

Anna Gałązka, Anna Kocoń

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

WPLYW PREPARATÓW Z MIKROORGANIZMAMI POŻYTECZNYMI NA LICZEBNOŚĆ I BIOMASĘ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH*

Słowa kluczowe: preparaty z mikroorganizmami pożytecznymi, ogólna liczebność drobnoustrojów glebowych, biomasa mikroorganizmów

Wstęp

Gleba zasiedlana jest przez różnorakie gatunki mikroorganizmów. Urodzajna gleba zawiera nawet miliardy bakterii w przeliczeniu na 1g świeżej masy gleby (1). Liczebność i aktywność mikroorganizmów uwarunkowana jest wieloma czynnikami. Skład mikroorganizmów może być istotnym wyznacznikiem tempa rozkładu materii organicznej i obiegu składników pokarmowych oraz ich dostępności w glebach (25).

Terminem „żyźność gleby” określamy naturalną zdolność gleb do zaspokojenia roślin w składniki odżywcze. O jej składzie i własnościach do dobrego wzrostu zdrowych roślin decydują następujące czynniki: biotyczne i abiotyczne (4). Do pierwszej grupy zalicza się w większości bakterie i grzyby o składzie odpowiednim dla mikroflory glebowej oraz wszystkie drobne organizmy z „królestwa zwierząt”. Drobnoustroje glebowe odpowiedzialne są za przeprowadzanie wszystkich biochemicznych procesów i transformacji, które występują w glebach. Ich liczebność i aktywność wpływa bezpośrednio na żyźność i jakość gleby (1). Abiotyczne czynniki gleb to zespół fizycznych, chemicznych, biochemicznych, fizykochemicznych cech decydujących o jej żyźności. Na naturalną żyźność gleb wpływają procesy glebotwórcze i biorące w nich udział związki mineralne, koloidy glebowe, próchnica jako zhumifikowana, bezpostaciowa materia organiczna oraz zespół wspomnianych mikroorganizmów odnawiających jej żyźność (1, 15, 22, 32).

Żyźność gleb można zwiększyć, stosując odpowiedni płodozmian roślin, właściwą dla danych gleb uprawę i nawożenie zarówno organiczne, jak i mineralne oraz

* Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.3 w programie wieloletnim IUNG-PIB.

przez melioracje, zachowując właściwe stosunki wodno-powietrzne (23). Negatywne skutki intensyfikacji produkcji roślinnej prowadzonej metodami konwencjonalnymi doprowadziły do wyjałowienia i zakwaszenia gleb, a w konsekwencji do degradacji środowiska. Problemy te wymuszają poszukiwanie alternatywnych, skutecznych metod indukowania rozwoju roślin. W celu ochrony środowiska naturalnego i odbudowy naturalnej żyzności gleby coraz częściej poszukuje się rozwiązań mających na celu ograniczenie chemizacji i przywrócenie różnorodności biologicznej w przyrodzie (10, 16, 17). Taką alternatywę mogłyby stanowić preparaty zawierające żywe mikroorganizmy. Stąd też, interesującymi dla rolnictwa rozwiązaniami z zakresu podniesienia żyzności gleb i ochrony roślin przed chorobami są stosowane od niedawna (ok. 10 lat) kompozycje kultur pożytecznych mikroorganizmów (2, 10, 14, 16). Istnieją doniesienia, mówiące o tym, że wprowadzenie do gleby szczepionki zawierającej efektywne mikroorganizmy daje szereg pozytywnych efektów, tj. ograniczenie procesów gnilnych, przyspieszenie przemiany materii, zwiększenie efektu fotosyntezy, zwiększenie zawartości próchnicy, odtruwanie gleby skażonej pestycydami, hamowanie rozwoju patogenów roślin oraz podnoszenie jakości biologicznej plonów roślin (15, 25). Z uwagi więc na szeroki zakres przewidywanych pozytywnych rezultatów związanych z zastosowaniem EM (Efektywnych Mikroorganizmów) oraz skrajnych opinii na temat ich właściwości wysoce uzasadnione wydaje się prześledzenie jego wpływu na stan autochtoniczny mikroflory gleby oraz jej aktywność biochemiczną.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano trzy preparaty o nazwach handlowych: Użyźniacz Glebowy, EM, ProBioEMy.

Użyźniacz Glebowy jest ekstraktem ze specjalnego kompostu i, jak deklaruje producent, służy do podnoszenia urodzajności gleby. Dopuszczony on jest do stosowania we wszystkich systemach rolnictwa, również ekologicznym. Jak podaje producent, jest to unikalny, naturalny preparat stwarzający nowe możliwości w technologii uprawy gleby i roślin.

Preparat EM jest biologiczną mieszanką składającą się z mikroorganizmów pochodzenia naturalnego, należących m.in. do bakterii kwasu mlekowego, bakterii fotosyntetyzujących, drożdży, promieniowców i grzybów pleśniowych. W skład preparatu EM wchodzi bakterie mlekowe (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*), bakterie fotosyntetyzujące (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter spae*), drożdże (*Saccharomyces albus*, *Candida utilis*), promieniowce (*Streptomyces albus*, *S. griseus*) oraz grzyby pleśniowe (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*).

W skład preparatów mikrobiologicznych typu **ProBioEmy** wchodzi bakterie kwasu mlekowego, promieniowce, bakterie fotosyntetyzujące. Bakterie kwasu mlekowego (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) dość często spowalniają rozwój chorobotwórczych mikroorganizmów oraz przyspieszają biodegradację materii organicznej. Antagonizm tych bakterii wobec innych drobnoustrojów kojarzony jest z następującymi metabolitami i ich działaniem: produkcją kwasów organicznych pośrednio wpływających na regulację (buforowanie) odczynu gleby (pH), wytwarzaniem nadtlenu wodoru

(H_2O_2), wytwarzaniem peptydów-bakteriocyn – laktacyny, laktobiny, acidoliny i in., działaniem modyfikującym na układ odpornościowy oraz współzawodnictwem w kierunku miejsc receptorowych na powierzchni komórek rośliny – gospodarza. Następną grupą drobnoustrojów wchodzącą w skład preparatów mikrobiologicznych są drożdże (*Saccharomyces*) produkujące substancje o charakterze związków fitohormonalnych, enzymy i in. oraz związki stanowiące najczęściej pożywkę dla bakterii kwasu mlekowego i pożytecznych promieniowców (*Actinomycetes*). W skład tych preparatów wchodzi także bakterie fotosyntetyzujące. Bakterie te odgrywają wiodącą rolę w procesach biochemicznych; posiadają zdolność syntezy aktywnych biochemicznie związków, wykorzystując do tego celu energię słoneczną i ciepło gleby. Naukowcy zajmujący się problemami rolnictwa badali te gatunki mikroorganizmów od wielu lat.

