

Om forekomst af kløverbakterier i nogle udvalgte danske landbrugsjorde

Distribution of clover rhizobia (Rhizobium trifolii) in some selected agricultural soils in Denmark

T. Vincents Nissen

Resumé

Kløverbakteriernes forekomst (tæthed) i nogle udvalgte danske landbrugsjorde er i 1978–79 undersøgt i relation til gødskning, forfrugt og brugen af 3 herbicider. Endvidere undersøgt forekomsten i nogle prøver fra arealet nær befærdet hovedvej (jord med stort indhold af tungmetaller). I alt undersøgt forekomsten af *Rhizobium trifolii* i 42 jordprøver fra 31 lokaliteter. I to jorde, hvor der i en lang årrække (40 år) ikke havde været dyrket bælgplanter af kløvergruppen, fandtes en lav tæthed af kløverbakterier. Der fandtes ingen effekt af gødskning, forfrugt eller herbicider. For nærværende ses der næppe at være grund til at pøde kløverfrø med rodknoldbakterier i Danmark, men langvarig monokulturpraksis kan antagelig med tiden gøre podning nødvendig.

Nøgleord: *Rhizobium trifolii*, kløverbakterier, kvælstofbinding.

Summary

Approximate amounts of *Rhizobium trifolii* in 42 soil samples from 31 agricultural soils in Denmark were estimated by dilution tests on seedlings in agar culture. The samples represented different kinds and amounts of artificial and natural fertilization methods, treatments with three herbicides and soils exposed to pollution by heavy metals (near a highway). In two plots where there had been no clover crop for 40 years, only small amounts of *Rhizobium trifolii* were present. In all other samples examined, the clover bacteria were present in reasonable amounts. It is concluded that, at the present time, there is no need to inoculate clover seeds with *rhizobia* in Denmark. But the continuous use of monocultures may, in future, render seed inoculation necessary.

Key words: *Rhizobium trifolii*, clover bacteria, nitrogen-fixation.

Indledning

Ved en undersøgelse af kløver-rodknoldbakteriernes forekomst og tæthed i danske landbrugsjorde fandt Jensen (1969), at disse bakterier næsten var universelt udbredte. Kun i 9 af 214 undersøgte jordprøver, nemlig fra 7 udyrkede og 2 ekstremt sure lokaliteter, manglede *Rhizobium*

trifolii. Der fandtes også kløverbakterier i jorde, hvor der havde været en lang kløverfri dyrkningsperiode.

Årsagen til den almindelige udbredelse af kløverbakterien i dansk landbrugsjord antoges dels at være brug af sædskifte, dels bakteriernes evne

til at overleve i let sur jord. Endelig var anvendelsen af herbicider ikke så stor i undersøgelsestiden (1948–1953 og 1965–1967).

Som følge af ændret landbrugspraksis (ensidig korndyrkning, højere niveau af kvælstofgødskning og udstrakt brug af herbicider) i den forløbne tid siden 1967 besluttedes det ved Bakteriologisk afdeling, Statens Planteavls-Laboratorium, Lyngby, i 1978 at følge de tidligere studier op – ved en begrænset og dermed hurtigere undersøgelse. Der blev i 1978 og 1979 i alt undersøgt 42 jordprøver fra 31 udvalgte lokaliteter, repræsenterende den nævnte ændrede landbrugspraksis. I 1978 undersøgtes prøver fra jorde med forskellig gødskning, hvor der, for en del af disse, ikke i en årrække havde været dyrket kløver. I 1979 undersøgtes prøver fra pesticidbehandlet og tungmetalbelastet agerjord.

De undersøgte jordprøver blev udtaget dels ved Jyndevad og Askov forsøgsstationer, dels ved samarbejde med Landsudvalget for Planteavl, Viby J., Statens Ukrudtsforsøg, Flakkebjerg, og Centralanalytisk Laboratorium, Vejle. Endvidere blev der udtaget prøver fra mark og have ved Statens Planteavls-Laboratorium, Lyngby, samt i en privat have ved Gl. Holte. Man medtog også prøver fra landbrugsjord nær en stærkt befærdet jydsk hovedvej for at iagttage en eventuel effekt af forurening med tungmetaller.

Parcellernes dyrkningsmæssige forhold og forfrugt og jordprøvernes pH fremgår af tabel 1–2.

