

SKUTECZNE I NIESKUTECZNE
PREPARATY MIKROBIOLOGICZNE STOSOWANE
W OCHRONIE I UPRAWIE ROŚLIN
ORAZ RZETELNE I NIERZETELNE METODY ICH OCENY

Stefan Martyniuk

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka biopreparatów stosowanych w ochronie roślin. 3. Charakterystyka preparatów mikrobiologicznych oddziałujących na plonowanie roślin i właściwości gleb. 4. Podsumowanie

Effective and ineffective microbial preparations used in plant protection and production and methods of their evaluation

Abstract: Main principles of production and evaluation of microbial bio-preparations (inoculants) used in plant protection to control pathogens and pests (biological control) and in plant production to stimulate growth and yields of crops are discussed in this article. The registration procedure of biological control agents (b.c.a.), which for many producers of b.c.a. is too costly and too restrictive, however this procedure ensures that the commercial use of b.c.a. is safe for the people and for the environment and also that these products are fair with respect to their quality. With respect to microbial preparation and other bio-products used to improve soil properties, particularly those designated for ecological (organic) crop production, the registration procedure is mild. This enables selling microbial bio-preparations whose quality and effectiveness have not been proven. More critical assessment of experimental results of studies on these products would result in spreading of more reliable information on the real quality and usefulness of such bio-preparations.

1. Introduction. 2. Characteristics of bio-preparations used in plant protection. 3. Characteristics of microbial preparations affecting crop yields and soil properties. 4. Summary

Słowa kluczowe: biopreparaty, biologiczna ochrona roślin, produkcja roślinna
Key words: bio-preparations, biological plant protection, plant production

1. Wstęp

W praktyce rolniczej preparaty mikrobiologiczne stosowane są przede wszystkim w ochronie roślin do ograniczania rozwoju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym [1, 3, 8, 10, 11, 14, 21, 25, 29, 45–47, 50]. Dostępne są również preparaty mikrobiologiczne wykorzystywane do stymulowania wzrostu i plonowania niektórych roślin uprawnych, a przykładami takich biopreparatów są szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin bobowatych (motylkowatych) oraz szczepionki stosowane w leśnictwie do mikoryzacji sadzonek w szkółkach drzew [2–6, 14, 19, 26, 28, 39, 40–43, 52]. W ostatnim dziesięcioleciu znalazły się w handlu także preparaty pseudo-mikrobiologiczne, które reklamowane są jako środki poprawiające rzekomo nie tylko mikrobiologiczne właściwości gleb, ale także ich właściwości chemiczne i fizyczne, oraz podnoszące w niewiarygodnie dużym stopniu plonowanie roślin [9, 16, 54, 55].

W odniesieniu do tych produktów stwierdzić można wiele nierzetelności, a ich jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia pozostawia także wiele do życzenia. Zanim omówione zostaną dokładniej wymienione wyżej grupy biopreparatów, warto przypomnieć jak ważną rolę odgrywają mikroorganizmy w środowisku glebowym. Liczne badania wykazały, że biomasa mikroorganizmów w glebach stanowi około 85% całej biomasy wszystkich organizmów żyjących w tym środowisku i aż 90% ditlenku węgla (CO₂) powstającego w glebach ma pochodzenie drobnoustrojowe [3, 8, 35, 37, 50]. Dane te świadczą o dużej aktywności metabolicznej i ogromnym znaczeniu mikroorganizmów dla większości procesów zachodzących w środowisku glebowym. Do najważniejszych funkcji organizmów glebowych należą:

1. Rozkład i mineralizacja materii organicznej (resztki pozbiorowe, obornik i inne nawozy naturalne, komposty, poplony) [3, 14, 18, 20, 23, 35, 39]. W procesach tych oprócz mikroorganizmów istotną rolę odgrywa także fauna glebowa (dżdżownice, roztocza), która

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; e-mail: sm@iung.pulawy.pl

przyczynia się do rozdrabniania i mieszania materii organicznej z glebą, w wyniku czego ułatwiany jest jej rozkład i mineralizacja przez mikroorganizmy, czyli bakterie i grzyby glebowe. Rozkład resztek organicznych jest bardzo ważny nie tylko ze względu na uwalnianie mineralnych form składników odżywczych, które stanowią źródło pokarmu dla roślin uprawnych, ale również dlatego że, w wyniku procesów mikrobiologicznej transformacji materii organicznej powstaje 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. Ponadto, różne produkty przemiany materii, np. śluzy bakteryjne czy glomaliny (substancje produkowane przez strzępki grzybów endomikoryzowych) wytwarzane przez drobnoustroje w czasie rozkładu materii organicznej, również przyczyniają się do kształtowania fizycznych właściwości gleb poprzez zlepianie cząstek glebowych w gruzełki, zwiększając w ten sposób odporność gleb na erozję wodno-powietrzną.

2. Rozkład i detoksykacja różnych substancji zanieczyszczających gleby (ksenobiotyków) [7, 12, 27, 35, 37]. Udział w procesach detoksykacji mają przede wszystkim mikroorganizmy glebowe. Ich niezwykle bogactwo, duża aktywność i zdolności przystosowawcze powodują, że nie tylko środki ochrony roślin, powszechnie stosowane w nowoczesnym, intensywnym rolnictwie, ale również inne substancje, np. zanieczyszczenia przemysłowe, ulegają mikrobiologicznemu rozkładowi do związków prostszych, na ogół mniej aktywnych biologicznie.

