

KATARZYNA ANNA KUBIAK, TOMASZ OSZAKO

Filtry biologiczne jako metoda ochrony siewek przed patogenami w szkółkach leśnych

Slow Sand Filter as a method of protection forest plants against phytopathogens in forest nurseries

ABSTRACT

Kubiak K. A., Oszako T. 2011. Filtry biologiczne jako metoda ochrony siewek przed patogenami w szkółkach leśnych. Sylwan 155 (4): 228-235.

Slow sand filtration (SSF) is a low-cost method of water disinfection that can be used as an alternative method of water irrigation treatment in nursery to control water-borne phytopathogens. Slow sand filtration relies on physical, chemical and biological activity in controlling plant pathogens. In a SSF, the filter bed is constructed of a medium-sand with the area which can be colonised by microorganisms – biofilm. This sand media also presents a physical barrier to fungal, bacterial and oomycetes plant pathogens. In the forest nursery Kiejsze an experimental slow sand filter was constructed to study the structure of a bacterial community suppressive to plant pathogens. The total bacterial community of an experimental SSF was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of partial 16S rRNA gene PCR products. Sequence analysis of DGGE bands from the SSF column indicated that a range of bacteria were present, among them similar to groups such as *alpha-Proteobacteria*, *delta-Proteobacteria*, *beta-Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacilli* and an uncharacterized environmental clone. This study describes the characterization of the microbial community of SSFs used for the treatment of irrigation water in the forest nursery. Using of natural SSF filters and manipulation of microorganisms in the biofilm may be a more reproducible control method of plant pathogens in the future.

KEY WORDS

forest nursery, Slow Sand Filter (SSF), *Phytophthora*, DNA isolation, biofilm, DGGE, PCR

ADDRESSES

Katarzyna A. Kubiak⁽¹⁾ – e-mail: katarzyna.kubiak82@gmail.com
Tomasz Oszako^(2, 3) – e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

⁽¹⁾ Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa

⁽²⁾ Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn

⁽³⁾ Zamięscowy Wydział Leśny; Politechnika Białostocka; ul. J. Piłsudskiego 8; 17-200 Hajnówka

Wstęp

Powolne filtry piaskowe (SSF) stosowane są od wielu lat do eliminacji ludzkich patogenów z wody pitnej. Wykorzystywane są także w ogrodnictwie jako metoda biologiczna do usuwania fitopatogenów z wody używanej do podlewania roślin (w hodowlach hydrofobowych z zamkniętym systemem obiegu wody). Oczyszczanie wody tą metodą jest najbardziej naturalnym i ekologicznym sposobem postępowania, który naśladuje procesy samooczyszczania zachodzące w przyrodzie, np. w ekosystemach rzecznych. Zastosowane rozwiązania technologiczne intensyfikują i ukierunkowują procesy biologiczne, aby eliminować patogeny uprawianych roślin.

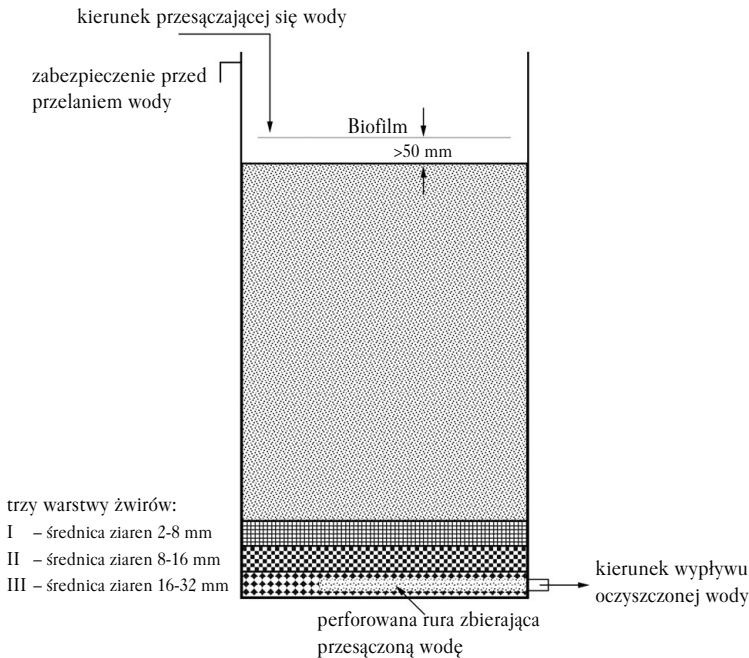
Dzięki współpracy z Nadleśnictwem Koło, w latach 2007-2008 przeniesiono doświadczenia z dziedziny ogrodnictwa i upraw szklarniowych do leśnej praktyki szkółkarskiej, projektując i budując prototypy filtrów na terenie szkółki leśnej Kiejnze [Małecka i in. 2008] (ryc. 1). Filtr wykonany z tworzywa sztucznego mrozoodpornego, zbudowany jest z pionowej „tuby” oraz wypełniającego ją złoża. Wypełniacz stanowią ułożone na sobie warstwy piasku i żwirów o różnej granulacji (ryc. 2). W powierzchniowej warstwie piasku, w czasie filtrowania wody, tworzy się swoista wspólnota mikroorganizmów, zatopiona w pozakomórkowym matriks, nazywana błoną biologiczną lub biofilmem. Davey i O’toole [2000] definiują ją jako wspólnotę mikroorganizmów, połączonych ze sobą zależnościami troficznymi i pozatrophicznymi, z ożywionymi lub nieożywionymi elementami środowiska. Z tego powodu filtr biologiczny musi funkcjonować przez pewien czas, aby odpowiednie mikroorganizmy zajęły w nim swoje miejsce. Zwykle mija około 2-3 tygodni, zanim filtr może być wykorzystany do oczyszczania wody. Ziarenka piasku są w tym przypadku jedynie podłożem i oferują powierzchnię do zasiedlenia przez różne organizmy. Efektywność usuwania patogenów z wody jest zatem przede wszystkim uzależniona od procesów mikrobiologicznych zachodzących w biofilmie i aktywności poszczególnych ogniw łańcucha troficznego [Davey, O’toole 2000]. Pomimo wielu badań, różnorodność bakterii zasiedlających biofilm jest wciąż niedostatecznie poznana. Wynika to z faktu, że zmienia się ona w czasie sezonu wegetacyjnego i może być różna w zależności od lokalnych warunków siedliskowych.



