

***RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII* PAPLITIMAS IR SIMBIOTINIS EFEKTYVUMAS ĮVAIRIOS GENEZĖS DIRVOŽEMIUOSE SKIRTINGAI JUOS TRĘŠIANT**

Edmundas LAPINSKAS

Lietuvos žemdirbystės institutas

Vėžaičiai, Klaipėdos rajonas

El. p. edmundas@vezaiciai.lzi.lt

Santrauka

Dobilų gumbelių bakterijų paplitimas nustatytas Vėžaičiuose stacionarių lizimetru dirvožemių monolituose, kurie buvo suvežti iš įvairių šalies vietovių, o iš dobilų šaknų išskirtų štamų simbiotinis efektyvumas įvertintas vegetaciniuose bandymuose. Lengvesnės granulometrinės sudėties (rišlus smėlis, priemelis) dirvožemiuose gumbelių bakterijų rasta mažiau – 130–1300 cfu g⁻¹, sunkesnės sudėties (lengvas priemolis, lengvas molis) – daugiau – 130–300 000 cfu g⁻¹ dirvožemio. Dirvožemio kalkinimas be tręšimo nepadedą plisti dobilų gumbelinėms bakterijoms.

Neutralokos reakcijos (pH 6,5) mitybinėje terpėje gumbelinės bakterijos sudarė beveik dvigubai didesnes kolonijas nei rūgščioje terpėje (pH 5,0). Dirvožemio kalkinimas stimuliuoja gumbelių susiformavimą raudonųjų dobilų šaknyse, o mineralinės trąšos N₇₀P₈₀K₈₀ šį procesą slopino. Derlinguose rudžemiuose ir išplautžemiuose formuojasi labai virulentiški gumbelių bakterijų štamai.

Veiksmingiausi gumbelių bakterijų štamai buvo randami nekalkintuose, bet organinėmis trąšomis tręšiamuose lengvos granulometrinės sudėties dirvožemiuose arba kalkinamuose ir organinėmis bei mineralinėmis trąšomis tręšiamuose lengvo priemolio dirvožemiuose. Beveik visi gumbelių bakterijų štamai (išskyrus štamus: RA 1 ir RA 8) efektyviai (iki 30–75 %) didina simbiotinio azoto fiksaciją ir daugelis jų gerina kai kurias dirvožemio agrochemines savybes. Azoto fiksacijos požiūriu efektyviausi štamai: RA 12, RA 14 ir RA 16 buvo išskirti iš kalkinamo ir organinėmis trąšomis tręšiamo Vėžaičių balkšvažemio, taip pat iš Vokės ir Rumokų išplautžemių. Rūgščiuose nekalkintuose ir netręštuose arba vien mineralinėmis trąšomis tręštuose dirvožemiuose susiformavo silpnos azoto fiksacijos gebos gumbelių bakterijų populiacijos.

Reikšminiai žodžiai: *Rhizobium*, paplitimas, simbiotinis efektyvumas, azoto fiksacija, dirvožemio savybės.

Įvadas

Simbiotinio azoto fiksacija yra vienas reikšmingiausių biologinių procesų, kurių dėka kaupiamas atmosferos azotas, didinamas dirvožemio ir žemės ūkio augalų derlingumas, gerinama derliaus kokybė ir aplinkos ekologinė būklė /Martensson ir kt., 1984; Paul, Clark, 1989; Jensen, Schjoerring, 1997/. Priklausomai nuo gumbelių bakterijų ir ankštinio augalo bei dirvožemio ir klimato sąlygų, efektyvi simbiozė gali sukaupti azoto iki 400 kg ha⁻¹ ir daugiau per vegetaciją /Paul, Clark, 1989; Lapinskas, 1998/.

Mažiausiai jautrios aplinkos sąlygoms ir daugiausia paplitusios dobilų gumbelinės bakterijos. Europos valstybių dirvožemiuose vidutiniškai jų randama nuo 500 iki $2,258 \times 10^6$ cfu g⁻¹ dirvožemio /Smirnova, Čunderova, 1987; Bowman ir kt., 1998/. Efektyvių spontaninių gumbelinių bakterijų dirvožemiuose dėl daugelio priežasčių aptinkama palyginti nedaug. JAV dirvožemiuose liucernų efektyvios gumbelinės bakterijos sudaro tik 6 % šių bakterijų /Bottomley, Jenkins, 1983/. Lietuvoje atliktais tyrimais efektyvių liucernų bakterijų štamai tesudarė 7 %, pupų, žirnių ir vikių grupės bakterijų – 27 ir dobilų gumbelinių bakterijų – 30 % visų gumbelinių bakterijų /Lapinskas, 1995; 1998/.

Dobilų gumbelinių bakterijų optimalios saprotrofinio (ne simbiozėje) gyvenimo sąlygos dirvožemyje: pH_{KCl} 4,5–5,5, judrieji fosforo ir kalio junginiai – atitinkamai 50–100 ir 120–320 mg kg⁻¹ dirvožemio bei lengvai hidrolizuojamas azotas – 3–90 mg kg⁻¹ dirvožemio /Martensson ir kt., 1984; Klasen, 1994/. Panašūs dėsningumai nustatyti ir Lietuvoje atliktais bandymais, kai dirvožemio optimalus pH_{KCl} dobilų gumbelinių bakterijų paplitimui buvo 5,0–6,0; gumbelinių bakterijų buvo rasta vidutiniškai 332 tūkst. cfu g⁻¹ dirvožemio. Šių bakterijų kritinis pH_{KCl} laikomas 4,0–4,5 /Lapinskas, 1998/. Rūgščiuose dirvožemiuose susilpnėja gumbelinių bakterijų virulentiškumas, trumpiau funkcionuoja ankštinių augalų infekcinė gija ir susidarę gumbeliai greičiau nunyksta /Hamdi, 1982; Killham, Foster, 1992/. Dirvožemio pH, judrusis Al ir mineraliniai biogeninių elementų junginiai yra pagrindiniai veiksniai, lemiantys gumbelinių bakterijų paplitimą, jų štamų įvairovės formavimąsi, fermentų aktyvumą ir simbiotinį efektyvumą /Ewing, Robson, 1990/.

Todėl dirvožemio kalkinimas – viena veiksmingiausių priemonių, reguliuojančių ne tik simbiotrofinių mikroorganizmų paplitimą, bet ir jų efektyvumą. Vėžaičiuose E. Lenkšaitės ir V. Knašio tyrimais nuo vienos normos kalkių pagal dirvožemio hidrolizinį rūgštumą dobilų gumbelių skaičius padidėjo net 5 kartus, lyginant su nekalkintu dirvožemiu /Lenkšaitė, Knašys, 1986/. D. Zviagincevas su bendraautorais, apibendrinę daugiamečių tyrimų rezultatus, priėjo prie išvados, kad kalkinant rūgščius dirvožemius, padidinamas mineralinių trąšų krūvis iki: N – 90, P – 600 ir K – 75 kg ha⁻¹ nepakenkiant mikroorganizmų populiacijoms /Zviagincev ir kt., 1986/.

Tyrimų tikslas – nustatyti dobilų (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) gumbelinių bakterijų paplitimą bei jų simbiotinį efektyvumą skirtingos genezės dirvožemiuose, priklausomai nuo dirvožemio rūgštumo ir tręšimo mineralinėmis bei organinėmis trąšomis.

Tyrimų sąlygos ir metodai

Dobilų gumbelinių bakterijų paplitimui ištirti ir jų skirtingiems štamams išskirti iš raudonaisiais dobilais ir motiejukais užimto dirvožemio, pastarojo mėginiai vieną kartą 2004 m. pavasarį paimti iš Lietuvos žemdirbystės instituto Vėžaičių filialo ilgalaikių stacionarių lizimetrinių bandymų. Bandymams dirvožemio natūraliai susigulėję monolitai (1,0 m skersmens ir 1,1 m gylio) buvo atvežti iš įvairių Lietuvos vietovių, nurodytų lizimetrinių bandymų schemoje. Stacionarūs lizimetrai su automatiniu vandens lygio reguliavimu įrengti 1991 m. Šešių rotacijos narių sėjomainoje lizimetrų dirvožemis buvo kalkinamas dulkiomis klintmilčiais viena norma pagal dirvožemio hidrolizinį rūgštumą.

