

Влияние на микробиалните инокулаци с *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* и *Glomus intraradices* върху качеството на зелен фураж от люцерна (*Medicago sativa* L.)

Костадинка Недялкова*, Галина Петкова, Радка Донкова

Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкарров”, София

*E-mail: nedyalkova.k@gmail.com

Резюме

Изследван е ефекта от самостоятелната и смесена инокулация на люцерна, сорт Плевен 6, със симбиотични азотфиксиращи бактерии *Rhizobium meliloti* 116 и *Rhizobium meliloti* 225, фосфатразлагащи бактерии *Pseudomonas fluorescens* и микоризна гъба *Glomus intraradices* върху качеството на зеления фураж. Оценката е извършена чрез показателите за химичен състав, смилаемост, енергийна и протеинова хранителна стойност. Опитът е проведен през 2018 г. на Излужена канелена-горска почва в полски условия при поливен режим. Установено е, че смесената инокулация *Rhizobium meliloti* 116+*Pseudomonas fluorescens* е с най-висока комплексна оценка за качество на фуража. Биомасата се характеризира с високо съдържание на суров протеин (22.44%) и ниско на сурови влакнини (15.35%), висока смилаемост (70.81%), висока енергийна (UFL-UFV 0.716-0.604) и протеинова (PBD-PDIN-PDIE 180-141-103 g/kg) хранителна стойност. В сравнение с контролата, всички видове микробиални инокулации имат подчертан положителен ефект върху съдържанието на сурова пепел в биомасата, а инокулациите с *Pseudomonas fluorescens* и *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 увеличават смилаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от азота (PDIN). Самостоятелните инокулации с *Rhizobium meliloti* 116 и *Rhizobium meliloti* 225 не влияят положително върху смилаемостта, енергийната и протеинова хранителна стойност на фуража. Специфичността във взаимоотношенията на люцерната с микробиалните инокуланти определя различията на ефекта върху показателите за качество на зеления фураж.

Ключови думи: люцерна; *in vitro* смилаемост; хранителна стойност; *Rhizobium meliloti*; *Pseudomonas fluorescens*; *Glomus intraradices*

Influence of microbial inoculation with *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus intraradices* on forage quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Kostadinka Nedyalkova*, Galina Petkova, Radka Donkova

“N. Poushkarov” Institute of Soil Science, Agrotechnologies and Plant Protection, Sofia, Bulgaria

*E-mail: nedyalkova.k@gmail.com

Citation

Nedyalkova, K., Petkova, G., & Donkova, R. (2020). Influence of microbial inoculation with *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus intraradices* on forage quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Rastenievadni nauki*, 57(2) 48-57 (Bg).

Abstract

The effect of single and mixed microbial inoculation of alfalfa (Pleven 6 variety) with symbiotic nitrogen fixing bacteria *Rhizobium meliloti* 116 and *Rhizobium meliloti* 225, phosphate solubilizing bacteria *Pseudomonas fluorescens* and mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on alfalfa forage quality was studied. The assessment

was made using the parameters of chemical composition, digestibility, energy and protein feeding values. A field experiment was carried out in 2018 on Chromic-Vertic Luvisol under irrigation. It was found that the mixed inoculation with *Rhizobium meliloti* 116+*Pseudomonas fluorescens* had the highest complex forage quality evaluation. The forage was characterized with high crude protein (22.44%) and low fiber (15.35%) contents, high *in vitro* digestibility (70.81%), high energy (UFL-UFV 0.716-0.604) and protein (PBD-PDIN-PDIE 180- 141-103 g/kg) feeding values. Comparing to the control, all inoculations increased the crude ash content, and *Pseudomonas fluorescens* and *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 increased the protein digestible in intestine depending on nitrogen (PDIN) value. Both single inoculations with *Rhizobium meliloti* 116 and *Rhizobium meliloti* 225 had no positive influence on forage quality parameters. The specificity of alfalfa- microbial inoculant relationships resulted in different effect on forage quality parameters.

Key words: alfalfa; *in vitro* digestibility; feeding value; *Rhizobium meliloti*; *Pseudomonas fluorescens*; *Glomus intraradices*

Люцерната е най-ценната фуражна бобова култура в света. Тя може да расте добре на почви с ниско съдържание на азот благодарение на симбиозата с азотфиксиращите бактерии от род *Rhizobium*. Бактериите образуват грудки по корените, чрез които се усвоява азот от въздуха и се подпомага азотното хранене на растението. Освен храненето, бактериите стимулират покълването на семената, фотосинтезата, растежа и добива на растенията, устойчивостта към абиотичен стрес, а също потискат развитието на патогени (Dakora, 2003; Grover et al., 2011).

