

# Lucerne- og kløverrodknoldbakteriernes forekomst i danske landbrugsjorde

Ved *H. L. Jensen*

## 844. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Den foreliggende beretning er et led i undersøgelserne over bælgplanternes rodknoldbakterier ved Statens Plan-teavls-Laboratoriums bakteriologiske afdeling og omhandler to af de vigtigste knoldbakteriearters udbredelse og tæthed under forskellige jordbundsforhold. Undersøgelserne falder i to afsnit: 1948-53 hvor det eksperimenterelle arbejde i hovedsagen blev varetaget af laboratorieassistent, frk. *Esther Christensen* († 1958), og supplerende forsøg 1965-67. Beretningen er udarbejdet af forstander, dr. agro. *H. L. Jensen*.

*Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur*

### Indledning

Vore vigtigste foderbælgplanter rødkløver og hvidkløver har her til lands været genstand for dyrkning i et par århundreder, i stærkest stigende omfang vel i 1900-årenes sidste halvdel, medens dyrkningen af lucerne tog et stort opsving i indeværende århundrede, hvor arealet dog næppe overskred 30.000 ha og idag er væsentlig mindre (*Møller Nielsen* 1947). Lucernedyrkningens relativt store men absolut set beskedne fremgang kom vel især som følge af *Harald R. Christensen's* (1914) arbejde, der viste en ofte meget betydelig udbytteforøgelse ved »podning» af lucernefrø med renkulturer af rodknoldbakterier til sikring af en rigelig udvikling af de kvælstofbindende rodknolde. Mangel på disse specifikke bakterier havde man i øvrigt længe kendt som en hyppig foreteelse, der søgtes afhjulpet ved anvendelse af »podejord« fra vellykkede lucernemarker, hvilket nu blev afløst af renkulturer (»nitragin«).

Vi kender idag bælgplanternes symbiotiske kvælstofbinding som en af de store faktorer i det globale kvælstofkredsløb, men vort kendskab til de pågældende bakteriers udbredelse og kvantitative forekomst i danske jorde er højst ufuldkomment. Om kløverens knoldbakterier (*Rhizobium trifolii*) synes der slet ikke at findes undersøgelser, hvorimod en monografi af *Møller Nielsen* (1947) indeholder et afsnit af docent (senere professor) Erik J. Petersen om lucerne-knoldbakteriernes kvalitative udbredelse i jyske jorde. Til vurdering af resultaterne må der erindres om, at samt-

lige sneglebælgarter (*Medicago*) samt stenkløver-slægten (*Melilotus*) har en fælles rodknoldsymbiont (*Rhizobium meliloti*). Den vigtigste værtplante for *R. meliloti* foruden lucerne er hos os ubetinget humleagtig sneglebælg (*Medicago lupulina*, i det følgende simpelthen betegnet »sneglebælg«), der idag er af ringe betydning som foder- eller frøafgrøde, men som fra omkring 1920-40 dyrkedes i ret stort omfang som grøntgødningsplante og for nogen tid også som indikator for kalktrang, især på Lolland-Falster (sml. *Christensen* 1924). Som enårig afgrøde vil sneglebælg i sammenligning med lucerne komme til at bevæge sig hurtigere i sædskiftet og bidrage mere til at vedligeholde bestanden af *R. meliloti* i jorden - en funktion som vildtvoksende stenkløverplanter kun vil udøve i meget beskedent omfang. Værtplantefællesskabet gælder dog kun for de forskellige bakteriestammers infektionsevne og ikke for den resulterende kvælstofbindings effektivitet.

Nærværende beretning er en videreførelse af *Møller Niensens* og Erik J. Petersens arbejde, men gældende for øerne såvel som Jylland, indbefattende kløverbakterierne og med sigte på de to bakteriearters kvantitative repræsentation under forskellige jordbunds- og dyrkningsforhold.

### Knoldbakterietællingens metodik

Isolation af rhizobier direkte fra jorden på kunststigt substrat er allerede en vanskelig opgave, og en kvantitativ bestemmelse ad denne vej må ind-

til videre regnes for umulig, især når der tillige kræves artsspecifikation. Selve forekomsten af en bestemt type af rhizobier kan nogenlunde let påvises ved at så desinficerede frø af en værtplante for den søgte bakterieart i jorden og iagttagelse om der dannes normale rodknolde på de fremspirende planter. Dette er princippet i den første tællingsmetode, der skyldes *Wilson* (1926) og består i, at man dyrker testplanterne i steriliseret jord og poder denne med suspensioner af jord i stigende fortynding. Den fortyndingsgrænse, hvor rodknolddannelsen ophører, bliver da et mål for antallet af formerings- og infektionsdygtige rhizobier i den undersøgte jord. *Pohlmann* (1931) har senere modificeret metoden ved at anvende sterilt sand i stedet for jord som dyrkningssubstrat.

I sin oprindelige form er metoden særdeles arbejds- og pladskrævende, og de åbne dyrkningskar giver store muligheder for fremmedinfektion. *Krasilnikov & Koreniako* (1940) simplificerede metoden ved at bruge kolber eller reagensglas med aseptiske kimplanter i kvælstoffrit agarsubstrat — en velkendt metode til undersøgelse af rhizobium-renkulturers værtplantespecificitet og kvælstofbindende evne, men her med jordsuspension i stigende fortynding som podemateriale. Især til forsøg med småfrøede bælgplanter egner metoden sig udmærket og tillader desuden at følge rodknoldenes opståen og udvikling i det gennemsigtige substrat. Iøvrigt er »agar-kimplantemetoden« senere udviklet til en betydelig grad af fuldkommenhed, ikke mindst af australske forskere (*Vincent & Waters* 1954, *Rovira* 1961, *Brockwell* 1963, *Thompson & Vincent* 1967).

Antallet eller rettere størrelsesordenen af knoldbakterier bestemt ad denne vej varierer som venteligt meget stærkt, fra sporadisk eller ikke påviseligt til hundredetusinder pr. gram jord eller endnu højere i planterøddernes umiddelbare nærhed (rhizosfæren). F. ex. fandt *Rovira* (1961) indtil 280 mill. pr. g jord i direkte kontakt med kløverrødder, men i en afstand af blot 10-20 mm herfra faldt tallene til ca. 1 mill./g. Om rhizosfærevirkning er der sandsynligvis også tale, når *Krasilnikov & Koreniako* (1940) for kløverbakterier angiver mere end 100 mill./g. I det hele taget tyder meget på, at rhizosfæren snarere end selve jorden

er hovedsædet for rhizobiernes aktive vækst (*Mulder & van Veen* 1960).

