

Den danske samling af kvælstofbindende knoldbakterier Katalog og metodik

*Lyngby collection of Rhizobium Denmark
Catalogue and methods*

T. Vincents Nissen

Resumé

Den danske samling af kvælstofbindende knoldbakterier (slægten *Rhizobium*) er grundlagt af *Harald Christensen*. De ældste kulturer i samlingen er fra 1911–1921. En i 1980–1981 foretagen afprøvning af disse stammer viser, at de har bevaret deres kvælstofbindende evne. Formentlig er de verdens ældste bevarede stammer af *Rhizobium*.

Samlingens og bælplantedyrkningens historie i Danmark beskrives i indledningen til et katalog over samlingens nuværende omfang. Endvidere gives en oversigt over opbevaringsmetoder, kulturteknik og afprøvning på planter for effektivitet. Der gives til sidst en oversigt over litteratur vedrørende bælplanternes knoldbakterier, udgået fra Statens Planteavls-Laboratorium i tiden 1914–1982.

Nøgleord: *Rhizobium*, knoldbakterier, bælplanter, symbiotiske kvælstofbindende bakterier.

Summary

A review is given of the Danish *Rhizobium* collection in the Department of Soil Biology, State Laboratory for Soil and Crop Research, Lyngby, Denmark. The collection includes strains of *Rhizobium* from 1911 to 1982. The oldest strains of *Rhizobium meliloti* are still effective, and they are probably the oldest strains of *Rhizobium* existing. The review comprises the history of the collection and a catalogue of the strains; the methods of preservation, and the techniques used for culture of the bacteria and for effectivity tests of plants. Also the method for inoculation of seeds in agriculture is mentioned. The literature of research in the laboratory is listed for the time 1914–1982.

Key words: *Rhizobium*, nodule bacteria, legumes, symbiotic nitrogen-fixing bacteria.

Indledning

Interessen for bælgplantedyrkning i Danmark er stigende som følge af de højere priser på kvælstofgødning.

Symbiosen mellem bælgplanter og knoldbakterier giver bælgplanterne en særstilling i planteavlen som følge af deres betydelige fiksering af luftens frie kvælstof.

I det følgende gives en oversigt over den danske samling af kvælstofbindende knoldbakterier (*Rhizobium*) og den historiske baggrund. Endvidere behandles metoder for opbevaring, dyrkning af bakterierne og afprøvning af dem på planter.

De ældste danske kulturer af *Rhizobium* fra 1911 er stadig effektive, og de er antagelig de ældste eksisterende kulturer i verden af denne slægt.

Denne oversigt har til formål at fremme og udbrede kendskab til podning med knoldbakterier og den dertil knyttede teknik.

Historisk baggrund

Bælgplantedyrkningen i Danmark går langt tilbage i historien. Vore første forfædre var jægere og fiskere, men planter har antagelig også bidraget til den daglige føde i varierende omfang. Tidligt har man samlet frø og frugter af forskellige planter. Vildtvoksende bælgplanter, hvis frø kunne fortæres, var arter af vikke og fladbælg.

I bronzealderen indvandrede eller indbragtes ært og hestebønne til Danmark. Det nu bofaste landbrug gjorde brug af disse planters proteinrige frø til føde og som dyrefoder.

Vikke kom i dyrkning i middelalderen, medens kløver først blev landbrugsplante i Danmark omkring 1760. Samtidig eller endnu senere kom rundbælg, lucerne, lupin, serradel, humle-sneglebælg og kællingetand ind i dansk planteavl.

Fra den senere middelalder har ært været meget almindelig dyrket. 1759 blev den samlede udsæd anslået til 65.000 tønder af ærter og vikker i Danmark, svarende til 36.000 ha. 1838 beregnede den såkaldte tabelkommission udsæd af ærter og anden bælgssæd til 105.700 tønder, svarende til 58.000 ha. Ved arealtællinger i 1881 fandtes, at 24.300 ha var dyrket med ærter, 3.700 ha med

vikke og 600 ha med bønne. Heri var ikke medregnet dyrkning i haver.

Bælgplanternes særlige betydning i agerbruget var kendt allerede i oldtiden.