Efektywność konsorcjów pożytecznych mikroorganizmów opiera się na działaniu dobranych mikroorganizmów, które mogą wspólnie rozwijać się w mieszaninach hodowlanych i są ze sobą kompatybilne fizjologicznie. Stwierdzono, że mieszanina tak dobranych mikroorganizmów zaaplikowana do naturalnego środowiska stymuluje tworzenie próchnicy glebowej, rozkładając pozostawione resztki poźniwne i podnosi zdrowotność gleb poprzez ograniczenie występowania patogenów (16, 17).

Material i metody

Wpływ preparatów mikrobiologicznych na liczebność drobnoustrojów glebowych

Badania dotyczące oceny efektywności działania 3 wybranych, najbardziej rozpowszechnionych w praktyce rolniczej preparatów z mikroorganizmami pożytecznymi: EM – Efektywne Mikroorganizmy, EmFarma Plus i UGmax – Użyźniacz glebowy przeprowadzono w RZD w Grabowie (52°13'N, 19°37'E), woj. mazowieckie, w warunkach eksperymentów polowych, w latach 2012–2014. Doświadczenie zlokalizowane było na glebie płowej wytworzonej na glinie lekkiej, kompleksu przydatności rolniczej żytnej bardzo dobrego, gdzie przedplonem była pszenica ozima. Doświadczenie miało charakter statyczny i prowadzono je metodą równoważnych podbloków: split-block-split-plot, w 3 powtórzeniach. Badania przeprowadzono w sumie na 108 poletkach, każde o powierzchni brutto 48 m² i powierzchni netto (do zbioru) 25,5 m².

W przeprowadzonych badaniach zastosowano 3 czynniki badawcze. Pierwszym czynnikiem były 3 badane produkty z mikroorganizmami pożytecznymi + obiekt kontrolny: EM Naturalnie Aktywny (Greenland Technologia EM Sp. z o.o.), EmFarma Plus (PrioBiotics Polska), UGmax – Użyźniacz Glebowy (P.P.H.U. BOGDAN) oraz obiekt kontrolny – bez stosowania preparatów mikrobiologicznych (4 obiekty). Drugim czynnikiem badawczym były 3 sposoby stosowania ww. produktów: na ściernisko, na ściernisko + słomę oraz na ściernisko + słomę + 30 kg N. Natomiast trzecim czynnikiem były 3 poziomy nawożenia N, w pierwszym roku było to: 60; 120

oraz 180 kg N·ha⁻¹, a w kolejnych dwu latach (2013–2014): O; 70 oraz 140 kg N·ha⁻¹. Azot w formie saletry amonowej (NH₄NO₃) stosowano na wiosnę, przy 2 poziomach nawożenia, tj. NI – w dwu dawkach, natomiast przy 3 poziomach nawożenia NII – w trzech dawkach dzielonych.

Preparaty mikrobiologiczne stosowano w dawkach według zaleceń Producenta. W przypadku preparatu EM i EmFarma Plus było to 30 l preparatu na hektar, zaś UGmax w dawce 0,9 l·ha⁻¹. Wszystkie preparaty dozowano co roku, we wrześniu w rozcieńczeniu z 300 litrami wody i opryskiwano nimi: ściernisko lub ściernisko wraz z pociętą słomą pozostawioną na polu po zbiorze ziarna, a także ściernisko ze słomą z dodatkiem azotu (30 kg N). Po oprysku, zawsze tego samego dnia, preparaty były przykrywane ok. 10 cm warstwą gleby (kompaktową broną talerzową KBT). Działanie badanych produktów porównywano z obiektami kontrolnymi – bez stosowania ww. preparatów. W schemacie doświadczenia nie uwzględniono kombinacji z dodatkiem do gleby tylko nośnika zastosowanego w preparacie.

Zakres przeprowadzonych badań mikrobiologicznych obejmował oznaczenie ogólnej liczebności bakterii właściwych, promieniowców i grzybów oraz mikroorganizmów oligotroficznych, kopiotroficznych, amonifikacyjnych oraz bakterii rozkładających fosforany, według następującej metodyki:

- a) ogólna liczebność drożdży (19);
- b) ogólna liczebność grzybów (19);
- c) ogólna liczebność bakterii i promieniowców (28);
- d) ogólna liczebność bakterii mlekowych [podłoże Difco];
- e) ogólna liczebność bakterii kopiotroficznych (9);
- f) ogólna liczebność bakterii oligotroficznych (9);
- g) ogólna liczebność *Azotobacter* spp. (7);
- h) ogólna liczebność bakterii amonifikacyjnych (9);
- i) ogólna liczebność bakterii rozkładających fosforany (26).

Ogólną liczbę bakterii oznaczano na pożywce z wyciągiem glebowym po 14 dniach inkubacji w temperaturze 27°C. Grzyby hodowano w temperaturze 24°C przez 5 dni. Mikroorganizmy oligotroficzne oznaczano na pożywce według Hattori, Hattori w temperaturze 28°C i określano ich liczebność po 7 dniach. Liczebność drobnoustrojów kopiotroficznych określano metodą posiewu wgłębnego na selektywne podłoże agarowe. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C przez 3–5 dniach.

Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie wykonano metodą fumi-gacji – ekstrakcji według normy PN-ISO 14240-2 (24). Celem oznaczania biomasy drobnoustrojów glebowych jest oszacowanie ciągłości zachowania żywności gleby, potencjalnej zdolności do rozkładu dodawanych substancji organicznych oraz wpływu dodawanych substancji na naturalną populację mikroorganizmów. Metoda ta jest metodą oznaczania biomasy mikroorganizmów w glebach przez pomiar całkowitego możliwego do wyekstrahowania materiału organicznego biomasy pochodzącego głównie ze świeżo zabitych mikroorganizmów (5, 8, 13). Niniejszą metodę można

także stosować do oceny zawartości azotu w biomase drobnoustrojów i zawartości w glebie azotu pochodzenia drobnoustrojowego reagującego z ninhydryną (31). Biomasę węgla i azotu w próbkach glebowych wyrażono w $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. gleby (24).