I kvalitativ form anvendtes agar-kimplantemetoden også af *Erik J. Petersen* (*Møller Nielsen* 1947): ca. et gram jord blev sat til flydende agarsubstrat, og efter dets størkning såede man desinficerede lucernefrø i agaren (det er her muligt, at fåtallige rhizobier kan blive indstøbt i agaren uden at få kontakt med rødderne og foranledige knolddannelse).

Tællingerne i de første af de her refererede forsøg udførtes væsentligt efter *Krasilnikov & Koreniako* (1940). Man anvendte reagensglas med to kimplanter fra desinficerede frø af rødkløver (Tidlig Øtofte) eller lucerne (DuPuits) i ca. 20 ml agarsubstrat med mineralske næringsstoffer men uden kvælstoftilsætning (*Jensen* 1955). Når kimplanterne havde udviklet det første blivende blad, podedes glassene med 1 ml jordsuspension i stigende fortynding: 1:10-50 (ell. 100) - 500 (ell. 1000) - 5.000-50.000-100.000 evt. 200.000. Der podedes mindst 3, oftest 4 indtil 6 fællesglas fra hver fortynding. Et drivhus blev først til rådighed i 1950; de to foregående år måtte glassene opstilles i sydvendte vinduer med den agarfyldte del af glassene omviklet med hvidt papir til beskyttelse af rødderne mod sollyset. Resultaternes størrelsesorden forblev dog den samme under de mere ensartede lysforhold i drivhuset. Planterne henstod mindst en måned med ca. ugentlig iagttagelse for fremkomst af rodknolde, der under gunstige forhold kunne ses allerede efter den første uge. Man lod enkelte glas stå noget længere til observation af rodknoldenes effektivitet, der næsten altid syntes at være positiv hos begge planter efter den dominerende rodknoldtype at dømme: forholdsvis store og fåtallige, mest på rodsystemets øvre dele og indeholdende synligt rødt pigment efter ca. en måned. Dog fandtes der en lucerneineffektiv *R. meliloti* (*Jensen* 1955) og senere en ineffektiv *R. trifolii*. I den supplerende forsøgsrække anvendte man større reagensglas med agaren dækket af et lag sand som tidligere beskrevet (*Jensen* 1955); disse planter lod man vokse mindst to måneder, hvilket giver et tydeligere billede af rodknoldenes effektivitet. Tællingsresultaterne lå på samme niveau som i den første forsøgsrække.

De prøvede fortyndingsgrader (potenser af 10 undtagen i de højeste trin) tillader kun bestemmelse af bakterietallenes størrelsesorden selv med mindst 4 fællesglas, og resultaterne er minimumstal, da blot een formerings- og infektionsdygtig bakteriecelle i podematerialet vil kunne formere sig i rhizosfæren og danne det teoretisk maximale antal rodknolde. Som tilnærmelsesvis mål for rhizobiernes tæthed er i det følgende angivet den reciproke højeste fortynding med positiv knolddannelse og korrektion for antallet af inficerede fællesglas. Et par eksempler kan anføres:

I. — Lucerne, 4 fællesglas pr. fortynding.

Fortynding, reciprok:	50	—	500	—	5.000	—	50.000	—	100.000
Rodknolddannelse.....	4+		4+		4+		2+, 2—		1+, 3—
Beregnet tæthed.....	> 50		> 500		> 5.000		25.000		25.000

II. — Kløver, 6 fællesglas pr. fortynding.

Fortynding, reciprok:	10	—	100	—	1000	—	10.000	—	50.000
Rodknolddannelse.....	6+		6+		6+		3+, 3—		6—
Beregnet tæthed.....	> 10		> 100		> 1000		5.000		< 50.000

I adskillige tilfælde og især hos lucerne sås der spring i fortyndingsrækken, enten ved manglende knolddannelse i een fortynding men positiv i den næste, eller således at et eller flere fællesglas forblev uinficerede i påfølgende fortyndinger, et forhold som forøvrigt også *Thompson & Vincent* (1967) har bemærket. Dette gør bestemmelsen meget usikker, og man har i sådanne tilfælde som regel valgt fortyndingen før den højeste med positiv knolddannelse som nærmeste grænse. Sådanne tællinger er i tabellerne betegnet som »usikre«. Årsagen til springene er usikre men kan måske tildels skyldes organismer med antagonisk virkning overfor rhizobierne (*Wieringa* 1963, *Visona & Tardieux* 1964).

**De undersøgte jorde**

Tæthedsbestemmelse af rhizobier udførtes i 214 jordprøver (alle fra pløjelagsdybde), hvoraf 94 stammede fra statens forsøgsstationer og forsøgsarealer: Lyngby (14), Aakirkeby (4), Tystofte (6), Abed (6), Aarslev (4), Blangstedgaard (7), Askov (10 fra lermarken og 6 fra sandmarken), Rønhave

(2), Jyndeved (3), Højer marsk (5), Ribe marsk (2), Spangsbjerg (2), Lundgaard (5), Borris (4), Ødum (4), Hornum (2), Studsgaard (3), Tylstrup (5). Fra andre forsøgsinstitutioner stammede 15 prøver: Landbohøjskolens forevisningsmark (4), Albertslund (2), Øtoftgaard (3), Faurholm (2), Godthaab v. Skanderborg (4). De resterende 89 prøver kom fra praktiske landbrug og var for størstedelen udtaget af flere planteavlskonsulenter, der her under eet takkes for deres velvillige bistand. Af disse prøver kom 45 fra Sjælland, 8 fra Lolland-Falster, 4 fra Fyn-Langeland og 32 fra

Jylland incl. 3 fra Læsø. Endelig var 6 prøver udtaget fra ikke-erhvervsmæssigt dyrkede haver og 10 fra udyrkede arealer (6 skovjorde og 4 andre).