Bandymuose buvo auginami ir tręšiami tokie augalai:

1. Bulvės, $N_{120}P_{120}K_{150}$, mėšlas 60 t ha^{-1} .
2. Miežiai su raudonųjų dobilų ir motiejukų išėliu, $N_{60}P_{60}K_{60}$.
3. Raudonieji dobilai ir motiejukai (I n. metai), $P_{60}K_{60}$.
4. Raudonieji dobilai ir motiejukai (II n. metai), $N_{60}P_{60}K_{60}$.
5. Žieminiai rugiai, $N_{90}P_{90}K_{90}$, mėšlas 60 t ha^{-1} .
6. Miežiai, $N_{90}P_{90}K_{60}$.

Skirtingos prigimties ir įvairaus tręšimo lygių dirvožemiuose susiformavo jiems būdingos mikroorganizmų biocenozės, taip pat ir spontaninių gumbelinių bakterijų nevienodo gausumo ir simbiotinio efektyvumo populiacijos. Todėl įrengus lizimetrus, atsirado unikali galimybė iširti šiuos procesus.

Gumbelinių bakterijų štamai sunumeruoti pagal Vėžaičių filialo gumbelinių bakterijų kultūrų katalogą.

Stacionarius lizimetrus įrengė ilgametis filialo vyresnysis mokslo darbuotojas dr. Valensas Ežerinskas, vėliau tyrimus tęsė skyriaus vedėja habil. dr. Nijolė Daugėlienė ir šiuo metu jų vykdytojai: dr. Daiva Baltramaitytė ir dr. Kazimieras Katutis. Štamai sunumeruoti pagal Vėžaičių filialo *Rhizobium* katalogą.

Dirvožemių, iš kurių buvo išskirti štamai, charakteristika:

Štamai: RA 1–6, paprastasis pajaurėjęs išplautžemis, IDE-p (velėninis jaurinis silpnai pajaurėjęs smėlis), Perloja: 1. Ca_0 . 2. $Ca_0 + NPK$. 3. $Ca_0 +$ mėšlas. 4. Ca . 5. $Ca + NPK$. 6. $Ca + NPK +$ mėšlas.

Štamai: RA 7–12, nepasotintasis giliau glėjiškas balkšvažemis, Jlg 4-n (velėninis jaurinis glėjiškas lengvas priemolis, karbonatai 0,80 m gylyje), Vėžaičiai: 7. Ca_0 . 8. $Ca_0 + NPK$. 9. $Ca_0 +$ mėšlas. 10. Ca . 11. $Ca + NPK$. 12. $Ca +$ mėšlas.

Štamas RA 13, nepasotintasis giliau glėjiškas balkšvažemis JI 4-n (velėninis jaurinis glėjiškas priemolis ant priemolio), Juknaičiai.

Štamas RA 14, paprastasis pajaurėjęs išplautžemis, Ide-p (velėninis jaurinis priemolis ant žvyro), Vokė.

Štamas RA 15, giliau karbonatingas giliau glėjiškas rudžemis, RDg4-k2 (velėninis karbonatinis priemolis), Upytė.

Štamas RA 16, giliau glėjiškas karbonatingasis išplautžemis, IDk-g0 (velėninis jaurinis glėjiškas lengvas molis), Rumokai.

Šešialaukėje sėjomainoje lizimetrų dirvožemis buvo kalkinamas dulkiomis klintmilčiais viena norma pagal dirvožemio hidrolizinį rūgštumą ir jame pagal bandymų schemą buvo auginami bei tręšiami tokie augalai: 1. Bulvės, $N_{120}P_{120}K_{150}$, mėšlas 60 t ha^{-1} ; 2. Miežiai su raudonųjų dobilų ir pašarinių motiejukų išėliu, $N_{60}P_{60}K_{60}$; 3. Raudonieji dobilai ir pašariniai motiejukai (I n. m.), $P_{60}K_{60}$; 4. Raudonieji dobilai ir pašariniai motiejukai (II n. m.), $N_{60}P_{60}K_{60}$; 5. Žieminiai rugiai, $N_{90}P_{90}K_{90}$, mėšlas 60 t ha^{-1} ; 6. Miežiai, $N_{90}P_{90}K_{60}$. Per sėjomainos rotaciją dirvožemis buvo kasmet tręšiamas mineralinėmis $N_{70}P_{80}K_{80}$ ir organinėmis trąšomis – 10 t ha^{-1} galvijų mėšlo arba ekvivalentiškai $N_{50}P_{25}K_{60}$.

Gumbelinių bakterijų paplitimas ir štamų išskyrimas. Spontaninių *Rhizobium* skaičius dirvožemyje buvo nustatomas praskiedimų metodu nuo 1:10 iki $1:10^{-6}$ auginant raudonuosius dobilus 'Liepsna' dideliuose ($200 \times 20 \text{ mm}$) biologiniuose mėgintuvėliuose, kiekvienam dirvožemio praskiedimui imant po 2 mėgintuvėlius

/Lapinskas, 1998/. Dobilų gumbelinių bakterijų štamai buvo išskiriami iš mėgintuvėliuose išaugintų augalų gumbelių, vadovaujantis A. Novikovos ir B. Simarovo paruoštais metodais /Novikova, Simarov, 1979/.

Štamų biomasės augimo intensyvumas buvo nustatomas auginant kiekvieno štamo kolonijas ant žirnių agaro skirtingo rūgštumo (pH 5,0, 6,0 ir 6,5) mitybinėse terpėse Petri lėkštelėje /Lapinskas, 1998/. Gumbelinių bakterijų kolonijų vidutinis skersmuo apskaičiuotas iš 9 pakartojimų, o duomenys apdoroti dispersinės analizės būdu. Štamų tolerantiškumas rūgščiam dirvožemiui (pH 5,0) buvo nustatomas kolonijų skersmenį (mm) terpėje pH 5,0 dalinant iš kolonijų skersmens terpėje pH 6,5 ir dauginant iš 100.

Štamų simbiotinis efektyvumas. Žinomų (nitragininių) ir naujų gumbelinių bakterijų štamų simbiozė buvo įvertinama auginant raudonuosius dobilus bei juos inokuliuojant gumbelinių bakterijų štamais vegetaciniuose bandymuose. Tyrimų schema: 1. Neinokuliuota. 2. Nitragininis štamas 348a. 3. Nitragininis štamas R 91. 4–19. Nauji štamai. 20. Mineralinis azotas $N_{21} \text{ mg kg}^{-1}$ dirvožemio. Be to, kaip palyginamasis augalas simbiotinio azoto fiksacijai nustatyti, gretimuose vegetaciniuose induose buvo auginamos daugiametės svidrės. Taigi, į bandymų schemą buvo įjungti dar du papildomi varpinių žolių variantai: 21. Be azoto (N_0) ir 22. Mineralinis azotas (21 mg N kg^{-1} dirvožemio). Kontroliniame variante (neinokuliuota) buvo sėjama gumbelinėmis bakterijomis neapdorota raudonųjų dobilų sėkla. Nitragininis gumbelinių bakterijų štamas 348a buvo gautas iš Rusijos žemės ūkio mikrobiologijos mokslinio tyrimo instituto (St. Peterburgas). Nitragininis štamas R 91 gautas Vėžaičių filiale, išskiriant iš Šakių rajono dirvožemyje augusių raudonųjų dobilų gumbelių ir adaptuotas rūgščiam dirvožemiui, auginant pagal specialią metodiką /Lapinskas, 1998/. Nauji štamai buvo išskirti iš skirtingos genezės dirvožemių, suvežtų iš įvairių Lietuvos vietovių, įrengiant stacionarius lizimetrus Vėžaičiuose. Varianto „Mineralinis azotas“ dirvožemis buvo tręšiamas pagal D. Prianišnikovą, skiriant 0,25 normos arba 21 mg N kg^{-1} dirvožemio /Novikova, Simarov, 1979/.

Dobilų sėkla buvo inokuliuojama gumbelinių bakterijų štamo vandens suspensija, kurios titras ne mažesnis kaip 10^6 cfu ml^{-1} . Vegetaciniam 6,5 kg talpos indui buvo suvartojama 5 ml paruoštos bakterijų suspensijos.