I 1808 skrev en dansk, landbrugskyndig præst (*I. H. Larsen*) om ærterne: »De synes at trække deres meste næring fra luften og den mindste del fra jorden«.

Men først i 1887 kunne *Hellriegel* og *Wilfarth* begrunde teorien om rodknoldenes kvælstofbinding hos bælgplanter. 1888 isolerede *Beijerinck* knoldbakterierne og gav hermed det fulde bevis for teoriens rigtighed.

I 1898 foreslog plantefysiologen *Hjalmar Jensen*, at Statens Planteavlsudvalg oprettede et dansk agrikultur-bakteriologisk laboratorium med fremstilling af kulturer af knoldbakterier for øje.

Efter flere forgæves forsøg på at opnå en bevilling til dette formål blev landbrugskandidat *Harald Christensen* i 1905 knyttet til den nyoprettede forsøgsstation i Årslev med den opgave at udføre bakteriologiske undersøgelser i forbindelse med gødningsforsøg. Indtil stationen var færdig indrettet, henlagdes de mikrobiologiske studier til Landbohøjskolens plantefysiologiske laboratorium, hvor der blev oprettet en særlig konto (årlig kr. 2.000) til løn for *Harald Christensen*. Denne konto blev det budgetmæssige grundlag for det i 1909 oprettede Statens Planteavls-Laboratorium. Ved finansloven 1909–10 blev der bevilget kr. 5.700 til selvstændige lokaler i en lejlighed på Henrik Steffens Vej. Her fungerede laboratoriet indtil 1923, da indflytning i nuværende bygning på Lottenborgvej i Sorgenfri fandt sted.

Hele denne udvikling skyldtes *Harald Christensens* indsats.

I 1895 havde *Nobbe* og *Hiltner* indleveret en patentansøgning i England på nitragin (af græsk *nitro*, dvs. kvælstof og latin *agere* dvs. gøre aktiv). Betegnelsen har siden dækket alle handelskulturer af kvælstofbindende knoldbakterier. *Harald Christensen* skaffede sig tidligt sådanne renkulturer, bl.a. fra Tyskland og USA (fig. 1).

Undersøgelse af Amerikansk Nitrogen
1906. (Flydende Kulture.)

Undersøgelsen påbegyndtes den 5/4.

Efter at det betænkelige Glas var
aalemt. Lavede nogle Pakglaspræparater
fra Originalkulturen, og disse synes at
vise Forholdene af Løse omend det
ikke lykkes at fra Præparaterne særlig
lydeligt.

Der foretages nu fra Vædsken
forskellige Overpodninger paa forskellige
Medingsstater.

A. ^(Fæst) ^(Kulturen) Kulturen paa skæve Glas.

a. 1. Løsningsglas.

Efter 1 Dag Forløb kunde man i Konden-
sationsvands med Enden af Straaffledet
iagttage en svag Vækst. Efter 2 Dages For-
løb havde der kun en Rodeskægge dannet sig

Fig. 1. Side af Harald Christensens dagbogsnotater fra
5. april 1906. Notatet omfatter en undersøgelse af en
amerikansk nitraginkultur.

På Statens Planteavls-Laboratorium blev de første danske pødekulturer til bælgplanter fremstillet i 1907. I større målestok anvendtes de første gang 1910 på godset Tranekær på Lange-land til et areal på 22 ha med lucerne til både dyrknings- og fodringsforsøg.

Lucernedyrkingen i Danmark blev hurtigt ud- bredt. I 1912 udgjorde den 9.700 ha, og i 1923 kulminerede den med 30.100 ha. Statens Plante-avls-Laboratorium leverede i 1922 over 75.000 glas med nitraginpødekulturer til landbruget. I begyndelsen havde man også anvendt *pødejord*, dvs. jord fra tidligere dyrkning af lucerne eller jord, iblandet nitragin til spredning og nedføring, men *frøpødning* viste sig at være den sikreste pødemetode, og den blev efterhånden eneråden- de.

I tiden fra 1923–1964 blev langt de fleste pøde- kulturer leveret til direkte brug fra laboratoriet i Lyngby. Siden har laboratoriet alene produceret *stamkulturer*, dvs. kulturer, afprøvet for renhed og effektivitet, til videre opformering på særlig dertil autoriserede private laboratorier, som vide-

resælger pødekulturer til landbrugets forsynings- enheder.