**Lucerne-knoldebakteriernes (*R. meliloti*) udbredelse og tæthed**

Tabel 1 viser i summarisk form forekomst og tæthed af *R. meliloti* i relation til jordens reaktion bestemt som pH(H<sub>2</sub>O), i det følgende for simpelhedens skyld betegnet pH<sup>1</sup>. Hvad den rent kvalitative forekomst såvel som tætheden angår, aftager begge hurtigt med faldende pH for næsten at forsvinde ved pH under 5,0. Den sureste jord, hvor forekomst af *R. meliloti* overhovedet kunne konstateres, var en sandjord af pH 4,8 fra det gamle gødningsforsøg på Askov sandmark. Selve forekomsten udtrykt i pct. af undersøgte prøver i 5 pH-klasser er ganske som i de af *Møller Nielsen* (1947) refererede forsøg, således som det fremgår af tabel 2. Disse to danske forsøgsrække's resul-

<sup>1</sup>. Detailoplysninger om de undersøgte jordes karakter og tællingsresultaterne for begge bakteriearter findes i en hovedtabel deponeret på Statens Planteavlkontor.

Tabel 1. Tæthed af *R. meliloti* i 214 jorde af pH(H<sub>2</sub>O) 8,5 til 4,0

Tætheds- gruppe	pH-interval					Ialt
	8,5-7,0	6,9-6,0	5,9-5,5	5,4-5,0	4,9-4,0	
100.000 +	2 (+1)	6	0	0	0	8 (+1)
50.000 +	8 (+6)	2	0	0	0	10 (+6)
10.000 +	4 (+2)	0 (+2)	0	0	0	4 (+4)
1.000 +	6 (+6)	6 (+2)	0 (+2)	0	0	12 (+10)
100 +	6	10	1 (+3)	0 (+1)	0	17 (+4)
10 +	5 (+1)	6 (+2)	3 (+1)	1	0	15 (+4)
1 +	4	24 (+1)	2	2	2	34 (+1)
0	16	33	10	13	12	84
Ialt.....	51 (+16) = 67	87 (+7) = 94	16 (+6) = 22	16 (+1) = 17	14 —	184 (+30) = 214

Tabel 2. Forekomst af *R. meliloti* (kvalitativ) i jord af forskellig reaktion

pH-interval	Nærværende forsøg			Møller Nielsen 1947		
	Ialt	R. mel. +	pct.	Ialt	R. mel. +	pct.
8,5-7,0....	67	51	76	85	60	71
6,9-6,0....	94	61	65	65	38	50
5,9-5,5....	22	12	55	—	—	—
5,4-5,0....	17	4	24	—	—	—
4,9-4,0....	14	2	14	—	—	—
Ialt < 6,0	(53)	(18)	(34)	15	4	27

tater stemmer også godt overens med undersøgelser af Peterson & Goodding (1941) over forekomst af *R. meliloti* i 314 jordprøver fra lokaliteter i Nebraska, hvor lucerne og stenklover ikke voksede. *R. meliloti* fandtes i 40 pct. af samtlige jorde, fallende jævnt fra 100 pct. i de (temmelig fåtallige) af pH 7,7-8,6 til 11 pct. ved pH 5,9-5,0; lavest pH med positiv forekomst var 5,1.

Angående tætheden er det bemærkelsesværdigt, at tal over 50.000 udelukkende forekommer ved pH 6,0 eller derover, og at der kun ses sporadiske tætheder ved pH 5,4 og derunder (sml. Wilson (1926) som i nordamerikansk jord kun fandt *R. meliloti* i antal på 10-50 pr. g ved pH 5,6-5,8 og ingen ved pH 5,4). Det i det hele taget noget komplicerede billeder af tætheden ved forskellig jord-

reaktion synes desuden i betydelig grad at være betinget af arealbenyttelsen. Af de 18 jorde med tætheder over 50.000 i tabel 1 (de 7 usikre ikke medregnet) stammede de 12 fra lucernemarker 1 til 13 år gamle, 3 fra udlægsmarker med lucerne (eller sneglebælg) og 3 fra marker, hvor der har været lucerne 2, 5 og 8 år før. pH i disse jorde varierede mellem 7,6 og 6,2. Tæthederne på 100.000 (+) forekom alene i bestående lucernemarker — utvivlsomt en rhizosfære-effekt.

En særstilling indtager nogle prøver fra de gamle gødningsforsøg på Askov lermark, hvor der i sædskiftet hvert 4. år indgår en »klovergræs«-afgrøde, der siden omkr. 1934 har inkluderet lucerne. Her fandtes der en udpræget middel-tæthed af *R. meliloti*:

Mark B.5, udlæg efter byg (1948)

Forsøgsled ..	pH	Tæthed
Ugødet.....	7,1	1.000
1 staldg.....	7,1	50.000 (usikker)
P+K.....	7,2	500
N+P.....	7,5	500
N+P+K...	7,1	50.000

Mark B.3, kårroer (1952)

Forsøgsled ..	pH	Tæthed
Ugødet.....	6,5	2.500
1 staldg. ...	6,5	2.500

Foruden de ovennævnte jorde med 2 til 8 år siden lucerneafgrøde omfattede undersøgelserne 25 prøver fra arealer, hvor man havde oplysninger om sidste lucerne-dyrkning 10 til ca. 50 år forud for tællingerne. Tabel 3 viser en oversigt der ikke inkluderer jorde af pH under 6,0, da disse ikke kan regnes for egentlige lucernejorde, og hvor vilkårene for overlevnen af *R. meliloti* i almindelighed må anses for ugunstige.

Omtrent to trediedele af jordene rummer *R.*

Tabel 3. Tæthed af *R. meliloti* i jord hvor lucerne tidligere er dyrket

Lokalitet og tællingsår	År		Tæthed
	siden	pH	
Næsgaard, Falster (1948).....	10	8,5	ca. 50
Nordsjælland (1948).....	10	6,1	0
Aarslev forsøgsstation (1949) .	10	6,3	500
Aakirkeby forsøgsareal (1949)	10	6,4	<10
Albertslund, Glostrup (1950) .	11	6,6	>5.000
Hornum forsøgsstation (1966)	11	6,0	>10
Blangstedgaard (1966).....	11	7,5	20
Tystofte forsøgsstation (1949)	15	7,6	0
Nordsjælland (1950).....	15	7,5	<10
Tylstrup forsøgsstation (1965)	16	6,0	0
Abed forsøgsareal (1966).....	18	7,8	500
Stevns (1950).....	20	6,5	<10
Vestlolland (1965).....	20	7,9	<1.000
Østlolland (1965).....	20	7,7	100
Borris forsøgsstation (1949) .	25	6,8	<10
St. Pl. Lab., Lyngby (1948)...	>25	7,5	0
Plantepatol. Fors., Lyngby (1965).....	>30	6,3	0
Virumgaard, gødningsfors. ugødet (1948).....	>38	6,2	10
Virumgaard, 4 kunstg. parceller (1948).....	38	6,0-6,4	0 (4 ×)
Virumgaard, staldg. parcel (1948).....	38	6,2	ca. 50
Blangstedgaard (1966).....	ca. 50	7,5	100
Spangsbjerg forsøgsstation (1967).....	ca. 50	6,2	0
Spangsbjerg forsøgsstation (1967).....	ca. 50	6,6	0
Landbohøjskolens forevisningsmark (1948).....	>50	6,6	500
Landbohøjskolens forevisningsmark (1948).....	>50	6,7	0