Значението на люцерната за животновъдството се определя от високото белтъчно съдържание, големите ѝ продуктивни възможности (многооткосност, високи добиви), сухоустойчивост и лесната адаптация към климатични и почвени условия (Kertikova et al., 2018). Установено е, че люцерната набавя до 90% от необходимия ѝ азот чрез азотфиксация, а също, че тя фиксира най-много азот на единица площ в сравнение с други тревни култури (Kirilov, 2016). Тя е важен компонент в системите за биологично земеделие тъй като обогатява почвата с биологичен азот и е предпочитана в засушливите райони (Kertikov & Kertikova, 2016). В нашата страна люцерната е една от най-високопродуктивните и най-важна в икономическо отношение тревна култура, която се употребява за приготвяне на сено и силаж и е ценен компонент на тревните смеси за храна на животните (Naydenova & Vasileva, 2015). Проучванията върху качеството на фуражните култури са от важно практическо значение с оглед задоволяване на енергийните и хранителни нужди на животните (Vasileva et al., 2018).

Инокулацията на бобовите култури със симбиотични азотфиксиращи бактерии с цел получаване на екологична продукция е дългогодишна практика и е предмет на много научни изследвания в България (Rajcheva-Kostadinova, 1986; Markova et al., 2005; Markova et al., 2011; Donkova et al., 2014) и чужбина (Howieson, 1995; Ferreira et al., 2013). В зависимост от комбинацията „сорт растение-бактериален щам“ ефективността на щамовете *Rhisobium* при фиксиране на атмосферен азот от въздуха е различна. Усвоеният по биологичен начин азот повишава качеството на растителната продукция.

През последните десетилетия у нас се изпитва и ефекта от инокулацията на бобови треви и зърнени култури с ендомикоризните арбускуларно-микоризни (АМ) гъби, които са известни с високата способност да подпомагат растенията в усвояването на фосфор (Djonova et al, 2014; Djonova et al, 2014a; Stancheva et al., 2016; Petkova et al., 2018). АМ гъби образуват вътреклетъчни структури (арбускули и везикули) в клетките на корена и хифи извън корена, с помощта на които увеличават абсорбцията на фосфор, вода и други хранителни вещества от почвата (Marulanda et al., 2003). Известно е, фосфорът е необходим за оптимално осъществяване на процесите азотфиксация и фотосинтеза, но в почвата той се среща най-често в недостъпни за растенията форми. Някои видове бактерии, сред които най-известни са тези от род *Bacillus* и род *Pseudomonas*, разграждат успешно неразтворимите фосфорни съединения и обезпечават фосфорни йони за растенията с помощта на отделяните от тях органични киселини. В

много изследвания е доказан синергичен ефект от смесените инокулации с азотфиксиращи и фосфатразлагащи бактерии и АМ гъби върху добива и усвояването на хранителни елементи от растенията, респективно, върху качеството на растителната продукция (Sampedro et al., 2007; Stajković-Srbinović et al., 2017). Ефектът от смесената инокулация на бобови треви върху биохимичния състав, енергийната и хранителна стойност и смилаемостта на фуража е слабо проучен, а в България липсват изследвания в тази насока.

Целта на настоящото изследване е да се направи оценка на ефекта от самостоятелната и смесена инокулации със симбиотични азотфиксиращи бактерии, фосфатразлагащи бактерии и АМ гъба върху качеството на фуража от люцерна чрез показателите за химичен състав, смилаемост, енергийна и протеинова хранителна стойност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в опитното поле на ИПАЗР - София в кв. Челопечене на Излужена канелена горска почва (рН H_2O - 6.7) през 2018 г. Люцерната (*Medicago sativa* L.), сорт „Плевен 6“, е отгледана в полски опит на парцелки с големина 5 m², разположени по метода на Рюмкер в 3 повторения. С цел обезпечаване на оптимално съдържание на фосфор в почвата, с основната обработка през есента на предходната година почвата е наторена с минимална доза троен суперфосфат (15 kg/da). Предсеитбено е внесена стартова доза минерален азот (4 kg/da) под формата на амониева селитра. Високите летни температури се отразяват неблагоприятно върху развитието на културата, поради което бе предвидено напояване чрез дъждовална система.

Люцерната е засята ръчно в началото на месец април с посевна норма 4 kg семена /da. В съответствие със схемата на опита, бактериалната инокулация на семената е извършена със суспензии (титър 10⁸ cells/ml) на симбиотичните азотфиксиращи бактерии *Rhizobium meliloti* щам 116 и *Rhizobium meliloti* щам 225, както и на бактерията *Pseudomonas fluorescens*, притежаваща фосфатразлагаща активност. Микориз-

ният инокулат от гъбата *Glomus intraradices* е внесен в почвата в количество 180 g/ m² на 5 cm под повърхността. Използваните микробни инокуланти са предварително селектирани въз основа на способността им да подпомагат храненето на растенията.

Заложени са следните варианти:

1) Контрола – без инокулация; 2) Инокулация на семената с *Rhizobium meliloti* 116; 3) Инокулация на семената с *Pseudomonas fluorescens*; 4) Инокулация на почвата с *Glomus intraradices*; 5) Смесена инокулация *Gl. intraradices* + *Rhizobium meliloti* 116; 6) Инокулация с *Rh. meliloti* 225; 7) Смесена инокулация *Rh. meliloti* 116 + *Pseudomonas fl.*

Развитието на посева от люцерна в началото на опита премина при екстремни климатични условия. В периода след засяване на семената нямаше валежи и растенията поникнаха неравномерно, а в периода преди и по време на цъфтеж паднаха обилни и продължителни валежи. Поради тези причини фуражните качества на люцерната са изследвани при втория откос на първата година от развитие на културата. Проби с тегло 1 kg надземна свежа биомаса от цели растения са взети във фаза „начало на цъфтеж“ от всички повторения на вариантите. Биомасата е фиксирана при 105°C и изсушена до постоянно сухо тегло.

