

## Προσδιορισμός της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης του *Trifolium repens* με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας $^{15}\text{N}$ ( $\delta^{15}\text{N}$ )

Ι. Θ. Τσιάλας<sup>1,2</sup> και Μ. Θ. Κασιούμη<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Γεωπονίας,  
Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος (267), 541 24 Θεσσαλονίκη  
Παρούσα διεύθυνση: <sup>2</sup>Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης ΑΕ, Εργοστάσιο Λάρισας,  
411 10 Λάρισα

### Περίληψη

Η μέθοδος της φυσικής αφθονίας  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) χρησιμοποιείται με επιτυχία πάνω από δύο δεκαετίες για τον προσδιορισμό της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης σε φυσικά, ημιφυσικά και καλλιεργούμενα οικοσυστήματα. Η εφαρμογή της στηρίζεται στην ύπαρξη διαφορών στη φυσική αφθονία  $^{15}\text{N}$  στους ιστούς ενός αζωτοδεσμευτικού είδους ( $\delta^{15}\text{N} \leq 0\text{‰}$ ) και ενός μη αζωτοδεσμευτικού είδους ( $\delta^{15}\text{N} \geq 0$ ) που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Σε τέσσερις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν σε ένα ορεινό ποολίβαδο της Βόρειας Ελλάδας κατά τη βλαστική περίοδο 1998, έγινε προσδιορισμός των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  στο ψυχανθές *Trifolium repens* και σε έξι συνυπάρχοντα είδη (*Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Plantago lanceolata*, *Achillea millefolium*) που αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Από τα έξι αυτά είδη, μόνο τα *Festuca valida*, *Taraxacum officinale* και *Achillea millefolium* αποδείχθηκαν κατάλληλα ως μάρτυρες γιατί είχαν τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  σημαντικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του *Trifolium repens* και έδιναν αποδεκτές τιμές αζωτοδέσμευσης (μη αρνητικές). Επίσης, ο μέσος όρος των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  όλων των ειδών έδωσε αποδεκτές τιμές αζωτοδέσμευσης. Τα ποσοστά της αζωτοδέσμευσης που προσδιορίστηκαν για τους τέσσερις μάρτυρες (*Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Achillea millefolium* και μέσος όρος τιμών  $\delta^{15}\text{N}$ ) δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά. Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στα ποσοστά αζωτοδέσμευσης μεταξύ των δειγματοληψιών αφού παρατηρήθηκε μείωση με την πρόοδο της αυξητικής περιόδου. Η αξιοπιστία της μεθόδου της φυσικής αφθονίας  $\delta^{15}\text{N}$  είναι μεγάλη όταν τα ποσοστά αζωτοδέσμευσης που προσδιορίζονται είναι υψηλά (>70%). Για όλους τους μάρτυρες (*Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Achillea millefolium* και μέσος όρος τιμών  $\delta^{15}\text{N}$ ) και τις 4 δειγματοληψίες, η αζωτοδέσμευση κυμάνθηκε σε ποσοστά >75%, κάτι που καθιστά τη χρήση της μεθόδου αξιόπιστη.

**Λέξεις κλειδιά:** Αζωτοδέσμευση,  $\delta^{15}\text{N}$ , *Trifolium repens*, ψυχανθή.

### Εισαγωγή

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση των ψυχανθών είναι πολύ σημαντική διεργασία καθώς εμπλουτίζει το έδαφος με άζωτο και συντελεί στη διαφοροποίηση της οικοθέσης των ειδών συμβάλλοντας στη συνύπαρξή τους (Handley and Scrimgeour 1997). Για να καταδειχτεί η σημασία της αζωτοδέσμευσης σε ένα οικοσύστημα είναι απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός της. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι.

Τα τελευταία 20 χρόνια, χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος της φυσικής αφθονίας  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ), μια μη καταστροφική μέθοδος που δεν απαιτεί την προσθήκη  $^{15}\text{N}$  και επομένως δεν προκαλεί διαταραχή του οικοσυστήματος, ενώ το μεγάλο πλεονέκτημά της είναι ότι εφαρμόζεται σε φυσικά οικοσυστήματα (Τσιάλας 2001). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι το έδαφος έχει τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  μεγαλύτερες ή μικρότερες από 0‰ που είναι οι τιμές του ατμοσφαιρικού  $\text{N}_2$ . Έτσι, φυτικά είδη που αζωτοδεσμεύουν θα έχουν τιμές από 0 έως -

2‰ ή μικρότερες (Abbadie et al. 1992). Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η εύρεση κατάλληλων ειδών-μαρτύρων με τα οποία θα συγκριθεί το αζωτοδεσμευτικό είδος (Boddey et al. 2000).

