

## V skyrius. MIKROBIOLOGIJA

ISSN 1392-3196

Žemdirbystė. Mokslo darbai, 2004, 4, 88, 183-197

UDK 576.851.155: 633.37

### RYTINIŲ OŽIARŪČIŲ SĖKLŲ INOKULIAVIMO BAKTERIJŲ (*RHIZOBIUM GALEGAE*) PREPARATAIS TERMINAI IR BŪDAI

Edmundas LAPINSKAS, Dalia AMBRAZAITIENĖ

Lietuvos žemdirbystės institutas

Vėžaičiai, Klaipėdos rajonas

El. p.: filialas@vezaiciai.lzi.lt; daliambra@hotmail.com; ekokat@gmf.ku.lt

#### Santrauka

1997-2002 m. atliktais laboratoriniais ir lauko bandymais nustatyti nitragino gamybos bei rytinių ožiarūčių inokuliacijos pagrindiniai parametrai.

Dirvožemis – nepasotintasis giliau glėžiškas balkšvažemis (J14-n), kurio  $pH_{KCl}$  5,4-5,8, humuso – 1,81-1,87 %, judriųjų  $P_2O_5$  ir  $K_2O$  – atitinkamai 135-148  $mg\ kg^{-1}$  ir 122-140  $mg\ kg^{-1}$  dirvožemio.

Tyrimais nustatyta, kad nitragino ir sėklos inokuliacijos kokybę lemia paruošto preparato ir bakterizuotos sėklos laikymo sąlygos bei trukmė, taip pat sėklos inokuliacijos derinimas su apsuginėmis medžiagomis. Gerą nitragino preparatą, nepriklausomai nuo laikymo temperatūros ( $+4^{\circ}C$  ar  $+26^{\circ}C$ ), galima išsaugoti ne ilgiau kaip dvi savaites. Ilgesnis preparato ar *Rhizobium* biomasės, skirtos nitraginui gaminti, laikymas yra rizikingas. Laikant bakterizuotą sėklą, tinkamas titras išsilaiko savaitę, inokuliuojant su 10 % cukraus tirpalu – dvi savaites.

Nitraginas buvo veiksmingiausias ožiarūčių pirmis ir antrais naudojimo metais, inokuliuojant sėjos dieną ir iki septynių dienų prieš sėją. Inokuliuotą sėklą apdorojus 10 % cukraus tirpalu simbiozės efektyvumas nepadidėjo.

Tarp *Rhizobium* efektyvumo ir augalo gumbelių skaičiaus bei sudėtingų gumbelių formavimosi nustatyti vidutinio stiprumo ryšiai ( $r = 0,65$  ir  $\eta = 0,71^{**}$ ).

Visi inokuliacijos deriniai ekonominiu požiūriu buvo naudingi ir per dvejus žolių naudojimo metus grynosios pajamos siekė iki 391,7 Lt  $ha^{-1}$ .

Reikšminiai žodžiai: *Rhizobium*, ožiarūčiai, nitraginas, inokuliacija, inokuliacijos terminai ir būdai.

#### Įvadas

Biologinio azoto fiksaciją sąlygoja daugelis veiksnių: gumbelinių bakterijų bei ankštinių augalų genetinės ir fiziologinės savybės bei dirvožemio ir meteorologinės sąlygos. Tačiau ne mažiau svarbu yra ankštinių augalų inokuliacijai pagaminto nitragino kokybė bei jo tinkamas naudojimas /Khotyanovitch, 1995; Bzheumychoy ir kt., 1999/. Inokuliuojant geros kokybės preparatais, ankštinių augalų gumbelių skaičius padidėja iki 25 % ir daugiau, pusė iš jų būna aktyvūs /Pasyukov, Lekomcev, 2000/. Vidutinis nitragino efektyvumas, skaičiuojant sausųjų medžiagų derliumi, ankštiniams žolėms sudaro 0,55-2,96, ankštiniams javams – 0,28-2,41 t  $ha^{-1}$  /Cleyet-Marel, 1988; Weaver, Holf, 1990; Klasens, 1994; Ambrazaitienė, 2000/. Ankštinių augalų inokuliacijos veiksmingumui didelę įtaką turi spontaninių gumbelinių bakterijų paplitimas ir jų simbiotinis efektyvumas. Krašto dirvožemiuose dobių

ir žirnių bakterijų būna daugiau, o liucernų bakterijų – mažiau. Ypač mažai, o kai kur ir iš viso nėra ožiarūčių gumbelinių bakterijų /Lindström, 1984; Sarand ir kt., 1995; Lapinskas, 1998; Lapinskas, 2002/. Vadinasi, ši palyginti ne taip seniai pradėta kiek plačiau auginti ankštinė žolė, pasėta be nitragino, skursta ir neišaugina derliaus.

Inokuliacijos efektyvumas daug priklauso nuo nitragino kokybės ir gumbelinių bakterijų gausumo (titro) inokuliuotos sėklos paviršiuje. Gumbelinių bakterijų titras gali būti sudarytas atsižvelgiant į bakterijų štamo efektyvumą ir atsparumą nepalankioms dirvožemio sąlygoms bei ankštinio augalo fiziologines savybes /Hamdy, 1982; Ambrazaitienė, 1995; Ambrazaitienė, 2000; /.

Į klausimą, koks turi būti minimalus nitragino titras, šiandien mokslas vieno atsakymo neturi. Vienu mokslininkų nuomone, žirnių efektyviam inokuliacijai reikia ne mažiau kaip 100 tūkst. gumbelinių bakterijų sėklai, o liucernoms pakanka 18 tūkst. bakterijų sėklai /Roughley, 1988; Khotyanovitch, 1995/.

Dirvožemiuose, kur randama nedaug spontaninių bakterijų arba jų iš viso nėra (ožiarūčiai, liucernos), pakanka nedidelio bakterijų titro – 100-300 ląstelių sėklai. Sudarant mažesnę titrą kaip 100 ląstelių sėklai, inokuliacija būna mažai veiksminga /Cleyet-Marel, 1988; Khotyanovitch, 1995/, o kai kurie mokslininkai tokio mažo titro apskritai nepripažįsta inokuliacijai. Seniai auginamų dobilų, žirnių, vikių gumbelinių bakterijų minimalus titras laikomas apie 100 tūkst. ląstelių sėklai /Roughley, 1988; Weaver, Holf, 1990/.

Plačiai paplitusi nuomonė, kad ankštinių inokuliacija veiksmingiausia tada, kai sėkla apvelinama nitraginu ir tą pačią dieną pasėjama /Milton, 1989; Abd-Alla Mohamed, 1994/. Tačiau liucernų gumbelinės bakterijos palyginti ilgai – iki 17-27 savaičių gali išlikti gyvybingos ir išsaugoti didelį –  $10^4$  ląstelių sėklai titrą. Kitų augalų sėklų paviršiuje gumbelinės bakterijos išsilaiko trumpiau. Ypač greitai bakterijos praranda gyvybingumą, inokuliuojant dobilų sėklą. Tai susiję su ankštinių augalų sėklų apvalkalėlio toksiškumu gumbelinėms bakterijoms ir šių bakterijų štamų atsparumu nepalankiems aplinkos veiksniams /Lindström, 1984; Lapinskas, 1998/.

Siekiant apsaugoti gumbelines bakterijas nuo toksiško aplinkos poveikio, ankštinių sėklos inokuliuojamos kartu derinant su apsauginėmis medžiagomis: metilceliuliozės 2 % konc. tirpalu arba cukraus 10 %, maltozės 10 %, Na-gliutamato 10 %, cukraus ir Na-gliutamato mišinio 10 % ir kt. /Roughley, 1988/.