3. Ograniczanie rozwoju szkodników i patogenów roślin [1, 8, 10, 11, 21, 25, 29, 45–47, 50]. Ta aktywność mikroorganizmów związana jest przede wszystkim z występowaniem w glebie konkurencji, m.in. o pokarm, pomiędzy jej mieszkańcami, a także zjawiskom antagonizmu i nadpasożytnictwa. Na przykład, wiele bakterii glebowych hamuje rozwój grzybów fitopatogenicznych produkując różnego rodzaju substancje antybiotyczne lub enzymy rozkładające strzępki grzybów. Z kolei niektóre grzyby glebowe mają zdolność pasożytowania na nicieniach i owadach.

4. Tworzenie układów symbiotycznych z roślinami [4–6, 26, 31, 32, 40, 48, 52]. Najlepiej znanym przykładem symbiozy mikroorganizmów glebowych z roślinami jest współżycie bakterii brodawkowych (rizobiów) z roślinami motylkowatymi. Wymiana składników odżywczych pomiędzy partnerami tej symbiozy odbywa się w brodawkach korzeniowych, w których bytujące tam rizobia przekazują roślinie motylkowatej azot (który pobrały z atmosfery) w zamian za węglowodany jako źródło energii niezbędnej bakteriom do przeprowadzania procesu redukcji azotu atmosferycznego. Proces ten jest więc bardzo korzystny zarówno z ekologicznego jak i rolniczego punktu widzenia. Uprawa roślin motylko-

watych nie wymaga bowiem na ogół stosowania nawożenia azotowego. Innym rodzajem symbiozy jest mikoryza, czyli symbioza wielu gatunków grzybów glebowych z korzeniami roślin. W tym przypadku grzyb mikoryzowy nie ma zdolności do asymilacji azotu atmosferycznego, a jego współpraca z rośliną polega przede wszystkim na ułatwianiu partnerowi pobierania wody i soli mineralnych, a także na ochronie korzeni przed grzybami chorobotwórczymi. Mikoryza jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie; tworzą ją zarówno drzewa leśne (ekto-mikoryza) jak i rośliny zielne (endo-mikoryza), w tym większość roślin uprawnych.

Wraz z rozwojem badań podstawowych z zakresu mikrobiologii gleby, których efektem było m.in. wyodrębnienie i zidentyfikowanie w XX wieku wielu ważnych grup mikroorganizmów glebowych, a także coraz dokładniejsze poznawanie ich biologii, ekologii, fizjologii i kluczowej roli w przeprowadzaniu wyżej wymienionych procesów, rozwijały się również badania utytarne nad wykorzystywaniem różnych grup pożytecznych drobnoustrojów w praktyce rolniczej. W efekcie tych badań opracowano i wdrożono do produkcji w różnych krajach liczne biopreparaty, wśród których dominują preparaty wykorzystywane w biologicznej ochronie roślin, czyli preparaty zawierające w swoim składzie mikroorganizmy antagonistyczne lub pasożytnicze w stosunku do patogenów i szkodników roślin, oraz mniej liczne szczepionki stymulujące aktywność mikrobiologiczną gleb lub korzystnie oddziałujące na wzrost i plonowanie roślin, np. biopreparaty zawierające mikroorganizmy symbiotyczne (bakterie brodawkowe roślin motylkowatych, grzyby mikoryzowe).

2. Charakterystyka biopreparatów stosowanych w biologicznej ochronie roślin

W 2005 roku w krajach członkowskich OECD zarejestrowanych było około 214 biologicznych środków ochrony roślin (biopestycydów) [17]. Jest to dość liczna grupa biopreparatów wskazująca na to, że badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych zakończyły się sukcesem, a więc wdrożeniem do produkcji biopestycydów, zawierających różne grupy mikroorganizmów (wirusy, bakterie i grzyby) oraz mikroskopijne nicienie (Tabela I). Jest to również niewątpliwy sukces producentów tych środków, często niewielkich firm, którzy podjęli trud, także finansowy, związany z rejestracją swoich produktów. Trzeba w tym miejscu zaznaczyć, że rejestracja biologicznych środków ochrony (b.s.o.) roślin odbywa się na podobnych zasadach jak chemicznych środków ochrony [45–47], czyli jest to proces nie tylko rygorystyczny ale także bardzo kosztowny. To m a l a k w swoim opracowaniu [45] podaje przykład szwedzkiej firmy Bioagri, która na zarejestrowanie na terenie UE

Tabela I
Biologiczne środki ochrony roślin zawierające mikroorganizmy zarejestrowane w krajach OECD [16]

Grupa biopestycydów	Liczba zarejestrowanych preparatów	Najważniejsze organizmy jako aktywne składniki (Liczba preparatów)
Bioherbicydy	1	<i>Alternaria destruens</i>
Biobakteriocydy	5	<i>Agrobacterium</i> (3), <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>
Biofungicydy	60	<i>Trichoderma</i> (25), <i>Gliocladium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Coniothyrium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Bioinsektocydy	83	<i>Bacillus thuringiensis</i> (72), <i>Bauveria basiana</i> (10)
Bionematocydy	64	<i>Metharhizium</i> (8), <i>Peacilomyces</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Bacillus</i> (8), wirusy (14), <i>Heterorhabditis</i> (10), <i>Steinernema</i> (20)