Ved anden verdenskrigs begyndelse var lucerne- arealet 22.000 ha, men efter krigen faldt det efterhånden betydeligt.

Lupindyrkingen udgjorde 1896 ca. 500 ha, i 1924 ca. 400 ha og er også siden faldet væsentligt.

Harald Christensen udnævntes 1919 til for- stander for Statens Planteavls-Laboratorium. Fra 1921 varetoges fremstillingen af nitragin af afde- lingsbestyreren for laboratoriets bakteriologiske afdeling (nu jordbundsbiologiske afdeling) – fra 1921–1923 af *K. A. Bondorff*, fra 1923–1947 af *Erik J. Petersen*, fra 1947–1969 af *H. L. Jensen* og siden 1969 af *T. Vincents Nissen*. I skiftende om- fang har undersøgelser over kvælstofbinding væ- ret knyttet til afdelingen. Denne forskning nåede under *H. L. Jensen* international anerkendelse.

Det tekniske arbejde ved fremstillingen af ni- traginkulturer har været betroet adskillige med- arbejdere gennem lang tid. Især fremhæves *Est- her Christensens* og *Minna Schrøders* langvarige indsats på området.

Klassifikation af slægten *Rhizobium* Classification of *Rhizobium*

Bakterieslægten *Rhizobium*

har seks definerede arter:

Rhizobium leguminosarum

Rhizobium phaseoli

Rhizobium lupini

Rhizobium japonicum

Rhizobium meliloti

Rhizobium trifolii

Rhizobium leguminosarum

Værtplanter

Lathyrus pratensis

(gul fladbælg)

Pisum sativum

(haveært + markært)

Vicia faba

(hestebønne)

Rhizobium phaseoli

Phaseolus vulgaris

(alm. bønne)

Rhizobium lupini

Lupinus densiflorus,

Lupinus luteus (gul lupin)

Ornithopus sativus

(serradel)

Rhizobium meliloti

Medicago sativa
(lucerne)

Medicago lupulina
(humle-sneglebælg)

Melilotus albus
(hvid stenkløver)

Trigonella (bukkehorn)

Rhizobium japonicum

Glycine max
(soyabønne)

Rhizobium trifolii

Trifolium (kløver)
(rød- og hvidkløver)

Rhizobium spp. betyder ikke-artsbetegnet *Rhizobium* (betegnelsen bruges især hyppigt ved tropiske plantesymbioser)

Den danske samling af stamkulturer af *Rhizobium*

Catalogue of strains in the Danish Collection

Jordbundsbiologisk Afdeling, Statens Planteavlslaboratorium, Lyngby

R. meliloti

L. 1/SPL	(1911)	Ompodet 1934. Afprøvet 1981
L. 2, 3/SPL	1913	(2 stammer). Afprøvet 1980
L. 4/SPL	1914	Afprøvet 1980
L. 5/SPL	1915	Afprøvet 1980
L. 6/SPL	1919	Ompodet 1934. Afprøvet 1980
L. 8/SPL	1919	Afprøvet 1980
L. 9/SPL	1919	Afprøvet 1980
L. 12/SPL	1920	Ompodet 1940. Afprøvet 1980
L. 13-14, 16-17/SPL	1920	(4 stammer). Afprøvet 1980
L. 19, 20/SPL	1921	(2 stammer). Afprøvet 1980
L. 21/SPL	1921	Ompodet 1934. Afprøvet 1980
L. 22/SPL	1921	Afprøvet 1980
L. 24/SPL	1922	Afprøvet 1980
L. 25/SPL	1924	Ompodet 1934. Afprøvet 1980
L. 26/SPL	1924	Afprøvet 1980
L. 27/SPL	1925	Afprøvet 1980
L. 31/SPL	1926	Ompodet 1934. Afprøvet 1980
L. 33/SPL	1926	Ompodet 1940. Afprøvet 1980
L. 40, 42/SPL	1928	(2 stammer). Afprøvet 1980
L. 48/SPL	1929	Ompodet 1940. Afprøvet 1980
L. 56/SPL	1935	Afprøvet 1980
L. 57-59/SPL	1936	(3 stammer). Afprøvet 1981
L. 60, 62, 63/SPL	1937	(3 stammer). Afprøvet 1981
L. 66, 70-72/SPL	1940	(4 stammer). Afprøvet 1981
L. 77, 79, 81-83, 85/SPL	1941	(6 stammer). Afprøvet 1981
L. 87-90, 92, 94-97/SPL	1944	(9 stammer). Afprøvet 1981
L. 98, 99/SPL	1945	(2 stammer). Afprøvet 1981
L. 100-104/SPL	1947	(5 stammer). Afprøvet 1981
L. 115/SPL	1967	Afprøvet 1981
Lucerne 2001	1980	Rothamsted. Afprøvet 1980
Lucerne 2011	1980	Rothamsted. Afprøvet 1980
Lucerne 2042	1980	Rothamsted. Afprøvet 1980
D. 417	1976	Praha