Lietuvoje pramoniniu būdu nitragino preparatai negaminami. Pagal žemdirbių užsakymus, nedidelius jo kiekius paruošia Lietuvos žemdirbystės instituto ir Vėžaičių filialo Mikrobiologijos laboratorijos, taip pat įveža Agrochemijos įmonės.

Darbo tikslas – nustatyti nitragino efektyvumą rytiniams ožiarūčiams, atsižvelgiant į preparato kokybės parametrus, sėklų inokuliacijos terminus ir būdus.

### **Tyrimų objektas, metodai ir sąlygos**

*Nitragino preparato laikymo trukmė.* Norint paruošti nitragino preparatą, į žirnių mitybinės terpės lėkšteles buvo pasėjama po 0,1 mL *Rhizobium galegae* (vietinis štamas G12) bakterijų suspensijos ir auginama termostate 5 paras, esant +26°C temperatūrai /Lapinskas, 1998/. Po to į kiekvieną lėkštelę įpilama po 20 mL sterilaus vandens, Drigalskio sklaidytuvu nuvaloma bakterijų biomasė ir supilama į nitraginui laikyti skirtą plastikinį bakelį. Vieno hektaro plotui preparato paruošti, priklausomai nuo išaugusios biomasės, sunaudojamas 2-3 lėkštelių turinys. Tyrimams buvo naudojamas L talpos indas nitragino 10-čiai hektarų. Bandymams dviejuose induose nitraginas buvo laikomas šaldytuve (+3-5°C temperatūroje), kiti du indai – termostate (+26°C temperatūra). Gumbelinių bakterijų

gyvybingumas arba gyvų bakterijų skaičius (titras) buvo nustatomas, užsėjant ant žirnių mitybinės terpės agarą Petri lėkštelėse nitragino paruošimo dieną, po 1, 2, 3 ir 4 savaičių.

Iš viso atlikti trys bandymai.

*Rhizobium biomassės laikymo trukmė.* *Rhizobium galegae* (štamai G12) buvo užsėjamas ant žirnių mitybinės terpės agarą Petri lėkštelėse ir auginamas termostate, esant +26°C temperatūrai. Po 5 dienų lėkštelės, kurių mitybinės terpės paviršius ištiesai padengtas gumbelinių bakterijų mase, buvo atrenkamos tolesniam tyrimui. Dalis atrinktų lėkštelių buvo laikoma termostate, likusios – dedamos į šaldytuvą, kuriame buvo palaikoma +3-5°C temperatūra. Iš atrinktų lėkštelių *Rhizobium* biomassės buvo ruošiamas nitraginas ir nustatomas šių bakterijų titras. Likusi gumbelinių bakterijų biomasa buvo laikoma 4-5 savaites, kas savaitę iš jų paruošiant po 4 hektarines porcijas nitragino. Kiekvienos nitragino porcijos tikrinama kokybė – nustatomas gumbelinių bakterijų titras 1 mL preparato.

Tyrimo laikotarpiu atlikti 3 bandymai ir išanalizuotos 56 hektarinės porcijos nitragino.

*Inokuliuotos sėklos laikymo terminai.* Ožiarūčių sėkla buvo inokuliuojama paruoštu nitragino preparatu, skaičiuojant 0,75 L gumbelinių bakterijų suspensijos 30-čiai kg sėklos.

Gumbelinių bakterijų skaičius inokuliuotos sėklos paviršiuje buvo tiriamas inokuliuavimo dieną, po 1 ir 3 dienų, taip pat po 1, 2, 3 ir 4 savaičių. Iš viso atlikti trys bandymai.

*Apsauginių medžiagų reikšmė, inokuliuojant sėklas.* Ožiarūčių gumbelinių bakterijų (štamai G12) biomasa 5 dienas buvo auginama termostate +26°C temperatūroje. Iš jos nitraginas buvo ruošiamas taip: 1 var. – *Rhizobium* biomasa praskiedžiama vandentiekio vandeniu; 2 var. – *Rhizobium* biomasa praskiedžiama 10 % konc. cukraus tirpalu; 3 var. – *Rhizobium* biomasa praskiedžiama 10 % konc. polivinilacetato emulsijoje.

Pagaminius skirtingus nitragino preparatus, tą pačią dieną juo buvo inokuliuojamos ožiarūčių sėklos. Kiekvienu nitragino preparatu inokuliuojamos 2 sėklų porcijos, t.y. iš viso buvo sudaromi 6 inokuliuotų sėklų mėginiai, kurie inokuliuavimo dieną ir toliau kas savaitę (iš viso 5 savaitės) buvo analizuojami, nustatant *Rhizobium* titrą vienam kg sėklų.

*Nitragino efektyvumo lauko bandymai* buvo įrengti nepasotintame giliau glėžiškame balkšvažemyje. Dirvožemio pH<sub>KCl</sub> 5,4-5,8, humuso – 1,81-1,87 %, bendrojo N – 0,10-0,12 %, judriųjų P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ir K<sub>2</sub>O atitinkamai 135-148 ir 122-140 mg kg<sup>-1</sup> dirvožemio.

Bandymų pradinio laukelio dydis 28 m<sup>2</sup> (14,0 m × 2,0 m), apskaitinio – 18 m<sup>2</sup> (12,0 m × 1,5 m). Pakartojimai – 4. Laukeliai pakartojimuose išdėstyti atsitiktine tvarka.

Rytiniai ožiarūčiai (*Galega orientalis* L.) 'Gale' sėti (30 kg ha<sup>-1</sup>) į antsėlinius augalus – miežius 'Ula', kurių sėklos norma – 170 kg ha<sup>-1</sup>.

Prieš sėją ir kiekvienų metų pavasarį ožiarūčiai buvo tręšiami P<sub>60</sub>K<sub>60</sub>.

Sėklos inokuliuojimui nitraginas buvo ruošiamas iš ožiarūčių gumbelinių bakterijų (*Rhizobium galegae* L.) vietinio štamai G12.

Bandymo schema: 1. Neinokuliuota (kontrolinis). 2. Inokuliuota sėjos dieną. 3. Inokuliuota 1 d. prieš sėją. 4. Inokuliuota 3 d. prieš sėją. 5. Inokuliuota 7 d. prieš sėją. 6. Inkrustuota 10 % cukraus tirpalu (CT). 7. Inokuliuota sėjos dieną ir CT. 8. Inokuliuota 1 d. prieš sėją ir CT. 9. Inokuliuota 3 d. prieš sėją ir CT. 10. Inokuliuota 7 d. prieš sėją ir CT. Bandymo 2-5 var. sėkla buvo inokuliuojama nitraginą praskiedžiant paprastu vandentiekio vandeniu, o 6-10 variantų sėklai apdoroti nitraginas buvo paskleidomas 10 % cukraus tirpale. Abiem atvejais gryna *Rhizobium* biomasa buvo paskleidžiama 0,75 L vandens arba cukraus tirpalo, skaičiuojant 30-čiai kg sėklos, t.y. nitragino suspensija sudarė 2,5 % sėklos kiekio.

*Agrocheminės analizės.* Žolių pjūčių metu iš kiekvieno laukelio buvo sudaromas vienas 0,5 kg dydžio augalų ėminys sausųjų medžiagų išėigai, botaniškai grynų ožiarūčių procentui ir bendrojo azoto (žalių baltymų) bei baltyminio azoto procentui nustatyti.

