

ANNA STRZELEC
Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

SYMBIOTYCZNE WIĄZANIE WOLNEGO AZOTU

CZ. I. ZNACZENIE BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH, ICH WYSTĘPOWANIE
W GLEBACH I SZCZEPIONKI RHIZOBIUM DLA ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Znaczenie bakterii symbiotycznych

Światowy kryzys energetyczny i wynikający z niego spadek produkcji nawozów azotowych spowodowały ponowny wzrost zainteresowania badaczy i praktyki rolniczej możliwościami zwiększenia efektywności biologicznych procesów wiązania azotu. Ilość N_2 wiązana w tych procesach szacowana jest w skali światowej na około 170 milionów ton/rok [120].

Dla praktyki rolniczej szczególnie duże znaczenie ma azot wiązany przez bakterie z rodziny *Rhizobacteriaceae*, żyjące w symbiozie z uprawnymi roślinami motylkowatymi. Efektywność tej symbiozy zależy od rodzaju rośliny, właściwości zakażającego ją szczepu *Rhizobium* oraz warunków środowiska w którym uprawiana jest roślina [26, 43, 46, 47, 100, 101, 119, 126, 129, 133, 136].

Ilość N_2 wiązana przez uprawne rośliny motylkowate żyjące w symbiozie z *Rhizobium* waha się od 45 do 600 kg N/ha/rok [6, 49] i szacowana jest w skali światowej na 20—30 milionów ton/rok [129]. Ponieważ rośliny wykorzystują z mineralnych nawozów azotowych na ogół nie więcej niż 50% N, tak więc każde 100 kg N związanego symbiotycznie jest ekwiwalentem 200 kg N w formie nawozowej [6].

Azot związany w procesie symbiozy rośliny motylkowate wykorzystują do wytwarzania dużych ilości wysokowartościowego białka, zbliżonego składem aminokwasów do białek zwierzęcych [79]. Wykazano, że np. z 1 ha grochu można otrzymać 690 kg białka, podczas gdy z tej samej powierzchni soi uzyskuje się 1260 kg białka, a w przypadku lucerny ilość białka z 1 ha dochodzi do 2500 kg [123].

Część azotu związanego w procesie symbiozy dostaje się do gleby w formie wydzielin korzeniowych i resztek poźniwnych roślin motylkowatych podnosząc tym samym jej wartość produkcyjną [30, 31, 32]. Ro-

śliny motylkowate wpływają ponadto korzystnie na strukturę gleby i jej właściwości fitosanitarne [77] i dzięki tym wszystkim właściwościom uważane są za bardzo dobry przedplon dla większości roślin uprawnych [80].

Wysokość i jakość plonów roślin motylkowatych oraz ich wpływ na środowisko glebowe zależą od efektywności ich symbiozy z *Rhizobium*, przy czym głównym czynnikiem warunkującym wysoką aktywność tego procesu jest obecność w glebie dużej liczby komórek specyficznego dla danej rośliny i aktywnego w symbiozie z nią szczepu *Rhizobium*.

Występowanie bakterii symbiotycznych w glebach

Bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych występują w większości gleb w ilościach od 10^3 do 10^6 /g gleby [6]. Ich rodzaj i liczebność w danej glebie zależy od jej składu mechanicznego, właściwości chemicznych, odczynu, stosunków powietrzno-wodnych, temperatury, rodzaju i ilości stosowanych nawozów [4, 9, 11, 23, 38, 47, 60, 67, 69, 71—74, 87, 88, 100, 128] oraz rodzaju i wielkości skażenia metalami ciężkimi i pestycydami [2, 44, 48, 65, 116]. Na występowanie *Rhizobium* oprócz abiotycznych czynników glebowych wpływa również ilościowy i jakościowy skład mikroflory zasiedlającej daną glebę [1, 20, 94, 104] oraz występujące w niej *Rhizobiofagi* [34, 37, 67, 108]. Każdy z tych czynników zarówno sam jak i w połączeniu może stymulować lub hamować rozwój *Rhizobium*, a nawet całkowicie eliminować je z gleby.

Na rodzaj i liczebność bakterii symbiotycznych zasiedlających daną glebę wpływają oprócz jej właściwości również częstotliwość i rodzaj uprawianych na niej roślin motylkowatych [84, 85, 86]. Nutman i Ross [86] badając występowanie *Rhizobium* w glebach Rothamsted stwierdzili w 1 g gleby z ryzosfery koniczyny obecność 10^6 do 10^{11} komórek *Rh. trifolii*, podczas gdy glebie z poza ryzosfery było ich od 10^3 do 10^6 . Ta sama gleba na której koniczynę uprawiano w czasie ostatnich pięciu lat, zawierała już tylko od 10^2 do 10^3 komórek tych bakterii, a gleba nie obsiewana koniczyną ponad pięć lat jedynie 1×10^2 [86].