Kulturer for <i>Medicago lupulina</i>		
HS. 7/SPL	(1910)	Sidst ompodet 1930. Afprøvet 1981
HS. 10/SPL	1920	Afprøvet 1981
HS. 18/SPL	1920	Afprøvet 1981

Kulturer for <i>Melilotus alba</i>		
ST. 105/SPL	1950	Afprøvet 1981
ST. 106/SPL	1952	Afprøvet 1981

Kulturer for <i>Trigonella foenumgraecum</i>		
Tr. 1/SPL	1960	

R. leguminosarum

3 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Vicia faba</i>		
Ært 313 c	1981	Uppsala. Afprøvet 1981
Ært 327 c	1981	Uppsala. Afprøvet 1981
D. 1	1977	Praha
D. 256	1979	Praha
D. 512	1978	Praha
D. 513	1979	Praha

R. phaseoli

1 ikke-nummereret stamme. Værtplante: <i>Phaseolus vulgaris</i>		
Brun bønne 458	1981	Uppsala
9.21	1978	Praha
9.6	1977	Praha

R. lupini

4 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Lupinus luteus</i> ,		
<i>Ornithopus sativus</i>		
Lupin 3204	1980	Rothamsted. Afprøvet 1980
Lupin 623 a	1981	Uppsala. Afprøvet 1981
Lupin 624 a	1981	Uppsala. Afprøvet 1981
D. 532	1979	Praha
D. 533	1979	Praha

R. japonicum

3 ikke-nummererede stammer		
Soyabønne 512	1981	Uppsala

R. trifolii

6 ikke-nummererede stammer.		Afprøvet 1979
-----------------------------	--	---------------

Rhizobium spp.

5 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Anthyllis vulneraria</i>		
2 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Astragalus glycyphyllos</i>		
4 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Caragana arborescens</i>		
6 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Lotus corniculatus</i>		
2 ikke-nummererede stammer. Værtplante: <i>Lotus uliginosus</i>		
1 ikke-nummereret stamme. Værtplante: <i>Ononis repens</i>		

Opbevaringsmetoder i kultursamlingen

Rhizobium meliloti, lucernens knoldbakterie, udgør hovedparten af den danske samling. Den opbevares i steril jord. De ældste kulturer er fra årene 1911–1921. De er formentlig de ældste i verden og er stadig effektive (tabel 1).

Opbevaring i steril jord

Der anvendes en frugtbar havejord. Fremgangsmåden er følgende:

Havejord	100 g
Sand	20 g
Calciumcarbonat	1 g
Mannitol	2 g

dest. vand til 60% af vandkapacitet.

Først opløses mannitol i vand. Det øvrige indhold blandes grundigt i en skål, hvorefter mannitol-opløsningen pådryppes med en pipette. Henstand en halv time, derpå ny blanding. Jordblan-

dingen fyldes i Freudenreich flasker (højest ¾). Slibene smøres og hættens kanal stoppes med hydrofob vat. Flaskerne autoklaveres en time ved 120°C i tre på hinanden følgende dage med indskudt inkubering. Efter sædvanlig kontrol for sterilitet kan flaskerne podes. Bakterierne overføres direkte fra skrå-agar eller opslemmet i en lille mængde steril vand (2 ml). Jorden må ikke være for våd. Efter etikettering opbevares podningerne ved stuetemperatur i et lukket, mørkt skab.