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie, posługując się programem Statistica 7.1. W celu oceny istotności różnic wielu średnich zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji. Celem tej analizy była weryfikacja hipotezy, że średnie w grupach są jednakowe, wobec hipotezy alternatywnej: co najmniej dwie średnie różnią się między sobą (rozkłady zmiennych były zbliżone do rozkładu normalnego). Za zmienne w analizie wariancji przyjęto: ogólną liczebność bakterii, promieniowców, grzybów, *Azotobacter* spp., bakterii koptotroficznych, oligotroficznych, amonifikacyjnych, drożdży oraz biomasę węgla i azotu (tab. 1).

Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (tab. 1) możemy wnioskować, że średnie zmiennych w poszczególnych grupach (preparat, sposób stosowania preparatu, nawożenie NPK, rok) różnią się istotnie statystycznie. W celu stwierdzenia, które średnie dla analizy jednoczynnikowej wariancji różnią się między sobą, a które są równe, zastosowano test NIR (najmniejszej istotnej różnicy) oraz test Tukeya. Na podstawie uzyskanych istotnych różnic średnich zmiennych w poszczególnych grupach w dalszej części rozdziału szczegółowo przedstawiono uzyskane wyniki pod kątem postępujących zmian.

Tabela 1

Wyniki analizy jednoczynnikowej wariancji średnich zmiennych w poszczególnych grupach: preparat, sposób stosowania preparatu, nawożenie NPK i rok ($\alpha \leq 0,05$) dla całego zbioru danych

ZMIENNA Ogólna liczebność	Preparat		Sposób stosowania		Nawożenie NPK		Rok	
	wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α
Bakterii i promieniowców (10^8 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	0,139	0,935	1,028	0,363	0,000	0,988	16,652*	0,000*
Grzybów (10^4 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	0,382	0,765	0,097	0,907	1,607	0,209	69,871*	0,000*
<i>Azotobacter</i> spp. (10^1 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	1,00	0,395	1,138	0,326	0,108	0,742	1,251	0,292
Drożdży (10^4 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	2,186	0,097	0,026	0,973	4,191*	0,044*	4,802*	0,011*
Bakterii amonifikacyjnych (10^7 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	0,304	0,821	1,553	0,218	0,376	0,541	2,416	0,096
Bakterii koptotroficznych (10^6 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	3,799*	0,014*	0,382	0,683	0,315	0,576	8,363*	0,000*
Bakterii oligotroficznych (10^7 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	1,026	0,386	0,521	0,596	0,155	0,694	12,456*	0,000*
Bakterii rozkładających fosforany (10^4 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	4,970*	0,003*	0,174	0,840	0,677	0,413	5,923*	0,004*

cd. tab. 1

ZMIENNA Ogólna liczebność	Preparat		Sposób stosowania		Nawożenie NPK		Rok	
	wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α
bakterii mlekowych (10^6 jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	0,366	0,777	0,915	0,404	0,332	0,565	47,074*	0,000*
biomasa węgla i azotu								
Biomasa C	1,961*	0,028*	0,464	0,630	0,000	0,986	52,273*	0,000*
Biomasa N	0,892*	0,008*	0,545	0,582	0,008	0,925	73,448*	0,000*

* istotnie statystycznie ($\alpha \leq 0,05$) wartości F i poziomy istotności

Źródło: opracowanie własne

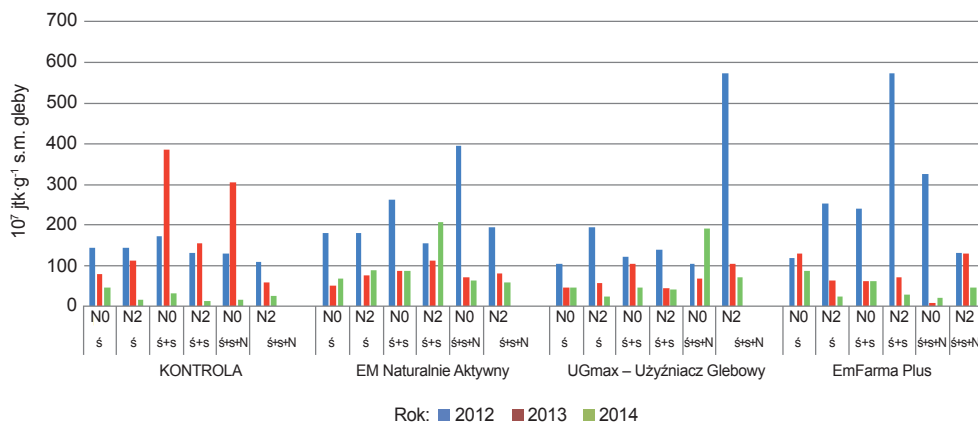
Liczebność drobnoustrojów glebowych

Udział drobnoustrojów w kształtowaniu żyzności i zdrowotności gleby jest powszechnie znany, ponieważ to właśnie mikroorganizmy glebowe odgrywają główną rolę w mineralizacji materii organicznej, udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, powstawaniu humusu glebowego, struktury gruzelkowej gleby, ograniczaniu patogenów i wielu innych (1, 4, 23, 32). Do najliczniejszych grup drobnoustrojów glebowych należą: bakterie właściwe i promieniowce, grzyby, drożdże, bakterie amonifikacyjne, koptotroficzne, oligotroficzne, rozkładające fosforany oraz bakterie kwasu mlekowego. Wyżej wymienione grupy uwzględniono w metodyce badawczej.

Promieniowce (*Actinomycetes*) (należące do bakterii) stanowią obok bakterii właściwych (typowych) drugą pod względem liczebności grupę mikroorganizmów prowadzących ważne przemiany złożonych związków węgla i azotu w glebie (1). Promieniowce odgrywają decydującą rolę w przebiegu licznych procesów biochemicznych w środowisku glebowym. Dzięki zdolności rozkładu i przemian różnych substancji organicznych są ważnym czynnikiem próchnicotwórczym. Jednym z głównych czynników mogących selekcyjnie wpływać na ich zespoły jest wilgotność gleby. Większość promieniowców może żywić się związkami, które z trudnością są rozkładane przez inne bakterie. Promieniowce wytwarzają substancje o działaniu zapobiegającym rozwojowi wielu szkodliwych grzybów i bakterii z aminokwasów wydzielanych przez bakterie fototropowe oraz rozkładu materii organicznej (32). *Actinomycetes* mogą doskonale współistnieć razem z bakteriami fototropowymi. Dlatego też oba te gatunki poprawiają jakość środowiska gleby poprzez stymulowanie jej odporności na działanie patogenów chorobotwórczych (17).