W literaturze brak jest konkretnych danych dotyczących rozprzeszczenia i liczebności bakterii brodawkowych w poszczególnych rodzajach gleb. Wynika to z braku pożywek selektywnych dla tych bakterii. Natomiast na podstawie obserwacji rozwoju roślin motylkowatych, ich brodawkowania i plonów należy sądzić, że w wielu glebach brak jest dostatecznej liczby niektórych gatunków *Rhizobium* lub nie są one słabo aktywne w procesie wiązania N_2 .

Określając metodę redukcji acetylenu aktywność nitrogenezy 288 szczepów *Rh. trifolii* wyodrębnionych z brodawek korzeniowych koniczyn zasiedlających różne stanowiska stwierdzono, że jedynie 5% stanowiły szczepy o wysokiej aktywności, natomiast aż 80% szczepów wykazało jedynie śladową aktywność [62]. Podobne wyniki uzyskano badając aktywność szczepów *Rh. meliloti* wyodrębnionych z gleb Bułgarii, wśród których 75% stanowiły szczepy nieaktywne lub słabo aktywne [96].

W ostatnich latach liczebność w glebach poszczególnych gatunków *Rhizobium* wydaje się zmniejszać co przypisywane jest postępującemu zakwaszeniu gleb i ich zanieczyszczeniu oraz stosowanym coraz powszechniej środkom ochrony roślin [82].

Aby zapewnić roślinom motylkowatym aktywną symbiozę, a tym samym umożliwić im korzystanie z azotu atmosferycznego, w praktyce rolniczej krajów o wysokiej kulturze rolnej stosuje się szczepienie ich nasion preparatami zawierającymi namnożone hodowle specyficznego dla danej rośliny i aktywnego w symbiozie z nią szczepu *Rhizobium*. Zabieg ten jest szczególnie ważny w przypadku roślin nowo wprowadzonych do uprawy np. soi lub których bakterie symbiotyczne są szczególnie wrażliwe na niesprzyjające warunki środowiska np. lucerna. Użycie do produkcji szczepionek szczepów specjalnie wyselekcjonowanych np. odpornych na zakwaszenie podłoża lub na stosowane do ochrony roślin pestycydy, może znacznie zwiększać plony uprawianych w tych warunkach roślin [23, 54].

Szczepionki dla roślin motylkowatych

Zabieg szczepienia roślin motylkowatych aktywnymi szczepami *Rhizobium* znany jest na świecie od kilkudziesięciu lat [129], a jego popularność stale wzrasta.

W Polsce próby uruchomienia produkcji szczepionek były podejmowane na niewielką skalę w 1920 roku w Poznaniu. Przed wojną i w czasie okupacji prace nad szczepieniem roślin motylkowatych prowadzone były w Instytucie Puławskim pod kierunkiem Prof. J. Ziemięckiej [75]. Szczepionki produkowane były na skalę półtechniczną lub nawet laboratoryjną. Były to szczepionki płynne lub agarowe. W roku 1954 z inicjatywy Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach i w oparciu o wyniki prowadzonych tu badań [40, 41] powstała w Wałczu Wytwórnia Szczepionek tzw. nitraginy dla uprawianych w Polsce rodzajów roślin motylkowatych. Obecnie produkuje ona rocznie nitraginę na około 300 tys. ha upraw roślin motylkowatych. Przeprowadzona aktualnie modernizacja wytwórni oraz wprowadzana ulepszona technologia pro-

dukcji nitraginy opracowana w Zakładzie Mikrobiologii IUNG, umożliwi co najmniej dwukrotne zwiększenie produkcji.

O efektywności szczepionek w bardzo dużym stopniu decydują właściwości użytych do ich produkcji szczepów *Rhizobium* i liczebność jego komórek w 1 g szczepionki.

Szczepy mateczne do produkcji szczepionek uzyskiwane są metodą selekcji szczepów wyodrębnionych z aktywnych brodawek korzeniowych danego rodzaju rośliny opartej na wynikach doświadczeń wegetacyjnych. Na ogół do produkcji szczepionki dla danego rodzaju rośliny używa się jednego szczepu. Są jednak doniesienia o uzyskiwaniu lepszego efektu szczepienia nasion mieszaniną kilku szczepów *Rhizobium*, w której według autorów łatwiej o szczep dobrze przystosowany do warunków gleby na której uprawiana jest szczepiona roślina [24, 27], chociaż stwierdzono także ujemne działanie takich szczepionek [18, 95]. Na efektywność szczepionek mogą oddziaływać korzystnie również inne drobnoustroje np. *Azospirillum* [92], *Azotobacter* [33, 50, 58, 77, 78, 109], bakterie rozkładające fosforany lub organizmy mykoryzowe [25, 97].

Aby szczepionka spełniała swoje zadanie konieczne jest zapewnienie wysokiego miana w niej komórek macierzystego szczepu *Rhizobium*. Liczebność komórek w 1 g szczepionki w wielu przypadkach decyduje bowiem o konkurencyjności wprowadzanego szczepu w stosunku do szczepów autochtonicznych, na ogół lepiej przystosowanych do warunków danej gleby, a tym samym lepiej się w niej namnażających i przez to łatwiej zakażających rośliny [53, 59, 64, 68, 90, 124]. W gramie szczepionki powinno znajdować się od kilku milionów do kilku miliardów żywych komórek *Rhizobium* [12, 59, 63, 64, 113]. Normy te są różne w różnych krajach i dla różnych szczepionek. Np. szczepionki australijskie muszą zawierać bezpośrednio po wyprodukowaniu co najmniej $1,0 \times 10^9$ komórek/g⁻¹, a pod koniec okresu ich ważności $1,0 \times 10^8$ /g⁻¹ [102].