LŽI Vėžaičių filialo Agrobiologijos laboratorijoje bei Agrocheminių tyrimų centre buvo nustatoma:  $pH_{KCl}$  – elektropotenciometriiniu metodu, hidrolizinis rūgštumas – Kappeno, sorbuotų bazių suma – Kappeno-Hilkovico, bendrasis azotas – Kjeldalio, judrieji fosforas ir kalis ( $P_2O_5$  ir  $K_2O$ ) – Egnerio-Rimo-Domingo (A-L) metodais.

Augalų gumbelių skaičiaus analizei iš kiekvieno laukelio buvo paimama po 4 šaknis ir suskaičiuojami gumbeliai.

*Fermento nitrogeazės (klasifikacijos Nr. 1.18.6.1) aktyvumas* ožiarūčiuose buvo nustatytas 2000 metų vasarą (antri žolių naudojimo metai). Iš skirtingų variantų iškastos augalų šaknys, nuplautos ir nusausintos filtriniu popieriumi. Pasverta po 2 g šaknų su gumbeliais. Svėrinys patalpintas į 20 mL talpos stiklines kapsules, kurios buvo hermetiškai uždarytos. Azoto fiksacijos intensyvumas nustatytas anksčiau aprašytu dujų chromatografijos metodu /Ambrazaitienė, 2003/.

*Ekonominis įvertinimas.* Grynosios pajamos buvo apskaičiuotos iš gautos tiriamų priemonių papildomos produkcijos vertės, atmetant inokuliavimo ir sėklos apdorojimo 10 % cukraus tirpalo išlaidas. Šias išlaidas sudarė nitrągino ( $25 \text{ Lt ha}^{-1}$ ) ir cukraus ( $0,20 \text{ Lt ha}^{-1}$ ), sėklos apdorojimo ( $15 \text{ Lt t}^{-1}$ ), taip pat išlaidos, susidariusios nuo tiriamų priemonių papildomai produkcijai (17 % drėgnumo šienui) nupjauti, išdžiovinti, pakrauti, nuvežti 3-5 km atstumu ir iškrauti daržinėse ( $10,0 \text{ Lt t}^{-1}$  produkcijos).

*Meteorologinės sąlygos* simbiotinio azoto fiksacijai turi didelę reikšmę, ypač dirvožemio drėgmės režimas gegužės mėnesį, kai sėjos metų ankštiniai augalai pradeda formuoti šaknų gumbelius ir atgyja ankstesniųjų metų sėjos augalų gumbelių funkcijos /Lindström, 1984; Bzheumychoy ir kt., 1999/.

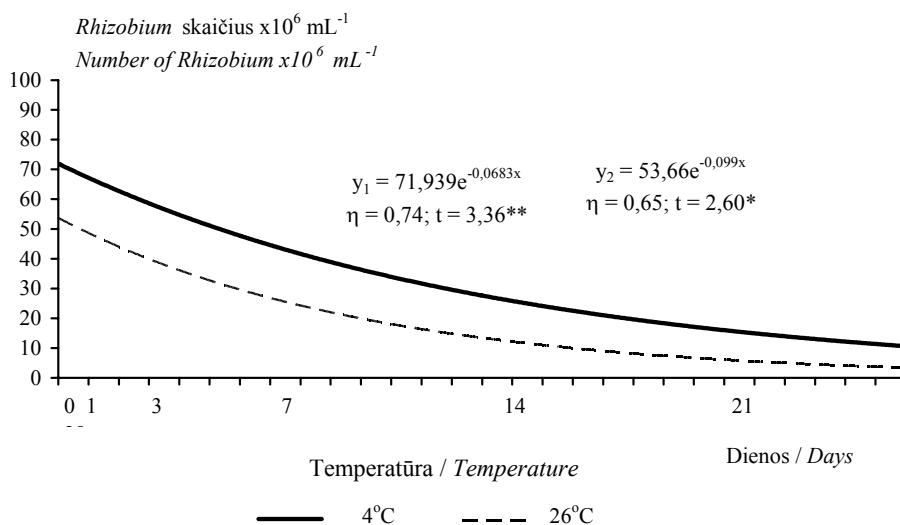
1998-2001 m. vegetacijos laikotarpių meteorologinės sąlygos buvo nevienodos. Kiek karštesnė vasara išsiskyrė 1999 m., kai gegužės – rugsėjo mėnesių vidutinė paros oro temperatūra buvo  $+15,2^\circ\text{C}$ , esant daugiametei normai  $+14,2^\circ\text{C}$ . Vėšiau, negu normaliais metais, buvo 1998 m. ir 2000 m.

Drėgnesnis, negu įprasta, augalų vegetacijos laikotarpis buvo 1998 ir 2001 m., kai kritulių suma gegužės – rugsėjo mėnesiais viršijo daugiametę normą atitinkamai 72,6 ir 133,0 mm, arba 19 % ir 35 %. Tuo tarpu 2000 m. vasarą vyravo palyginti sausi orai; kritulių suma sudarė tik 244,7 mm, arba 65% daugiametės normos.

Vertinant drėgmės režimą G.Selianinovo pasiūlytu metodu pagal apskaičiuotus hidroterminius koeficientus (HTK), galima teigti, kad 1998-2001 m. drėgmės režimas augalams ir gumbelinėms bakterijoms buvo palankus /Battalov, 1980/. Tačiau 2000 m. ir 2001 m. gegužės. HTK tesudarė 0,96 ir 0,56. Tokį drėgmės režimą reikia vertinti kaip sausą ir dargi sausringą (2001 m.), t.y. simbiozei susiformavo nepalankios sąlygos. Žinoma, tai tęsėsi neilgai ir jau birželio mėnesį abejais metais buvo normaliai drėgna.

### **Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas**

*Nitrągino preparato laikymo įtaka gumbelinių bakterijų gyvybingumui.* Nepriklausomai nuo nitrągino laikymo sąlygų (šaldytuve ar termostate), daugiausia gumbelinių bakterijų žuvo per pirmąją saugojimo savaitę (1 pav.). Nitrąginą laikant  $+4^\circ\text{C}$  temperatūroje, bakterijų titras sumažėjo nuo 99,7 iki 61,8 milijono  $\text{mL}^{-1}$  preparato. Nitrąginą laikant termostate, po vienos savaitės bakterijų tebuvo 41,4 milijono  $\text{mL}^{-1}$ .

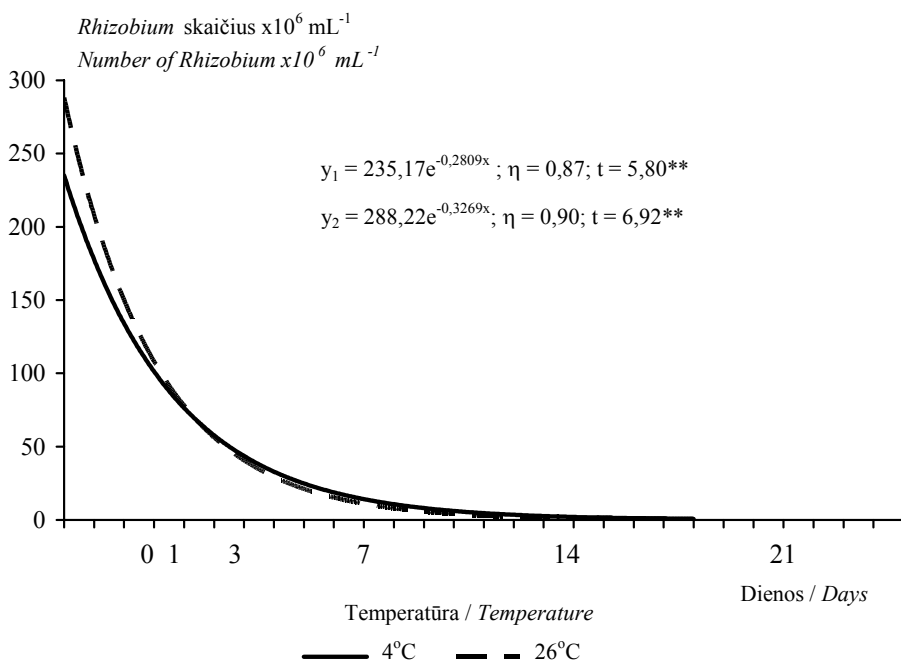


**1 paveikslas.** Temperatūros, laikymo terminų ir *Rhizobium galegae* skaičiaus nitragino preparate ryšys

**Figure 1.** The relationship between temperature, storage terms and number of *Rhizobium galegae* in the bacterial preparation