*meliloti*, uden tydelig sammenhæng med jordens reaktion (pH 6,0-8,5) eller tidsrummet siden sidste lucerneafgrøde; tætheden er dog forholdsvis ringe på en eller to undtagelser nær. Til disse jorde slutter sig 17 andre, hvor lucerne angives »aldrig« at have været dyrket. Resultaterne fordeler sig således:

Tæthed	Antal pH-interval	
0.....	7	6,0-7,3
10.....	5	6,5-6,9
10-100.....	2	6,7-8,2
500.....	1	8,3
25.000.....	1	8,4
40.000 (usikker)....	1	7,2
	17	6,0-8,4

Her er igen ca. 2/3 positive. Af de to jordprøver med påfaldende høj tæthed hidrørte den første fra et aldrig dyrket areal nær Abed planteavlsstation; det ligger nær at tænke på vildtvoksende sneglebæg som naturlig kilde til *R. meliloti*. Den anden med måske endnu højere tæthed stammede fra landbohøjskolens forsøgs-gård Albertslund (ligesom nr. 5 i tabel 3), hvor der synes at være særlig gunstige betingelser for rhizobiernes overlevnen, uden at man dog nærmere kan præcisere disse.

Møller Nielsens (1947) data rummer tilsvarende iagttagelser. Her fandt man i 91 jorde af pH 6,0 til 8,0; I 23 jorde 10 til 24 år efter sidste lucerneafgrøde 20 positive (87 pct.). I 68 jorde hvor lucerne ikke før var dyrket, 39 positive (57 pct.). Det bemærkedes her, at sortsandede jorde uanset deres pH-niveau syntes særlig ugunstige for overlevnen af *R. meliloti*.

Den her fundne variation i lucerne-rhizobiernes tæthed fra sporadisk til over 100.000 (i en lucerne-jord fra Rønhave forsøgsstation fandtes 200.000 (+) svarende til hvad Hely & Brockwell (1962) med en lignende metode har fundet i Australien. I 26 jordprøver taget nær vildtvoksende *Medicago*-arter taltes 11 til 2 mill. *R. meliloti* pr. gram, oftest 10.000 til 160.000, med lucerne som indikatorplante, medens den mere selektive *Medicago laciniata* viste langt mindre tal og ikke sjældent helt negative resultater.

### Kløver-knoldbakteriernes (*R. trifolii*) udbredelse og tæthed

Som det ses af tabel 4 viser *R. trifolii* i sammenligning med *R. meliloti* et langt mindre kompliceret billede, idet de kun mangler i 9 jorde, eller godt 4 pct. af samtlige; 7 af disse var udyrkede jorde (6 skovjorde og en hedelignende sandjord), desuden 2 prøver fra ukalkede parceller i et gammelt kalkforsøg ved Virumgaard, af en for agerjord ekstrem surhedsgrad (pH 4,3-4,4). Positiv forekomst ved lavest pH (4,3) fandtes i ukalket parcel fra et kalkforsøg ved Lundgaard (nedlagt som forsøg 1937, men parcellerne bevarede). Tætheden var her kun sporadisk, hvad der ellers er en sjælden foreteelse ligesom i det hele taget tætheder under 100. Derimod fandtes tætheder på 100.000 (+) i 60 eller 61 af samtlige prøver, og lægger man hertil prøverne mellem 50.000 og 100.000, når man næsten halvdelen af alle de undersøgte jorde. Ligesom tilfældet var med *R. meliloti* samler de høje værdier sig overvejende (dog ikke udelukkende) i de to højeste pH-grupper, men forekomsten som sådan strækker sig stort set en pH-enhed længere nedad (sml. tabel 1); ikke mindre end 13 af de 17 jorde af pH 5,4-5,0 indeholder *R. trifolii*, ofte i anselig tæthed, og endnu ved pH mellem pH 4,9 og 4,0 (4,4) er den jævnlig repræsenteret, omend sparsomt. pH-intervallet 4,9-4,5 synes at spille omtrent den samme kritiske rolle som 5,9-5,5 for *R. meliloti*. I overensstemmelse hermed fandt *Mulder & van Veen* (1960) i karforsøg, at *R. trifolii* kun formerede sig dårligt i kløverplanternes rhizosfære ved pH 5,0,

medens der efter kalkning begyndte en langsom stigning. I markforsøg i Wales fandt *Jones* (1966) endog *R. trifolii* ved pH 3,5, omend sparsomt (<100/g, stigende til 180.000 ved pH 5,7).

Tabel 5. Tæthed af *R. trifolii* i jord hvor kløver ikke er dyrket i længere tid

Lokalitet og tællingsår	År		Tæthed
	siden kløver	pH	
Aarslev forsøgsstation (1949) . . . . .	10	6,4	100.000
Blangstedgaard (1949) . . . . .	10	6,4	5.000
Borris forsøgsstation (1949) . . . . .	10	5,7	5.000
Nordsjælland (1948) . . . . .	10(+)	6,1	5.000
Tystofte forsøgsstation (1949) . . . . .	15	7,6	500
Næsgaard, Falster (1949) . . . . .	13(+)	7,5	100.000
Tylstrup forsøgsstation (1965) . . . . .	16	6,0	400
Blangstedgaard (1966) . . . . .	16	7,5	50.000
Borris forsøgsstation (1949) . . . . .	25	6,8	50.000
St. Pl. Lab., Lyngby (H 1948) . . . . .	25(+)	7,9	500
St. plantepatol. Fors. (H 1949) . . . . .	30	7,2	<10
St. plantepatol. Fors. (H 1952) . . . . .	30	7,0	25.000
St. plantepatol. Fors. (H 1952) . . . . .	30(+)	6,7	50
St. Pl. Lab., Lyngby (H 1965) ca.40 . . . . .		7,2	50
Virumgaard (1948) . . . . .	33(+)	6,7	50.000
Sydøstjylland (1949) . . . . . ukendt		6,4	5.000
Abed, udyrket areal (1949) . . . . . »		8,4	25.000
Ødum forsøgsstation (1949) . . . . . »		7,3	25.000
Godthaab, Skanderborg (1949) . . . . . »		7,1	100.000
Spangsbjerg fors. (1966) . . . . . (50?)		6,2	500
» » » . . . . . »		6,6	25.000

H: havejord, ikke erhvervsmæssigt dyrket.