Vegetaciniai bandymai buvo daromi 6,5 kg dirvožemio talpinančiuose Mitčerlichio tipo vegetaciniuose induose 4 pakartojimais. Vegetacinių bandymų dirvožemis – nepasotintasis giliau glejiškas balkšvažemis buvo imamas iš Samališkės laukų, kur raudonieji dobilai augo ne mažiau kaip prieš 5 metus. Dirvožemis, prieš pakraunant į vegetacinius indus, buvo persijojamas per $10 \times 10 \text{ mm}$ dydžio akutes turintį sietą ir tręšiamas pagal A. Sokolovą PK trąšomis (K_2HPO_4 ir KH_2PO_4) po 0,10 g P_2O_5 ir $K_2O \text{ kg}^{-1}$ dirvožemio /Sokolov, 1960/. Į kiekvieną indą 0,5 cm gilumu skylėta plokštele padarytose 33 duobutėse po vieną sėklą kiekvienoje buvo sėjami raudonieji dobilai (*Trifolium pratense* L.) ‘Liepsna’ ir kaip palyginamasis augalas – daugiametės svidrės (*Lolium perenne* L.) ‘Žvilgė’ arba ‘Sodrė’.

Dobilų šaknų gumbelių analizėms atsitiktine tvarka buvo atrenkama po 10 šaknų iš kiekvieno varianto ir suskaičiuojami gumbeliai.

Biologinio azoto fiksacija buvo nustatoma ankštinių ir varpinių augalų palyginamuoju (tiesioginiu) metodu /Hamdi, 1982; Killham, Foster, 1992/ ir netiesioginiu –

apskaičiuota pagal Hopkinsą - Piterą /Hamdi, 1982/. Pirmuoju atveju raudonųjų dobilų simbiotinio azoto fiksacija buvo nustatyta pagal formulę /Hamdi, 1982/:

$$F_n = (U_n + R_n) - (U_s + R_s), \text{ kur:}$$

F_n – fiksuotas azotas, U_n – bendrasis azotas dobilų antžeminėje dalyje, R_n – bendrasis azotas dobilų šaknyse, U_s – bendrasis azotas daugiamečių svidrių antžeminėje dalyje ir R_s – bendrasis azotas daugiamečių svidrių šaknyse (mg N indo^{-1}).

Pagal Hopkinsą - Piterą raudonųjų dobilų simbiotinio azoto fiksacija apskaičiuota:

$$F_n = (U_n + R_n) \times 0,65.$$

Visi duomenys, išskyrus procentinę jų išraišką, buvo apdorojami dispersinės analizės, o kai kurie – netiesioginių skirtumų metodais. Gumbelių bakterijų štamų efektyvumo ir įvairių parametrų ryšys bei dėsningumai buvo nustatyti koreliacijos ir regresijos metodais /Tarakanovas, Raudonius, 2003/.

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Gumbelių bakterijų paplitimas. Tyrimų rezultatai rodo, kad įvairių vietovių ir skirtingos genezės dirvožemiuose dobilų gumbelių bakterijų populiacijos yra paplitusios labai nevienodai (1 lentelė). Mažiausiai gumbelių bakterijų (tik 250 cfu g^{-1}) aptikta Perlojos smėliuose, o daugiausia ($300 \text{ tūkst. cfu g}^{-1}$) – Vėžaičių pakalkintame ir kasmet vidutiniškai po $N_{70}P_{80}K_{80}$ per sėjomainos rotaciją tręšiamame lengvame priemolyje. Gauti tyrimų duomenys buvo nelaukti, juolab derlingiausiuose Upytės ir Rumokų dirvožemiuose dobilų gumbelių bakterijų populiacijos buvo žymiai mažesnės ir sudarė vidutiniškai $13 \text{ tūkst. cfu g}^{-1}$ dirvožemio. Tai galima paaiškinti tuo, kad dobilų gumbelinės bakterijos savo saprofitiniam gyvenimui dirvožemyje, palyginti su kitų rūšių bakterijomis, yra daugiau tolerantiškos nepalankioms ekologinėms sąlygoms /Martensson ir kt., 1984; Lapinskas, 1995/. Tuo tarpu raudonieji dobilai šešialaukėje sėjomainos rotacijoje sudarė 3 laukus, arba 50 %, t. y. joje susidarė palankios sąlygos plisti spontaninėms gumbelinėms bakterijoms. Dirvožemio kalkinimas be tręšimo, nepriklausomai nuo dirvožemio granulometrinės sudėties, nepadėjo pagausinti gumbelių bakterijų populiacijos. Rūgštų nekalkintą Perlojos smėlio dirvožemį tręšiant mineralinėmis arba organinėmis trąšomis, gumbelių bakterijų skaičius didėjo nuo 250 iki $13 \text{ tūkst. cfu g}^{-1}$. Ir atvirkščiai, rūgštaus nekalkinto Vėžaičių lengvo priemolio dirvožemio tręšimas tiek mineralinėmis, tiek ir organinėmis trąšomis žymiai sumažino dobilų gumbelių bakterijų skaičių. Matyt, rūgščiaame dirvožemyje nuo tręšimo staigiai pagausėjus biogeninių elementų, sparčiau už gumbelines bakterijas pradėjo daugintis amonifikuojantys ir mineraliniu azotu mintantys mikroorganizmai, ypač sporinės bakterijos, kurios galėjo nustelbti pirmąsias /Pialukaitė Motuzienė ir kt., 2005/. Kitoks vaizdas susidarė kalkintame dirvožemyje, kur nuo mineralinių arba organinių trąšų įvyko dobilų gumbelių bakterijų populiacijos sukcesija, dėl ko jų skaičius staigiai išaugo nuo 30 tūkst. iki $250 \text{ tūkst.} - 300 \text{ tūkst. cfu g}^{-1}$.

1 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* naujiems štamams išskirti raudonųjų dobilų augimo dirvožemio charakteristika ir gumbelinių bakterijų paplitimas

Table 1. Characteristics of the soil in which red clover was cultivated and from which new strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* were isolated and the distribution of legume bacteria in the soil

Štamai Strain	Augimvietės dirvožemio charakteristika Soil characteristics		<i>Rhizobium</i> paplitimas cfu g ⁻¹ dirvožemio <i>Rhizobium</i> distribution cfu g ⁻¹ of soil
	dirvožemio grupė, granulometrinė sudėtis ir vietovė soil group, granulometric composition and locality	lizimetrinio dirvožemio kalkinimas ir tręšimas liming and fertilizing of lizimetric soil	
RA 1	IDe-p, smėlis, Perloja <i>LVe-ha, sand, Perloja</i>	Ca ₀	250±20,8
RA 2	„	Ca ₀ + N ₇₀ P ₈₀ K ₈₀ kasmet / per year	13000±871
RA 3	„	Ca ₀ + mėšlas 60 t ha ⁻¹ per 6 metus <i>Ca₀+manure 60 t ha⁻¹ per 6 years</i>	6000±486
RA 4	„	Ca	130±12,2
RA 5	„	Ca + N ₇₀ P ₈₀ K ₈₀ kasmet / per year	1 300±94,9
RA 6	„	Ca + mėšlas 60 t ha ⁻¹ per 6 metus <i>Ca+manure 60 t ha⁻¹ per 6 yeas</i>	9 000±612
RA 7	Jlg 4-n, lengvas priemolis, Vėžaičiai <i>ABg-n-w-eu light loam, Vėžaičiai</i>	Ca ₀	3 000±252
RA 8	„	Ca ₀ + N ₇₀ P ₈₀ K ₈₀ kasmet / per year	130±12,9
RA 9	„	Ca ₀ + mėšlas 60 t ha ⁻¹ per 6 metus <i>Ca₀+manure 60 t ha⁻¹ per 6 years</i>	600±52,2
RA 10	„	Ca	30000±1860
RA 11	„	Ca + N ₇₀ P ₈₀ K ₈₀ kasmet / per year	300000±14400
RA 12	„	Ca + mėšlas 60 t ha ⁻¹ per 6 metus <i>Ca+manure 60 t ha⁻¹ per 6 years</i>	250000±13250
RA 13	Jlg 4-n, priemolis ant priemolio, Juknaičiai <i>ABg-n-w-eu sandy loam on loam, Juknaičiai</i>	–	60000±5580
RA 14	IDe-p, priemolis ant žvyro, Vokė <i>LVA-gld-w, sandy loam on gravel, Vokė</i>	–	6000±528
RA 15	RDg 4-k2, lengvas priemolis, Upytė <i>CMg-n-w-can, light loam, Upytė</i>	–	13000±793
RA 16	IDk-g 0, lengvas molis, Rumokai <i>LVk-gld-w, light clay, Rumokai</i>	–	130000±6110

Štamų kolonijų augimo intensyvumas. Iš įvairių dirvožemių išskirti dobilų gumbelinių bakterijų štamai buvo tiriami skirtingo rūgštumo (pH 5,0, 6,0 ir 6,5) mitybinėse terpėse, siekiant įvertinti bakterijų tolerantiškumą rūgščiai reakcijai.

