

ROLA MIKROORGANIZMÓW EFEKTYWNYCH (EM) I GLEBOWYCH W KSZTAŁTOWANIU WŁAŚCIWOŚCI MIKROBIOLOGICZNYCH GLEBY

Jan Kucharski, Ewa Jastrzębska

Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wstęp

Od wielu lat wykorzystuje się szczepionki mikrobiologiczne w rolnictwie. BASHAN [1998] do podstawowych celów jakie mają one spełniać zalicza: wiązanie i udostępnianie roślinom azotu zawartego w środowisku, ochronę przed patogenami, uruchamianie trudno dostępnych składników mineralnych występujących w glebie i ułatwienie ich pobierania przez rośliny oraz produkcję fitohormonów. Szczepionka taka może składać się z jednego lub kilku szczepów drobnoustrojów zawieszonych na nośniku, a jej zastosowanie w warunkach polowych nie powinno być skomplikowane.

Najczęściej wykorzystywane drobnoustroje do szczepienia gleby to bakterie z rodzaju *Azotobacter* [BASHAN 1998], *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* [SAINI i in. 2004], *Bacillus* [SUNDARA i in. 2002; STĘPIEŃ i in. 2004], *Pseudomonas* [SOBICZEWSKI 1994], *Streptomyces* [BASHAN 1998; STURZ i in. 2004] oraz *Anabaena azollae* [ANJULI i in. 2003] i grzyby mikoryzowe [SAINI i in. 2004].

Ostatnio w wielu krajach promuje się stosowanie nowego preparatu mikrobiologicznego o nazwie EM, zawierającego bakterie fermentacji mlekowej – *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, bakterie fotosyntetyzujące – *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter spae*, drożdże – *Saccharomyces albus*, *Candida utilis*, promieniowce – *Streptomyces albus*, *S. griseus* oraz grzyby – *Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis* [SZYMANSKI, PATTERSON 2003]. W działaniu tego preparatu upatruje się poprawę struktury gleby, zwiększenie zawartości próchnicy i urodzajności gleby.

Celem podjętych badań było określenie wpływu szczepionek mikrobiologicznych EM₁ i EM₂ zawierających efektywne mikroorganizmy, w porównaniu z niektórymi występującymi w glebie, na właściwości mikrobiologiczne gleby oraz plonowanie sałaty.

Materiał i metody badań

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w hali wegetacyjnej w czterech powtórzeniach. W badaniach wykorzystano glebę brunatną właściwą o składzie

granulometrycznym piasku gliniastego mocnego pylastego o $\text{pH}_{\text{KCl}} = 6,7$. Próbki tej gleby pobrane z poziomu orno-próchnicznego umieszczono w wazonach polietylenowych. Przed napełnieniem wazonów 3,2 kg porcje gleby dokładnie wymieszano ze szczepionkami zawierającymi efektywne mikroorganizmy (EM_1 , EM_2) lub inokulum bakterii z rodzaju *Azotobacter*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* wyizolowanych z gleby, na której prowadzono doświadczenie.

Izolacji dokonano na podłożach selektywnych: według FENGLEROWEJ [1965] dla *Azotobacter* spp. oraz według MULDERA i ANTHEUMISSE [1963] dla *Arthrobacter* spp. i *Pseudomonas* spp. Pozyskane mikroorganizmy przeszczepiono na skosy z odpowiednią pożywką selektywną i inkubowano w temperaturze 28°C przez 72 godz. Inokulum każdego rodzaju bakterii przygotowano dokonując zmywu bakterii ze skosów za pomocą 3 cm^3 0,85% wodnego roztworu NaCl. Do każdego wazonu wprowadzono po 5 cm^3 odpowiedniego inokulum.