Ukendt: alm. betegnelser (»ikke i mange år«, »ikke i mands minde«, »så vidt vides aldrig«, o. lign.).

Tabel 4. Tæthed af *R. trifolii* i 214 jorde af pH(H<sub>2</sub>O) 8,5 til 4,0

Tætheds-gruppe	pH-interval					Ialt
	8,5-7,0	6,9-6,0	5,9-5,5	5,4-5,0	4,9-4,0	
100.000 +	24 (+1)	32	4	0	0	60 (+1)
50.000 +	14	21	4	1	0	40
10.000 +	9	8 (+3)	5	2	0	24 (+3)
1.000 +	13	20 (+1)	6	8	2	49 (+1)
100 +	3	7 (+1)	3	2	1	16 (+1)
10 +	2	1	0	1	3 (+1)	7 (+1)
1 +	1	0	0	0	1	2
0	0	0	0	3	6	9
Ialt . . . . .	66 (+1)	89 (+5)	22	17	13 (+1)	207 (+7)
	= 67	= 94	—	—	= 14	= 214

Arealbenyttelsen synes ikke at spille så stor en rolle som for *R. meliloti*. Af de 60 (61 ?) jorde med stætheder på 100.000 (+) stammede kun de 16 fra bestående kløvermarker. Marskjordene var som venteligt særdeles rige på *R. trifolii* uanset den stående afgrøde. Ingen af dem var kløvermarker i prøveudtagningsåret, men 6 af dem havde tætheder over 100.000, den syvende (mislykket lucernemark ved Højer, pH 5,7) dog kun 5.000.

Ligesom for lucerne kunne der i flere tilfælde fås oplysning om jorde, hvor kløver ikke var dyrket i længere tid. I tabel 5 findes en oversigt, som viser konstant forekomst af *R. trifolii* indtil et halvt århundrede efter sidste kløverafgrøde, i tætheder væsentlig højere end *R. meliloti* (sml. tabel 3), uden nogen kendelig sammenhæng med længden af den »kløverfrie« mellemtid.

#### Lucerne- og kløverrhizobiers følsomhed overfor jordreaktionen

Som ovenfor nævnt synes pH-niveauerne 5,9-5,5 og 4,9-4,5 at være kritiske for henholdsvis *R. meliloti* og *R. trifolii* i jorden. Dette kan direkte skyldes forskellig følsomhed af de to bakteriearter overfor brintionkoncentrationen, men kan også bero på, at lucerne og sneglebæg oftere dyrkes (eller findes vildtvoksende) på jorde med højere reaktionstal end kløverarterne, dvs. rhizobiernes forekomst kan tildels skyldes en rhizosfære-effekt.

Til nærmere oplysning herom anstilledes nogle opbevaringsforsøg under laboratorieforhold med jord af forskellig surhedsgrad og tilsat en rigelig flora af begge bakteriearter. Hertil anvendtes prøver af sandjord fra Lundgaard, hvor der i marken var tilført kalk svarende til 4-8-16-32 tons  $\text{CaCO}_3$  pr. ha; til den sidste sattes i laboratoriet extra 0,2 pct. calciumcarbonat. Jordene fugtedes med destilleret vand til ca. 2/3 vandkapacitet samt suspension af lige dele ungt celledmateriale (fra agar-kultur) af *R. meliloti* og *R. trifolii*. Portioner på ca. et kg jord opbevarede i store glasflasker med løstsiddende låg ved stuetemperatur under bibeholdelse af et vandindhold på 9-10 pct., og ved forsøgets indledning samt efter ca. 4, 11 og 23 ugers forløb bestemtes tætheden af de to rhizobium-arter.

Tabel 6. Levetid af *R. meliloti* og *R. trifolii* i jord af forskellig reaktion

Jord	Forsøgstid dage	pH	Tæthed af	
			<i>R. meliloti</i>	<i>R. trifolii</i>
A)	0	4,8	100.000+	100.000+
	27	5,0	10	5.000
	76	4,3	0	10+
	159	4,1	0	0
B)	27	4,9	400+	100.000+
	76	5,0	ca. 25	4.000
	159	4,8	0	0
C)	27	5,5	100.000+	100.000+
	76	5,7	5.000	75.000
	159	5,2	ca. 25	5.000
D)	27	5,9	50.000	50.000
	76	6,0	100.000	100.000
	159	6,3	(100.000)*	30.000
E)	0	7,7	100.000+	100.000+
	(+ $\text{CaCO}_3$ ) 159	7,5	(100.000)*	50.000+

\*) Tællingerne usikre.

Resultaterne i tabel 6 viser, at begge arters tæthed falder meget hurtigt i den sureste jord (A, pH 4,8-4,1), hvor *R. meliloti* er næsten uddød efter 27 og helt efter 76 dage, men *R. trifolii* først efter 159 dage. I jord B, af pH 5,0-4,8, sker det samme, men igen hurtigst med *R. meliloti*. I jord C falder pH ikke under 5,2, og begge arter er i live efter 159 dage, *R. meliloti* dog meget fåtallig. I den svagt sure jord D af pH 6,3-5,9 forbliver begge arter levende i betydelige antal ligesom i kontroljorden E af pH 7,5-7,7. Forskellen mellem de to rhizobium-arters forhold overfor jordreaktionen kommer her til udtryk ligesom i tabel 1 og 4.

Den anvendte jord giver muligvis et noget outreret billede, da den hører til den jordtype (»mørk sandjord«) som iflg. Møller Nielsen (1947) er ugunstig for *R. meliloti*. Resultaterne stammer dog stort set overens med udenlandske forsøg. Således fandt Vincent & Waters (1954), at *R. trifolii* ved dyrkning i steriliseret jord hurtigt uddøde ved pH 4,5-4,8 men formerede sig langsomt ved pH 5,2 og meget hurtigere ved pH 5,7. Mulder & van Veen (1960) fandt under forsøgsbetingelser svarende til tabel 5 en meget hurtig nedgang i tæ-

hed af *R. trifolii* i stærkt sur men mindre udpræget i svagt alkalisk jord:

<i>R. trifolii</i> pr. 0,2 g jord ved	pH 5,0	pH 7,5
Efter 1 dag.....	$2,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
» 15 dage.....	$2,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
» 64 dage.....	$3,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$

I markforsøg viste Vincent (1958), at *R. meliloti* gik til grunde efter et år i jord af pH 5,3-5,7, men formerede sig indtil 100.000 pr. g når pH hævedes til 6,8.