Po dviejų savaičių abiem būdais laikomų preparatų kokybė susilygino ir sudarė atitinkamai 28,0 ir 26,2 milijono ląstelių  $\text{mL}^{-1}$  preparato. Dar ilgiau laikant nitraginą, bakterijų skaičius sumažėjo dvigubai, o po 4 savaičių – net 7 kartus, ir toks preparatas jau gali prarasti veiksmingumą ožiarūčiams. Taigi gerą nitragino preparatą galima išsaugoti ne ilgiau kaip 2 savaites, tiek laikant šaldytuve, tiek termostate.

***Rhizobium* biomasės laikymo įtaka jų gyvybingumui.** Dobilų ar liucernų gumbelinų bakterijų preparatas laikomas geros kokybės, jei yra apie 1 milijardą bakterijų viename mL /Rice ir kt., 2000/. Manoma, kad ožiarūčių nitragino titras gali būti žymiai mažesnis. Tyrimais nustatyta, kad jau per pirmąją *Rhizobium* bakterijų biomasės laikymo savaitę iš jos pagamintame preparate bakterijų skaičius sumažėjo kelis kartus (2 pav.). Biomasę laikant +4°C temperatūroje, *Rhizobium* titras sumažėjo vidutiniškai 4,9 karto, laikant +26°C – 4,2 karto. Pastebėta, kad esant didesniai pradiniam bakterijų skaičiui, per savaitę jų sumažėja daugiau, negu esant mažesniai skaičiui. Matyt, per „tirštoje“ biomasėje gumbelinės bakterijos greičiau žūsta ne tik dėl maisto medžiagų spartesnio išnaudojimo mitybinėje terpėje, bet ir dėl toksinių medžiagų susidarymo, irstant žuvusioms ląstelėms. Kritinis *Rhizobium* skaičius nitragino yra mažiau kaip 10 tūkst. ląstelių  $\text{mL}^{-1}$  /Cleyet-Marel, 1988; Weaver, Holf, 1990/.

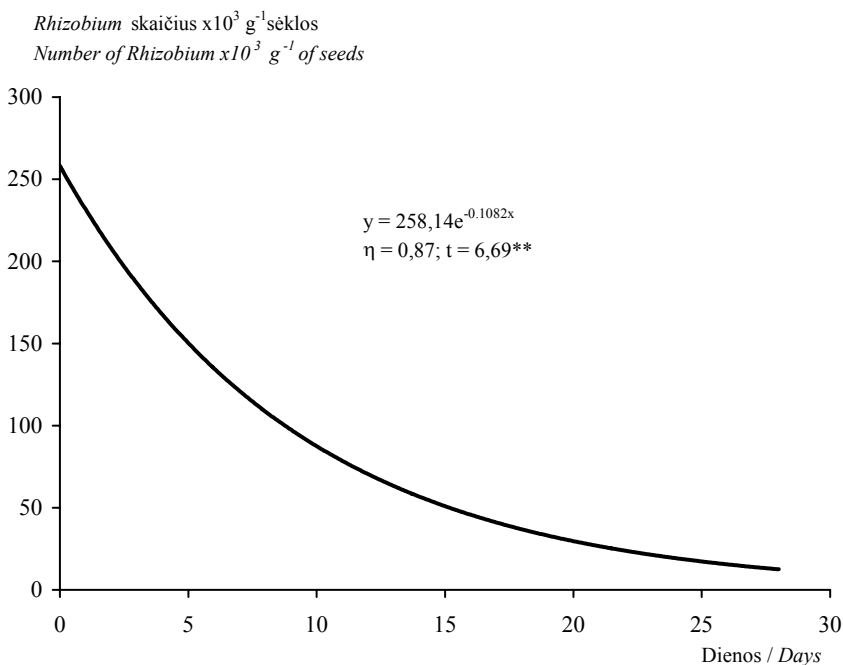


**2 paveikslas.** Temperatūros, laikymo terminų ir *Rhizobium galegae* skaičiaus bakterijų biomasėje ryšys

**Figure 2.** The relationship between temperature, storage terms and number of *Rhizobium galegae* in the bacterial biomass

Nitraginas, pagamintas iš biomasės ir laikytas 2 savaites šaldytuve, turėjo 11,3 milijono gyvų ląstelių  $\text{mL}^{-1}$ , o laikomo nitragino termostate titras siekė 6,2 milijono ląstelių  $\text{mL}^{-1}$ . Ilgiau negu dvi savaites laikyti biomasę nitragino gamybai rizikinga. Tokiu atveju būtina naudoti bent dvigubai didesnę išaugintos biomasės kiekį.

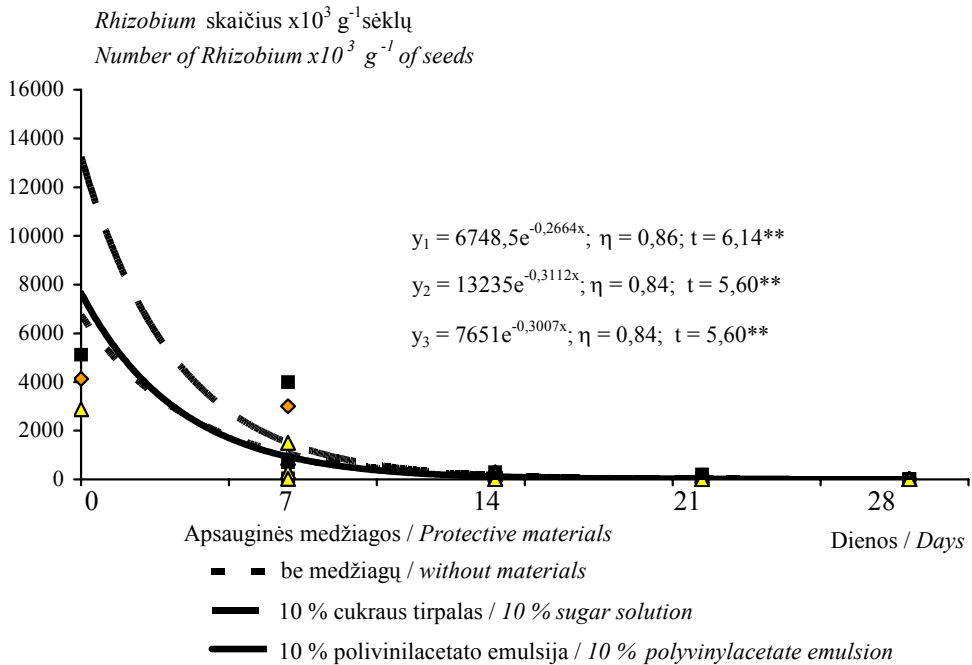
**Inokuliuotos sėklos laikymo terminai.** Inokuliuavus nitraginu ožiarūčius, gumbelinių bakterijų skaičius sėklos paviršiuje visą sėklos saugojimo laiką mažėjo (3 pav.). Sėklą inokuliuavus, kitą dieną gumbelinių bakterijų nustatyta 56 %, o po 3 dienų – tik 28 % pradinio jų skaičiaus, arba 150,7 tūkst.  $\text{g}^{-1}$  sėklos. Dar ilgiau – 7 dienas laikant inokuliuotą sėklą, bakterijų skaičius sumažėjo 52,6 tūkst.  $\text{g}^{-1}$ . Tokio *Rhizobium* kiekio dar gali pakakti efektyviam inokuliuvimui. Tuo tarpu po ilgesnio – 14-28 dienų – laikymo gumbelinių bakterijų teišliko 10-4 % pradinio jų skaičiaus. Jų buvo aiškiai per maža veiksmingam inokuliuvimui /Cleyet-Marel, 1988; Khotyanovitch, 1995/.



