



**Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach  
Zakład Mikrobiologii, Pracownia Rizosfery**

**Sprawozdanie z realizacji zadania w 2016 roku  
Korekta z dnia 05.12.2016**

***Warzywnictwo, w tym uprawa ziół metodami ekologicznymi – badania w zakresie innowacyjnych rozwiązań dla towarowej uprawy ekologicznej warzyw i ziół. Opracowanie innowacyjnych bioproduktów i technologii dla poprawy jakości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych.***

**Kierownik projektu: Lidia Sas Paszt**

**Wykonawcy: dr hab. Lidia Sas-Paszt, prof. IO, prof. dr hab. Stanisław Kaniszewski, dr hab. Urszula Smolińska, prof. IO, prof. dr hab. Zygmunt Grzyb, dr Anna Lisek, dr Beata Sumorok, dr Jacek Dyśko, dr Magdalena Szczech, dr Beata Kowalska, dr Michał Oskiera, mgr inż. Edyta Derkowska, mgr Sławomir Głuszek, mgr Paweł Trzciniński, mgr inż. Krzysztof Weszczak, mgr Michał Przybył, mgr inż. Mateusz Frąć, mgr inż. Teresa Sabat, mgr inż. Artur Kowalski, Maria Dzikowska, Anna Polit.**

## WSTĘP

Celem zadania było opracowanie innowacyjnych technologii poprawy jakości gleb, z zastosowaniem bioproduktów i pożytecznych mikroorganizmów glebowych. Opracowane zostały innowacyjne konsorcja pożytecznych mikroorganizmów na bazie zasobów zgromadzonych w SYMBIO BANKU Pracowni Rizosfery Zakładu Mikrobiologii, Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Oceniony został wpływ nowo opracowanych biopreparatów na poprawę jakości gleb w uprawach roślin warzywnych. t.j. wielkość populacji pożytecznych mikroorganizmów, odczyn gleb i skład mineralny przed i po aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych. Podczas realizacji zadania opracowano nowe bionawozy, t.j. inokulum bakteryjno-mikoryzowe, nawóz organiczny Bioilsa, kompost na bazie węgla brunatnego i biowęgla oraz kwasy humusowe wzbogacone o pożyteczne mikroorganizmy glebowe. Zaproponowana w zadaniu innowacja jest przełomowa w skali kraju i świata. Nowo opracowane technologie i bioprodukty organiczne wzbogacone mikrobiologicznie w kolejnych latach badań będą przekształcone w produkty handlowe. W Polsce istnieje popyt na tego typu bioprodukty, które są konkurencyjne i bardziej skuteczne w stosunku do istniejących na rynku preparatów pochodzenia zagranicznego.

Realizacja zadania umożliwi zastosowanie bioproduktów mikrobiologicznych dla poprawy żyzności i produktywności gleb w Polsce. Zwiększenie zawartości materii organicznej w glebie poprzez aplikację bioproduktów organicznych wzbogaconych mikrobiologicznie jest pilną potrzebą w ekologicznej i integrowanej produkcji roślin ogrodniczych i rolniczych. Związki humusowe mają istotne znaczenie w utrzymaniu odporności mechanicznej gleb, stabilności agregatów glebowych, odpowiedniej zawartości materii organicznej i azotu ogólnego (Gümüs i Seker 2015), co poprawia wielkość i jakość plonowania roślin oraz biofizyko-chemiczne właściwości gleb. Stosowanie intensywnego nawożenia mineralnego, zwłaszcza związkami azotu prowadzi do szybkiego rozkładu związków humusowych w glebach (Shan i in. 2015). Umiejętne stosowanie związków humusowych z nawozami azotowymi zapewnia uzyskiwanie wysokiej jakości plonów (Azeem i in. 2015; Hafez i in. 2015). Realizacja zadania umożliwiła opracowanie technologii poprawy jakości gleb poprzez aplikację kwasów humusowych i nawozów organicznych wzbogaconych mikrobiologicznie mających na celu poprawę żyzności gleb oraz wzrostu i plonowania roślin uprawnych (Zlatev i Popov 2013). Badania prowadzone na świecie wykazują, iż stosowanie w uprawach roślin materii organicznej zmniejsza pobieranie metali ciężkich przez rośliny (Tang i in. 2015). Nadmienia się także, że związki humusowe działają biostymulująco na wzrost i plonowanie roślin uprawnych oraz poprawę jakości i produktywności gleb (Canellas i in. 2015).



Rośliny marchwi i ogórka traktowane biopreparatami  
(Pole Doświadczalne IO, 2016r.).

Badania obejmowały opracowanie i zastosowanie bioproduktów mikrobiologicznych dla zwiększenia zawartości materii organicznej i próchnicy w glebie, na której rosły gatunki warzyw objęte projektem (ogórek i marchew). Wzrost zawartości próchnicy zwiększa aktywność biologiczną gleb, pojemność wodną, pojemność sorpcyjną oraz poprawia wymianę gazową pomiędzy atmosferą a glebą. Zastosowanie organicznych bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie przyczyni się do poprawy jakości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych oraz ich wzrostu i plonowania. Pożyteczne mikroorganizmy glebowe wspomagają rozkład i mineralizację materii organicznej zawartej w bionawozach i kompostach. Realizacja zadania przyczyni się do poprawy żyzności gleb, wielkości i jakości plonowania roślin warzywnych w uprawach ekologicznych oraz do ochrony wód i środowiska glebowego. Badania prowadzone w Pracowni Rizosfery Instytutu Ogrodnictwa wskazują, iż zastosowanie nawozów, na bazie węgla brunatnego i biowęgla, wzbogaconych mikrobiologicznie zwiększa wielkość populacji i aktywność pożytecznej mikroflory glebowej oraz stymuluje formowanie symbioz pożytecznych mikroorganizmów z korzeniami roślin. **Wyniki uzyskane w ramach realizacji zadania pozwolą producentom nawozów organicznych na podjęcie produkcji nowych biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie, poprawiających wzrost i plonowanie roślin oraz właściwości gleb o niskiej zawartości próchnicy. Wdrożenie innowacyjnych biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie w ekologicznej produkcji warzyw zwiększy konkurencyjność i dochodowość ekologicznych producentów roślin ogrodniczych oraz firm produkujących bioprodukty wzbogacone mikrobiologicznie.**

**Zaproponowane i zrealizowane zadanie wpisuje się w strategię rozwoju rolnictwa ekologicznego poprzez opracowanie innowacyjnych bioproduktów i technologii dla poprawy jakości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych, z zastosowaniem kwasów humusowych i nawozów organicznych wzbogaconych mikrobiologicznie.**

## Literatura

1. Azeem K., Shah S., Ahmad N., Shah S., Khan F., Arafat Y., Naz F., Azeem I., Ilyas M. 2015. Physiological indices, biomass and economic yield of maize influenced by humic acid and nitrogen levels. *Russian Agricultural Sciences* 41: 115–119.
2. Canellas L.P., Olivares F.L., Aguiar N.O., Jones D.L., Nebbioso A., Mazzei P., Piccolo A. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Biostimulants in Horticulture* 196: 15–27.
3. Gümüs I., Seker C. 2015. Influence of humic acid applications on modulus of rupture, aggregate stability, electrical conductivity, carbon and nitrogen content of a crusting problem soil. *Solid Earth* 6: 1231–1236.
4. Hafez M.M., Shafeek M.R., Mahmoud A.R., Ali A.H. 2015. Beneficial effects of nitrogen fertilizer and humic acid on growth, yield and nutritive values of spinach (*Spinacia oleriva* L.). *Middle East Journal of Applied Sciences* 5: 597–603.
5. Shan J., Ji R., Yan X. 2015. Soil-specific effects of urea addition on mineralization of aromatic and proteinaceous components of humic-like substances in three agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils* 51: 615–623.
6. Tang X., Li X., Liu X., Hashmi M.Z., Xu J., Brookes P.C. 2015. Effects of inorganic and organic amendments on the uptake of lead and trace elements by *Brassica chinensis* grown in an acidic red soil. *Chemosphere* 119: 177–183.
7. Zlatev Z., Popov V. 2013. Effect of organic fertilizers on photosynthesis of young tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Agricultural Science and Technology* 5: 35–38.

## Podzadanie 1. Rekultywacja gleb z niską zawartością materii organicznej w ekologicznych uprawach roślin ogórka i marchwi, z zastosowaniem bioproduktów mikrobiologicznych.

### CEL

Celem badań była ocena wpływu bioproduktów mikrobiologicznych na poprawę jakości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych.



Rośliny marchwi traktowane biopreparatami (Pole Doświadczalne IO, 2016r.). Pierwsze trzy rzędy od lewej- kombinacja kontrolna, pozostałe traktowane bioproduktami mikrobiologicznymi.

### MATERIAŁ I METODY

#### **Określenie właściwości biologicznych gleby: liczebność populacji bakterii i grzybów w glebie i w rizosferze.**

Próby gleby pobierano z każdego poletka przed zbiorem warzyw (20.10.2016), przy pomocy metalowej laski, z głębokości ok. 15-20cm. Analizę mikrobiologiczną rizosfery marchwi i ogórka wykonano po zakończeniu doświadczeń uprawowych. Próby korzeni (ogórek) lub zewnętrznych warstw korzeni marchwi wytrząsano przez 20 min na wstrząsarce, w 100 ml soli fizjologicznej w kolbach zawierających szklane kulki. Uzyskaną zawiesinę wysiewano na odpowiednie pożywki selektywne.

Określano liczebność populacji głównych grup mikroorganizmów glebowych, umożliwiającą ocenę stanu żyzności analizowanych gleb oraz aktywność dehydrogenaz.

Liczebność mikroorganizmów w próbach glebowych oznaczano następującymi metodami:

1/ **ogólną ilość bakterii i promieniowców** metodą posiewów na pożywkę agarową z ekstraktem glebowym (Dhingra and Sinclair, 1995); 2/ **liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas*** określano na pożywkę Goulda (Gould *et al.*, 1985); 3/ liczebność bakterii fluoryzujących z rodzaju *Pseudomonas* na pożywkę Gould w świetle UV; 4/ **liczebność bakterii tworzących przetrwalniki** określano na pożywkę sojowej (1/10 TSA), po uprzednim podgrzaniu zawiesiny przez 10 min. w 80°C (Dhingra and Sinclair, 1995); 5/ populację

**grzybów** określano na pożywce Martina (Martin, 1950). Liczebność mikroorganizmów wyrażano w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w gramie suchej masy gleby.

Inne metody „wskaźnikowe” zastosowane w badaniach mające na celu określenie stanu mikrobiologicznej jakości gleb:

1/ **Liczebność wolno żyjących asymilatorów azotu z rodzaju *Azotobacter*** oceniano metodą płytkową na bezazotowej pożywce agarowej. Określano liczbę kolonii bakterii rosnących wokół mikropróbek gleby, o masie ok. 0,5 mg (200 mikropróbek na 1 próbę gleby).

2/ **Liczebność bakterii koptroficznych i oligotroficznych** (Hattori R., Hattori T. 1980; Swędzińska i Grześ, 2015).

Określenie **aktywności enzymu dehydrogenazy** w glebie wykonano wg metod przedstawionych w pracach: Brzezińska & Włodarczyk, (2005) oraz Kussainova et al., 201; Pepper et al., 1995, z zastosowaniem TTC (2-, 3-, 5-trifenyloctetrazoliowy chlorek) oraz TPF (triphenylo formazan).

### **Opracowanie metod i podłoży do efektywnego namnażania wyselekcjonowanych mikroorganizmów.**

Do badań nad składem pożywek hodowlanych użyto danych z systemu Biolog dotyczących efektywności utleniania poszczególnych związków węgla przez bakterie: *Klebsiella oxytoca* (szcep SYMBIO BANKU: NAzot2), *Pseudomonas* sp. (szcep SYMBIO BANKU: Pi25C), *Pantoea agglomerans* (szcep SYMBIO BANKU: Pi77AA). Do badań użyto pożywek na bazie soli M9 o składzie: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.78 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NH<sub>4</sub>Cl 1g, NaCl 0.5 g, woda 1000 g oraz następujących węglowodanów: fruktoza, glukoza, glicerol, sacharoza. Jako kontroli użyto pożywki tryptonowo sojowej (BTL, nr kat. P-0120). Do inokulacji płynnych pożywek użyto 48-godzinnych kolonii bakterii wyrosłych na pożywce tryptonowo sojowej (BTL, P-090). Bakterie w płynnych pożywkach inkubowano przez 48 godzin, w temperaturze 30°C, w łaźni wodnej z wytrząsaniem.

W celu oceny wpływu węglowodanów na szybkość wzrostu populacji bakterii, oszacowano ich liczbę metodą posiewów kolejnych rozcieńczeń. Do badania populacji użyto pożywki PCA (BTL, nr. kat. P-0037). Bakterie na szalkach inkubowano w temperaturze 26°C, przez 96 godzin. Przy oznaczaniu liczby bakterii w badanym materiale brano pod uwagę szalki na których liczba kolonii zawierała się w przedziale 30-300.

### **Identyfikacja mikroorganizmów w glebie przed zastosowaniem biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie oraz po ich aplikacji.**

W ramach badań zidentyfikowano szczepy bakterii *Klebsiella* sp. NAzot2 oraz *Pantoea agglomerans* Pi77AA aplikowane do gleby w nowo opracowanych bioproduktach w ekologicznych uprawach roślin warzywnych. Próbkę gleby pobrano z doświadczenia, w którym oceniano wpływ bioproduktów na wzrost roślin marchwi i ogórka na początku sierpnia, po 2 miesiącach od aplikacji bioproduktów w warunkach polowych. Ogółem pobrano próbki gleby z uprawy marchwi (siedem kombinacji) i uprawy ogórka (siedem kombinacji). Dla każdej kombinacji pobrano próbkę mieszaną gleby pozyskaną z trzech stanowisk. Identyfikację szczepów bakterii prowadzono w oparciu o analizę genu rybosomalnego 16S rRNA z użyciem techniki DGGE (elektroforeza w denaturującym żelu gradientowym - denaturing gradient gel electrophoresis). Ponadto do analiz zastosowano DNA pozyskany ze szczepów bakterii *Klebsiella* sp. NAzot2 i *Pantoea agglomerans* Pi77AA kultywowanych na pożywkach mikrobiologicznych. Zastosowano metodykę doświadczenia taką samą jak przy ocenie stabilności mikrobiologicznej bioproduktów (opis jak poniżej).

### **Monitoring stabilności mikrobiologicznej nowo opracowanych bioproduktów i inokulów bakteryjno-grzybowych.**

Bioprodukty przygotowano na bazie nośników takich jak odtłuszczone mleko oraz biowęgiel, które wzbogacono następującymi bakteriami: gram ujemnymi *Pseudomonas fluorescens* (szcep SYMBIO BANKU: Ps1/2) i *Pantoea agglomerans* (szcep SYMBIOBANKU:

Pi77AA) oraz gram dodatnimi bakteriami przetrwalnikującymi *Paenibacillus polymyxa* (szczep SYMBIOBANKU: AFG1AA), *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* (szczep SYMBIOBANKU: Sp27d) oraz *Bacillus pumilus* (szczep SYMBIOBANKU: Sp82AA)

Do przygotowania bioproduktów użyto bakterii pochodzących z 48 godzinnych kolonii wyrosłych na pożywce tryptonowo sojowej (BTL, nr kat. P-0090). Bakterie kultywowano w płynnej pożywce tryptonowo sojowej (BTL, nr kat. P-0120) lub w płynnej pożywce tryptonowo sojowej z dodatkiem uwodnionego zmikronizowanego węgla drzewnego (15 g na litr.) przez 72 godziny w 30°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Następnie odseparowano biomasę lub biomasę z węglem drzewnym od płynu hodowlanego przez wirowanie przy prędkości 6000 obrotów na minutę. Uzyskaną biomasę połączono z 10% roztworem odtłuszczonego mleka (BTL, nr kat. D-001), zhomogenizowano i zamrożono w -80°C. Tak przygotowane materiały poddano suszeniu sublimacyjnemu w liofilizatorze (ciśnienie: 0,05 mbara, temperatura: -50°C, czas: 24 godziny). Wysuszone materiały przeniesiono do opakowań typu 'falcon'/'moczówka' i przechowywano w temperaturze pokojowej w eksykatorze lub oraz w lodówce w temperaturze ok. 4°C przez 60 dni.

W celu oceny wpływu nośników na mikroorganizmy oraz ich przeżywalności oszacowano populację bakterii metodą posiewów kolejnych rozcieńczeń. Do badania populacji użyto pożywki PCA (BTL, nr. kat. P-0037). Zainokulowane szalki inkubowano w temperaturze 26°C przez 96 godzin. Przy oznaczaniu liczby bakterii w badanym materiale brano pod uwagę szalki na których liczba kolonii zawierała się w przedziale 30-300.

Ponadto monitoring stabilności mikrobiologicznej bioproduktów przeprowadzono z użyciem techniki DGGE (elektroforeza w denaturującym żelu gradientowym - denaturing gradient gel electrophoresis), która umożliwia identyfikację mikroorganizmów w oparciu o DNA wyekstrahowany z gleby, bez konieczności kultywowania mikroorganizmów na pożywkach. Technika DGGE polega na rozdzieleniu pojedynczych amplikonów o tej samej długości, ale różniących się sekwencją, w żelu poliakrylamidowym, w gradiencie chemicznym (Hill i in., 2000). Technika ta umożliwia ocenę zróżnicowania mikrobiologicznego gleb, a także precyzyjną identyfikację szczepów mikroorganizmów. Techniki te były stosowane na przykład do oceny zróżnicowania bakteryjnego lub grzybowego kilku typów gleb uprawnych, gleb o zróżnicowanym poziomie nawożenia azotowego oraz gleb zanieczyszczonych chemicznie (Smalla i in. 2007; Hoshino i Morimoto 2008; Sun i in. 2014; Liu i in. 2015).

Identyfikację mikroorganizmów z użyciem techniki DGGE przeprowadzono dla 5 bioproduktów wzbogaconych pojedynczymi szczepami bakterii. Jeden bioprodukt przygotowano na bazie odtłuszczonego mleka w proszku, natomiast cztery bioprodukty przygotowano na bazie biowęgla. Bioprodukt na bazie odtłuszczonego mleka w proszku wzbogacono szczepem bakterii *Bacillus pumilus* Sp82AA. Bioprodukty na bazie biowęgla wzbogacono szczepami bakterii *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* Sp27d, *Pantoea agglomerans* Pi77AA oraz *Paenibacillus polymyxa* AFG1AA. Przygotowane bioprodukty przechowywano w temperaturze pokojowej (od+22 do +24°C) oraz w obniżonej temperaturze (+4°C).

Bioprodukty oznaczono następująco:

- 1- na bazie odtłuszczonego mleka, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt wyjściowy.
- 2- na bazie odtłuszczonego mleka, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze pokojowej.
- 3- na bazie odtłuszczonego mleka, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze +4°C.
- 4- na bazie biowęgla, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt wyjściowy.
- 5- na bazie biowęgla, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze pokojowej.
- 6- na bazie biowęgla, szczep *Bacillus pumilus* Sp82AA, bioprodukt przechowywany w



temperaturze +4°C.

