

Om lucerne-knoldbakteriers levedygtighed i jordkultur

Ved H. L. JENSEN

632. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning fremkommer som et led i Statens Planteavlslaboratoriums bakteriologiske afdelings undersøgelser over biologisk kvælstofbinding og omhandler lucerne-knoldbakteriernes evne til at holde sig levende gennem flere årtier i steriliseret jord og forblive i stand til at danne normale, kvælstofbindende rodknolde. Beretningen er udarbejdet af afdelingsbestyrer, dr. agro. *H. L. Jensen*.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

Bælgplanternes rodknoldbakterier vides at kunne bevare deres levedygtighed i renkultur gennem meget lange tidsrum, idet man ofte har fundet formeringsdygtige individer i 15-16 år gamle kulturer af forskellige knoldbakteriearter såvel i kunstige substrater som i steriliseret jord (se FRED o.a., 1932 og ALLEN & ALLEN, 1958). Brugen af det sidste materiale som mikrobiologisk dyrkningssubstrat synes først foreslået af BARTHEL (1918, 1919), efter hvis angivelser forskellige (ikke specificerede) arter af knoldbakterier her kan forblive levende i 3-3½ men sjældent 4 år.

Ved nærværende laboratorium anvendes autoklave-steriliseret jord rutinemæssigt til opbevaring af stamkulturer af knoldbakterier, især fra lucerne. Om sådanne bemærkede PETERSEN (1940), at bakterierne her holdt sig levende og effektivt knolddannende »gennem et praktisk talt ubegrænset tidsrum«. Dette sidste defineredes ikke nærmere, men strakte sig iflg. senere personlig meddelelse over indtil 20 år. Et stort antal stammer af sneglebælg-gruppens knoldbakterier (*Rhizobium meliloti*) har senere vist en »levealder« langt højere end hidtil angivet fra anden side.

En nærmere undersøgelse foretoges i efteråret 1960 af laboratoriets 20 ældste kulturer, der var 30 til 45 år gamle og repræsenterede 17 stammer af *Rh. meliloti* fra lucerne og 3 fra humle-sneglebælg. Kulturerne var som senere beskrevet af PETERSEN (1940) fremstillede i Freudreich-kolber med ca. 10 til 50 gram kalkrig jord (Rt. 7.8-8.0), for de ældste kulturers vedkommende (indtil 1922) iflg. oplysning fra professor K. A. BONDORFF dog uden tilsætning af mannit. I aldersklasser fordeles de sig som følger:

Oprindelsesår	Antal	Oprindelsesår	Antal
1915	1	1921	5
1916	1	1922	4
1919	1	1927	3
1920	4	1930	1

Resultater

Jordkulturernes bakterieindhold. Talrige forudgående forsøg havde vist, at der fremkom en ren og typisk vækst af *Rh. meliloti* fra de gamle kulturer, når nogle jordpartikler overførtes til reagensglas med skrå »nitragin-agar« (se PETERSEN, 1940: glucose-asparagin-agar tilsat lucernekimplanteafkog og noget calciumcarbonat). Tælling af bakterierne forsøgt ved spredning på kalkfri nitragin-agar fra jordopslemninger, der fremstilledes ved aseptisk at afveje ca. et gram jord i sterile 50-ml koniske kolber og heri afpipettere et rumfang sterilt ledningsvand svarende til 10× jordens vægt. Spredninger udførtes først til orientering i stigende fortynding (1:10 til 1:10.000) i duplikatskåle, derefter i 6 parallelskåle med en passende fortynding af hver jord. Koloniantallet på pladerne viste sig dog snart at være så variabelt og resultaterne så dårligt reproducerbare, at man ikke kunne opnå blot nogenlunde pålidelige tællinger. For forsøgenes formål var det imidlertid tilstrækkeligt at kunne fastslå, at de 30 til 45 år gamle jordkulturer indeholdt formeringsdygtige knoldbakterier i antal fra mindre end 100 til henimod en halv million pr. gram jord, således som det fremgår af tallene i tabel 1. Nogen korrelation mellem kulturernes alder og bakterietæthed eksisterer næppe.