Opbevaring på nitragin-agar

De øvrige kulturer af *Rhizobium* opbevares som færdig inkuberede, udviklede skrå-agar-kulturer i køleskab. Ompodes 2–3 gange årligt.

Opbevaring i frysetørret tilstand

Enkelte udenlandske kulturer opbevares i frysetørret stand (glasampuller) i køleskab.

Tabel 1. Effektivitet af kultursamlingens ældste stammer af *Rhizobium meliloti*
Effectivity of the oldest strains in the Danish culture collection

Stamme	Oprindelse	Isolerings- år	Sidste prøve	mg tørstof	mg kvælstof	% N i tørstof	Prøve- plante
<i>Strain</i>	<i>Place of isolation</i>	<i>Year of isolation</i>	<i>Last test</i>	<i>mg dry matter</i>	<i>mg nitrogen</i>	<i>% N in dry matter</i>	<i>Test plant</i>
L1, SPL	ukendt	1911	1980	428,7	15,47	3,61	Lucerne
L2, SPL	Virumgård	1913	1980	406,4	15,53	3,82	(Alfalfa)
L3, SPL*	»	1913	1980	383,6	13,97	3,64	»
L4, SPL	»	1914	1980	362,2	12,41	3,43	»
L5, SPL	»	1915	1980	433,4	15,68	3,62	»
L6, SPL	»	1919	1980	376,1	13,49	3,59	»
L8, SPL	»	1919	1980	486,0	16,72	3,44	»
L9, SPL	»	1919	1980	410,0	11,08	2,70	»
L12, SPL	»	1920	1980	325,7	10,92	3,53	»
L13, SPL	»	1920	1980	388,0	13,70	3,53	»
L14, SPL	»	1920	1980	376,7	12,93	3,43	»
L16, SPL	»	1920	1980	381,3	14,07	3,69	»
L17, SPL	»	1920	1980	370,5	13,75	3,71	»
L19, SPL	»	1921	1980	357,9	13,57	3,79	»
L20, SPL	»	1921	1980	410,9	15,10	3,67	»
L21, SPL	»	1921	1980	398,7	14,34	3,60	»
L22, SPL	»	1921	1980	387,7	14,10	3,64	»
L24, SPL	»	1922	1980	369,6	12,75	3,45	»
Upodet (kontrol)				155,3	1,77	1,14	»

I tabellen angives mg tørstof og mg kvælstof i høstet plantemasse (sædvanlig af 10 planter) og det procentiske kvælstofindhold, for samlingens ældste kulturer og for upodede kontrolplanter.

Dyrkningsteknik

Fremstilling af nitragin-agar

(Dyrkningssubstrat)

18 g Difco agar

150 ml lucerne-ekstrakt (indeholdende 2 pro mille tørstof)

10 g glucose

10 g tekn. CaCO₃

0,10 g K₂HPO₄

0,75 g asparagin

1 liter ledningsvand

Agaren smeltes sammen med lucerne-ekstrakten 20 min. ved 121°C.

Glucose, CaCO₃ og K₂HPO₄ afvejes i en kolbe (der i forvejen er mærket ved rumfang 1 liter). Asparaginen opløses i lidt kogende vand og tilsættes kolben. Der tilsættes yderligere ca. 100 ml ledningsvand så pulveret er vådt. Tilsæt kogende ledningsvand til 1 liter.

Det varme substrat hældes på rør à 10 ml. Rørene proppes og autoklaveres 20 min. ved 121°C (ved ophældning af substratet skal kolben rystes tit).

Lucerne-ekstrakt

Planterne sås i drivhus ved god varme og høj fugtighed. Lucernefrøene sås tæt på 6–7 cm sand i kasser med plastic i bunden. Der vandes hver dag. Når planterne har veludviklede kimblade (5–6 dage), høstes hele planten og skylles godt for sand. Planterne koges med så lidt vand som muligt, og afkoget filtreres gennem trådnat. Ekstrakten autoklaveres ved 121°C i 20 min.

Ekstrakten skal indeholde ca. 2 promille tørstof.

Fremstilling af kød-pepton-bouillon (Anvendes ved diagnose og kontrol)

8 g DIFCO NUTRIENT BROTH opløses i 1 liter dest. H₂O ved opvarmning. Opløsningen hældes på rør à 5 ml. Rørene proppes og autoklaveres 20 min. ved 121°C. pH = 6,8.