#### Vækst af *R. meliloti* og *R. trifolii* ved forskellig pH i kunstigt substrat

Som et supplement til de forudgående undersøgelser og iagttagelser anstilledes dyrkningsforsøg med nogle stammer af begge arter til oplysning om deres pH-følsomhed i renkultur. Det anvendte substrat havde følgende sammensætning: Glucose 1,0 pct., asparagin 0,1 pct.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  0,08 pct.,  $\text{KH}_2\text{PHO}_4$  0,02 pct.,  $\text{MgSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  0,02 pct.,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  50 p.p.m.,  $\text{FeCl}_3$  10 p.p.m.,

$\text{MaSO}_4$ ,  $4\text{H}_2\text{O}$  1,0 p.p.m., alt i demineraliseret vand, desuden en vækststofblanding af biotin (0,1 p.p.m.), thiamin, pyridoxin, nicotinsyre og Ca-pantothenat (hver 1,0 p.p.m.). Grundsubstratet indstilledes med svovlsyre og natriumhydroxid til 6 pH-værdier mellem 7,5 og 4,0, og efter autoklavering tilsattes glucose og vitaminblanding fra sterilfiltrerede stamopløsninger. Substratet anvendtes for hver pH-værdi i duplikatportioner af 80 ml i 300-ml koniske kolber, der podedes med 2 dråber celsesuspension (adjusteret til samme tæthed) fra 2 døgn gamle agarkulturer. Efter dyrkning 2 til 4 døgn (undertiden længere) ved 25-27°C under kontinuerlig rystning måltet vækstgraden som optisk tæthed (O.D.) ved  $\lambda = 600 \text{ m}\mu$ , med sterilt substrat som blindværdi. Substratets sammensætning og dyrkningsbetingelserne skulle sikre nogenlunde optimal væksthastighed af begge bakteriearter.

Tabel 7 viser resultaterne med 8 stammer af *R. meliloti*, der vokser praktisk talt lige godt fra pH 7,4 til 6,5, men væksten er kendelig nedsat ved pH

Tabel 7. Vækst af *R. meliloti* ved varierende pH

Stamme nr.	Væksttid dage	Optisk tæthed (O.D.) ved pH -					
		7,4	7,0	6,4-6,5	5,9-6,0	5,4-5,6	5,0-5,1
L. 5	2	0,92	0,93	0,85	0,34	0	0
	4	1,05	1,05	1,07	0,99	0,03	0
H.S. 8	2	0,92	0,94	0,90	0,12	—	0
	3	1,02	1,05	1,05	0,84	0,03	0
St. 105	2	1,15	1,16	1,10	0,34	0,01	0
	4	1,31	1,25	1,24	0,56	0,01	0
L. 40	2	0,78	0,80	0,71	0,11	0	0
	4	1,07	1,16	1,12	0,72	0	0
L. 115	2	0,94	0,82	0,86	0,26	—	—
	3	1,35	1,05	1,19	0,63	0	0
L. 116	2	1,20	1,25	1,14	0,54	0	—
	3	1,52	1,54	1,50	1,19	0,01	0
L.Aa. 3 )	2	0,53	0,39	0,27	0,09	0,01	0
	4	1,41	1,38	1,40	1,08	0,03	0
L.G.b. 1 )	2	1,43	1,23	0,96	0,31	—	—
	4	1,45	1,40	1,06	0,75	0,01	0

\*) Semi-effektiv stamme.

\*\*) Ineffektiv stamme.



ca. 6 for derefter at falde til et minimum ved pH ca. 5,5 og næppe synlig ved pH ca. 5,0.

Hos flere stammer ledsagedes kraftig vækst af en stærk pH-sænkning i det forholdsvis stødpudefattige substrat. Dette gjaldt særlig for den ineffektive stamme L.G.b-1 og den effektive St. 105 (fra stenkløver), medens flere andre kun ændrede reaktionen i ringe grad. Nogle eksempler viser dette:

Stamme	pH efter dage -			
	0	2	3	4
L.G.b-1	7,4	4,2	4,2	—
	7,0	4,3	4,2	—
St. 105	7,4	6,7	5,0	4,6
	7,0	6,5	4,4	4,4
H.S. 8	7,4	7,1	6,8	7,0
L. 5	7,4	7,0	6,7	7,0
L. 40	7,4	7,2	6,8	6,7
	7,0	7,0	6,7	6,3

Hos de stærkt syreproducerende stammer vedbliver det glycolytiske enzymkomplex åbenbart at fungere ved pH-værdier under grænsen for cellevækst og formering. En interessant analogi hertil viser et ganske nyt arbejde af Munn (1968): i vandkulturer af lucerne kunne *R. meliloti* danne rodknolde ved pH 5,5 med stærkt aftagende antal ved pH 5,1-4,7 og næsten ingen ved pH 4,5-4,4. Der syntes ikke at ske nogen egentlig formering

men en udpræget koncentration af rhizobierne på lucernerøddernes overflade.

I tabel 8 ses de tilsvarende resultater for 6 stammer af *R. trifolii*: 4 danske isolater samt en fra Rothamsted Experimental Station (»Agdell«) og en fra Instituut voor Bodemvruchtbaarheid, Groningen (»K. 8«). Resultaterne for pH 7,4 og 7,0 er ikke anførte, da væksten her konstant var optimal. Ved pH omkr. 5,0 viser alle stammer noget retarderet vækst, i et par tilfælde antydning af et dobbelt optimum, men fuldstændig væksthæmning indtræder først ved pH ca. 4,5 og for nogle stammers vedkommende endnu lavere, således, at vækstens pH-interval strækker sig ca. 1-1,5 enhed længere ned end hos *R. meliloti* (sml. Lonergan & Dowling (1950): skarp vækstgrænse for *R. trifolii* ved pH 4,5). Også i disse kulturer skete der en pH-sænkning, dog ret forskellig hos de forskellige stammer og mest ved de højere pH-værdier, medens udgangs-pH 5,0 og derunder kun faldt til pH 4,7-4,9. Stærkest syredannende var stammerne Vir.-c og PF-2b, der sænkede udgangs-pH 5,5-5,0 til pH 4,2-4,4 efter 3 dage (men ikke bevirkede nogen sænkning af udgangs-pH 4,8-4,6 trods kraftig vækst). Hos *R. trifolii* modsat *R. meliloti* synes altså pH-grænserne for vækst og syredannelse (glycolyse) at være omtrent de samme.

