord, hvor nitratdannelse er et normalt fænomen under de samme reaktions-, temperatur- og fugtighedsbetingelser, som begunstiger væksten af *Azotobacter*, er denne forudsætning ikke berettiget. Som påvist af *Bortels* (1936) og *Horner & Allison* (1944) kan *Azotobacter*, ialtfald med tilstrækkelig molybdænforsyning, vel binde noget kvælstof ved tilstedeværelse af nitrat, men ikke uden samtidig at dække en del af sit kvælstofbehov (i *Horner & Allison's* forsøg ca. halvdelen) ved assimilation af nitratkvælstof.

De kvælstofmængder, der kan ventes bundet af den normale *Azotobacter*-population i jordbunden, lader sig på ingen måde påvise ved direkte kvælstofbestemmelse efter *Kjeldahl* (sikkert heller ikke efter *Dumas*); det er imidlertid muligt, at forsøg med isotopisk kvælstof (atmosfære med N^{15} og massespektografisk bestemmelse heraf i jorden) vil kunne skaffe klarhed i spørgsmålet. Der er her grund til at minde om et gammelt forsøg af *Schloesing* (1888), som ved gasometrisk bestemmelse ikke med sikkerhed kunne påvise kvælstofbinding i jord efter 14 måneders opbevaring i lukkede beholdere, i modsætning til *Berthelot's* omtrent samtidige angivelser om stærk kvælstofbinding under lignende forhold. En gentagelse af *Schloesing's* forsøg efter kvælstofisotop-metoden ville frembyde stor interesse.

Det må sluttelig fremhæves, at de her fremsatte betragtninger kun gælder for den ikke-symbiotiske kvælstofbinding, som skyldes *Azotobacter*, og ikke for andre fritlevende kvælstofbindende bakterier (*Clostridium butyricum* og beslægtede arter), om hvis eventuelle betydning i jordbunden vor viden endnu er yderst mangelfuld.

Afhænger kvælstofbindingen hos *Azotobacter* af klimatiske faktorer?

I kulturer af een og samme stamme af *Azotobacter* ser man ofte, at kvælstofbindingen varierer ret betydeligt fra det ene forsøg til det andet. Dette forhold er i nyere tid studeret af *Bortels* (1940), som på grundlag af flere års forsøg mente at kunne fastslå, at væksten under iøvrigt konstante betingelser varierer i overensstemmelse med vejrforholdene, idet *Azotobacter* angives at vokse kraftigt, når et barometrisk højtryk nærmer sig, samt så længe dette vedvarer, og omvendt svagt, når et lavtryk nærmer sig eller vedvarer. Fænomenet iagttoges i substrat med bundet (NH_4NO_3) såvel som frit kvælstof (gælder altså væksten som sådan og ikke blot kvælstofbindingsprocessen) og synes også at optræde i jordkulturer. Da hverken det absolutte lufttryk eller luftens sammensætning til forskellig tid påvirkede væksten, antog *Bortels*, at fænomenet måtte skyldes en ukendt fysisk faktor, muligvis en særlig art hård stråling, hvis intensitet stod i forbindelse med vejrliget, men som ikke var identisk med den kosmiske stråling. Efter den af *Bortels* givne fremstilling er det noget vanskeligt at bedømme korrelationen, da den meteorologiske faktor kun udtrykkes som »højtryk« eller »lavtryk«, og væksten målttes i det store flertal af forsøgene (med *Az. chroococcum*) kun ved rumfanget af bakteriesediment produceret i 4 døgn ved 30° C. Kun i en enkelt kortvarig forsøgsserie med *Az. agile* udførtes kvantitative kvælstofbestemmelser i 24-timers kulturer, og her fandtes ofte en meget dårlig overensstemmelse mellem duplikatkulturerne (hvilket igen tilskrives vejrliget).