За оценка на биохимичния състав на фуража е използван Weende метода (АОАС, 2007), чрез който са определени съдържанието на суров протеин (по Kjeldahl – БДС – ISO 5983), сурови влакнини и сурова пепел в абсолютно сухото вещество.

Структурните влакнинни компоненти на клетъчните стени са изследвани по систематичния детергентен анализ (Goering & Van Soest, 1970) (АОАС, 2007) (EN ISO 13906, 2008) в сухи проби от цели растения и са представени като процент от сухото вещество. Определени са фракциите Неутрално-детергентни влакнини (НДВ)– лигнин+целулоза+хемицелулоза / Neutral-detergent fiber (NDF), Киселинно-детергентни влакнини (КДВ) - лигнин+целулоза / Acid-detergent fiber (ADF) и Киселинно-детергентен лигнин (КДЛ) / Acid-detergent lignin (ADL). Разликите между тези фракции предоставят данни за компонентите на клетъчните стени във влакнинната фракция - полиозидите

Хемицелулоза = НДВ – КДВ и Целулоза = КДВ - КДЛ. Съотношението на КДЛ и НДВ (КДЛ/НДВ x100) показва степента на лигнификация (Akin & Chesson, 1990), който е фактор, ограничаващ смилаемостта на фуража.

Ензимната смилаемост *in vitro* на сухото (СмСВ/IVDMD) и органично (СмОВ/IVOMD) вещество е определена чрез двустепенен пепсин-целулазен ензимен метод на Aufrere (1982) (Todorov et al., 2010) и е представена в проценти. Данните за смилаемостта на органичното вещество са използвани за изчисляване на енергийната и протеинова хранителна стойност на фуража.

Направена е оценка на хранителната стойност въз основа на съдържанието на влакнинни компоненти - относителна хранителна стойност (Linn & Martin, 1991) по показателите DDM – Digestible Dry matter/ Смилаемо сухо вещество; DMI – Dry matter intake/ Поемане на сухо вещество; RFV – Relative feeding value/ Относителна хранителна стойност.

Потенциалната енергийна хранителна стойност е оценена по Френската система като UFL-UFV (Кръмни единици за мляко-Кръмни единици за растеж) (INRA, 1988), въз основа на уравнения за бобови или житни, в които се включват експерименталните стойности за суровия протеин, суровите влакнини и смилаемостта на органичното вещество. Коефициентът на смилаемост на органичното вещество dMO *in vivo* е определен по Andrieu & Demarquilly (1989) чрез зависимост, ползваща *in vitro* смилаемостта на органичното вещество, определена експериментално. Енергийната хранителна стойност е преизчислена в българската система Кръмни единици за мляко-Кръмни единици за растеж (КЕМ-КЕР/FUM-FUG) по Тодоров (Todorov et al., 2010) и по холандската система (VEM-VEVI). Изчислени са параметрите обща енергия (ОЕ) и метаболитна енергия (МЕ) въз основа на уравнения според експерименталните стойности на суровия протеин, суровите влакнини и смилаемостта на органичното вещество.

Потенциалната протеинова хранителна стойност (PDIN=PDIA+PDIMNiPDIE=PDIA+PDIME) е оценена по Френската система (INRA, 1988) чрез показателите: Общ смилаем протеин (TDP/PBD - Total Digestible Protein/Protein Brute

Digestible), смилаем протеин в тънките черва в зависимост от азота (PDIN), и смилаем протеин в тънките черва в зависимост от енергията (PDIE).

Статистически доказаните разлики между средните стойности на вариантите са определени чрез АНОВА (LSD при $P \leq 0.05$) с програмен продукт STATGRAPHICS Plus 2.1.

РЕЗУЛТАТИ

Влиянието на приложените инокулации върху основния състав, влакнинните компоненти, смилаемостта, енергийната и протеинова хранителна стойност на зеления фураж от люцерна е отразено в таблици 1-4. В сравнение с контролата всички инокулации повишават съдържанието на сурова пепел в биомасата с 3-18%, като най-голямо е увеличението при смесените инокулации *Gl. intraradices* + *Rh. meliloti* 116 и *Rh. meliloti* 116 + *Pseudomonas fl.* (Табл. 1). Съдържанието на суров протеин се повишава с 9% само при смесената инокулация *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* (вар. 7). Показателите сурови влакнини (СВл) и неутрално-детергентни влакнини (НДВ) се понижават само във вар. 7 с 24% и 11%, съответно. Киселинно-детергентните влакнини (КДВ) се увеличават при самостоятелните инокулации с двата щама *Rhizobium* (вар. 2 и 6) с 13% и 16%. Върху киселинно-детергентния лигнин (КДЛ) оказва влияние единствено *Rh. meliloti* 225 (12% увеличение), а в останалите варианти разликите спрямо контролата не са доказани (Табл.1).