Fremstilling af kød-pepton-agar (Anvendes ved diagnose og kontrol)

8 g DIFCO NUTRIENT BROTH

20 g Difco agar

1 liter dest. H₂O

Det hele hældes i en 2 liter kolbe og autoklaveres i 20 min. ved 121°C. Det smeltede substrat hældes på rør à 10 ml. Rørene proppes og autoklaveres ved 121°C i 20 min. pH = 6,8.

Skummet mælk (Anvendes ved diagnose og kontrol)

Ca. 7 ml mælk i reagensglas, der proppes og steriliseres i strømmende vanddamp 20 min. i tre på hinanden følgende dage med 24 timers interval.

Plante-agar

1 g CaHPO₄

0,2 g K₂HPO₄

0,2 g MgSO₄

0,2 g NaCl

0,001 g FeCl₃ eller 0,002 g FeSO₄

0,001 g NaMoO₄

0,001 g MnSO₄

7 g Difco agar

1 liter ledningsvand

Kemikalierne samt agar tilsættes 1 liter ledningsvand og autoklaveres 20 min. ved 121°C. Substratet hældes på planteglas à 25 ml (husk at ryste kolben ofte). Rørene proppes og autoklaveres 20 min. ved 121°C. Henstand til dagen efter.

Udvaskning og sterilisering af strandsand

Groft strandsand udvaskes med vand, til vandet er klart. Vandet sis fra og sandet lægges ud på bakker med meget avispapir i bunden til tørring.

15 g tørt sand hældes på reagensglas. Glassene proppes og tørsteriliseres ved 120°C i 12 timer.

Fremstilling af planteglas

Det sterile sand hældes sterilt over på den kolde, stive planteagar. Henstand 4–5 dage.

Fugtigheden fra planteagaren vil så trænge op og fugte sandet.

Hvis dette ikke er tilfældet, tilsættes lidt sterilt ledningsvand.

Hvis vandet står over sandet, skal det fjernes med en steril pipette, da frøene ellers ikke kan spire.

Sterilisering af frø

Bunden af en steril 50 ml Erlenmeyerkolbe dæk-

kes med frø. *Lucernefrø* rystes med 10 ml koncentreret H_2SO_4 i $1\frac{1}{2}$ min. Svovlsyren fjernes med en steril pipette og derefter skylles frøene med flere hold sterilt ledningsvand, til vandet er neutralt (prøv med lakmuspapir).

Andre frø som f.eks. serradel eller kløver rystes 1 min. med 96% alkohol. Alkoholen fjernes med steril pipette og der skylles med 2 promille $HgCl_2$ opløsning i 2 min. $HgCl_2$ -opløsningen fjernes med steril pipette, og frøene skylles med 4–5 hold sterilt ledningsvand.

Såning af frø

Straks efter steriliseringen af frøene sås 5 frø med podenål i hvert planteglas. Frøene sås i en dybde af $\frac{1}{2}$ cm i sandet ved glassiden.

Planteglassene sættes til spiring i mørke et par dage og derefter i specielle kasser et lyst sted ved 15–18°C (evt. drivhus).

Når planterne har en passende størrelse, dvs. ca. 5 cm høje og med veludviklede kimblade, podes med bakteriesuspension.

Podning

5–6 dråber (ca. $\frac{1}{2}$ ml) tæt bakteriesuspension tilsættes planteglassene. For hver bakteriestamme podes 5 glas. Til kontrol bruges 5 upodede glas. Herefter henstilles glassene i drivhus mindst $1\frac{1}{2}$ –2 måneder.

Høst af planter

Propperne fjernes fra glassene, og destilleret H_2O hældes over planterne, så agaren bliver blød. Planterne samt agar hældes forsigtigt ud af glassene, og rødderne skylles rene for sand og agar i flere hold destilleret H_2O .

Evt. knoldtælling.

Planterne rulles sammen og lægges i et glas. Der foretages tørstofbestemmelse (105°C et døgn), og herefter Kjeldahlanalyse.

Kriteriet for høsttidspunktet

Er bakteriestammen effektiv, skal de podede planter være veludviklede med tydelig knolddannelse på rødderne, og der skal være tydelig forskel på podede og upodede planter.

