

## ZASTOSOWANIE RÓŻNYCH MODELI DO OKREŚLANIA LICZBY BAKTERII W GLEBIE

*M. Dąbek-Szreniawska, J. Malicki<sup>1</sup>*

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27

<sup>1</sup>Politechnika Lubelska, Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin

**Streszczenie:** Celem badań było dokonanie oceny zmian zachodzących w liczebności bakterii na tle cech fizyko-chemicznych gleb w systemach użytkowania konwencjonalnego i ekologicznego. Obiektem doświadczeń była gleba płowa wytworzona z glin zwałowych o składzie mechanicznym piasków gliniastych mocnych. Liczbę bakterii przedstawiono jako liczebność tworzących kolonie jednostek (CFU) wg Parkinsona oraz po wykorzystaniu wyników wszystkich obserwacji w modelu FOR wg Hattoriego. Liczebności tworzących kolonie jednostek wyrażono w stosunku do: 1 g świeżej masy gleby, 1 g suchej masy gleby, 1 cm<sup>3</sup> gleby, 1 cm<sup>3</sup> roztworu glebowego, 1 cm<sup>3</sup> porowatości gleby. Użycie modelu FOR pozwala na dopasowanie użytych pożywek do potrzeb pokarmowych obserwowanych mikroorganizmów. Uzyskiwane rezultaty zależą nie tylko od sposobu postępowania z próbkami glebowymi, ale także od sposobu hodowania i pomiaru bakterii.

**Słowa kluczowe:** liczebność bakterii, model FOR, sposób uprawy.

### WSTĘP

Nawożenie wpływa nie tylko na plonowanie roślin, ale także na rozwój i czynność drobnoustrojów w glebie i na wywoływane przez nie przemiany organicznych i mineralnych składników tego środowiska. Jednostronne traktowanie gleb lekkich nawozami mineralnymi, w szczególności powodującymi ich zakwaszenie, prowadzi do przyspieszenia mineralizacji próchnicy i pogorszenia się jej jakości. Korzystny wpływ nawozów organicznych, zwłaszcza przy systematycznym ich stosowaniu, na gromadzenie się materii organicznej w glebie jest od dawna znany i doświadczalnie udokumentowany.

Celem badań było dokonanie oceny zmian zachodzących w liczebności bakterii na tle cech fizyko-chemicznych gleby ze szczególnym uwzględnieniem zawartości węgla organicznego w systemach użytkowania konwencjonalnego z nawożeniem mineralnym i ekologicznego z nawożeniem organicznym. Poznanie tych zmian oraz zależności pomiędzy cechami gleby, a sposobami ich użytkowania daje możliwość w sposób bardziej ścisły ocenić znaczenie i wpływ dwu systemów uprawowych na żyzność gleb [5].

Określanie liczebności lub biomasy mikroorganizmów glebowych może być realizowane wieloma różnorodnymi metodami. Metody bezpośrednio w zasadzie nie pozwalają na określenie cech fizjologicznych i taksonomicznych nawet, jeśli poddawany obserwacji materiał traktuje się fluorochromami sprzęgniętymi z globulinową frakcją specyficznych surowic.

Określanie liczebności grup fizjologicznych poprzez pomiar metabolitów (np.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ) po wprowadzeniu określonego substratu obarczone jest błędem wynikającym albo ze zróżnicowania kinetyki przemian, albo z udziału innych niż mikroorganizmy grup edafonu.

Wyniki pomiarów pośrednich – polegających na sporządzaniu mianowanych zawiesin badanego materiału i wysiew do podłoża hodowlanych – zależą od postępowania z pobranymi próbkami glebowymi przed sporządzeniem zawiesin [14], od dopasowania używanego podłoża do badanego obiektu, a nawet od sposobu realizacji pomiaru i od sposobu interpretacji wyników [1, 11].