Nogle jordkulturer undersøgtes tillige mikroskopisk i præparater af indtørret jordopslemning, der farvedes med phenol-anilinblåt

Tabel 1. Resultater af spredninger fra gamle jordkulturer
(6 parallelskåle)

Stamme nr.*	Alder år	Fortynding	Bakteriekolonier pr. Petriskål
L. 2.....	45	1/10	30—48
L. 4.....	44	1/200	26—86
L. 8.....	41	1/25	148—258
L. 9.....	40	1/5000	53—73
L. 13.....	40	1/2000	54—111
L. 14.....	40	1/1000	390—580
L. 16.....	40	1/500	80—131
L. 3.....	39	1/100	26—86
L. 5.....	39	1/2000	18—50
L. 19.....	39	1/5000	7—40
L. 20.....	39	1/1000	12—25
L. 21.....	39	1/5000	38—138
L. 11.....	38	1/1000	43—62
L. 17.....	38	1/1000	15—36
L. 22.....	38	1/100	10—26
L. 24.....	38	1/4	8—20
L. 32.....	33	1/10	7—55
H. S. 18.....	33	1/10	57—96
H. S. 38.....	33	1/20	32—74
H. S. 10.....	30	1/20	64—140

* L: stammer isolerede fra lucerne. H. S.: fra humle-sneglebælg

eller phenol-bengalrosa. Bakterierne kunne tydeligt ses og varierende i skikkelse fra korte stave til coccoidformer, der mest var samlede i uregelmæssige hobe fra nogle få til flere hundrede individer og tilsyneladende fasthæftede til jordkolloiderne. Det mikroskopiske billede var gennemgående som beskrevet af BARTHEL (1919) og GANGULEE (1926).

I tilslutning til de 20 ældste kulturer undersøgtes tillige jordkulturer af 48 andre stammer af *Rh. meliloti* kvalitativt på nitragin-agar; alle disse stammer viste sig levedygtige efter 18 til 27 år.

Varmeresistens. Som forklaring på knoldbakteriekulturernes store levedygtighed har BISSET (1952, 1959) hævdet, at ialtfald nogle stammer, især fra vildtvoksende bælgplanter, kan indtræde i en udviklingsfase, hvor de danner endosporer og ligner *Bacillus polymyxa* uden dog at være identisk hermed. Sporerens varme-resistens angives at være meget forskellig, men dog så betydelig,

at de kan overleve mindst 20-30 minutter ved 80°C og ofte yderligere 5 minutter ved 100°C. Denne teori har ikke fundet større tilslutning og kunne iflg. NUTMAN (1958) ikke bekræftes i forsøg ved Rothamsted. På den anden side betragtede ALLEN & ALLEN (1958) kulturernes udprægede sejglivethed som i sig selv en indirekte støtte for teorien, og i forsøg refererede af SWABY (1958) vil man have fundet sporedannende varianter af knoldbakterier, hvis sporer betegnes som kun moderat varmeresistente. Dr. C. A. PARKER, University of Western Australia, har iflg. personlig meddelelse hidtil ikke kunnet finde virkeligt termoresistente endosporer hos *Rhizobium*-arter.

Dersom knoldbakterierne virkelig overlever lange tidsrum i form af sporelignende celler, skulle der være en særdeles god udsigt til at finde sådanne sporer i de her omhandlede gamle jordkulturer, hvor deres eventuelle forekomst skulle kunne påvises ved dyrkning fra pasteuriseret jordopslemning. Orienterende forsøg i dette øjemed foretoges ved at opvarme små mængder opslemning af jord i sterilt ledningsvand (1:10) til ca. 75°C i 2-4-6 minutter og derefter overføre ca. 0,5 ml jordopslemning til skrå nitragin-agar. Der fremkom efter 3 ugers inkubation ved 25°C ingen vækst fra nogen af de 20 gamle jordkulturer efter blot 2 minutters opvarmning af opslemningen.

Mere detaljerede forsøg udførtes på lignende måde ved 50°C og 60°C, i enkelte forsøg også 55°C, i et termostatisk reguleret vandbad af en nøjagtighed på ca. $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Jordopslemninger i duplikatglas opvarmedes i 5, 10 og 20 minutter, i nogle forsøg også 15 og 30 minutter; skrå nitragin-agar podet med ca. 0,5 ml opvarmet opslemning inkuberedes mindst 3 og i nogle forsøg 6 uger; inkubationstiden gjorde ingen forskel. I kontrolkulturer med uopvarmet jordopslemning fremkom stedse god vækst, som regel indenfor en uge.