Undersøgelsens gennemførelse

Ved undersøgelsen er anvendt sterilt opformerede rødkløverplanter. Disse dyrkes på et agarsubstrat, der er kvælstoffrit og har følgende sammensætning: K_2HPO_4 0,05 pct., $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 pct., $NaCl$ 0,02 pct., $FePO_4$ 0,10 pct., $Ca_3(PO_4)_2$ 0,2 pct., $FeCl_3$ 0,002 pct., agar 0,75 pct. i ledningsvand (efter Jensen 1969).

Planterne dyrkes i Pyrex-rørglas ($20 \times 2,2$ cm) med 25 ml agarsubstrat i hvert og med vatlukke. Over den steriliserede, til stivning afkølede, agar hældes 17 g udvasket, sterilt, groft sand. Ved henstand trænger fugten op i sandet, eller der

tilsættes en ringe mængde sterilt vand til passende fugtighed.

Rødkløverfrøene steriliseres først i 96 pct. alkohol (1 minut), derpå i 0,02 pct. merkurichlorid (2 minutter) og efterskylles 10 gange med sterilt vand. 5 frø anbringes ved kanten af glassene og dækkes med lidt af sandet. Når kimbladene er vel udviklede, og rødderne er trængt ned i agaren, udtynes til 2 planter i hvert glas, sædvanlig efter 6–10 dages forløb.

Jordprøverne er udtaget efter den for prøver til kemisk jordbundsundersøgelse anvendte forskrift, i dybden 0–20 cm.

Af den frisk hjemførte jordprøve afvejes, efter blanding og evt. knusning med ske, 3 g jord, som derpå rystes i 300 ml sterilt ledningsvand i 10 minutter. Denne suspension (1:100) fortyndes 5 gange ved at føre 2 ml suspension til 8 ml sterilt vand, hvorpå der rystes i 5 minutter. Denne fortynding gentages så mange gange, som man ønsker fortyndinger.

Planteglassene podes hvert med 1 ml jordfortynding; 4 glas for hver fortynding. De henstilles – sammen med upodede kontrolglas – i drivhus ved 18–20°C og beskyttes mod for stærkt solskin.

I mindst 6 uger foretages ugentlig aflæsning for knolddannelse. Aflæsningen sker med lup, og de positive og negative led noteres i skemaer.

Ved beregning af rodknoldbakteriernes tæthed er anvendt Brockwells metode (Vincent, 1970). Ved hjælp af de angivne MPN-tabeller (MPN: Most Probable Number) er sandsynligste laveste værdi for tæthed pr. g frisk jord opført i tabel 1 og 2.

Ved undersøgelsens gennemførelse har man i øvrigt bestræbt sig på, at de tekniske enkeltheder har ligget så nær den af Jensen (1969) udførte, hvorved grundlaget for sammenligning med dennes resultater er tilvejebragt.

Resultater

Undersøgelsen har omfattet to vækstperioder (1978 og 1979). Resultaterne af forsøgene i 1978 (tabel 1) viser ingen tydelig relation mellem kløver-rodknoldbakteriernes tæthed og gødskningens art eller mængde, ej heller med afgrøde og forfrugt.

Tabel 1. Tæthed af kløverbakterier i forskelligt gødede jorde 1978

Lokalitet	pH	Gødskning 1978	Afgrøde 1978	Forfrugt 1977	Tæthed g frisk jord minimum
Jynde vad	6,1	ugødet		byg	23.200
»	6,1	»		»	8.600
»	6,1	P+K		»	2.000
»	6,0	»		»	4.100
»	6,1	N+P+K		»	18.800
»	6,1	»		»	6.300
Askov	6,8	ugødet		byg	54.600
»	6,6	staldg.		»	23.200
»	6,7	kunstg.		»	116.100
SPL, mark	4,7		grønsager	grønsager	600
SPL, have	6,2	kunstg.	grønsager	grønsager	900
Holte, have	6,1		grønsager	grønsager	10.300
Viby J.	7,4	kunstg.	kløvergræs	kløvergræs	193.800
»	6,5	gylle	græs	græs	77.600
»	7,1	kunstg.	græs	kløvergræs	193.800
»	7,7	»		byg	77.600
»	6,0	0 N	kløvergræs m. udlæg		31.500
»	6,0	600 N	»	»	31.500
»	7,0	0 N	»	»	193.800
»	7,5	600 N	»	»	116.100

Derimod ses væsentligt lavere tæthed af kløverbakterier i 2 jorde, hvor der gennem en længere årrække (formentlig mindst 40 år) ikke har været dyrket bælgplanter af kløvergruppen (mark og have ved Statens Planteavls-Laboratorium, Lyngby).