Съдържанието на хемицелулоза се повишава при инокулации с АМ гъба *Gl. intraradices* с 14% и се понижават при *Rh. meliloti* 225 с 19% (Табл. 2). Целулозата се повишава при *Rh. meliloti* 225 с 31% и се понижават при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* с 13%. Увеличение на степента на лигнификация е установено при *Rh. meliloti* 116 (12%), *Rh. meliloti* 225 (9%) и смесените инокулации *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 (7%) и *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* (7%). Показателите за смилаемост на сухото вещество (СмСВ) и на органичното вещество (СмОВ) се понижават при *Rh. meliloti* 116 (5-6%) и се повишават при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* (4%) (Табл. 2).

Върху показателите за енергийна и протеинова хранителна стойност на зеления фураж оказват влияние предимно самостоятелните и

смесени инокулации с *Rh. meliloti* 116. Общият показател за смилаемост на сухото вещество (ССВ) се понижава при *Rh. meliloti* 225 с 3% и

Таблица 1. Основен състав и влакнинни компоненти (% СВ) на зеления фураж от люцерна при микробиална инокулация

Table 1. Principal composition and fiber components content (% DM) of alfalfa forage as influenced by microbial inoculation

№	Вариант Treatment	СВ DM	Пепел Ash	СП CP	СВл CF	НДВ NDF	КДВ ADF	КДЛ ADL
1	Control	92.76 ab	10.54 a	20.59abc	20.10 bc	33.70 b	24.58 ab	5.91 ab
2	<i>Rh. meliloti</i> 116	93.16 c*	11.17 c	19.99 ab	21.36 c	35.32 b	27.83 c	6.42 bc
3	<i>Pseudomonas fl.</i>	92.83 a	11.37 c	21.09 bc	19.16 b	34.30 b	26.58 bc	5.81 ab
4	<i>Gl. intraradices</i>	92.93 a	10.89 b	20.01 ab	20.53 bc	35.06 b	26.37 bc	6.09abc
5	<i>Gl.intr.+Rh.116</i>	92.77 a	11.68 d	21.15 c	19.61 bc	33.76 b	26.74 bc	6.30 bc
6	<i>Rh. meliloti</i> 225	92.84 a	11.29 c	19.84 a	19.37 b	34.76 b	28.59 c	6.64 c
7	<i>Rh.116+Ps. fl.</i>	92.58 a	12.44 e	22.44 d	15.35 a	29.98 a	23.22 a	5.59 a
	LSD (5%)	0.18	0.26	1.12	1.96	2.52	2.88	0.64

Легенда: СВ - сухо вещество; СП - Сурова пепел; СП - суров протеин; СВл - сурови влакнини; НДВ-неутрално-детергентни влакнини; КДВ- киселинно-детергентни влакнини; КДЛ - киселинно-детергентен лигнин. *Маркираните с тъмен шрифт стойности във всяка колона имат доказана разлика с контролата. Разликите между отделните варианти са доказани при стойностите с различни буквени означения.

Legend: DM - Dry matter; Ash - Crude Ash; CP - Crude protein; CF - Crude fiber; NDF - Neutral-detergent fiber; ADF - Acid-detergent fiber; ADL - Acid-detergent lignin. *Bold values in each column are significantly different from the control. Values followed by the same letters are not significantly different.

Таблица 2. Влакнинни компоненти (% СВ) и смилаемост (%) на люцерна при микробиална инокулация

Table 2. Fiber components content (% DM) and digestibility (%) of alfalfa forage as influenced by microbial inoculation

№	Вариант Treatment	ХЕМИ HEMI	ЦЕЛУЛ CELLU	ЛИГНИФ LIGNIF	СмСВ IVDMD	СмОВ IVOMD
1	Control	7.62 bc	20.18 b	17.50 a	63.25 b	61.95 b
2	<i>Rh. meliloti</i> 116	7.49 bc	21.40 b	19.65 b	59.94 a	58.27 a
3	<i>Pseudomonas fl.</i>	7.73 c	20.76 b	16.95 a	63.76 b	62.38 b
4	<i>Gl. intraradices</i>	8.70 d*	20.28 b	17.35 a	62.67 b	61.46 b
5	<i>Gl.intr.+Rh.116</i>	7.03 abc	20.44 b	18.65 b	62.38 b	61.05 b
6	<i>Rh. meliloti</i> 225	6.17 a	26.45 c	19.10 b	62.31 b	60.94 b
7	<i>Rh.116+Pseudom. fl.</i>	6.76 ab	17.63 a	18.65 b	66.10 c	64.35 c
	LSD (5%)	0.93	2.51	1.14	1.64	1.56

Легенда: ХЕМИ- Хемичеселулоза; ЦЕЛУЛ - Целулоза; ЛИГНИФ - Степен на лигнификация; СмСВ - Смилаемост на сухото вещество; СмОВ - Смилаемост на органичното вещество. *Маркираните с тъмен шрифт стойности във всяка колона имат доказана разлика спрямо контролата. Разликите между отделните варианти са доказани при стойностите с различни буквени означения.