W badanych próbkach glebowych najwyższą liczebność bakterii oraz promieniowców stwierdzono w pierwszym roku badań (2012) (rys. 1). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich liczebności bakterii i promieniowców w zależności od zastosowanego preparatu i sposobu jego stosowania oraz nawożenia

NPK. Istotnie statystycznie różnice średnich wykazano jedynie dla roku badań. Średnie liczebności bakterii i promieniowców w roku 2012 różniły się istotnie statystycznie od średnich ogólnych liczebności dla roku 2013 i 2014.



n = 3

K – kontrola, EM – preparat EM, Ug – preparat UGmax, PBE – preparat ProBioEMy

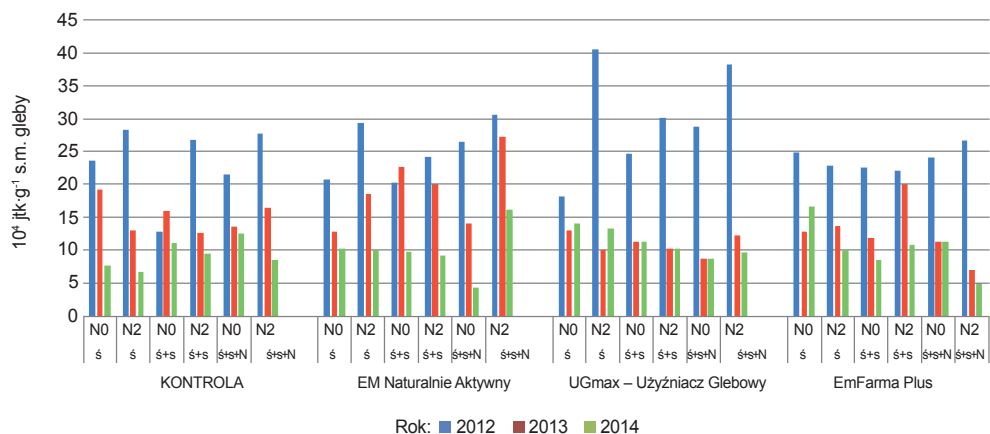
ś – ściernisko; ś+s – ściernisko i słoma; ś+s+N – ściernisko, słoma i nawożenie; N0 – brak nawożenia; N2 – II dawka NPK

Rys. 1. Ogólne liczebności bakterii i promieniowców w latach 2012–2014

Źródło: opracowanie własne

Obok bakterii właściwych i promieniowców zasadniczą rolę w krążeniu substancji pokarmowej w glebie (i przepływie energii) odgrywają grzyby. Istnieje wiele przyczyn, opowiadających się za stwierdzeniem, że są one potężnymi czynnikami przemian geochemicznych (1). Ze względu na małe rozmiary stosunek ich powierzchni do objętości jest bardzo duży, co pozwala na szybką wymianę substancji między własną komórką a środowiskiem, równie ważne jest ich szybkie rozmnażanie się. Z rolniczego punktu widzenia ich fizjologiczne zdolności do akumulacji wody, wytwarzania kwasów organicznych i uwalniania wielu składników odżywczych z minerałów glebowych, powodują, że grzyby spełniają ważną funkcję w procesach glebotwórczych oraz w procesach odżywiania roślin (17). Jako saprofity przeprowadzają bardzo intensywnie zachodzące procesy mineralizacji materii organicznej, przyczyniając się do podniesienia urodzajności gleby.

Najwyższą liczebność grzybów stwierdzono w pierwszym roku badań (2012) (rys. 2). Statystycznie istotne różnice średnich liczebności grzybów stwierdzono jedynie w poszczególnych latach badań. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich ogólnych liczebności grzybów w zależności od zastosowanego preparatu, sposobu jego stosowania oraz nawożenia NPK (tab. 1).



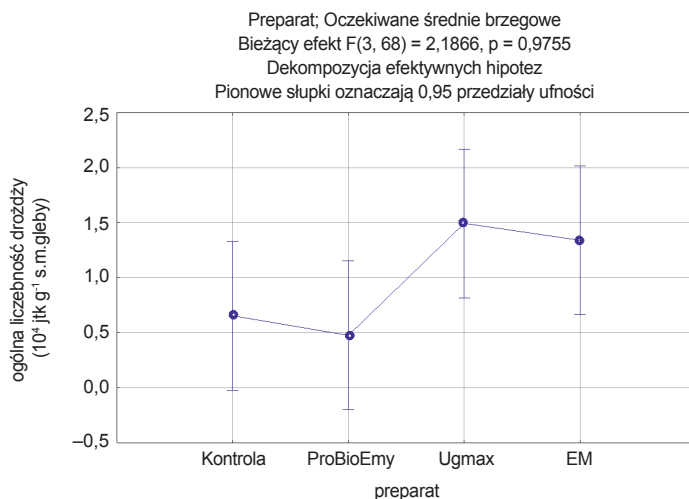
n = 3; K – kontrola, EM – preparat EM, Ug – preparat UGmax, PBE – preparat ProBioEMy
 ś – ściernisko; ś+s- ściernisko i słoma; ś+s+N – ściernisko, słoma i nawożenie; N0 – brak nawożenia;
 N2 – II dawka NPK

Rys. 2. Ogólna liczebność grzybów w próbkach glebowych w latach 2012–2014

Źródło: opracowanie własne

Najwyższą liczebność drożdży (podobnie jak w przypadku grzybów) stwierdzono w pierwszym roku badań (2012) (rys. 3). Statystycznie istotne różnice średnich liczebności grzybów stwierdzono jedynie w poszczególnych latach badań oraz po zastosowanym nawożeniu NPK. Drożdże doskonale syntetyzują składniki służące do zwalczania drobnoustrojów w żywności i wiele innych użytecznych substancji wydzielanych przez bakterie fotosyntetyczne, co sprzyja prawidłowemu wzrostowi roślin (17). Bioaktywne substancje, takie jak hormony i enzymy, wytwarzane przez drożdże wspierają czynne komórki i podział korzenia. Ich wydzieliny stanowią użyteczne podłoże dla bakterii kwasu mlekowego i *Actinomycetes* (1).