Ryc. 1.

System filtracyjny składający się ze zbiornika magazynującego wodę „surową” (1), dwóch filtrów piaskowych (2), dwóch zbiorników na wodę przefiltrowaną (3)

Filtration system contains storage tank for a raw water (1), two Slow Sand Filters (2), two tanks for filtered water (3)



Ryc. 2.

Schemat budowy powolnego filtra piaskowego [Alsanius i in. 2001]
Scheme of slow sand filter [Alsanius i in. 2001]

Celem niniejszej pracy jest zbadanie składu mikroorganizmów w biofilmach zbudowanych filtrów typu SSF oraz ich udział w procesie oczyszczania wody.

Materiały i metody

Obecność bakterii identyfikowano przy pomocy metod biologii molekularnej oraz izolowano na pożywkę. Do izolacji DNA wykorzystano zestaw Genomic Mini AX Bacteria firmy A&A Biotechnology. Procedurę izolacji wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, a otrzymane DNA oczyszczono zestawem Clean up firmy A&A Biotechnology (według protokołu). Powyższą procedurę – liza komórek, izolacja i oczyszczanie DNA – stosowano również do izolatów bakterii wyrosłych uprzednio na odżywczym agarze. Część kolonii z podłoża zestawonego pobierano plastikową, jałową szpatułą i umieszczano w 1,5 ml probówkach Eppendorfa.

Reakcja PCR do analizy DGGE została przeprowadzona ze starterami komplementarnymi do regionu V3 16S rRNA pomiędzy pozycjami 341 do 534 (odpowiednio pozycje w genomie *E. coli*) – 341 z 40 GC-resztami (5' CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGC-ACGGGGGGCCTACGGGAA-3') oraz 534 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') [Calvo-Bado i in. 2003]. Reakcja PCR do identyfikacji izolatów hodowlanych z biofilmu została przeprowadzona ze starterami komplementarnymi do regionu 16S rRNA pomiędzy pozycjami 11 do 907 (odpowiednio pozycje w genomie *E. coli*) – 11F 5' GTTTGATCMTGGCTCAG 3' 907 R 5' CCGTCAATTCMTTTGAGTTT 3'. Mieszanina reakcyjna o objętości końcowej 25 µl zawierała 2,5 µl 10× PCR bufor (Qiagen), 1,5 µl roztworu Mg (25 mM) (Qiagen), 0,4 µl mieszaniny dNTP (5 mM) (Qiagen), 0,25 µl roztworu startera 1 (10 µM), 0,25 µl roztworu startera 2 (10 µM), 0,04 U/µl Taq-polimeraza (5 U/µl), 5µl 25× Q bufor (Qiagen), 12,9 µl wody dejonizowanej oraz

1,0 µl DNA matrycowego (20-40 ng/ul). Reakcję PCR zaprojektowano następująco: denaturacja wstępna (w 95°C – 3 min) i następnie 35 cykli amplifikacji DNA w określonych warunkach (denaturacja w 95°C – 20 s, przyłączanie startera w 55°C – 30 s, wydłużanie startera w 72°C – 2 min, wydłużanie końcowe w 72°C – 7 min). Produkt PCR oczyszczono zestawem Clean up firmy A&A Biotechnology.