Auginant rūgščios (pH 5,0) mitybinės agarų terpės paviršiuje, bakterijos, atsizvelgiant į štamą, suformavo nuo 3,5 iki 5,6 mm skersmens kolonijas (2 lentelė). Dirvožemio kalkinimas ir tręšimas organinėmis trąšomis neturėjo kiek didesnės įtakos kolonijų dydžiui. Tačiau pastebėta, kad nuo ilgalaikio mineralinio tręšimo dirvožemyje susiformuoja štamai, augantys mažesnėmis kolonijomis, nei visiškai netręšiant ar tręšiant organinėmis trąšomis. Vis dėl to gumbelinių bakterijų štamai iš Vokės ir Rumokų išplautžemių bei Upytės rudžemių sudarė vidutiniškai 5,2 mm dydžio kolonijas, arba 13 % stambesnes už visų tirtų štamų kolonijas vidutiniškai (4,6 mm).

2 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingos kilmės štamų kolonijų dydžio priklausomumas nuo mitybinės terpės pH

Table 2. Colony size of the strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* of different origin in relation to the pH of the nutrient medium

Štamai Strains	Terpės pH ir kolonijų dydis mm <i>Medium pH and colony size mm</i>			Štamų tolerantiškumas pH 5,0 % <i>Strain tolerance to pH 5.0 %</i>
	5,0	6,0	6,5	
348a	4,9	7,8	9,1	53,8
R 91	3,6	6,8	8,2	43,9
RA 1	4,7	7,8	10,2	46,1
RA 2	3,7	6,7	8,8	42,0
RA 3	4,8	7,3	8,9	53,9
RA 4	3,5	7,5	9,7	36,1
RA 5	4,3	7,5	9,1	47,2
RA 6	4,6	6,9	8,5	54,1
RA 7	5,6	8,3	10,0	56,0
RA 8	4,4	7,5	8,5	51,8
RA 9	4,6	8,9	9,0	51,1
RA 10	5,2	8,0	8,5	61,2
RA 11	4,9	8,4	8,3	59,0
RA 12	4,6	7,2	8,7	52,9
RA 13	4,2	6,8	10,6	39,6
RA 14	5,4	6,7	9,1	59,3
RA 15	5,2	6,9	8,6	60,5
RA 16	5,3	9,0	10,2	52,0
R_{05} / LSD_{05}	0,64	0,77	1,20	

Neutraloko rūgštumo (pH 6,0) mitybinėje terpėje visų štamų kolonijos buvo net 63 % stambesnės, t. y. išaugino daugiau biomasės, lyginant su rūgščioje terpėje išaugusiomis kolonijomis, ir sudarė nuo 6,7 iki 8,9 mm. Mineralinės N₇₀P₈₀K₈₀ trąšos nekalbant apie dirvožemio kalkinimą aiškiai slopino gumbelinių bakterijų vystymąsi tiek Perlojos smėlio, tiek ir Vėžaičių lengvo priemolio dirvožemyje. Tuo tarpu kalkintame dirvožemyje mineralinės trąšos jau neturėjo neigiamo poveikio bakterijų kolonijų dydžiui.

Neturima žinių, kad mineralinės fosforo ir kalio trąšos kenktų gumbelinėms bakterijoms. Atvirkščiai, dirvožemio fosforo ir kalio junginiai stimuliuoja šių bakterijų vystymąsi saprofitiniame gyvenime ir simbiozėje su ankštiniais augalais /Mikanova, 2003/. Tačiau mineralinis azotas, ypač azoto trąšos, tręšiant didesnėmis kaip N_{30-40} normomis, slopina gumbelių bakterijų vystymąsi, gumbelių formavimąsi, taip pat ir simbiotinio azoto fiksaciją /Martensson, Rydberg, 1996/.

Toliau didėjant mitybinės terpės pH iki 6,5, didėjo ir visų gumbelių bakterijų dydis kolonijų, kurios buvo beveik dvigubai stambesnės, nei bakterijas auginant rūgščioje (pH 5,0) terpėje. Esant dirvožemio rūgštumui pH 6,5, nei kalkinimas, nei mineralinės ar organinės trąšos jau neturėjo kiek didesnės įtakos susiformavusių bakterijų štamų kolonijų dydžiui, t. y. jų biomasės augimo intensyvumui.

Dobilų gumbelių bakterijų skirtingų štamų tolerantiškumas mitybinės terpės rūgščiai reakcijai buvo labai nevienodas ir svyravo nuo 36,1 iki 61,2 %. Reikia pažymėti, kad rūgščiai reakcijai tolerantiškiausi štamai (RA 10, RA 11 ir RA 15) buvo išskirti ne iš rūgščių, kaip buvo tikėtasi, bet iš pakalkintų balkšvazemių (Vėžaičiai) arba rudžemių (Upytė). Šiuose dirvožemiuose buvo randamos palyginti tirštos gumbelių bakterijų populiacijos, kuriose galėjo dažniau pasitaikyti ir rūgščiai reakcijai tolerantiškų šių bakterijų formų /Smirnova, Čunderova, 1987/.

Štamų virulentiškumas. Gumbelių bakterijų štamai, sudarantys greičiau ir daugiau gumbelių ankštinių augalų šaknyse, laikomi virulentiškesniais. Manoma, kad bakterijų virulentiškumas nelemia jų simbiotinio efektyvumo, tačiau sudaro sąlygas daugiau sukaupti azoto iš atmosferos /Koc', 2001/.

Vegetacinių bandymų (2005–2006 m.) duomenys rodo, kad nuo dobilų inokuliacijos, neatsižvelgiant į štamą, didėjo gumbelių skaičius augalo šaknyse vidutiniškai nuo 21 iki 48 % (3 lentelė).

Tačiau skirtingos prigimties štamų virulentiškumas buvo nevienodas. Dirvožemio kalkinimas visais atvejais stimuliuoja bakterijų gumbelių formavimąsi dobilų šaknyse. Tuo tarpu mineralinės trąšos ir, reikia manyti, jų sudėtyje esantis azotas slopina bakterijų štamų savybę formuoti gumbelius. Tręšimas organinėmis trąšomis neturėjo neigiamo poveikio štamų gumbelių susidarymui, bet ir nestimuliuoja šio proceso.

Startinė azoto norma (N_{21} mg kg^{-1} dirvožemio) teigiamai veikė gumbelių formavimąsi ir nuo tręšimo jų susidarė net 34 % daugiau, lyginant su kontroliniu variantu. Manoma, kad nedidelė azoto norma teigiamai paveikė augalo fotosintezės procesus, nuo ko galėjo per šaknis daugiau išsiskirti tirpių sacharidų dirvožemio spontaninėms ir jau infekciniame procese dalyvaujančioms gumbelinėms bakterijoms /Mandrovskaja ir kt., 1995/. Įdomu pažymėti, kad Upytės rudžemyje ir Rumokų išplautžemyje, t.y. derlinguose dirvožemiuose susiformavo palyginti aukšto virulentiškumo štamai.

Vadinasi, dirvožemio kalkinimas ir apskritai jo kultūrinimo priemonės formuoja gumbelių bakterijų virulentiškesnių štamų paplitimą ir sudaro prielaidą efektyvesnei simbiotinio azoto fiksacijai.