Η μέθοδος της φυσικής αφθονίας έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον ποσοτικό προσδιορισμό της αζωτοδέσμευσης πολλών ψυχανθών μεταξύ των οποίων και το *Trifolium repens* (Kerley and Jarvis 1999). Το *Trifolium repens* είναι το πιο διαδεδομένο ψυχανθές των ευκράτων περιοχών αλλά η αφθονία του εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των εδαφικών πόρων (Høgh-Jensen and Schjoerring 1997, Tsialtas et al. 2001).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να προσδιοριστεί, με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας  $^{15}\text{N}$ , το ποσοστό της αζωτοδέσμευσης και η δεσμευμένη ποσότητα N από το *Trifolium repens*, σε ένα ορεινό ποολίβαδο της Δυτικής Μακεδονίας, σε 4 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της αυξητικής περιόδου του 1998.

## Υλικά και μέθοδοι

Σε ένα ορεινό ποολίβαδο του Βερμίου όρους (40° 26'N, 22°00'E, 1115m υψόμετρο), η περιγραφή του οποίου δίνεται από τους Tsialtas et al. (2001), πραγματοποιήθηκαν, κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου του 1998, 4 δειγματοληψίες υπέργειας βιομάζας (15 Απριλίου, 6 Μαΐου, 27 Μαΐου, 17 Ιουνίου). Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν τυχαία 12 δείγματα υπέργειας βιομάζας διαστάσεων 25×25cm για τον προσδιορισμό της σύνθεσης των φυτικών ειδών (Tsialtas et al. 2001). Από τα δείγματα αυτά, 3 τυχαία υποδείγματα φύλλων των αφθονότερων φυτικών ειδών (*Poa pratensis* L., *Lolium perenne* L., *Festuca valida* (Uechtr.) Penzes, *Trifolium repens* L., *Taraxacum officinale* Weber ex Wigg, *Plantago lanceolata* L., *Achillea millefolium* L.) κονιοποιήθηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση ισotόπων N ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) και περιεχομένου N στο Scottish Crop Research Institute στο Dundee της Σκωτίας. Ο προσδιορισμός των ισotόπων αζώτου έγινε με τη χρήση φασματογράφου μάζας συνεχούς ροής (CF-IRMS, Europa Tracer Mass, Crewe, UK), ο οποίος συνδέονταν με στοιχειακό αναλυτή (Roboprep) για προετοιμασία του δείγματος και προσδιορισμό του περιεχομένου αζώτου (%N).

Η φυσική αφθονία του  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) προσδιορίστηκε από τη σχέση:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left[ \frac{R_{\text{δείγματος}} - R_{\text{προτύπου}}}{R_{\text{προτύπου}}} \right] \times 10^3,$$

όπου  $R_{\text{δείγματος}}$  και  $R_{\text{προτύπου}}$  είναι οι λόγοι  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  του δείγματος φύλλου και του προτύπου, αντίστοιχα. Το παγκοσμίως αποδεκτό πρότυπο που χρησιμοποιείται είναι το ατμοσφαιρικό  $\text{N}_2$  που έχει 0,3663‰ άτομα  $^{15}\text{N}$ .

Το ποσοστό του αζώτου που προέρχεται από την αζωτοδέσμευση υπολογίζεται με τη σύγκριση των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  του αζωτοδεσμευτικού είδους με τις αντίστοιχες τιμές μη αζωτοδεσμευτικού είδους, που αποτελεί τον μάρτυρα, σύμφωνα με τη σχέση (Shearer and Kohl 1986):

$$N_{\text{dfa}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{fix}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - B)$$