Legend: HEMI - Hemicellulose; CELLU- Cellulose; LIGNIF - Degree of lignification; IVDMD - *In vitro* dry matter digestibility; IVOMD - *In vitro* organic matter digestibility. *Bold values in each column are significantly different from the control. Values followed by the same letters are not significantly different.

се повишава при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* с 3 % (Табл.3). Поемането на сухото вещество (12%), относителната хранителна стойност

(16%), общата енергия (1%) и общия смилаем протеин- PBD (11%) се увеличават единствено при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* (вар.7). Ме-

Таблица 3. Протеинова хранителна стойност (g kg⁻¹ СВ) и относителна хранителна стойност на люцерна при микробиална инокулация

Table 3. Protein feeding value (g kg⁻¹ DM) and relative feeding value of alfalfa forage as influenced by microbial inoculation

№	Вариант Treatment	ОСП PBD	СПТЧА PDIN	СПТЧЕ PDIE	ССВ DDM	ПСВ DMI	ОХС RFV	ОЕ GE	МЕ ME
1	Control	162 ab	129 a	97 bc	68.58 b	3.58 a	190 a	11.76abc	5.91 c
2	<i>Rh. meliloti</i> 116	156 a	126 a	94 a *	67.22 ab	3.40 a	177 a	11.74 ab	5.73 a
3	<i>Pseudo-monas fl.</i>	167 b	133 b	99 c	68.20 ab	3.50 a	185 a	11.79 bc	5.93 cd
4	<i>Gl. intrarad.</i>	156 a	126 a	96 abc	68.36 b	3.42 a	181 a	11.74 ab	5.87 bc
5	<i>Gl.intr.+ Rh. 116</i>	167 b	133 b	98 c	68.07 ab	3.56 a	188 a	11.80 c	5.86 bc
6	<i>Rh. meliloti</i> 225	155 a	125 a	95 ab	66.63 a	3.47 a	180 a	11.73 a	5.83 b
7	<i>Rh. 116+ Ps. fl.</i>	180 c	141 c	103 d	70.81 c	4.01 b	220 b	11.87 d	5.99 d
LSD (5%)		10.87	5.27	2.83	1.71	0.27	18.77	0.05	0.072

Легенда: ОСП- Общ смилаем протеин (протеин смилаем в тънките черва); СПТЧА -смилаем протеин в тънките черва в зависимост от азота; СПТЧЕ- смилаем протеин в тънките черва в зависимост от енергията; ССВ- смилаемо сухо вещество; ПСВ- Поемане на сухо вещество; ОХС- Относителна хранителна стойност; ОЕ- обща енергия; МЕ- метаболитна енергия. *Маркираните с тъмен шрифт стойности във всяка колона имат доказана разлика спрямо контролата. Разликите между отделните варианти са доказани при стойностите с различни буквени означения

Legend: PBD –Protein brute digestible (total digestive protein); PDIN- Protein digestible in the intestine depending on nitrogen; PDIE – Protein digestible in the intestine depending on energy; DDM – Digestible Dry matter; DMI – Dry matter intake; RFV – Relative feeding value; GE- gross energy; ME- metabolic energy. *Bold values in each column are significantly different from the control. Values followed by the same letters are not significantly different.

Таблица 4. Енергийна хранителна стойност (g kg⁻¹) на люцерна при микробиална инокулация

Table 4. Energy feeding value (g kg⁻¹) of alfalfa forage as influenced by microbial inoculation

№	Вариант Treatment	UFL	UFV	KEM	KEP	VEM	VEVI
		UFL	UFV	FUM	FUG	VEM	VEVI
1	Control	0.700 bc	0.588bcd	0.580 bc	0.480bcd	869 bc	1836 bc
2	<i>Rh. meliloti</i> 116	0.662 a *	0.545 a	0.549 a	0.445 a	838 a	1787 a
3	<i>Pseudomonas fl.</i>	0.702 cd	0.590 cd	0.582 cd	0.482 cd	87 3c	1842 b
4	<i>Gl. intraradices</i>	0.695 bc	0.583 bc	0.577 bc	0.476 bc	864 bc	1828 bc
5	<i>Gl.intr.+Rh.116</i>	0.686 b	0.571 b	0.574 b	0.467 b	861 bc	1823 bc
6	<i>Rh. meliloti</i> 225	0.688 bc	0.575 bc	0.571 bc	0.470 bc	857 b	1816 b
7	<i>Rh. 116+Ps. fl.</i>	0.716 d	0.604 d	0.594 d	0.494 d	888 d	1865 d
LSD (5%)		0.015	0.014	0.017	0.014	13.31	20.77

Легенда: UFL (Fr), KEM (Bg), VEM (Dutch) - Кръмни единици за мляко; UFV (Fr), KEP (Bg), VEVI (Dutch)- Кръмни единици за растеж. *Маркираните с тъмен шрифт стойности във всяка колона имат доказана разлика спрямо контролата. Разликите между отделните варианти са доказани при стойностите с различни буквени означения.