Da *Bortels'* resultater ikke hidtil synes efterprøvede, anstilles der fra maj 1948 til september 1949 en række lignende forsøg. To stammer af *Az. chroococcum*, en stærkt og en moderat

kvælstofbindende, dyrkedes 5 døgn ved 25° C i følgende næringsopløsning: glukose 20.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $CaCO_3$ 2.0, $MgSO_4$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $FeSO_4$ 0.1 g, Na_2MoO_4 0.005 g og destilleret vand 1000 ml. Der anvendtes stedse duplikatkulturer med 25 ml substrat i 250 cc erlenmeyerkolker. Podematerialet stammede fra 2-dages kulturer på et til opløsningen svarende agarsubstrat. Kvantitative kvælstofbestemmelser i 82 forsøg gennem 16 måneder udviste en del variation i kvælstofbindingen, idet der fandtes:

	Gennemsnitlig kvælstofbinding, mg pr. kultur.	Standard- afvigelse, mg
Stamme A	6.79	± 1.008
» B	5.16	± 0.692

Gennemgående var resultaterne dog mere regelmæssige, end tilfældet synes at være i *Bortels'* forsøg; betydelige afvigelser var fåtallige, og tallene udviste en tilnærmelsesvis normal fordeling, for begge stammers vedkommende dog med et ret stort overskud af varianter omkring gennemsnit (spidstoppede fordelingskurver). De udprægede afvigelser, som mest gik i negativ retning, udviste ingen kendelig sammenhæng med vejrlig og lufttryksændring og optrådte ikke alle til samme tid hos begge stammer; på den anden side sås ofte udprægede vejrforandringer, som ikke ledsagedes af ændringer i bakterievæksten. Derimod forekom der hos begge stammer visse små, men signifikante langtidsvariationer, som dog ikke gik parallelt hos de to stammer og således ikke synes at skyldes nogen fælles ydre faktor. Hos den stærkest kvælstofbindende stamme gav denne langtidsvariation sig udtryk i en gradvis aftagen af kvælstofbindingen i løbet af 1949. Dette fænomen synes at finde fyldestgørende forklaring gennem en mutationslignende ændring i de kulturer, der gennem hele forsøgsperioden havde været dyrket på agarsubstrat, hvorfra podematerialet toges. Ved forsøgsperiodens afslutning bandtes der kun 5.6—6.5 mg kvælstof pr. kultur, eller 12—13 mg pr. g forbrugt glukose, medens andre kulturer, hvortil podematerialet toges fra en kultur i steril jord anlagt i september 1948, bandt 7.6—7.7 mg kvælstof pr. kultur, eller 16 mg pr. g glukose, hvilket var omtrent det samme som på det tidspunkt, da jordkulturen

blev anlagt. Variationerne i vækstintensitet og kvælstofbinding synes således, foruden af de uundgåelige små ændringer i substratets sammensætning og tilberedning, for en stor del at bero på indre egenskaber hos bakterierne, og forsøgene giver intet grundlag for antagelse af en hidtil ukendt ydre faktor af meteorologisk eller kosmisk oprindelse.

Oversigt.

En undersøgelse af 264 danske jorder, for størstedelen agerjorder, viste forekomst af *Azotobacter* i 142 (53.8 pct.) af disse. *Azotobacter* fandtes kun undtagelsesvis i jord med reaktionstal på under 6.0, medens hyppigheden iøvrigt steg med stigende reaktionstal; ved pH 7.5 og derover fandtes *Azotobacter* praktisk talt konstant. Tætheden af *Azotobacter*, bestemt ved tælling af kolonier på agarsubstrat, varierede fra 0 til 80.000 pr. g jord. Tal på mindre end 100 var almindeligst (26.9 pct. af samtlige jorder, eller halvdelen af de *Azotobacter*-holdige), medens kun ca. 7 pct. af jorderne indeholdt mere end 1000 og kun 1 pct. mere end 10.000 *Azotobacter* pr. g (de sidste alle havejorder). Iøvrigt fandtes der ingen sammenhæng mellem *Azotobacter*-tætheden og jordernes fysiske karakter eller afgrødernes art. I de *Azotobacter*-holdige jorder fandtes der en tydelig omend ikke stor positiv korrelation mellem *Azotobacter*-tætheden og reaktionstallet (korrelationskoefficient mellem pH og $\log(Azotobacter)$: $r = 0.459$) samt fosforsyreindhold (korrelationskoefficient mellem Ft og $\log(Azotobacter)$: $r = 0.358$). Mellem humusindhold og *Azotobacter*-tæthed fandtes ingen betydningsfuld korrelation.