Kjeldahl analyse

De 5 glas med tørrede planter fra hver bakteriestamme fugtes og hældes op i en 200 ml Kjeldahlkolbe. Glassene skylles efter. 3 Kjeldahl catalyst tablets tilsættes og derefter 10 ml koncentreret H_2SO_4 . Der koges først ved svagt blus, til vandet er kogt af og hvide svovlsyredampe kan ses. Blusset skrues nu op, og kogningen fortsættes 3 timer, efter at grønlig farve er fremkommet.

Kolben afkøles, og indholdet fortyndes forsigtigt med ledningsvand. Indholdet hældes over i en destillationskolbe, og der skylles efter med H_2O til i alt 110 ml. Tilsæt 40 ml koncentreret NaOH (samlet rumfang = 150 ml). Kolben tilsluttes omgående destillationsapparatet. Destillatet opsamles i en forlagskolbe indeholdende 10,0 ml 2% H_3BO_3 .

Efter endt destillation tilbagesitres forlagskolben med 0,03 N H_2SO_4 , og kvælstofindholdet beregnes.

Resultatet opgives som % kvælstof beregnet på antal gram tørstof.

Blindbestemmelse foretages.

Indikator til Kjeldahl

0,033 g bromkresolgrønt
0,066 g methylrødt
100 ml 96% alkohol

Fremstilling af 2% H_3BO_3

20 g H_3BO_3
10 ml indikator
1 liter dest. H_2O

20 g H_3BO_3 opløses i H_2O , og der tilsættes 10 ml indikator. Kolben fyldes op til 1 liter med H_2O . Der tilsættes lidt NaOH (0,1 N), til borsyren har en farve nærmest rød (en mellemting mellem rød og grøn). Er borsyren for grøn, tilsættes lidt borsyre i opløsningen.

Podning af lucerne og humle-sneglebælg med bakteriekulturer

I de af Statens Planteavlslaboratorium fremstillede kulturer forefindes bakterierne som en hvidlig slim på den skråliggende agars overflade.

Ved hjælp af en ren pind el. lign. føres glassenes indhold over i et rent fad, indeholdende lidt frisk,

skummet mælk (ca. ¼ liter pr. glas). Glassene skylles et par gange med lidt af mælken. Baktorieslimen fordeles så godt som muligt i væsken. Agaren, der er uopløselig, udtværes omhyggeligt med fingrene.

Efter at bakterierne er godt fordelt i mælken, hældes denne ud over frøene, der må være anbragt i en dyngge på et velrenset gulv. Frøene gennemblandes omhyggeligt med hænderne eller med en skovl, således at hvert enkelt bliver befulgt af podevæsken. Er der for lidt væske til helt at kunne befugte frøene, tilføres rent vand, men man må passe på, at sæden ikke bliver for våd (helst lige gennemfugtet). Hvis frøene efter podningen klæber sammen, blandes de med lidt tørt sand eller tør jord, og de vil kunne sås med det samme.

Såningen bør foretages samme dag, som podningen af frøene finder sted og helst umiddelbart efter. I tilfælde af bredsåning må frøene straks nedharves (harven må følge efter såmaskinen), da stærk udtørring eller direkte sollys kan svække eller dræbe bakterierne. Af samme grund kan det anbefales at foretage såning i grævejre eller ved atfenstid.

Kulturerne må indtil anvendelsen, der helst må finde sted inden ca. 4 uger efter modtagelsen, opbevares på et mørkt og køligt sted.

Hvert glas skal være forsynet med etikette med angivelse af den dato, indtil hvilken kulturerne med sikkerhed kan anvendes.

Af særlig betydning for en god lucerneudvikling er det, at jorden hverken er vandlidende eller kalktrængende.

Litteratur om kvælstofbindende knoldbakterier *Statens Planteavlslaboratorium 1914-1982*

References 1914-1982

*State Laboratory for Soil and Crop Research
Lyngby, Denmark*

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

Eisenhardt, A. Rosengaard (1975): Influence of the insecticide phoxim on symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixation determined by the acetylene reduction method. Tidsskr. Planteavl 79, 254-258.