Legend: UFL (Fr), FUM (Bg), VEM (Dutch)- Feed units for milk; UFV (Fr), FUG (Bg), VEVI (Dutch) - Feed units for growth. *Bold values in each column are significantly different from the control. Values followed by the same letters are not significantly different.

таболитната енергия се понижава при самостоятелните инокулации *Rh. meliloti* 116 (3%) и *Rh. meliloti* 225 (1%), но се увеличава при смесената във вар.7 (1%).

Кръмните единици за мляко (UFL, КЕМ, VEM) и за растеж (UFV, КЕР, VEVI) се понижават при *Rh. meliloti* 116 с 3-7% и се повишават при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* с 2% по всички системи на отчитане (Табл.3 и 4). Аналогично на тях, смислаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от енергията се понижава при *Rh. meliloti* 116 с 3% и се повишава при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* с 6%. Смислаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от азота се повишава при инокулациите с *Pseudomonas fl.* (3%), *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 (3%) и *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* (9%). Общият смислаем протеин се увеличава само при *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* с 11% (Табл.4).

ОБСЪЖДАНЕ

От получените данни може да се обобщи, че всички приложени инокулации повлияват положително съдържанието на сурова пепел в биомасата. Съдържанието на суров протеин, който е важен показател за качеството на фуража, варира между 19.84-22.4% при инокулираните растения в нашия опит. Стойностите са завишени с 1% спрямо установените за неинокулиран сорт Плевен 6 при втори откос (18.96% - 20.75 %) през годините 2006-2010 (Kertikova et al., 2018). Доказано увеличение на суровия протеин в сравнение с контролата е установено само при вар.7 (*Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.*). При посочения вариант смесената инокулация има подчертано благоприятно комплексно въздействие върху показателите за биохимичния състав (увеличава съдържанието на пепел и суров протеин), влакнинните компоненти (понижава съдържанието на суровите влакнини, неутрално-детергентните влакнини и целулозата), енергийна и хранителна стойност на фуража (повишава показателите за поемане на сухото вещество, относителна хранителна стойност, обща енергия, общ смислаем протеин и смислаем протеин в тънките черва в зависимост от азота и енергията).

Pseudomonas fluorescens са добре известни като представители на бактериите, подпомагащи развитието на растенията (plant-growth-promoting rhizobacteria - PGPR), които успешно се заселват в ризосферата и по повърхността на корените (Quagliotto et al., 2009). В изследването на Villacieros et al. (2003) при съвместна инокулация на люцерна с *Pseudomonas fluorescens* и *Sinorhizobium meliloti* е установено, че *Pseudomonas fl.* колонизират кореновата повърхност съвместно със *Sinorhizobium*, но не се конкурират с него и не влияят върху симбиотичните му взаимоотношения с люцерната. Предполага се, че *Pseudomonas fl.* действат като агенти за биоконтрол на почвени патогени. Тези данни дават основание да се препоръчат комбинирани (смесени) инокуланти, които съчетават положителните свойства на два и повече вида микроорганизми и усилват ефекта върху растението (синергизъм). Такъв ефект се наблюдава в нашия опит при двойката инокуланти *Rh. meliloti* 116+*Pseudomonas fl.* при повечето показатели за качество на фуража и при *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 по отношение на някои показатели.

Освен биологичен контрол на почвени патогени, механизмите на действие на PGPR-бактериите включват подобряване усвояемостта на хранителни елементи, продуциране на фитохормони (стимулиращи удължаването на корените и увеличаване на броя на страничните корени и власинки), вещества стимулиращи образуването на грудки, витамини и пр. (Barahona et al., 2011; Altier et al., 2013).

Самостоятелните инокулации с азотфиксиращите бактерии (*Rh. meliloti* 116 и *Rh. meliloti* 225) повишават показателите киселинно-детергентни влакнини и лигнин, степен на лигнификация и смислаемост на сухото вещество, а *Rh. meliloti* 116 намалява енергийната хранителна стойност, с което понижават качеството на фуража. Известно е, че в сравнение с другите фуражни треви, бобовите имат по-високо съдържание на лигнин - необходим за растението полимер, но напълно неусвояем от преживните животни (Naydenova et al., 2015). В нашия опит стойностите на КДЛ в повечето инокулирани варианти нямат доказани разлики спрямо контролата. Подобно на нашите резултати, в изследването на Zhang et al. (2016) е установе-

но повишено съдържание на НДВ и КДВ при инокулирана с *Rhizobium* люцерна, а съдържанието на КДЛ не се различава от контролата. Количеството на добива, други фенотипни характеристики и нивото на суров протеин при инокулираните растения също не се различават от тези на неинокулираните. Намалява ин витро смилаемостта (IVTD), за която Zhang et al. предполагат, че се обуславя от друг вид лигнин или влакнини. Авторите заключават, че вероятно промяната в качеството на фуража се дължи на измененията на лигнина и другите компоненти на клетъчните стени, предизвикани от симбиозата с бактериите.