**3 paveikslas.** Inokuliuotos sėklos laikymo terminų ir *Rhizobium galegae* skaičiaus sėklos paviršiuje ryšys

**Figure 3.** The relationship between storage terms of inoculated seed and the number of *Rhizobiumgalegae* on the seed surface

**Apsauginių medžiagų reikšmė, inokuliuojant ožiarūčių sėklas.** Tyrimai rodo, kad pradinis gumbelinių bakterijų skaičius viename g sėklų skirtinguose bandymuose buvo nevienodas. Tai aiškinama tuo, kad buvo naudotas nitraginas, turintis skirtingą *Rhizobium* titrą (4 pav.). Inokuliuojant naudojant nitraginą su 10 % cukraus tirpalu, ant sėklų išsilaiko bakterijų 58 % daugiau, negu inokuliuojant vandens suspensija. Naudojant 10 % polivinilacetato emulsiją, bakterijų sėklų paviršiuje buvo beveik tiek pat, kaip ir be apsauginių medžiagų. Laikant paprastu nitraginu (be apsauginių medžiagų) inokuliuotas sėklas savaitę, sėklų paviršiuje išsilaiko gumbelinių bakterijų 1 % pradinio jų skaičiaus, o inokuliuojant 10 % polivinilacetato emulsija, – tik 0,5 % bakterijų. Ankstesniais liucernų tyrimais nustatyta, kad jei dirvožemyje nėra spontaninių gumbelinių bakterijų, dirbtinai inokuliuojant efektyviai simbiozei šių bakterijų pakanka 5 tūkst. ląstelių sėklai. Panašus bakterijų skaičius ant sėklų buvo likęs praėjus nuo inokuliuojimo vienai savaitei ir tik tuose variantuose, kur sėklos buvo inokuliuotos paprastu nitraginu arba nitraginu su 10 % cukraus tirpalu. Taigi teorinis minimalus gumbelinių bakterijų skaičius, galintis užtikrinti efektyvią simbiozę su ožiarūčiais, sudaro apie 130 tūkst. ląstelių  $\text{g}^{-1}$  sėklų. Toks titras gali išlikti tik saugant inokuliuotas ožiarūčių sėklas ne ilgiau kaip dvi savaites.



**4 paveikslas.** *Rhizobium galegae* skaičiaus priklausomumas nuo apsauginių medžiagų mitybinėje terpėje

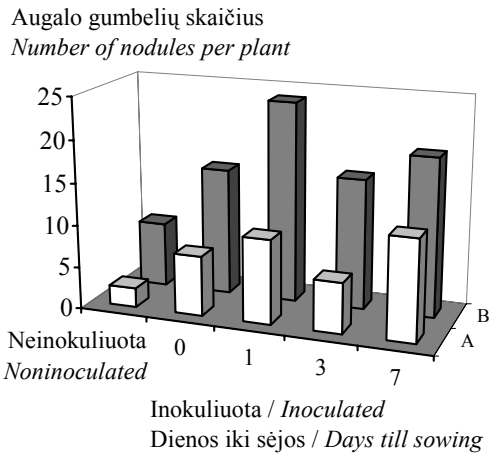
**Figure 4.** The relationship between the number of *Rhizobium galegae* and protective materials in the nutritive medium

**Ožiarūčių gumbeliai.** Ožiarūčių inokuliacija buvo veiksminga priemonė, formuojant augalų šaknyse gumbelius. Nuo nitratingo augalo susiformavo vidutiniškai 9 gumbeliai, o nitratingą naudojant su apsaugine medžiaga – 18 gumbelių, esant neinokuliuotų augalų 2 gumbeliams augalui (5 pav.). Reikia pažymėti, kad ir vienas 10 % cukraus tirpalas taip pat stimuliuoja gumbelių susidarymą augale (8 gumbeliai augalui). Tai rodo, kad ši apsauginė medžiaga stimuliuoja ir spontaninių gumbelinių bakterijų virulentiškumą bei azoto fiksaciją.

Gumbelinių bakterijų simbiozėje tarp *Rhizobium* efektyvumo ir augalo gumbelių skaičiaus nustatytas vidutinio stiprumo ryšys:  $r = 0,65$ ,  $t = 2,55^*$  ( $y = 1,11 + 0,072x$ ).

Ankstesni pašarinių pupų, liucernų ir kai kurie raudonųjų dobilų tyrimai rodo, kad didėjant ankštinių augalų ir gumbelinių bakterijų simbiozės efektyvumui, gausėja paprastų ir mažėja sudėtingų (šakotų formų) gumbelių santykinis skaičius /Lapinskas, 1998/. Šiuose ožiarūčių tyrimuose taip pat nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp simbiozės efektyvumo ir sudėtingų gumbelių procento:  $\eta = 0,71$ ,  $t = 3,00^*$  ( $y = -2,06 + 0,559x - 0,0024x^2$ ).





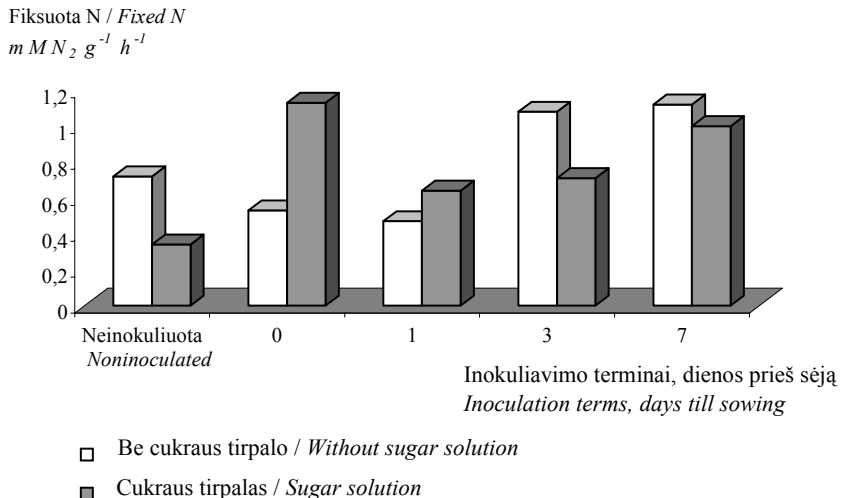
$R_{05} / LSD_{05} \ 6,7$

A - Be cukraus tirpalo / Without sugar solution

B - Cukraus tirpalas / Sugar solution

**5 paveikslas.** Inokuliacijos terminų ir būdų įtaka gumbelių susidarymui ožiarūčių šaknyse  
**Figure 5.** The impact of inoculation terms and methods on goat's rue nodulation

**Nitrogenazės aktyvumas.** Nitrogenazės aktyvumas (simbiotinio azoto fiksacija) buvo nustatytas ožiarūčių šaknyse ir gumbeliuose antrais žolių naudojimo metais (2000 m.). Vidutiniais tyrimų duomenimis, inokuliuojant vandens suspensija ar 10 % cukraus tirpale paruoštu preparatu, azoto fiksacija padidėjo 58 %, palyginus su neinokuliuotais augalais (6 pav.).