Jensen, H. L. (1949): Nyere undersøgelser over biologisk kvælstofbinding. Tidsskr. Planteavl 52, 653-690.

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

Jensen, H. L. (1958): The classification of the Rhizobia. Nutrition of the legumes, p. 75-86. (Butterworth's Scientific Publications, London).

Jensen, H. L. (1961): Hvorledes foregår den symbiotiske kvælstofbinding? Botanisk Tidsskr. 56, 336-344.

Jensen, H. L. (1961): Survival of *Rhizobium meliloti* in soil culture. Nature 192, 682-683.

Jensen, H. L. (1962): Om lucerne-knoldbakteriers levedygtighed i jordkultur. Tidsskr. Planteavl 65, 703-715.

Jensen, H. L. (1963): Relations de la plante hôte avec les *Rhizobium* du groupe *Lotus-Anthyllis*. Ann. Inst. Pasteur 105, 232-236.

Jensen, H. L. (1964): Om forholdet mellem værtplanter og rodknoldbakterier hos nogle grupper af bælgplanter. Tidsskr. Planteavl 68, 1-22.

Jensen, H. L. (1965): Urea and biuret as nitrogen sources for *Rhizobium* spp. (med Minna Schrøder). J. Appl. Bacteriology 28, 473-478.

Jensen, H. L. (1966): Growth inhibition by nicotinic acid in certain root nodule bacteria (*Rhizobium* spp.). (med A.S. Abdel-Ghaffar). Symposia, IX. Int. Cong. Microbiol. Moscow, p. 87-96.

Jensen, H. L. (1966): The Rhizobia of *Lupinus densiflorus* Benth, with some remarks on the classification of root nodule bacteria. (med A.S. Abdel-Ghaffar). Arch. f. Mikrobiol 54, 393-405.

Jensen, H. L. (1967): Mutual host plant relationships in two groups of legume root nodule bacteria (*Rhizobium* spp.). Dedicated to Professor C. B. van Niel on the occasion of his 70th birthday. Arch. f. Mikrobiol 59, 174-179.

Jensen, H. L. (1967): Growth-promoting effect of chloro-substituted aliphatic acids in root nodule bacteria. (med Minna Schrøder). Arch. f. Mikrobiol. 58, 127-133.

Jensen, H. L. (1968): Symbiotisk kvælstofbinding med speciel henblik på bælgplanterne. Ugeskrift for Agronomer 133, 43-48.

Jensen, H. L. (1969): Lucerne- og kløverrodknoldbakteriernes forekomst i danske landbrugsjorder. Tidsskr. Planteavl 73, 61-72.

Jensen, H. L. (1969): Kvælstofbindende effektivitet hos sneglebælg-gruppens rodknoldbakterier, med særligt henblik på lucerne. Tidsskr. Planteavl 73, 148-159.

Jensen, H. L. (1969): Om rodknoldbakteriernes forhold over for visse ukrudtsmidler. Tidsskr. Planteavl 73, 309-317.

Nissen, T. Vincents (1981): Om forekomst af kløverbakterier i nogle udvalgte danske landbrugsjorde. Tidsskr. Planteavl 85, 153-157.

- Nissen, T. Vincents (1981): Den biologiske kvælstofbinding. Ugeskrift for Jordbrug 126, 495-499.
- Nissen, T. Vincents (1982): Aktuelle problemer i bælgplantedyrkningen. Ugeskrift for Jordbrug 127, 727-729.
- Nissen, T. Vincents (1983): The Danish *Rhizobium* collection, i E. Hamatova and F. A. Skinner: World Catalogue of Microorganisms (in press).
- Petersen, Erik, J. (1940): Diagnostiske undersøgelser over lucernebakterier. Tidsskr. Planteavl 44, 504-553.

Appendiks

Nyere litteratur om knoldbakterier og metodik vedrørende disse

- Allen, O. N., E. Hamatová & F. A. Skinner (1973): IBP World catalogue of *Rhizobium* collections. London.
- Bergersen, F. J. (1980): Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York.
- Vincent, J. M. (1970): A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford.
- Vincent, J. M. (1981): The genus *Rhizobium* - in Mortimer P. Starr et al.: The Procariotes, bd. 1., 818-841. New York.

Manuskript modtaget den 18. juni 1982.