Wychodząc z założenia, że liczebność mikroorganizmów skorelowana jest ze stężeniem dostępnego substratu pokarmowego postanowiono sprawdzić, jak na dokładność i powtarzalność określania liczebności bakterii glebowych metodą rozcieńczeń wpływają: czas przetrzymywania próbek gleby przed sporządzeniem zawiesiny, czas inkubacji podłoża z wyrastającymi koloniami, dobór podłoża hodowlanego, sposób określania liczby kolonii oraz sposób wyrażania wyników.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano próby gleby z długoletnich doświadczeń polowych prowadzonych przez IUNG w Puławach. Obiektem badań była gleba płowa wytworzona z glin zwałowych o składzie mechanicznym piasków gliniastych mocnych, na której prowadzone były doświadczenia w systemie 4-ro polowego zmianowania typu norfolkskiego. Próby gleby pobrano spod uprawy pszenicy ozimej nawo-

zonej mineralnie i organicznie (obornikiem). Analizy mikrobiologiczne wykonywano po różnym czasie przetrzymywania próbek glebowych w temperaturze +7°C. Szczegółowy opis systemu uprawy przedstawił Kuś [10] a właściwości fizyko-chemicznych obiektu przedstawili Hajnos i wsp. [6] oraz Sokołowska i wsp. [17].

Właściwości fizyko-chemiczne gleby przedstawia tabela 1.

**Tabela 1.** Fizyko-chemiczne właściwości badanej gleby.  
**Table 1.** Physico-chemical characteristics of examined soils.

| Sposób nawożenia                               | Mineralne | Organiczne |
|--|-----------|------------|
| Zawartość węgla organicznego, % wag.           | 0,96      | 1,34       |
| Gęstość objętościowa, g/cm <sup>3</sup>        | 2,3       | 2,1        |
| pH w H <sub>2</sub> O                          | 6,7       | 7,5        |
| Całkowita objętość porów mm <sup>3</sup> /g    | 40,9      | 68,1       |
| Porowatość całkowita, % objętościowy           | 9,4       | 14,3       |
| Wilgotność, % wagowy                           | 53        | 60         |
| Powierzchnia właściwa porów, m <sup>2</sup> /g | 0,43      | 0,83       |

W badaniach użyto dwu podłoży: DNB (Diluted Nutrient Broth) według Hattori i Hattori [7] o składzie: pepton 0,1 g., bulion odżywczy 0,1 g, NaCl 0,05 g, woda destylowana 1000,0 cm<sup>3</sup>, agar 15,0 g, oraz SEA (Soil Extract Agar) według Stotzky'ego i in. [18] o składzie: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g, sacharoza 1,0 g, wyciąg glebowy 100,0 cm<sup>3</sup>, woda destylowana 0,9 dm<sup>3</sup>, agar 15,0 g.

Kolonie na płytkach liczono codziennie, po 24, 48, do 336 godzin od momentu inokulacji. Liczbę mikroorganizmów przedstawiano jako liczebność jednostek tworzących kolonie (CFU) wg Parkinsona i in. [15] oraz po wykorzystaniu wyników wszystkich obserwacji w modelu FOR wg Ishikuri i in. [8], Ishikuri i Hattori [9]. Jednostki tworzące kolonie według modelu FOR × 10<sup>6</sup>/1g świeżej gleby i parametry modelu FOR:

$$N(t) = N_{\infty}(1 - e^{-\lambda(t-t_r)}), \quad t \geq t_r$$

gdzie:  $N_{\infty}$  = potencjalna liczba jednostek tworzących kolonie × 10<sup>6</sup>,  $\lambda$  = współczynnik kierunkowy,  $t_r$  = czas opóźnienia – czas, w którym pojawiły się pierwsze kolonie (Tabele 2–5).

Liczebności jednostek tworzących kolonie przedstawiono w stosunku do: 1 g świeżej masy gleby, 1 g suchej masy gleby, 1 cm<sup>3</sup> gleby, 1 cm<sup>3</sup> roztworu glebowego, 1 cm<sup>3</sup> porowatości gleby.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Uzyskane wyniki przedstawiono w kolejnych Tabelach 2–6. Tabele 2–5 obrazują szczegółowo pomiary liczebności bakterii dokonywane za pomocą modelu FOR. W Tabeli 6 zestawiono wyniki z liczebności bakterii na pożywce DNB i SEA po 5 dniowym przetrzymywaniu próbek gleby przed sporządzeniem rozcieńczeń według modelu FOR i według Parkinsona. Wysiewy inkubowano przez 14 dni i uzyskane wyniki odniesiono do 1 g świeżej masy gleby, 1 g suchej masy gleby, 1 cm<sup>3</sup> gleby, 1 cm<sup>3</sup> roztworu glebowego, 1 cm<sup>3</sup> porowatości gleby.