Samtlige 20 stammer prøvedes ved 50°C, hvor 11 af dem (L.2, L.3, L.4, L.8, L.22, L.24, L.32, H.S.10, H.S.18 og H.S.38) ikke voksede efter 5 minutters opvarmning. De øvrige 9 stammer overlevede 5-10 minutter, men undertiden med »spring« i rækken; L.21 viste to gange vækst efter 30 minutter, hver gang dog kun i det ene duplikatglas. Disse stammer samt 5 andre (L.3, L.4, L.8, L.16, H.S.18) prøvedes ved 60°C. Efter 5 minutters opvarmning

gik alle til grunde undtagen een: L.21, der i første forsøg overlevede 10 minutter; dette resultat kunne dog ikke reproduceres ved gentagelse af forsøget. I de få forsøg ved 55°C dræbtes L.2, L.3 og L.5 på 5 minutter, medens L.4 voksede i det ene duplikatglas efter 15 minutter.

Vækst af andre organismer end knoldbakterier (skimmelsvampe, gule mikrokokker og *Bac. cereus*-lignende sporedannere) optrådte så sjældent og uregelmæssigt, at de uden videre kunne regnes for tilfældige forureninger. Organismer af *Bac. polymyxa*-lignende karakter sås ikke.

Knoldbakterier fra kunstige substrater angives som regel at dø efter få minutter ved 60°C (FRED o.a., 1932). Kulhydratfattigt substrat skal iflg. de af SWABY (1958) refererede forsøg begunstige dannelsen af sporelignende elementer; dog fandt PETERSEN (1940) ingen forhøjet termoresistens hos lucernebakterier dyrkede på magert substrat (succinat-agar). Dette bekræftedes i pasteuriseringsforsøg med nogle af de nærværende stammer, der dyrkedes fortrinsvis på kulhydratfattige substrater: kødekstrakt-pepton-agar, jordekstrakt og lucerneekstrakt (4:1). Suspensioner af 1 til 4 uger gamle celler i jordekstrakt eller bouillon opvarmedes ved 60°C som i forsøgene med jord og prøvedes for vækst på nitragin-agar i 14 dage ved 25°C. I 42 forsøg indtrådte der sjældent vækst efter 5 minutters og endnu sjældnere efter længere tids opvarmning:

Opvarmningstid	Subkulturer	
	ialt	visende vækst
5 minutter	84	20
10 »	84	7
20 »	72	2

Afkom af de to kulturer, der fremkom efter 20 minutters opvarmning, voksede ikke efter mere end 5 minutters opvarmning og besad således ingen påfaldende termoresistens.

Knoldbakteriernes effektivitet. I tilslutning til nedenfor omtalte kvælstofbindingsforsøg blev nogle lucernekimplanter i aseptisk agarkultur podet med jordopslemning (fortynding 1:10, 0,4 ml pr. glas) fra kulturerne af L.9, L.14 og L.21. På planter podede med opslemning opvarmet til 60°C i 15 minutter fremkom ingen