3 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingų štamų poveikis gumbelių susiformavimui raudonųjų dobilų šaknyse

Table 3. The impact of different strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* on nodule formation in red clover roots

Variantas <i>Treatment</i>	Augalo gumbelių skaičius / <i>Number of nodules per plant</i> ¹			sant. skaič. <i>relative values</i>
	2005 m.	2006 m.	vidurkis / <i>average</i>	
	vnt. augalo ⁻¹ / <i>unit per plant</i> ¹			
Neinokuliuota / <i>Uninoculated</i>	20,0	49,8	34,9	100
Štamas 348a / <i>Strain 348a</i>	37,6	66,0	51,8	148
R 91	21,5	62,7	42,1	121
RA 1	29,8	58,1	44,0	126
RA 2	24,3	48,4	36,4	104
RA 3	40,8	57,7	49,2	141
RA 4	64,6	51,1	57,8	166
RA 5	32,8	68,3	50,6	145
RA 6	56,2	57,8	57,0	163
RA 7	39,8	45,3	42,6	122
RA 8	27,1	48,4	37,8	108
RA 9	30,8	64,9	47,8	137
RA 10	52,9	64,2	58,6	168
RA 11	31,2	55,0	43,1	123
RA 12	20,2	57,8	39,0	112
RA 13	29,8	55,6	42,7	122
RA 14	23,3	52,6	38,0	109
RA 15	38,3	65,8	52,0	149
RA 16	27,4	66,1	51,8	148
N ₂₁ mg kg ⁻¹	24,5	56,4	40,4	116
R ₀₅ / <i>LSD</i> ₀₅	12,05	13,41	12,75	

Štamų simbiotinis efektyvumas. Inokuliacija, nepriklausomai nuo gumbelių bakterijų štamo, turėjo teigiamą poveikį augalų *antžeminės dalies* sausųjų medžiagų derliui (4 lentelė). Nauji štamai savo simbiotiniu efektyvumu buvo vidutiniškai 9 % veiksmingesni už nitragininį štamą 348a, prilygo kitam nitragininiam štamui R 91 ir gautas sausųjų medžiagų derliaus priedas, lyginant su neinokuliuotais augalais, sudarė 20 %. Vertinant pagal augalų *antžeminės dalies* derlių, vien dirvožemio kalkinimas be tręšimo nepadarė suformuoti veiksmingesnių štamų nei smėlio, nei lengvo priemolio dirvožemyje. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad lengvos granulometrinės sudėties dirvožemyje veiksmingiausi štamai buvo gauti ne kalkinant, bet tręšiant organinėmis trąšomis. Tuo tarpu lengvame priemolyje efektyvesni štamai susiformavo, kai dirvožemis buvo kalkinamas ir tręšiamas ne organinėmis, bet mineralinėmis trąšomis. Tokiame dirvožemyje nuo organinių trąšų nepastebėta teigiamo poveikio veiksmingesnių štamų susiformavimui. Rudžemyje buvo išskirtas efektyvus štamas (RA 15), tačiau savo veiksmingumu atsiliko nuo kalkintame ir mineralinėmis trąšomis tręšiamame balkšvažemyje išskirto štamo.

4 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingų štamų poveikis raudonųjų dobilų biomasei

Table 4. *The impact of different strains of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* on the biomass of red clover

Variantas <i>Treatment</i>	Dobilų saus. medž. biomasė / <i>Plant DM biomass</i>			sant. skaičiai <i>relative values</i>
	antžeminė dalis <i>overground part</i>	šaknys <i>root</i>	augalo biomasė <i>plant biomass</i>	
	g indo ⁻¹ / g per pot ⁻¹			
Neinokuliuota / <i>Uninoculated</i>	14,96	3,24	18,20	100
Štamas 348a / <i>Strain 348a</i>	16,64	3,52	20,16	111
Štamas R 91 / <i>Strain R 91</i>	17,80	3,93	21,72	119
RA 1	16,36	3,38	19,74	108
RA 2	13,94	3,44	17,38	96
RA 3	17,29	4,20	21,48	118
RA 4	16,50	3,75	20,24	111
RA 5	16,86	3,89	20,74	114
RA 6	16,04	3,48	19,53	107
RA 7	17,10	3,76	20,86	115
RA 8	15,64	3,45	18,60	102
RA 9	17,32	3,47	20,80	114
RA 10	17,19	3,88	21,07	116
RA 11	18,53	4,98	23,51	129
RA 12	16,98	4,34	21,32	117
RA 13	17,50	3,98	21,48	118
RA 14	17,74	3,94	21,69	119
RA 15	17,92	4,02	21,94	121
RA 16	17,12	3,36	20,48	112
N ₂₁ mg kg ⁻¹	16,91	3,69	20,86	115
	Daugiametės svidrės / <i>Lolium perenne</i>			
N ₀	5,69	1,86	7,55	100
N ₂₁ mg kg ⁻¹	9,52	3,00	12,52	165
	R ₀₅ / LSD ₀₅	1,39	0,65	1,53

Startinė mineralinio azoto norma stimulavo neinokuliuotų raudonųjų dobilų augimą ir jų antžeminės dalies sausųjų medžiagų derlių vidutiniškai 13 %.

Simbiotinio azoto fiksacijai nustatyti kaip palyginamasis augalas parinktos varpinės žolės – daugiametės svidrės. Be azoto trąšų svidrės augo silpnai ir jų antžeminės dalies sausųjų medžiagų derlius tesiekė 5,69 g indo⁻¹. Nuo startinės azoto normos derlius padidėjo 67 %.

Šaknų masė. Dobilų inokuliacija turėjo teigiamą poveikį ne tik augalų antžeminės dalies, bet ir šaknų augimui. Priklausomai nuo štamo prigimties ir efektyvumo, šaknų sausųjų medžiagų masė kito nuo 3,36 iki 4,98 g indo⁻¹, arba 4–54 %, lyginant su kontroliniu variantu (4 lentelė).

Kalkinant Perlojos smėlio dirvožemį, pastebėtas jame išskirto štamo RA 4 teigiamas poveikis dobilų šaknų augimui, ko nenustatyta kalkinant Vėžaičių lengvo prie-

molio dirvožemį (štamai RA 10). Mineralinės $N_{70}P_{80}K_{80}$ trąšos skirtinguose dirvožemiuose taip pat nevienodai veikė štamų efektyvumą ir augalų šaknų masės formavimąsi. Nekalkintame smėlio dirvožemyje mineralinės trąšos neturėjo jokios įtakos, o lengvame priemolyje išskirtas štamai aiškiai slopino šaknų vystymąsi. Tuo tarpu mėšlas abiejuose dirvožemiuose šaknų vystymąsi veikė teigiamai.

Dobilų biomasė. Raudonųjų dobilų inokuliacija, nepriklausomai nuo štamai, buvo veiksmingas augalų biomasės augimas (4 lentelė). Smėlio dirvožemyje paplitusių spontaninių gumbelinių bakterijų efektyvumas padidėjo tik tręšiant mėšlu (60 t ha^{-1} šešialaukėje sėjomainos rotacijoje). Kalkinimas ir mineralinės trąšos šiame dirvožemyje nepadėjo suaktyvinti gumbelinių bakterijų. Atvirkščiai, lengvo priemolio kalkinimas bei derinant tręšimą su mineralinėmis arba organinėmis trąšomis, pasiektas gumbelinių bakterijų žymus aktyvumo padidėjimas. Didžiausia dobilų biomasė ($23,51 \text{ g indo}^{-1}$, arba 29 % didesnė nei kontroliniai augalai) išaugo, inokuliuojant štamai iš kalkinto ir $N_{70}P_{80}K_{80}$ tręšto dirvožemio. Nauji štamai iš Juknaičių, Vokės ir Upytės veiksmingumu pralenkė nitragininį štamai 348a ir prilygo kitam nitragininiam štamai R 91.

Mineralinio azoto dozė $N_{21} \text{ mg kg}^{-1}$ dirvožemio taip pat stimulavo dobilų biomasės susikaupimą, tačiau statistiškai patikimai atsiliko nuo efektyviausių štamai (R 91, RA 3, RA 11, RA 13, RA 14 ir RA 15). Į mineralinį azotą labiausiai reagavo daugiametės svidrės, padidinusios savo biomasę 65 %.

Simbiotinio azoto fiksacija. Vienas vertingiausių gumbelinių bakterijų veiklos rodiklių yra simbiotinio azoto fiksacija, kuri buvo nustatyta dviem mikrobiologinėje praktikoje pripažintais metodais: ankštinių ir varpinių augalų palyginamuoju arba vadinamu tiesioginiu ir apskaičiavimo būdu pagal Hopkinsą - Piteršą /Hamdi, 1982; Paul, Clark, 1989/.