όπου  $N_{\text{dfa}}$  το ποσοστό του αζώτου που προέρχεται απ' την αζωτοδέσμευση,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{fix}}$  οι τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  του αζωτοδεσμευτικού φυτού όταν προμηθεύεται άζωτο τόσο από την ατμόσφαιρα όσο και από το έδαφος,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$  η φυσική αφθονία του  $^{15}\text{N}$  ενός μη αζωτοδεσμευτικού φυτού που προμηθεύεται άζωτο μόνο από το έδαφος και B η τιμή  $\delta^{15}\text{N}$  του αζωτοδεσμευτικού είδους με αποκλειστική πηγή αζώτου την αζωτοδέσμευση. Ως τιμές B χρησιμοποιήθηκαν οι μικρότερες τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  του *Trifolium repens* σε κάθε δειγματοληψία (Hansen and Vinther 2001).

Τα δεδομένα των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  και του ποσοστού αζωτοδέσμευσης που προσδιορίστηκαν για το *Trifolium repens* αναλύθηκαν ως Πλήρως Τυχαίοποιημένο Σχέδιο με το στατιστικό πρόγραμμα Mstat και η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με την Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (LSD test).

## Αποτελέσματα και συζήτηση

Από την Ανάλυση Παραλλακτικότητας (ANOVA) των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  προέκυψε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ειδών όσο και μεταξύ των δειγματοληψιών (Πίνακας 1). Ο Συντελεστής Παραλλακτικότητας (CV) που υπολογίστηκε ήταν πολύ υψηλός (566,66%) αλλά αυτό είναι κάτι το σύνηθες για τον προσδιορισμό τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  (Jacot et al. 2000). Ένα φυτικό είδος είναι κατάλληλος μάρτυρας όταν οι τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  διαφέρουν σημαντικά (είναι μεγαλύτερες) από τις αντίστοιχες του ψυχανθούς (Pate et al. 1994). Το *Trifolium repens* (Πίνακα 2) είχε τις μικρότερες τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  που διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ( $P \leq 0,5$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη. Επίσης, διαπιστώθηκε μείωση των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  με την πρόοδο της βλαστικής περιόδου (Πίνακας 2), πιθανώς ως αποτέλεσμα της μείωσης της εδαφικής υγρασίας (Abbadie et al. 1992).

Πίνακας 1. Ανάλυση Παραλλακτικότητας των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$ . Τα δεδομένα αναλύθηκαν ως Πλήρες Τυχαίοποιημένο Σχέδιο με δύο κύριους παράγοντες (είδη και δειγματοληψίες).

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί Ελευθερίας	f	Σημαντικότητα
Είδη (E)	6	72,05	P<0,0001
Δειγματοληψίες (Δ)	3	39,28	P<0,0001
E×Δ	18	15,99	P<0,0001
CV		566,66%	

Πίνακας 2. Σύγκριση μέσων όρων των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  για τους κύριους παράγοντες (είδη και δειγματοληψίες).

Είδος	$\delta^{15}\text{N}$	Δειγματοληψία	$\delta^{15}\text{N}$
<i>Poa pratensis</i>	-0,371 d(1)	15 Απριλίου	0,614 a
<i>Lolium perenne</i>	0,514 b	6 Μαΐου	0,721 a
<i>Festuca valida</i>	0,380 bc	27 Μαΐου	-0,112 b
<i>Trifolium repens</i>	-2,385 e	17 Ιουνίου	-0,847 c
<i>Taraxacum officinale</i>	1,915 a		
<i>Plantago lanceolata</i>	-0,013 cd		
<i>Achillea millefolium</i>	0,617 b		

1. Στην ίδια στήλη, οι τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  που φέρουν το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για  $P < 0,05$ . Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με την Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (LSD test).

Αποδεκτά αποτελέσματα ποσοστού αζωτοδέσμευσης ( $0 < N_{\text{dfa}} < 100\%$ ) του *Trifolium repens* έδωσαν οι τιμές  $\delta^{15}\text{N}$  των ειδών *Festuca valida*, *Taraxacum officinale* και *Achillea millefolium* και ο μέσος όρος των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  όλων των μη-αζωτοδεσμευτικών ειδών. Η ακρίβεια προσδιορισμού του ποσοστού αζωτοδέσμευσης απαιτεί τη χρήση πολλών ειδών-μαρτύρων (Kerley and Jarvis 1999, Ramos et al. 2001) ή τη χρήση του μέσου όρου των τιμών  $\delta^{15}\text{N}$  ενός αριθμού ειδών που συνυπάρχουν με το αζωτοδεσμευτικό είδος (Jacot et al. 2000). Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3, τα ποσοστά αζωτοδέσμευσης που προσδιορίστηκαν για το *Trifolium repens* δε διέφεραν σημαντικά από το μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε αλλά μόνο ως προς το χρόνο δειγματοληψίας. μείωση του ποσοστού αζωτοδέσμευσης με το χρόνο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία (Πίνακας 4) θα μπορούσε να αποδοθεί στη μείωση της διαθεσιμότητας του εδαφικού νερού (Serraj et al. 1999).