Miano komórek *Rhizobium* w szczepionce zależy od jej formy (szczepionki płynne, agarowe, suche, na różnych nośnikach, granulowane), technologii produkcji i sposobu przechowywania. Natomiast wybór formy szczepionki zależy od wielkości zapotrzebowania na nią, możliwości technologicznych, dostępności odpowiedniego nośnika oraz wymagań co do sterylności podłoża i czasu przeżywalności *Rhizobium* w preparacie i na nasionach [77].

Do celów doświadczalnych i na niewielkie powierzchnie mogą być używane jako szczepionki hodowle *Rhizobium* namnażane na skosach agarowych, łatwe do przygotowania w warunkach każdego laboratorium. Z dobrze rosnącej hodowli agarowej na skosie z 10 ml pożywki

YEMA można otrzymać około 10^9 komórek *Rhizobium* [134]. Stwierdzono jednak, że użycie jako szczepionki wodnej zawiesiny z hodowli agarowej, jak też płynnej hodowli *Rhizobium* nie zapewnia dostatecznej przeżywalności komórek *Rhizobium* na nasionach szczepionych nimi roślin. Lepsze efekty osiąga się stosując zawiesinę *Rhizobium* w 10% roztworze sacharozy lub maltozy [134]. Również stosowanie szczepionek sporządzonych ze zliofilizowanych hodowli *Rhizobium* nie daje spodziewanych efektów, a odtwarzanie hodowli z liofilizatu wymaga co najmniej dwutygodniowej ich inkubacji [133, 134]. Liofilizacja może ponadto wpływać niekorzystnie na aktywność *Rhizobium* [30].

Dla szerokiej praktyki rolniczej znacznie odpowiedniejsze są szczepionki przygotowywane na specjalnych nośnikach, które nasyca się płynną hodowlą *Rhizobium* namnożoną w specjalnych fermentorach. Szczepionki takie są łatwiejsze do rozprowadzenia i mają na ogół dłuższy okres ważności.

Właściwości substancji użytej jako nośnik decydują w dużym stopniu o jakości szczepionki, a tym samym o jej efektywności [10, 29, 89, 93, 114, 121, 131, 132]. Przy wyborze nośnika brane są pod uwagę oprócz jego właściwości fizykochemicznych również jego dostępność i względy ekonomiczne.

Substancja użyta jako nośnik szczepionki powinna charakteryzować się dużą pojemnością sorpcyjną oraz niską koncentracją jonów H^+ (91) i Na^+ (82). W przypadku zbyt niskiego odczynu nośnika konieczna jest jego neutralizacja przy pomocy $CaCO_3$. Natomiast substancje zawierające zbyt dużą ilość jonów Na^+ np. niektóre rodzaje torfu, nie powinny być stosowane jako nośnik.

Najczęściej stosowanymi nośnikami są: torf, gleba, mieszanina torfu z glebą, bentonit i węgiel. Na ogół szczepionki na nośniku węglowym i torfowym dają lepsze efekty, niż na glebie lub vermiculicie. Tłumaczone to jest dużą zdolnością torfu i węgla do adsorpcji substancji toksycznych, a tym samym ochroną *Rhizobium* przed ich niekorzystnym oddziaływaniem [91].

Oprócz tradycyjnych nośników prowadzone są próby z wykorzystaniem jako nośnika innych substancji np. produktów odpadowych z cukrowni [91]. Nośnikiem polskiej nitraginy były w pierwszych latach produkcji gleba piaszczysta, następnie jej mieszanina z torfem, sam torf, a ostatnio pył z węgla brunatnego z kopali Bełchatów.

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o stosowaniu szczepionek w formie granulowanej, które zdaniem niektórych autorów gwarantują lepszą przeżywalność *Rhizobium* w porównaniu z tradycyjnymi szczepionkami powlekanymi [5, 7].

Miano komórek *Rhizobium* w szczepionkach zależy w bardzo dużym stopniu od intensywności namnożenia ich płynnych hodowli, a ta z kolei od składu podłoża i warunków hodowli.

Szczególnie duży wpływ na intensywność namnażania *Rhizobium* ma rodzaj użytego w pożywce hodowlanej źródła C i N.