I 1979 undersøgtes rodknoldbakteriernes tæthed i relation til behandling med tre ukrudtsmidler (tabel 2). I alle tilfælde havde parcellerne hvidkløver som bestanddel af forfrugt og som afgrøde. For de anvendte midler, dinoseb, Basagran og MCPA, ses ingen tydelig effekt på kløverbakteriernes tæthed.

Undersøgelsen af den med tunge metaller belastede jord nær befærdet hovedvej viste, at der var kløverbakterier til stede både i vejrabatten og i arealer i 5 og 40–50 meters afstand fra vejbanen. De højere værdier i 5 meters afstand skyldes formentlig, at der her i sommeren 1979 var dyrket græs med 5 pct. kløver. Tungmetalindholdet i tilsvarende jordprøver er anført i tabel 3, (efter Sørensen, 1978).

Effektiviteten af de ved samtlige forsøg dannede bakterieknolde var, visuelt bedømt, gennemgående god. Dog var der tegn på forringet kvælstofbinding (ringere knolddannelse) fra jordprøverne med høj kvælstofgødskning (120–600 kg N/ha).

Diskussion

Dazzo og Brill (1978) fandt total hæmning af knolddannelsen hos hvidkløver *in vitro* ved 16 mM nitrat og 1 mM ammonium-N. I øvrigt iagttog man, at knolddannelsen faldt i takt med stigende kvælstoftilførsel. Svenske undersøgelser (THE, 1978) anfører, at ved tilstedeværelse af organisk kvælstof og ammonium-N i jordbunden mindskes kvælstofbindingens størrelse. Man nævner her muligheden af at fremstille mutanter af *Rhizobium trifolii*, som ikke hæmmes af ammonium-N. Nærværende undersøgelse har alene været rettet på at konstatere kløver-rodknoldbakteriernes tæthed i jordbunden, ikke deres effektivitet eller ændringer i denne. I tætheden af bakterier er der

Tabel 2. Tæthed af kløverbakterier i herbicidbehandlede og tungmetalbelastede jorde 1979

Lokalitet	pH	Behandling 1978	Afgrøde 1979	Forfrugt 1978	Tæthed*) g frisk jord minimum
Flakkebjerg 15/5	6,9	ubehandlet	hvidkløver	hvidkløver med engræsgræs som udlæg i byg	59.700
»	6,9	dinoseb	»	»	77.600
»	7,2	MCPA	»	»	54.400
»	7,2	Basagran	»	»	46.600
Flakkebjerg 27/6	7,1	ubehandlet	»	»	155.000
»	7,1	dinoseb	»	»	193.800
»	7,0	MCPA	»	»	155.000
»	7,0	Basagran	»	»	193.800
Kolding landevej 28/8	7,9	i vejrabatten	græs	græs	31.500
»	7,9	»	»	»	77.600
»	6,4	5 m fra vej	græs + 5% kløver	»	77.600
»	6,4	»	»	»	193.800
»	5,9	40-50 m fra vej	græs	græs	54.600
»	5,9	»	»	»	116.100

*) For prøver fra Flakkebjerg er der foretaget dobbeltbestemmelser på jordprøverne.
De nævnte parceller har modtaget 90 N i 1978 og 0 N i 1979.

Tabel 3. Indhold af bly og cadmium i jord ved hovedvej (efter *Sørensen*, 1978)

Afstand	Dybde	Jordtype	mg pr. kg jord	
			bly	cadmium
Rabat øst	0- 2 cm	sand	56	0,44
Rabat øst	2- 5 cm	sand	22	0,28
Rabat øst	5-10 cm	sand	13	0,32
Mark 10 m øst	0-20 cm	ler	15	0,23
Mark 50 m øst	0-20 cm	ler	13	0,21

ikke i nærværende undersøgelse fundet hæmning, der direkte kan henføres til gødskning. Alle bælgplanter er – og især i etableringsfasen – følsomme for påvirkning af kvælstof, herbicider samt for mangel på vand og lys (*Bentholt*, 1978). For naturlig kløverdyrkning er det således ikke blot nødvendigt, at effektive rodknoldbakterier findes i tilstrækkelig mængde, men en række andre dyrkningsbetingelser må også være til stede, herunder det rette samspil mellem kløversort og bakteriestamme.