dwóch biopreparatów zawierających bakterię *Pseudomonas chlororaphis* wydała 4,3 miliona Euro. Trudna i kosztowna procedura rejestracyjna b.s.o. roślin powoduje, że część producentów rezygnuje z wytwarzania biopreparatów, co niewątpliwie zmniejsza ich asortyment i ogranicza zakres stosowania biologicznej ochrony w rolnictwie i ogrodnictwie. Z tego m.in. powodu od kilku lat trwają w UE prace zmierzające do zmiany (złagodzenia) zasad rejestracji b.s.o. roślin [25, 46]. Choć proces rejestracyjny tych środków jest dość kłopotliwy dla producentów i niewątpliwie wymaga zmian, to jednak należy podkreślić, że zapewnia on nie tylko bezpieczeństwo ich stosowania (dla ludzi i środowiska), ale także powoduje, że b.s.o. są produktami o dobrej jakości. Przy czym w przypadku tych środków chodzi zwłaszcza o jakość procesu ich wytwarzania i czystości produktu końcowego. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, bowiem ich proces produkcyjny obejmuje m.in. kilkietapowe rozmnażanie czystej kultury mikroorganizmu, który jest aktywnym czynnikiem preparatu [26, 33, 40, 41, 48]. Proces ten rozpoczyna się od przygotowania czystej „kultury matecznej”, a w kolejnych etapach dochodzi do dalszego rozmnożenia mikroorganizmów w wyniku ich przenoszenia do urządzeń hodowlanych (fermentorów) zawierających coraz większe objętości sterylnych pożywek, najczęściej płynnych. Liczba tych etapów uzależniona jest oczywiście od skali produkcji. W przypadku niektórych biopreparatów, np. zawierających *Bacillus thuringiensis*, skala produkcji jest bardzo duża i prowadzona jest ona z wykorzystaniem fermentorów o objętości nawet 100 000 litrów [41, 47]. Fermentory są urządzeniami, w którym rozmnażanie mikroorganizmów odbywa się w sposób kontrolowany,

jałowy i optymalny. Częścią centralną fermentora jest zbiornik, najczęściej wykonany ze stali nierdzewnej, który wyposażony jest w agregaty umożliwiające wyjaławianie wprowadzanej do niego pożywki płynnej oraz jej napowietrzanie i utrzymywanie w stałej (optymalnej) temperaturze w czasie całego procesu hodowlanego. Rozmnażanie mikroorganizmów w fermentorach trwa zwykle kilka dni i kończy się gdy gęstość hodowli osiąga wymagany poziom. Bardzo ważną czynnością, od której zależy finalna jakość wytwarzanego biopreparatu, jest kontrolowanie czystości hodowli mikroorganizmu na każdym z ww. etapów przenoszenia i powiększania objętości hodowli. Zakażenie hodowli, np. kultury matecznej, rozmnażanego drobnoustroju innymi mikroorganizmami może bowiem doprowadzić do zdominowania, a nawet całkowitego wyeliminowania z hodowli właściwego drobnoustroju w dalszych etapach tego procesu. Jest to szczególnie ważne w przypadku bakterii, które charakteryzują się znacznie wolniejszym tempem namnażania (podziału komórek), jak np. rizobia, niż inne bakterie, np. z rodzaju *Pseudomonas* lub *Bacillus* [33, 48]. W zależności od przyjętej technologii produkcji biopreparatu, uzyskana w fermentorze biomasa mikroorganizmów jest odseparowywana od płynu pochodzącego lub, jak to ma miejsce w przypadku szczepionek rizobiowych, cała hodowla wykorzystywana jest w dalszym etapie produkcji, w którym następuje dokładne wymieszanie zawiesiny bakterii z nośnikiem. Większość biopreparatów mikrobiologicznych produkowana jest w postaci preparatów stałych, suchych (liofilizowanych) lub wilgotnych. Tylko nieliczne mają postać płynną. W obydwu przypadkach mikroorganizmy wymieszane są z jałowym nośnikiem (talk, pył torfu lub węgla brunatnego, minerały ilaste), którego rolą jest zapewnienie możliwie jak najlepszych warunków do przeżywania mikroorganizmów w preparacie handlowym oraz jak najefektywniejszego sposobu jego aplikacji [32, 40, 47].

Ponadto, procedura rejestracyjna wymaga od producentów podania wielu innych ważnych informacji [10, 45–47], m.in. takich jak:

- dokładna nazwa i charakterystyka mikroorganizmu (makroorganizmu),
- dane dotyczące kolekcji, w której czysta kultura mikroorganizmu została zdeponowana,
- ilościowy skład preparatu (aktywna forma mikroorganizmu i jego zawartość, a także innych składników, np. nośnika),
- metoda oznaczania (identyfikacji) składu produktu,
- warunki przechowywania i okres przydatności,
- zakres (cel) i zasady stosowania,
- wynik badań potwierdzających skuteczność biopreparatu.

Wszystko to powoduje, że b.s.o. roślin są bez wątpienia produktami bezpiecznymi i solidnymi pod względem

jakości, znany jest bowiem ich dokładny skład, konkretny cel i zakres ich stosowania, oraz – co jest bardzo ważne – znana jest metoda badania i identyfikacji, a więc także kontrolowania, ich składu i zawartości czynnika aktywnego.