Изследваните щамове *Rhizobium* влияят по различен начин върху показателите за качество. *Rh. meliloti* 116 увеличава повече съдържанието на сурови влакнини и намалява в по-голяма степен смилаемостта и енергийната стойност на биомасата в сравнение с щам 225, а *Rh. meliloti* 225 понижава повече съдържанието на хемицелулоза и повишава това на целулозата. Данните потвърждават уникалното взаимодействие на всеки ризобиален щам с люцерната по отношение качеството на фуража, подобно на специфичните взаимоотношения „сорт бобово растение-бактериален щам“ по отношение на фиксирания азот.

При другите самостоятелни инокулации в нашия опит е установен положителен ефект на *Pseudomonas fl.* върху смилаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от азота и на АМ гъба *Gl. intraradices* върху съдържанието на хемицелулоза. В изследване на чужди автори инокулацията на люцерна с микоризни гъби също увеличава количеството на хемицелулозата в биомасата (Baslam et al, 2014). В сравнение със самостоятелната инокулация с *Gl. intraradices*, смесената *Gl. intraradices*+*Rh. meliloti* 116 увеличава съдържанието на суров протеин, общия смилаем протеин и смилаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от азота, което доказва положителното влияние на азотфиксиращия щам при тази комбинация, но като цяло ефектът спрямо контролата е доказан само при последния показател. Получените данни показват, че между микробиалните инокуланти и растението се установяват специфични взаимоотношения, в резултат на което се различава и ефекта вър-

ху качествените показатели на биомасата при всяка от инокулациите.

ИЗВОДИ

Всички видове микробиални инокулации повишават съдържанието на пепел в биомасата в сравнение с контролата, а някои увеличават смилаемостта на протеин в тънките черва в зависимост от азота (PDIN). Подчертано благоприятно въздействие върху показателите за биохимичен състав, поемност, смилаемост, енергийна и хранителна стойност на фуража от люцерна, сорт Плевен 6, оказва смесената инокулация *Rhizobium meliloti* 116+*Pseudomonas fluorescens*. Комплексната оценка отличава този вид инокулация като най-добра за повишаване фуражните качества на люцерната.

Самостоятелните инокулации с *Rhizobium meliloti* 116 и *Rhizobium meliloti* 225 не подобряват смилаемостта, енергийната и протеинова хранителна стойност на фуража. Различният ефект на микробиалните инокуланти върху показателите за качество на зеления фураж се дължи на специфичността във взаимоотношенията на люцерната с всеки инокулант.

БЛАГОДАРНОСТИ

Издаваме благодарност на проф. Й. Найденова за участието в това изследване, което е част от разработката по проекта „Приложение на инокуланти за бобови фуражни треви“ (2017-2019), финансиран от ССА.