Preparaty EM_1 i EM_2 przed zastosowaniem do gleby zostały przygotowane zgodnie z instrukcją tj. drobnoustroje w nich zawarte uaktywniono poprzez inkubację z odpowiednią dawką sacharozy. Dlatego w badaniach zastosowano także obiekty zawierające taką samą ilość sacharozy, jaką dodawano do preparatów EM. Zatem doświadczenie zawierało następujące obiekty doświadczalne: K (kontrola), Az (gleba z inokulum bakterii z rodzaju *Azotobacter* – $52\text{ mln}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby), Arth (gleba z inokulum bakterii z rodzaju *Arthrobacter* – $48\text{ mln}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby), Ps (gleba z inokulum bakterii z rodzaju *Pseudomonas* – $120\text{ mln}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby) oraz obiekty z glebą kontrolną z dodatkiem samej sacharozy – S (3% roztwór sacharozy wykorzystywany do namnażania efektywnych drobnoustrojów – w ilości $56\text{ mm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1 : 100), oraz sacharozy i inokulum wyizolowanych bakterii glebowych: S+Az, S+Arth, S+Ps, a także preparaty EM_1 i EM_2 (w ilości $56\text{ mm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby rozcieńczone wodą w stosunku objętościowym 1 : 100) stosowane oddzielnie (EM_1 i EM_2) oraz w mieszaninach z bakteriami z rodzaju *Azotobacter* (EM_1 +Az, EM_2 +Az), *Arthrobacter* (EM_1 +Arth, EM_2 +Arth) i *Pseudomonas* (EM_1 +Ps, EM_2 +Ps).

Do tak przygotowanej gleby przepikowano po 2 rośliny na wazon 7-dniowej siewki sałaty kruchej, lodowej odmiany Królowa Lata. Przez cały okres prowadzenia doświadczenia (70 dni) utrzymywano stałą wilgotność gleby na poziomie 60% kapilarnej pojemności wodnej. W dniu zbioru sałaty określono jej plon (świeżej oraz suchej masy) i pobrano próbki gleby, w których oznaczono liczebność bakterii oligotroficznych (Olig), kopiotroficznych (Cop), amonifikacyjnych (Am), immobilizujących azot (Im), celulolitycznych (Cel), *Azotobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., promieniowców (Act) oraz grzybów (Fun). Oznaczenia mikrobiologiczne wykonano zgodnie z procedurą przedstawioną w pracy WYSZKOWSKIEJ [2002]. Określono także aktywność: dehydrogenaz (Deh) – metodą Lenharda w modyfikacji CASIDY i in. [1964], ureazy (Ure) metodą GORINA i CHING CHANGA [1966], fosfatazy kwaśnej (Pac) i fosfatazy alkalicznej (Pal) metodą TABATABAI i BREMNERA [1969]. Wyniki opracowano statystycznie przy pomocy testu Duncana pakietem STATISTICA 6.1 [STATSOFT, INC... 2003].

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wprowadzone do gleby mikroorganizmy, czy to w postaci szczepionek EM, czy też inokulum bakteryj-

nego zawierającego bakterie wyizolowane z gleby oddziaływały w różnym stopniu na skład i aktywność drobnoustrojów glebowych. Stwierdzono także istotne w tym względzie działanie sacharozy.

Szczepionka EM₁ wpłynęła stymulująco jedynie na bakterie celulołityczne, a EM₂ na bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (tab. 1). Zarówno liczebność bakterii oligotroficznych, amonifikatorów, bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, promieniowców jak i grzybów malała w glebie szczepionej efektywnymi mikroorganizmami. Zdecydowanie pozytywniej na namnażanie drobnoustrojów oddziaływało inokulowanie gleby *Arthrobacter* spp., bez dodatku sacharozy, powodując wzrost liczebności bakterii oligotroficznych, kopiotroficznych, immobilizujących azot, amonifikatorów i promieniowców. Wprowadzenie do gleby *Arthrobacter* spp., i dodatkowo sacharozy stymulowało rozwój bakterii immobilizujących azot, a EM₁+Arth bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i grzybów, zaś EM₂+Arth bakterii celulołitycznych, *Azotobacter* i grzybów. Być może o fakcie pozytywnego oddziaływanie *Arthrobacter* spp. na inne mikroorganizmy zdecydowały: zdolność wiązania azotu atmosferycznego oraz wydzielanie chitynaz [LATZKO, HAMPEL 1995], które mogą ograniczać w glebie ilość patogenicznych grzybów. Pozytywnie na namnażanie się bakterii oligotroficznych, immobilizujących azot, amonifikatorów, *Arthrobacter* spp. oraz grzybów działała także sacharoza.