**6 paveikslas.** Nitrogenazės aktyvumas ožiarūčių gumbeliuose  
**Figure 6.** Nitrogenase activity in goat's rue nodules

Inokuliuojant augalus vandens ar cukraus tirpale paruošta gumbelinių bakterijų suspensija, didelių skirtumų nenustatyta. Pirmuoju atveju inokuliuotų augalų fermento nitrogenazės aktyvumas sudarė 0,80, antruoju – 0,87  $\mu\text{M N}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Taip pat fermento aktyvumas mažai priklausė ir nuo ožiarūčių inokuliacijos terminų. Tarp nitrogenazės aktyvumo (x) ir žalių baltymų masės (y) nustatytas vidutinio stiprumo koreliacinis ryšys:  $\eta = 0,58$ ,  $t = 2,00$  ( $y = 1603,8 - 2185,1x + 1483x^2$ ).

**Inokuliacijos efektyvumas.** Grynų ožiarūčių sausųjų medžiagų derliaus pokyčiai tarp inokuliuotų ir neinokuliuotų augalų rodo inokuliacijos efektyvumą, kuris sutampa su simbiotiniu efektyvumu (Milton, 1989; Gomez ir kt., 1997; Rice ir kt., 2000). Ožiarūčių simbiotinį efektyvumą lemė inokuliacijos terminai ir priklausė nuo žolių naudojimo metų (1 lentelė).

**1 lentelė.** Ožiarūčių sausųjų medžiagų derliaus priklausomumas nuo inokuliacijos terminų ir būdų

**Table 1.** Goat's rue dry matter yield in relation to inoculation terms and methods

Vėžaičiai, 1999-2002 m.

Variantas (inokuliacijos laikas) <i>Treatment (inoculation time)</i>	Sausųjų medžiagų derlius $\text{t ha}^{-1}$ <i>Dry matter yield <math>\text{t ha}^{-1}</math></i>					
	I n.m. <i>1st year of use</i>	II n.m. <i>2nd year of use</i>	III n.m. <i>3rd year of use</i>	IV n.m. <i>4th year of use</i>	I-II n.m. vidurkis <i>average of the 1st and 2nd years of use</i>	I-IV n.m. vidurkis <i>average of the 1st and 4th years of use</i>
Neinokuliuota <i>Noninoculated</i>	0,68	3,52	8,61	4,28	2,10	4,27
Sėjos diena <i>On the sowing day</i>	2,51	5,29	8,38	4,54	3,90	5,18
1 d. prieš sėją <i>1 day before sowing</i>	1,22	4,02	8,50	4,28	2,62	4,51
3 d. prieš sėją <i>3 days before sowing</i>	1,52	5,22	8,03	4,37	3,37	4,78
7 d. prieš sėją <i>7 days before sowing</i>	2,42	5,69	9,41	4,24	4,06	5,44
Apdorota 10% cukraus tirpalu (CT) <i>Treated with 10% sugar solution (CT)</i>	1,46	4,00	8,48	4,17	2,73	4,53
Sėjos diena, CT <i>On the sowing day, CT</i>	3,04	5,95	8,70	3,95	4,50	5,41
1 d. prieš sėją, CT <i>1 day before sowing, CT</i>	2,28	5,47	8,81	4,30	3,88	5,22
3 d. prieš sėją, CT <i>3 days before sowing, CT</i>	1,52	4,69	8,17	3,79	3,11	4,54
7 d. prieš sėją, CT <i>7 days before sowing, CT</i>	1,95	5,14	9,41	3,96	3,54	5,12
$R_{05} / LSD_{05}$	0,98	1,22	2,10	0,97	0,78	0,70

Pirmais žolių naudojimo metais buvo mažiausias neinokuliuotų augalų derlius ir didžiausias inokuliuotų; nuo nitragino sausųjų medžiagų derliaus priedas sudarė 1,86 t ha<sup>-1</sup>. Sėklos inokuliacija vieną ar tris dienas prieš sėją buvo daug mažiau efektyvus, negu inokuliuojant ir tą pačią dieną pasėjant. Tuo tarpu sėklą inokuliuojant 7 dienas prieš sėją, nitragino veiksmingumas toliau ne tik nemažėjo, bet prilygo inokuliacijai sėjos dieną. Tai galima paaiškinti tuo, kad sumažėjęs gumbelių bakterijų skaičius sėklų paviršiuje palyginti greitai (iki augalo infekavimo) dirvožemyje pasidaugino ir atsistatė. Tai visiškai galima, nes ožiarūčių sėklų apvalkalėlis, skirtingai nuo dobilų ar vikių, nepasižymi toksikiškumu gumbelinėms bakterijoms /Cleyet-Marel, 1988; Lapinskas, 1998/.

Sėklos apdorojimas 10 % cukraus tirpalu stimuliuojo neinokuliuotų augalų biomasės augimą ir neturėjo teigiamo poveikio inokuliuotiems augalams. Matyt, cukraus tirpalas netiesiogiai stimuliuojo augalų augimą, suaktyvinant spontaninių gumbelių bakterijų veiklą ir gumbelių susidarymą /Roughley, 1988/.

Antraisiais žolių naudojimo metais inokuliacijos efektyvumas išliko panašus kaip ir pirmaisiais metais. Visi inokuliacijos terminai buvo geri. Vidutinis inokuliacijos efektyvumas be cukraus tirpalo sudarė 1,54 t ha<sup>-1</sup>, bakterijų suspensiją ruošiant cukraus tirpale – 1,79 t ha<sup>-1</sup> ir statistiškai nesiskyrė.

Auginant ožiarūčius trečius ir ketvirtus naudojimo metus, inokuliacijos efektyvumas, nepriklausomai nuo jo terminų ir būdų, jau buvo neįrodomas. Todėl, siekiant teisingiau įvertinti augalų inokuliacijos efektyvumą, buvo apskaičiuoti pirmų ir antrų bei pirmų – ketvirtų žolių naudojimo metų vidutiniai duomenys. Pirmuoju atveju veiksmingiausias nitraginas buvo inokuliuojant sėjos dieną, trečią arba septintą dieną prieš sėją. Inokuliacijos ir kitą dieną pasėjus, teigiamų rezultatų negauta. Matyt, per parą išnykusių bakterijų skaičius sėklos paviršiuje nespėjo pasidauginti iki augalo infekavimo pradžios.

Sėklos apdorojimas 10 % cukraus tirpalu nei pirmų, nei antrų naudojimo metų, nei pirmų – ketvirtų metų vidutiniais duomenimis nebuvo naudingas. Todėl negalima sutikti su literatūriniais teiginiais, kad cukraus tirpalai padeda apsaugoti įnešamas gumbelines bakterijas nuo nepalankių dirvožemio sąlygų ir tuo padidinti bakterizacijos efektyvumą /Roughley, 1988; Rice ir kt., 2000/.