Zdolność wykorzystywania różnych źródeł C zależy w dużym stopniu od gatunku *Rhizobium*, a w obrębie gatunku od właściwości szczepu [36, 66, 76, 134]. Substratem energetycznym najlepiej wykorzystywanym przez większość szczepów *Rhizobium* jest mannitol. Wykorzystują one dobrze również szereg cukrów np. glukozę, sacharozę. Szybko rosnące gatunki *Rhizobium* mogą asymilować oprócz cukrów również inne wzglowodany, alkohole i kwasy organiczne, natomiast gatunki wolno rosnące są znacznie bardziej wyspecjalizowane w rodzaju wykorzystywanych źródeł węgla [135]. Bakterie brodawkowe mogą wykorzystywać C również z innych związków organicznych [36, 117]. Rodzaj źródła C w pożywce hodowlanej wpływa także na aktywność wytwarzanej przez *Rhizobium* nitrogenazy [70] i efektywność szczepionek [40, 41]. Zdolność wykorzystania przez te bakterie C z kwasów dwukarboksylowych może być ważnym czynnikiem decydującym o efektywności symbiozy [39]. Wykazano, że aktywne szczepy *Rhizobium* wykorzystują do produkcji tej samej ilości białka mniej mannitolu i O_2 niż szczepy nieaktywne [13].

Najdostępniejszym źródłem N dla *Rhizobium* są aminokwasy, przy czym cysteina i metionina są konieczne do rozpoczęcia ich wzrostu [56, 57]. Najkorzystniejsze warunki dla rozwoju tych bakterii zapewnia hydrolizat kazeiny, jednak w większości pożywek jako źródło N stosowany jest ekstrakt drożdżowy lub woda drożdżowa, zawierająca w 100 ml 50—60 mg N aminokwasowego. Podwyższenie koncentracji kazeiny lub ekstraktu drożdżowego ponad 0,5 do 1% powoduje obniżenie żywotności większości szczepów *Rhizobium* i zmiany w budowie ich komórek [111]. Po rozpoczęciu wzrostu, bakterie brodawkowe mogą wykorzystywać jako źródło N również sole amonowe i mocznik [45, 81, 118]. Większość szczepów *Rhizobium* potrzebuje do rozpoczęcia wzrostu również witamin np. biotyny i kwasu pantotenowego [42].

Oprócz składu podłoża, na intensywność namnażania i przeżywalność *Rhizobium* mają duży wpływ także warunki hodowli, a w szczególności odpowiednie jej napowietrzanie i temperatura.

Rhizobium są fakultatywnymi tlenowcami i zarówno nadmiar jak i niedobór tlenu może hamować ich wzrost. Badając na różnych podłożach napowietrzania hodowli szczepów *Rh. leguminosarum* stwierdzono, że najkorzystniejsze warunki do rozwoju znalazły one w hodowlach nawietrznych 1,71 g O_2 /1 litr/godzinę. Zwiększenie, a tym bardziej zmniej-

szenie intensywności nawietrzania hodowli odbijało się niekorzystnie na ich wzroście [127].

Intensywność namnażania i przeżywalność komórek *Rhizobium* zależy również od temperatury [11]. Optymalne warunki dla wzrostu tych bakterii stwarza temperatura 28°C [38, 112]. Natomiast przechowywanie w takiej temperaturze namnożonych hodowli wyraźnie zmniejsza przeżywalność komórek. Wykazano np., że w hodowlach przechowywanych przez 8 tygodni w temperaturze 25°C ilość żywych komórek zmniejszała się 10-krotnie, podczas gdy w takich samych hodowlach przechowywanych w 5°C podobną redukcję liczebności żywych komórek obserwowano dopiero po 18 tygodniach [134]. Wysoka temperatura hodowli *Rhizobium* może zmniejszać wirulencję tych bakterii [138]. Wykazano, że szczepy *Rh. trifolii* inkubowane przez 7 dni w 37°C wykazywały zanik wirulencji związany z zanikiem dużego plazmidu [137].

Na rozwój i przeżywalność *Rhizobium* w danym podłożu ma duży wpływ rodzaj i liczebność zasiedlającej go mikroflory [1, 9, 15, 94, 104]. Ponieważ zarówno bakterie, promieniowce jak i grzyby są często antagonistami *Rhizobium*, dlatego też duże znaczenie dla ich rozwoju i przeżywalności w szczepionce ma jej sterylność. Szczególnie ważne jest to w przypadku szczepionek zawierających wolno rosnące szczepy *Rhizobium* [131].

Rozwój i przeżywalność hodowli *Rhizobium* na nośniku zależy w dużym stopniu od wieku wprowadzanej hodowli [8] oraz wilgotności szczepionki i temperatury w której jest ona przechowywana [51, 112, 125].

Na efektywność szczepionki wpływa w dużej mierze również sposób jej stosowania [12, 14, 16, 17, 19, 35, 52, 110, 122], jak też wielkość dawki stosowanej na ha [35, 82, 98]. Decydują one bowiem o ilości komórek *Rhizobium* dostających się na nasiona.

Efekt szczepienia można znacznie zwiększyć poprzez zwiększenie przylepności szczepionki do nasion poprzez ich powlekanie substancjami klejącymi np. 20% gumą arabską, olejem lub innymi środkami np. metylocelulozą lub mieszaniną 10% sacharozy z 10% glutaminanem sodu w 2% metylocelulozie [7, 63, 99]. Środki te oprócz zwiększania przylepności szczepionki do nasion zwiększają także przeżywalność na nich komórek *Rhizobium* [22, 99, 105] co jest bardzo ważne bo jak wykazały badania większość komórek *Rhizobium* ginie bardzo szybko w wyniku wysuszenia. Stwierdzono np. że po 24 godzinach od zaszczepienia następuje 1000-krotny spadek liczebności *Rhizobium* [19, 105—107].