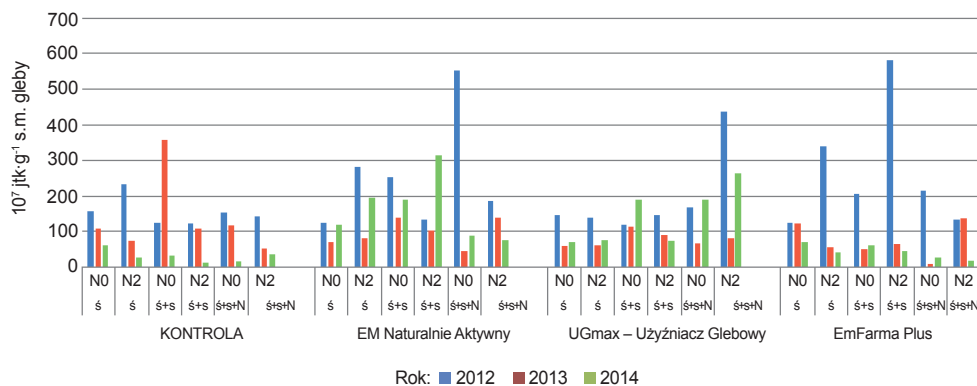
Kolejną grupą drobnoustrojów, których liczebność określano w doświadczeniu były oligotrofy. Są to drobnoustroje, które dobrze rosną w środowisku o wyjątkowo niskiej dostępności związków organicznych (29). Optymalne stężenie składników pokarmowych dla oligotrofów waha się w granicach od 1 do 15 mg rozpuszczonego C·l⁻¹. Pojęcie oligotrofii odnosi się do bakterii, które rosną na podłożu ubogim, o niskim stężeniu składników pokarmowych tylko na początku hodowli. Natomiast w kolejnych posiewach bakterie te rosną bardzo dobrze również na podłożu bogatym w składniki pokarmowe. Są to bakterie wykazujące małą zmienność pod względem liczebności i aktywności. Nie wymagają innego pożywienia lub źródła. Oligotrofy stanowią znaczną część bakterii zasiedlających glebę (stanowią 80–85% ogólnej ilości bakterii) (1). Wykazują dynamikę rozwoju charakterystyczną dla mikroflory autochtonicznej, wykorzystują humus jako źródło materii i energii oraz inne substancje proste i złożone. Oligotrofy reagują negatywnie na zbyt duże stężenie węgla w środowisku (29).



Rys. 3. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla grup: rok, preparat, sposób stosowania preparatu oraz nawożenie NPK dla $\alpha \leq 0,05$

Źródło: opracowanie własne

Najwyższą liczebność bakterii oligotroficznych stwierdzono w pierwszym roku badań (2012) (rys. 5). Średnie liczebności bakterii oligotroficznych uzyskane dla roku 2012 różniły się istotnie statystycznie od średnich uzyskanych w latach 2013 i 2014. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich ogólnych liczebności bakterii oligotroficznych w zależności od zastosowanego preparatu, sposobu jego stosowania oraz nawożenia NPK.



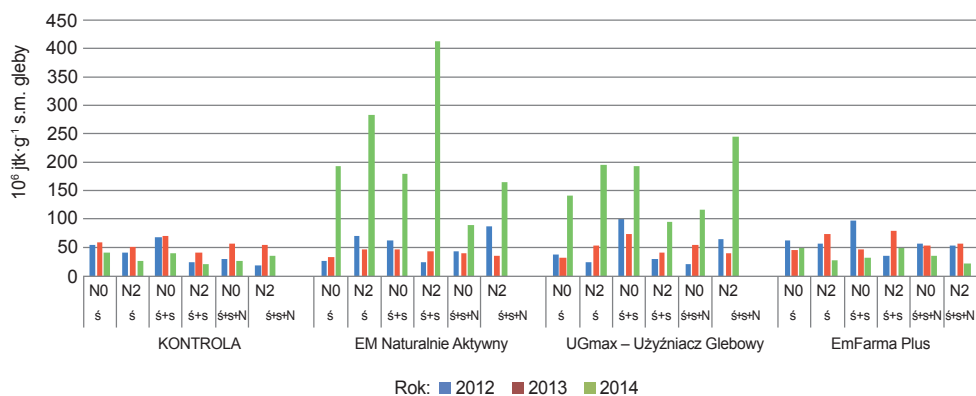
n = 3; K – kontrola, EM – preparat EM, Ug – preparat UGmax, PBE – preparat ProBioEmy
 ś – ściernisko; ś+s – ściernisko i słoma; ś+s+N – ściernisko, słoma i nawożenie; N0 – brak nawożenia; N2 – II dawka NPK

Rys. 4. Ogólna liczebność bakterii oligotroficznych w próbkach glebowych w latach 2012–2014

Źródło: opracowanie własne

W zespole analizowanych mikroorganizmów uwzględniono także dynamikę rozwoju kopiotrofów. Kopiotrofy są bakteriami rozwijającymi się w glebie po wprowadzeniu do niej substancji organicznej, która jest przez nie intensywnie mineralizowana. W odróżnieniu od autochtonicznych oligotrofów kopiotroficzne zymogeny przetwarzają materię organiczną w sposób bardzo rozrzućny (29). Wykazują one zmienność pod względem liczebności i aktywności w glebie. Liczebność ta spada po wykorzystaniu łatwo dostępnego substratu pokarmowego w wyniku autolizy większości komórek lub przejścia pozostałych w fazę spoczynku. Kopiotrofy to specyficzna grupa drobnoustrojów glebowych namnażająca się intensywnie podczas napływu do gleby materii organicznej, głównie w postaci świeżych resztek roślinnych i zwierzęcych (1). Ich wymagania pokarmowe związane są więc z wysokim stężeniem składników organicznych w podłożu, których optymalna dawka wynosi ok. 1000 mg rozpuszczonego C·l⁻¹. W trakcie trwania badań zaobserwowano również, że we wszystkich kombinacjach glebowych przeważał udział oligotrofów w mikroflorze glebowej. Powyższa dominacja jest niezbędna dla zachowania stałego poziomu glebowej materii organicznej. Ponadto, z badań Weyman-Kaczmarkowej (29) wynika, iż wskaźnikiem równowagi biologicznej gleby jest stosunek mikroorganizmów oligotroficznych do kopiotroficznych, zaś ilościowe relacje między nimi, określane jako O:K, stanowią jeden z indeksów kierunku mikrobiologicznych przemian materii organicznej gleby.