Πίνακας 3. Ανάλυση Παραλλακτικότητας του ποσοστού αζωτοδέσμευσης που υπολογίστηκε για το *Trifolium repens*. Τα δεδομένα αναλύθηκαν ως Πλήρες Τυχαιοποιημένο Σχέδιο με δύο κύριους παράγοντες (μάρτυρες και δειγματοληψίες).

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί Ελευθερίας	<i>f</i>	Σημαντικότητα
Μάρτυρας (Μ)	3	1,69	0,19
Δειγματοληψίες (Δ)	3	24,12	P<0,0001
Μ×Δ	9	1,43	0,22
CV		5,54%	

Πίνακας 4. Σύγκριση των μέσων όρων των ποσοστών αζωτοδέσμευσης που προσδιορίστηκαν για το *Trifolium repens* για τους κύριους παράγοντες (μάρτυρες και δειγματοληψίες).

Μάρτυρας	N <sub>dfa</sub> (%)	Δειγματοληψία	N <sub>dfa</sub> (%)
<i>Festuca valida</i>	92,05a (1)	15 Απριλίου	98,42a
<i>Taraxacum officinale</i>	95,74a	6 Μαΐου	97,64a
<i>Achillea millefolium</i>	91,72a	27 Μαΐου	92,74b
Μέσος όρος τιμών δ <sup>15</sup> N	91,86a	17 Ιουνίου	82,57c

1. Στην ίδια στήλη, οι τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για P<0,05. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με την Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (LSD test).

Επειδή τα ποσοστά αζωτοδέσμευσης, που προσδιορίστηκαν, ήταν υψηλότερα του 75%, θεωρείται ότι τα αποτελέσματα που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας <sup>15</sup>N ήταν αξιόπιστα (Unkovich and Pate 2000).

## Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η εφαρμογή της μεθόδου της φυσικής αφθονίας <sup>15</sup>N έδωσε υψηλά ποσοστά αζωτοδέσμευσης για το *Trifolium repens* καθόλη τη διάρκεια της αυξητικής περιόδου. Κατάλληλοι μάρτυρες για το προσδιορισμό του ποσοστού αζωτοδέσμευσης ήταν τα είδη *Festuca valida*, *Taraxacum officinale* και *Achillea millefolium* καθώς και ο μέσος όρος των τιμών δ<sup>15</sup>N των 6 ειδών (*Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Plantago lanceolata*, *Achillea millefolium*) που συνυπήρχαν με το *Trifolium repens*.

## Βιβλιογραφία

- Abbadie, L., A. Mariotti and J.-C. Menaut. 1992. Independence of savanna grasses from soil organic matter for their nitrogen supply. *Ecology*, 73: 608-613.
- Boddey, R.M., M.B. Peoples, B. Palmer and P.J. Dart. 2000. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 57: 235-270.
- Handley, L.L. and C.M. Scrimgeour. 1997. Terrestrial plant ecology and <sup>15</sup>N natural abundance: the present limits to interpretation for uncultivated systems with original data from a Scottish old field. *Adv. Ecol. Res.*, 27: 133-212.
- Hansen, J.P. and F.P. Vinther. 2001. Spatial variability of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in grass-white clover pastures estimated by the <sup>15</sup>N isotope dilution method and the natural <sup>15</sup>N abundance method. *Plant Soil*, 230: 257-266.
- Høgh-Jensen, H. and J.K. Schjoerring. 1997. Effects of drought and inorganic N form on nitrogen fixation and carbon isotope discrimination in *Trifolium repens*. *Plant Physiol. Biochem.*, 35: 55-62.