Tabela 1; Table 1

Liczebność drobnoustrojów (jtk·kg⁻¹ s.m.) w glebie
Number of microorganisms (cfu·kg⁻¹ DM) in the soil

Rodzaj inokulum Type od inokulum	Olig · 10 ⁹	Cop · 10 ⁹	Cel · 10 ⁷	Im · 10 ⁹	Am · 10 ⁹	Az · 10 ⁴	Arth · 10 ⁸	Ps · 10 ⁸	Act · 10 ⁹	Fun · 10 ⁷
K	3,12	6,65	1,40	2,95	4,42	6,68	4,53	1,42	5,71	2,44
Az	3,97	5,85	1,38	3,12	6,53	21,06	10,53	0,88	5,89	3,01
Arth	7,39	9,26	2,04	4,65	8,80	5,63	7,81	1,45	9,26	2,39
Ps	8,56	7,08	2,01	4,23	6,70	7,26	8,99	2,06	9,97	2,61
S	7,75	7,61	0,85	6,54	12,30	7,64	10,98	1,10	6,36	2,95
S+Az	7,37	8,98	1,55	6,46	7,47	15,34	8,07	1,68	7,23	3,70
S+Arth	2,14	6,36	1,93	8,36	6,32	8,00	44,59	1,27	6,79	2,68
S+Ps	2,95	4,62	2,24	5,96	4,72	6,67	4,58	2,66	5,71	6,00
EM ₁	1,60	8,27	1,81	4,33	4,76	5,79	5,01	1,25	3,80	1,92
EM ₁ +Az	1,14	4,29	3,72	2,93	3,11	20,87	9,00	1,82	2,75	1,82
EM ₁ +Arth	4,77	5,78	1,33	5,17	4,99	7,71	9,36	1,96	4,49	3,98
EM ₁ +Ps	5,17	4,53	2,28	2,53	4,42	8,02	4,49	1,99	3,64	1,60
EM ₂	1,70	2,95	0,96	1,84	2,58	6,56	1,00	1,95	1,29	0,92
EM ₂ +Az	1,45	2,75	1,48	4,34	3,32	16,49	3,39	1,17	2,86	1,80
EM ₂ +Arth	8,53	4,80	2,15	7,24	8,14	9,64	17,53	1,37	6,42	4,16
EM ₂ +Ps	1,25	3,42	1,85	4,24	5,48	5,59	3,95	1,41	2,89	1,89
NIR _{0,01} ; LSD _{0,01}	0,80	1,22	0,66	1,58	1,67	1,73	1,84	0,28	1,24	0,50

K gleba nieszczepiona; soil without inoculum

Znacznie bardziej czuła na zmiany zachodzące w środowisku glebowym okazała się aktywność enzymów (tab. 2). Najwyższą aktywność dehydrogenaz

stwierdzono w obiektach, w których nie stosowano efektywnych mikroorganizmów. Preparaty EM₁ i EM₂ istotnie obniżały aktywność tych enzymów, co pozostaje w sprzeczności z badaniami MURANYI i JÓZEFACIUKA [2003]. Wymienieni autorzy donoszą, że szczepionki typu EM stymulują aktywność dehydrogenaz i wzmagają oddychanie gleby.

Najwyższą aktywność ureazy glebowej stwierdzono w glebie kontrolnej (K). Wprowadzenie sacharozy istotnie obniżało aktywność testowanego enzymu. Negatywne działanie na ureazę wywarło także zaszczepienie gleby bakteriami z rodzaju *Azotobacter*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* oraz preparatami EM₁ i EM₂.