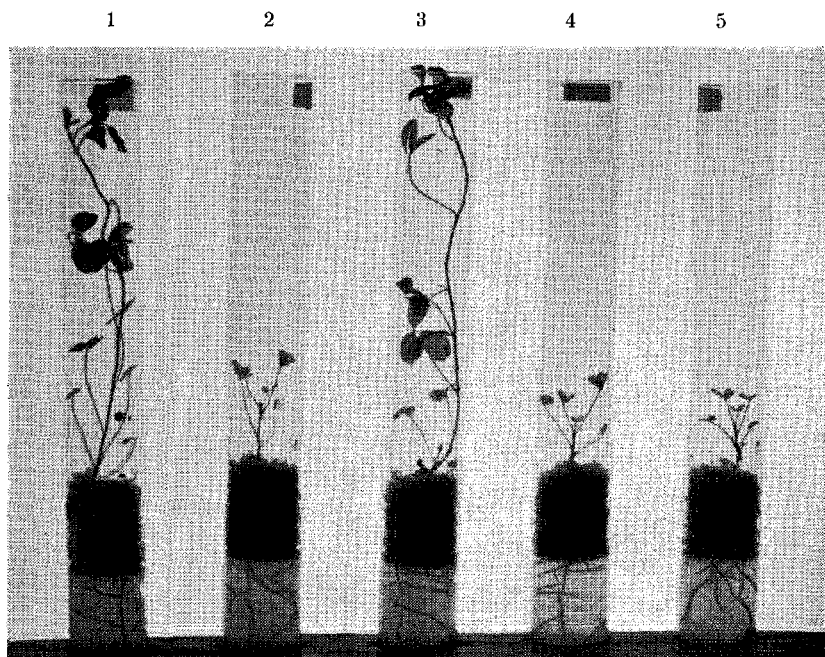


Fig. 1. Lucernekimplanter podede med uopvarmet og opvarmet (15 min. 60° C) jordkulturopslemning. Planterne podet 21. 3. 1961, fotograferet 2. 5. 1961 (vatpropperne fjernede fra glassene). Ca. $\frac{2}{5}$ nat. st. Fra venstre: (1) podet med L.9, uopvarmet. (2) do., opvarmet. (3) podet med L.14, uopvarmet. (4) do., opvarmet. (5) upodet plante. Fot. A. Munch, Landbrugets Informationskontor

rodskolde indenfor 6 uger, medens kontrolplanter podede med uopvarmet opslemning bar normale knolde og voksede kraftigt (se fig. 1). Bakterierne i de 39-40 år gamle kulturer var således ikke blot formeringsdygtige men også effektive.

På den anden side viste NUTMAN (1946), at en genetisk stabil stamme af kløver-knoldbakterier (*Rh. trifoli*) ved dyrkning i jordkultur ganske hyppigt afspaltede varianter, der dannede ikke-funktionsdygtige rodskolde og kun yderst sjældent slog tilbage til den oprindelige effektive form; BROCKWELL (1954) har berettet om lignende resultater. Betydningen af dette fænomen for brugen af steril jord som grundsubstrat for stamkulturer af knoldbakterier er selvindlysende; der foretoges derfor nogle effektivitetsprøver for at konstatere, om der i de gamle jordkulturer var

opstået en blanding af effektive og ineffektive former. I forbindelse med bakterietællingerne (Tabel 1) afpodedes 20 isolerede kolonier fra 10 forskellige stammer, og med samtlige 200 isolater udførtes kvælstofbindingsforsøg med luccrnekimplanter i agar-kultur som tidligere beskrevet (JENSEN, 1955). Duplikatkulturer af hvert isolat henstilledes i et drivhus, hvor dagslyset i vinter-tiden (november til marts incl.) suppleredes med kunstig belysning. Kulturerne høstedes 6 til 8 uger efter podningen, knold-dannelsen noteredes, planterne tørredes og vejedes, og i 3×2 kul-turer fra hvert sæt isolater bestemtes kvælstofindholdet som stik-prøve. Upodede planter tjente som kontrol.

Allerede planternes udseende viste, at ineffektive varianter ikke var fremtrædende. De podede planter bar ret fåtallige normalt udseende rodknolde med rødt pigment (leghæmoglobin) og var frisk grønne og langt kraftigere end de upodede kontrolplanter, der viste alle tegn på kvælstofhunger (sml. fig. 1). Tallene i Ta-bel 2 viser dette endnu tydeligere. Et enkelt isolat, L.4:12, var i det første podningsforsøg ineffektivt og dannede talrige små rod-

Tabel 2. Effektivitet af 200 enkeltkoloni-isolater fra 10 bakteriestammer

Forsøg nr. og -tid*	Bakterie-stamme	Parallel-kulturer	Tørstof, mg pr. kultur		N % i tørstof
			gns.	middelfejl	
1. $7/11-60$ $3/1-61$	L. 3	39**	39	± 0.95	3.31—4.08
	L. 4	37**	31	± 0.81	2.82—4.59
	L. 4	2	21	—	1.25—1.71
	L. 8	39**	35	± 0.83	2.67—4.08
2. $24/11-60$ $19/1-61$	L. 20	39**	30	± 0.91	3.36—4.52
	H. S. 38	20	27	± 1.07	3.08—4.54
3. $13/12-60$ $1/2-61$	H. S. 38	20	42	± 1.58	3.09—4.55
	L. 21	40	42	± 0.95	3.21—4.26
4. $3-4/3-61$ $12-13/4-61$	L. 2.	40	40	± 0.70	4.33—4.78
	L. 5	40	41	± 0.90	3.85—4.75
	L. 14	40	38	± 1.11	4.35—4.67
5. $4/4-16/5$ 1961	L. 17	40	38	± 1.02	3.61—4.73
6. Upodede kulturer, 5 sæt (6+6+6+ 5+4)		27	23	± 0.87	1.16—1.71