Tiesioginis metodas. Tyrimų rezultatai rodo, kad absoliuti dauguma inokuliacijai panaudotų efektyvių štamai veiksmingai didino simbiotinio azoto fiksaciją vidutiniškai nuo 364 iki $489 \text{ mg N indo}^{-1}$, arba 30–75 % daugiau už neinokuliuotus augalus ($280 \text{ mg N indo}^{-1}$) (5 lentelė). Atmosferos azotą aktyviai fiksavo nitragininiai štamai 348a ir R 91, taip pat naujai gauti štamai iš pakalkinto ir organinėmis trąšomis tręšiamo Vėžaičių balkšvažemio (RA 12), Vokės (RA 14) ir Rumokų (RA 16) išplautžemių. Pastebėtina tai, kad rūgščiuose nekalkintuose ir netręštuose arba mineralinėmis $N_{70}P_{80}K_{80}$ trąšomis tręštuose dirvožemiuose susiformavo silpnos azoto fiksacijos gebos gumbelinių bakterijų populiacijos (štamai: RA 1, RA 2 ir RA 8).

Mineralinis azotas, nors veiksmingai didino raudonųjų dobilų biomasę ir bendrojo azoto susikaupimą derliuje bei šaknyse, simbiotinio azoto fiksacijai neturėjo jokio poveikio.

Netiesioginis metodas. Simbiotinio azoto fiksaciją apskaičiuojant supaprastintu metodu pagal Hopkinsą-Piteršą, gauti kiek sumažinti skaičiai, lyginant su tiesioginiu metodu, tačiau abiem atvejais skirtingų štamai poveikio dėsningumai išliko panašūs (5 lentelė). Azoto fiksacijos požyriui veiksmingiausi buvo nitragininiai štamai 348a ir R 91 bei jau minėti nauji štamai: RA 12, RA 14 ir RA 16.

Šiuo metodu skaičiuojant, kiek geresnius rezultatus, lyginant su tiesioginiu metodu, parodė startinio azoto dozė (21 mg N kg^{-1} dirvožemio); azoto fiksacijos aktyvumas padidėjo vidutiniškai 22 %. Tuo tarpu azoto fiksaciją nustatant tiesioginiu metodu, nuo mineralinio azoto panaudojimo fiksuoto azoto nepagausėjo.

5 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingų štamų simbiotinio azoto fiksacija
Table 5. *The biological nitrogen fixation by different strains of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Variantas <i>Treatment</i>	Fiksuota azoto mg N indo ⁻¹ <i>Fixed nitrogen mg N pot⁻¹</i>		N _t / N _n	Biologinio azoto % <i>Biological N %</i>
	tiesiog. metodas N _t <i>direct method</i>	netiesiog. metodas N _n <i>indirect method</i>		
Neišokuliuota / <i>Uninoculated</i>	280	258	1,08	70,7
Štamas 348a / <i>Strain 348a</i>	468	379	1,23	80,1
R 91	461	374	1,23	80,0
RA 1	266	249	1,07	69,6
RA 2	312	278	1,12	72,9
RA 3	432	356	1,21	78,8
RA 4	364	312	1,17	75,8
RA 5	454	371	1,22	79,5
RA 6	408	340	1,20	77,9
RA 7	369	316	1,17	76,1
RA 8	284	260	1,09	71,0
RA 9	397	334	1,19	77,4
RA 10	406	339	1,20	77,8
RA 11	372	318	1,17	76,2
RA 12	446	365	1,22	79,4
RA 13	403	337	1,20	77,6
RA 14	489	393	1,24	80,8
RA 15	381	334	1,14	76,6
RA 16	446	366	1,22	89,7
N ₂₁ mg kg ⁻¹	284	316	0,90	58,4
R ₀₅ / LSD ₀₅	38,1	33,0	0,12	5,75

Azoto fiksacijos metodų palyginimas. Vertinant tiesioginiu ir netiesioginiu metodais nustatytą raudonųjų dobilų simbiozės su gumbelinių bakterijų štamais azoto fiksaciją, rasta, kad skaičiuojant pagal Hopkinsą – Piterašą, gautos kiek sumažintos fiksacijos reikšmės. Tačiau skirtingų štamų šios reikšmės sumažėjo nevienodu laipsniu. Pastebėta, kad tiesioginiu ir netiesioginiu metodu skaičiuojant, palyginimo koeficientas buvo mažesnis kontrolinių, t.y. neinokuliuotų augalų ir inokuliuotų mažesnio efektyvumo štamais, o didžiausio efektyvumo štamų azoto fiksacijos palyginimo koeficientas buvo žymiai didesnis. Vadinasi, mažiau veiksmingos simbiozės atveju azoto fiksacija netiesioginiu metodu skaičiuojant santykinai, sumažėjo mažiau, nei efektyvesnės simbiozės (5 lentelė).

Biologinio azoto procentas. Apžvelgiant simbiotinio azoto fiksacijos tyrimų duomenis, galima teigti, kad be dviejų aprašytų azoto fiksacijos metodų, biologinio azoto procentas bendrojo azoto masėje taip pat vertinamas įvertinant skirtingų štamų efektyvumą. Gumbelinių bakterijų štamai, kurie simbiozėje daugiausia fiksavo atmosferos azoto, dobiuose nustatytas ir didžiausias biologinio azoto procentas bendrojo azoto masėje (5 lentelė). Ir atvirkščiai, štamai iš rūgščių, nekalkintų, bet tręštų tik mineralinėmis trąšomis dirvožemių, menkai fiksavo atmosferos azotą ir jais inokuliuotų augalų biologinio

azoto procentas buvo mažiausias. Įdomu pažymėti, kad nuo startinės azoto dozės staigiai sumažėjo biologinio azoto nuo 70,7 (kontroliniuose augaluose) iki 58,4 %.

Dirvožemio agrocheminės savybės. Nuo raudonųjų dobilų inokuliacijos gerėjo kai kurios dirvožemio agrocheminės savybės (6 lentelė). Teigiamas *Rhizobium* poveikis priklausė nuo štamo genetinių ir fiziologinių savybių. Inokuliuojant dobilus nitragininiais ir štamais, išskirtais iš kalkinamų ar šiaip derlingų dirvožemių, padidėjo dirvožemio pH_{KCl} nuo 6,2 (neinokuliuota) iki vidutiniškai 6,4. Pastebėta, kad ir nuo startinės azoto dozės dirvožemio rūgštumas taip pat sumažėjo 0,2 pH vieneto. Tai rodo, kad raudonųjų dobilų simbiozės aktyvinimas, tiek inokuliuojant augalus veiksmingais gumbelinių bakterijų štamais, tiek ir maža mineralinio azoto doze, padidino šarmiškų organinių junginių išskyras per šaknų sistemą, nuo ko mažėja dirvožemio rūgštumas dobilų rizosferoje /Lapinskas, 2006/.

6 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingų štamų ir mineralinio azoto poveikis dobilienos dirvožemio agrocheminėms savybėms

Table 6. *The influence of different strains of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and mineral nitrogen on clover field soil agrochemical properties

Variantas <i>Treatment</i>	pH _{KCl}	Hidrolizinis	Sorbuotų	Bazėmis	Judrusis	Judrusis
		rūgštumas	bazių suma	pasotinimo	P ₂ O ₅	K ₂ O
		<i>Hydrolitic</i>	<i>Amount of</i>	laipsnis %	<i>Available</i>	<i>Available</i>
		<i>acidity</i>	<i>bases in soil</i>	<i>Degree of</i>	<i>P₂O₅</i>	<i>K₂O</i>
		mekv. kg ⁻¹		<i>basic</i>	mg kg ⁻¹	
				<i>saturation %</i>		
Neišokuliuota / <i>Uninoculated</i>	6,2	12,6	127,4	91,0	103	148
Štamas 348a / <i>Strain 348a</i>	6,4	9,1	186,2	95,3	118	140
R 91	6,4	10,4	167,4	94,2	114	140
RA 1	6,3	10,4	137,8	93,0	118	164
RA 2	6,2	12,5	130,4	91,2	116	166
RA 3	6,2	11,6	140,0	92,3	110	162
RA 4	6,4	11,2	159,6	93,4	112	154
RA 5	6,4	10,4	155,6	93,7	113	156
RA 6	6,4	8,6	173,8	95,3	120	170
RA 7	6,2	11,6	151,4	92,9	118	156
RA 8	6,0	13,6	142,2	91,3	115	160
RA 9	6,2	11,6	150,8	92,8	102	131
RA 10	6,4	11,2	192,2	94,5	112	138
RA 11	6,2	9,5	135,0	93,4	112	144
RA 12	6,3	9,1	199,1	95,6	110	166
RA 13	6,4	9,5	165,6	94,6	122	148
RA 14	6,4	9,1	175,2	95,1	120	148
RA 15	6,4	9,1	205,1	95,8	111	136
RA 16	6,4	10,4	167,2	94,1	101	127
N ₂₁ mg kg ⁻¹	6,4	9,9	163,5	94,3	113	134
<i>Daugiametės svidrės / Perennial ryegrass</i>						
N ₀	6,2	10,4	143,1	93,2	136	120
N ₂₁ mg kg ⁻¹	6,4	7,3	156,8	95,6	122	108