Rozdział produktu reakcji PCR prowadzono w żelu zawierającym 10% acrylamid (37,5:1 acrylamid-bisacrylamid) w obecności czynnika denaturującego (stężenie 40-60%) złożonego ze 100% denaturatu, 7M mocznika i 40% formamidu w urządzeniu Dcode Mutation Detection System (Bio-Rad). Gradient czynnika denaturującego sporządzono w 16 cm² żelu poliakrylamidowego o grubości 1 mm. Do dołków w żelu wprowadzono po około 300 ng/µl produktu PCR. Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach: napięcie 60V przez 18 h, temperatura 60°C w 7 litrach buforu 0,5×TBE (40 mM Tris-acetate, boric acid, EDTA). DNA w żelu wybarwiano bromkiem etydyny. Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym fragmenty DNA w postaci prążków wycinano i zawieszano w 100 µl wody dejonizowanej w probówkach Eppendorfa.

Izolowane z żelu fragmenty DNA sekwencjonowano w Zakładzie Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych IBL i Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie.

Wyniki i dyskusja

W celu przeanalizowania składu wspólnoty bakterii biofilmu SSF przeprowadzono PCR z użyciem pary starterów dla domeny *Bacteria* komplementarnych do regionu V3. Amplikon zawierający mieszaninę DNA środowiskowego poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym z mieszaniną czynników denaturujących: mocznika i formamidu (DGGE). Odzyskane z żelu fragmenty DNA o najintensywniejszym stopniu świecenia poddano sekwencjonowaniu. Dzięki tej technice wyodrębniono trzynaście fragmentów DNA o takiej samej długości, a różnym składzie nukleotydowym. Metody te pozwoliły na oznaczenie jedenastu szczepów bakterii występujących w biofilmie. Równolegle metodą posiewu powierzchniowego izolowano wyrosłe na agarze odżywczych kolonie bakterii obecne i być może dominujące w biofilmie. Wyizolowane z nich DNA poddano amplifikacji PCR z użyciem pary starterów (341F oraz 534R) powielających fragment liczący około 200 pozycji [Clavo-Bado i in. 2003]. Zsekwencjonowane produkty pozwoliły na identyfikację czternastu hodowlanych gatunków bakterii występujących w biofilmie. Wyniki tych analiz wskazują na gatunki bakterii, wcześniej opisywanych w próbach środowiskowych ekosystemów słodkowodnych i morskich oraz gleb [Zwart i in. 2002; Clavo-Bado i in. 2003]. Wśród zidentyfikowanych bakterii najliczniej występowały szczepy należące do typu *Proteobacteria* i klas: *Alphaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria*, dość licznie do typu *Actinobacteria*, mniej do typu *Firmicutes* oraz typu *Planctomycetes*. Wśród gatunków hodowlanych w biofilmie SSF dominują bakterie należące do typu *Actinobacteria*, natomiast wśród pozyskanych metodami bezpośrednimi opartymi na analizie 16S rRNA dominują gatunki należące do klasy *Alphaproteobacteria*.

Uzyskane wyniki dominacji gatunków w zależności od stosowanej metody znajdują potwierdzenie w literaturze. Park i in. [2007] analizując skład wspólnoty bakterii pozyskanych metodami pośrednimi (posiew powierzchniowy na agar odżywczy) w biofilmie powstałym w procesie oczyszczania ścieków organicznych w systemie biologicznych złóż płytowo-zanurzeniowych (rotating biological contactor, RBC) stwierdzili dominację bakterii należących do typu *Proteobacteria* (35,8%) i *Actinobacteria* (34%). Ci sami autorzy metodami molekularnymi (analiza 16S rDNA) zaobserwowali, że 43,3% bakterii należy do *Firmicutes*, 28,6% do *Proteobacteria*, a po 1,1% do *Planctomycetes*, *Actinobacteria* i *Nitrospira*.