Tabela 2; Table 2

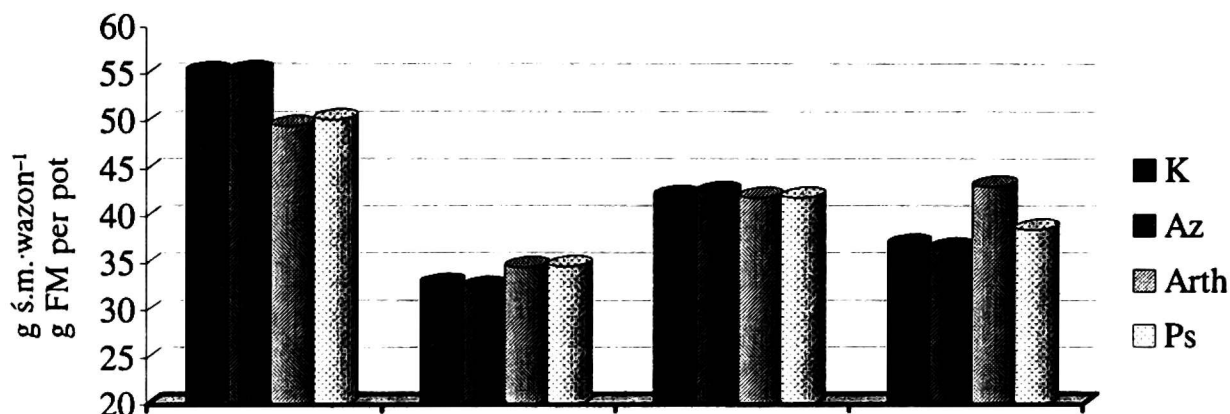
Aktywność enzymatyczna gleby
Activity of soil enzymes

Rodzaj inokulum Type of inoculum	Deh (cm ³ H ₂ ·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	Ure (mg N-NH ₄ ·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	Pac (mmol PNP·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)	Pal (mmol PNP·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)
K	11,29	38,55	1,15	1,89
Az	10,50	32,75	1,13	1,64
Arth	11,48	33,39	1,08	1,50
Ps	11,71	34,74	1,08	1,60
S	11,81	30,16	1,21	1,62
S+Az	10,47	25,61	1,28	1,62
S+Arth	11,44	32,10	1,37	1,82
S+Ps	11,58	38,99	1,33	1,72
EM ₁	10,51	37,21	1,15	1,54
EM ₁ +Az	11,66	37,01	1,20	1,67
EM ₁ +Arth	10,73	31,35	1,33	1,66
EM ₁ +Ps	10,02	36,04	1,18	1,64
EM ₂	9,80	28,07	1,17	1,90
EM ₂ +Az	9,17	33,93	1,29	1,85
EM ₂ +Arth	11,04	32,21	1,14	1,65
EM ₂ +Ps	10,54	27,56	1,15	1,64
NIR _{0,01} ; LSD _{0,01}	0,75	1,45	0,15	0,06

Efektywne mikroorganizmy (EM₁ i EM₂) nie zmieniały aktywności fosfatazy kwaśnej, natomiast enzym ten stymulowały bakterie z rodzaju *Azotobacter*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* w glebie z dodatkiem sacharozy. W przypadku fosfatazy alkalicznej potwierdził się brak jakiegokolwiek oddziaływania preparatu EM₂, podczas gdy preparat EM₁ okazał się skutecznym inhibitorem tego enzymu.

Ponieważ szczepionki EM₁ i EM₂ nie wywarły pozytywnego działania na aktywność enzymatyczną gleby, nie jest więc zaskoczeniem, że działały negatywnie na plonowanie sałaty (rys. 1). Obniżyły także jej jakość handlową – na liściach pojawiły się bowiem nekrotyczne plamy. Otrzymane wyniki nie potwierdzają rezultatów badań innych autorów [SINQUIERA i in. 1993; WIETRZYŃSKA i in. 2003]. WIETRZYŃSKA i in. [2003] obserwowała pozytywne oddziaływanie szczepionek EM na wzrost ziemniaków, natomiast SINQUIERA i in. [1993] odnotowali dodatni

ich wpływ na kiełkowanie oraz żywotność ogórków, marchwi, pomidorów, grochu i buraków.



NIR = 3,33; LSD = 3.33

Rys. 1. Plon sałaty (g św.m.·wazon⁻¹)

Fig. 1. Yield of lettuce (g FM per pot)

Być może, jak sugeruje BADURA [2004], efektywne mikroorganizmy spełniają swoje zadanie na glebach zdegradowanych, zniszczonych i ubogich, w których brak drobnoustrojów pełniących funkcje ochronne w strefie ryzosferowej korzeni roślin, natomiast na glebach nie zdegradowanych ich oddziaływanie jest mniej efektywne.