* Podnings- og høstdato; planterne 7—10 dage gamle ved podningen

** Planterne visne i et enkelt glas i hvert af disse forsøg

knolde uden pigment, men et nyt forsøg ca. en måned senere viste normal effektivitet, og dette bekræftedes ved en yderligere gentagelse (se Tabel 3). RIEDE & BUCHERER (1939) synes at have iagttaget noget lignende hos soyabønne-knoldbakterier isolerede fra 15 år gamle lufttørre rodknolde; disse bakterier viste umiddelbart efter isolationen en mangelfuld men efterhånden en stigende effektivitet.

I de podede planters vækst var der betydelig variation såvel mellem de forskellige isolater som mellem disses duplikater; kun i to stammer, L. 4 og L. 14, var variationen signifikant større mellem isolaterne end mellem deres duplikater – i L. 4 også bortset fra den midlertidigt ineffektive variant L. 4:12. Som yderligere prøve for en eventuelt gradsforskellig effektivitet foretoges kvælstofbindingsforsøg med nogle af de isolater indenfor hver stamme, der havde givet tegn på størst forskel i tørstofudbyttet. Disse forsøg omfattede 8-10 parallelkulturer, og foruden tørstofvægt bestemtes kvælstof i det samlede plantemateriale fordelt i 2-3 portioner; i et par tilfælde bestemtes kvælstof i de individuelle kulturer.

Resultaterne er anført i tabel 3. Kun et par isolater, L. 8:4 og L. 8:11, viser en sikker (99 pct. signifikant) forskel i tørstofudbytte, hvilken forskel synes at understreges yderligere af kvælstofbestemmelserne. Der fandtes dog ingen forskel, da forsøget en halv snes dage senere gentoges med det tilsyneladende lidet effektive isolat L. 8:11 i sammenligning med et andet isolat L. 8:3 af lignende effektivitet som L. 8:4. Isolaterne L. 14:1 og L. 14:11 viste en ret tydelig forskel i totalt kvælstofindhold (95 pct. signifikant), men denne forskel var rigtignok til fordel for det isolat, der i det indledende forsøg havde givet tegn på mindst effektivitet. Om nogen generel forskel mellem isolaterne indenfor hver stamme er der åbenbart ikke tale, og der er således ingen tegn på, at den lange opbevaring i steril jord påvirker bakteriernes effektivitet i gunstig eller ugunstig retning.

Ved spredningerne på nitragin-agar fremkom der ofte bakteriekolonier af den af PETERSEN (1940) beskrevne »vandede« type, hvis vækst er voluminøs og halvgennemsigtig og i udseende minder mere om kløver- og ærtbakteriernes end om lucernebakteriernes normalt »stearinlignende« vækst. Den »vandede« type