- 7- na bazie biowęgla, szczep *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* Sp27d, bioprodukt wyjściowy.
- 8- na bazie biowęgla, szczep, *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* Sp27d, bioprodukt przechowywany w temperaturze pokojowej.
- 9- na bazie biowęgla, szczep *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* Sp27d, bioprodukt przechowywany w temperaturze +4°C.
- 10- na bazie biowęgla, szczep *Pantoea agglomerans* Pi77AA, bioprodukt wyjściowy.
- 11- na bazie biowęgla, szczep *Pantoea agglomerans* Pi77AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze pokojowej.
- 12- na bazie biowęgla, szczep *Pantoea agglomerans* Pi77AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze +4°C.
- 13- na bazie biowęgla, szczep *Paenibacillus polymyxa* AFG1AA, bioprodukt wyjściowy.
- 14- na bazie biowęgla, szczep *Paenibacillus polymyxa* AFG1AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze pokojowej.
- 15- na bazie biowęgla, szczep *Paenibacillus polymyxa* AFG1AA, bioprodukt przechowywany w temperaturze +4°C.

### **Ekstrakcja DNA**

Izolację DNA przeprowadzono bezpośrednio po przygotowaniu bioproduktów oraz po ich przechowywaniu przez 2 miesiące, w temperaturze obniżonej (+4°C) i pokojowej (od +22 do +24°C). DNA izolowano z 250 mg każdego z bioproduktów z użyciem zestawu komercyjnego do izolacji DNA gleby NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL). Ponadto, wyizolowano DNA z kultur bakterii rosnących na pożywkach mikrobiologicznych, ze szczepów, które uprzednio aplikowano do bioproduktów. DNA izolowano ze szczepów *Bacillus pumilus* Sp82AA, *Bacillus subtilis* ss. *subtilis* Sp27d, *Pantoea agglomerans* Pi77AA oraz *Paenibacillus polymyxa* AFG1AA przy użyciu zestawu komercyjnego do izolacji DNA z bakterii i drożdży (GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit for isolating DNA from bacteria and yeast, EURx). Koncentrację DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Do analiz przygotowano próby DNA w rozcieńczeniu 10 ng/μl.

### **Warunki PCR**

Reakcje przeprowadzono z użyciem starterów 907-R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') oraz GC357-F zawierającego klamrę GC długości 40 pz (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Sass i in. 2001). Reakcje przeprowadzono w 10 cyklach (94°C 30s, 61°C 60s, 72°C 60s), a następnie w 20 cyklach (94°C 30s, 56°C 60s, 72°C 60s) w mieszaninie o objętości 20 μl, zawierającej bufor reakcyjny 1x, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM każdego startera, 0,5 U polimerazy DNA (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with Buffer I; ThermoScientific, Waltham, USA) oraz 20 ng matrycy DNA. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze S1000™ (BioRad, Hercules, USA). Obecność produktu PCR sprawdzono w 1,4% żelu agarozowym.

### **Analiza DGGE (elektroforeza w denaturującym żelu gradientowym - denaturing gradient gel electrophoresis) bakteryjnego genu 16S rRNA**

Analizę DGGE przeprowadzono z użyciem systemu do wrywania mutacji DCode™ (Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Żele poliakrylamidowe (37.5:1 akrylamid:bisakrylamid) w koncentracji 7% przygotowano w gradiencie chemicznym 30%-55%. Na żel poliakrylamidowy nakładano 10 μl każdej próby. Elektroforezę w buforze 1xTAE prowadzono przez 4,5 godz, w temperaturze 60°C przy napięciu 200V. Żele poliakrylamidowe barwiono z użyciem barwnika SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:10 000 przez 30 minut. Elektroforegramy dokumentowano przy użyciu systemu do dokumentacji żeli (GelDoc-It® Imaging System, UVP, Upland USA).

## WYNIKI

### Określenie właściwości mikrobiologicznych gleby: liczebność populacji bakterii i grzybów w glebie i w rizosferze.

Tabela 1. Liczebność bakterii (ogólna), promieniowców, bakterii przetrwalnikujących i liczebność grzybów w glebie z poletek, na których uprawiano marchew.

Traktowanie	Bakterie *	Promieniowce	Przetrwalnik.	Grzyby *	Drożdżaki
	X 10 <sup>6</sup>	X 10 <sup>6</sup>	X 10 <sup>5</sup>	X 10 <sup>4</sup>	X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby					
Kontrola (bez nawożenia)	38,6	13,1	74,3	16,6	0,94
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	23,4	12,3	54,2	12,1	4,64
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	36,2	10,7	88,9	24,7	11,9
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	30,5	12,3	51,5	37,9	26,0
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	34,5	16,7	70,8	44,2	34,3
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	12,3	4,2	28,2	25,4	20,0
Obornik	28,6	5,1	53,9	26,3	86,5

\*ogólna liczebność bakterii.

\*\*Wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki); \*\* pojedyncze kolonie drożdży na szalkach.

Aplikacja bioproduktów modyfikowała wielkość populacji poszczególnych grup mikroorganizmów w glebie, w której rosły rośliny marchwi. Zastosowanie kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie liczby promieniowców w glebie, w której uprawiano rośliny marchwi odmiany Nipomo. Aplikacja Bioilsy wzbogaconej mikrobiologicznie zwiększyła liczebność bakterii wytwarzających przetrwalniki. Bioilsa, kompost, kwasy humusowe i biowęgiel wzbogacone mikrobiologicznie zwiększały populację grzybów w glebie pobranej z poletek, na których uprawiano marchew. Wszystkie badane biopreparaty zwiększały populację drożdżaków w glebie.

Tabela 2. Liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie z poletek, na których uprawiano marchew.

Traktowanie	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseud.</i> fluoryzujące
	X 10 <sup>3</sup>	X 10 <sup>3</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby		
Kontrola (bez nawożenia)	52,8	3,5
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	83,0	5,7
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	171,0	23,7
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	107,2	12,5
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	95,6	3,1
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	78,5	5,3
Obornik	246,6	23,7

Zastosowane biopreparaty wpłynęły na zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie, w której uprawiano rośliny marchwi odmiany Nipomo.



Tabela 3. Liczebność bakterii (ogólna), bakterii przetrwalnikujących, promieniowców oraz liczebność grzybów w rizosferze marchwi.

Traktowanie	Bakterie *	Promieniowce	Przetrwalnik.	Grzyby *	Drożdżaki
	X 10 <sup>7</sup>	X 10 <sup>6</sup>	X 10 <sup>5</sup>	X 10 <sup>5</sup>	X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby					
Kontrola (bez nawożenia)	13,1	10,0	121,1	10,1	61,9
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	9,5	9,8	88,5	9,2	55,1
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>14,1</b>	<b>13,9</b>	72,6	<b>12,8</b>	<b>77,7</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>11,6</b>	<b>11,6</b>	<b>148,9</b>	<b>26,2</b>	<b>183,7</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>83,3</b>	<b>75,0</b>	82,4	<b>16,6</b>	<b>206,0</b>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>153,6</b>	<b>65,0</b>	65,7	<b>15,6</b>	<b>71,4</b>
Obornik	10,3	8,0	48,9	<b>16,8</b>	53,9

\*ogólna liczebność bakterii.

\*wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki).

Aplikacja Bioilsy, kwasów humusowych oraz biowęgla wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęła na zwiększenie ogólnej liczby bakterii w glebie rizosferowej marchwi odmiany Nipomo. Zastosowanie Bioilsy, kompostu, kwasów humusowych i biowęgla wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie populacji grzybów, promieniowców oraz drożdżaków, a kompost wzbogacony mikrobiologicznie wpłynął korzystnie na liczebność bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe.

Tabela 4. Liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w rizosferze marchwi.

Traktowanie	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseud.</i> fluoryzujące
	X 10 <sup>4</sup>	X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby		
Kontrola (bez nawożenia)	57,9	11,0
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	33,3	10,1
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	44,8	<b>21,4</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>58,1</b>	7,4
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>62,0</b>	>10 <sup>3</sup>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	26,6	5,6
Obornik	39,3	>10 <sup>3</sup>

Zastosowanie kompostu i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie rizosferowej roślin marchwi odmiany Nipomo.

Tabela 5. Liczebność bakterii (ogólna), promieniowców, bakterii przetrwalnikujących i liczebność grzybów w glebie z poletek, na których uprawiano ogórek.

Traktowanie	Bakterie *	Promieniowce	Przetrwalnik.	Grzyby *	Drożdżaki
	X 10 <sup>6</sup>	X 10 <sup>6</sup>	X 10 <sup>5</sup>	X 10 <sup>4</sup>	X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby					
Kontrola (bez nawożenia)	62,2	9,1	102,3	22,4	1,09
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	34,2	10,9	85,9	28,0	2,2
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	29,4	8,5	52,8	34,7	1,8
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	31,5	11,1	86,6	34,4	1,8
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	33,3	11,0	68,7	24,0	1,0
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	19,7	6,7	53,3	18,4	1,3
Obornik	42,1	8,1	73,7	20,4	1,1

\*ogólna liczebność bakterii.

\*\*Wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki); \*\* pojedyncze kolonie drożdży na szalkach.

Aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego, kompostu i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęła na zwiększenie liczebności promieniowców a inokulum bakteryjno-mikoryzowe, Bioilsa, kompost i kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie zwiększały populację grzybów w glebie.

Tabela 6. Liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie z poletek, na których uprawiano rośliny ogórka.

Traktowanie	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseud.</i> fluoryzujące
	X 10 <sup>4</sup>	X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby		
Kontrola (bez nawożenia)	26,8	6,0
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	41,1	5,0
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	57,1	8,9
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	22,3	5,7
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	43,7	6,5
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	22,4	3,9
Obornik	61,2	10,4

Inokulum bakteryjno-mikoryzowe, Bioilsa, kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie oraz obornik korzystnie wpłynęły na zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie, w której uprawiano rośliny ogórka odmiany Adam.

Tabela 7. Liczebność bakterii (ogólna), bakterii przetrwalnikujących oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* sp w ryzosferze ogórka.

Traktowanie	Bakterie *	Przetrwalnik.	<i>Pseudomonas</i>
	X 10 <sup>7</sup>	X 10 <sup>5</sup>	X 10 <sup>5</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby			
Kontrola (bez nawożenia)	32,4	6,0	39,8
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	25,6	6,2	53,4
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	31,7	7,8	75,9
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	26,4	13,4	56,9
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	35,3	9,1	31,4

<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>25,5</b>	<b>7,7</b>	<b>59,3</b>
<b>Obornik</b>	<b>74,5</b>	<b>10,3</b>	<b>170,3</b>

\*ogólna liczebność bakterii.

Zastosowanie kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie oraz obornika korzystnie wpłynęło na ogólną liczebność bakterii w ryzosferze ogórka odmiany Adam. Wszystkie zastosowane bioprodukty zwiększały populację bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe. Zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego, Bioilsy, kompostu i biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie oraz obornika korzystnie wpłynęło na liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie ryzosferowej roślin ogórka odmiany Adam.

Tabela 8. Liczebność grzybów w ryzosferze ogórka.

Traktowanie	Grzyby * X 10 <sup>5</sup>	Drożdżaki X 10 <sup>4</sup>
	Liczebność w jtk/g suchej masy gleby	
Kontrola (bez nawożenia)	27,5	23,4
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>28,9</b>	<b>16,7</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	14,2	1,7
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	<b>37,4</b>	1,1
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	24,4	0,4
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>37,6</b>	<b>0,9</b>
<b>Obornik</b>	<b>62,6</b>	<b>1,9</b>

\*Wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki).

Inokulum bakteryjno-mikoryzowe, kompost, biowęgiel wzbogacone mikrobiologicznie oraz obornik wpłynęły na zwiększenie ogólnej liczebności grzybów ryzosferze ogórka odmiany Adam.

Tabela 9. Średnia aktywność dehydrogenaz w próbach glebowych z poletek, na których rosły rośliny marchwi i ogórka.

Traktowanie	Średnia aktywność dehydrogenaz [ $\mu\text{mol TPF g}^{-1}$ s.m. 24h <sup>-1</sup> ]		
	16.06.2016	17.08.2016	10.10.2016
<b>Marchew</b>			
Kontrola (bez nawożenia)	0,22	0,23	0,18
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>0,18</b>	<b>0,22</b>	<b>0,17</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	0,23	0,20	0,19
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	0,16	0,31	0,20
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	0,17	0,19	0,20
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>0,26</b>	<b>0,24</b>	<b>0,13</b>
<b>Obornik</b>	<b>0,15</b>	<b>0,24</b>	<b>0,24</b>
<b>Ogórek</b>			
Kontrola (bez nawożenia)	0,21	0,28	<b>0,31</b>
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>0,24</b>	<b>0,41</b>	<b>0,32</b>
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>0,28</b>	<b>0,50</b>	<b>0,39</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>0,33</b>	<b>0,54</b>	<b>0,44</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>0,33</b>	<b>0,51</b>	<b>0,34</b>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>0,33</b>	<b>0,62</b>	<b>0,37</b>
<b>Obornik</b>	<b>0,31</b>	<b>0,62</b>	<b>0,40</b>

Po zastosowaniu badanych biopreparatów zaobserwowano, w miesiącu sierpniu, zwiększoną aktywność enzymu dehydrogenazy w glebie pobranej, z poletek na których uprawiano rośliny ogórka odmiany Adam. Zależności tej nie odnotowano w próbach gleby, na której rosły rośliny marchwi.

### Opracowanie metod i podłoży do efektywnego namnażania wyselekcjonowanych mikroorganizmów.

Tabela 1. Wpływ składu pożywki na liczebność bakterii.

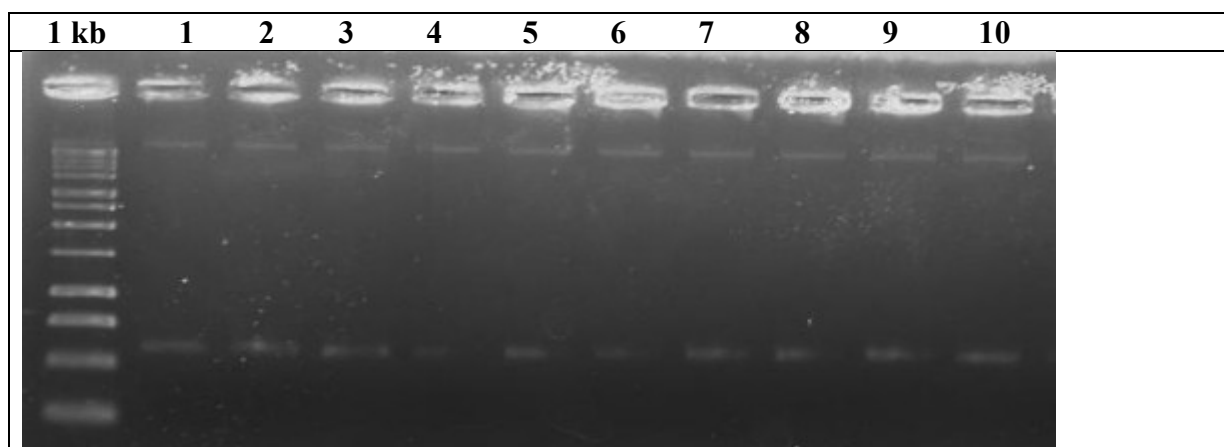
Szczep	Pożywka	Populacja uzyskana po 48 godzinach hodowli [ $\times 10^9$ jtk $\times$ ml $^{-1}$ ]
<i>Klebsiella oxytoca</i> (NAzot 2)	Sole M9 z dodatkiem fruktozy (10 g na litr)	2.8
	Sole M9 z dodatkiem glukozy (10 g na litr)	1.7
	Sole M9 z dodatkiem glicerolu (10 g na litr)	1.6
	Sole M9 z dodatkiem sacharozy (10 g na litr)	4.5
	Pożywka tryptonowo sojowa	5.3
<i>Pseudomonas</i> sp (Pi25C)	Sole M9 z dodatkiem fruktozy (10 g na litr)	1.9
	Sole M9 z dodatkiem glukozy (10 g na litr)	1.5
	Sole M9 z dodatkiem glicerolu (10 g na litr)	2.2
	Sole M9 z dodatkiem sacharozy (10 g na litr)	0.8
	Pożywka tryptonowo sojowa	3.1
<i>Pantoea agglomerans</i> (Pi77AA)	Sole M9 z dodatkiem fruktozy (10 g na litr)	1.0
	Sole M9 z dodatkiem glukozy (10 g na litr)	0.9
	Sole M9 z dodatkiem glicerolu (10 g na litr)	1.0
	Sole M9 z dodatkiem sacharozy (10 g na litr)	0.8
	Pożywka tryptonowo sojowa	1.2

Najlepszą pożywką do hodowli bakterii była płynna pożywka tryptonowo sojowa. Najlepszymi cukrami do hodowli poszczególnych szczepów bakterii były:

- sacharoza dla *Klebsiella oxytoca* (NAzot 2).
- glicerol i glukoza dla *Pseudomonas* sp. (Pi25C).
- fruktoza i glukoza dla *Pantoea agglomerans* (Pi77AA).

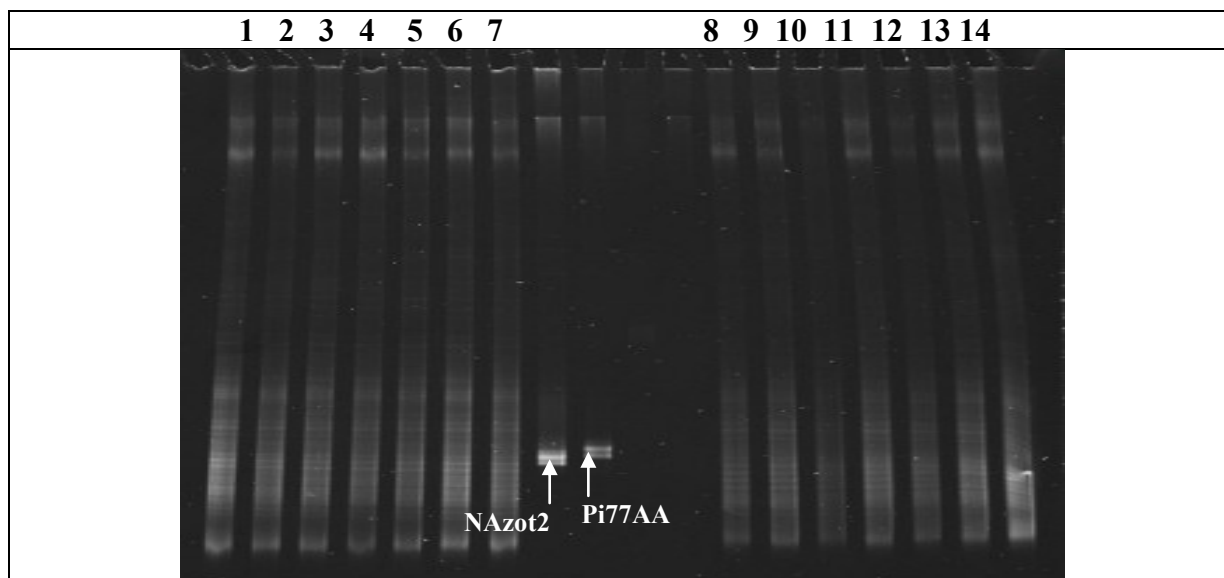
### Identyfikacja mikroorganizmów w glebie przed zastosowaniem biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie oraz po ich aplikacji.