ЛИТЕРАТУРА

- Akin, D.E. & Chesson, A. (1990). Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. In: Proc. XVI Int. Grassland Cong., Vol. III. Association Francaise pour la Production Fourragere. Versailles, France. pp. 1753-1760.
- Altier, N., Beyhaut, E., & Pérez, C. (2013). Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management. In *Bacteria in Agrobiology: Crop Productivity*, 167-184. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Andrieu, J., & Demarquilly, C.** (1989). Prediction of the digestible and metabolisable energy content of forages from their chemical composition and organic matter digestibility. In: *Proceedings* (p. 875-876). Presented at 16. International Grassland Congress, Nice, FRA (1989-10-04-1989-10-11). Versailles, FRA: Association Française pour la Production Fourragère.
- AOAC** (2007). *Official methods of analysis*, 17-th ed. Association of Analytical Chemists, Gaitensburg, MD, USA.
- Aufrère, J.** (1982). Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Annales de Zootechnie*, 31, 11-30.
- Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Zea-Bonilla, T., Pérez-Jiménez, R. M., Martín, M., & Rivilla, R.** (2011). *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5412-5419.
- Baslam, M., Antolín, M. C., Gogorcena, Y., Muñoz, F. & Goicoechea, N.** (2014). Changes in alfalfa forage quality and stem carbohydrates induced by arbuscular mycorrhizal fungi and elevated atmospheric CO₂. *Annals of Applied Biology*, 164(2), 190-199.
- Dakora, F. D.** (2003). Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist*, 158(1), 39-49.
- Djonova, E., & Petkova, G.** (2014). Effect of inoculation with AM-fungi and N-fixing microorganisms on plant biomass of forage grasses. *Journal of Balkan Ecology*, 17(3), 261-269.
- Djonova, E., Petkova, G. & Stancheva, I.** (2014a). Influence of double microbial associations with AM fungi and *Rhizobium* on the growth of alfalfa and red clover and on the soil structure. Proceedings of the Seminar of Ecology dedicated to 70 years of the Union of Scientists in Bulgaria, 24-25 April, Sofia, Bulgaria. 121-128.
- Donkova, R., Dimitrova, A., Dzhonova, E., Petkova, G., Nedyalkova, K., Markova, A., & Altimirska, R.** (2014). Biological methods to increase yield and improve quality production in growing legumes on Chernozem soils. *Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 48(3-4), 49-59 (Bg).
- Ferreira, L.V.M, Nóbrega, R.S.A, Nóbrega, J.C.A., Aguiar, F.L., Moreira, F.M.S., & Pacheco, L.P.** (2013). Biological Nitrogen Fixation in Production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Family Farming in Piauí, Brazil. *Journal of Agricultural Science*, 5, 4, 153-160.
- Goering, H. K., & Van Soest, P.J.** (1970). *Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)*. USDA Agricultural Handbook No. 379.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B.** (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231-1240.
- Howieson, J. G.** (1995). Rhizobial persistence and its role in the development of sustainable agricultural systems in Mediterranean environments. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 603-610.
- INRA** (1988). *Alimentation des bovins, ovins et caprins*. (R. Jarrige, ed.) INRA Publ., Versailles, France, 471 pp.
- Kertikov, T., & Kertikova, D.** (2016). Quantity and quality parameters of alfalfa forage with conventional and biological seed production. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 53 (1-3), 65-71 (Bg).
- Kertikova, D., Ilieva, A., & Kertikov, T.** (2018). Crude protein content in nine alfalfa cultivars and its relationship with dry matter yield. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (4), 83-92.
- Kirilov, A.** (2016). Role of leguminous fodder crops for sustainable agriculture. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 19 (2), (46-84).
- Linn, J. G., & Martin, N. P.** (1991). Forage quality analysis and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7 (2), 509-523.
- Markova, A., Chanova, D., & Altimirska, R.** (2005). Nodulation and efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* strains depending on soybean variety in two soils. *Ecology and Industry*, 7(2), 258 – 259 (Bg).
- Markova, A., Altimirska, R., & Chanova, D.** (2011). Nitrogen-fixing bacteria for legume cultures. Proceedings of the International Conference “100 years Soil Science in Bulgaria”, 16-20 May 2011, Sofia, part 2, 569-572 (Bg).
- Marulanda, A., Azcon, R., & Ruiz-Lozano, J. M.** (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 526-533.
- Naydenova, Y., Vasilev, E., & Kirilov, A.** (2015). Plant cell wall fiber components content and digestibility of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) and legume forage species in pure stands and mixtures. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 18(1), 61-76.
- Naydenova, Y., & Vasileva, V.** (2015). Forage Quality Analysis of Perennial Legumes-Subterranean Clover Mixtures. *Science International*, 3(4), 113-120.
- Petkova, G., Nedyalkova, K., Perfanova, J., & Eftimova, D.** (2018). Effect of Microbial Inoculants on Plant Biomass of Lucerne. *Journal of Balkan Ecology*, 21(4), 370-378.
- Quagliotto, L., Azziz, G., Bajsa, N., Vaz, P., Pérez, C., Ducamp, F., Cadenazzi M., Altier, N., & Arias, A.** (2009). Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control*, 51(1), 42-50.
- Rajcheva-Kostadinova, L.** (1986). *Symbiotic nitrogen fixation of alfalfa and soybean in Bulgarian soils*. Zemizdat, Sofia, Bulgaria (Bg).
- Sampedro, I., Aranda, E., Díaz, R., Ocampo, J. A. & García-Romera, I.** (2007). Xyloglucanases in the inter-

- action between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and *Rhizobium*. *Symbiosis*, 43(1), 29-36.
- Stajković-Srbinić, O., Delić, D., Nerandžić, B., Andjelović, S., Sikirić, B., Kuzmanović D., & Rasulic, N.** (2017). Alfalfa yield and nutrient uptake as influenced by co-inoculation with rhizobium and rhizobacteria. *Rommanian Biotechnological Letters*, 22(4), 12834-41.
- Stancheva, I., Nedyalkova, K., Geneva, M., Donkova, R., Hristozkova, M., Perfanova, I., Sichanova, M., Petkova, G., Djonova, E., & Valchovski, H.** (2016). Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) grain grown under different soil moisture as affected by dual inoculation with nitrogen fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Bulgarian Journal of Soil Science*, 1(2), 112-121.
- Todorov, N., Atanasov, A., Ilchev, A., Ganchev, G., Michailova, G., Girginov, D., Penkov, G., Shindarska, Z., Najdenova, Y., Nedelkov, K., & Chobavova, S.** (2010). *Practicum in animal nutrition* (Todorov, N., ed). East-West, Sofia, Bulgaria (Bg). ISBN 978-954-321-733-5.
- Vasileva, V., Stoycheva, I., & Naydenova, Y.** (2018). Comparative characteristics of the composition and enzyme digestibility of temporary and permanent pasture. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (4), 106-117.
- Villaceros, M., Power, B., Sánchez-Contreras, M., Lloret, J., Oruezabal, R. I., Martín, M., Fernandes-Pinas, F., Bonilla, I., Whelan, C., Dowling D., & Rivilla, R.** (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant and soil*, 251(1), 47-54.
- Zhang, Z., Shao, L., Chang, L., Cao, Y., Zhang, T., Wang, Y., Liu Y., Zhang P., Sun X., Wu Y., Hu, T., & Yang, P.** (2016). Effect of rhizobia symbiosis on lignin levels and forage quality in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 55-59.