I adskillige jorder af gunstig reaktion og højt fosforsyretilfælde fandtes ingen *Azotobacter*, muligvis på grund af mangel på tilstrækkelig organisk næring eller forekomst af antibiotiske fænomener.

Den hyppigst forekommende art var *Az. chroococcum*; mindre hyppigt fandtes *Az. beijerinckii*, fortrinsvis i neutrale eller svagt sure jorder med relativt lavt fosforsyretilfælde. Et antal stammer af begge arter viste i renkultur den for *Azotobacter* normale kvælstofbinding på ca. 10 til 18 mg kvælstof pr. g forbrugt glukose. Gennemgående viste *Az. chroococcum* en hurtigere og kraf-

tigere vækst end *Az. beijerinckii*. Andre *Azotobacter*-arter fandtes ikke, ej heller aerobe kvælstofbindende organismer af andre grupper.

I jord af gunstig reaktion og fosforsyreindhold synes indholdet af tilgængelige organiske næringsstoffer (energimateriale) at være den begrænsede faktor for udviklingen af *Azotobacter*. I sådanne jorder medførte tilsætning af små mængder æthylalkohol (0.04—0.05 pct.) en meget hurtig og kraftig formering af *Azotobacter*, som i løbet af et par døgn nåede langt højere tal, end man nogensinde finder under naturlige forhold. En sådan stærk formering kunne finde sted i jord med ret højt nitratindhold (ca. 40 mg $\text{NO}_3\text{-N}$ pr. kg).

Til trods for deres betydelige kvælstofbindende evne i renkultur kan *Azotobacter*-organismene på grund af deres relative fåtallighed i jordbunden næppe tillægges stor betydning for jordens kvælstofbalance. I gunstigste tilfælde kan man anslå, at kun i et mindretal af danske jorder (måske de 6—7 pct. hvis *Azotobacter*-tæthed overstiger 1000 pr. g) kan der ventes en kvælstofbinding, som beløber sig til nogle få kg pr. ha årlig, medens højere tal kun kan ventes undtagelsesvis. Hvis de fritlevende organismers kvælstofbinding overhovedet spiller nogen rolle i sammenligning med afgrødernes kvælstofkrav under danske forhold, må øjensynlig andre grupper af organismer (*Clostridium*-arter) være ansvarlige for hovedparten heraf. En virkelig experimentel løsning af dette problem vil muligvis kunne opnås gennem forsøg efter kvælstofisotop-metoden.

Der fandtes intet holdepunkt for antagelsen af en ukendt meteorologisk faktor, der påvirker væksten af *Azotobacter* under laboratoriebetingelser, som hævdedet af Bortels.

Summary.

The Occurrence of *Azotobacter* in Cultivated Soils of Denmark.

The distribution and density of *Azotobacter* in Danish soils was investigated by plate-counting on nitrogen-free dextrin agar. The survey included 264 samples, mostly from arable soils, of a reaction varying from pH 4.5 to pH 8.5. In no case was *Azotobacter* found in soil of pH less than 5.8, and its distribution was closely correlated with the soil reaction, as shown by following figures:

pH-range:	Number of soil samples:		
	Total	Containing	<i>Azotobacter</i>
<6.0.....	42	4	(9.5 pct.)
6.0—6.4.....	55	15	(27.3 »)
6.5—6.9.....	64	33	(51.6 »)
7.0—7.4.....	49	38	(77.6 »)
7.5—7.9 ..	36	34	(94.4 »)
8.0—8.5 ..	18	18	(100 »)

The density of *Azotobacter* varied from none to 80,000 per gram of soil. Numbers higher than 10,000 were only observed in garden soils, and the low densities (less than 100 per gram) were predominant:

<i>Azotobacter</i> per gm. of soil:	Number of samples:	Per cent of Total:
0	122	46.2
<100	71	26.9
100—1000	52	19.7
1000—10,000	16	6.1
>10,000	3	1.1

The physical character of the soil (sand or loam) and the nature of the crops did not appear to influence the distribution or the density of *Azotobacter*. A simple correlation coefficient of + 0.537 was found between pH and log (*Azotobacter*) in the 142 *Azotobacter*-positive soils. Phosphate - index (Ft) as well as pH was determined in 121 of these soils. The following partial correlation coefficients were found:

Between pH and log (*Azotobacter*), Ft eliminated: $r = +0.459$.