Powlekanie nasion substancjami klejącymi wyraźnie zwiększa efektywność szczepionek. Substancje klejące zwiększały do 90 a nawet 100% ilość brodawek powstałych w wyniku zakażenia lucerny szczepem wpro-

wadzonym w szczepionce, podczas gdy w seriach nie powlekanych było ich 12 do 38%. Powlekanie nasion zwiększało także plon pierwszego pokosu lucerny o 85%, a drugiego o 47% [99].

Efekt szczepienia zależy w dużej mierze również od warunków pogodowych i właściwości środowiska glebowego [118, 119].

Czynnikiem determinującym przeżywalność *Rhizobium* w glebie i efektywność ich symbiozy z roślinnym gospodarzem mogą być np. nie-sprzyjające warunki pogodowe zarówno w czasie zabiegu szczepienia jak i podczas wegetacji roślin np. zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura, susza lub zbyt duża wilgotność gleby [4, 7, 11, 15, 16, 17, 19, 38, 73, 87, 88, 115, 126, 133].

Na efekt szczepienia mogą wpływać ujemnie również niekorzystne warunki glebowe np. zakwaszenie gleb [21, 23, 72, 100], lub zbyt duża ilość wniesionych do nich nawozów azotowych [32, 46, 47, 83, 101, 119]. Niekorzystny wpływ mogą mieć także pestycydy, szczególnie jeśli stosowane są równocześnie z zabiegiem szczepienia lub niezgodnie z zaleceniami [2, 3, 28, 44, 48, 61, 65, 116].

W celu ochrony szczepu *Rhizobium* wprowadzonego w szczepionce przed toksycznym wpływem na jego rozwój zakwaszenia gleby lub wysokich dawek nawozów, polecane jest mieszanie świeżo zaszczipionych nasion powleczonych substancją klejącą, z drobno zmielonym węglanem wapnia [35, 55, 82, 98, 110] lub użycie do wytwarzania szczepionek szczepów *Rhizobium* odpornych na zakwaszenie podłoża.

W celu zmniejszenia niekorzystnego wpływu na rozwój *Rhizobium* zapraw nasiennych używanych do ochrony roślin przed chorobami i szkodnikami, zalecane jest ich stosowanie na 1—2 miesiące przed szczepieniem lub użycie do produkcji szczepionek szczepów *Rhizobium* odpornych na nie [54].

W świetle przedstawionych badań wydaje się, że szczepienie roślin motylkowatych będzie zabiegiem coraz powszechniej stosowanym w praktyce rolniczej, a dzięki wynikom prowadzonych w ostatnich latach badań nad udoskonaleniem szczepionek oraz opracowywaniem coraz skuteczniejszych metod ich stosowania, efektywność tego zabiegu będzie wzrastać.

LITERATURA

1. Akrikyan E.K., Tumanyan V.G.: Izviest. Akad. Nauk Arm. SSR. 11: 37—46, 1958.
2. Antoun H., Couture L., Guilmette H.: Protect. Ecol. 6: 279—286, 1984.
3. Awrow O.J. i in.: Chemicz. srjedstwa zaszczity rost. 4: 33—35, 1974.
4. Bajpai P.H., Gupta B.R., Bali R.: Indian J. Agric. Res. 12: 39—43, 1978.
5. Barkololl A.W., Sartain J.B., Hubbell D.H.: Proc. of the Soil and Crop Sci. Soc. of Florida. 42: 184—189, 1983.
6. Beringer J.E.: CRC Critical Rev. in Plant Sc. 1: 269—286, 1984.
7. Bezdicsek D.R., Evans D.W., Abede B., Witters R.E.: Agron. J. 70: 865—868, 1978.
8. Bhuvanewari T.V. i in.: J. of Bacter. 153: 443—451, 1983.
9. Bohlool B.B., Kosslak R., Woolfenden R.: Adv. in Nitrogen Fix. Res., ed. Veeger C., Newton W.E., Wageningen: 287—293, 1984.
10. Boiaroli J.L. i in.: Soil and Fert. 47: 794, poz. 7226, 1984.
11. Boonkerd N., Weaver R.W.: Appl. Environ. Microb. 43: 585—589, 1982.
12. Boonkerd N., Weber D.F., Bezdicsek D.F.: Agr. J. 70: 547—549, 1978.
13. Bordelean L.M., Lalande R., Anthoun H.: Plant and Soil. 56: 439—443, 1980.
14. Brockwell J.: Austr. J. Agric. Res. 13: 638—648, 1962.
15. Brockwell J., Gault R.R., Zorin M., Roberts M.J.: Austr. J. Agric. Res. 33: 803—815, 1982.
16. Brockwell J., Phillips K.: Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb., 10: 739—744, 1970.
17. Brockwell J., Whalley R.D.B.: Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 10: 455—459, 1970.
18. Bromfield E.S.P., Jones D.G.: Ann. Appl. Biol. 94: 51—59, 1980.
19. Burton J.C.: Symbiotic nitrogen fixation in plants. ed Nutman P.S. Cambridge Univ., Cambridge. 175—189, 1975.
20. Chafel D.L., Greenwood R.M., Parker C.A.: Ninth Intern. Congr. of Soil Science, Adelaide, 2: 65—73, 1968.
21. Chhonker P.K., Iswaran V.: Isr. J. Agr. Res. 22: 41—42, 1972.
22. Cooper J.E.: Mat. Intern. Symposium on Interrelationships Between Microorganisms and Plants in Soil at Libice, Czechoslovakia, 1987.
23. Cooper J.E. Wood M., Holding A.J.: In: Temperate Legumes; Physiol., Genetics and Nodulation, ed. Tones D.A., Davies D.R., Pitman, London, 319—335, 1983.
24. Czundjerowa A.I.: Trudy WNIIC-ch Mikrobiol., 48: 74—83, 1978.