Dokładniejsze omawianie skuteczności biologicznych środków ochrony roślin w praktyce rolniczej nie jest celem tego artykułu. Trzeba jednak stwierdzić, że skuteczność ta jest w przypadku wielu b.ś.o. niewątpliwie mniejsza niż środków chemicznych. Dotyczy to zwłaszcza biopreparatów opartych na mikroorganizmach (bakteriach i grzybach), które aplikowane są do gleby, czyli do środowiska charakteryzującego się bardzo dużą złożonością różnego rodzaju oddziaływań, w tym antagonistycznych, oraz ogromną konkurencyjnością o energię i składniki odżywcze pomiędzy drobnoustrojami glebowymi i innymi mieszkańcami gleby. Gleba jest także środowiskiem o dużej zmienności czynników abiotycznych (wilgotność, temperatura, odczyn (pH), zabiegi agrotechniczne), które bardzo istotnie wpływają na przeżywalność i skuteczność organizmów wprowadzanych do gleby [1, 5, 8, 9, 14, 28, 35, 37, 50]. Być może jest to jeden z ważniejszych czynników powodujących, że w ostatnim dziesięcioleciu sprzedaż preparatów zawierających makroorganizmy (pasożytnicze i drapieżne owady, drapieżne roztocza), czyli środków stosowanych w bardziej kontrolowanych i mniej złożonych warunkach (szklarnie, części nadziemne roślin) jest znacznie większa niż biopreparatów opartych na mikroorganizmach – odpowiednio 55–60% i 26% ogólnej sprzedaży b.ś.o. roślin [45, 46]. Warto też dodać, że choć zakres praktycznego wykorzystywania biopreparatów w ochronie roślin jest ciągle mały, ma on jednak tendencje wzrostowe. Na przykład, Tomalak [45] podaje, że w 2004 roku wartość rynku preparatów biologicznych (opartych na makroorganizmach i mikroorganizmach) stosowanych w ochronie roślin wyniosła około 2,5% ogólnej wartości rynku środków ochrony roślin, a obecnie udział ten prognozowany jest na 4,2–4,5%. Wzrastające zapotrzebowanie na biopreparaty związane jest prawdopodobnie głównie z rozwojem proekologicznych metod uprawy roślin, w tym rolnictwa ekologicznego [5, 8, 24, 29, 47].

3. Charakterystyka preparatów mikrobiologicznych oddziaływujących na plonowanie roślin i właściwości gleb

W tej grupie biopreparatów najbardziej znane na świecie i najszerzej stosowane w praktyce rolniczej, także w naszym kraju, są wspomniane już wcześniej szczepionki zawierające bakterie (rizobia), które wiążą azot atmosferyczny w symbiozie z korzeniami roślin (bobowatych) motylkowatych. Podobnie jak w przy-

padku b.ś.o. technologia wytwarzania tych szczepionek obejmuje następujące etapy:

- zgromadzenie kolekcji różnych szczepów drobnoustrojów,
- kontrolowanie czystości i jakości (efektywności symbiotycznej) tych szczepów,
- wieloetapowe rozmnażanie mikroorganizmów i kontrolowanie czystości uzyskiwanej biomasy,
- przygotowywanie jałowego nośnika (drobno zmielony torf lub węgiel brunatny),
- mieszanie biomasy bakterii z nośnikiem i konfekcjonowanie szczepionki [26, 33, 40, 48].

W naszym kraju szczepionki rizobiowe, a także inne preparaty mikrobiologiczne, dopuszczane są do obrotu przez MRiRW po spełnieniu wymogów stosownej procedury rejestracyjnej. Procedura ta, choć znacznie łagodniejsza niż w przypadku rejestracji b.ś.o. roślin, jest wystarczająco szczegółowa, ponieważ, oprócz danych na temat składu, opisu procesu produkcyjnego i sposobu stosowania produktu, wymaga także przedstawienia wyników doświadczeń potwierdzających skuteczność rejestrowanego biopreparatu w praktyce. Z tego powodu szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych są biopreparatami o sprawdzonej efektywności i dobrej jakości po względem mikrobiologicznym [33, 41].

W odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, a także innych produktów określanych jako środki poprawiające właściwości gleby, rejestrowanych na potrzeby rolnictwa ekologicznego, procedura rejestracyjna jest jeszcze bardziej łagodna, ponieważ nie stawia ona wymogu prowadzenia badań potwierdzających skuteczność rolniczą tych produktów. Wykorzystują to niektórzy producenci lub dystrybutorzy różnych biopreparatów wprowadzając na rynek w naszym kraju produkty, których efektywność i jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia są bardzo wątpliwe. Najbardziej znanym produktem w tej grupie jest preparat pochodzenia japońskiego – tzw. Efektywne Mikroorganizmy (EM) i różne jego modyfikacje (EM1, EM5, Ema) [16, 53, 54]. Pod względem mikrobiologicznym biopreparaty te nie spełniają większości z wymienionych w tym artykule wymogów stawianych rzetelnym produktom wykorzystywanym w ochronie i uprawie roślin. Na przykład, nieznaną jest skład gatunkowy drobnoustrojów wchodzących w skład EM-ów. Najczęściej podaje się tylko, że składają się one z 80 gatunków mikroorganizmów beztlenowych i tlenowych reprezentowanych przez bakterie fermentacji mlekowej, bakterie fototroficzne, promieniowce, drożdże i inne grzyby, ale brak jest jakiegokolwiek informacji na temat liczebności wymienionych grup drobnoustrojów [16, 53]. Ponadto nieznaną są żadne oryginalne prace naukowe, w których opisano pochodzenie mikroorganizmów wchodzących w skład tych szczepionek, metody ich identyfikacji i namnażania