Between Ft and log (*Azotobacter*), pH eliminated: $r = +0.358$.

These values are both significant beyond the 1 pCt. point. No significant correlation was found between the humus content, which varied from 1.27 to 8.42 %, and the density of *Azotobacter*. Several soils of favourable reaction and phosphate content did not contain *Azotobacter*, possibly owing to lack of available organic matter or to antibiotic phenomena. A number of soil actinomycetes showed strong inhibitory action towards six strains of *Azotobacter* when grown on lucerne-extract glucose agar, some also on soil-extract glucose agar.

Az. chroococcum was the most common species. *Az. beijerinckii* was found less frequently, and seemed somewhat characteristic of neutral or faintly acid soils of comparatively low phosphate content. Fifteen strains of *Az. chroococcum* and nine of *Az. beijerinckii* showed in pure culture a normal nitrogen-fixing ability ranging from about 9 to about 18 mgm. nitrogen per gm. glucose consumed. *Az. beijerinckii* grew generally more slowly than *Az. chroococcum*, and its growth was usually more obviously improved by the addition of 0.1 % agar to the liquid medium.

The supply of available organic matter (energy material) appeared to be the chief limiting factor for the growth of *Azotobacter* in soil of favourable reaction and phosphate content. In such soils the *Azotobacter*-flora responded immediately to addition of 0.01—0.05 % ethanol with a vigorous multiplication, even in the presence of quite high concentrations of nitrate (17—45 p.p.m. $\text{NO}_3\text{-N}$). In some cases even a dose of 40—50 p.p.m. ethanol caused an observable stimulation of *Azotobacter*. No gain of nitrogen could be detected after 3½ months in a soil where the *Azotobacter*-flora had been stimulated by small weekly additions of ethanol and had reached a density up to 340,000 per gm.

In spite of their vigorous nitrogen fixation in pure culture, the *Azotobacter*-organisms do not seem to represent a major factor in the nitrogen economy of normal soils, owing to their relative sparseness. If the average *Azotobacter*-cell is estimated to measure $5 \mu^3$, with a specific gravity of unity, a dry matter content of 20 %, and a nitrogen content of 10 % in dry matter, a simple calculation shows that merely a fixation of 2.5 kg. nitrogen annually per hectare (2500 tons of top soil) will require the production of 10 millions of *Azotobacter*-cells per gm. of soil, or 50,000 new cells per 24 hours, if it be assumed that *Azotobacter* finds suitable growth conditions for 200 days each year — and then only under the further assumption that these cells derive their nitrogen exclusively from the atmosphere. At the best, a gain of this magnitude can be expected only in the comparatively few soils (approximately 7 %) that show a density of *Azotobacter* higher than 1000 per gm., while gains of higher magnitude (20—50 kg. per hectare) must be quite exceptional. The importance of other free-living nitrogen-fixing bacteria (*Clostridium* spp.) remains obscure, and it appears highly desirable that the isotopic-nitrogen method should be brought to bear on the phenomenon of non-symbiotic nitrogen fixation in soil and its true significance in the nitrogen balance of agricultural soils.

Periodical nitrogen fixation experiments with two strains of *Az. chroococcum* were conducted for 16 months, in order to test the hypothesis of *Bortels* on the existence of an unknown factor of meteorological origin, influencing the growth of *Azotobacter* under constant laboratory conditions. No evidence for the existence of such a factor was found.

Litteraturhenvisninger.

- Bondorff, K. A.*, 1946. — Om Humusbestemmelser i Jord. *Tidsskr. f. Planteavl*, v. 50, pp. 138—149.
- Bortels, H.*, 1936. — Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und andere Erdaschenstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen. *Cent. Bakt.*, II, v. 95, pp. 193—217.
- Bortels, H.*, 1940. — Meteorobiologische Untersuchungen an *Azotobacter*. *Ibid.*, II, v. 102, pp. 129—153.
- Burk, D., Lineweaver, H.*, og *Horner, C. K.*, 1934. — The Specific Influence of Acidity on the Mechanism of Nitrogen Fixation by *Azotobacter*. *J. Bact.*, v. 27, pp. 325—340.