Augalų inokuliacija teigiamai veikia ir sorbuotų bazių susikaupimą dirvožemyje. Priklausomai nuo inokuliacijai panaudoto štamų efektyvumo, sorbuotų bazių suma dirvožemyje kito vidutiniškai nuo 130,4 iki 205,1 mekv. kg^{-1} , kai kontrolinio varianto dirvožemio – 127,4 mekv. kg^{-1} . Nuo inokuliacijos didėja ir dirvožemio bazėmis pasotinimo laipsnis, judriųjų fosforo bei kalio junginių koncentracija. Dirvožemio rūgštumo sumažėjimą ir bazingumo bei judriųjų maisto medžiagų padidėjimą galima sieti su tuo, kad veiksmingais štamais inokuliuoti došilai išaugino galingesnę šaknų ir viso augalo biomasę (6 lentelė). Literatūros duomenimis, tokie augalai turi ir aktyvesnę šaknų sistemą, gebančią dirvožemio sunkiai tirpius fosforo junginius paversti iš dalies prieinamais augalams / Hamdi, 1982; Koc, 2001/.

Dirvožemio sąlygų ir simbiotinio azoto fiksacijos ryšys. Dirvožemio agrocheminės savybės, susijusios su rūgštumo mažėjimu, turėjo didelę teigiamą įtaką *Rhizobium* štamų biologinio azoto fiksacijai. Tarp dirvožemio pH_{KCl} , jo bazingumo, bazėmis pasotinimo laipsnio ir azoto fiksacijos nustatytas stiprus tiesioginis ryšys – atitinkamai $R = 0,62, 0,61$ ir $0,70$ (7 lentelė). Judriųjų fosforo junginių koncentracija dirvožemyje, esant P_2O_5 nuo 101 iki 122 mg kg^{-1} dirvožemio, neturėjo įtakos biologinio azoto susikaupimui, o judrusis kalis, esant jo dirvožemyje nuo 140 iki 155 mg kg^{-1} dirvožemio, šiek tiek didesnę įtaką turėjo azoto fiksacijos procesams ($R = 0,37$).

7 lentelė. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* skirtingų štamų simbiotinio azoto fiksacijos (y) priklausomumas nuo dirvožemio agrocheminių savybių (x)

Table 7. *Symbiotic nitrogen fixation (y) by different strains of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in relation to soil agrochemical properties (x)

Dirvožemio agrocheminiai parametrai <i>Soil agrochemical parameters</i>	Regresijos lygtys <i>Regression equation</i>	R	Fišerio kriterijus t <i>Fisher's test t</i>
pH_{KCl}	$-1818,8 + 350,55x$	0,62	10,53**
Sorbuotų bazių suma mekv. kg^{-1} <i>Amount of bases</i>	$110,2 + 1,745x$	0,61	10,05**
Bazėmis pasotinimo laipsnis % <i>Degree of base saturation</i>	$-2539,5 + 31,29x$	0,70	16,51**
Judrusis P_2O_5 mg kg^{-1} <i>Available P_2O_5</i>	$225,57 \cdot x^{0,1135}$	0,10	0,009
Judrusis K_2O mg kg^{-1} <i>Available K_2O</i>	$14398,0 \cdot x^{0,7228}$	0,37	0,137

Be to, nustatytas silpnas ryšys tarp spontaninių gumbelinių bakterijų paplitimo dirvožemyje ir suformuotų gumbelių skaičiaus došilų šaknyse, augalo biomasės bei azoto fiksacijos.

Išvados

1. Iš krašto įvairių vietovių ir Vėžaičiuose suvežtuose skirtingų dirvožemių monolitų (balkšvažemiai, išplautžemiai, rudžemiai) lizimetriniuose bandymuose došilų gumbelinės bakterijos (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) paplitusios labai nevienodai: nuo 130 iki 300 tūkst. cfu g^{-1} dirvožemio. Lengvesnės granulimetrinės sudėties (rišlus smėlis, priesmėlis) dirvožemiuose rasta mažiau – 130–1300 cfu g^{-1} , sunkesnės

sudėties (lengvas priemolis, lengvas molis) – daugiau – 130–300 tūkst. cfu g⁻¹ dirvožemio. Dirvožemio kalkinimas be tręšimo nepadeda plisti dobilų gumbelinėms bakterijoms.

2. Dobilų gumbelinių bakterijų štamai, išskirti iš skirtingų ir įvairiai tręšiamų dirvožemių, sudarė nevienodo dydžio kolonijas. Neutraloko rūgštumo (pH 6,5) mitybinėje terpėje gumbelinės bakterijos sudarė beveik dvigubai didesnes kolonijas, nei rūgščioje terpėje (pH 5,0). Rūgščiuose dirvožemiuose nuo ilgalaikio mineralinio tręšimo paprastai susiformuoja štamai augantys smulkesnėmis kolonijomis, nei visiškai netręšiant ar tręšiant organinėmis trąšomis.

3. Įvairios genėzės ir tręšimo dirvožemiai formavo skirtingo virulentiškumo dobilų gumbelinių bakterijų štamus. Dirvožemio kalkinimas stimuliuo gumbelių susidarymą, o mineralinės N₇₀P₈₀K₈₀ trąšos šį procesą slopino. Derlinguose rudžemiuose ir išplautžemiuose formuojasi aukšto virulentiškumo gumbelinių bakterijų štamai.

4. Nuo inokuliacijos, nepriklausomai nuo dirvožemių, iš kurių buvo išskirti štamai, veiksmingai didėjo raudonųjų dobilų biomasė (antžeminės dalies ir šaknų masė). Labai efektyvūs gumbelinių bakterijų štamai buvo randami nekalkintuose, bet organinėmis trąšomis tręšiamuose lengvos granuliometrinės sudėties dirvožemiuose arba kalkinamuose ir organinėmis bei mineralinėmis trąšomis tręšiamuose lengvo priemolio dirvožemiuose. Efektyviausi štamai (RA 11 ir RA 12) daugiausia stimuliuo ne tik raudonųjų dobilų antžeminės dalies, bet ir šaknų vystymąsi.

5. Beveik visi gumbelinių bakterijų štamai (išskyrus štamus RA 1 ir RA 8) veiksmingai (iki 30–75 %) didino simbiotinio azoto fiksaciją. Azoto fiksacijos požūriū efektyviausi štamai: RA 12, RA 14 ir RA 16 buvo išskirti iš kalkinamų ir organinėmis trąšomis tręšiamų Vėžaičių balkšvažemio, taip pat Vokės ir Rumokų išplautžemių. Rūgščiuose nekalkintuose ir netręštuose arba mineralinėmis trąšomis tręštuose dirvožemiuose susiformavo silpnos azoto fiksacijos gebos gumbelinių bakterijų populiacijos.

6. Vertinant tiesioginį ir netiesioginį azoto fiksacijos nustatymo metodus, rasta, kad apskaičiuojant pagal Hopkinsą-Pitersą, gautos kiek sumažintos fiksacijos reikšmės. Abiejų metodų palyginimo koeficientas, priklausomai nuo inokuliacijos ir štamų, svyravo tarp 1,08 ir 1,24.