oraz wyniki badań wykazujących przydatność i skuteczność omawianych biopreparatów w praktyce. Preparaty EM produkowane są głównie w formie płynnych zawiesin, o kwaśnym odczynie ($\text{pH} < 4,0$) i rozprowadzane w szczelnie zamkniętych pojemnikach plastikowych o różnej objętości. Nie ulega wątpliwości, że są to warunki niesprzyjające dłuższemu przeżywaniu mikroorganizmów, zwłaszcza tlenowych. Potwierdzają to wyniki badań autorów holenderskich, którzy stosując analizy DNA metodą PCR-DGGE stwierdzili niskie liczebności bakterii w handlowym preparacie EM1, ale po aktywacji tego preparatu liczebność bakterii wzrosła [51]. Autorzy ci stwierdzili ponadto, że różne serie zarówno nieaktywowanych jak i aktywowanych produktów EM charakteryzowały się dużą zmiennością pod względem zawartości w nich bakteryjnego DNA, co świadczy o bardzo małej powtarzalności (stabilności) tych preparatów. A oto w jaki sposób producenci i dystrybutorzy preparatu EM1 zalecają rolnikom uaktywnienie tego środka: do plastikowego pojemnika należy wlać 1 część (np. 1 litr) EM1, 1 część melasy trzcinowej jako pożywki, oraz 23 części niechlorowanej wody, wymieszać, szczelnie zamknąć pojemnik i inkubować przez około 7 dni. Jest rzeczą oczywistą, że w tych warunkach powtarzalność uzyskiwanych hodowli musi być niska, a ponadto rolnicy używając niejałowej wody i melasy oraz niejałowego pojemnika rozmnażają nie tylko nieznanne mikroorganizmy znajdujące się w EM-ach, ale także te które zawarte były w niejałowej wodzie, w pojemniku, czy w powietrzu – a przecież mogą to być nawet drobnoustroje szkodliwe.

Jeszcze więcej nierzetelności można stwierdzić odnośnie skuteczności EM-ów w praktyce rolniczej. Twórcy i dystrybutorzy tych produktów prezentują je jako środki o wręcz cudownych właściwościach (np. zawarte w nich mikroorganizmy przeżywają w temp. ponad 700°C) i skutecznych nie tylko w stymulowaniu wielu procesów mikrobiologicznych w glebach, ale także korzystnie oddziałujących na wzrost i zdrowotność roślin oraz poprawiających chemiczne i fizyczne właściwości gleb [16, 53, 54]. A ponadto EM-y redukują emisję amoniaku i innych odorów z obór i chlewni, przyspieszają proces kompostowania nawozów naturalnych i resztek roślinnych oraz korzystnie wpływają na jakość uzyskiwanych z tych materiałów kompostów. Niestety nie przedstawiają na to żadnych naukowo udokumentowanych, rzetelnych i wiarygodnych wyników badań. Brak takich publikacji doskonale ilustruje i potwierdza praca przeglądowa C o n d o r i wsp. [9]. Autorzy ci dokonując przeglądu literatury światowej dotyczącej oddziaływania EM-ów na plonowanie różnych roślin i właściwości gleb, stwierdzili, że większość doświadczeń z pozytywnymi wynikami badań przeprowadzono w krajach orientalnych (Pakistan, Indonezja, Thailandia), a wyniki tych badań publikowano najczęściej w nierecenzowanych

materiałach z konferencji sponsorowanych przez producentów i dystrybutorów, a tylko nieliczne w czasopiśmie o niskim IF (Impact Factor). Natomiast żadne z renomowanych czasopism naukowych o tematyce gleboznawczej, takich jak: *European Journal of Soil Biology*, *Geoderma*, *Soil Biology and Biochemistry*, *Soil Sc. Soc. Am. Journal*, czy *Agriculture Ecosystems & Environment*, nie zamieściło na swoich łamach jakiegokolwiek pracy na temat EM-ów. Bardzo ważna, krytyczna praca badaczy holenderskich opublikowana w dobrym czasopiśmie [51] wykazała nieskuteczność użytych w tych badaniach preparatów EM.

Warto też dodać, że większość analizowanych przez C o n d o r i wsp. [9] badań charakteryzowała się błędami metodycznymi (m.in. niewłaściwy obiekt kontrolny), przyczynkowością i brakiem analiz statystycznych. Prawidłowe obiekty kontrolne zastosowano w badaniach polowych przeprowadzonych w Szwajcarii [34]. Wspomniano już wcześniej, że EM-y produkowane są z wykorzystaniem melasy trzcinowej (jako pożywki dla drobnoustrojów), która jest bogata w liczne składniki, m.in. mikroelementy, mogące korzystnie oddziaływać na wzrost roślin. Ponadto, preparat EM-ów to bardzo kwaśna zawiesina. Dlatego w badaniach nad tym biopreparatem stosować należy dwa obiekty kontrolne; jeden „zerowy” – bez EM-ów, a w drugim do opryskiwania gleby lub roślin należy używać takiego samego płynu (rozcieńczona zawiesina EM-ów) jak we właściwym obiekcie badawczym, ale po zabiciu w nim mikroorganizmów lub po usunięciu mikroorganizmów w inny sposób, np. przez filtrowanie. W 4-letnim doświadczeniu polowym przeprowadzonym w warunkach szwajcarskich zastosowano takie właśnie dwa obiekty kontrolne. We wnioskach końcowych autorzy tego doświadczenia jednoznacznie stwierdzają, że preparaty EM-ów nie miały istotnego wpływu ani na plony badanych roślin ani na właściwości mikrobiologiczne gleby [34]. Podobne, negatywne wyniki można znaleźć w większości (bardzo licznych) publikacji polskich autorów, pomimo że w badaniach tych stosowano na ogół tylko jeden obiekt kontrolny (bez EM-ów lub oprysk wodą). Na przykład, D a c h i wsp. [13] nie stwierdzili żadnego wpływu dodatku preparatu EM na proces kompostowania osadu ściekowego, jakość uzyskanego kompostu obornikowego czy na emisję gazów (CO_2 , amoniak). Także na podstawie wyników innych badań krajowych, zarówno laboratoryjnych jak i polowych, można stwierdzić, że EM-y oraz takie preparaty jak użyźniacz glebowy, Bactofil A czy Phylozonit, stosowane doglebowo lub jako opryski na liście, nie powodują istotnych przyrostów plonów badanych roślin uprawnych (kukurydza, pszenica, sałata) oraz nie mają wpływu na właściwości mikrobiologiczno-biochemiczne gleby [22, 38, 44, 49, 53]. Na koniec warto podkreślić, że autorzy ww. publikacji zagranicznych krytycznie analizują wyniki uzyskane przez innych badaczy