25. Daft M.J.: *Ann. Appl. Biol.* 88: 461—462, 1978.
26. Danso S.K.A., Hera C., Douka C.: *Plant and Soil*. 99: 163—174, 1987.
27. Dean J., Clark K.: *Can. J. Plant Sci.* 59: 27—34, 1979.
28. Dorosiński L.M., Awrow O.E.: *Izw. A.N.S.S.S.R. Ser. biol.* 6: 920—923, 1964.
29. Dube J.N., Mahere D.P., Rawat A.K.: *Sci. and Cult.* 46: 304, 1980.
30. Eaglesham A.R.J.: *Fertilizer use efficiency studies in intercropping systems using Nitrogen — 15*, FAO/IAEA, Ankara, Turkey, 1979.
31. Eaglesham A.R.J. i in.: *Soil Biol. Bioch.* 13: 169—171, 1981.
32. Eaglesham A.R.J. i in.: *Plant and Soil* 68: 171—192.
33. El-Bahrawy S.: *Zentralb. fur Microbiol.* 138: 443—449, 1983.
34. Evans H.J. i in.: *Can. J. Microb.* 25: 968—978, 1979.
35. Gaur Y.D., Lawther W.L.: *Soil Biol. Biochem.* 14: 99—102, 1982.
36. Germida J.J.: *Trans. XIII Congres of the Inter. Soc. of Soil Sci., Hamburg.* v. 2: 574—575, 1986.
37. Germida J.J., Casida L.E.: *Appl. Envir. Microb.* 45: 1110—1388, 1983.
38. Gewaily E.M., Khan M.F.A., Kheder A.K.: *Adv. in Nitrogen Fixation Research*, eds Veeger C., Newton W.E., Wageningen: 341, 1984.
39. Glenn A.R. i in.: *Adv. in Nitrogen Fixation Research*, eds. Veeger C., Newton W.E., Wageningen 225, 1984.
40. Gołębiowska J.: *Acta Microbiol. Pol.* 1: 327—337, 1952.
41. Gołębiowska J., Wróbel T.: *Acta Microbiol. Pol.* 1: 313—326, 1952.
42. Graham P.H.: *J. Gen. Microbiol.* 30: 245—248, 1963.
43. Graham P.H.: In: *Biolog. nitrogen fixat. technol for tropical. agricul.* ed. Graham P.H., Harris S.C., Cali, Colombia, CIAT. 27—37, 1982.
44. Graham P.H. i in.: *Agr. J.*, 72: 625—627, 1980.
45. Graham P.H., Parker C.A.: *Plant and Soil.* 20: 383—393, 1964.
46. Hardarson G., Zapata F., Danso S.A.A.: *Plant and Soil*, 82: 397—405, 1984.
47. Hardarson G., Zapata F., Danso S.K.A.: *Adv. in Nitr. Fixat. Res.*, ed Veeger C., Newton W.E., Wageningen, 34, 1984.
48. Heinonen-Tanski H., Oros G., Keckes. M.: *Acta Agric. Scandin.* 32: 283—288, 1982.
49. Höflich G.: *Arch. f. Acker Pflban.*, 23: 675—686, 1983.
50. Jauhri K.S., Bhatnager R.S., Iswarn V.: *Plant and Soil*, 53: 105—108, 1979.
51. Jauhri K.S., Philip K.: *Zentralb. f. Mikrobiol.* 139: 97—107, 1984.
52. Jensen E.S.: *Plant and Soil.* 97: 63—70, 1987.
53. Johnson H.W., Means U.M., Weber C.R.: *Agron. J.* 57: 178—185, 1965.