Gauta 2007 07 11

Pasirašyta spaudai 2007 09 24

LITERATŪRA

1. Bottomley P., Jenkins M. Some characteristics of *Rhizobium meliloti* isolates from alfalfa fields in Oregon // Soil Science Society of America Journal. – 1983, vol. 47, No. 6, p. 1153–1157
2. Bowman A. M., Hebb D. M., Munnich D. J. *Rhizobium* as a factor in the reestablishment of legume based pastures on day soils of the wheat belt of North Western New South Wales // Australian Journal of Experimental Agriculture. – 1998, vol. 38, No. 6, p. 555–566
3. Ewing M. A., Robson A. D. The effect of solution pH and external calcium concentration on the early growth and nodulation of several annual *Medicago species* // Australian Journal of Agricultural Research. – 1990, vol. 45, No. 5, p. 933–939
4. Hamdi Y. A. Application of nitrogen – fixing systems in soil improvement and management // FAO Soils Bulletin. – Rome, 1982, No. 49. – 188 p.

5. Jensen H. H., Schjoerring J. K. Residual nitrogen effect of clover – ryegrass swards on yield and N uptake of a subsequent winter wheat crop as studied by use of N – 15 methodology and mathematical modelling // *European Journal of Agronomy*. – 1997, vol. 6, iss. 3–4, p. 235–243
6. Kaminskij V. F., Golodna A. V. Zernobobovi kul'tury – džerelo biologičnogo azotu // *Vistnik agrarnoj nauki*. – 2000, spec. vyp., s. 45–47
7. Killham K., Foster R. *Soil ecology*. – Cambridge, 1992. – 229 p.
8. Klasen V. P. Symbiotic effectiveness of nodule bacteria in the soils of Latvia: the work of doctor habilitatis. – Jelgava, 1994. – 58 p.
9. Koc' S. J. Fiziologični osoblivosti formuvannia ta funkcionuvannia simbiotičnych sistem bobovi roslini-bulbučkovi bakterii // *Ontogenez roslin, biologična fiksacija molekuliarnogo azotu ta azotnij metabolism*. – Ternopil', 2001, s. 86–90
10. Kučinskas J., Pekarskas J., Pranckietienė I. ir kt. *Agrochemija*. – 1999. – 338 p.
11. Lapinskas E. Biologinio azoto fiksavimas ir nitraginas. – *Akademija (Kėdainių r.)*, 1998. – 218 p.
12. Lapinskas E. Liucernų gumbelių bakterijų paplitimas Lietuvos dirvose ir jų efektyvumas // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. – *Akademija (Kėdainių r.)*, 1995, t. 50, p. 134–143
13. Lapinskas E. Ankštinių augalų inokuliacijai bei dirvožemio agrocheminėms savybėms // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. – *Akademija (Kėdainių r.)*, 2006, t. 93, Nr. 2, p. 3–24
14. Lenkšaitė E. P., Knašys V. J. Vlijanie izvestkovykh udobrenij na simbiotičeskoe vzaimootnošeniya klevera lugovogo i kluben'kovykh bakterij // *Mikrobiologičeskije processy v počvach i urožajnost' s.-ch. kul'tur*. – Vilnius, 1986, s. 223–224. – Rus.
15. Mandrovskaja N. M., Ochramenko S. M., Kirizij D. A., Starčenko E. P. Vlijanie inokuliacii azotoustojčivymi klonami kluben'kovykh bakterij na intensivnost' fotosinteza i azotofiksacii u gorocha // *Fiziologija i biochimija kul'turnykh rastenij*. – 1995, t. 27, No. 3, s. 169–173. – Rus.
16. Martensson A. M., Rydberg I. Cultivar x rhizobial strain interactions in peas with respect to early symbiosis, nodule formation and N uptake // *Plant Breeding*. – 1996, vol. 115, No. 5, p. 402–406
17. Martensson A., Wivstad M., Ljunggren H. The influence of different crop rotations on the occurrence and efficiency of *Rhizobium trifolii* in some Swedish field experiments // *Swedish Journal of Agricultural Response*. – 1984, No. 14, p. 71–76
18. Mikanova O. P. P – solubilising activity of soil bacteria // *Balanced Fertilization in Contemporary Plant Production / The Role of Potassium*. – Lithuania, 2003, p. 24
19. Novikova A. T., Simarov B. V. Metodičeskije rekomendacii po polučeniju novykh štamov kluben'kovykh bakterij i ocenke ich effektivnosti. – Leningrad, 1979. – 33 s. – Rus.
20. Paul E. A., Clark F. E. *Soil microbiology and biochemistry*. – New York, 1989. – 273 p.
21. Piaulokaitė - Motuzienė L., Končius D., Lapinskas E. Mikroorganizmų paplitimas esant skirtingoms dirvožemio agrocheminėms savybėms // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. – *Akademija (Kėdainių r.)*, 2005, t. 89, p. 154–162
22. Sardana V., Narwal S. S. Effect of *Rhizobium* seed inoculation and nitrogen on the fodder quality of berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) under different levels of phosphorus // *Research on Crops*. – 2001, vol. 2, No. 2, p. 123–133
23. Smirnova T. V., Čunderova A. I. Vlijanie počvennykh uslovij na saprofitnoe suščestvovanie kluben'kovykh bakterij klevera // *Bjulleten' VNII s.-ch. mikrobiologii*. – Leningrad, 1987, No. 48, s. 27–32. – Rus.

24. Sokolov A. V. Vegetacionij metod // Agrochimičeskie metody issledovanija počv. – Moskva, 1960, s. 157–163. – Rus.

25. Stevovic V., Djukic D., Djurovic D., Mandic L. Presowing seed inoculation as a factor to improve yield and quality of perennial legumes on acid soils // Integrating Efficient Grassland Farming and Biodiversity / Grassland Science in Europe. – Tartu, 2005, vol. 10, p. 285–288

26. Tarakanovas P., Raudonius S. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT, PLOT iš paketo „Selekcija ir Irristat”. – Akademija (Kėdainių r.), 2003. – 56 p.

27. Zviagincev D. G., Gusev V. S., Levin S. I. Izmenenija v komplekse počvennyh mikroorganizmov pri antropogennyh vozdeystvijach // Uspechi počvovedenija. – Moskva, 1986, s. 64–68. – Rus.

ISSN 1392–3196

Zemdirbyste / Agriculture, vol. 94, No. 3 (2007), p. 73–89

UDK 576.851.155:631.816

***RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII* DISTRIBUTION AND SYMBIOTIC EFFICIENCY IN THE SOILS OF DIFFERENT GENESIS AND FERTILIZATION**

E. Lapinskas

Summary

The distribution of clover *Rhizobium* bacteria was determined in Vėžaičiai in stationary lysimeter soil monoliths delivered from various locations of the country, and symbiotic efficiency of strains isolated from clover roots was assessed in pot experiments. In the soils of lighter texture (sand, sandy loam) the count of *Rhizobium* bacteria was lower 130–1300 cfu g⁻¹, in heavier textured soils (light loam, light clay) the count of *Rhizobium* bacteria was higher 130 – 300 000 cfu g⁻¹ of soil. Soil liming without fertilization did not contribute to the distribution of *Rhizobium* bacteria.

In the nutrient medium of somewhat neutral reaction (pH 6.5) *Rhizobium* bacteria formed almost twice as large colonies as those in acid medium (pH 5.0). Soil liming stimulated formation of nodules in the roots of red clover, whereas mineral fertilizers N₇₀P₈₀K₈₀ inhibited this process. In fertile cambisols and luvisols formation of very virulent *Rhizobium* bacteria strains occurred.

The most efficient *Rhizobium* bacteria strains were found in unlimed but applied with organic fertilizers light-textured soils or in limed light loam soils fertilized with organic and mineral fertilizers. Almost all strains of *Rhizobium* bacteria (except for the strains: RA 1 and RA 8) effectively increased (up to 30–75 %) symbiotic nitrogen fixation and many of them improved some of the soil agrochemical properties. From the viewpoint of nitrogen fixation the most effective were found to be: RA 12, RA 14 and RA 16 which were isolated from limed and applied with organic fertilizers albeluvisol from Vėžaičiai, as well as from Vokė and Rumokai luvisols. In acid unlimed and unfertilized soils or only in mineral fertilization receiving soils the populations of *Rhizobium* bacteria that formed were characterised by weak nitrogen fixing capacity.

Key words: *Rhizobium*, distribution, symbiotic efficiency, nitrogen fixation, soil properties.