Najwyższą liczebność bakterii kopiotroficznych uzyskano w ostatnim roku badań (2014) (rys. 5). Statystycznie istotny wzrost liczebności bakterii kopiotroficznych stwierdzono po zastosowaniu preparatu EM i Ugmax. Być może wiąże się to z wprowadzeniem do gleby większej ilości składników pokarmowych w postaci melasy, która stanowi płynny nośnik badanych preparatów. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich ogólnych liczebności bakterii kopiotroficznych w zależności od sposobu stosowania preparatu oraz nawożenia NPK.



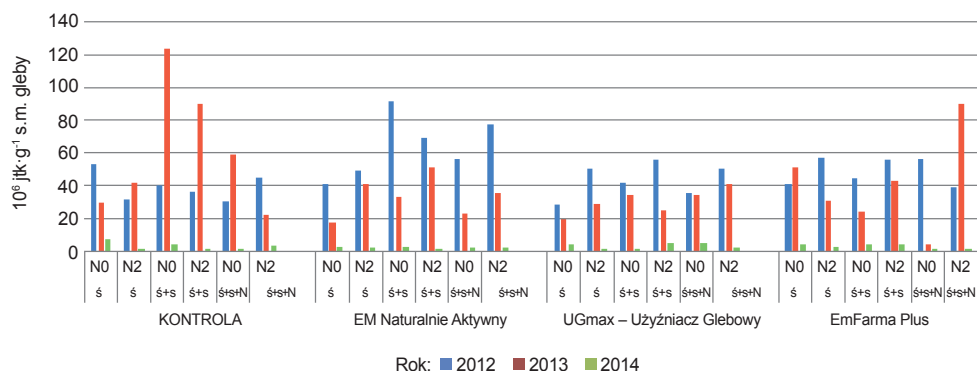
n = 3; K – kontrola, EM – preparat EM, Ug – preparat UGmax, PBE – preparat ProBioEMy
 ś – ściernisko; ś+s- ściernisko i słoma; ś+s+N – ściernisko, słoma i nawożenie; N0 – brak nawożenia;
 N2 – II dawka NPK

Rys. 5. Ogólna liczebność bakterii kopiotroficznych w próbkach glebowych w latach 2012–2014

Źródło: opracowanie własne

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) wymagają do życia środowisk bogatych w puryny, pirymidyny, aminokwasy oraz witaminy, co wynika z braku zdolności do syntezy różnych związków (4). Niektóre gatunki muszą mieć dostarczone od 6 do 13, a nawet 18 aminokwasów w podłożu. Najwydajniej rosną na podłożach pełnych zaspokajających w dostatecznym stopniu ich wymagania pokarmowe. Na duże potrzeby pokarmowe LAB wskazuje środowisko ich występowania (1, 23, 26). Bardzo często spotykane są w materiale roślinnym, mleku oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, a niezwykle rzadko w glebach i wodzie. Wynika to z faktu, że woda czy gleba nie dostarcza wystarczającej ilości wymaganych substratów aminokwasowych. W wyniku fermentacji odczyn podłoża obniża się, co jest wynikiem akumulacji kwasu mlekowego oraz innych produktów metabolizmu. Podłoże staje się bardziej wybiórcze dla bakterii. Te, które nie potrafią utrzymać pH wewnątrz komórek bliskiego neutralnemu, nie są w stanie wykazywać aktywności metabolicznej (25). Kwas obecny w podłożu niszczy błony cytoplazmatyczne, co skutkuje ucieczką jonów potasowych i magnezowych na zewnątrz komórki (1). Jednak dzięki sprawnemu systemowi regulacji pH, mikroorganizmy te są w stanie utrzymać odczyn cytoplazmy bardziej zasadowy niż w otaczającym je środowisku. Bakterie kwasu mlekowego wytrącają kwas mlekowy z cukrów i innych węglowodanów wytwarzanych przez bakterie fotosyntetyczne i drożdże (1, 4). Kwas mlekowy jest naturalnym sterylizatorem hamującym rozwój szkodliwych mikroorganizmów poprzez szybki rozkład materii organicznej. Bakterie kwasu mlekowego w warunkach glebowych mają zdolność hamowania rozprzestrzeniania się m.in. grzybów z rodzaju *Fusarium* – szkodliwego mikroorganizmu wywołującego wiele groźnych procesów chorobotwórczych (21).

Najwyższą liczebność bakterii kwasu mlekowego uzyskano w pierwszym i drugim roku badań (2012–2013) (rys. 6). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich ogólnych liczebności bakterii kwasu mlekowego w zależności od zastosowanego preparatu, sposobu stosowania preparatu oraz nawożenia NPK (tabela 1).

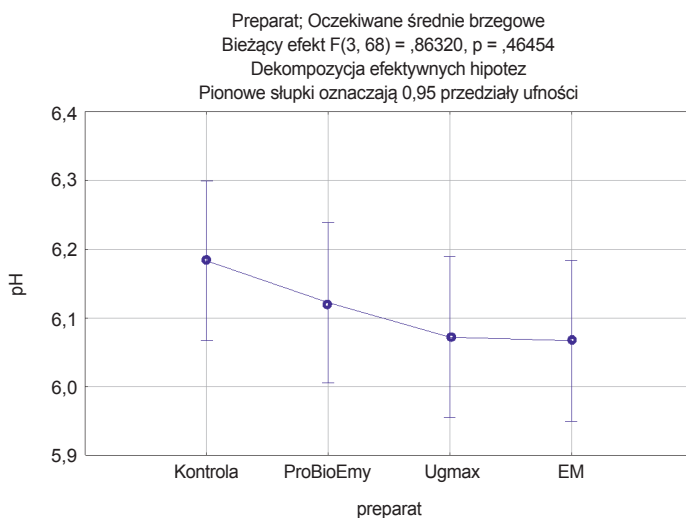


n = 3; K – kontrola, EM – preparat EM, Ug – preparat UGmax, PBE – preparat ProBioEMy
 ś – ściernisko; ś+s- ściernisko i słoma; ś+s+N – ściernisko, słoma i nawożenie; N0 – brak nawożenia;
 N2 – II dawka NPK

Rys. 6. Ogólna liczebność bakterii mlekowych w próbkach glebowych w latach 2012–2014

Źródło: opracowanie własne

Liczebności poszczególnych grup drobnoustrojów glebowych w istotny sposób zależą od odczynu gleby (1, 23). Ma on decydujący wpływ na zmianę składu mikroflory glebowej i jej właściwości oraz na aktywność enzymatyczną znajdujących się w niej mikroorganizmów. Odczyn pH w wodzie w badanych próbkach glebowych wahał się od 5,8 do 6,8 i zależał zarówno od roku badań, jak i zastosowanego sposobu dozowania preparatu (rys. 7).