Tabel 8. Vækst af *R. trifolii* ved varierende pH

Stamme nr.	Væksttid dage	Optisk tæthed (O.D.) ved pH -						
		6,6-6,5	6,0-5,9	5,6-5,5	5,1-5,0	4,8-4,7	4,6-4,4	4,2
Borris a)	2	1,20	1,02	0,89	0,53	0,11	0	—
	3	1,38	1,29	0,99	1,23	1,01	0	—
Ødum a)	2	1,22	1,10	1,02	0,88	0,11	0	—
	3	1,37	1,38	1,23	1,20	1,07	0	—
Vir. c)	2	1,26	1,18	0,86	0,86	0,58	0	—
	3	1,43	1,43	0,84	1,22	1,33	0	—
	6	—	—	—	—	—	1,03	0
PF-2b	2	1,29	1,08	0,71	0,64	0,61	0,07	0
	3	1,53	1,37	0,95	1,40	1,46	0,88	0
Agdell	3	1,05	1,02	0,99	0,23	—	—	—
	5	1,25	1,17	1,16	1,05	1,20	1,07	0
K. 8	3	1,05	1,05	0,97	1,09	0,84	0,88	0

## Øversigt og konklusioner

Undersøgelserne viser, at lucernens (og andre *Medicago*-arter) rodknoldbakterier (*Rhizobium meliloti*) er i og for sig kvalitativt ret udbredte, idet de fandtes i 61 pct. af samtlige undersøgte jorde og i 70 pct. jorde af pH ( $H_2O$ ) 6,0 og derover. Kvantitativt var tætheden (minimumstal af bakterier pr. gram jord) størst ved pH-intervallet 8,5-6,0 og især i bestående lucernemarkers; kun under disse forhold fandt man den højeste tæthedsgruppe: 100.000 eller derover, der kun udgjorde 4-5 pct. af samtlige tællinger. Kun ca. en trediedel af jordene af pH <6,0 indeholdt *R. meliloti* og her næppe i tætheder over 1000/g. pH-intervallet 5,9-5,5 synes at være en kritisk zone, omend der sås en sporadisk forekomst ved pH 4,8. Kvantitativt er forekomsten således stærkt bundet til jordreaktionen men måske især til arealbenyttelsen — hvilke to faktorer tildels falder sammen, for så vidt som lucerne fortrinsvis dyrkes på jord med reaktionstal på 7 eller derover. Rhizosfærevirkningen, den intensive vækst af bakterier i planterøddernes umiddelbare nærhed og deriblandt rhizobier hos bælgplanterne, er utvivlsomt den faktor der betinger den tætteste flora af *R. meliloti*. På den anden side findes *R. meliloti* ofte, omend i mere beskedne antal, i jord hvor der i mange år eller slet ikke har været dyrket lucerne (eller sneglebælg). Under sådanne betingelser må *R. meliloti* forudsættes at leve (1) som ren jordbundssaprophyt i konkurrence med den øvrige jordbundsmikroflora og udsat for antagonistiske virkninger, (2) som lejlighedsvis rodknoldsymbiont hos vildtvoksende sneglebælg- eller stenkloverplanter eller endelig (3) som rhizosfærebeboer hos ikke-bælgplanter. På denne sidste mulighed tyder undersøgelser af Robinson (1967) i Australien (*R. trifolii* vides med sikkerhed at kunne formere sig i græsplanters rhizosfære (Rovira 1961).

Nogen righoldig flora af *R. meliloti* kan man dog ikke vente at finde under sådanne forhold, og med mindre man har grund hertil, f. ex. gennem erfaringer med lucernens trivsel på lokale arealer, må podning af lucernefrø fortsat anbefales for at sikre en betydelig tæthed af *R. meliloti* i de unge planters rhizosfære, hvilket ifl. Munns (1968) net-

op synes at være en forudsætning for rigelig rodknolddannelse. I denne forbindelse er det et moment af nogen vigtighed, at lucernemarkers idag sjældent bliver mere end 2 eller højst 3 år gamle og således i et givet tidsrum kommer til at cirkulere over et større areal end tidligere. Fortsat lucernedyrkning efter denne praksis skulle automatisk forstærke rhizosfære-effekten (selv uden podning af frøet) og således skabe en rigeligere *R. meliloti*-flora i jordområder egnede for lucerneafgrøder.

For kløver-rhizobiernes vedkommende er forholdene radikalt forskellige: *R. trifolii* må betragtes som universelt forekommende i normale danske agerjorde og måske også havejorde. Tætheden er gennemgående langt rigeligere end af *R. meliloti* og dertil mindre afhængig af jordreaktionen (det kritiske niveau synes at være pH 5,0-4,5 eller omtrent en pH-enhed lavere end for *R. meliloti*). Endelig synes *R. trifolii* langt mindre knyttet til arealbenyttelsen: de 60 jorde i tæthedsgruppen 100.000 (+) indbefattede kun 16 fra bestående kløvermarkers.

Grunden til de to *Rhizobium*-arters helt forskellige udbredelse ligger klart for dagen. For det første er det kløverbærende areal af en ganske anden størrelsesorden end lucerne-arealet; alene græsmarkers i omdriften udgør næsten 20 pct. af landbrugsarealet og har i henvend hundrede år været et normalt led i sædskiftet med 7-8 års mellemrum og tilsvarende stærk rhizosfæreeffekt, især fordi *R. trifolii* kan trives ved betydelig surere jordreaktion end *R. meliloti*. For det andet er den mindst lige så levedygtig som denne gennem lange tidsrum, hvor dens normale værtplanter ikke bliver dyrket. Da der ydermere kun undtagelsesvis synes at forekomme stammer af *R. trifolii* uden kvælstof bindende effektivitet i danske jorde (modsat visse egne i Storbritannien (Holding & King 1963)), bliver det ret indlysende, hvorfor podningsforsøg med kløver hos os hverken har givet eller kan ventes at give positive resultater.