- Christensen, Harald R.*, 1914. — Studier over Jordbundsbeskaffenhedens Indflydelse paa Bakterielivet og Stofomsætningen i Jordbunden. *Tidsskr. f. Planteavl*, v. 21, pp. 323—552.
- Csáky, T. Z.*, 1949. — On the Influence of pH and Inhibitors on the Ammonia and Nitrate Assimilation by *Azotobacter*. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 3, pp. 298—300.
- Fischer, R. A.*, 1944. — Statistical Methods for Research Workers (9th Ed., London and Edinburgh).
- Gainey, P. L.*, 1923. — Influence of the Absolute Reaction of a Soil upon its *Azotobacter* — Flora and Nitrogen-fixing Ability. *J. Agric. Res.*, v. 24, pp. 907—934.
- Horner, C. K.*, og *Allison, F. E.*, 1944. — Utilization of Fixed Nitrogen by *Azotobacter* and Influence on Nitrogen Fixation. *J. Bact.*, v. 47, pp. 1—14.
- Jensen, H. L.*, 1940. — Contributions to the Nitrogen Economy of Australian Wheat Soils. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, v. 65, pp. 1—122.
- Nickell, L. G.*, og *Burkholder, P. R.*, 1947. — Inhibition of *Azotobacter* by Soil Actinomycetes. *J. Amer. Soc. Agron.*, v. 39, pp. 771—779.
- Olsen, Carsten*, 1927. — On the Determination of Nitrogen in Soils. *Medd. f. Carlsberg-Laboratoriet*, v. 17, No. 3.
- Petersen, Erik J.*, 1925. — Undersøgelser over Forholdet mellem *Azotobacter*prøven og Jordens Reaktionstilstand, *Tidsskr. f. Planteavl*, v. 31, pp. 246—337.
- Petersen, Erik J.*, 1933. — Undersøgelser over Winogradsky-Sacketts Metode til Bestemmelse af Kali- og Fosforsyretræng. *Ibid.*, v. 39, pp. 781—821.
- Pochon, J.*, og *Tchan, Y. T.*, 1947. — Recherches sur la nutrition carbonée des azotobacter. *Ann. Inst. Pasteur*, v. 73, 1947, pp. 37—41.
- Rippel, A.*, 1936. — Ueber die Wirkung von geringen Mengen von Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von *Azotobacter* und auf andere mikrobiologische Vorgänge. *Arch. Mikrobiol.*, v. 7, pp. 210—234.
- Schloesing, T.*, 1888. — Sur les relations de l'azote atmosphérique avec la terre végétale. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris*, v. 106; pp. 805—809, 898—902, 982—987.
- Starkey, R. L.*, og *De, P. K.*, 1939. — A New Species of *Azotobacter*. *Soil Sci.*, v. 47, pp. 329—343.
- Stöckli, A.*, 1944. — Die Verbreitung der *Azotobacter*organismen in der Schweiz. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, v. 58, pp. 67—105.
- Weis, Fr.*, og *Bornebusch, C. H.*, 1914. — Om *Azotobacter*s Forekomst i danske Skove. *Det Forstl. Forsøgsv. i Danmark*, v. 4, pp. 319—340.
- Winogradsky, S.*, 1926. — Études sur la microbiologie du sol, II. Sur les microbes fixateurs d'azote. *Ann. Inst. Pasteur*, v. 40, pp. 445—520.
- Winogradsky, S.*, og *Ziemięcka, Jadwiga*, 1928. — Études sur la microbiologie du sol. III. Sur le pouvoir fixateur des terres. *Ibid.* v. 42, pp. 36—62.
- Yamagata, U.*, og *Itano, A.*, 1923. — Physiological Study of *Azotobacter chroococcum*, *beijerinckii* and *vinelandii* Types. *J. Bact.*, v. 8, pp. 521—533.
- Ziemięcka, Jadwiga*, 1933. — The *Azotobacter* Test of Soil Fertility Applied to the Classical Fields at Rothamsted. *J. Agric. Sci.*, v. 22, pp. 797—810.