54. Jones R., Giddens J.: *Agron. J.* 76: 599—602, 1984.
55. Jones D.G., Druce R.G., Williams G.: *J. of Appl. Bacter.* 30: 511—517, 1967.
56. Jordan D.C.: *Can. J. Microb.*, 30: 693—695, 1952.
57. Jordan D.C., San Clemente C.L.: *Can. J. Microb.* 1: 659, 1955.
58. Kale N.Y., Patil P.L., Patil B.C.: *Indian of Microb.* 22: 203—205, 1982.
59. Kapusta G., Rouwenhorst D.I.: *Agr. J.* 65: 916—919, 1973.
60. Keyser H.H., Munns D.N.: *Soil Sci. Soc. of Amer. J.*, 43: 500—503, 1979
61. Komarowa W.N., Gołob B.I.: *Trudy W.N.I.I. Mikrobiol. srjedstw zaszczyty rost. i baktjeriolog. prjeparatow. Moskwa*, 4: 200—205, 1976.
62. Kowalczyk E.: *Sprawozdanie z I etapu badań w CPBR. 3. 15. A-1: Biotechnologie w rolnictwie i przemyśle spożywcym. IUNG.* 1987.
63. Kremer R., Peterson H.L.: *Soil Sci.* 134: 117—125, 1982.
64. Kremer R., Peterson H.L.: *Agr. J.* 75: 139—143, 1983.
65. Krugłow J.W., Paromenskaja L.N.: *Izw. Akad. Nauk SSSR. Ser. biolog.* 2: 238—249, 1986.
66. Larne T.A., Peterson J.B., Tajima S.: *Adv. in Nitr. Fixat. Res.*, eds. Veeger C., Newton W.E., Wageningen, 437—443, 1984.
67. Lawson K.A., Barnet Y.M.: *Adv. in Nitr. Fixat. Res.* eds. Veeger C., Newton W.E., Wageningen, 347, 1984.
68. Li F., Chen H., Wang F.: *Trans. XIII Congress of the Intern. Soc. of Soil Sc.*, 2: 602—603, Hamburg, 1986.
69. Lindstrom K., Myllyniemi H.: *Plant and Soil* 98: 353—362, 1987.
70. Lisova N.E.: *Inter. Symp. „Interrelationskips between Microorg. and Plants in Soil, Libice, Czechoslovakia*, ed. Skradleta, 13, 1987.
71. Lowendorf H.S.: *Adv. Microb. Ecol.* 4: 87—124, 1980.
72. Lowendorf H.S., Baya A.M., Alexander M.: *Appl. and Environ. Microbiol.* 42: 951—957, 1981.
73. Mahler R.L., Wollum A.G.H.: *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 44: 988—992, 1980.
74. Mahler R.I., Wollum A.G.H.: *Soil Sc.* 134: 317—324, 1982.
75. Marszewska-Zimięcka J.: *Pam. Puł.* 16, 1937.
76. Martyniuk M., Pietruszyńska J., Maliszewska W.: *Pam. Puł.* 71: 135—147, 1979.
77. Milto N.I.: *Kłubienkowyje bakterii i produktiwnost bobowych rastjenii. Akad. Nauk Bjełor. SSR, Mińsk, Nauke i tech.* 1982.
78. Milto N.I. i in.: w: *Mikroorganizmy — producenty biolog. aktywnych wjeszczestw. Mińsk*, 149—153, 1973.
79. Miszustin J.N., Czerepkow N.I.: *Izw. A. N.SSSR. Ser. biol.* 3: 656—678, 1979.
80. Miszustin J.N., Czerepakow W.: w *Biol. fix. molek. azota. Kijew, Naukowa dumka*: 7—19, 1983.

81. Miszustin J.N., Szilnikowa W.K.: Moskwa: Nauka, 288, 1973.
82. Newbould P.: Temp. Legumes, Physiol., Genetics and Nodul., eds. Tones D.R., Davies, Pitman, London, 1983.
83. Newbould P., Holding A.J. i in.: J. Agric. Sci, Camb. 99: 591—610, 1982.
84. Nutman P.S.: Nitr. fix. ed. Stewort. W.D.P., Gallon J.R., Acad. Press. London, rozdz. 14: 335—354, 1980.
85. Nutman P.S., Hearne R.: Rothamsted Exp. Stat. Report for 1979, Port 2: 77—90, 1980.
86. Nutman P.S., Ross G.J.S.: Rothamsted Exp. Stat. Report. for 1969. 148—167, 1970.
87. Osa-Afiana L.C., Alexander M.: J. Soil Soc. Amer. 43: 925—930, 1979.
88. Osa-Afiana L.O., Alexander M.: J. Soil Sci. Soc. Amer, 46: 285—288, 1982.
89. Paczkowski M.W., Berryhill D.L.: Appl. Envir. Microb. 38: 612—615, 1979.
90. Peres J.R.R., Vidor C.: Soil and Fertil. p. 970, 1984.
91. Philip K., Jauhri K.S.: Zentralb. f. Mikrobiol. 139: 35—41, 1984.
92. Plaziński J. i in.: Adv. in Nitr. Fix. Res., eds. Veeger C., Newton W.E., Wageningen, 424, 1984.
93. Pramanik M., Iswaran V.: Zentralbl. f. Bakter. 128: 232, 1973.
94. Pugashetti B.K., Angle J.S., Wagner G.H.: Soil Biol. Biochem., 14: 45—49, 1982.
95. Pugashetti B.K., Wagner G.H.: Plant and Soil, 53: 463—475, 1979.
96. Rajczewa wg Wojnowa-Raikowa Z., Rankow W., Ampowa G.: Mikroorganizmy i płodorodje. Moskwa, 32, 1986.
97. Rangeley A., Deft M.J., Newbould P.: New Phytol. 92: 89—102, 1982.
98. Rice W.A.: Can. J. Soil Sci. 55: 245—250, 1975.
99. Rice W.A., Olsen P.E.: Can. J. Soil Sci. 63: 541—545, 1983.
100. Rice W.A., Penney D.C., Nyborg M.: Can. J. Soil Sci. 57: 197—203, 1977.
101. Richards J.E., Soper R.J.: Agrom. J. 71: 807—811, 1979.
102. Roughley R.J., Pulsford D.J.: Nitrogen fix. in legumes. ed. Vincent J.M., Acad. Press. Sydney, 193—209, 1982.
103. Roughey R.J., Vincent J.M.: J. Appl. Bact. 30: 362—372, 1967.
104. Rovira A.D.: Austr. J. Agric. Res., 12: 77—89, 1961.
105. Salema M.P. i in.: Soil a. Fert. p. 930, 1984.