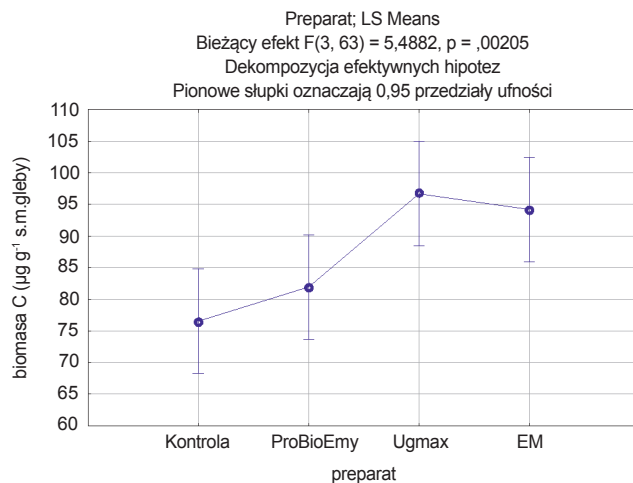
Rys. 7. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla grup: rok, preparat, sposób stosowania preparatu oraz nawożenie NPK dla $\alpha \leq 0,05$

Źródło: opracowanie własne

Biomasa mikroorganizmów glebowych

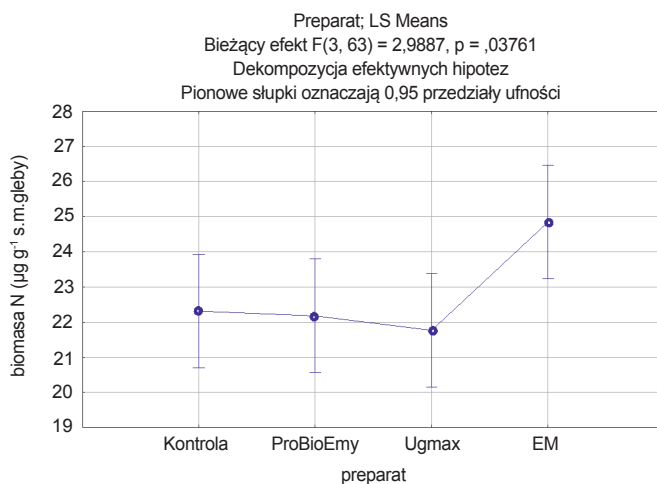
Biomasa mikroorganizmów w glebach stanowi ok. 85% całej biomasy wszystkich organizmów żyjących w tym środowisku, a ok. 90% dwutlenku węgla (CO_2) powstającego w glebach ma pochodzenie drobnoustrojowe (1, 5, 13). Dane te świadczą o dużej aktywności metabolicznej i ogromnym znaczeniu mikroorganizmów dla większości procesów zachodzących w środowisku glebowym, wśród których najważniejszy jest rozkład i mineralizacja materii organicznej (resztki pozbiorowe, obornik i inne nawozy naturalne, komposty, poplony). Rozkład resztek organicznych jest bardzo ważny ze względu na uwalnianie mineralnych form składników odżywczych stanowiących ważne źródło pokarmu dla roślin uprawnych (24, 31). Ponadto w wyniku procesów mikrobiologicznej transformacji materii organicznej tworzona jest próchnica glebowa, której zawartość w glebie jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o zdolności gleby do magazynowania wody i składników pokarmowych, a także o fizycznej strukturze (gruzełkowatość, wymiana gazowa) gleby (18, 30). Najwyższą zawartość węgla organicznego stwierdzono w drugim

i trzecim roku badań (2013–2014) (rys. 8). Statystycznie istotny wzrost węgla organicznego w biomasie mikroorganizmów stwierdzono w glebie po zastosowaniu preparatu o nazwie EM i UGmax. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu sposobu dozowanego preparatu oraz nawożenia NKPI i NKPII na zmianę zawartości węgla, jak również azotu (rys. 9) organicznego w glebie.



Rys. 8. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla grup: rok, preparat, sposób stosowania preparatu oraz nawożenie NPK dla $\alpha \leq 0,05$

Źródło: opracowanie własne



Rys. 9. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla grup: rok, preparat, sposób stosowania preparatu oraz nawożenie NPK dla $\alpha \leq 0,05$

Źródło: opracowanie własne

W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono nieistotny statystycznie wzrost liczby bakterii i grzybów w kombinacjach z wprowadzonymi preparatami. Otrzymane wyniki potwierdzają rezultaty m.in. badań Kucharskiego i Jastrzębskiej (17). Wyżej wymienieni autorzy stwierdzili hamujący wpływ szczepionki EM na namnażanie się grzybów i innych analizowanych grup drobnoustrojów. Zdaniem Badury (1) Efektywne Mikroorganizmy spełniają swoje zadanie na glebach zdegradowanych, zniszczonych i ubogich, na których brak drobnoustrojów pełniących funkcje ochronne. Powyższe stwierdzenie wyjaśniać może rozbieżności w wielu publikowanych wynikach badań (3, 6, 17, 20, 27, 33). W warunkach polowych trudno jest uzyskać pozytywne efekty stosowania preparatów mikrobiologicznych, głównie ze względu na skomplikowane interakcje między organizmami glebowymi oraz oddziaływanie bardzo zmiennych warunków pogodowych i abiotycznych właściwości gleb na rozwój mikroorganizmów glebowych (20). Autochtoniczna mikroflora szybko wypiera ze środowiska drobnoustroje dostarczone w postaci biopreparatu. Ponadto większość drobnoustrojów będących składnikami biopreparatów nie jest przystosowana do wzrostu i rozwoju w środowisku glebowym – tak jest w przypadku bakterii kwasu mlekowego, które stanowią główny składnik tychże preparatów (11, 12, 21).

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, iż wprowadzenie do gleby węglowodanów i dodatkowych mikroorganizmów w postaci preparatów mikrobiologicznych przyczyniło się do silnej konkurencji o pokarm i dominacji innych grup drobnoustrojów, kosztem mikroorganizmów oligotroficznych i autochtonicznych.