## Summary

### *The distribution of lucerne and clover rhizobia in agricultural soils in Denmark*

Approximate numbers of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii* in 214 soils samples from various parts of Denmark were estimated by dilution tests on seedlings in agar culture. The samples had a pH-range from 8.5 to 4.0 and represented mostly agricultural soils.

*R. meliloti* was found in 61 pct. of all samples and in 70 pct. of those of pH 6.0 and above. High densities of *R. meliloti* (100.000/g or above) accounted for only 4-5 pct. of the total and were confined to existing lucerne fields of pH above 6.0. Below this value the occurrence was often sporadic only and did not seem to exceed densities of 1000/g. Nevertheless *R. meliloti* could be detected in numerous soils that had not carried a lucerne crop for ten to about fifty years, although the density was mostly low. When introduced in soil of varying degrees of acidity in laboratory experiments, *R. meliloti* perished rapidly at pH 4.8-5.0, more slowly at pH 5.2-5.7, but survived for 22 weeks in considerable numbers at pH 5.9-6.3. The pH-interval from 6.0 to 5.5 thus seems critical for its existence in soil, at least in the absence of a host plant.

*R. trifolii* was almost ubiquitous in cultivated soils, being absent only in some forest and heath soils and two extremely acid field soils (pH 4.3-4.4). Densities of 100.000/g were found in 27 pct. of the samples, and only a minor fraction of these came from actual clover fields. Like *R. meliloti* it could be recovered from soils not carrying a clover crop for up to half a century, but often in much higher densities. *R. trifolii* was not infrequently found in soils of pH 4.9-4.5, although in small numbers only. This pH-range, which is about one pH-unit lower than for *R. meliloti*, thus seems critical for its existence in soil.

In-vitro tests with 8 strains of *R. meliloti* and 6 of *R. trifolii* under favourable conditions showed that the former species ceased growth between pH 6.0 and 5.5 and the latter at pH approx. 4.5, in conformity with their behaviour in soil. A few strains of *R. meliloti* continued to produce acid from glucose at pH-levels where growth no longer took place.

The limited prevalence and density of *R. meliloti* compared to *R. trifolii* is assumed to be due to the fact that clovers have been grown in short-time leys of routine crop rotations for nearly a century, thus enriching the soils with *R. trifolii* through their rhizosphere effect. Lucerne areas on the other hand have been and still are comparatively small (other medics are of little importance), mostly confined to soils of a

narrower (and higher) pH-range and causing a less pronounced rhizosphere-effect.

## Litteraturhenvisninger

Brockwell, J. (1963). - Accuracy of a plant-infection technique for counting populations of *Rhizobium trifolii*. - Appl. Microbiol., v. 11: 377-383.

Christensen, H. R. (1914). - Forsøg og undersøgelser vedrørende forskellige podningsmidler til bælglplanter. - Tidsskr. Planteavl, v. 21: 97-131.

Christensen, H. R. (1924). - Undersøgelser over forholdet mellem udviklingen af Humle-Sneglebælg og jordens reaktionstilstand. - Tidsskr. Planteavl, v. 30: 265-297.

Hely, F. W. & Brockwell, J. (1962). - An exploratory study of the ecology of *Rhizobium meliloti* in inland New South Wales and Queensland. - Aust. J. Agr. Res., v. 13: 864-879.

Holding, A. J., & King, J. (1963). - The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. - Plant and Soil, v. 18: 191-198.

Jensen, H. L. (1955). - En lucerne-ineffektiv stamme af *Rhizobium meliloti*. - Tidsskr. Planteavl, v. 59: 553-570.

Jones, D. G. (1966). - The contribution of white clover to a mixed upland sward. - Plant and Soil, v. 24: 250-260.

Krasilnikov, N. A., & Koreniako, A. I. (1940). - Om en metode til kvantitativ tælling af knoldebakterier i jorden (Russisk). - Mikrobiologiya, v. 9: 27-31.

Loneragan, J. F., & Dowling, E. J. (1958). - The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of subterranean clover. - Aust. J. Agr. Res., v. 9: 464-472.

Mulder, E. G., & van Veen, W. L. (1960). - Effect of pH and organic compounds on nitrogen fixation by red clover. - Plant and Soil, v. 13: 91-113.

Munns, D. N. (1968). - Nodulation in *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid-sensitive steps. - Plant and Soil, v. 28: 129-146.

Møller Nielsen, H. (1947). - Lucernen. Beretning om systematiske undersøgelser af lucernemarker i Jylland 1943-45. - Udg. af Foreningen af jydsk Landboforeningers Græsmarkssektion. 126 pp.

Peterson, H. B., & Gooding, T. H. (1941). - The geographic distribution of *Azotobacter* and *Rhizobium meliloti* in Nebraska soils in relation to certain environmental factors. - Nebraska Agr. Exp. Station Res. Bull. No. 121 (24 pp.).

- Pohlmann, G. G.* (1931). - Method of counting the number of legume bacteria in the soil. - *J. Amer. Soc. Agron.*, v. 23: 70-77.
- Robinson, A. R.* (1967). - The influence of host on soil and rhizosphere populations of clover and lucerne bacteria in the field. *J. Aust. Inst. Agr. Sci.*, v. 33: 207-209.
- Rovira, A. D.* (1961). - Rhizobium numbers in the rhizosphere of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. - *Aust. J. Agr. Res.*, v. 12: 77-83.
- Thompson, J. A., & Vincent, J. M.* (1967). - Methods of detection and estimation of rhizobia in soil. - *Plant and Soil*, v. 26: 72-84.
- Vincent, J. M., & Waters, L. M.* (1954). - The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore District, New South Wales. II. Survival and success of inoculation in laboratory trials. - *Aust. J. Agr. Res.*, v. 5: 77-89.
- Vincent, J. M.* (1958). - Survival of the root nodule bacteria. (*Nutrition of the Legumes*, pp. 108-123). - Butterworth's Scientific Publications. London.
- Visona, L., & Tardieux, P.* (1964). - Antagonistes des *Rhizobium* dans la rhizosphère du trèfle et de la luzerne. - *Ann. Inst. Pasteur*, v. 107: 297-302.
- Wieringa, K. T.* (1963). - Organismes isolés du sol des Apennins producteurs d'antibiotiques envers diverses souches de *Rhizobium*. - *Ann. Inst. Pasteur*, v. 105: 417-425.
- Wilson, J. K.* (1926). - Legume bacteria population of the soil. - *J. Amer. Soc. Agron.*, v. 18: 911-919.