106. Salema M. i in.: *Soil Biol. Biochem.* 14: 13—14, 1982.
107. Salema M.P. i in.: *Soil Biol. Biochem.* 14: 15—22, 1982.
108. Sawicka A., Gołębiowska J.: *Acta Microb. Pol.* 25: 123—128, 1976.
109. Sharma R.L., Rao A.N.: *Fertil. Technol.* 15: 50—51, 1978.
110. Sims J.S., Sigafus R.E., Tiaranan N.: *Agr. J.* 66: 446—449, 1974.
111. Skinner F.A. i in.: *J. Appl. Bacteriol.* 43: 287—297, 1977.
112. Somasegaren P., Reyes V.G., Hoben H.: *Can. J. Microb.* 30: 23—30, 1984.
113. Sparrow S.D., Ham G.E.: *Agr. J.* 75: 20—24, 1983.
114. Sparrow S.D., Ham G.E.: *Agrom. J.* 75: 181—184, 1983.
115. Sprent J.I., Bradford A.M.: *J. Agric. Sci.* 88: 303—310, 1977.
116. Staphorst Y.L., Strijdom B.W.: *Phytophylactica* 8: 47—54, 1976.
117. Stowers M.D.: *Ann. Rev. Microb.* 39: 89—108, 1985.
118. Strzelec A.: *Pam. Puł.* 52: 87—101, 103—144, 1972.
119. Strzelec A.: *Rocz. Gleb.* 38 z. 4, 1987.
120. Subba Rao N.S.: *Recent advances in biological nitrogen fixation.* 1—7. ed. Subba Rao. Edward Arnold, 1980.
121. Tilak K.V., Subba Rao N.S.: *Fert. News.* 23: 25, 1978.
122. Waggoner J.A., Evers G.W., Weaver R.W.: *Agron. J.* 71: 375—376, 1979.
123. Wawiłow P.P., Pasypanow G.S.: *Westn. s. ch. nauki*, 9: 44—56, 1978.
124. Weaver R.W., Frederick I.R.: *Agr. J.* 66: 229—236, 1974.
125. Wilson D.O., Trang K.M.: *Trop. Agric., Trinidad*, 57: 233—238, 1980.
126. Wivstad M., Martensson A.M., Ljunggren H.D.: *Plant and Soil.* 97: 93—104, 1987.
127. Wjerjenko W.D.: *Głubinnoje kultiwirowanie i liofilnoje wysusziwanie kłubienkowych bakterii gorocho*, Mińsk, 1981.
128. Wood M., Cooper J.E.: *Soil Biol. Biochem.* 17: 493—497, 1985.
129. Wright S.F., Wright R.J., Bennett O.L.: *Plant and Soil.* 97: 151—154, 1987.
130. Wróbel T.: *Acta Microb. Pol.* 9: 181—189, 1960.
131. Van Schreven D.A.: *Plant and Soil* 32: 113—133, 1970.
132. Van Schreven D.A., Otzen D., Lidenbergh D.J. *Anton. van Leeuwenkoch* 20: 33, 1954.

133. Vincent J.M.: W-Soil Nitrogen, ed. Bartholomew W.V., Clarke F.E., 384—435, 1965.
134. Vincent J.M.: A manual for the practical study of the root- nodule bacterie, Oxford, England, 1970.
135. Vincent J.M.: W-Biol. Nitr. Fix., ed. Quispel A., Amsterdam, 268—341, 1974.
136. Vincent J.M.: Nitrogen Fix. v. II, 103—129, ed. Newton W.E., Orme-Johnson W.H., Baltimore, 1980.
137. Żurkowski W.: J. Bacter. 150: 999—1007, 1982.
138. Żurkowski W., Lorkiewicz Z.: Gen. Res. Cambr. 32: 311—314, 1978.

Materiały nadesłano do redakcji w styczniu 1988 r.