Tabel 3. Sammenligning mellem isolater af forskellige stammer

Forsøgstid (fra podning til høst)	Stamme og isolat	Parallel- kulturer	Tørstof, mg pr. kultur		N % i tørstof
			gns.	middelfejl	
1. ⁵ / ₄ - ²³ / ₅ 1961	L. 20-14 (h)	10	51	± 1.68	3.33-4.41
	L. 20-12 (l)	10	50	± 1.53	3.41-4.60
2. ⁸ / ₄ - ²⁶ / ₅ 1961	L. 4-1 (h)	10	54	± 1.48	3.90-3.94
	L. 4-12 *	10	55	± 2.39	3.61-3.97
3. ¹⁰ / ₄ - ²⁴ / ₅ 1961	L. 21-19 (h)	10	54	± 2.11	(tabt)
	L. 21-4 (l)	10	55	± 0.29	3.37-3.31
4. ¹ / ₅ - ¹⁵ / ₆ 1961	L. 2-7 (h)	9	45	± 1.95	3.28-3.57
	L. 2-8 (l)	9	47	± 2.39	3.32-3.75
	L. 14-1 (h)	10	46	± 2.77	3.00-3.14
	L. 14-11 (l)	10	49	± 1.51	3.48-3.49
5. ² / ₅ - ¹⁵ / ₆ 1961	L. 5-11 (h)	9	55	± 2.17	3.34-3.65
	L. 5-6 (l)	9	50	± 1.90	3.51-3.88
	L. 17-9 (h)	10	50	± 2.15	3.33-3.44
	L. 17-15 (l)	8	50	± 2.41	3.31-3.45
6. ³ / ₅ - ¹⁷ / ₆ 1961	L. 8-4 (h)	10	53	± 1.59	3.33-4.09
	L. 8-11 (l)	10	43	± 2.75	2.18-3.54
7. ¹³ / ₄ - ²⁷ / ₆ 1961	L. 8-3 (h)	7	51	± 2.11	3.72-3.32
	L. 8-11 (l)	8	52	± 2.63	3.59-4.03
8. ²⁹ / ₃ - ²⁹ / ₆ 1961, upodet ²⁴ / ₄ - ¹⁷ / ₆ 1961, »		6	33	± 1.94	1.10
		10	25	± 1.75	1.32-1.92

* Ineffektiv i det indledende forsøg (tabel 2). — (h) og (l) angiver isolater med henholdsvis højest og lavest udbytte i indledende forsøg.

var ganske dominerende i stammen L. 2 og sås desuden hyppigt bl.a. i L. 3, L. 8, L. 11 og L. 17. Flere sådanne isolater var repræsenterede i kvælstofbindingsforsøgene i tabel 2 og tabel 3; ændringen i bakteriernes væksttype har således intet at gøre med deres evne til at foranledige kvælstofbinding.

Jordkulturer af andre organismer. Laboratoriets samling rummer adskillige andre levedygtige jordkulturer af anselig alder, omend ingen så gamle som de ældste kulturer af lucernebakterier; for eksempel viste to stammer af kløverbakterier sig i live efter 12 år, een stamme af vikkebakterier efter 10 år og fire stammer af soyabønnebakterier efter 6 år. På den anden side fandtes flere stammer af andre knoldbakterier (fra ært, havebønne, lupin,

serradel og rundbælg) døde efter 4 til 7 år, hvilket stemmer med BARTHEL's (1919) angivelser.

Til sammenligning med knoldbakterierne undersøgtes nogle jordkulturer af andre mikroorganismer for levedygtighed ved dyrkning på kødpepton- glucose-agar, glucose-asparagin-agar og kødpeptonbuillon. Blandt de levende fandtes bakterier (*Pseudomonas aeruginosa*), actinomyceter (*Streptomyces violaceus*, *Nocardia lutea*, *Micromonospora chalceae*) og skimmelsvampe (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma viride*) efter 12 år, tre arter af *Penicillium* endda efter 14 år. Adskillige andre var døde efter 9 til 12 år, bl.a. *Escherichia coli*, *Aerobacter cloacae*, *Mycobacterium phlei*, en uidentificeret gærsvamp og skimmelsvampen *Cunninghamella elegans*. Heller ikke knoldbakteriernes nære slægtning *Agrobacterium radiobacter* overlevede mere end 4 til 7 år, skønt den er en mere udpræget jordbeoer end knoldbakterierne, der overvejende formerer sig i planterøddernes umiddelbare nærhed (rhizosfæren).

OVERSIGT

Det er ganske tydeligt, at sneglebælg-gruppens knoldbakterier kan overleve indtørring i steriliseret jord gennem tidsrum, der nærmer sig et halvt århundrede. Tørkeperioder kan således næppe være afgørende for disse bakteriers forbliven i live i jordbunden under naturlige forhold. Deres varmeresistens er ikke væsensforskellig i jordkulturer og i kunstige substrater, og den overstiger kun sjældent og i ringe grad 5 minutter ved 60°C; dette taler stærkt imod den antagelse, at bakterierne skulle overleve i form af endosporer eller andre termoresistente hvileformer.