Jensen (1977) fandt ændringer i mikrofloraen i blyforurenet jord, i form af en forskydning i balancen mellem svampeflora og bakteriepopulation til fordel for sidstnævnte. *Doelman* og *Haanstra* (1979) påviste forsinket respiration og nedsat nedbrydning i blyforurenet jord og forskydning af bakteriefloraen til fordel for den gramnegative del. Da rhizobier er gramnegative, er de derfor muligt ikke så påvirkelige af blyforurening. Uensartet fordeling af bly i mikrolokaliteter kan også være medvirkende årsag; i almin-

delighed er gram-negative bakterier mere fugtighedskrævende end gram-positive. Svenske undersøgelser (THE, 1978) angiver hæmning af kvælstofbindingen på grund af tungmetaller og nævner, at sur nedbør og sure gødningsemidler forøger tungmetallers opløselighed i jordbunden. I nærværende undersøgelse er ikke fundet påvirkning af tungmetaller.

Smith *et al.* (1978) fandt hæmning af kvælstofbinding hos rødkløver, dyrket i jord, som følge af 7 insekticider. Fisher *et al.* (1978) påviste *in vitro* nedsat vækst og kvælstofbinding hos hvidkløver ved tilførsel af 3 fungicider. Svenske undersøgelser (THE, 1978) nævner, at visse herbicider skal kunne hæmme kvælstofbindingen og nævner også mulighed for synergistisk effekt (samvirke) mellem pesticider og tungmetaller. I nærværende undersøgelse er ikke fundet hæmning som følge af herbicider.

Nutman og Hearne (1980) fandt en reduktion i tætheden af knoldbakterier i intensivt dyrket monokulturdjord med eksponent 1–2, i visse tilfælde med 3. Efter 18 års brak var kløverbakterietætheden reduceret med eksponent 4–5. Det konkluderes, at podning i sådanne tilfælde kan blive nødvendig.

Konklusion

Der er fundet kløverbakterier i 31 udvalgte landbrugsjorde, uanset forfrugt, gødskning, herbicider og tungmetaller. Antal år efter sidste kløverafgrøde er den vigtigste faktor til reduktion af tætheden af *Rhizobium trifolii*. For nærværende er der næppe grund til at anbefale podning af kløverfrø med rodknoldbakterier i Danmark.

Men hvis nuværende landbrugspraksis med bl.a. brug af monokulturer fortsætter, kan det senere blive nødvendigt at tage spørgsmålet om podning op til overvejelse. En undersøgelse af effektiviteten af kløverbakterierne og af den rette kombination mellem kløversorter og bakteriestammer kan da også blive aktuell.

Laborant Minna Schrøder og laborant Grete Rasmussen har medvirket ved arbejdets udførelse.

Litteratur

- Bentholm, B. R. (1978): Udnyttelse af forskellige bælgplantearter i græsmarken. N.J.F. Beretning (seminar) 41–54.
- Bonish, P. M. (1979): Clover rhizobia in soils: assessment of effectiveness using the plant infection count method. N.Z. Journal of Agricultural Research 22, 89–93.
- Dazzo, F. B. & Brill, W. J. (1978): Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Plant Physiol. 62, 18–21.
- Doelman, P. & Haanstra, L. (1979a): Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity. Soil Biol. Biochem. 11, 479–481.
- Doelman, P. & Haanstra, L. (1979b): Effects of lead on the decomposition of organic matter. Soil Biol. Biochem. 11, 481–485.
- Doelman, P. & Haanstra, L. (1979c): Effects of lead on the soil bacterial microflora. Soil Biol. Biochem. 11, 487–491.
- Fisher, D. J., Hayes, A. L. & Jones, C. A. (1978): Effects of some surfactant fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. Annals of Applied Biology 90, 73–84.
- Jensen, H. L. (1969): Lucerne- og kløverrodknoldbakteriernes forekomst i danske landbrugsjorder. Tidsskr. Planteavl 73, 61–72.
- Jensen, V. (1977): Effects of lead on biodegradation of hydrocarbons in soil. Oikos 28, 220–224.
- Nutman, P. S. & Hearne, R. (1980): Persistence of nodule bacteria in soil under long term cereal cultivation. Rothamsted Experimental Station, Report 1979, part 2, s. 77–90.
- Smith, C. R., Funke, B. R. & Schultz, J. T. (1978): Effects of insecticides on acetylene reduction by alfalfa, redclover and sweetclover. Soil Biol. Biochem. 10, 463–466.
- Sørensen, N. Kr. (1978): Bly, cadmium i jord og afgrøder. Bilag til Statens Planteavlsmøde s. 21–23.
- Tekniska Högskolornas Energiarbetsgrupp (THE) (1978): Mikrobiella aspekter på energiekonomin inom jord- och skogbruket. Rapport nr. 2. (Stockholm) 1–44.
- Vincent, J. M. (1970): A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. London. I.B.P. handbook nr. 15, 1–164.

Manuskript modtaget den 22. november 1980.