Žalių baltymų masė pirmais naudojimo metais labiausiai padidėjo, inokuliuojant ožiarūčius sėjos dieną be cukraus tirpalo – 352 kg ha<sup>-1</sup> ir naudojant cukraus tirpalą – 382 kg ha<sup>-1</sup> (2 lentelė). Antraisiais žolių naudojimo metais, žymiai padidėjęs augalų biomasei, nuo inokuliacijos išaugo ir žalių baltymų išėiga. Abejais naudojimo metais geriausi rezultatai gauti inokuliuojant sėjos dieną. Kitais terminais panaudotas nitraginas nors veikė kiek silpniau, tačiau turėjo teigiamą įtaką žalių baltymų susikaupimui.

Trečiais ir ketvirtais žolių naudojimo metais tik kai kurie inokuliacijos terminai ir deriniai su cukraus tirpalu padėjo padidinti žolių baltymingumą.

Per ketverius žolių naudojimo metus ožiarūčius inokuliuojant sėjos dieną statistiškai patikimai didėjo baltymų masė; kiek didesnis baltymų masės priedas gautas inokuliuojant 10 % cukraus tirpalu (281 kg ha<sup>-1</sup>) ir mažesnis – be cukraus tirpalo (196 kg ha<sup>-1</sup>). Paprastai, esant efektyvesnei simbiozei, augalai daugiau sukaupia ir žalių baltymų /Milton, 1989; Bzheumychov ir kt., 1999/.

**2 lentelė.** Ožiarūčių žalių baltymų masės priklausomumas nuo inokuliacijos terminų ir būdų  
**Table 2.** Crude protein mass in goat's rue dry yield in relation to inoculation terms and methods

Vėžaičiai, 1999-2002 m.

Variantas (inokuliacijos laikas) <i>Treatment (inoculation time)</i>	Žali baltymai kg ha <sup>-1</sup> / Crude protein kg ha <sup>-1</sup>					
	I n.m. <i>1st year of use</i>	II n.m. <i>2nd year of use</i>	III n.m. <i>3rd year of use</i>	IV n.m. <i>4th year of use</i>	I-II n.m. vidurkis <i>average of the 1st and 2nd years of use</i>	I-IVn.m. vidurkis <i>average of the 1st and 4th years of use</i>
Neinokuliuota <i>Noninoculated</i>	125	639	1334	655	382	689
Sėjos dieną <i>On the sowing day</i>	433	1036	1309	762	734	885
1 d. prieš sėją <i>1 day before sowing</i>	188	753	1399	680	471	755
3 d. prieš sėją <i>3 days before sowing</i>	277	923	1312	661	600	793
7 d. prieš sėją <i>7 days before sowing</i>	404	976	1540	753	690	918
Apdorota 10% cukraus tirpalu (CT) <i>Treated with 10% sugar solution (CT)</i>	256	670	1390	718	463	759
Sėjos dieną, CT <i>On the sowing day, CT</i>	508	1061	1595	713	784	969
1 d. prieš sėją, CT <i>1 day before sowing, CT</i>	404	955	1456	781	680	899
3 d. prieš sėją, CT <i>3 days before sowing, CT</i>	273	863	1416	639	568	798
7 d. prieš sėją, CT <i>7 days before sowing, CT</i>	355	1021	1529	712	688	904
<i>R<sub>05</sub> / LSD<sub>05</sub></i>	170	221	346	163	139	118

Ekonominiu požiūriu visi tirti inokuliacijos terminai bei jų deriniai su sėklos apdorėjimu cukraus tirpalu buvo naudingi (3 lentelė).

Per dvejus žolių naudojimo metus daugiausia grynųjų pajamų gauta bakterizuojant sėjos dieną – 291,0 Lt ha<sup>-1</sup> ir septynios dienos prieš sėją – 317,6 Lt ha<sup>-1</sup>. Labiausiai gryniosios pajamos sumažėjo, kai buvo inokuliuojama 1 diena prieš sėją. Matyt, susiję su tuo, kad laikant bakterizuotą sėklą, santykinai daugiausia gumbelinių bakterijų žūsta (44 %) per pirmąją po inokuliacijos parą (3 pav.).

Sėklą apdoroti 10 % cukraus tirpalu be sėklos inokuliacijos ekonomiškai neapsimoka, nes grynųjų pajamų priedas – 106,0 Lt ha<sup>-1</sup> statistiškai nepatikimas.

Ožiarūčius auginant ketverius naudojimo metus, visų tirtų inokuliacijos atvejų ekonominė nauda išliko panaši kaip ir auginant žoles dvejus metus. Tačiau ilgiau naudojant žolyną, grynųjų pajamų nuo inokuliacijos gauta dvigubai mažiau.

**3 lentelė.** Ožiarūčių inokuliacijos terminų ir būdų ekonominis įvertinimas  
**Table 3.** The economic estimation of goat's rue inoculation terms and methods  
 Vėžaičiai, 1999-2002 m.

Variantas (inokuliacijos laikas) <i>Treatment</i> (inoculation time)	Papildoma produkcija (17 % drėgnumo šienas) <i>Additional production</i> (hay of 17% moisture)		Išlaidos Lt ha <sup>-1</sup> <i>Expenses Lt ha<sup>-1</sup></i>			Grynosios pajamos Lt ha <sup>-1</sup> <i>Net</i> <i>profit</i> <i>Lt ha<sup>-1</sup></i>
	derlius t ha <sup>-1</sup> <i>yield</i> t ha <sup>-1</sup>	vertė Lt ha <sup>-1</sup> <i>value</i> Lt ha <sup>-1</sup>	nitraginas ir inoku- liavimas <i>nitragin</i> <i>and</i> <i>inocu- lation</i>	apdorojimas 10 % cukraus tirpalu <i>treated with</i> <i>10% sugar</i> <i>solution</i>	papildomai produkcijai sudoroti handling <i>of</i> <i>additional</i> <i>production</i>	
Neinokuliuota <i>Noninoculated</i>	–	–	–	–	–	–
Sėjos diena <i>On the sowing day</i>	2,17	325,5	12,8	–	21,7	291,0
1 d. prieš sėją <i>1 day before sowing</i>	0,63	94,5	12,8	–	6,3	75,4
3 d. prieš sėją <i>3 days before sowing</i>	1,53	229,5	12,8	–	15,3	201,4
7 d. prieš sėją <i>7 days before sowing</i>	2,36	354,0	12,8	–	23,6	317,6
Apdorota 10% cukraus tirpalu (CT) <i>Treated with 10% sugar</i> <i>solution (CT)</i>	0,76	114,0	–	0,45	7,6	106,0
Sėjos diena, CT <i>On the sowing day, CT</i>	2,89	433,5	12,8	0,10	28,9	391,7
1 d. prieš sėją, CT <i>1 day before sowing, CT</i>	2,14	321,0	12,8	0,10	21,4	286,7
3 d. prieš sėją, CT <i>3 days before sowing, CT</i>	1,22	183,0	12,8	0,10	12,2	157,9
7 d. prieš sėją, CT <i>7 days before sowing, CT</i>	1,73	259,5	12,8	0,10	17,3	229,3
R <sub>05</sub> / LSD <sub>05</sub>	0,94	141,4				125,7

### Išvados

1. Tyrimais nustatyta, kad ožiarūčių nitragino ir sėklos inokuliacijos kokybę lemia preparato ir bakterizuotos sėklos laikymo sąlygos bei trukmė.

2. Geros kokybės paruoštą nitraginą arba gumbelinių bakterijų biomasę nitragino gamybai, nepriklausomai nuo laikymo sąlygų (+4°C ar +26°C temperatūra), galima išsaugoti ne ilgiau kaip dvi savaites.

3. Laikant inokuliuotą ožiarūčių sėklą, po vienos dienos gumbelinių bakterijų skaičius sumažėja 44 %. Tinkamas bakterijų titras išsilaikė, saugant sėklą tiek be apsauginių medžiagų, tiek ir apdorojant su 10 % cukraus tirpalu, iki dviejų savaičių.