Wnioski

1. Szczepionki handlowe EM₁ i EM₂, zawierające tzw. efektywne mikroorganizmy hamowały namnażanie bakterii oligotroficznych, amonifikatorów, promieniowców, *Arthrobacter* spp. oraz grzybów, natomiast EM₁ stymulował rozwój bakterii celulolitycznych. Obie szczepionki hamowały także aktywność dehydrogenaz i ureazy.
2. Wprowadzenie do gleby inokulum *Arthrobacter* spp. nie uaktywnionego sacharozą, spowodowało wzrost liczebności bakterii oligotroficznych, kopiotroficznych, immobilizujących azot, amonifikatorów i promieniowców. Pozytywnie na namnażanie się bakterii oligotroficznych, immobilizujących azot, amonifikatorów, *Arthrobacter* spp. oraz grzybów wpływała także sacharoza.
3. Efektywne mikroorganizmy (EM₁ i EM₂) działały negatywnie na wzrost i rozwój sałaty, a zatem ich stosowanie jest niecelowe.

Literatura

ANJULI P., RADHA P., SASWATI N., KUMAR S.P. 2003. *Physiological characterization of the cultured and freshly isolated endosymbionts from different species of Azolla*. Plant Physiol. Biochem. 41(1): 73–79.

BADURA L. 2004. *Czy znamy wszystkie uwarunkowania funkcji mikroorganizmów w ekosystemach lądowych*. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych 53(264–265): 373–379.

- BASHAN Y. 1998. *Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture*. Biotechnol. Adv. 4(16): 729–770.
- CASIDA L.E., KLEIN J.D., SANTORO D. 1964. *Soil dehydrogenases activity*. Soil Sci. 98(1): 371–374.
- FENGLEROWA W. 1965. *Simple method for counting Azotobacter in soil samples*. Acta Microbiol. Polon. 14(2): 203–206.
- GORIN G., CHING CHANG CH. 1966. *A new method of assay the specific enzymic activity, IV Urease*. Analyt. Biochem. 17: 49–58.
- LATZKO F., HAMPEL W. 1995. *Enzyme formation by the yeast cell wall lytic Arthrobacter species: chitinolytic activity*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44(1/2): 185–189.
- MULDER E.G., ANTHEUMISSE J. 1963. *Morphologie, physiologie et ecologie des Arthrobacter*. Annales de Institut Pasteur. 105: 46–74.
- MURANYI A., JÓZEFACIUK G. 2003. *Effective microorganisms and the long-term soil quality*. 38 Międzyn. Symp. Mikrobiologiczne „Efektywne mikroorganizmy EM w rolnictwie zrównoważonym i ochronie środowiska”, 1–4 IX 2003 Rogów k/Łodzi: 85–86.
- SAINI V.K., BHANDARI S.C., TARAFDAR J.C. 2004. *Comparison of crop yield, soil microbial C, N and P, N-fixation, nodulation and mycorrhizal infection in inoculated and non-inoculated sorghum and chickpea crops*. Field Crop. Res. 89(1): 39–47.
- SINQUIERA M.F.B., SUDRÉ C.P., ALMEIDA L.H., PEGORER A.P.R., AKIBA F. 1993. *Influence of Effective microorganisms on seed germination and plantlet vigor of selected crops*. Proceedings of the third international conference on nature farming. October 5–7, Santa Barbara USA: 284 ss.
- SOBICZEWSKI P. 1994. *Bakterie jako czynniki biologicznej ochrony roślin przed chorobami*. Post. Nauk Rol. 6: 19–33.
- STATSOFT, INC. 2003: STATISTICA (data analysis software system), version 6.1. www.statsoft.com.
- STĘPIEŃ W., MERCIK S., GÓRSKA E.B., RUSSEL S. 2004. *Wpływ chińskiej rolniczej szczepionki bakteryjnej na wybrane właściwości gleby i plonowanie roślin*. Acta Agr. Silv. Ser. Agr. 42: 429–435.
- STURZ A.V. RYAN D.A.J., COFFIN A.D., MATHESON B.G., ARSENAULT W.J., KIMPINSKI J., CHRISTIE B.R. 2004. *Stimulating disease suppression in soils: sulphate fertilizers can increase biodiversity and antibiosis ability of root zone bacteria against Streptomyces scabies*. Soil Biol. Biochem. 36(2): 343–352.
- SUNDARA B., NATARAJAN V., HARI K. 2002. *Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields*. Field Crop. Res. 77: 43–49.
- SZYMANSKI N., PATTERSON R.A. 2003. *Effective microorganisms (EM) wastewater systems*. Best Management Proceedings of One-site'03 Conference, Admirale: 347–354.
- TABATABAI M.A., BREMNER J. M. 1969. *Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphate activity*. Soil Biol. Biochem. 1: 301–310.
- WIETRZYŃSKA A., KOŁPAK R., PIETKIEWICZ S., ŁOBODA T., OSTROWSKA D. 2003. *Growth and Yielding of potato crop from minitubers as affected by effective microorganisms*. 38 Międzyn. Symp. Mikrobiologiczne „Efektywne mikroorganizmy EM w rolnic-