Denne store sejglivethed synes at være en konstant egenskab hos *Rh. meliloti*. I de nærværende forsøg er ikke mindre end 68 stammer forblevet levende efter 18 til 45 år, og ved Landbrugs-højskolens bælgplantelaboratorium i Uppsala har man iflg. personlig meddelelse fra overassistent G. BJÄLFVE iagttaget det samme i en 30 år gammel jordkultur. Hvorvidt andre *Rhizobium*-arter besidder den samme modstandsdygtighed lader sig ikke afgøre ud fra det hidtidige forsøgsmateriale; ganske vist uddøde kulturer af flere andre arter på mindre end 10 år, men det er vel

muligt, at den anvendte jord af ret stærk alkalisk reaktion ikke er et lige gunstigt substrat for alle knoldbakterier.

Effektivitetsforsøgene tyder ikke på, at der i jordkultur vil opstå ineffektive varianter af *Rh. meliloti*, der i det hele taget synes genetisk stabilere end f.eks. *Rh. trifolii*. Anvendelsen af steril jord til stamkulturer af lucernebakterier skulle således ikke give anledning til nogen betænkelighed.

SUMMARY

On the viability of lucerne rhizobia in soil culture

Cultures of *Rhizobium meliloti* in sterilized soil remained viable after storage for 30 to 45 years at room temperature. The rhizobia in soil suspensions did not resist heating for more than ten and only exceptionally for five minutes at 60°C and had thus not survived in the form of endospores or similar thermoresistant forms. Many other strains of the same organism survived in soil cultures for 18 to 27 years and none were found to die out earlier than this.

No ineffective variants were found among 200 single-colony isolates from 39 to 45 years old cultures of ten strains. Little or no difference was found in the nitrogen-fixing capacity of the isolates within each strain.

Several other microorganisms (*Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, various actinomycetes and fungi) remained alive in similar soil cultures for at least 10 to 14 years, while various others, including some rhizobia, perished within 4 to 10 years.

LITTERATURHENVISNINGER

- Allen, Ethel K., & Allen, O. N., 1958. – Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. – Ruhland's Handbuch der Pflanzenphysiologie, 8:48-118.
- Barthel, C., 1918. – Kulturen von Gärungsorganismen in sterilisierter Erde. – Centralbl. f. Bakt. II, 48: 340-349.
- 1919. – Cultures de bactéries sur terre stérilisée. – Medd. Kungl. Vetenskapsakad. Nobelinstit. 5, No. 20, 15 pp.
- Bisset, K. A., 1952. – Complete and reduced life cycles in *Rhizobium*. – J. Gen. Microbiol. 7: 233-242.
- 1959. – Some characters of *Rhizobium* strains from tropical legumes. – J. Gen. Microbiol. 20: 89-90.
- Brockwell, J., 1954. – Non-infective bacteria in peat cultures. – J. Aust. Inst. Agric. Sci. 20: 243-246.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L., & McCoy, Elizabeth, 1932. – Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. – University of Wisconsin, Studies in Science, No. 5.

- Gangulee, N., 1926.* – Studies on the lucerne nodule organism (*B. radiculicola*) under laboratory conditions. – Ann. Appl. Biol. 12: 360-373.
- Jensen, H. L., 1955.* – En lucerne-ineffektiv stamme af *Rhizobium meliloti*. – Tidsskr. f. Planteavl 59: 553-570.
- Nutman, P. S., 1946.* – Variation within strains of clover nodules bacteria and its influence on the infection of the legume host. – J. Bacteriol. 51: 411-432.
- Nutman, P. S., 1958.* – Diskussionsindlæg i Nutrition of the Legumes (Ed. Professor E. G. Hallsworth), p. 86. – Butterworth's Scientific Publications, London.
- Petersen, E. J., 1940* – Diagnostiske Undersøgelser over Lucernebakterier. – Tidsskr. f. Planteavl 44: 504-553.
- Riede, W., & Bucherer, H., 1939.* – Über Lebensdauer, Wirksamkeit und Leistung der Sojknöllchenbakterien. – Centralbl. f. Bakt. II, 100: 25-34.
- Swaby, R. J., 1958.* – Diskussionsindlæg i Nutrition of the Legumes (Ed. Professor E. G. Hallsworth), pp. 85-86. – Butterworth's Scientific Publications, London.