Gleba badanych obiektów różniąc się sposobem nawożenia różniła się w efekcie również zawartością węgla organicznego, odczynem, gęstością objętościową, porowatością i wilgotnością (Tabela 1). Okazało się, że wywiera to wpływ na liczebność zasiedlających glebę mikroorganizmów. Tabele 2–5 przedstawiają liczebności jednostek tworzących kolonie wyrastających na użytych podłożach DNB i SEA według modelu FOR po zróżnicowanym czasie przetrzymywania próbek glebowych przed pomiarem. Najwięcej kolonii wyrosło na podłożu DNB z gleby nawożonej obornikiem, natomiast najmniej na podłożu SEA z gleby nawożonej mineralnie. Użycie modelu FOR pozwoliło stwierdzić, że użyte podłoża różnie wpływały nie tylko na potencjalne liczebności  $N_t$  lecz także na czas pojawienia się pierwszej kolonii  $t_r$ , (wcześniej na DNB) i kinetykę wzrostu  $\lambda$  – (szybciej na DNB niż na SEA), oraz wcześniej z prób gleby nawożonej obornikiem. Jak przestawiono w Tabelach 2–6 najwyższą liczbę tworzących kolonie jednostek uzyskano w przypadku gleby nawożonej obornikiem i na podłożu DNB. Wyniki następnie przedstawiono w odniesieniu do różnych jednostek gleby a więc w stosunku do: 1 g świeżej masy gleby, 1 g suchej masy gleby, 1 cm<sup>3</sup> gleby, 1 cm<sup>3</sup> roztworu glebowego, 1 cm<sup>3</sup> porowatości gleby. Efekty przeprowadzonych obliczeń (wykorzystano do nich informacje z tabeli 1) przedstawiono w tabeli 6. Widać tu, że liczebności bakterii różnią się nie tylko ze względu na badane obiekty, ale także użyte metody hodowli i pomiaru. Różne rezultaty otrzymuje się również stosując różne sposoby przedstawiania uzyskanych wyników. W prowadzonych badaniach najlepszą dokładność uzyskiwano przedsta-

wiając liczebność bakterii w odniesieniu do  $1 \text{ cm}^3$  porowatości badanych gleb i wykorzystując wyniki uzyskane modelem FOR.

Widać z przedstawionych rezultatów, że podając wyniki badań mikroorganizmów glebowych warto w opracowaniach zamieszczać pełne informacje dotyczące fizykochemicznych właściwości badanych obiektów, na co zwrócili już wcześniej uwagę Malicki [11], Dąbek-Szreniawska i Kondracka [1], Dąbek-Szreniawska [2], Dąbek-Szreniawska i in. [3, 4]. Szczególnie ważne wydaje się uwzględnianie w interpretacji wyników właściwości fizycznych gleby. Należy zaznaczyć, że pomiar zawsze realizowany jest w oparciu o świeżą masę gleby i zwykle przeliczany na jej suchą masę. Brak informacji o aktualnej wilgotności, a także gęstości objętościowej i porowatości utrudnia porównanie właściwości mikrobiologicznych badanych gleb, ponieważ jednostki masy nie są w rzeczywistości przestrzenią życia mikroorganizmów. Podawanie fizycznych właściwości gleby pozwoliłoby ujednoczyć sposób prezentacji wyników w kompleksowych badaniach tego środowiska. Kilkundniowe (w przedstawionej pracy pięciodniowe) przetrzymywanie próbek gleby przed sporządzeniem jej rozcieńczeń zwiększa precyzję pomiaru liczebności glebowych mikroorganizmów metodą hodowlaną. Na uzyskiwane rezultaty znaczący wpływ wywiera użyte podłoże hodowlane, decydujące o momencie pojawienia się pierwszych kolonii oraz o kinetyce przyrastania ich liczby.