4. Visi inokuliacijos deriniai stimuliuoja gumbelių susiformavimą augalų šaknyse. Tarp gumbelių bakterijų efektyvumo ir augalo gumbelių skaičiaus bei sudėtingų gumbelių formavimosi nustatyti vidutinio stiprumo koreliaciniai ryšiai ( $r = 0,65^*$  ir  $\eta = 0,71^{**}$ ).

5. Inokuliuotos liucernos fiksavo azoto  $0,31 \mu\text{M N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , arba 58 % daugiau, negu neinokuliuotos. Tačiau dėl palyginti didelių analizės paklaidų tarp inokuliacijos terminų ir būdų statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta.

6. Auginant ožiarūčius ketverius naudojimo metus, didžiausias grynų žolių sausųjų medžiagų derlius nuo inokuliacijos gautas pirmais ir antrais naudojimo metais. Veiksmingiausias nitraginas buvo sėklą inokuliuojant sėjos dieną (derliaus priedas –  $1,80 \text{ t ha}^{-1}$ , grynosios pajamos –  $291,0 \text{ Lt ha}^{-1}$ ). Tačiau esant būtinybei, galima sėti ir praėjus net septynioms dienoms po inokuliacijos.

7. Ožiarūčių inokuliacija su gumbelių bakterijų apsaugine medžiaga – 10 % cukraus tirpalu – nepažeidžia suformuoti efektyvesnės simbiozės, palyginti su inokuliacijos vandens suspensija.

Gauta 2004 03 08  
Pasirašyta spaudai 2004 07 15

## LITERATŪRA

1. Abd-Alla Mohamed H. Nodulation and nitrogen fixation of faba bean plants as influenced by the inoculation method of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae strain RCR 1001 // Microbiology Research. - 1994, vol.149, No.1, p.65-68

2. Ambrazaitienė D. Biologinių priemonių naudojimas ankstyvųjų raudonųjų dobilų ir liucernų auginimui // Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI. - Akademija, 1995, t.48, p.67-71

3. Ambrazaitienė D. Gumbelių bakterijų naujų kamienų efektyvumo įvertinimas vasariniams vikiams // Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU. - Akademija, 2000, t.70, p.202-215

4. Ambrazaitienė D. Simbiotinio azoto fiksavimo aktyvumas skirtingo rūgštumo įvairiai tręštame nepasotintame balkšvažemyje // Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU. - Akademija, 2003, t.83, p.173-186

5. Battalov F.Z. Sel'skochozjajstvennaja produktivnost' klimata dlja jarovyč zernovyč kul'tur. - Leningrad, 1980. - 112 s.

6. Bzheumyčhov V.S., Kachykoev M.V., Tokbaev M.M. Azotfiksirujuščaja aktivnost' liucerny v zavisimosti ot vlažnosti počvy, aktivnosti štamma rizobij i obespečennosti elementami mineral'nogo pitaniija // Izvestija TSChA. - 1999, vyp.4, s.176-179

7. Cleyet-Marel J.C. Seed inoculation and inoculant technology// Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. - 1988, p.251-258

8. Gomez M., Silva N., Hartmann A. et al. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 1997, vol.13, No.2, p.167-173

9. Hamdy Y.A. Application of nitrogen – fixing systems in soil improvement and management // Soils Bulletin. - Rome, 1982, vol.49. - 188 p.

10. Khotyanovitch A.V. Nitrogen fixing bacterial inoculants production process and application for plant production // Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications.- Dordrecht, Boston, London, 1995, p.763

11. Klasens V. Symbiotic effectiveness of nodule bacteria in the soils of Latvia // The work of doctor habilitatis. - Jelgava, 1994. - 58 p.

12. Lapinskas E. Biologinio azoto fiksavimas ir nitraginas.-Akademija, 1998. -218 p.

13. Lapinskas E. Importance of ecological conditions for symbiotic nitrogen fixation in acid soils // Scientific Aspects of Organic Farming. - Jelgava, 2002, p.154-157

14. Lindström K. Analysis of factors affecting in situ nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) activity of Galega orientalis, Trifolium pratense and Medicago sativa in temperate conditions // Plant and Soil. - 1984, vol.79, No.2, p.329-341

15. Mil'to N.I. Biologyčeskij azot i povyšenie plodorodija počv // Problemy rasširennogo vosproizvodstva plodorodija počv v respublikach zapadnogo regiona. - Minsk, 1989, s.107-116
16. Pasyнков A.V., Lekomcev P.V. Effektivnost' preparatov na osnove asociativnoj i simbiotičeskoj azotifiksacii v agrocenozach // Problemy pitanija rastenij i ispol'zovanie udobrenij v sovremennyh uslovijach. - Minsk, 2000, s.376-380
17. Rice W.A., Clayton P.E., Olsen N.Z. et al. Rhizobial inoculant formulations and soil pH influence on field pea nodulation and nitrogen fixation // Canadian Journal of Soil Science. - 2000, vol.80, No.3, p.395-400
18. Roughley R.J. Legume inoculants, their technology and application // Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. - 1988, p.259-268
19. Sarand R., Laitamm H., Jaaniste I. Nitrogen fixation by different strains of *Rhizobium galegae* // Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications. - Dordrecht, Boston, London, 1995, p.732
20. Weaver R.W., Holf E.C. Short-term survival of rhizobia on arrowleaf clover seed sown at different depths // Plant and Soil. - 1990, vol.122, No.1, p.147-150

ISSN 1392-3196

Agriculture. Scientific articles, 2004, 4, 88, 183-197

UDK 576.851.155: 633.37

## **TERMS AND METHODS OF GOAT'S RUE SEED INOCULATION WITH BACTERIA (*RHIZOBIUM GALEGAE*) PREPARATIONS**

E.Lapinskas, D.Ambrazaitienė

### **S u m m a r y**

Major parameters of nitragine production and goat's rue inoculation were estimated in the laboratory and field experiments during the period 1997-2002.

The soil of the experimental site is classed as Dystri-Endohypogleyic Albeluvisol (J14-n), with a  $pH_{KCl}$  value of 5.4-5.8, humus content 1.81-1.87 %, available  $P_2O_5$  and  $K_2O$  135-148 and 122-140  $mg\ kg^{-1}$  soil, respectively.

Our experimental evidence suggests that the quality of nitragine and seed inoculation is affected by the storage conditions and period of the preparation and bacteria-treated seed as well as by the combination of seed inoculation with protective materials. Regardless of the storage conditions (+4°C or +26°C), high efficacy of nitragine preparation can be maintained for no longer than two weeks. Longer storage of the preparation or *Rhizobium* biomass, intended for nitragine production, is risky. When storing bacteria-treated seed, the proper bacterial titre persists for a week, and while inoculating with 10 % sugar solution –for two weeks.

The highest efficacy of nitragine was identified in the first and second year of use of goat's rue when the seed was inoculated on the sowing day and up to 7 days before sowing. Treatment of inoculated seed with 10 % sugar solution did not contribute to the enhancement of the symbiosis efficiency.

A medium strong correlation was identified between *Rhizobium* efficacy and number of plant nodules, and formation of complex nodules ( $r = 0.65$  and  $\eta = 0.71^{**}$ ).

All inoculation combinations were economically useful. During the two years of swards use net profit totalled up to 391.7  $Lt\ ha^{-1}$ .

Key words: *Rhizobium*, goat's rue, inoculum (nitragin), inoculation, inoculation terms and methods.