[9], a badania własne podsumowują jednoznacznymi wnioskami, w tym przypadku wyraźnie podkreślają w nich nieskuteczność preparatów EM [34, 51]. Czytając publikacje krajowe dotyczące EM-ów i innych biopreparatów mikrobiologicznych ma się natomiast wrażenie, że autorzy tych badań z góry zakładają pozytywne oddziaływanie testowanych produktów i „na siłę” doszukują się tych pozytywów. Na przykład, jeden z autorów napisał w streszczeniu (brak wniosków) swoich badań, że EM-y (oraz inny preparat) spowodowały wzrost różnych cech o taki a taki procent i dopiero w ostatnim zdaniu dodał, że różnice te nie były istotnie statystycznie [38]. W podsumowaniu innych badań, przeprowadzonych bez powtórzeń i bez analiz statystycznych, można przeczytać, że „Preparat mikrobiologiczny EM wykazywał nieznaczny wpływ na różnorodność mikoflory nasion grochu” [36], lub „Zastosowany oprysk biopreparatem EM początkowo powodował spadek liczebności większości badanych grup fizjologicznych drobnoustrojów oraz obniżenie aktywności badanych enzymów w glebie a następnie obserwowano tendencje wzrostowe” [53]. I jeszcze jeden wniosek z kolejnych badań – „Zaprawianie ziarna pszenicy jarej preparatem EM^R nie wpłynęło na wyższą procentową zawartość suchej masy w korzeniach” [15]. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów cytowanych publikacji świadczą, że ww. preparaty mikrobiologiczne nie wykazują istotnego wpływu ani na plonowanie roślin ani na właściwości gleby. Badania nad wykorzystaniem różnych grup mikroorganizmów glebowych w praktyce rolniczej do podnoszenia żyzności gleb i plonowania roślin prowadzono już od zarania rozwoju mikrobiologii glebowej. Na przykład, szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych (bobowatych) stosowano już po koniec XIX wieku [3, 5, 52]. Szczepionki te produkowane i stosowane są w wielu krajach także obecnie i jest to właściwie jedyny przykład tak szerokiego wykorzystywania preparatów mikrobiologicznych w praktyce rolniczej. Sukces ten związany jest m.in. z tym, że szczepionki z bakteriami symbiotycznymi (rizobiami) stosowane są najczęściej do otoczkowania nimi nasion roślin bobowatych. Taki sposób aplikacji ułatwia wprowadzenie dużej liczebności bakterii (10^3 – 10^6 komórek na każde nasionko) bezpośrednio do strefy korzeniowej siewek roślin, zwiększając w efekcie szanse (konkurencyjność) bakterii szczepionkowych na zawiązanie efektywnej symbiozy (brodawek) z korzeniami roślin. Wprowadzanie biopreparatów mikrobiologicznych do całej masy gleby na polu nie daje najczęściej żadnych efektów. Próby takie prowadzono z wieloma grupami drobnoustrojów glebowych, m.in. z bakteriami fosforolitycznymi, wolno żyjącymi w glebie asymilatorami N₂ (*Azotobacter* spp.) i innymi [3, 5, 28, 39, 52]. Niska skuteczność szczepionek doglebowych związana jest, jak już wspomniano w rozdziale 2, ze skomplikowanymi interakcjami pomiędzy organizmami glebowymi, oraz

z oddziaływaniem bardzo zmiennych warunków pogodowych i abiotycznych właściwości gleb. Na przykład, bakterie należące do rodzaju *Azotobacter* charakteryzują się dużą wrażliwością na kwaśny odczyn gleby. Bakterie te nie występują zwykle, lub ich liczebności są bardzo niskie w glebach o pH poniżej 6,0 [28, 31]. Szczepienie gleb kwaśnych nawet dużą masą preparatów zawierających omawiane bakterie nie może dać jakichkolwiek efektów, ponieważ nie zasiedlą one tych gleb, a staną się jedynie pożywieniem dla innych organizmów glebowych. Także szczepienie azotobakterem gleb o odczynie sprzyjającym rozwojowi tych bakterii nie daje w warunkach produkcyjnych istotnych efektów pozytywnych, np. w postaci przyrostu w glebach zawartości azotu czy plonów roślin, m.in. dlatego, że proces wiązania N₂ wymaga dużych ilości energii, której w glebie na ogół brakuje, a jeśli jest to toczy się o nią intensywna konkurencja [3, 20, 28, 31, 35]. Ponadto, należy pamiętać, że każda gleba w warunkach naturalnych zasiedlona jest przez mikroorganizmy, które w toku wielowiekowego procesu glebotwórczego najlepiej przystosowały się do życia w danej glebie i skolonizowały w niej wszystkie dostępne i umożliwiające egzystencję „nisze” ekologiczne [9, 35, 51]. Drobnoustroje wprowadzane do gleby w postaci szczepionek są zwykle eliminowane lub ich liczebność zredukowana jest do poziomu naturalnego. Trudności w uzyskaniu istotnych efektów ze stosowania biopreparatów doglebowych wynikają także z prostych proporcji ilościowych. Na przykład, w jednym gramie gleby można znaleźć od kilkudziesięciu milionów do miliarda komórek bakteryjnych, a w nawozach naturalnych (gnojowica, obornik) ich liczebność przekracza nawet 10^{11} komórek w 1 gramie [30, 37, 51]. W przeliczeniu na hektar biomasa mikroorganizmów waha się od kilku do kilkunastu ton. Aby mikroorganizmy wprowadzane do gleby w biopreparacie mogły rozwijać się i konkurować z tak ogromną biomasa drobnoustrojów glebowych, należałoby stosować bardzo duże, nieopłacalne w praktyce, ilości biopreparatów oraz zmienić środowisko glebowe tak, aby faworyzowało ono rozwój wprowadzanego organizmu. Oznaczając liczebność mikroorganizmów w jednym z ww. biopreparatów stwierdziliśmy (dane nieopublikowane), że w zalecanej dawce (1 l) na hektar zawiera on mniej bakterii niż można znaleźć w 100 gramach gleby. Odpowiedź na pytanie, czy tak niewielka zawartość drobnoustrojów w tym preparacie, w dodatku nieprzystosowanych do życia w środowisku glebowym, może w jakikolwiek sposób wpłynąć na właściwości gleby i plonowanie roślin – wydaje się oczywista.