twie zrównoważonym i ochronie środowiska” 1–4 IX 2003 Rogów k/Łodzi: 86–87.

WYSZKOWSKA J. 2002. *Biologiczne właściwości gleby zanieczyszczone chromem sześciowartościowym*. Wyd. UWM, Rozprawy i Monografie 65: 1–134.

Słowa kluczowe: efektywne mikroorganizmy (EM), bakterie glebowe, liczebność drobnoustrojów, aktywność enzymatyczna gleby, plonowanie sałaty

Streszczenie

Określono wpływ szczepionek mikrobiologicznych zawierających efektywne mikroorganizmy (EM₁ i EM₂) oraz bakterii z rodzajów *Azotobacter*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* na właściwości mikrobiologiczne oraz aktywność enzymatyczną gleby, a także na plonowanie sałaty kruchej, lodowej. Doświadczenie wazonowe przeprowadzono na próbkach gleby brunatnej o składzie granulometrycznym piasku gliniastego mocnego pylastego (pH_{KCl} – 6,7).

Wyniki badań dowodzą, że oddziaływanie testowanych szczepionek EM₁ i EM₂ na drobnoustroje glebowe było zróżnicowane. Obie szczepionki hamowały namnażanie się bakterii oligotroficznych, amonifikatorów, promieniowców, bakterii z rodzaju *Arthrobacter* oraz grzybów. Szczepionka EM₁ wpływała pozytywnie na bakterie celulolityczne, natomiast EM₂ działała dodatnio jedynie na bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Obydwa zastosowane preparaty hamowały aktywność dehydrogenaz i ureazy glebowej oraz działały negatywnie na wzrost i rozwój sałaty.

THE ROLE OF SOIL AND EFFECTIVE MICROORGANISMS (EM) IN THE MANAGEMENT OF MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF SOIL

Jan Kucharski, Ewa Jastrzębska

Department of Microbiology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn

Key words: effective microorganisms (EM), soil bacteria, microorganism count, enzymes activity, yield of lettuce

Summary

The effect of microbiological inocula containing effective microorganisms (EM₁ and EM₂) and bacterial inoculum containing bacteria of *Azotobacter*, *Arthrobacter* and *Pseudomonas* genera on the microbiological properties and enzymatic activity of soil, as well as on the yield of lettuce was determined. A pot experiment was carried out on brown soil with the granulometric composition of very-fine medium sand (pH_{KCl} – 6.7).

The results obtained indicated differentiated effects of the EM₁ and EM₂ inocula tested on soil bacteria. Both inocula (EM₁ and EM₂) were observed to inhibit the multiplication of oligotrophic bacteria, amonifying bacteria, actinomy-

cetes, *Arthrobacter* spp. and fungi. The EM₁ had a beneficial effect on cellulolytic bacteria, whereas the EM₂ inoculum positively affected only the bacteria of the genus *Pseudomonas*. Both inocula of effective microorganisms decreased the activity of dehydrogenases and urease and applied had a negative impact on the growth and development of lettuce.

Prof. dr hab. Jan **Kucharski**
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
pl. Łódzki 3
10-727 OLSZTYN
e-mail: jan.kucharski@uwm.edu.pl