- Jacot, K.A., A. Lüscher, J. Nösberger and U.A. Hartwig. 2000. Symbiotic  $\text{N}_2$  fixation of various legume species along an altitudinal gradient in the Swiss Alps. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1043-1052.
- Kerley, S.J. and S.C. Jarvis. 1999. The use of nitrogen-15 natural abundance in white clover (*Trifolium repens* L.) to determine nitrogen fixation under different management practices. *Biol. Fertil. Soils*, 29: 437-440.
- Pate, J.S., M.J. Unkovich, E.L. Armstrong and P. Sanford. 1994. Selection of reference plants for  $^{15}\text{N}$  natural abundance assessment of  $\text{N}_2$  fixation by crop and pasture legumes in south-west Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, 45: 133-147.
- Ramos, M.G., M.A.A. Villatoro, S. Urquiaga, B.J.R. Alves and R.M. Boddey. 2001. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using  $^{15}\text{N}$ -isotope techniques. *J. Biotech.*, 91: 105-115.
- Serraj, R., T.R. Sinclair and L.C. Purcell. 1999. Symbiotic  $\text{N}_2$  fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50: 143-155.
- Shearer, G.B. and D.H. Kohl. 1986.  $\text{N}_2$  fixation in field settings: estimations based on natural  $^{15}\text{N}$  abundance. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 699-757.
- Τσιάλτας, Ι.Θ. 2001. Προσδιορισμός της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης των φυτών με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ). *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα* 12: 141-152.
- Tsialtas, J.T., L.L. Handley, M.T. Kassioumi, D.S. Veresoglou and A.A. Gagianas. 2001. Interspecific variation in potential water use efficiency and its relation to plant species abundance in a water limited grassland. *Funct. Ecol.*, 15: 605-614.
- Unkovich, M.J. and J.S. Pate. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation by annual legumes. *Field Crops Res.*, 65: 211-228.

## Symbiotic N<sub>2</sub>-fixation by *Trifolium repens* using <sup>15</sup>N natural abundance method (δ<sup>15</sup>N)

J. T. Tsialtas<sup>1,2</sup> and M. T. Kassioumi<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture,

Lab. of Ecology & Environmental Protection (267), 541 24 Thessaloniki, Greece

Present address: <sup>2</sup>Hellenic Sugar Industry SA, Larissa factory, 411 10 Larissa, Greece

### Summary

<sup>15</sup>N natural abundance method (δ<sup>15</sup>N) is used with success for over two decades for N<sub>2</sub>-fixation determination in natural, semi-natural and cultivated ecosystems. The application of this method is based on the differences that exist in <sup>15</sup>N natural abundance (δ<sup>15</sup>N) in the plant tissues between a N<sub>2</sub>-fixing species (δ<sup>15</sup>N ≤ 0‰) and non-fixers which are used as a reference. During the 1998 growing season, four leaf samplings were conducted in an upland grassland of Northern Greece and δ<sup>15</sup>N values were determined in *Trifolium repens* and 6 co-existing species (*Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Plantago lanceolata*, *Achillea millefolium*) which served as references. *Festuca valida*, *Taraxacum officinale* and *Achillea millefolium* were found to be appropriate reference species, since they had significantly different δ<sup>15</sup>N values compared to *Trifolium repens* and the N<sub>2</sub>-fixation determinations calculated using these values were acceptable (positive). As well as, the average of δ<sup>15</sup>N values of all non-legume species gave acceptable N<sub>2</sub>-fixation percentages. The percentages of N<sub>2</sub>-fixation determined for the four reference species (*Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Achillea millefolium* and the average δ<sup>15</sup>N values) did not differ significantly. Significant differences were found for N<sub>2</sub>-fixation percentages between sampling dates. The reliability of the method of <sup>15</sup>N natural abundance is high when the percentages of N<sub>2</sub>-fixation determined are high (>70%). In our study, for all reference species (*Festuca valida*, *Taraxacum officinale*, *Achillea millefolium* and the average of δ<sup>15</sup>N values) and samplings, N<sub>2</sub>-fixation was higher than 75%, which reveals that the use of <sup>15</sup>N natural abundance method was pertained.

**Key words:** Nitrogen fixation, δ<sup>15</sup>N, *Trifolium repens*, legumes.