W wyniku przeprowadzonych reakcji ze starterami GC357-F /907-R dla każdej z prób uzyskano produkty PCR wielkości 630 pz (Rys. 1).



Rys. 1. Produkty PCR wielkości 630 pz uzyskane w reakcji ze starterami GC357-F /907-R dla wybranych prób DNA pozyskanego z gleby. Próby 1-3: DNA wyizolowany z gleby traktowanej bioproduktami w uprawie marchwi, próby 4-10: DNA wyizolowany z gleby traktowanej bioproduktami w uprawie ogórka. 1 kb – marker wielkości.

W wyniku analizy DGGE uzyskano elektroforegram przedstawiający obecność ampikonów genu 16S rRNA szczepów kontrolnych oraz w testowanych próbach gleby (Rys. 2). Dla kontrolnych szczepów bakterii *Klebsiella* sp. NAzot2 oraz *Pantoea agglomerans* Pi77AA, z których wyizolowano DNA z kultur na pożywkach mikrobiologicznych, uzyskano fragmenty DNA charakteryzujące te szczepy bakterii. Obecność fragmentów DNA odpowiadających szczepowi bakterii NAzot2 zaobserwowano we wszystkich kombinacjach gleby pobranej z okolic korzeni marchwi. Nie stwierdzono obecności ampikonów charakterystycznych dla szczepu NAzot2 w próbach gleby pobranej z uprawy ogórka. Nie stwierdzono także fragmentów DNA odpowiadających szczepowi bakterii *Pantoea agglomerans* Pi77AA w żadnej z testowanych prób gleby. Ponadto nie stwierdzono zróżnicowania bakteryjnego w obrębie prób gleby pobranych w z uprawy marchwi oraz w obrębie prób gleby pobranych z uprawy ogórka. **Uzyskane wyniki wskazują, że szczep bakterii, *Klebsiella* sp. NAzot2, wykazywał przeżywalność w glebie w okresie ponad dwa miesiące po aplikacji bioproduktów.**

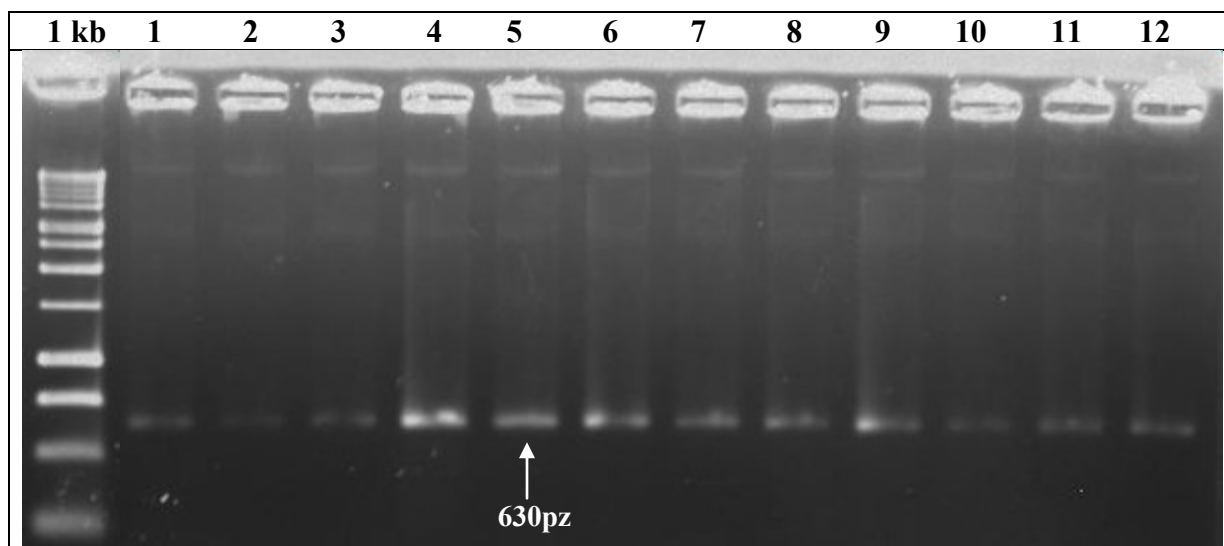


Rys. 2. Profile DGGE uzyskane w wyniku amplifikacji genu 16S rRNA ze starterami GC357-F /907-R. 1-7: DNA z prób gleby pobranej z okolic korzeni marchwi (7 kombinacji), 8-14: DNA z prób gleby pobranej z okolic korzeni ogórka (7 kombinacji). Strzałkami oznaczono produkty amplifikacji kontrolnych szczepów bakterii.

Uzyskane wyniki znajdują zastosowanie do oceny stabilności mikrobiologicznej bioproduktów oraz do identyfikacji szczepów bakterii wprowadzanych do gleby po aplikacji bioproduktów w ekologicznych uprawach roślin warzywnych. Ponadto, uzyskane wyniki będą wykorzystane do charakterystyki molekularnej pożytecznych dla roślin mikroorganizmów, zdeponowanych w SymbioBanku Pracowni Rizosfery Instytutu Ogródnictwa w Skierniewicach.

### Monitoring stabilności mikrobiologicznej nowo opracowanych bioproduktów i inokulów bakteryjno-grzybowych.

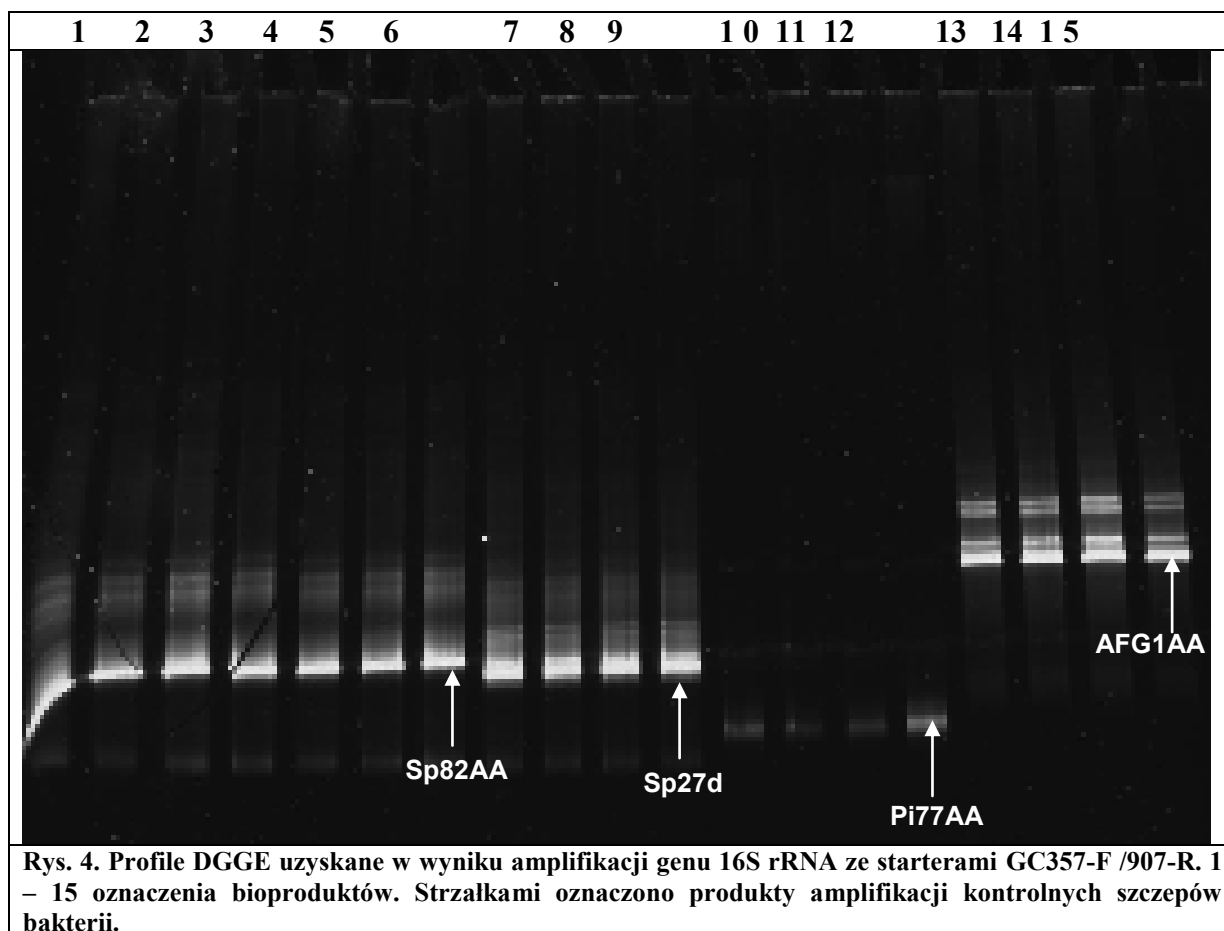
W wyniku przeprowadzonych reakcji ze starterami GC357-F /907-R dla każdej z prób uzyskano produkty PCR wielkości 630 pz (Rys. 3).



Rys. 3. Produkty PCR wielkości 630 pz uzyskane w reakcji ze starterami GC357-F /907-R dla wybranych prób bioproduktów. Próby 1-3: DNA wyizolowany z bioproduktów opartych na odłuszczonej mleku, próby 4-12: DNA wyizolowany z bioproduktów opartych na biowęglu. 1 kb – marker wielkości.



W wyniku rozdziału produktów PCR w żelu poliakrylamidowym z gradientem chemicznym 30%-55% uzyskano elektroforegram przedstawiający obecność amplikonów genu 16S rRNA (Rys. 4). Dla wszystkich kontrolnych szczepów bakterii, z których wyizolowano DNA z kultur na pożywkach mikrobiologicznych uzyskano fragmenty DNA charakteryzujące te szczepy bakterii. Obecność takich samych fragmentów DNA jak u szczepów kontrolnych stwierdzono we wszystkich bioproduktach, z których DNA izolowano bezpośrednio po ich sporządzeniu oraz po dwóch miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w temperaturze obniżonej do +4°C. **Wynik ten wskazuje, że wszystkie testowane bioprodukty po dwóch miesiącach przechowywania charakteryzowały się wysoką przeżywalnością szczepów bakterii, którymi je inokulowano, niezależnie od zastosowanej temperatury.**



Rys. 4. Profile DGGE uzyskane w wyniku amplifikacji genu 16S rRNA ze starterami GC357-F /907-R. 1 – 15 oznaczenia bioproduktów. Strzałkami oznaczono produkty amplifikacji kontrolnych szczepów bakterii.

Przeprowadzone testy wykazały wysoką stabilność i przeżywalność pożytecznych mikroorganizmów w bioproduktach podczas ich dwumiesięcznego przechowywania w zróżnicowanej temperaturze (Tabela 2). Uzyskane wyniki wykazały także wysoką przeżywalność szczepów bakterii w glebie po aplikacji bioproduktów w ekologicznych uprawach roślin warzywnych.

Tabela 2. Wpływ nośnika i temperatury na liczebność i przeżywalność bakterii po okresie 60 dni.

Próbka	Liczba bakterii x 10 <sup>5</sup> jtk x g <sup>-1</sup> (1 dzień doświadczenia)	Liczba bakterii x 10 <sup>5</sup> jtk x g <sup>-1</sup> (60 dzień doświadczenia)	Przeżywalność [%]
Ps1/2 liofilizowane (temperatura pokojowa)	1,27 ± 0,15	1,18 ± 0,34	93%
Ps1/2 liofilizowane + węgiel drzewny	142,5 ± 3,54	144,81 ± 12,1	100%

(temperatura pokojowa)			
<b>Ps1/2 liofilizowane + węgiel drzewny</b> (temperatura 4°C)	<b>142,5 ± 3,54</b>	<b>114,28 ± 19,68</b>	<b>80%</b>
<b>Sp82AA liofilizowane</b> (temperatura pokojowa)	<b>3437,071 ± 68,1</b>	<b>3295,37 ± 56,9</b>	<b>96%</b>
<b>Sp82AA liofilizowane + węgiel drzewny</b> (temperatura pokojowa)	<b>556,22 ± 36,11</b>	<b>510,59 ± 67,36</b>	<b>92%</b>
<b>Sp82AA liofilizowane + węgiel drzewny</b> (temperatura 4°C)	<b>556,22 ± 36,11</b>	<b>395,05 ± 12,28</b>	<b>71%</b>
<b>Sp27d liofilizowane</b> (temperatura pokojowa)	<b>744,35 ± 58,1</b>	<b>695,2 ± 14,91</b>	<b>93%</b>
<b>Pi77AA liofilizowane</b> (temperatura pokojowa)	<b>1,8 ± 0,08</b>	<b>1,59 ± 0,08</b>	<b>88%</b>
<b>AFG1AA liofilizowane</b> (temperatura pokojowa)	<b>89,5 ± 7,78</b>	<b>74,68 ± 3,14</b>	<b>84%</b>

Dodatek zmikronizowanego węgla drzewnego do pożywki hodowlanej miał istotny wpływ na populację bakterii:

- Po zastosowaniu węgla drzewnego w hodowli bakterii *Pseudomonas fluorescens* (Ps1/2) zaobserwowano większą jej populację, w porównaniu do hodowli w czystej pożywce tryptonowo sojowej.
- Po zastosowaniu węgla drzewnego w hodowli bakterii *Bacillus pumilus* (Sp82AA) zaobserwowano mniejszą jej populację, w porównaniu do hodowli w czystej pożywce tryptonowo sojowej.
- Zaobserwowane różnice mogą pochodzić od: wpływu składników węgla drzewnego na bakterię *B. pumilus* i/lub mogą być spowodowane kolonizacją powierzchni węgla drzewnego przez bakterię *P. fluorescens* podczas hodowli w pożywce płynnej.

**Uzyskane wyniki wykazały zadowalającą przeżywalność bakterii, przechowywanych w lodówce i w temperaturze pokojowej, na poziomie od 71 do 100 % ich wyjściowej populacji.**

		
<p>Próbki odwodnionych materiałów zawierające badane szczepy bakterii.</p>		<p>Próbki materiałów zawierające szczepy bakterii (2 górne - bakterie na nośniku z odtłuszczonego mleka, 2 dolne - bakterie na nośniku węgla drzewnego i odtłuszczonego mleka).</p>

## PODSUMOWANIE

Zastosowane bioprodukty wpłynęły na zwiększenie ogólnej liczby bakterii, bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe, bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, ogólnej liczby grzybów, drożdżaków oraz promieniowców w glebie oraz w glebie ryzosferowej roślin marchwi odmiany Nipomo i ogórka odmiany Adam. Po aplikacji badanych biopreparatów w sierpniu 2016 r. zaobserwowano zwiększoną aktywność enzymu dehydrogenazy w glebie pobranej z poletek, na których rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

Najlepszą pożywką do hodowli bakterii była płynna pożywka tryptonowo sojowa. Najlepszymi cukrami do hodowli poszczególnych szczepów bakterii były:

- sacharoza dla *Klebsiella oxytoca* (NAzot 2).
- glicerol i glukoza dla *Pseudomonas* sp. (Pi25C).
- fruktoza i glukoza dla *Pantoea agglomerans* (Pi77AA).

Uzyskane wyniki wykazały zadowalająco wysoką przeżywalność bakterii, przechowywanych w lodówce i w temperaturze pokojowej, na poziomie od 71 do 100 % ich wyjściowej populacji. Wszystkie testowane bioprodukty po dwóch miesiącach przechowywania charakteryzowały się wysoką przeżywalnością szczepów bakterii, którymi je inokulowano, niezależnie od zastosowanej temperatury.

## Podzadanie 2. Poprawa wzrostu i plonowania roślin warzywnych w uprawach ekologicznych, z zastosowaniem bioproduktów wzbogaconych o pożyteczne mikroorganizmy.

### CEL

Celem realizowanego podzadania była ocena wpływu bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na poprawę wzrostu i plonowania roślin warzywnych w uprawach ekologicznych. Przeprowadzone zostały doświadczenia polowe w ekologicznych obiektach Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz u prywatnych producentów ekologicznych warzyw.



Rośliny ogórka traktowane biopreparatami stymulującymi wzrost i plonowanie roślin oraz o działaniu ochronnym. Pierwszy rząd od lewej – kombinacja kontrolna. Rzędy 3, 4 i 5 o silnym wzroście roślin traktowanych preparatami wzbogaconymi mikrobiologicznie: Bioilsa, kompost i kwasy humusowe (Pole Doświadczalne IO, 2016r.).

## **MATERIAŁ I METODY**

### **Opracowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego i bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie do doświadczeń polowych i szklarniowych.**

Bioprodukty t.j. inokulum bakteryjno-mikoryzowe, Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie, kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel, kwasy humusowe (5%) wzbogacone mikrobiologicznie oraz Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie opracowano w początkowej fazie zadania. Opracowane bioprodukty zaaplikowano wiosną 2016 r. na Polu Doświadczalnym IO, na poletkach doświadczalnych o powierzchni 25 m<sup>2</sup>. Zoptymalizowano dawki bioproduktów w stosunku do wymagań pokarmowych roślin warzywnych, rosnących w uprawach ekologicznych, opisanych szerzej w podzadaniu 4. Wykonano analizy mikrobiologiczne prób gleby oraz przekazano próby gleby i roślin do badań składu mineralnego z poszczególnych kombinacji doświadczalnych:

- Kontrolna
- Inokulum bakteryjno-mikoryzowe (1 kg/m<sup>2</sup> – 25 kg/25 m<sup>2</sup>)
- Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie (700 kg/ha – 1,75 kg/25 m<sup>2</sup>)
- Kompost wzbogacony mikrobiologicznie (40 t/ha – 100 kg/25 m<sup>2</sup>) + 10% Biowęgiel (4 t/ha – 10 kg/25 m<sup>2</sup>)
- Kwasy humusowe (5%) wzbogacone mikrobiologicznie
- Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie (10 t/ha – 25 kg/25 m<sup>2</sup>)
- Obornik przefermentowany (30 t/ha – 75 kg/25 m<sup>2</sup>).

Plantacje marchwi i ogórka chroniono przed chorobami i szkodnikami, stosując dwukrotnie wyciąg z wrotycza, mniszka polnego i czosnku, a następnie 3-krotnie, w odstępach 10 dniowych, preparat o nazwie Funguran OH50WP, zawierający wodorotlenek miedzi.



Wykonano analizy wzrostu wegetatywnego i plonowania roślin oraz ocenę cech wzrostu korzeni i stopnia asocjacji mikoryzowej w korzeniach roślin.



### **Oznaczanie frekwencji mikoryzowej arbuskularnych grzybów mikoryzowych (AGM) w korzeniach roślin warzywnych z doświadczeń szklarniowych i polowych.**

W celu określenia stopnia frekwencji mikoryzowej we wrześniu 2016 r. pobrano korzenie roślin marchwi i ogórka, które wybarwiono z zastosowaniem metody opracowanej w Pracowni Rizosfery (Derkowska i in. 2015) i analizowano zgodnie z metodą Trouvelot (1986), przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego z kontrastem fazy Nikon Eclipse 50i oraz kamerą DS-Fil i oprogramowaniem NIS-ELEMENTS BR. Określono: stopień frekwencji mikoryzowej (F%), intensywność mikoryzową (M%, m%) oraz obfitość arbuskul (A%, a%), za pomocą programu MycoCalc: <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html>

### **Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na natężenie fotosyntezy oraz maksymalną wydajność fotosystemu II roślin ogórka odmiany Adam.**

W sierpniu 2016 r. na polu doświadczalnym przeprowadzono ocenę wybranych parametrów fizjologicznych roślin ogórka. Określono sprawność aparatu fotosyntetycznego (natężenie fotosyntezy i maksymalną wydajność fotosystemu II) dla 30 liści ogórka z każdej kombinacji doświadczalnej. Natężenie fotosyntezy mierzono przy pomocy analizatora wymiany gazowej LCpro+ (ADC BioScientific, Wielka Brytania), wyposażonego w standardową komorę pomiarową oraz sztuczne źródło światła. Pomiar fluorescencji chlorofilu wykonano za pomocą fluorymetru OS1-FL (Opti-Sciences, USA). Do scharakteryzowania aktywności fotosyntetycznej wykorzystany został wskaźnik fluorescencji wyznaczony po adaptacji w ciemności - Fv/Fm (fluorescencja zmienna/fluorescencja maksymalna), określający maksymalną wydajność fotosystemu II.

Z powodu budowy liści marchwi nie można było wykonać pomiarów natężenia fotosyntezy i maksymalnej wydajności fotosystemu II marchwi z zastosowaniem analizatora wymiany gazowej LCpro+ (ADC BioScientific, Wielka Brytania), dostępnego w Instytucie Ogrodnictwa.

**Ocenę wzrostu wegetatywnego roślin** wykonano po zakończeniu doświadczeń, t.j. pomiary długości pędów, świeżej i suchej masy systemu korzeniowego i części nadziemnej roślin. Określono również pięć cech morfologicznych korzeni t.j. pole powierzchni, długość, średnicę, objętość i liczbę wierzchołków korzeni, a także pole powierzchni i objętość pędów, z zastosowaniem skanera korzeniowego EPSON EXPRESSION 10000 XL, z oprogramowaniem WinRhizo (Arsenault i in. 1995). Analizy składu mineralnego obejmują zawartość makro- i mikroelementów w roślinach i w glebie pobranej z doświadczeń polowych.



**Rośliny marchwi i ogórka traktowane biopreparatami  
(Pole Doświadczalne IO, 2016r.).**

## WYNIKI

### Oznaczenie frekwencji mikoryzowej arbuskularnych grzybów mikoryzowych (AGM) w korzeniach roślin warzywnych z doświadczeń polowych.

Tabela 1. Wpływ nowo opracowanych bioproduktów na stopień frekwencji mikoryzowej (F%) oraz intensywności mikoryzowej (M%, m%) w korzeniach marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016).

Traktowanie	F%	M%	m%
Kontrola	11.11 a	0.1 a	3.3 a
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>12.22 ab</b>	<b>0.2 a</b>	<b>6.6 ab</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	11.11 a	0.1 a	3.3 a
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	11.11 a	0.1 a	3.3 a
Kwasy humusowe (5%) wzbogacone mikrobiologicznie	11.11 a	0.1 a	3.3 a
Biowęgiel – wzbogacony mikrobiologicznie	11.11 a	0.1 a	3.3 a
Obornik	11.11 a	0.1 a	3.3 a

Wyniki doświadczenia potwierdzają korzystny wpływ aplikacji bioproduktów wzbogaconych o pożyteczne mikroorganizmy glebowe na występowanie grzybów AGM oraz formowanie struktur grzybów mikoryzowych (wezykule, arbuskule, grzybnia i spory) w korzeniach badanych roślin marchwi odmiany Nipomo. Z obserwacji mikroskopowych wynika, iż po aplikacji inokulum bakteryjno-mikoryzowego, korzenie roślin marchwi były częściej zasiedlane przez arbuskularne grzyby mikoryzowe niż korzenie roślin kontrolnych (Tabela 1.).

Tabela 2. Wpływ nowo opracowanych bioproduktów na stopień frekwencji mikoryzowej (F%) oraz intensywności mikoryzowej (M%, m%) w korzeniach ogórka odmiany ADAM (Pole doświadczalne IO, 2016).

Traktowanie	F%	M%	m%
Kontrola	8.89 a	0.09 a	1.0 a
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>17.78 c</b>	<b>0.18 b</b>	<b>1.0 a</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	14.44 b	0.14 ab	1.0 a
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	13.33 ab	0.13 a	1.0 a
<b>Kwasy humusowe (5%) wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>17.78 c</b>	<b>0.18 b</b>	<b>1.0 a</b>
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	12.22 ab	0.12 a	1.0 a
Obornik	14.44 b	0.14 ab	1.0 a

Wyniki przeprowadzonych badań polowych wskazują na pozytywne działanie zastosowanych bioproduktów na stopień asocjacji mikoryzowej oraz formowanie struktur grzybów mikoryzowych w korzeniach roślin ogórka odmiany Adam. W porównaniu do kontroli, aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego oraz kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęły na zwiększenie stopnia frekwencji mikoryzowej w korzeniach ogórka odmiany Adam (Tabela 2).





### Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na natężenie fotosyntezy oraz maksymalną wydajność fotosystemu II roślin ogórka odmiany Adam.

Tabela 3. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na natężenie fotosyntezy oraz maksymalną wydajność fotosystemu II roślin ogórka odmiany ADAM (Pole Doświadczalne IO, sierpień 2016 r.).

Traktowanie	Natężenie fotosyntezy ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Maksymalna wydajność fotosystemu II (Fv/Fm)
Kontrola	10,51 b	0,702 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	14,45 f	0,705 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	13,24 e	0,718 ab
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	12,07 c	<b>0,837 c</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>16,47 g</b>	0,795 a-c
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	12,14 d	<b>0,827 c</b>
Obornik	10,27 a	0,820 bc

Największe natężenie fotosyntezy dla ogórka uzyskano po aplikacji kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie (Tabela 3). Najwyższe wartości maksymalnej wydajności fotosystemu II w liściach roślin ogórka odnotowano po zastosowaniu kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie łącznie z biowęgłem oraz po aplikacji biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie (Tabela 3).

### Ocena wzrostu wegetatywnego roślin

Tabela 4. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na cechy wzrostu części nadziemnej roślin marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	Świeża masa części nadziemnej [g]	Sucha masa części nadziemnej [g]	Pole powierzchni części nadziemnej [cm <sup>2</sup> ]
Kontrola	20,15 a	6,16 a-c	697,61 b
Inokulum bakteryjno-	16,73 a	5,68 a-c	573,36 b

<b>mikoryzowe</b>			
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	26,86 a	7,85 bc	749,87 bc
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	20,45 a	4,91 ab	630,53 b
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	27,18 a	8,31 c	934,43 c
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	23,20 a	7,53 bc	726,39 b
<b>Obornik</b>	15,60 a	3,46 a	384,97 a

W porównaniu do roślin kontrolnych, nie inokulowanych mikroorganizmami, zastosowanie kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie cech wzrostu nadziemnych części roślin marchwi (Tabela 4).

**Tabela 5. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na cechy wzrostu korzeni roślin marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).**

Traktowanie	Świeża masa korzeni [g]	Sucha masa korzeni [g]	Długość korzeni [cm]	Pole powierzchni korzeni [cm <sup>2</sup> ]	Średnica korzeni [mm]	Objętość korzeni [cm <sup>3</sup> ]	Liczba wierzchołków korzeni [szt.]
<b>Kontrola</b>	155,43 a	46,20 a	18,87 a	171,60 a	33,32 a	113,56 a	419 a
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	179,86 a	52,51 a	18,81 a	184,32 a	36,80 ab	122,84 ab	352 a
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	227,36 a	86,58 a	20,96 a	212,57 a	42,09 b	135,60 b	409 a
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	199,33 a	57,91 a	20,50 a	199,99 a	38,41 ab	131,58 ab	316 a
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	219,16 a	81,30 a	18,09 a	196,28 a	43,17 b	142,15 b	359 a
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	193,43 a	53,63 a	18,42 a	188,92 a	39,31 ab	128,07 ab	383 a
<b>Obornik</b>	196,20 a	43,55 a	18,02 a	185,17 a	41,79 b	134,89 b	406 a

Najwyższe wartości dla cech wzrostu korzeni roślin marchwi uzyskano po aplikacji bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie (Tabela 5).

**Tabela 6. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na plon handlowy i świeżą masę roślin marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).**

Traktowanie	Plon handlowy [szt./poletko]	Plon handlowy masa [g/poletko]	Plon niehandlowy [szt./poletko]	Plon niehandlowy masa [g/poletko]

<b>Kontrola</b>	37,0 a	8132,5 a	22,5 ab	5528,8 bc
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	87,0 c	13617,5 b	22,8 ab	4265,0 a-c
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	45,3 ab	9352,5 ab	30,3 b	6128,8 c
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	76,0 bc	12811,0 ab	11,5 a	2576,3 a
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	51,0 ab	10953,0 ab	22,8 ab	4955,0 a-c
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	73,3 bc	13282,5 b	18,0 ab	3610,0 ab
<b>Obornik</b>	64,3 a-c	11505,0 ab	20,8 ab	4335,0 a-c

W porównaniu do roślin kontrolnych, nie inokulowanych mikroorganizmami, zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego wpłynęło na istotne zwiększenie plonu handlowego marchwi, natomiast aplikacja Bioilsy wzbogaconej mikrobiologicznie wpłynęła na wzrost plonu niehandlowego (Tabela 6).



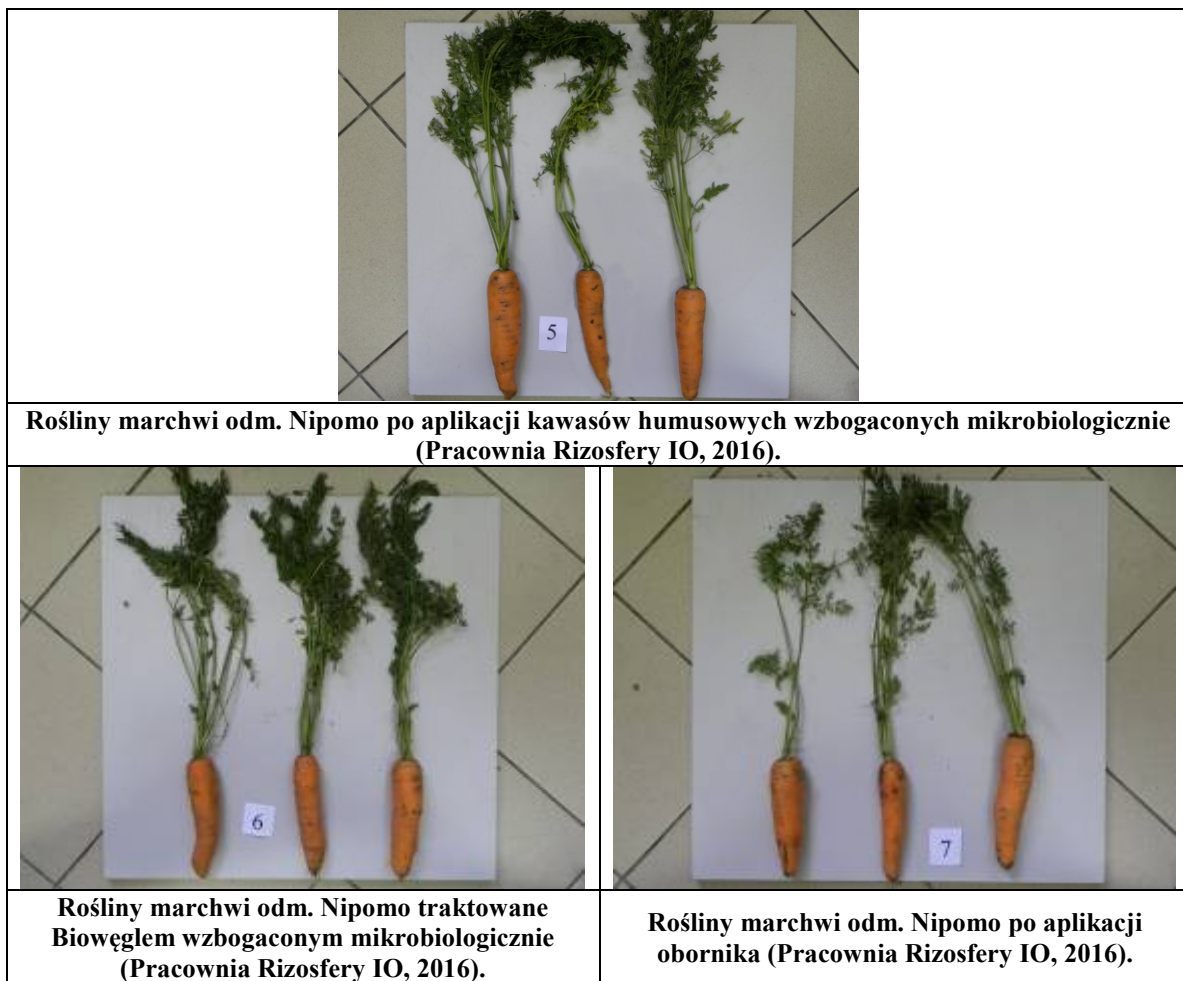


Tabela 7. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na liczbę oraz świeżą masę ogórka w poszczególnych klasach średnicy ogórka odmiany ADAM (Pole Doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	6-8 cm [szt.]	6-8 cm masa [g]	8-10 cm [szt.]	8-10 cm masa [g]	>10 [szt.]	>10 masa [g]
Kontrola	22,5 a	1219,50 ab	40,8 ab	2714,25 ab	39,0 ab	4111,50 a-c
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	21,3 a	878,00 a	39,8 ab	2487,25 ab	<b>45,3 b</b>	<b>5017,50 c</b>
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>44,8 b</b>	<b>1865,25 b</b>	<b>47,8 b</b>	<b>3193,75 b</b>	30,8 ab	3461,00 a-c
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	28,5 ab	1188,75 ab	31,8 ab	1965,75 ab	35,8 ab	3725,25 a-c
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	26,8 ab	1024,75 a	33,8 ab	2260,75 ab	40,8 ab	4346,25 bc
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	26,5 ab	1057,50 a	18,0 a	1129,50 a	29,5 ab	3086,50 ab
Obornik	26,5 ab	1032,50 a	26,5 ab	2406,75 ab	27,0 a	2448,25 a

Najwyższe wartości dla poszczególnych klas i świeżej masy ogórka uzyskano po aplikacji bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie, w porównaniu do pozostałych kombinacji nawożenia (Tabela 7 i 8).





Tabela 8. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na liczbę i świeżą masę w poszczególnych klasach oraz zieloną barwę liści roślin ogórka odmiany ADAM (Pole Doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	Przerośnięte [szt.]	Przerośnięte masa [g]	Zniekształcone [szt.]	Zniekształcone masa [g]	Zielona barwa liści
<b>Kontrola</b>	<b>23,5 d</b>	<b>3759,50 d</b>	21,3 a	<b>1213,50 a</b>	39,6 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	19,5 cd	3411,50 cd	18,5 a	859,00 a	<b>49,5 a</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	14,0 bc	2477,00 bc	18,3 a	1013,00 a	47,7 a
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	10,0 ab	1552,50 ab	18,3 a	960,00 a	46,5 a
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	14,5 bc	2476,00 bc	<b>22,0 a</b>	1112,25 a	37,7 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	10,0 ab	1555,00 ab	20,0 a	987,50 a	41,3 a
Obornik	7,0 a	1244,00 a	18,5 a	875,50 a	38,9 a

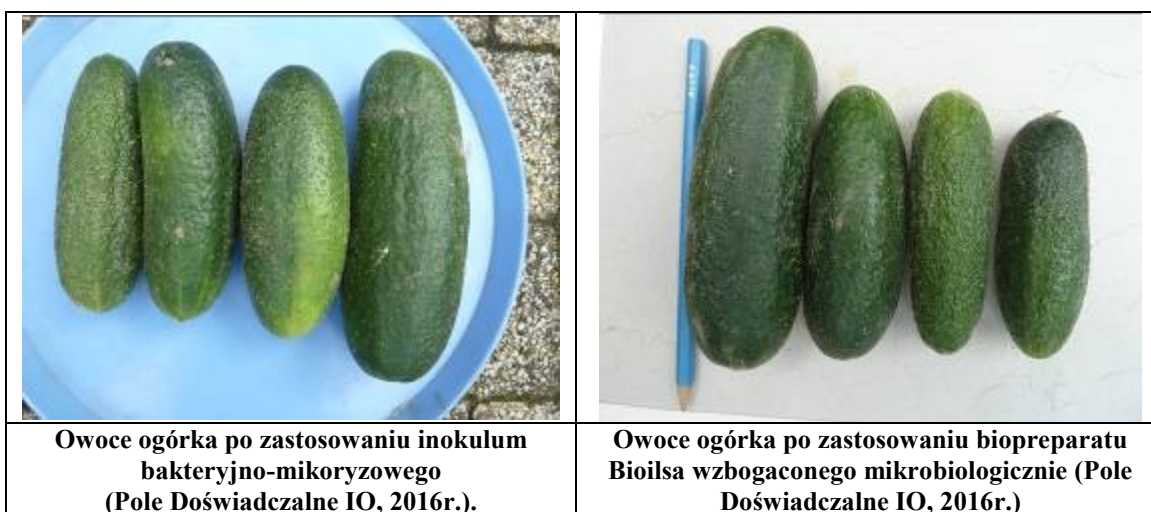
Aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego wpłynęła na zwiększenie zielonej barwy liści roślin ogórka (Tabela 8), w porównaniu do pozostałych kombinacji nawożenia roślin.

Tabela 9. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na masę plonu handlowego i niehandlowego roślin ogórka odmiany ADAM (Pole Doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	Masa plonu handlowego [g]	Masa plonu niehandlowego [g]	Masa plonu całkowitego [g]
<b>Kontrola</b>	8045,2 b	4973,0 d	13018,2 b
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>8382,4 bc</b>	4270,5 cd	12653,2 b
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>8520,0 bc</b>	3490,0 a-c	12010,0 ab

<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	<b>6879,7 ab</b>	<b>2512,5 ab</b>	<b>9392,2 ab</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>7631,5 ab</b>	<b>3588,2 bc</b>	<b>11220,0 ab</b>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>5273,5 a</b>	<b>2542,5 ab</b>	<b>7816,0 a</b>
<b>Obornik</b>	<b>5887,5 a</b>	<b>2119,5 a</b>	<b>8007,0 a</b>

Zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego oraz Bioilsy wzbogaconej mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie masy plonu handlowego ogórka odmiany Adam.



## PODSUMOWANIE



Wyniki doświadczenia potwierdzają korzystny wpływ większości aplikowanych bioproduktów wzbogaconych o pożyteczne mikroorganizmy glebowe na występowanie grzybów AGM oraz formowanie struktur grzybów mikoryzowych (wezykule, arbuskule, grzybnia i spory) w korzeniach badanych roślin marchwi odmiany Nipomo i ogórka odmiany Adam. Z obserwacji mikroskopowych wynika, iż po aplikacji inokulum bakteryjno-mikoryzowego, korzenie roślin marchwi oraz ogórka były częściej zasiedlane przez arbuskularne grzyby mikoryzowe niż korzenie roślin kontrolnych. W porównaniu do roślin kontrolnych, nie inokulowanych mikroorganizmami, zastosowanie kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie cech wzrostu nadziemnych części roślin marchwi. Najwyższe wartości dla cech wzrostu korzeni roślin marchwi uzyskano po aplikacji bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie. Zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego wpłynęło na zwiększenie zielonej barwy liści roślin ogórka, zwiększenie plonu handlowego marchwi. Najwyższe wartości dla poszczególnych klas i świeżej masy ogórka uzyskano po aplikacji bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie, w porównaniu do pozostałych kombinacji nawożenia.



### **Podzadanie 3. Oznaczenie Wskaźników Jakości Gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych, przed i po aplikacji bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie.**

#### **CEL**

Celem przeprowadzonych badań było określenie wskaźników jakości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych, przed i po aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych.

	
<b>Rośliny marchwi we wczesnej fazie wzrostu (Pole Doświadczalne IO, 2016r.).</b>	<b>Rośliny ogórka we wczesnej fazie wzrostu (Pole Doświadczalne IO, 2016r.).</b>

#### **MATERIAŁ I METODY**

##### **Ocena biochemicznych właściwości gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych**

Próbki gleby zostały pobierane z ekologicznych doświadczeń polowych przed i po zastosowaniu bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie (Pole Doświadczalne IO). Analizy gleby wykonano w Zakładzie Mikrobiologii IO oraz w Laboratorium Analiz Chemicznych IO.

##### **Określenie właściwości chemicznych gleb.**

###### ***Przygotowanie gleby do analiz***

Świeżą, dobrze wymieszaną próbkę gleby wysuszono do stanu powietrznie suchego w temperaturze nie przekraczającej 40<sup>0</sup> C. Powietrznie suchą glebę przesiewano przez sito o kwadratowych oczkach wielkości 1 mm. Przesianą próbkę gleby przeniesiono do tekturowego pudełka, zamknięto i oznaczono.

###### ***Oznaczanie pH gleby***

Odczyn gleby wynika ze stężenia (aktywności ) jonów wodorowych i wodorotlenowych w roztworze glebowym. Stężenie jonów wodorowych podawane jest najczęściej jako pH gleby, które mierzono w 1M chlorku potasu, metodą potencjometryczną. Odczyn gleby uwzględnia stężenie jonów wodorowych znajdujących się w roztworze glebowym a także jony wodoru słabo związane ze stałą frakcją gleby.

###### ***Oznaczanie przyswajalnych form fosforu, potasu, magnezu, mikroelementów***

W celu określenia przydatności gleby do uprawy różnych gatunków roślin sadowniczych oznaczono zawartość przyswajalnych formy fosforu, potasu i magnezu.

Do oznaczania przyswajalnych form fosforu i potasu w glebie mineralnej wykorzystano metodę Egnera-Riehma. Metoda polega na ekstrahowaniu z gleby związków fosforu i potasu roztworem mleczanu wapnia.

Do oznaczania przyswajalnych form magnezu w glebie mineralnej wykorzystano metodę

Schachtschabela. Metoda polega na ekstrahowaniu gleby z 0.025 M chlorkiem wapnia. Jon wapniowy wypiera z kompleksu sorpcyjnego jon magnezowy, który zostaje w ten sposób przeprowadzony do roztworu. Oznaczanie przyswajalnych form mikroelementów w glebie wykonano metodą ekstrakcji w roztworze 1M HCl.

### **Określenie właściwości chemicznych materiału roślinnego.**

#### ***Przygotowanie materiału roślinnego do oznaczeń***

Próbkę materiału roślinnego suszono do stanu powietrznie suchego w temperaturze nie przekraczającej 65°C. Wysuszoną próbkę zhomogenizowano używając młynka udarowego z sitem o średnicy oczek nie większej niż 1,0 mm. Rozdrobnioną masę roślinną przeniesiono do plastikowego opakowania, zamknięto i oznaczono.

#### ***Oznaczanie zawartości składników mineralnych w materiale roślinnym***

Oznaczanie zawartości składników mineralnych w materiale roślinnym metodami chemicznymi wymagało przeprowadzenia ich do roztworu. Dokonano tego w procesie mineralizacji (spalania). Spalanie substancji roślinnej na mokro polegało na całkowitym utlenieniu za pomocą ciekłych utleniaczy takich jak stężone kwasy siarkowy, azotowy i nadchlorowy używanych pojedynczo lub w różnych kombinacjach i proporcjach.

Do oznaczenia zawartości składników mineralnych w uzyskanych roztworach, zastosowano pomiary techniką atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES)

Zawartość azotu ogólnego zarówno w glebie jak i w materiale roślinnym oznaczono wg Dumas'a, metodą konduktometryczną z użyciem aparatu TruSpec CNS. Tę samą metodę wykorzystano do oznaczania zawartości węgla organicznego w glebie. Zawartość substancji organicznej została wyliczona na podstawie zawartości węgla ( $C_{org} \times 1.72$ ).

### **Ocena liczebności mikroorganizmów przed i po zastosowaniu bioproduktów.**

Wpływ nowo opracowanych konsorcjów mikroorganizmów badano przed- i po ich aplikacji przy użyciu metod mikrobiologicznych oraz klasycznych. Wykonano 2 serie analiz mikrobiologicznych gleby w następujących terminach:

1/ termin „0” – przed aplikacją biopreparatów 16.06.2016.

2/ termin I – po aplikacji bioproduktów 11.08.2016

Próby gleby pobierano z każdego poletka przy pomocy metalowej laski, z głębokości ok. 15-20 cm. Z gleby tej przygotowywano jedną próbę mieszaną. Jedynie w serii „0” przed wysiewem nasion wykonano analizę jednej próby zbiorczej z każdej kombinacji.

Próby korzeni ogórka lub zewnętrznych warstw korzeni marchwi wytrząsano przez 20 min na wstrząsarce, w 100 ml soli fizjologicznej w kolbach zawierających szklane kulki. Uzyskaną zawiesinę wysiewano na odpowiednie pożywki selektywne.

Określano liczebność populacji głównych grup mikroorganizmów glebowych, umożliwiające ocenę stanu żyzności analizowanych gleb. Liczebność mikroorganizmów w próbach glebowych oznaczano następującymi metodami:

1/ **ogólną liczbę bakterii i promieniowców** metodą posiewów na pożywce agarowej z ekstraktem glebowym (Dhingra and Sinclair, 1995);

2/ **liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas*** - na pożywce Goulda (Gould *et al.*, 1985);

3/ liczebność bakterii fluoryzujących z rodzaju *Pseudomonas* na pożywce Gould w świetle UV;

4/ **liczebność bakterii tworzących przetrwalniki** określono na pożywce sojowej (1/10 TSA), po uprzednim podgrzaniu zawiesiny przez 10 min. w 80°C (Dhingra and Sinclair, 1995);

5/ populację **grzybów** określano na pożywce Martina (Martin, 1950). Liczebność mikroorganizmów wyrażano w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w gramie suchej masy gleby.

**Liczebność wolno żyjących asymilatorów azotu z rodzaju *Azotobacter*** oceniano metodą

płytkową na bezazotowej pożywce agarowej. Określano liczbę kolonii bakterii rosnących wokół mikropróbek gleby o wadze ok. 0,5mg (200 mikropróbek na 1 próbę gleby).

**Liczebność bakterii koptotroficznych i oligotroficznych** (Hattori R., Hattori T. 1980; Swędrzyńska i Grześ, 2015).

Izolację, identyfikację taksonomiczną i selekcję pożytecznych szczepów arbuskularnych grzybów mikoryzowych (AGM) ze strefy korzeniowej roślin ogórka oraz marchwi wykonano wg zmodyfikowanej metody za Błaszowski (2008) oraz z zastosowaniem klucza Schüßlera i Walkera (2010). Oceniono również stopień asocjacji mikoryzowej w korzeniach badanych gatunków roślin warzywnych wg metody Trouvelot (1986), z zastosowaniem programu MYCOCALC: <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/MYCOCALC.EXE> i wykonano dokumentację fotograficzną zaobserwowanych struktur mikoryzowych.

## WYNIKI

### Skład mineralny gleby oraz materiału roślinnego.

Tabela 1. Analiza składu mineralnego gleby, na której rosły rośliny marchwi, przed aplikacją bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	PH KCL	P	K	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	N og.	C org.	Substancja organiczna
		mg/100 g gleby				mg/1000 g gleby				%			
Kontrola	6,1 a	22,4 ab	9,65 a-c	13,5 a	3,31 a	4,38 a	736 e	77,2 a	12,3 a	6,14 a	0,15 a	1,36 ab	2,3 ab
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe		21,0 a	9,08 a	14,0 a	3,21 a	3,96 a	751 g	75,0 a	12,7 a	7,63 a	0,15 a	1,31 a	2,2 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	6,4 b	22,7 ab	9,88 a-c	13,8 a	3,19 a	4,10 a	739 f	75,0 a	12,8 a	7,90 a	0,15 a	1,32 a	2,3 ab
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	6,3 b	23,4 b	9,34 a	14,1 a	3,18 a	4,19 a	731 d	52,3 a	12,8 a	7,75 a	0,15 a	1,33 a	2,3 ab
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6,4 b	24,2 bc	11,00 b-d	13,4 a	3,23 a	4,30 a	722 c	76,0 a	12,5 a	7,10 a	0,16 a	1,41 b	2,4 b
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	6,1 a	25,4 cd	11,20 cd	13,1 a	3,18 a	4,05 a	713 b	77,2 a	12,5 a	6,55 a	0,15 a	1,29 a	2,2 a
Obornik	6,1 a	26,1 d	12,10 d	12,8 a	3,19 a	4,02 a	694 a	76,4 a	12,5 a	7,68 a	0,15 a	1,36 ab	2,3 ab

Tabela 2. Analiza składu mineralnego gleby, na której rosły rośliny marchwi, przed aplikacją bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	Cd	Pb
	mg/kg			
Kontrola	1,78 a	1,00 a	0,18 c	11,8 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	2,30 e	1,00 a	0,17 bc	11,3 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	2,11 d	1,00 a	0,17 bc	10,7 a
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	2,50 f	1,00 a	0,21 d	12,4 a
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	1,87 b	1,00 a	0,16 ab	11,0 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	2,31 e	1,23 b	0,15 a	10,9 a
Obornik	2,09 c	1,80 c	0,17 bc	10,8 a

Tabela 3. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na pH, zawartość makro- i mikroelementów, azotu ogólnego, węgla oraz substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	pH KCL	P	K	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	N og.	C org.	Substancja organiczna
		mg/100 g gleby				mg/1000 g gleby						%	
Kontrola	6,3 b	26,5 bc	11,4 b	13,7 a	3,41 a	4,41 a	756 c	79,2 ab	13,1 ab	11,80 bc	0,14 a	1,32 b	2,3 ab
Inokulum bakteryjno- mikoryzowe	6,3 b	25,4 b	9,73 ab	14,1 ab	3,09 a	4,46 a	783 f	76,2 a	13,0 ab	10,20 ab	0,14 a	1,31 b	2,2 a
Bioiła wzbogacone mikrobiologicznie	6,3 b	25,6 b	11,0 b	13,7 a	3,15 a	4,75 a	775 e	80,4 ab	13,5 ab	11,50 a-c	0,15 ab	1,38 c	2,4 bc
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	<b>6,6 c</b>	<b>27,8 c</b>	<b>22,9 c</b>	<b>15,0 ab</b>	<b>3,61 a</b>	4,63 a	774 e	<b>84,3 b</b>	<b>14,3 b</b>	11,40 a-c	<b>0,16 b</b>	1,61 e	<b>2,8 d</b>
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6,1 a	23,1 a	9,04 a	13,4 a	3,10 a	4,77 a	765 d	78,7 ab	12,8 ab	9,86 a	0,15 ab	1,29 a	2,2 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	<b>6,5 c</b>	21,5 a	8,21 a	13,8 a	3,42 a	4,59 a	724 a	80,3 ab	12,4 ab	<b>14,00 d</b>	<b>0,16 b</b>	<b>1,87 f</b>	3,2 e
Obornik	<b>6,6 c</b>	21,3 a	11,0 b	<b>15,8 b</b>	3,52 a	<b>4,91 a</b>	737 b	<b>84,5 b</b>	12,3 a	12,90 cd	<b>0,16 b</b>	1,46 d	2,5 c

Aplikacja kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie w połączeniu z biowęgłem wpłynęła na zwiększenie pH gleby, zawartości makro- i mikroelementów oraz zawartości substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny marchwi odmiany NIPOMO.

Tabela 4. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na zawartość N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub> oraz metali ciężkich, w glebie na której rosły rośliny marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	Cd	Pb
	mg/kg			
Kontrola	1,51 e	2,61 bc	0,15 a	10,8 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	1,11 b	2,06 ab	0,16 ab	10,8 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	1,07 a	2,77 c	0,16 ab	11,2 a
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	<b>1,72 g</b>	<b>6,79 d</b>	0,16 ab	11,3 a
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	1,19 c	2,00 ab	<b>0,17 b</b>	<b>11,4 a</b>
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	1,41 d	1,70 a	0,16 ab	11,1 a
Obornik	1,55 f	1,65 a	0,16 ab	11,1 a

Zastosowanie kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie łącznie z biowęgłem wpłynęło na zwiększenie zawartości N-NO<sub>3</sub> oraz N-NH<sub>4</sub> w glebie, na której rosły rośliny marchwi odmiany NIPOMO.



Tabela 5. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na zawartość makro- i mikroelementów, powietrznie suchą masę i suchą masę korzeni roślin marchwi odmiany NIPOMO (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N	P	K	Mg	Ca	Powietrznie sucha masa	Sucha masa	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	% suchej masy					%		mg/kg suchej masy				
Kontrola	1,27 b	0,34 bc	2,27 a	0,09 a	0,25 b	13,7 ab	96,2 a	13,9 a	3,28 a	59,7 b	5,18 ab	13,2 ab
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	1,45 f	0,35 c	2,17 a	0,09 a	0,30 d	12,9 ab	94,9 a	15,8 b	4,23 ab	81,7 e	5,79 ab	15,5 c
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>1,54 g</b>	<b>0,46 d</b>	2,07 a	<b>0,11 b</b>	<b>0,30 d</b>	12,2 ab	94,7 a	<b>18,2 c</b>	<b>5,29 b</b>	<b>71,7 d</b>	<b>7,06 b</b>	<b>18,0 d</b>
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	1,29 c	0,30 a	1,84 a	0,09 a	0,24 b	12,3 ab	94,6 a	13,5 a	3,26 a	53,8 a	4,63 a	12,4 a
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	1,32 d	0,30 a	1,91 a	0,09 a	0,22 a	<b>13,8 b</b>	95,5 a	14,3 ab	3,70 ab	72,1 d	5,62 ab	12,7 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	1,37 e	0,33 b	1,92 a	0,09 a	0,28 c	12,5 ab	95,0 a	14,5 ab	3,72 ab	62,2 c	5,45 ab	13,7 a-c
Obornik	1,22 a	0,34 bc	2,16 a	<b>0,11 b</b>	<b>0,30 d</b>	11,8 a	95,4 a	16,1 b	3,85 ab	<b>81,4 e</b>	6,57 ab	14,6 bc

W porównaniu do kontroli, zastosowanie bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęło na zwiększenie zawartości makroelementów i mikroelementów w korzeniach marchwi. Największą powietrznie suchą masę korzeni marchwi odnotowano po aplikacji kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie.

Tabela 6. Analiza składu mineralnego gleby, na której rosły rośliny ogórka, przed aplikacją bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	PH KCL	P	K	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	N og.	C org.	Substancja organiczna
		mg/100 g gleby				mg/1000 g gleby						%	
Kontrola	6,9 a	19,5 bc	13,3 b	14,1 a	3,58 a	7,33 ab	640 b	80,1 a	14,9 b	9,77 b	0,15 a	1,30 c	2,2 ab
Inokulum bakteryjno- mikoryzowe	7,0 a	17,7 ab	10,1 a	14,5 a	3,45 a	8,55 b	631 a	80,0 a	11,8 a	8,98 ab	0,14 a	1,24 b	2,1 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	6,4 a	17,4 a	9,9 a	13,1 a	3,41 a	5,91 a	692 e	79,8 a	11,2 a	7,34 a	0,14 a	1,29 c	2,2 ab
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	6,8 a	18,2 ab	9,41 a	13,9 a	3,28 a	5,99 a	661 d	77,1 a	11,0 a	9,73 b	0,14 a	1,21 a	2,1 a
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6,9 a	22,4 d	13,5 b	15,0 a	3,57 a	7,96 b	650 c	82,2 a	16,5 b	8,90 ab	0,15 a	1,33 d	2,3 b
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	6,8 a	20,6 c	10,2 a	14,4 a	3,38 a	5,61 a	650 c	77,9 a	11,4 a	10,20 b	0,15 a	1,24 b	2,1 a
Obornik	6,7 a	18,7 ab	10,5 a	13,5 a	3,50 a	6,00 a	711 f	85,4 a	11,3 a	8,68 ab	0,15 a	1,25 b	2,2 ab

Tabela 7. Analiza składu mineralnego gleby, na której rosły rośliny ogórka, przed aplikacją bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	Cd	Pb
	mg/kg			
Kontrola	5,50 c	2,59 c	0,15 a	10,8 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	3,34 ab	1,75 ab	0,15 a	10,2 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	2,53 a	1,62 a	0,16 ab	11,5 a
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	2,98 ab	1,77 ab	0,16 ab	10,8 a
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	5,38 c	3,70 d	0,17 bc	10,9 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	10,20 d	2,39 bc	0,16 ab	11,2 a
Obornik	4,50 bc	1,79 ab	0,18 c	11,5 a

Tabela 8. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na pH, zawartość makro- i mikroelementów, azotu ogólnego, węgla organicznego i substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny ogórka odmiany ADAM (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	PH KCL	P	K	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	N og.	C org.	Substancja organiczna
		mg/100 g gleby				mg/1000 g gleby						%	
Kontrola	6,4 a	22,8 c	10,3 a	13,2 ab	3,46 a	6,95 a-c	733 g	84,9 a	11,9 b	11,1 ab	0,15 ab	1,30 a	2,2 a
Inokulum bakteryjno- mikoryzowe	7,1 ab	23,4 c	12,4 b	14,9 bc	3,61 a	7,73 c	717 c	86,3 a	11,6 ab	9,86 a	0,15 ab	1,32 a	2,3 ab
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	7,2 b	21,6 bc	14,3 c	14,1 b	3,75 a	6,59 a-c	729 e	91,5 bc	11,4 ab	12,6 bc	0,15 ab	1,40 b	2,4 b
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	7,3 b	26,3 d	24,8 d	16,1 c	4,14 a	5,93 a-c	685 a	92,6 cd	11,5 ab	12,6 bc	0,17 c	1,58 c	2,7 c
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6,9 ab	20,2 ab	11,3 ab	12,1 a	4,08 a	5,12 a	710 b	89,8 b	10,1 ab	9,31 a	0,15 ab	1,26 a	2,2 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	7,1 ab	18,8 a	13,0 bc	12,0 a	3,87 a	5,31 ab	722 d	93,4 d	9,88 a	10,5 a	0,14 a	1,55 c	2,7 c
Obornik	7,0 ab	19,1 a	25,0 d	14,9 bc	4,10 a	7,15 bc	731 f	99,1 e	9,75 a	14,4 d	0,16 bc	1,42 b	2,4 b

Łączna aplikacja kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie z biowęgłem w największym stopniu wpłynęła na zwiększenie zawartości makroelementów, boru, azotu ogólnego, węgla organicznego i substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny ogórka odmiany ADAM.

Tabela 9. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na zawartość N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub> oraz metale ciężkie w glebie, na której rosły rośliny ogórka odmiany ADAM (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	Cd	Pb
	mg/kg			
Kontrola	1,19 a	1,26 a	0,17 bc	11,3 a
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>2,80 d</b>	2,21 b	0,18 c	11,3 a
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	2,51 cd	2,31 b	0,16 b	10,80 a
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel</b>	2,27 b-d	<b>5,73 d</b>	0,16 b	10,20 a
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	1,65 ab	1,00 a	0,16 b	10,20 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	2,40 cd	1,02 a	0,14 a	9,81 a
Obornik	1,94 bc	4,73 c	0,13 a	9,45 a

Aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego wpłynęła na zwiększenie N-NO<sub>3</sub> a kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie z biowęgłem na zwiększenie N-NH<sub>4</sub> w glebie, na której rosły rośliny ogórka odmiany ADAM.

Tabela 10. Wpływ bioproduktów wzbogaconych mikrobiologicznie na zawartość makro- i mikroelementów oraz powietrznie suchej masy w owocach ogórka odmiany ADAM (Pole doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	N	P	K	Mg	Ca	Powietrznie sucha masa	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	% suchej masy					%	mg/kg suchej masy				
Kontrola	4,2 a	7,8 b	39,3 a	0,15 c	0,49 d	2,5 b	36,2 b	10,9 ab	102 e	18,4 a	59,3 b
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	5,2 a	8,4 c	42,2 bc	0,11 a	0,53 e	3,6 e	42,1 d	14,5 d	115 g	20,3 b	71,4 d
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	5,5 a	9,8 d	48,4 d	0,19 d	0,62 f	4,6 f	39,7 c	12,2 bc	110 f	24,9 d	80,8 f
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	4,1 a	10,5 e	41,2 a-c	0,13 b	0,50 d	2,4 b	58,5 f	16,7 e	99 d	20,2 b	69,5 c
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6,9 a	7,6 b	43,2 c	0,13 b	0,45 c	1,6 a	34,3 a	12,7 c	88 b	28,4 e	57,5 a
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	4,1 a	6,6 a	40,6 ab	0,16 c	0,39 a	2,8 c	35,5 ab	10,4 a	84 a	21,8 c	69,2 c
Obornik	4,4 a	8,8 c	46,6 d	0,12 ab	0,43 b	3,2 d	48,9 e	13,7 cd	92 c	31,3 f	74,3 e

W porównaniu do kontroli, aplikacja bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęła na zwiększenie zawartości makroelementów oraz powietrznie suchej masy w owocach ogórka. W porównaniu do kontroli, zastosowanie kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie z biowęglem, inokulum bakteryjno-mikoryzowego oraz obornika i Bioilsy wpłynęło na istotne zwiększenie mikroelementów w owocach ogórka.

**Ocena liczebności populacji pożytecznych mikroorganizmów przed i po zastosowaniu bioproduktów.** Liczebność wybranych grup mikroorganizmów oznaczono w glebie, z poletek przed wysiewem nasion, na których rosły rośliny marchwi i ogórka oraz po aplikacji bioproduktów.

**Tabela 11. Liczebność bakterii (ogólna), promieniowców, bakterii przetrwalnikujących w glebie z poletek przed wysiewem nasion marchwi i po aplikacji bioproduktów.**

Traktowanie	Przed wysiewem nasion			Po aplikacji bioproduktów		
	Bakterie * X 10 <sup>6</sup>	Promieniowce X 10 <sup>6</sup>	Przetrwalnik. X 10 <sup>5</sup>	Bakterie * X 10 <sup>6</sup>	Promieniowce X 10 <sup>6</sup>	Przetrwalnik. X 10 <sup>5</sup>
<b>Liczebność w jtk/g suchej masy gleby</b>						
<b>Kontrola (bez nawożenia)</b>	<b>33,0</b>	<b>10,8</b>	<b>67,7</b>	<b>53,3</b>	<b>8,9</b>	<b>81,7</b>
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>39,2</b>	<b>6,4</b>	<b>58,0</b>	<b>41,2</b>	<b>8,8</b>	<b>69,5</b>
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>95,5</b>	<b>5,4</b>	<b>39,7</b>	<b>49,9</b>	<b>9,6</b>	<b>84,8</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>31,2</b>	<b>2,1</b>	<b>57,8</b>	<b>27,0</b>	<b>5,6</b>	<b>63,0</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>33,7</b>	<b>6,1</b>	<b>58,5</b>	<b>18,0</b>	<b>5,0</b>	<b>62,1</b>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>113,8</b>	<b>7,9</b>	<b>48,6</b>	<b>16,0</b>	<b>2,7</b>	<b>40,7</b>
<b>Obornik</b>	<b>54,2</b>	<b>4,4</b>	<b>55,6</b>	<b>35,4</b>	<b>7,8</b>	<b>69,7</b>

\*ogólna liczebność bakterii.

Wszystkie zastosowane biopreparaty, z wyjątkiem biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie, wpłynęły na zwiększenie liczebności bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe po ich aplikacji w uprawie roślin marchwi odmiany Nipomo. Aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego, Bioilsy i kompostu wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęła na zwiększenie populacji promieniowców w glebie. Inokulum bakteryjno-mikoryzowe wpłynęło korzystnie na ogólną liczebność bakterii w glebie.

**Tabela 12. Liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* z poletek przed wysiewem nasion marchwi oraz po aplikacji bioproduktów.**

Traktowanie	Przed wysiewem nasion		Po aplikacji bioproduktów	
	<i>Pseudomonas</i> X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseud.</i> fluoryzujące X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseudomonas</i> X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseud.</i> fluoryzujące X 10 <sup>4</sup>
<b>Liczebność w jtk/g suchej masy gleby</b>				
<b>Kontrola (bez nawożenia)</b>	<b>22,6</b>	<b>5,1</b>	<b>4,4</b>	<b>1,1</b>
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>22,1</b>	<b>3,5</b>	<b>9,7</b>	<b>4,7</b>
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>138,7</b>	<b>84,4</b>	<b>11,1</b>	<b>2,8</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>21,6</b>	<b>2,1</b>	<b>5,7</b>	<b>1,6</b>
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>78,3</b>	<b>3,2</b>	<b>5,2</b>	<b>1,3</b>
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>106,2</b>	<b>51,4</b>	<b>9,5</b>	<b>1,4</b>
<b>Obornik</b>	<b>42,5</b>	<b>6,5</b>	<b>32,7</b>	<b>3,9</b>



Tabela 13. Liczebność grzybów w glebie z poletek przed wysiewem nasion marchwi i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion		Po aplikacji bioproduktów	
	Grzyby * X 10 <sup>4</sup>	Drożdżaki X 10 <sup>4</sup>	Grzyby * X 10 <sup>4</sup>	Drożdżaki X 10 <sup>4</sup>
	Liczebność w jtk/g suchej masy gleby			
Kontrola (bez nawożenia)	48,4	12,9	21,1	**
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	30,7	9,9	16,8	11,3/**
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	45,8	20,4	28,6	1,7
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	25,2	2,5	22,1	9,1
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>19,1</b>	<b>3,2</b>	<b>22,7</b>	<b>4,1</b>
Biówęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	64,9	23,9	33,8	20,9
Obornik	46,1	17,5	33,9	15,6

\*Wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki); \*\*pojedyncze kolonie na szalkach.

Aplikacja kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie zwiększyła liczebność grzybów i drożdżaków w glebie pobranej z poletek doświadczalnych roślin marchwi odmiany Nipomo.

Tabela 14. Liczebność kopiotrofów i oligotrofów w glebie z poletek przed wysiewem nasion marchwi i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion			Po aplikacji bioproduktów		
	kopiotrofy jtk x 10 <sup>8</sup>	oligotrofy Jtk x 10 <sup>8</sup>	o/k	kopiotrofy jtk x 10 <sup>8</sup>	oligotrofy Jtk x 10 <sup>8</sup>	o/k
	Liczebność w jtk/g suchej masy gleby					
Kontrola (bez nawożenia)	34,4	102,8	2,99	23,6	10,3	0,44
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>20,6</b>	<b>72,8</b>	<b>1,18</b>	<b>29,2</b>	<b>4,5</b>	<b>0,16</b>
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	28,2	41,4	1,47	24,9	3,1	0,13
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	20,2	47,5	2,35	29,6	4,4	0,15
<b>Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie</b>	<b>19,4</b>	<b>55,3</b>	<b>2,85</b>	<b>21,5</b>	<b>10,1</b>	<b>0,47</b>
<b>Biówęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>22,1</b>	<b>25,7</b>	<b>1,16</b>	<b>33,6</b>	<b>5,8</b>	<b>0,17</b>
Obornik	46,1	24,0	0,52	30,6	6,4	0,21

Zastosowanie w doświadczeniu polowym inokulum bakteryjno-mikoryzowego, kwasów humusowych oraz biowęgla wzbogaconych mikrobiologicznie zwiększyło liczebność kopiotrofów w glebie, w której rosły rośliny marchwi odmiany Nipomo.

Tabela 15. Liczebność ogólnej ilości bakterii, promieniowców i bakterii przetrwalnikujących glebie z poletek przed wysiewem nasion ogórka i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion			Po aplikacji bioproduktów		
	Bakterie * X 10 <sup>6</sup>	Promieniowce X 10 <sup>6</sup>	Przetrwalnik. X 10 <sup>5</sup>	Bakterie * X 10 <sup>6</sup>	Promieniowce X 10 <sup>6</sup>	Przetrwalnik. X 10 <sup>5</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby						
Kontrola (bez nawożenia)	31,9	4,7	36,2	35,1	8,0	47,1
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	72,0	13,7	73,4	23,5	13,7	57,6
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	32,8	4,0	41,3	28,4	11,4	56,8
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	50,7	9,0	43,4	24,7	11,6	61,1
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	47,5	5,7	57,5	24,7	8,2	35,4
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	76,8	10,0	70,0	23,7	10,0	56,7
<b>Obornik</b>	41,7	6,1	43,8	17,1	7,0	53,1

\*ogólna liczebność bakterii.

Aplikacja kompostu i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęła korzystnie na zwiększenie liczebności promieniowców oraz bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe w glebie pobranej z poletek doświadczalnych, na których rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

Tabela 16. Liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie z poletek przed wysiewem nasion ogórka i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion		Po aplikacji bioproduktów	
	<i>Pseudomonas</i> X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseud. fluoryzujące</i> X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseudomonas</i> X 10 <sup>4</sup>	<i>Pseud. fluoryzujące</i> X 10 <sup>4</sup>
Liczebność w jtk/g suchej masy gleby				
Kontrola (bez nawożenia)	61,2	4,7	27,9	5,0
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	41,8	3,6	20,3	2,9
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	43,0	5,3	32,5	4,7
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	48,5	4,7	18,8	1,9
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	69,0	8,3	24,1	3,2
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	32,0	6,5	11,7	1,6
<b>Obornik</b>	29,8	6,5	76,9	3,9

Aplikacja obornika wpłynęła na zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie rizosferowej roślin ogórka odmiany Adam.

Tabela 17. Liczebność grzybów w glebie z poletek przed wysiewem nasion ogórka i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion		Po aplikacji bioproduktów	
	Grzyby * X 10 <sup>4</sup>	Drożdżaki X 10 <sup>4</sup>	Grzyby * X 10 <sup>5</sup>	Drożdżaki X 10 <sup>4</sup>
	Liczebność w jtk/g suchej masy gleby			
Kontrola (bez nawożenia)	85,9	69,6	4,8	**
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	46,4	18,4	5,5	**
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	30,2	5,7	5,2	**
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	45,9	9,0	5,4	**
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	33,1	7,2	7,5	**
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	97,0	73,0	3,7	**
Obornik	29,8	4,0	3,3	**

\*Wszystkie grzyby (strzępkowe i drożdżaki); \*\*pojedyncze kolonie na szalkach.

Aplikacja Bioilsy, kompostu i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie oraz obornika wpłynęła na istotne zmniejszenie populacji grzybów w glebie pobranej z poletek doświadczalnych, na których rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

Tabela 18. Liczebność koptotrofów i oligotrofów w glebie z poletek przed wysiewem nasion ogórka i po aplikacji bioproduktów.

Traktowanie	Przed wysiewem nasion			Po aplikacji bioproduktów		
	koptotrofy jtk x 10 <sup>8</sup>	oligotrofy Jtk x 10 <sup>8</sup>	o/k	koptotrofy jtk x 10 <sup>8</sup>	oligotrofy Jtk x 10 <sup>8</sup>	o/k
	Liczebność w jtk/g suchej masy gleby					
Kontrola (bez nawożenia)	30,1	35,4	1,18	48,4	5,3	0,11
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	60,8	24,4	0,40	57,1	2,9	0,05
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	79,3	18,5	0,23	62,1	2,5	0,04
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie	31,5	38,0	1,21	52,6	4,9	0,09
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	37,0	40,2	1,09	91,0	9,0	0,10
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	12,9	42,4	3,27	45,1	3,3	0,74
Obornik	24,4	35,5	1,46	38,9	4,2	0,11

Zastosowanie kompostu, kwasów humusowych i biowęgla wzbogaconych mikrobiologicznie oraz obornika wpłynęło na zwiększenie liczebności koptotrofów w glebie, w której rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

Tabela 19. Liczebność wolno żyjących asymilatorów azotu z rodz. *Azotobacter* w glebie z poletek przed wysiewem nasion ogórka i marchwi oraz po aplikacji biopreparatów.

Traktowanie	<i>Azotobacter</i> * – przed siewem nasion		<i>Azotobacter</i> * - po aplikacji bioproduktów	
	Ogórek	Marchew	Ogórek	Marchew
Kontrola (bez nawożenia)	7,7	8,7	8,7	7,5
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	8,7	7,3	7,4	6,4
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	12,6	<b>6,8</b>	8,4	<b>7,1</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie</b>	12,3	<b>3,7</b>	4,3	<b>8,1</b>
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	9,7	12,5	4,2	7,4
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	9,3	9,2	5,7	6,2
<b>Obornik</b>	11,1	<b>7,3</b>	10,5	<b>9,6</b>

\* liczba kolonii *Azotobacter* rosnących wokół 20 mikropróbek gleby umieszczonych na I szalce Petriego. Wynik jest średnią z 10 szalek Petriego.

Aplikacja Bioilsy i kompostu wzbogaconych mikrobiologicznie oraz obornika wpłynęła na zwiększenie liczebności wolno żyjących asymilatów z rodzaju *Azotobacter* w glebie pobranej z poletek doświadczalnych, na których rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

Tabela 20. Liczba zarodników AGM w 100 g gleby w ryzosferze marchwi odmiany NIPOMO (Pole Doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	Liczba zarodników w 100g gleby
Kontrola	5 ab
<b>Inokulum bakteryjno-mikoryzowe</b>	<b>8 cd</b>
<b>Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie</b>	<b>9 de</b>
<b>Kompost wzbogacony mikrobiologicznie +Biowęgiel</b>	<b>7 c</b>
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	6 b
<b>Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie</b>	<b>10 e</b>
<b>Obornik</b>	<b>8 cd</b>

W doświadczeniach polowych wykazano korzystne działanie bioproduktów mikrobiologicznych na formowanie większej liczby zarodników grzybów mikoryzowych w ryzosferze roślin marchwi, w porównaniu do kontroli. Aplikacja biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęła na uformowanie największej liczby zarodników arbuskularnych grzybów mikoryzowych w ryzosferze roślin marchwi, w porównaniu do liczby zarodników w ryzosferze roślin kontrolnych (Tabela 20).

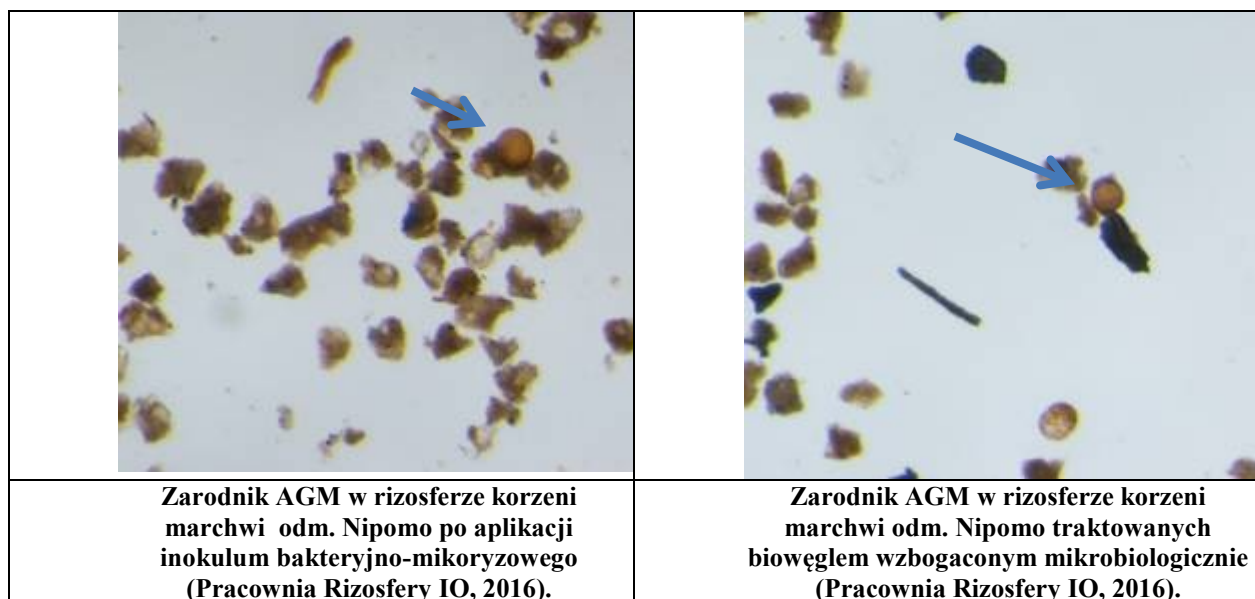


Tabela. 21. Liczba zarodników AGM w 100 g gleby w ryzosferze ogórka odmiany ADAM (Pole Doświadczalne IO, 2016 r.).

Traktowanie	Liczba zarodników w 100 g gleby
Kontrola	2 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	9 cd
Bioiła wzbogacona mikrobiologicznie	8 c
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + Biowęgiel	6 b
Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie	9 cd
Biowęgiel wzbogacony mikrobiologicznie	14 e
Obornik	10 d

Wyniki przeprowadzonych badań polowych wskazują na pozytywne działanie zastosowanych bioproduktów na formowanie zarodników grzybów mikoryzowych w ryzosferze roślin ogórka. Aplikacja biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie wpłynęła na formowanie największej liczby zarodników w ryzosferze ogórka, w porównaniu do ryzosfery roślin kontrolnych (Tabela 21).

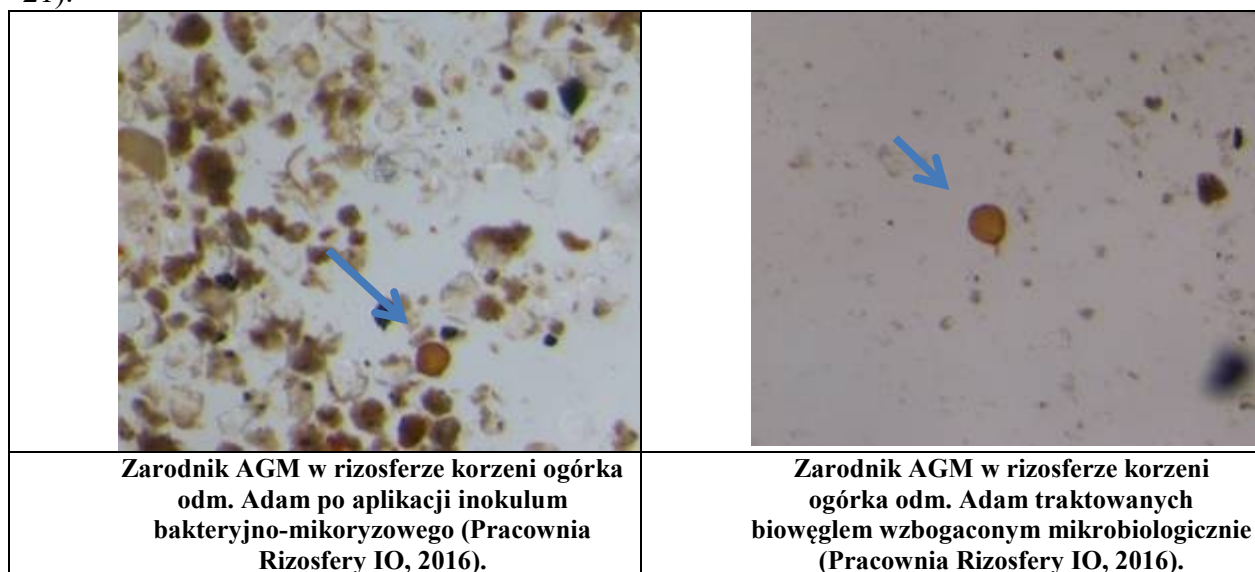


Tabela 22. Wpływ nowo opracowanych bioproduktów na stopień frekwencji mikoryzowej (F%) oraz intensywności mikoryzowej (M%) w korzeniach marchwi odmiany NIPOMO i ogórka odmiany ADAM przed i po aplikacji bioproduktów (Pole Doświadczalne IO, 2016).

Kombinacja	Marchew				Ogórek			
	Przed aplikacją bioproduktów		Po aplikacji bioproduktów		Przed aplikacją bioproduktów		Po aplikacji bioproduktów	
	F%	M%	F%	M%	F%	M%	F%	M%
Kontrola	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	8.89 a	0.09 a
Inokulum bakteryjno-mikoryzowe	11.11 a	0.01 a	12.22 ab	0.02 a	6.67 a	0.07 a	17.78 c	0.18 b
Bioilsa wzbogacona mikrobiologicznie	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	14.44 b	0.14 ab
Kompost wzbogacony mikrobiologicznie + 10% Biowęgiel	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	13.33 ab	0.13 a
Kwasy humusowe (5%) wzbogacone mikrobiologicznie	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	17.78 c	0.18 b
Biowęgiel – wzbogacony mikrobiologicznie	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	12.22 ab	0.12 a
Obornik	11.11 a	0.01 a	11.11 a	0.01 a	6.67 a	0.07 a	14.44 b	0.14 ab

Wyniki przeprowadzonych badań polowych wskazują na korzystne działanie zastosowanych biopreparatów na stopień asocjacji mikoryzowej w korzeniach roślin ogórka odmiany Adam. W porównaniu do korzeni roślin pobranych przed aplikacją bioproduktów, zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie stopnia frekwencji mikoryzowej w korzeniach ogórka odmiany Adam oraz stymulację formowania mikoryz pod wpływem zastosowanego inokulum bakteryjno-mikoryzowego w korzeniach roślin marchwi odmiany Nipomo (Tabela 22).

## PODSUMOWANIE

Wszystkie zastosowane biopreparaty, z wyjątkiem biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie, wpłynęły na zwiększenie liczebności bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe po ich aplikacji w uprawie roślin marchwi odmiany Nipomo. Aplikacja inokulum bakteryjno-mikoryzowego, Bioilsy i kompostu wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęła na zwiększenie populacji promieniowców w glebie. Inokulum bakteryjno-mikoryzowe wpłynęło korzystnie na ogólną liczebność bakterii oraz kopiotrofów w glebie, w której rosły rośliny marchwi odmiany Nipomo. Zastosowanie kompostu, kwasów humusowych oraz biowęgla wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na zwiększenie liczebności promieniowców, bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe oraz liczebności kopiotrofów w glebie, w której rosły rośliny ogórka odmiany Adam. Aplikacja Bioilsy i kompostu wzbogaconych mikrobiologicznie oraz obornika zwiększyła liczebność wolno żyjących asymilatów z rodzaju *Azotobacter* w glebie pobranej z poletek doświadczalnych, na których rosły rośliny ogórka odmiany Adam.

W doświadczeniach polowych wykazano korzystne działanie konsorcjów mikrobiologicznych oraz bioproduktów mikrobiologicznych na występowanie zarodników grzybów mikoryzowych w rizosferze roślin marchwi. Aplikacja biowęgla wzbogaconego mikrobiologicznie wpłynęła na formowanie największej liczby zarodników arbuskularnych grzybów mikoryzowych w rizosferze roślin marchwi i ogórka, w porównaniu do roślin kontrolnych. W porównaniu do korzeni roślin pobranych przed aplikacją bioproduktów, zastosowanie inokulum-bakteryjno-mikoryzowego i kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie wpłynęło na



zwiększenie stopnia frekwencji mikoryzowej w korzeniach ogórka. Zastosowanie inokulum bakteryjno-mikoryzowego stymulowało także formowanie mikoryz w korzeniach roślin marchwi odmiany Nipomo. Aplikacja kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie w połączeniu z biowęgłem wpłynęła na zwiększenie pH gleby, zawartości makro- i mikroelementów, substancji organicznej oraz zawartości N-NO<sub>3</sub> i N-NH<sub>4</sub> w glebie, na której rosły rośliny marchwi odmiany NIPOMO. W porównaniu do kontroli, zastosowanie bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęło na zwiększenie zawartości makroelementów i mikroelementów w korzeniach marchwi. Największą powietrznie suchą masę korzeni marchwi odnotowano po aplikacji kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie. Łączna aplikacja kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie z biowęgłem w największym stopniu wpłynęła na zwiększenie zawartości makroelementów, boru, azotu ogólnego, węgla organicznego i substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny ogórka odmiany ADAM. W porównaniu do kontroli, aplikacja bionawozu Bioilsa wzbogaconego mikrobiologicznie w największym stopniu wpłynęła na zwiększenie powietrznie suchej masy i makroelementów w owocach ogórka a zastosowanie kompostu wzbogaconego mikrobiologicznie z biowęgłem, inokulum bakteryjno – mikoryzowego oraz obornika i Bioilsy wpłynęło na istotne zwiększenie mikroelementów w owocach ogórka.

#### **Podzadanie 4. Opracowanie wyników oraz opracowanie zaleceń nawozowych.**

##### **CEL**

Celem podzadania było opracowanie nowych bioproduktów oraz technologii ich aplikacji, w celu poprawy żyzności gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych. Nowoopracowane bioprodukty mikrobiologiczne będą wdrożone do praktyki ogrodniczej, co przyczyni się do rozwoju ekologicznej produkcji warzyw i innych roślin ogrodniczych.



Wygląd owoców ogórka w końcowym okresie wegetacji, po zastosowaniu inokulum bakteryjno-mikoryzowego (Pole Doświadczalne IO, 2016r.).

## **METODYKA BADAŃ**

Projekt obejmuje działania nad rozwojem nowych metod aplikacji opracowywanych bioproduktów. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na określenie optymalnych dawek nawożenia bioproduktami, w stosunku do wymagań pokarmowych badanych gatunków i odmian roślin warzywnych rosnących w uprawach ekologicznych oraz terminy i częstotliwość ich stosowania. Opracowano również technologię ich aplikacji, w celu poprawy żyzności gleb w ekologicznych uprawach roślin warzywnych.

## **WYNIKI**

**Opracowano następujące zalecenia dla nowoopracowanych bioproduktów:**

### **INOKULUM BAKTERYJNO-MIKORYZOWE**

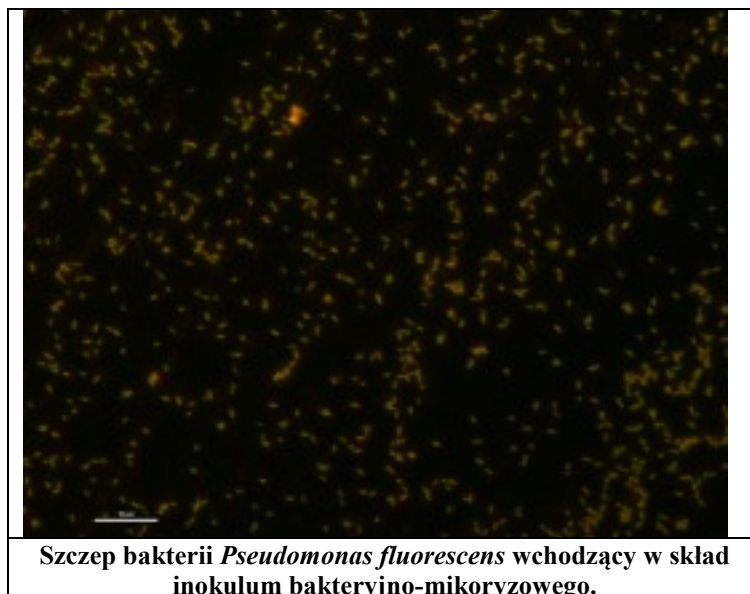
#### **Opis produktu**

**Skład:** szczepy bakterii NAzot2 (*Klebsiella oxytoca*), IAA - kwas indoliloctowy, Pi77AA (*Pantoea agglomerans*), Ps1/2 (*Pseudomonas fluorescens*), N52AD (*Pantoea / Erwinia* sp) oraz gatunki grzybów mikoryzowych *Claroideoglossum claroideum*, *Gigaspora margarita*, *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora dipurpurea*, *Rhizophagus fasciculatus*.

**Sposób działania:** bakterie *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* oraz *Pantoea / Erwinia* sp. stymulują wzrost roślin, rozpuszczają związki fosforu, wiążą azot atmosferyczny w glebie, udostępniają roślinom żelazo poprzez zmianę jego wartościowości oraz produkują siderofory. Zastosowane gatunki grzybów mikoryzowych zwiększają odporność roślin na stres wodny, zwiększają powierzchnię chłonną korzeni i powodują wzrost ukorzeniania, zwiększają dostępność fosforu, azotu, potasu, żelaza, manganu i innych mikroelementów dla roślin oraz stymulują ich wzrost i plonowanie roślin.

**Sposób stosowania:** Metoda aplikacji w warunkach polowych powinna być dostosowana do rośliny uprawnej. W przypadku upraw jednorocznych inokulum może być rozsiane na powierzchni gleby albo zastosowane łącznie z wysiewem nasion. Preparat może być także aplikowany w bruzdy, wzdłuż rzędów roślin. Zaleca się stosowanie biopreparatu 1- krotnie w trakcie sezonu wegetacji roślin, najlepiej podczas wysadzania roślin/wysiewu nasion. Stosowanie preparatu powinno być połączone z nawożeniem obornikiem lub innym nawozem organicznym.

**Korzyści stosowania:** Inokulum zawiera żywe mikroorganizmy, co pozwala na obniżenie dawek nawozów tradycyjnych, zarówno mineralnych jak i organicznych (obornik), dzięki intensyfikacji pobierania składników mineralnych z gleby przez rośliny. Ma on również działanie stymulujące rozwój systemu korzeniowego i zwiększające jego powierzchnię, co jest korzystnym efektem, w kontekście gospodarki wodnej roślin w przypadku nienawadnianych upraw. Dzięki wielu sposobom aplikacji inokulum, można wykorzystać istniejący w gospodarstwie park maszynowy, bez konieczności zakupu specjalistycznego sprzętu. Dawka bionawozu może być dostosowana do wymagań roślin uprawnych oraz warunków glebowo-klimatycznych, co zwiększa skuteczność inokulacji.



Szczep bakterii *Pseudomonas fluorescens* wchodzący w skład inokulum bakteryjno-mikoryzowego.

## BIOILSA WZBOGACONA MIKROBIOLOGICZNIE

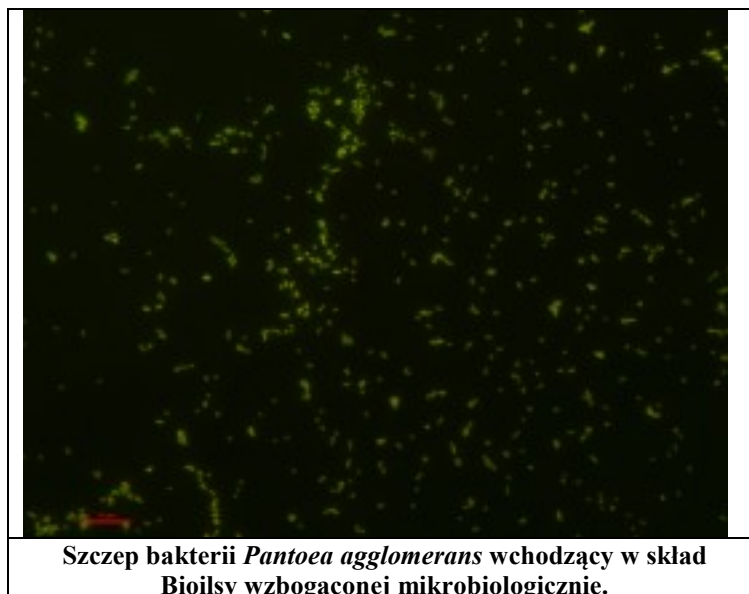
### Opis produktu

**Skład:** produkt zawiera azot organiczny (N – 12.5%, w tym organiczny azot rozpuszczalny w wodzie 5%), węgiel organiczny pochodzenia biologicznego (C - 42%, w tym ekstrahowany węgiel organiczny - 95%) oraz szczepy bakterii NAzot2 *Klebsiella oxytoca* (synteza IAA - kwas indoliloctowy), Pi77AA - *Pantoea agglomerans*, Ps1/2 - *Pseudomonas fluorescens*.

**Sposób działania:** bakterie *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans* oraz *Pseudomonas fluorescens* stymulują wzrost roślin, udostępniają niedostępne dla roślin związki fosforu, udostępniają roślinom żelazo, poprzez zmianę jego wartościowości oraz wiążą azot atmosferyczny w glebie.

**Sposób stosowania:** produkt w formie granulatu aplikowanego doglebowo, w ilości 700 kg na hektar, 1 krotnie, przez wysiewem nasion. Ponadto, biopreparat może być stosowany do zaprawiania nasion roślin warzywnych wodną zawiesiną.

**Korzyści stosowania:** Zastosowane do wzbogacenia nawozu bakterie, zostały wyizolowane z gleby rizosferowej roślin ogrodniczych, rosnących w warunkach glebowo-klimatycznych Polski, co zwiększa skuteczność i specyficzność działania nowo opracowanego biopreparatu. Stosowanie Bioilsy wzbogaconej mikrobiologicznie wpływa na zwiększenie wzrostu i plonowania roślin oraz pobierania i zawartości składników mineralnych w korzeniach i części nadziemnej roślin, t.j. azot, potas, fosfor, magnez, żelazo.



## KOMPOST WZBOGACONY MIKROBIOLOGICZNIE

### Opis produktu

**Skład:** miał węgla brunatnego, szczepy bakterii NAzot2 - *Klebsiella oxytoca* (synteza IAA - kwas indoliloctowy), Pi77AA - *Pantoea agglomerans*, Ps1/2 - *Pseudomonas fluorescens* oraz odpady przemysłu spożywczego, takie jak Vinassa i serwatka. Nowo opracowany kompost zawiera odpowiedni stosunek C:N (w przedziale od 30:1 do 40:1).

**Sposób działania:** związki humusowe wytwarzane przez utlenianie lignitów węgla brunatnego, w szczególności kwasy humusowe o małym ciężarze cząsteczkowym, są pobierane przez rośliny i wykazują działanie podobne do działania hormonów roślinnych. Stymulują pobieranie pierwiastków, takich jak potas, fosfor, azot, miedź, mangan, żelazo, sód i ich późniejszy metabolizm, w szczególności w odniesieniu do stymulacji wzrostu i plonowania roślin.

**Sposób stosowania:** Kompost aplikowany jest do gleby. Dawka zależy od rodzaju rośliny uprawnej i zasobności gleby w składniki mineralne oraz organiczne. Kompost powinien być stosowany w ilości 40 t/ha łącznie z doglebowym nawożeniem nawozem azotowym lub z innym bionawozem. Zalecane jest również stosowanie kompostu łącznie z dolistnym nawożeniem nawozem organicznym (np. Vinassa lub ekstraktem z glonów morskich).

**Korzyści stosowania:** Zastosowanie kompostu powoduje stymulację wzrostu i plonowania roślin oraz poprawę właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych gleby, co pozwala na ograniczenie mineralnego nawożenia roślin. Stosowanie kompostu zwiększa zawartość materii organicznej w glebie, a przede wszystkim węgla organicznego (50%) co ma długotrwały wpływ na poprawę gospodarki wodnej i redukcję erozji gleby.



## KWASY HUMUSOWE WZBOGACONE MIKROBIOLOGICZNIE

### Opis produktu

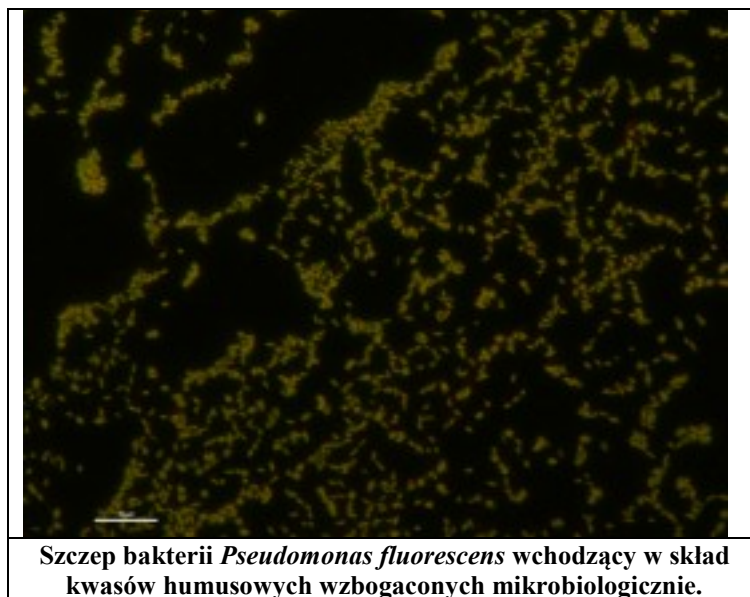
**Skład:** kwasy humusowe z węgla brunatnego w postaci płynnej oraz szczepy bakterii NAzot2 *Klebsiella oxytoca* (synteza IAA - kwas indoliloctowy), Pi77AA - *Pantoea agglomerans*, Ps1/2 - *Pseudomonas fluorescens*.

**Sposób działania:** Kwasy humusowe z węgla brunatnego w postaci płynnej wyprodukowano na bazie węgla brunatnego i montmorylonitu. Pomimo niskiej zawartości składników pokarmowych, skuteczność działania kwasów humusowych wzbogaconych o pożyteczne mikroorganizmy, wynika z dużej zawartości substancji humusowych (kwasy humusowe i fulwowe), dzięki którym składniki mineralne w glebie są bardziej przyswajalne dla roślin i poprawiają aktywność mikrobiologiczną gleb.

**Sposób stosowania:** Preparat z kwasów humusowych wzbogacony mikrobiologicznie można stosować w celu stymulacji wzrostu i plonowania roślin oraz poprawy jakości gleb. Kwasy humusowe wzbogacone mikrobiologicznie stosowane są doglebowo w stężeniu 5%, a ich roztwór wodny należy przygotować bezpośrednio przed aplikacją. Preparat można stosować 2-3 krotnie od momentu rozpoczęcia wzrostu vegetacyjnego przez rośliny, w 2 - 3 tygodniowych odstępach. Dawka zależy od rodzaju rośliny uprawnej i waha się od 50 do 100 litrów na hektar w ciągu sezonu wegetacji. Zalecane jest stosowanie kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie łącznie z innymi bionawozami.

**Korzyści stosowania:** Polepszenie pobierania składników mineralnych z gleby przez rośliny po zastosowaniu kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie, pozwala na zmniejszenie stosowania dawek nawozów mineralnych i organicznych. Ponadto, zwiększenie zawartości związków humusowych w glebie polepsza jej właściwości bio-fizyko-chemiczne, w tym pojemność wodną, co jest szczególnie ważne w uprawach nienawadnianych. Płynna forma bionawozu ułatwia jego aplikację i dostosowanie dawki do potrzeb uprawianych roślin i warunków glebowo-klimatycznych.





Szczep bakterii *Pseudomonas fluorescens* wchodzący w skład kwasów humusowych wzbogaconych mikrobiologicznie.

## BIOWĘGIEL WZBOGACONY MIKROBIOLOGICZNIE

### Opis produktu

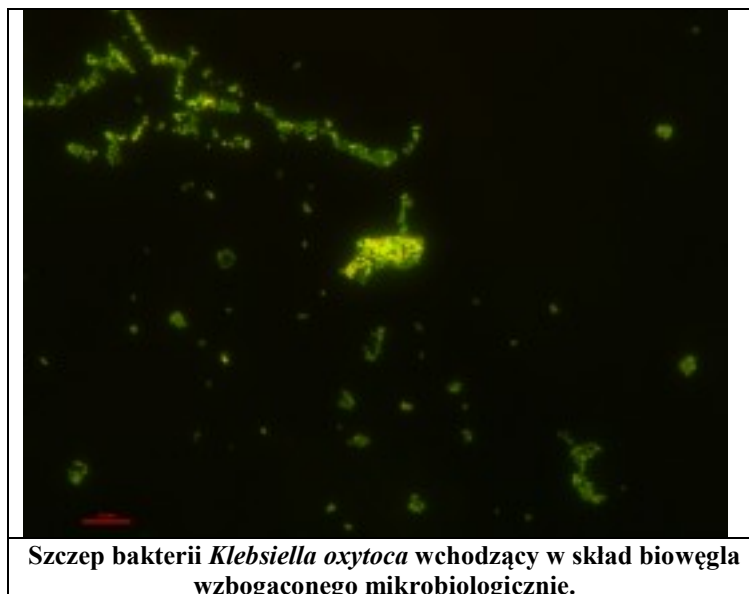
**Skład:** części organiczne i ilaste z węgla brunatnego oraz biowęgla, melasa z dodatkami komponentów powodujących ekstrahowanie kwasów humusowych oraz szczepy bakterii NAzot2 - *Klebsiella oxytoca* (synteza IAA - kwas indoliloctowy), Pi77AA - *Pantoea agglomerans*, Ps1/2 - *Pseudomonas fluorescens*.

**Sposób działania:** Biowęgiewiel, dzięki właściwościom fizykochemicznym, może być wykorzystywany w produkcji roślinnej do poprawy właściwości gleb, bioremediacji gleb zanieczyszczonych, sekwestracji węgla w glebie, w procesie kompostowania jako materiał strukturalny, jako dodatek ograniczający emisję amoniaku (redukując emisję  $N_2O$  oraz  $CH_4$  z gleb) oraz w produkcji nawozów organicznych. Podnosi również pojemność wodną oraz pH gleb, zapobiega wymywaniu składników pokarmowych oraz wiąże zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne. Biowęgiewiel pełni także rolę materiału strukturotwórczego i ogranicza straty azotu podczas kompostowania. Jest również wykorzystywany do ograniczania zanieczyszczenia wód podziemnych i powierzchniowych poprzez retencję składników biogennych w glebie oraz do unieszkodliwiania odpadów składowanych na wysypiskach.

**Sposób stosowania:** Biowęgiewiel wzbogacony mikrobiologicznie jest aplikowany do gleby w postaci granulek, o wielkości 3-6 mm. Dawka zależy od rodzaju rośliny uprawnej i zasobności gleby i waha się od 10 do 50 t/ha. Powinien być stosowany łącznie z doglebowym nawożeniem nawozem azotowym lub łącznie z dolistnym nawożeniem nawozem organicznym (np. ekstraktem z glonów morskich).

**Korzyści stosowania:** Biowęgiewiel wytworzony z węgla brunatnego wzbogacony mikrobiologicznie jest produktem zawierającym kwasy humusowe, makro- i mikroelementy oraz inne substancje odżywcze. Jego stosowanie zwiększa wzrost i plonowanie roślin oraz poprawia właściwości gleby. Biowęgiewiel wzbogacony mikrobiologicznie ma duży potencjał wymiany jonowej, co ułatwia napowietrzenie gleb ciężkich oraz zwiększa absorpcję i penetrację wody. Biowęgiewiel zastosowany jako ściółka zatrzymuje wilgoć poprzez ograniczenie rozwoju chwastów i zmniejszenie parowania, poprawia strukturę gruzełkową w warstwie ornej gleb, ogranicza erozję oraz wzbogaca glebę w materię organiczną i humus, co przynosi jednocześnie korzyści dla rozwoju mikroflory glebowej.





## PODSUMOWANIE

Bionawozy zawierają substancję organiczną oraz jeden lub kilka biologicznie aktywnych związków organicznych (aminokwasy, witaminy, enzymy, hormony roślinne), jak również makro i mikroelementy stymulujące wzrost i plonowanie roślin. Dostarczają one roślinom niezbędnych substancji, które są naturalnie syntetyzowane w wielu skomplikowanych procesach biochemicznych powodując oszczędności energii, która może być wykorzystana do innych przemian w roślinie. Z powodu korzystnych oddziaływań pożytecznych mikroorganizmów na wzrost i plonowanie roślin są one komponentami preparatów biologicznych, w tym biostymulatorów, bionawozów itp. Zwiększenie efektywności pobierania i przyswajania składników mineralnych z biopreparatów przyczynia się do ograniczenia stosowania nawozów i innych chemicznych środków produkcji roślin. Ponadto, zanieczyszczenia gleby związane są w strefie rizosfery i w tej części ulegają biodegradacji przy udziale mikroorganizmów glebowych.

Zwiększenie zawartości materii organicznej w glebie oraz przywrócenie dominacji pożytecznej mikroflory glebowej zwiększa stabilność mechaniczną gleby i przyczynia się do poprawy zdolności sorpcyjnej gleby i pobierania składników mineralnych przez rośliny, a także łagodzi skutki anomalii pogodowych, np. niskich lub wysokich temperatur. Aktywność pożytecznej mikroflory w rizosferze jest nie tylko jednym z czynników warunkujących prawidłowy wzrost roślin, ale także ważnym potencjalnym źródłem ich odporności na choroby infekcyjne. **W celu przeciwdziałania degradacji gleb (n.p. choroby replantacji) wskazanym jest stosowanie bioproduktów na bazie bakterii, grzybów mikoryzowych i grzybów strzępkowych w celu poprawy żyzności i bioróżnorodności gleb oraz antagonistycznego oddziaływania przeciwko mikroorganizmom szkodliwym.** Pożyteczne mikroorganizmy wytwarzają biologicznie aktywne związki (witaminy, regulatory wzrostu, antybiotyki, siderofory, substancje odżywcze dla roślin), poprawiające jakość gleb uprawnych oraz wzrost i plonowanie roślin. W intensywnej produkcji ogrodniczej i rolniczej w celu uzyskania wysokich plonów powszechnie stosowane jest wysokie nawożenie mineralne, z aplikacją środków ochrony roślin. Powoduje to utratę potencjału biologicznego i erozję gleb, co prowadzi do pogorszenia jakości i żyzności gleb uprawnych. Alternatywą dla takiej produkcji jest stosowanie obornika, wprowadzanie słomy do gleby oraz naturalnych bioproduktów t.j. bionawozów, biostymulatorów, kompostów wzbogaconych mikrobiologicznie. Dotyczy to zwłaszcza pól użytkowanych rolniczo, przygotowywanych pod nowe nasadzenia oraz rejonach o dużej intensywności upraw roślin ogrodniczych, gdzie brak jest możliwości

przeprowadzenia powszechnie zalecanego zmianowania. **Biopreparaty działają najskuteczniej, jeśli są aplikowane podczas sadzenia roślin i na początku uprawy. Stymulują one wzrost i rozwój systemu korzeniowego, który jest zdrowy, silny, o kilkukrotnie większej objętości niż w uprawach konwencjonalnych. Rośliny traktowane bionawozami w większym stopniu przyswajają składniki mineralne i wodę oraz lepiej rosną i plonują niż rośliny kontrolne.**

## **PODSUMOWANIE KOŃCOWE**

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie produkcją i konsumpcją żywności ekologicznej, co jest wyrazem wzrostu świadomości konsumentów w kontekście ochrony środowiska naturalnego i zdrowia człowieka. Badania nad rozwojem przyjaznych dla środowiska metod uprawy roślin ogrodnich obejmują wiele aspektów takich jak: hodowla nowych odmian o podwyższonej odporności na niekorzystne czynniki środowiska, optymalizacja metod nawadniania i nawożenia, wykorzystanie płodozmianu, ściółkowanie gleb oraz stosowanie nawozów pochodzenia naturalnego z aplikacją mikroorganizmów glebowych dla zwiększenia żyzności gleb, a także podniesienia odporności roślin na choroby i szkodniki.

Badania wykazały dużą skuteczność pożytecznych mikroorganizmów zgromadzonych w SYMBIO BANK-u w stymulacji wzrostu wegetatywnego i plonowania roślin marchwi odmiany Nipomo i ogórka odmiany Adam. Najbardziej efektywne szczepy i gatunki mikroorganizmów są komponentami nowo opracowanych biopreparatów: biostymulatora, bionawozu, kompostu, biowęgla i inokulum bakteryjno-mikoryzowego.

Poznanie bio-fizyko-chemicznych procesów zachodzących w rizoferze oraz roli symbiotycznych mikroorganizmów, mających największy wpływ na dostępność i pobieranie składników odżywczych przyczyni się do rozwoju ekologicznych metod uprawy roślin ogrodnich. W celu lepszego zrozumienia mechanizmu działania tych mikroorganizmów niezbędna jest ich identyfikacja oraz ocena efektywności ich działania. Identyfikację mikroorganizmów oraz ocenę aktywności mikrobiologicznej gleby prowadzi się w celu określenia bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych oraz wpływu warunków środowiska i oddziaływania człowieka poprzez zabiegi agrotechniczne na wielkość ich populacji w glebie. Zastosowanie pożytecznych mikroorganizmów w ekologicznej uprawie roślin ogrodnich zwielokrotni ich korzystny wpływ na potencjał plonotwórczy roślin ogrodnich i poprawi jakość gleb. Powszechne stosowanie innowacyjnych bioproduktów w ekologicznej uprawie warzyw przyczyni się do poprawy dochodowości gospodarstw ogrodnich poprzez obniżenie kosztów produkcji. Konsumenti warzyw, dzięki nowym rozwiązaniom, będą mieli dostęp do tańszych produktów o wysokiej jakości.

## **ZALECENIA DLA PRAKTYKI**

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń polowych wskazują na:

- Korzystny wpływ zastosowanych pożytecznych mikroorganizmów wchodzących w skład nowo opracowanych biopreparatów na zwiększenie populacji i bioróżnorodności bakterii rizoferowych oraz grzybów mikoryzowych w rizoferze roślin marchwi odmiany Nipomo oraz ogórka odmiany Adam.
- Wysoką przeżywalność zastosowanych szczepów bakterii, którymi inokulowano rośliny marchwi i ogórka.
- Możliwość rozwoju ekologicznych metod uprawy roślin warzywnych z zastosowaniem nowo opracowanych bioproduktów, które zwiększają jakość i wielkość plonów.

- Zwiększenie dominacji pożytecznej mikroflory glebowej, poprzez aplikację nowo opracowanych bioproduktów, co wpływa na poprawę jakości i żyzności gleb uprawnych i zdegradowanych.
- Możliwość wykorzystania nowo opracowanych bioproduktów jako skutecznych i ekonomicznie opłacalnych metod nawożenia i ochrony roślin warzywnych.
- Możliwość wykorzystania istniejących maszyn w gospodarstwie do aplikacji nowo opracowanych bioproduktów, bez konieczności zakupu nowych urządzeń przeznaczonych do tego celu.
- Możliwość rozwoju firm sektora rolnictwa ekologicznego w Polsce.

## Literatura

1. Arsenault J.L., Poulcur S., Messier C., Guay R. 1995. WIN-RHIZO a root-measuring system with a unique overlap correction method. *HortScience* 30: 906.
2. Błaszowski J., 2008. Metody izolowania, hodowania i identyfikowania arbuskularnych grzybów mikoryzowych z gromady *Glomeromycota*. W: W. Mułenko, Mycologiczne badania terenowe. Przewodnik metodyczny. Wyd. UMCS., 142-163.
3. Brzezińska, M., Włodarczyk, T., Stępniewski, W., Przywara, G. 2005. Soil aeration status and catalase activity. *Acta Agrophysica* 5(3): 555-565
4. Cygański A. 1997. Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, Polska.
5. Derkowska E., Sas Paszt L., Dyki B., Sumorok B. 2015a. Assessment of mycorrhizal frequency in the roots of fruit plants using different dyes. *Adv. in Microbiol.*, 5(1): 54-64. DOI: [10.4236/aim.2015.51006](https://doi.org/10.4236/aim.2015.51006)
6. Dhingra O.D., Sinclair J.B. 1995. Basic plant pathology methods. Lewis Publishers. Boca Raton London Tokyo.
7. Dumas A. 1826. *Annales de chimie*, 33: 342.
8. Egner H., Riehm H., Domingo W.R., 1960: Untersuchungen ueber die chemische bodenanalyse als grundlage fur die bevrteilung des nährstoffzustandes der boden. II. Chemische extraktionsmethoden zu phosphor – und kaliumbestimmung K. *Lantbr. Hogsk. Annlr.* 26: 199-215.
9. EPPO Standards – Guidelines for the efficacy evaluation of Plant Protection Products. 2008.
10. Gould W.D., Hagedorn C., Bardinelli T.R., Zablatowicz R.M. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent *Pseudomonas* from various habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 28-32
11. Hattori R., Hattori T. 1980. Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26: 1-14.
12. Hill G. T., Mitkowski N. A., Aldrich-Wolfe L., Emele L. R., Jurkonie D. D., Ficke A., Maldonaldo-Ramirez S., Lynch S. T., Nelson, E. B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* 15: 25-36.]
13. Hoshino Y. T., Morimoto S. 2008. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 701-710.

14. Kussainova, M., Durmuş, M., Erkoçak, A., Kızılkaya, R. 2013. Soil dehydrogenase activity of natural macro aggregates in a toposequence of forest soil. *Eurasian Journal of Soil Science* 2(1): 69-75
15. Liu J., Yu Y., Cai Z., Bartlam M., Wang Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World J. Microb. Biot.* 31: 1387-1395.
16. Martin J.P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232
17. Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brendecke, J.W., 1995. *Environmental microbiology: a laboratory manual*. Academic Press Inc. New York, USA.
18. Praca zbiorowa pod redakcją Stanisława Mercika, *Chemia Rolna. Podstawy teoretyczne i praktyczne*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2002.
19. *Procedury Badawcze Pracowni Badania Zanieczyszczeń Chemicznych ISK*, Skierniewice 2010.
20. Sass A. M., Sass H., Coolen M. J., Cypionka H., Overmann J. 2001. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5392-5402.
21. Schüßler A., Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Schüßler A, Walker C, Gloucester, Published in libraries at Royal Botanic Garden Edinburgh, Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University; freely available online at [www.amf-phylogeny.com](http://www.amf-phylogeny.com)
22. Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe, C. C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results?. *J. Microbiol. Meth.* 69: 470-479.
23. Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology* 55: 415–424.
24. Sun S., Xing F., Zhao H., Gao Y., Bai Z., Dong, Y. 2014. Response of bacterial community to simulated nitrogen deposition in soils and a unique relationship between plant species and soil bacteria in the Songnen grassland in Northeastern China. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14: 565-580.
25. Swędrzyńska D., Grześ S. 2015. Microbiological parameters of soil under sugar beet as a response to the long-term application of different tillage systems. *Pol. J. Environ. Stud.* 24(1): 285-294
26. *The Manual of Biocontrol Agents*. 2004. (L.G. Copping. Ed.). British Crop Protection Council, 702 s.
27. Tiurin, I. V. (1944). *Pedology*, 10, 441.
28. Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA, Paris, pp. 217-221.
29. Walenty Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
30. Żabicka D. 2010. Metody detekcji i identyfikacji bakterii. [http://ichf.edu.pl/r\\_act/act\\_pl/fund\\_strukt/KSP/zabicka.pdf](http://ichf.edu.pl/r_act/act_pl/fund_strukt/KSP/zabicka.pdf)