**Tabela 2.** Gleba nawożona mineralnie, wilg. 53% wag., DNB jednostki tworzące kolonie  $\times 10^{-6}$  /1g świeżej gleby

**Table 2.** Minerally fertilized soil, moisture 53% /per weight, DNB. CFU  $10^{-6}$  /g fresh soil

| Przechowywanie gleby, Dni | $N_{x_i}$ | $T_r$  | $\lambda$ |
|---------------------------|-----------|--------|-----------|
| 1                         | 176,4     | 0,307  | 0,217     |
| 2                         | 126,5     | 1,022  | 0,243     |
| 3                         | 141,6     | 1,032  | 0,213     |
| 4                         | 160,8     | 0,948  | 0,081     |
| 5                         | 166,8     | 0,719  | 0,233     |
| 6                         | 118,4     | 0,756  | 0,273     |
| Średnia                   | 148,41    | 0,7973 | 0,210     |
| $N_x$                     |           |        |           |
| $\sigma_n$                | 21,2217   | 0,250  | 0,060     |

**Tabela 3.** Gleba nawożona mineralnie, wilg. 53% wag., SEA. Jednostki tworzące kolonie  $\times 10^{-6}$  /1g świeżej gleby

**Table 3.** Minerally fertilized soil, moisture 53% /per weight, SEA. CFU  $10^{-6}$  /g fresh soil

| przechowywa-<br>wanie gleby,<br>dni | $N_{r_i}$ | $T_r$ | $\lambda$ |
|-------------------------------------|-----------|-------|-----------|
| 1                                   | 142,2     | 0,723 | 0,086     |
| 2                                   | 99,6      | 0,938 | 0,174     |
| 3                                   | 99,0      | 1,324 | 0,105     |
| 4                                   | 116,5     | 1,333 | 0,082     |
| 5                                   | 196,7     | 1,326 | 0,089     |
| 6                                   | 102,3     | 0,871 | 0,129     |
| Średnia<br>$N_{r_i}$                | 126,05    | 1,085 | 0,1171    |
| $\sigma_n$                          | 34,97     | 0,250 | 0,0032    |

**Tabela 4.** Gleba nawożona organicznie, wilg. 60% wag., SEA Jednostki tworzące kolonie  $\times 10^{-6}$ /1g świeżej gleby

**Table 4.** Organically fertilized soil, moisture. 60% /per weight. SEA, CFU  $10^{-6}$ /g fresh soil

| przechowywa-<br>wanie gleby,<br>dni | $N_{r_i}$ | $T_r$ | $\lambda$ |
|-------------------------------------|-----------|-------|-----------|
| 1                                   | 234,6     | 1,106 | 0,137     |
| 2                                   | 258,6     | 1,247 | 0,147     |
| 3                                   | 282,7     | 1,518 | 0,081     |
| 4                                   | 157,7     | 1,102 | 0,156     |
| 5                                   | 198,4     | 1,102 | 0,131     |
| 6                                   | 330,1     | 1,067 | 0,233     |
| Średnia<br>$N_{r_i}$                | 243,68    | 1,190 | 0,147     |
| $\sigma_n$                          | 55,88     | 0,157 | 0,044     |

**Tabela 5.** Gleba nawożona organicznie, wilg. 60% wag., DNB. Jednostki tworzące kolonie  $\times 10^{-6}$  /1g świeżej gleby**Table 5.** Organically fertilized soil, moisture. 60% /per weight, DNB, CFU  $10^{-6}$ /g fresh soil

| przechowywa-<br>wanie gleby,<br>dni | $N_s$  | $T_r$  | $\lambda$ |
|-------------------------------------|--------|--------|-----------|
| 1                                   | 420,0  | 0,131  | 0,177     |
| 2                                   | 348,9  | 0,514  | 0,206     |
| 3                                   | 327,0  | 0,603  | 0,212     |
| 4                                   | 253,6  | 0,648  | 0,170     |
| 5                                   | 330,7  | 0,587  | 0,204     |
| 6                                   | 299,6  | 0,227  | 0,327     |
| Średnia<br>$N_s$                    | 329,96 | 0,451  | 0,216     |
| $\sigma_n$                          | 50,37  | 0,1987 | 0,051     |

**Tabela 6.** Wyniki badań próbek gleby po 5 dniach przetrzymywania przed sporządzeniem rozcieńczeń przedstawione w stosunku do przyjętych sposobów odniesienia. Liczba bakterii  $\times 10^6$ /1g świeżej gleby**Table 6.** The results of keeping the soil samples for 5 days before inoculation of the dilutions. The number of colonies  $\times 10^6$ /1g of fresh soil

| Jednostki                                      | Nawożenie organiczne |         |                |          | Nawożenie mineralne |         |                |         |
|--|----------------------|---------|----------------|----------|---------------------|---------|----------------|---------|
|  | SEA                  |         | DNB            |          | SEA                 |         | DNB            |         |
|  | Parkin-<br>son       | FOR     | Parkin-<br>son | FOR      | Parkin-<br>son      | FOR     | Parkin-<br>son | FOR     |
| n/g świeżej<br>gleby                           | 159,66               | 198,44  | 312,00         | 330,73   | 127,66              | 196,7   | 158,66         | 166,82  |
| n/g suchej<br>gleby                            | 399,15               | 496,10  | 780,00         | 826,83   | 271,62              | 418,51  | 337,57         | 354,94  |
| n/cm <sup>3</sup> gleby                        | 838,21               | 1041,81 | 1638,00        | 1736,00  | 624,72              | 962,57  | 776,41         | 816,35  |
| n/cm <sup>3</sup> roz-<br>tworu gle-<br>bowego | 266,10               | 330,73  | 520,00         | 551,21   | 240,86              | 371,13  | 299,36         | 314,75  |
| n/cm <sup>3</sup> po-<br>rowatości             | 5861,23              | 7285,38 | 11454,54       | 12142,24 | 6645,96             | 10240,1 | 8259,6         | 8684,57 |

n – liczba bakterii w jednostkach tworzących kolonie

n – number of colonies forming units (C.F.U).

Kilkukrotne (w czasie trwania pomiaru) zliczanie kolonii pozwala na użycie modelu FOR dla określenia potencjalnej liczby mikroorganizmów. Jednorazowe

obserwacje liczby kolonii, aczkolwiek oszczędzają czas, pozbawiają jednocześnie kilku – wydaje się ważnych informacji. Nie informują o kinetyce wzrostu kolonii, o dopasowaniu użytego podłoża do potrzeb hodowlanych mikroorganizmów, o momencie ukazania się pierwszej kolonii, nie informują również o potencjalnej liczebności tworzących kolonie jednostek w badanym materiale glebowym. Jakkolwiek stosowanie modelu FOR zmusza do kilkukrotnego liczenia kolonii w czasie trwania pomiaru, jednak pozwala wszystkie te informacje uzyskać.

### WNIOSKI

1. Na wyniki liczebności bakterii w glebie znaczący wpływ wywierało użyte podłoże hodowlane, decydujące o momencie pojawienia się pierwszych kolonii oraz o kinetyce przyrastania ich liczby.
2. Kilkukrotne (w czasie trwania pomiaru) zliczanie kolonii pozwala na użycie modelu FOR dla określenia potencjalnej liczby bakterii glebowych.
3. Użycie modelu FOR pozwoliło ocenić dopasowanie użytych pożywek do potrzeb pokarmowych obserwowanych mikroorganizmów.
4. Uzyskiwane wyniki zależały nie tylko od sposobu postępowania z próbkami glebowymi, sposobu hodowania i pomiaru drobnoustrojów, ale także od przyjętej formy prezentacji wyników.

### PIŚMIENICTWO

1. Dąbek-Szreniawska M., Kondracka B.: The influence of fertilization on the distribution of microorganisms in soil aggregates. Conference on: The influence of physical and chemical factors on soil microorganisms. Lublin – Piaseczno, Poland 1984.
2. Dąbek-Szreniawska M.: Results of microbiological analysis in relation to soil physical properties. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 398–405, 1992.
3. Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A., Stawiński J.: The distribution of soil microorganisms in soils and its relations to physicochemical soil characteristics. Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent., 58 (4a), 1787–1790, 1993.
4. Dąbek-Szreniawska M., Sokolowska Z., Stotzky G., Collins Y.: The interaction between microbiological and physico-chemical properties as an indicator of soil quality. Abstract of 99<sup>th</sup> Meeting of ASM, May 30–June 3, Chicago, Illinois, 1999.
5. Dechnik I., Stawiński J.: Specific surface in physicochemical and physical soil research. Probl. Agrofizyki, 6, 50, 1973.
6. Hajnos M., Sokolowska Z., Dąbek-Szreniawska M., Kuś J.: Influence of cultivation system (ecological and conventional) on porosity of podzolic soil. Polish J. Soil Sci., 31, 33–41, 1998.



7. Hattori R., Hattori T.: Sensivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *J. Gen. Appl. Microbial.*, 26, 1–14, 1980.
8. Ishikuri S., Suwa Y., Hattori T.: Method for mathematical analysis of bacterial count data. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30, 249–253, 1984.
9. Ishikuri S., Hattori T.: Analysis of colony forming curves of soil bacteria. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 33 (3), 355–362, 1987.
10. Kuś J.: Wstępne porównanie trzech systemów produkcji roślinnej (konwencjonalny, integrowany, i ekologiczny). *Rocz. Akad. Roln. Poznań, CCCVII, Roln.* 52, 119–126, 1998.
11. Malicki J.: Physical properties of soils and their microbiological analysis (in Polish), *Post. Nauk. Roln.*, 3/182, 45–70, 1980.
12. Malicki J.: Ecological base for the interpretation of the bacterial count in the soil. *Rocz. Gleb.* 32, 87–92, 1982.
13. Malicki J., Bieganski A., Dąbek-Szreniawska M.: Mathematical modeling of biological activity of the soils with different compacting ratios. *Soil Till. Res.*, 19, 357–362, 1991.
14. Malicki J., Bieganski A., Sikora B., Dąbek-Szreniawska M.: Research of bacteria quantity in the soil stored in various thermal conditions. *Polish J. Soil Sci.* 37, 71–79, 1999.
15. Parkinson D., Gray T.R.G., Williams S.T.: *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1971.
16. Sokolowska Z., Hajnos M., Bowanko G., Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A.: Changes in selected physicochemical properties of soil in ecological and conventional cultivation. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rolniczych*, 460, 351–360, 1998.
17. Sokolowska Z., Hajnos M., Dąbek-Szreniawska M.: Relationn between adsorption of water vapour, specific surface area and soil cultivation. *Polish J. Soil Sci.* 37, 3–12, 1999.
18. Stotzky G., Broder M.W., Doyle J.D., Jones R.A.: Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered microorganisms to the terrestrial environment. *Adv., Appl., Microbiol.*, Academic Press, New York, 1–98, 1993.

## EVALUATION OF SOIL BACTERIA NUMBER BY VARIOUS MODELS

*M. Dąbek-Szreniawska, J. Malicki<sup>1</sup>*

Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27

<sup>1</sup>Technical University, Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin

**Summary.** The aim of the research was to determine the changes in number of microorganisms in soil under ecological and conventional cultivation of winter wheat. The number of bacteria was presented as a number of colony forming unit (CFU) acc. to Parkinson and after using all the observations according to FOR model. The number of colony forming units was presented in relation to: 1 g of fresh soil, 1 g of dry soil, 1 cm<sup>3</sup> soil, 1 cm<sup>3</sup> of soil dilution and 1 cm<sup>3</sup> of soil porosity. The obtained results depended not only on the method of dealing with the samples and the way of measuring. They depended also on the used method of presenting the results. The used of FOR model allowed for evaluating the adequacy of the media for the needs of the observed microorganisms.

**Keywords:** number of bacteria, model FOR, cultivation system.