4. Podsumowanie

W pracy omówiono ogólne zasady produkcji i oceny preparatów (szczepionek) mikrobiologicznych stosowanych w ochronie roślin do ograniczania roz-

woju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym, oraz do stymulowania wzrostu i plonowania roślin. Proces rejestracyjny biologicznych środków ochrony, który jest dla wielu producentów tych środków zbyt kosztowny i restrykcyjny, to jednak należy pamiętać, że zapewnia on nie tylko bezpieczeństwo ich stosowania (dla ludzi i środowiska), ale także powoduje, że b.s.o. są produktami rzetelnymi pod względem ich jakości i zastosowania. W odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, a także innych produktów określanych jako środki poprawiające właściwości gleby, przeznaczonych do stosowania w ekologicznej produkcji roślinnej, procedura rejestracyjna jest bardzo łagodna. Wykorzystują to niektórzy producenci i dystrybutorzy różnych biopreparatów wprowadzając na rynek w naszym kraju produkty, których skuteczność i jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia są bardzo wątpliwe. Bardziej krytyczna ocena wyników badań nad tymi preparatami przyczyniłaby się do upowszechniania wśród ich potencjalnych użytkowników rzeczywistej wartości tego rodzaju produktów.

Piśmiennictwo

- Alabouvette C.: Biological control of plant disease. (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 257–264
- Al-Taweil H.I., Bin Osman M., Hamid A.A., Yusoff W.M.: Development of microbial inoculants and the impact of soil application on rice seedlings growth. *Am. J. Agric. Biol. Sc.* **4**, 79–82 (2009)
- Banerjee M.R., Yesmin L., Vessey J.K.: Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides (w) Handbook of Microbial Biofertilizers red. M.K. Rai, The Haworth Press Inc., New York, 2006, s. 137–182
- Barea J.M.: Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 81–92
- Bashan Y.: Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* **16**, 729–770 (1998)
- Bethlenfalvay G.J.: Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis*, **14**, 413–425 (1993)
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R.: A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3663–3668 (1998)
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement Ch., Barka A.: Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951–4959 (2005)
- Condor A.F., Perez P.G., Lokare Ch.: Effective Microorganisms: Myth or reality? *Peru. Biol.*, 315–320 (2006) <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/biologia/14n2/pdf>
- Cook R.J.: Assuring the safe use of microbial biocontrol agents: a need for policy based on real rather than perceived risk. *Can. J. Pl. Pathol.* **18**, 439–445 (1996)
- Czaban J., Księżniak A., Paszkowski W.: An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 175–182 (2004)
- Czaban J., Wróblewska B.: Microbial transformation of cadmium in two soils differing in organic matter content and texture. *Pol. J. Environ. Stud.* **14**, 727–737 (2005)
- Dach J., Wolna-Murawka A., Zbytek Z.: Wpływ dodatku efektywnych mikroorganizmów (EM) na przebieg procesu kompostowania i wielkość emisji gazowych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **54**, 49–54 (2009)
- Dahm H., Wrótniak-Drzewiecka W., Pauter A.: Microbial biofertilizers. (w) Physical, chemical and biological processes in soils, red. L.W. Szajdak, A.K. Karabanow, Prodrak, Poznań, 2010, s. 537–547
- Fałtyń U., Miszkioł T.: Wpływ efektywnych mikroorganizmów (EM^R) na zdolność kiełkowania ziarna pszenicy jarej. *Zesz. Nauk. Univ. Przyrod. Wrocław, Rolnictwo*, **568**, 31–35 (2008)
- Higa T.: Rewolucja w ochronie naszej planety. Fundacja – Rozwój SGGW, Warszawa, 2003, s. 1–152
- Kabaluk T., Gazdik K.: Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Agriculture and Agri-Food, Canada 2005, s. 242. http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/collection_2009/agr/A42-107-2007E.pdf
- Kandele E., Murer E.: Aggregate stability and soil microbial processes in a soil with different cultivation. *Geoderma*, **56**, 503–513 (1993)
- Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.P.: Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, **70**, 1078–1082 (1980)
- Kobus J., Czaban J., Gajda A., Masiak D., Księżniak A.: Wheat rhizosphere microflora and its effect on plant nutrition and some pathogenic fungi. Part I. Changes of rhizobacterial populations with development of winter wheat. *Rocz. Glebozn.* **44**, 45–53 (1993)
- Kohl J., Fokkema N.: Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. (w) Plant-microbe interactions and biological control, red. G.J. Boland, L.D. Kuykendall, Marcel Dekker, Inc. New York, 1998, s. 49–88
- Kucharski J., Jastrzębska E.: Rola efektywnych mikroorganizmów w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych gleby. *Inżynieria Ekologiczna*, **12**, 295–296 (2005)
- Kurek E., Kobus J.: Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost roślin. *Post. Mikrobiol.* **29**, 103–123 (1990)
- Kuś J., Jończyk K.: Rozwój rolnictwa ekologicznego w Polsce. *J. Res. Applic. Agricult. Eng.* **54**, 178–182 (2009)
- Lipa J., Pruszyński S.: Stan wykorzystania metod biologicznych w ochronie roślin w Polsce i na świecie. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1033–1043 (2010)
- Lupwayi N.Z., Olsen P.E., Sande E.S., Keyser H.H., Collins M.M., Singleton P.W., Rice W.A.: Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Res.* **65**, 259–270 (2000)
- Lynch J.M.: Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Biodegradation*, **13**, 21–27 (2002)
- Maliszewska W.: Szczepienie roślin azotobakterem. *Rocz. Nauk Roln.* **68**, 3–51 (1953)
- Mańka M.: Stan i perspektywy biologicznej ochrony drzew przed chorobami w leśnictwie. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1089–1094 (2010)
- Martyniuk S., Myśków W.: Development of some groups of microorganisms in liquid cattle manure and farmyard manure during their fermentation. *Acta Microbiol. Polon.* **26**, 213–220 (1977)

31. Martyniuk S.: Systemy biologicznego wiązania azotu. *Nawozy i Nawożenie/Fertilizers and Fertilization*, **1**, 264–277 (2002)
32. Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M.: Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta. Soc. Bot. Polon.* **74**, 83–86 (2005)
33. Martyniuk S.: Wytwarzanie preparatów mikrobiologicznych na przykładzie bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **55**, 20–23 (2009)
34. Mayer J., Scheid S., Oberholzer H.-R.: How effective are “Effective microorganisms”? Results from an organic farming field experiment. (w) 16th JFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, 2008, s. 40–43. <http://orgprints.org/14838>
35. Nannipieri P., Falchini L., Landi L., Pietramellara G.: Management of soil microbiota (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J.-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 237–255
36. Okorski A., Majchrzak B.: Grzyby zasiedlające nasiona grochu siewnego po zastosowaniu preparatu mikrobiologicznego EM 1. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **48**, 1315–1318 (2008)
37. Panhurst C.E., Rogers S.L., Gupta V.S.R.: Microbial parameters for monitoring soil pollution. (w) Environmental Biomonitoring, red. J.M. Lynch, A. Wiseman, Cambridge Univ. Press, UK, 1998, s. 46–69
38. Piskier T.: Reakcja pszenicy jarej na stosowanie biostymulatorów i absorbentów glebowych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **51**, 136–138 (2006)
39. Rodriguez H., Fraga R.: Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* **17**, 319–339 (1999)
40. Smith R.S.: Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* **38**, 485–492 (1992)
41. Sobiczewski P.: Bakterie wykorzystywane w produkcji roślinnej. (w) Biotechnologia roślin, red. S. Malepszy, PWN Warszawa, 2009, s. 172–213
42. Strzelec A.: Symbiotyczne wiązanie azotu. Cz. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin motylkowatych. *Post. Nauk Roln.* **4**, 17–30 (1988)
43. Stephens J.H.G., Rask H.M.: Inoculant production and formulation. *Field Crop Res.* **65**, 249–258 (2000)
44. Sulewska H., Ptaszyńska G.: Reakcja kukurydzy uprawianej na ziarno na stosowanie preparatów mikrobiologicznych. *Pam. Puł.* **140**, 271–285 (2005)
45. Tomalak M.: Rejestracja biologicznych środków ochrony roślin w Europie – nowe perspektywy. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **47**, 233–240 (2007)
46. Tomalak M.: Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1053–1063 (2010)
47. Tomalak M., Sosnowska D., Lipa J.J.: Tendencje rozwoju metod biologicznych w ochronie roślin. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1650–1660 (2010)
48. Tompson J.A.: Legume inoculant production and control. (w) Report on expert consultation on legume inoculants production and control, FAO, Rome, Italy, 1991 s. 15–32
49. Tyburski J., Łachacz A.: Efektywność środków ulepszających gleby ciężkie w gospodarstwach ekologicznych. Sprawozdanie z badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego w zakresie upraw polowych metodami ekologicznymi, 2009. <http://www.uwm.edu.pl/wksir/systemy/raporty>
50. Van Elsas J.D., Garbeva P., Salles J.: Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, **13**, 29–40 (2002)
51. Van Vliet P.C.J., Bloem J., de Goede R.G.M.: Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Microorganisms (EM) to slurry manure. *Appl. Soil Ecol.* **32**, 188–198 (2006)
52. Vessey J.K.: Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**, 571–586 (2003)
53. Wielgosz E., Dziamba Sz., Dziamba J.: Effect of application of EM spraying on the populations and activity of soil microorganisms occurring in the root zone of spring barley. *Pol. J. Soil Sci.* **43**, 65–72 (2010)
54. <http://www.emy.com.pl/mikroorganizmy>
55. <http://www.emgreen.pl>