Literatura

1. B a d u r a L.: Czy znamy wszystkie uwarunkowania funkcji mikroorganizmów w ekosystemach lądowych. Kosmos. Probl. Nauk Biol., 2004, **53**: 373-379.
2. B a j w a R.: Effects of arbuscular mycorrhizae (AM) and effective microorganisms (EM) on various plants under allelopathic stress. Allelopathy J., 2005, **16**: 261-271.
3. B i e l i Ń s k a E.J., F u t a B., B i k - M o ł o d z i ń s k a M., S z e w c z u k M., S u g i e r D.: The impact of fertilizing agents on the enzymatic activity of soils. J. Res. Appl. Agr. Engin., 2013, **58(3)**: 15-19.
4. B o w l e s T.M., A c o s t a - M a r t í n e z V., C a l d e r ó n F., J a c k s o n L.E.: Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. Soil Biol. Biochem., 2014, **68**: 252-262.
5. B r o o k e s P.C., L a n d m a n A., P r u d e n G., J e n k i n s o n D.S.: Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. Soil Biol. Biochem., 1985, **17**: 837-842.
6. D a i l y M.J., S t e w a r t D.P.C.: Influence of Effective Microorganisms (EM) on vegetative production and carbon mineralization – a preliminary investigation. J. Sustain. Agr., 1999, **14**: 15-25.
7. F e n g l e r o w a W.: Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. Acta Microbiol. Pol., 1965, **14(2)**: 203-206.

8. Ghani A., Dexter M., Perrott K.W.: Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation. *Soil Biol. Biochem.*, 2003, **35**: 1231-1243.
9. Hattori R., Hattori T.: Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *J. General Appl. Microbiol.*, 1980, **26**: 1.
10. Janas R.: Możliwości wykorzystania efektywnych mikroorganizmów w ekologicznych systemach produkcji roślin uprawnych. *Probl. Inż. Roln.*, 2009, **3**: 111-119.
11. Javai A.: Foliar application of effective microorganisms on pea as an alternative fertilizer. *Agron. Sustain. Dev.*, 2006, **26**: 257-262.
12. Javid A., Bajwa R., Anjum T.: Effect of heat-sterilization and EM (effective microorganisms) application on wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in organicamended sandy loam soil. *Cereal Res. Commun.*, 2008, **36**: 489-499.
13. Jenkinson D.S., Ladd J.N.: Microbial biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biochem.*, 1981, **5**: 415-471.
14. Khalique A., Abbasi M.K., Hussain T.: Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresource Technol.*, 2006, **97**: 967-972.
15. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A.: Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 2007, **27**: 29-43.
16. Kłama J., Jędryczka M., Wiśniewska H., Gajewski P.: Ocena stopnia rozwoju oraz kondycji fizjologicznej ozimych roślin pszenicy i rzepaku w uprawie z zastosowaniem Efektywnych Mikroorganizmów. *Nauka Przyroda Technologie*, 2010, **6(4)**: 79-81.
17. Kucharski J., Jastrzębska E.: Rola efektywnych mikroorganizmów w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych gleby. *Inżynieria Ekologiczna*, 2005, **12**: 295-297.
18. Leita L., De Nobili M., Muhlbachova G., Mondini C., Marchiol L., Zerbi G.: Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol. Fert. Soils*, 1995, **19**: 103-108.
19. Martin J.P.: Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 2003, **69**: 215.
20. Martyniuk S., Książak J.: Ocena pseudomikrobiologicznych preparatów stosowanych w uprawie roślin. *Pol. J. Agron.*, 2011, **6**: 27-33.
21. Mayer J., Scheid S., Widmer F., Fließbach A., Oberholzer H.R.: How effective are Effective microorganisms (EM)? Results from a field study in temperate climate. *Appl. Soil Ecol.*, 2010, **46**: 230-239. Muthaura C., Musyimi D.M., Ogar J.A., Okello S.V.: Effective microorganisms and their influence on growth and yield of pigweed (*Amaranthus dubians*). *J. Agri. Biol. Sci.*, 2010, **5(1)**: 17-22.
22. Parham J.A., Deng S.P., Raun W.R., Johnson G.V.: Long-term cattle manure application in soil. I. Effect on soil phosphorus levels, microbial biomass C, and dehydrogenase and phosphatase activities. *Biol. Fert. Soils*, 2002, **35**: 328-337.
23. PN ISO 14240-2. Jakość gleby – Oznaczenie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie. Metoda fumigacji-ekstrakcji. 2001.
24. Rifai S.W., Markewitz D., Borders B.: Twenty years of intensive fertilization and competing vegetation suppression in loblolly pine plantations: Impacts on soil C, N and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 2010, **42**: 713-723.
25. Rodina A.: Mikrobiologiczne metody badania wód. PWRiL, Warszawa 1968.

26. S h a h S.H., S a l e e m M.F., S h a h i d M.: Effect of Different Fertilizers and Effective Microorganisms on Growth, Yield and Quality of Maize. *Int. J. Agr. Biol.*, 2001, **3(4)**: 378-379.
27. W a l l a c e R., L o c h h e a d A.: Qualitative studies of soil microorganisms IX. Amino acid requirements of rhizosphere bacteria. *Can. J. Res. sec. C*, 1950, **28**: 1.
28. W e y m a n - K a c z m a r k o w a W.: Interdependencies between oligotrophic and copiotrophic bacteria in soils of different mechanical structure. *Pol. J. Soil Sci.*, 1995, **29(1)**: 62-72.
29. W u J., J o e r g e n s e n R.G., P o m m e r e n i n g B., C h a u s s o d R., B r o o k e s P.C.: Measurement of soil microbial biomass C by Fumigation- extraction- an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 1990, **22**: 1167-1169.
30. X i a n g S., D o y l e A., H o l d e n P., S c h i m e l J.: Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, **40**: 2281-2289
31. Y u a n B., Y u e D.: Soil microbial and enzymatic activities across a chronosequence of Chinese pine plantation development on the loess plateau of China. *Pedosphere*, 2012, **22**: 1-12.
32. Z y d l i k P., Z y d l i k Z.: Impact of biological effective microorganisms (EM) preparations on some physico-chemical properties of soil and the vegetative growth of apple-tree rootstocks. *Nauka Przyroda Technologie*, 2008, **2(1)**: 1-4.

Adres do korespondencji:

dr Anna Galązka
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 47 86 950
e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl