

Filtry piaskowe jako element zintegrowanej ochrony materiału rozmnożeniowego w szkółkach leśnych

Slow Sand Filters as a part of integrated protection of seedlings against disease in forest nurseries

Tomasz Oszako¹✉, Katarzyna Anna Kubiak¹, Marta Siebyła², Justyna Anna Nowakowska³

¹ Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu w Sękocinie Starym, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn, Poland;

² Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Rolnictwa i Biologii, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, Poland;

³ Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych w Sękocinie Starym, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn, Poland.

✉ Tel. + 48 22 7153823, fax. +48 22 7150557, e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Abstract. Slow Sand Filters (SSF) are a biological method used to protect nursery plants, from pathogen infections which can cause serious diseases in many forest tree species. Thanks to SSF application the number of phytopathogens in nurseries can be significantly reduced, as demonstrated by many field and greenhouse experiments (e.g. in Polish nurseries, and for horticultural crops in Germany and The Netherlands).

In this study, the effect of pollution from fertilizers and fungicides used in agriculture (e.g. PCNB) on the efficiency of SSFs was assessed. A quantitative analysis was performed of the copiotrophic and oligotrophic bacterial composition colonizing SSF biofilms. The efficiency with which selected Oomycete strains belonging to the genus *Phytophthora* (*P. alni*, *P. cactorum*, *P. plurivora*) were removed from water was determined based on genetic material (DNA of the organisms) found in the SSF filtrate. Specific primers and TaqMan probes (qPCR) appeared to be the most sensitive molecular methods. Moreover, the microbiological analysis of SSF biofilm performed with selective media allowed the growth of copiotrophic and oligotrophic bacteria to be estimated. The influence of fungicide (PCNB) and N-fertilizer on the number of bacteria in each biofilm was also evaluated.

The pollution of water with fertilizer (being used for plant irrigation) was demonstrated to reduce the efficiency of filtration more than fungicide addition (the amount of DNA from those investigated pathogens in the water decreased with time). The amount of bacteria in SSF biofilm readily increased after application of N-fertilizer in contrast to fungicide (PCNB) addition.

Key words: Phytopathogen, biofilm, SSF, PCNB, mineral fertilizer

1. Wstęp

Pobieranie wody z naturalnych ujęć wód powierzchniowych (cieków wodnych) i jej wykorzystywanie do podlewania roślin szkółkarskich stanowi ryzyko rozprzestrzeniania się fitopatogenów oraz rozwoju wielu chorób roślin (Runia 1995; Wohanka 1995; Ehret et al. 2001). Do nawadniania szkółek leśnych wykorzystuje się najczęściej wodę pobieraną z pobliskich jezior i stawów. Często takie ujęcia położone są w zlewni oko-

licznych terenów wykorzystywanych rolniczo i dlatego w większości są skażone fitopatogenami oraz środkami pochodzenia rolniczego (nawozy mineralne, środki ochrony roślin). Nieprawidłowe lub nadmierne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin niesie ze sobą liczne niebezpieczeństwa, m.in. wywiera presję na środowisko naturalne (pozostałość środków ochrony roślin), ogranicza bioróżnorodność i powoduje pojawienie się organizmów szkodliwych dla roślin odpornych na ich działanie.

Powolne filtry piaskowe z błoną biologiczną (biofilmem) mają na celu eliminację patogenów z wody (Kubiak, Oszako 2011), m.in. lęgnowców należących do rodzaju *Phytophthora*, które porażają młode rośliny stanowiące materiał sadzeniowy w leśnictwie. Efektywność usuwania fitopatogenów przez filtry zależy od rodzaju i aktywności procesów mikrobiologicznych zachodzących w samym biofiltrze (Davey i O'Toole 2000), a na te wpływają zanieczyszczenia antropogeniczne powodowane działalnością rolniczą.

Celem badań była ocena wpływu nawozu mineralnego oraz fungicydu (PCNB) na skuteczność pracy powolnych filtrów piaskowych (SSF) w usuwaniu fitopatogenów z wody używanej do podlewania roślin. Została także przeprowadzona analiza wpływu zanieczyszczeń wody (np. nawóz mineralny) do podlewania roślin szkółkarskich na ilościowy skład bakterii zasiedlających biofilm filtrów SSF.

2. Materiały i metody

Analizy efektywności eliminacji fitopatogenów przez biofiltry SSF

Przygotowano 3 warianty biofilmu powolnych filtrów piaskowych (SSF) ustawionych w szklarni Instytutu Badawczego Leśnictwa – IBL (fot. 1): biofiltr nr 1 – naturalny – kontrola; biofiltr nr 2 – wzbogacony nawozem mineralnym w ilości 55 ml/40 l wody, o składzie: azot całkowity – 3%, azot azotanowy – 1%, azot amonowy – 2%, pięciotlenek fosforu – 5%, tlenek potasu – 7%, bor – 0,02%, miedź – 0,008, żelazo – 0,03%, mangan – 0,015%, molibdenian – 0,002%, cynk – 0,015%;



Fotografia 1. Prototypy Powolnych Filtrów Piaskowych zainstalowane w szklarni IBL

Photo 1. Prototypes of Slow Sand Filters installed in Forest Research Institute greenhouse

biofiltr nr 3 – zawierający dodatek fungicydu PCNB w ilości 1 g rozpuszczony w 50 ml 96% alkoholu etylowego.

Do wodociągowej wody zgromadzonej w kontenerze o objętości 120 l dodano czyste kultury *Phytophthora alni*, *P. plurivora* i *P. cactorum* (izolaty pochodzący z kolekcji IBL) inkubowane uprzednio przez 4 tygodnie w ciemności, w temperaturze pokojowej i na płynnej pożywce wielowarzywnej – V8. Dobę przed rozpoczęciem filtracji kultury zostały przeniesione na 24 godziny do temperatury +4°C (w celu wytworzenia zarodników), a następnie zhomogenizowane i zmieszane ze sobą w równych objętościach. Po dodaniu mieszaniny lęgnowców do wody system filtracyjny pracował przez dwie doby bez przerwy. Woda z lęgnowcami pompowana była równoległe do trzech filtrów SSF z różnymi wariantami biofilmów: filtr nr 1 (F1) – biofilm kontrolny, filtr nr 2 (F2) – biofilm z dodatkiem nawozu mineralnego, i filtr nr 3 (F3) – biofilm z dodatkiem PCNB. Próbkę wody przed filtracją i w trakcie filtracji pobierano w określonych odstępach czasowych (po 3, 6, 9, 12, 24 i 48 godzinach) od rozpoczęcia filtracji zainfekowanej wody. Wodę do badań pobierano do sterylnych kolb o objętości 1 litra ze zbiornika magazynującego wodę (aby określić ilość DNA patogenów przed filtracją), a uzyskany filtrat pobierano bezpośrednio z przewodów odprowadzających przefiltrowaną wodę z filtrów (dla porównania ilości DNA patogenów po filtracji). W laboratorium Zakładu Ochrony Lasu IBL przygotowano próbki wody do izolacji genomowego DNA i przeprowadzono analizę ilościową metodą qPCR (PCR w czasie rzeczywistym) umożliwiającą ocenę ilości DNA wybranych gatunków lęgnowców w wodzie nieprzefiltrowanej i w filtracie.

Przygotowanie próbek wody do analiz molekularnych qPCR

Próbki wody filtrowano dwukrotnie za pomocą pompy próżniowej firmy Millipore przez filtry membranowe (Ø 47 mm) (Millipore®) i średnicy porów 11 µm, dodatkowo przesącz filtrowano przez filtr membranowy o średnicy porów 5 µm w celu zatrzymania zarodników i fragmentów grzybni lęgnowców. Następnie filtry membranowe z osadem umieszczono w probówkach typu Eppendorf, do których dodano 2 ml wody sterylnej, destylowanej i wytrząsano 60 min, w temperaturze pokojowej przy prędkości 1400 rpm. Tak uzyskaną zawiesinę wirowano przez 15 min przy prędkości 13 000 rpm, usunięto filtr a zebrany na dnie osad traktowano jako materiał wyjściowy. Izolację DNA wykonano przy użyciu zestawu GenElute PLANT GENOMIC DNA MINIPREP KIT firmy Sigma Aldrich zgodnie z zaleceniami producenta z pewnymi modyfikacjami. Mia-

Tabela 1. Sekwencje starterów molekularnych oraz sond typu TaqMan komplementarnych do DNA wybranych fitopatogenów użytych w analizie ilościowej – qPCR

Table 1. Sequences of molecular primers and probes TaqMan types complementary to the DNA of selected phytopathogens used in quantitative analysis - qPCR

Gatunek fitopatogenu Species	Sekwencje starterów Sequences of starters	Sonda typu TaqMan Probe of TaqMan type
<i>Phytophthora alni</i>	CTGTCGATGTCAAAGTTG ATGGGTTTAAAAGATAAGGG	[HEX]ACCCAAACGCTCGCCATGATA[HBQ1]
<i>Phytophthora cactorum</i> :	ACGTGAACCGTTTCAAAC CAGCCGCCAACAATAAAG	[TET]CAGCCGCCACCAGACAAGAC[HBQ1]
<i>Phytophthora plurivora</i>	CCGTATCAACCTTTTAG GCAGTATAATCAGTATTGTAGA	[6FAM]CCCAGACCGAAGTCCAAACAT[HBQ1]

nowicie podczas lizy komórkowej do próbek typu eppendorf z osadem z wody dodano po 20 µl kulek szklanych i wytrząsano z buforem lizującym przez 15 min, w temperaturze 65°C (1400 rpm), a następnie przez 15 min w temperaturze pokojowej w wortexie firmy MoBio przy maksymalnej prędkości – czynność tę powtórzono dwukrotnie. Izolowane DNA genomowe oczyszczono zestawem Clean Up firmy A&A Biotechnology i rozdzielono elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym.

Analiza ilościowa – qPCR

W celu ustalenia obecności i oszacowania ilości DNA wybranych gatunków łęgniowców przed filtracją i po filtracji zastosowano startery molekularne oraz sondy typu TaqMan (tab. 1). Każdą próbkę analizowano 3 razy, dlatego uzyskany wynik jest średnią z tych trzech powtórzeń. Skład mieszaniny reakcyjnej do qPCR o objętości 20 µl: 10 µl mieszaniny Lumino Ct, 2 µl mieszaniny starterów (każdy 10 mM), 2 µl sondy (*P. alni* – 5 mM, *P. cactorum* – 10 mM, *P. plurivora* – 1 mM), 2 µl DNA (w przybliżeniu 20 ng), 4 µl woda-MilliQ. Reakcja qPCR składała się z następujących cykli: denaturacja wstępna – 94°C przez 3 min, amplifikacja – 40 cykli, denaturacja – 94°C przez 30 s, przyłączanie startera – 55°C przez 30 s, wydłużanie startera – 72°C przez 30 s.

Uzyskane wyniki badań ilościowych poddano analizie statystycznej. Różnice między średnimi wartościami redukcji badanych patogenów we wszystkich wariantach biofilmów w filtrach F1, F2 i F3 testowano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie STATISTICA v.8.0, przyjmując $\alpha=0,05$.

Analiza składu ilościowego bakterii zasiedlających biofilm SSF

W celu oceny obecności bakterii koptroficznych i oligotroficznych w biofilmie wykonano analizę mikro-

biologiczną metodą rozcieńczeń i hodowli na podłożach stałych. Pobrano 1 g biofilmu z każdego wariantu biofiltra SSF i przeniesiono do 9 ml jałowego roztworu 0,85% soli fizjologicznej, a następnie całość wytrząsano przez 15 min w łaźni wstrząsawej. W kolejnym etapie wykonano serię dalszych rozcieńczeń próby macierzystej w próbkach zawierających po 9 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej, przenosząc po 1 ml z poprzedniego do kolejnego rozcieńczenia. Wykonano posiew bakterii, wglaskując po 0,1 ml zawiesiny na agar odżywczy (dla bakterii koptroficznych) lub agar odżywczy 1000-krotnie rozcieńczony (dla bakterii oligotroficznych) z szeregu rozcieńczeń (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) w trzech powtórzeniach. Po inkubacji w temperaturze pokojowej przez 3 (koptrofy) i 7 dni (oligotrofy) zliczono ilość wyrosłych kolonii.

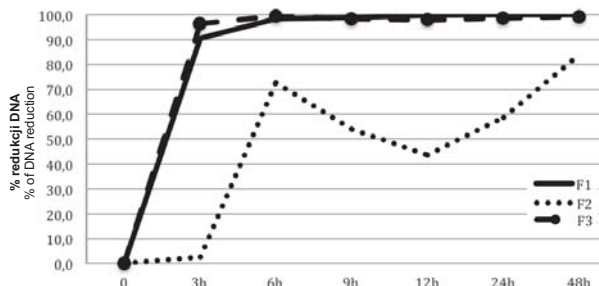
Statystyczne różnice pomiędzy średnimi wartościami ilości bakterii koptroficznych (kopio) i oligotroficznych (oligo) we wszystkich wariantach biofilmów w filtrach F1, F2 i F3 testowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie STATISTICA v.8.0.

3. Wyniki badań

Wyniki ilościowe uzyskane za pomocą qPCR z sondami TaqMan dostarczyły danych, na podstawie których oszacowano stopień eliminacji patogenów, wyrażony zmniejszeniem zawartości ich DNA w przefiltrowanej wodzie.

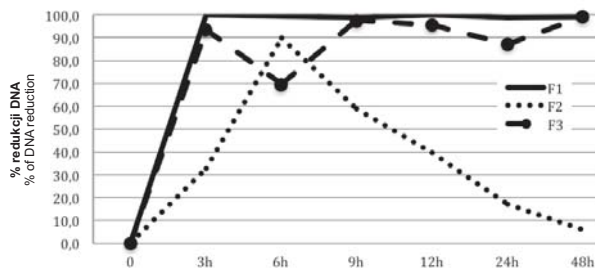
Redukcja ilości DNA *P. alni* w kontrolnym biofiltrze oraz w biofiltrze z dodatkiem PCBN przebiegała równomiernie i wydajnie, tzn. ilość DNA spadała wraz z wydłużaniem się czasu filtracji, osiągając po 48 godzinnej filtracji 99,9% i 99,1% redukcji. Natomiast w biofiltrze z dodatkiem nawozu mineralnego eliminacja *P. alni* była wyraźnie zakłócona. Do szóstej godziny nieustannej filtracji zanotowano redukcję DNA *P. alni* na poziomie

72,5%, natomiast kolejne pomiary po 9 i 12 godzinach wskazały na obniżenie skuteczności redukcji do 43,5%, następnie po okresie 24 i 48 godzin skuteczność filtracji wzrosła prawie o połowę, osiągając po 48 godzinach poziom 83,7% (ryc. 1).



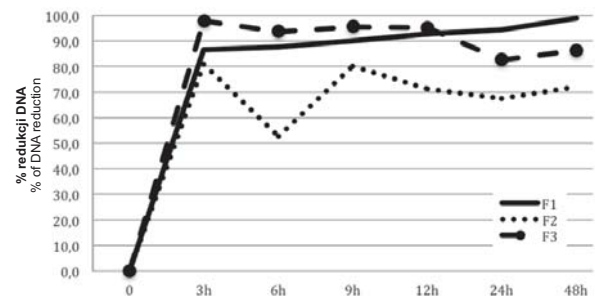
Rycina 1. Zmniejszenie ilości DNA *P. alni* (w %) w 3 wariantach biofiltrów SSF w czasie 48 godzinnej filtracji wody inokulowanej fitopatogenami

Figure 1. Reducing the amount of DNA of *P. alni* (in%) in three variants of SSF biofilter during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens



Rycina 2. Zmniejszenie ilości DNA *P. cactorum* (w %) w 3 wariantach biofiltrów SSF w czasie 48 godzinnej filtracji wody inokulowanej fitopatogenami

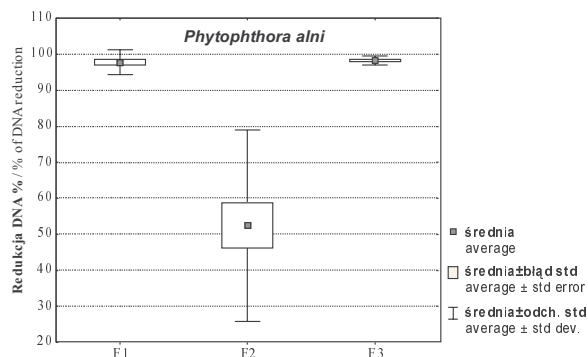
Figure 2. Reduction of *P. cactorum* DNA (in %) in three variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens



Rycina 3. Zmniejszenie ilości DNA *P. plurivora* (w %) w 3 wariantach biofiltrów SSF w czasie 48 godzinnej filtracji wody inokulowanej fitopatogenami

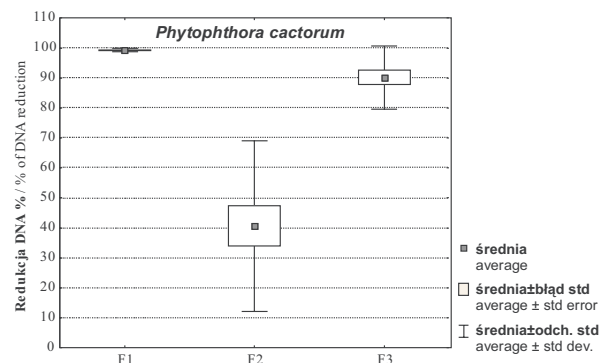
Figure 3. Reducing the amount of *P. plurivora* DNA (in%) in 3 variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens

Zmniejszenie ilości DNA *P. cactorum* w kontrolnym biofiltrze przebiegało wydajnie i równomiernie, osiągając po 48 godzinnej filtracji poziom 99,1% redukcji DNA patogenu. W biofiltrze z dodatkiem PCNB po dwóch dobach filtracji poziom redukcji DNA także był wysoki i wynosił 99%. Natomiast po 6 i 24 godzinach filtracji nastąpił niewielki spadek jej wydajności do poziomu odpowiednio 69,4% i 86,9%. W biofiltrze z dodatkiem nawozu mineralnego eliminacja *P. cactorum* była wysoka (na poziomie 89,7%) do czasu upływu 6 godzin, natomiast później wykazywała tendencję spadkową, osiągając po 48 godzinach wartość 6% (ryc. 2).



Rycina 4. Redukcja patogenów *P. alni* (P. a) w wyniku stosowania 3 wariantów filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB). Między redukcją *P. alni* a rodzajem filtra różnice są statystycznie istotne ($p=0.00000$)

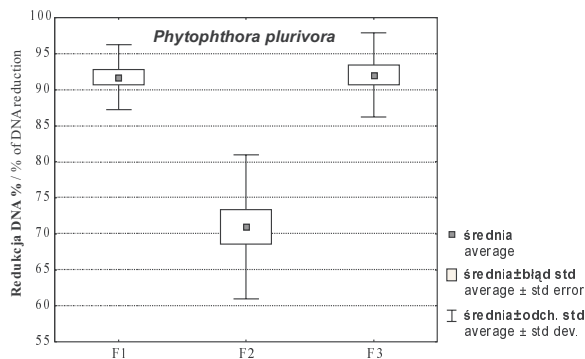
Figure 4. The reduction of pathogen - *P. alni* (Pa) by the application of three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. alni* and the type of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).



Rycina 5. Redukcja patogenów *P. cactorum* (P. c) w wyniku stosowania 3 wariantów filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB). Między redukcją *P. cactorum* a rodzajem filtra różnice są statystycznie istotne ($p=0.00000$).

Figure 5. The reduction of pathogen - *P. cactorum* (Pc) in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. cactorum* and the type of filter are statistically significant ($p=0.00000$).

Zmniejszenie ilości DNA *P. plurivora* w kontrolnym biofiltrze przebiegało wydajnie i równomiernie, osiągając po 48 godzinnej filtracji poziom 99% redukcji DNA patogenu. W biofiltrze z dodatkiem PCNB w czasie filtracji zanotowano niewielkie spadki wydajności filtracji po 3 i 12 godzinach do poziomów odpowiednio 93,9% i 82,8%, osiągając po 48 godzinach wysoką wydajność eliminacji patogenu z wody – 86,5%. W biofiltrze z dodatkiem nawozu mineralnego zanotowano zakłócenia efektywności filtracji *P. plurivora* po 3, 9 i 24 godzinach, kiedy to redukcja DNA wynosiła odpo-



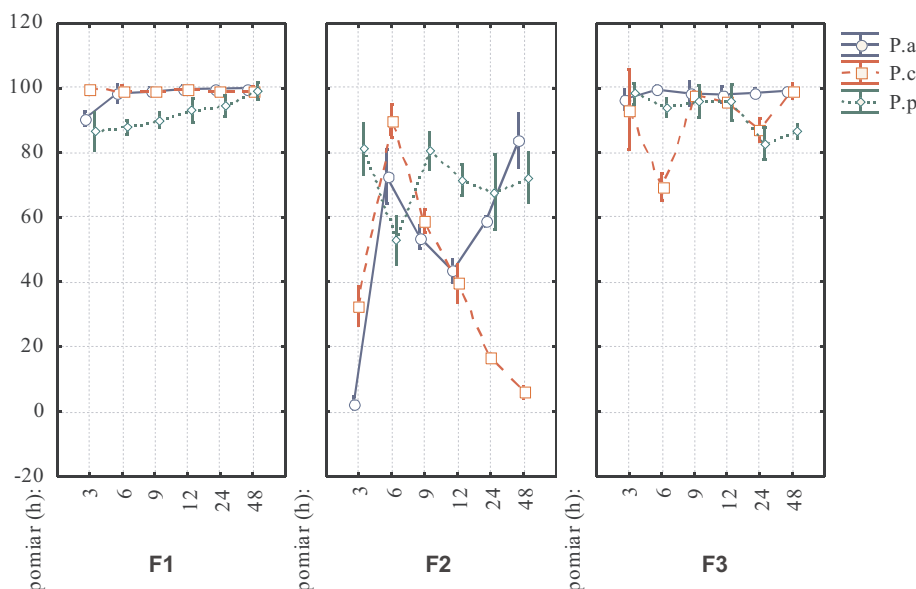
Rycina 6. Redukcja patogenów *P. plurivora* (*P. p*) w wyniku stosowania 3 wariantów filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB). Między redukcją *P. plurivora* a rodzajem filtra różnice są statystycznie istotne ($p=0.00000$)

Figure 6. The reduction of pathogen - *P. plurivora* (Pp) in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. plurivora* and the kind of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).

wiednio 52,9%, 71,4%, 67,7%, natomiast po 48 godzinach filtracji wzrosła do poziomu 72,3% (ryc. 3).

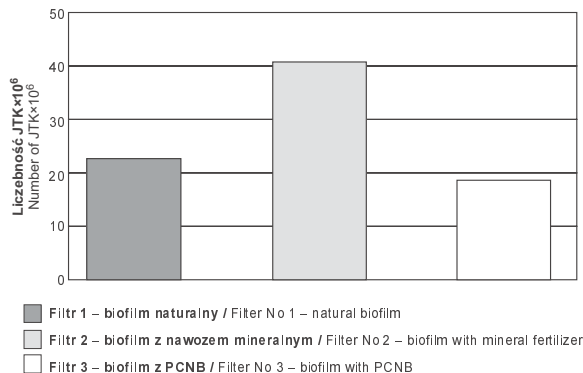
Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że skuteczność działania biofilmu w filtrach zależy od czasu pomiaru filtracji i od rodzaju zanieczyszczenia pochodzenia rolniczego. Po dodaniu nawozu mineralnego (F2) zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie efektywności filtracji niezależnie od testowanego gatunku patogenu (*P. alni*, *P. cactorum* i *P. plurivora*), dla $\alpha=0,05$ (ryc. 4, 5 i 6). W przypadku dodania PCNB do filtrowanej wody (F3) nie stwierdzono różnicy statystycznie istotnej od działania filtra kontrolnego (F1), obliczone za pomocą testu Tukeya dla prób niejednorodnych, $\alpha=0,05$. Skuteczność eliminacji badanych 3 gatunków fitopatogenów z filtrowanej wody ustabilizowała się i osiągnęła maksimum po 48 godzinach (ryc. 7).

Analiza ilościowa biofilmu pobranego z filtra kontrolnego nr 1 wykazała, że liczebność bakterii koptroficznych i oligotroficznych była porównywalna i wynosiła odpowiednio 23×10^6 i 21×10^6 JTK/1 g biofilmu (jednostek tworzących kolonie w 1 g biofilmu). W próbach biofilmu pobranych z filtra nr 2 po zastosowaniu nawozu mineralnego zaobserwowano o 77% więcej koptrofów i 33% oligotrofów (w porównaniu do kontroli), ich liczebność wynosiła odpowiednio: $40,8 \times 10^6$ oraz 28×10^6 . W próbach biofilmu po zastosowaniu PCNB zaobserwowano o 18% mniej koptrofów i o 17% mniej oligotrofów (w porównaniu do kontroli), ich liczebność wynosiła: $18,9 \times 10^6$ i $17,6 \times 10^6$ JTK/1 g biofilmu (ryc. 8, 9).



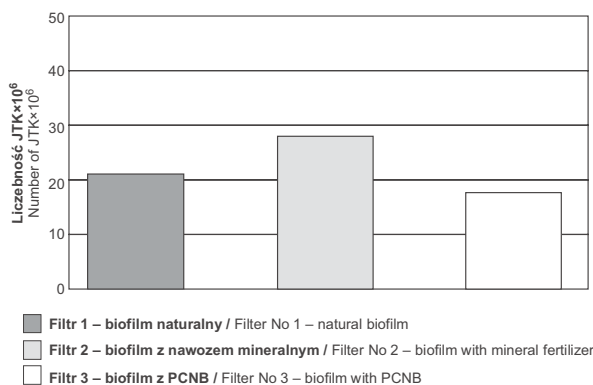
Rycina 7. Redukcja patogenów *P. alni* (*P. a*), *P. cactorum* (*P. c*) i *P. plurivora* (*P. p*) w czasie od 3 do 48 godzin dla 3 zastosowanych filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB)

Figure 7. The reduction of pathogens *P. alni* (Pa), *P. cactorum* (Pc) and *P. plurivora* (Pp) at the time of 3 to 48 hours for three of the filters F1 (control) F2 (phosphite) and F3 (PCNB).



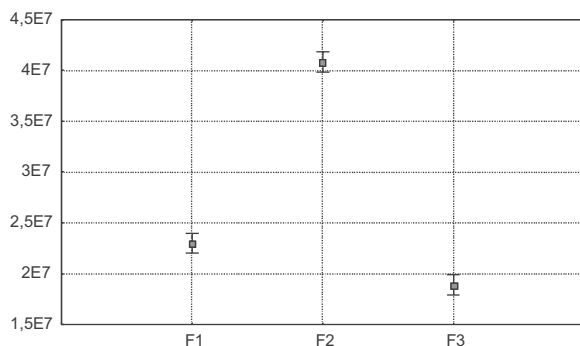
Rycina 8. Liczebność bakterii koptiotroficznych w próbach biofilmu pobranego z 3 wariantów filtrów SSF pracujących równolegle w szklarni IBL (n=3)

Figure 8. The number of copiotrophic bacteria in biofilm samples taken from three variants of SSF filters working in parallel in the IBL greenhouse (n = 3)



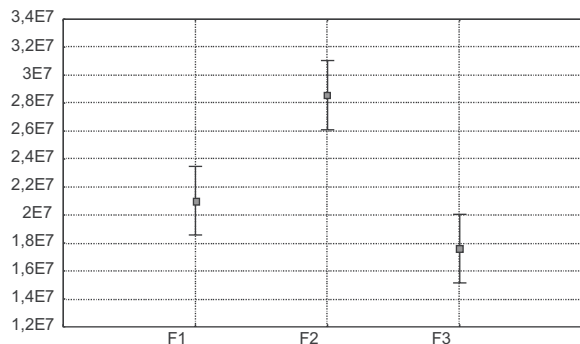
Rycina 9. Liczebność bakterii oligotroficznych w próbach biofilmu pobranego z 3 wariantów filtrów SSF pracujących równolegle w szklarni IBL (n=3)

Figure 9. The number of oligotrophic bacteria in biofilm samples taken from the three variants of SSF filters working in parallel in the Forest Research Institute (IBL) greenhouse (n = 3)



Rycina 10. Pomiar średniej ilości bakterii koptiotroficznych (kopio) ± S.E. w 3 wariantach filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB)

Figure 10. Measurement of the average number of copiotrophic bacteria (kopio) ± S.E. in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB).



Rycina 11. Pomiar ilości bakterii oligotroficznych (oligo) ± S.E. w 3 wariantach filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB)

Figure 11. Measurement the amount of oligotrophic (oligo) bacteria ± S.E. in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB).

Analiza statystyczna wykazała, że różnice pomiędzy średnimi ilościami bakterii koptiotroficznych a rodzajem filtra są statystycznie istotne ($p=0,00001$, dla $\alpha=0,05$) (ryc. 10) oraz że różnice między średnimi ilościami bakterii oligotroficznych a rodzajem filtra są statystycznie istotne ($p=0,04867$, dla $\alpha=0,05$) (ryc. 11).

W przypadku bakterii oligotroficznych wartości p są na granicy poziomu istotności (dla $p=0,05$).

4. Podsumowanie

Literatura przedmiotu dotyczy przede wszystkim budowy, działania i skuteczności filtrów piaskowych typu SSF w eliminowaniu fitopatogenów z wody. Niewiele prac badawczych opisuje modyfikacje działania biofilmów na skutek dodawania do filtrowanej wody substancji takich jak nawozy mineralne lub fungicydy.

W naszych doświadczeniach zanieczyszczenie filtrowanej wody substancjami pochodzenia rolniczego obniża wydajność pracy biofiltrów SSF, zakłócając efektywność eliminacji fitopatogenów. Zarówno nawóz mineralny, jak i PCNB wpłynęły na równowagę mikrobiologiczną biofilmu SSF. Zmienił się skład ilościowy oraz gatunkowy bakterii i grzybów mikroskopowych, co znajduje potwierdzenie w literaturze przedmiotu (Macedo et al. 2007; Barragán-Huerta et al. 2007; Davey, O'Toole 2000). Zaobserwowano, że obecność nawozu mineralnego w filtrowanej wodzie obniżyła bardziej wydajność eliminacji fitopatogenów przez SSF niż podczas filtracji wody z dodatkiem fungicydu PCNB.

Efektywność pracy biofilmów zależy od ich przestrzennej struktury oraz składu gatunkowego wspólnot mikroorganizmów je zasiedlających (Davey, O'Toole

2000). Oba te elementy, o ile nie zostaną naruszone, zapewniają prawidłowe funkcjonowanie ożywionych i nieożywionych elementów biofilmu jako całości, co jest zgodne z wynikami badań innych autorów (Lewandowski et al. 1993; Moller et al. 1996). W środowisku wodno-glebowym pod wpływem substancji mineralnych – biogennych – zawartych w nawozach następuje przegrupowanie zarówno ilościowe, jak i gatunkowe mikroorganizmów, przede wszystkim zaczynają namnażać się mikroorganizmy o wysokich wymaganiach pokarmowych, które są powszechne w środowisku naturalnym (Koch 2001). Są one biologicznie mniej aktywne niż mikroorganizmy o średnio i bardzo ubogich wymaganiach pokarmowych (Kuznetsov et al. 1979; Alabouvette 1986).

Na podstawie uzyskanych danych, ilości bakterii zasiedlających biofilm SSF, stwierdzono, że obecny w filtrowanej wodzie fungicyd (PCNB) prawdopodobnie zahamował rozwój grzybów mikroskopowych w normalnych warunkach chętnie zasiedlających biofiltr SSF. Grzyby mikroskopowe we wspólnocie mikrobiologicznej biofilmu odgrywają podwójną rolę, ponieważ produkują egzogenne substancje aktywne (enzymy) oraz ze względu na rozbudowaną strukturę plechy stanowią dodatkową barierę mechaniczną dla zanieczyszczeń niesionych z wodą przepływającą przez biofiltr (Wohanka 1995).

Zintegrowana ochrona szkółek leśnych została uprawnioną zarządzeniami prawnymi Komisji Europejskiej (UE) (Dyrektywa nr 2009/128/WE z dnia 21.10.2009 oraz Rozporządzenie nr 546/2011 z dnia 10.06.2011 dotyczące zintegrowanej ochrony roślin przed szkodnikami). Jej idea polega na komplementarnym stosowaniu wielu (lub wszystkich) możliwych metod ochrony roślin. Powstała ona w trosce o ochronę środowiska naturalnego w celu zmniejszenia udziału preparatów chemicznych (pestycydów), których pozostałości znajdują się w wodzie pitnej (Aslan 2005). W związku z powyższym, w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi opracowano projekt krajowego planu działania na rzecz ograniczania ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin na lata 2013–2017. Wykonane przez nas testy wykazały możliwość usuwania nawozu z wody za pomocą SSF, kosztem utraty sprawności filtrów w eliminowaniu fitopatogenów. Zjawiska tego nie zaobserwowano (różnica nieistotna statystycznie) w przypadku obecności fungicydu – PCNB, prawdopodobnie dlatego, że nie oddziałuje on tak silnie na bakterie biofilmu jak obecność nawozu mineralnego w filtrowanej wodzie. W przypadku obecności w wodzie zanieczyszczeń pochodzenia rolniczego należy liczyć się z pogorszeniem właściwości filtrujących biofilmów.

Powszechna w wodach powierzchniowych obecność fitopatogenów ma kluczowe znaczenie dla zdrowotności siewek, jeśli jest ona używana do podlewania roślin szkółkarskich. Bez uprzedniego filtrowania patogeny zostaną rozproszone po kwaterach szkółki. Warto przy tym zaznaczyć, że coraz powszechniejsze filtry piaskowe (ciśnieniowe) nie są tak skuteczne jak filtry biologiczne (SSF) ze względu na zbyt szybki przepływ wody przez złożę piasku. Mogą one jedynie przechwycić nasiona chwastów. Oferowane nowe technologie filtrów membranowych lub zastosowanie promieniowania UV są skuteczne lecz bardzo drogie. Natomiast stosowanie substancji chemicznych typu podchloryn sodu są sprzeczne z zasadami ochrony środowiska naturalnego (Wohanka 1995). Zasoby wodne w Polsce przypadające na jednego mieszkańca wynoszą jedną trzecią średniej europejskiej, dlatego w przyszłości woda pobierana ze studni głębinowych będzie przywilejem (odpowiednio opodatkowanym) lub też rozwijająca się międzynarodowa legislacja ochrony środowiska w ogóle zabroni jej używania do tego celu. Stąd wrośnie potrzeba korzystania z naturalnych wód powierzchniowych, pomimo że zawierają one wiele patogenów roślin i ludzi (bakterie chorobotwórcze). Szkółki posiadające odpowiednie systemy filtrujące będą do tego zadania lepiej przygotowane i staną się konkurencyjne na rynku produkcji roślin szkółkarskich.

Filtry piaskowe typu SSF nabierają w szkółkarstwie szczególnego znaczenia. W przyszłości powstaną gospodarstwa szkółkarskie z zamkniętym obiegiem wody, być może z zestawem filtrów do usuwania kolejno pozostałości pestycydów i nawozów, a następnie fitopatogenów. Zainstalowane zamknięte obiegi wody w szkółkach przyczynią się znacznie do jej oszczędności. Być może Lasy Państwowe już wkrótce pójdą śladem niemieckich szkółkarzy i zaplanują wybudowanie pierwszego pełnowymiarowego filtra typu SSF na terenie jednej ze szkółek leśnych w Polsce. Zainteresowane nadleśnictwa mogłyby wtedy korzystać z jej doświadczeń i naocznie przekonać się o skuteczności metod oczyszczania wody jako elementu zintegrowanej ochrony materiału rozmnożeniowego w praktyce szkółkarskiej. Pozwoli to na ograniczenie stosowania pestycydów do niezbędnego minimum i w ten sposób zminimalizuje presję na środowisko naturalne oraz będzie miało korzystny wpływ na ochronę bioróżnorodności środowiska leśnego.

5. Wnioski

1. Naturalne filtry piaskowe powolnego przesączania są skuteczne w usuwaniu patogenów z rodzaju *Phytophthora*, gdy woda przeznaczona do filtrowania

nie zawiera zanieczyszczeń pochodzenia rolniczego (nawozów mineralnych), za wyjątkiem fungicydu (PCNB).

2. Do zbiorników przechowujących wodę do podlewania roślin w szkółkach nie zaleca się dodawania nawozu zawierającego azot i fosfor, gdyż obniża to skuteczność działania biofilmu.

3. W przypadku dodawania do zbiornika nawadniającego nawozu mineralnego, woda przeznaczona do podlewania roślin powinna być filtrowana co najmniej 48 godzin.

4. Dodatek nawozu mineralnego (zawierającego azot i fosfor) oraz fungicydu (PCNB) powoduje zmiany w liczebności oraz w składzie bakterii zasiedlających biofilm SSF, co wpływa na efektywność eliminowania patogenów przez SSF.

5. Dodatek nawozu mineralnego skutkuje ponad dwukrotnym zwiększeniem liczebności bakterii w biofilmie, zarówno kopiotroficznych, jak i oligotroficznych, w porównaniu do stanu kontrolnego.

6. Dodatek PCNB wpływa na zmniejszenie liczebności zarówno bakterii kopiotroficznych, jak i oligotroficznych o prawie jedną piątą w porównaniu do kontroli.

Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pt. “Wpływ wybranych czynników środowiskowych na usuwanie fitopatogenów z wody”, umowa nr 7124/B/P01/2011/40.

Literatura

- Alabouvette C. 1986. *Fusarium*-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. *Agronomie*, 3: 273–284.
- Aslan S. 2005. Combined removal of pesticides and nitrates in drinking waters using biodenitrification and sand filter system. *Process Biochemistry*, 40(1): 417–424.
- Barragán-Huerta B. E., Costa-Pérez C., Peralta-Cruz J., Barrera-Corte J., Esparza-García F., Rodríguez-Vázquez R. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of

green bean coffee. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 239–244.

- Davey M. E., O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 847–867.
- Ehret D., Alsanus B., Wohanka W., Menzies J., G., Utkhed R. 2001. Disinfection of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie*, 21: 323–339.
- Koch A. L. 2001. Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 23: 657–661.
- Kubiak K., Oszako T. 2011. Filtry biologiczne jako metoda ochrony siewek przed patogenami w szkółkach leśnych. *Sylvan*, 155 (4): 228–235.
- Kuznetsov S. I., Dubinia G.A., Lapteva N.A. 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 33: 377–387.
- Lewandowski Z., Altobelli S.A., Fukushima E. 1993. NMR and microelectrode studies of hydrodynamic and kinetics in biofilms. *Biotechnology Progress*, 9: 40–45.
- Macedo A.J., Timmis K.N., Abraham W.R. 2007. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. *Environmental Microbiology*, 9(8): 1890–1897.
- Möller S., Pederson A.R., Ponulsen L.K., Arvin E., Molin S. 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Applied & Environmental Microbiology*, 62: 4632–4640.
- Runia W.T.H. 1995. A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. *Acta Horticulturae*, 382: 221–229.
- Wohanka W. 1995. Disinfection of recirculating nutrient solutions by slow sand filtration. *Acta Horticulturae*, 382: 246–255.

Materiały źródłowe

- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów.
- Rozporządzenie Komisji (UE) NR 546/2011 z dnia 10 czerwca 2011 r. wykonujące rozporządzenie (WE) nr 1107/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do jednolitych zasad oceny i udzielania zezwolenia na środki ochrony roślin.