Wcześniejsze badania [Małecka i in. 2008] nastawione były na stwierdzenie skuteczności biofiltrów zainstalowanych na szkółce leśnej w stosunku do wybranych fitopatogennych bakterii, grzybów i łęgniowców. Stwierdzono że SSF są skuteczną (100%) metodą eliminacji patogenów grzybowych (np. *Fusarium*) i łęgniowców (np. *Phytophthora* spp. i *Pythium* spp.) i w nieco mniejszym (od 81% do 100%) stosunku bakterii (*Xanthomonas hortorum* pv. pelargonii), w zależności od złoża wypełniającego filtr [Wohanka i in. 1999]. Obecnie, dzięki analizie składu biofilmu, poznaliśmy mikroorganizmy, dzięki którym prawdopodobnie następuje oczyszczanie biologiczne wody. Stwierdzona duża różnorodność organizmów w wierzchniej, kilkucentymetrowej warstwie piasku (biofilmie) sprawia, że to właśnie tam następuje główny proces oczyszczania (usuwania fitopatogenów). Przepływające zarodniki i strzępki patogenów zostają aktywnie zatrzymywane przez strukturę biofiltra. Z tego względu przepływ filtrowanej wody musi być wystarczająco wolny, aby biofilm zatrzymał niebezpieczne zanieczyszczenia biologiczne. Zwykle prędkość ta ustalana jest na poziomie 150 (max 200) l/h. W badanym filtrze wynosiła 90 l/h [Małecka i in. 2008]. Jest to podstawowa cecha odróżniająca filtry piaskowe typu SSF od używanych jako zaporę mechaniczną i charakteryzujących się dużym przepływem, produkowanych i instalowanych w Polsce (np. na terenie szkółki Nadleśnictwa Cewice). Te ostatnie charakteryzują się właściwościami oczyszczania wody wynikającymi głównie z funkcji mechanicznych. Jest wątpliwe, aby sporangia (wielkości kilkudziesięciu mikronów), a tym bardziej zarodniki (kilku mikronów), zostały zatrzymane przez filtry o przepływie wody szybszym niż 200-400 l/m² powierzchni filtracyjnej/h [Wohanka i in. 1999]. W takim przypadku zagrożenie infekcjami dla roślin podlewanych wodą pochodzącą z naturalnych ujęć jest bardzo wysokie. Wykonane analizy cieków wodnych w ramach innych badań wykazały obecność patogenicznych łęgniowców rodzaju *Phytophthora*, takich jak *P. citricola*, *P. cambivora*, *P. alni*, *P. gonapodyides*, *P. cryptogea* [Oszako i in. 2008; Orlikowski i in. 2008a, b; Orlikowski, Ptaszek 2009]. W sąsiedztwie wielohektarowych szkółek ozdobnych stwierdzono nawet zarodniki organizmu kwarantannowego – *P. ramorum* [Orlikowski i in. 2007]. Szkółki są zarówno miejscem, w którym dochodzi do infekcji sadzonek [Jung, Blaschke 2006], jak i jedyną szansą podjęcia jeszcze środków zaradczych. Gdy dojdzie do wysadzenia zakażonych sadzonek na uprawach lub w drzewostanach, jest już za późno na próby powstrzymania chorób. Przekonano się o tym, gdy olsze zakażone *P. alni* w niemieckich szkółkach wielkoobszarowych zostały wysadzone wzdłuż rzek (w celu umocnienia brzegów), co umożliwiło rozprzestrzenienie się tego patogena z prądem wody na terenie całej Bawarii [Jung 2008]. Również i w Polsce od kilku lat zjawisko zamierania olszy rozprzestrzenia się głównie wzdłuż cieków wodnych. Podjęte badania pozwoliły stwierdzić w wodzie obecność nie tylko wspomnianego patogena olszy, ale także wielu organizmów po raz pierwszy stwierdzonych w Europie, np. *Pythium sterilum*, *Pythium quercum* czy *Pythium spiculium* [Belbahri i in. 2006a-c]. Na terenie Nadleśnictwa Koło, w rzece Ner zalewającej okresowo obumierający drzewostan olszowy, stwierdzono po raz pierwszy na świecie nowy gatunek *P. polonica* [Belbahri i in. 2006c].

Zidentyfikowane w biofilmach mikroorganizmy, jako najważniejszy element biofilmu powierzchniowych filtrów piaskowych SSF, mogą odegrać zasadniczą rolę w ochronie materiału rozmnożeniowego, który powinien być wolny od chorób [Ustawa... 2001, art. 41]. W badanym biofilmie SSF oznaczono szczepy bakterii należące do typu *Proteobacteria* z rodzajów *Acinetobacter* oraz *Caulobacter* sp. (klasa *Alphaproteobacteria*) oraz *B. amyloliquefaciens* oraz *Bacillus* sp., co jest zgodne z danymi Park i in. [2007]. Ponadto w biofilmie stwierdzono obecność *Porphyrobacter* sp., wcześniej zidentyfikowanego w biofilmie SSF przez Clavo-Bado i in. [2003] oraz *Rhodopseudomonas*

palustris, uprzednio znalezionej przez Xu i in. [1996]. Obecność *Methylobacterium* sp. w biofilmie SSF była wcześniej stwierdzona w systemach oczyszczających wodę pitną przez Simões i in. [2009]. Obecność *Pseudomonas* sp. oraz *P. stutzeri* (klasa *Gammaproteobacteria*) w biofiltrze została wcześniej obserwowana przez Zellner i in. [1995]. Bakterie należące do typu *Actinobacteria* są powszechne w ekosystemach słodkowodnych i glebach rolniczych [Zwart i in. 2002]. W badanym biofilmie SSF stwierdzono obecność szczepów należących do rodzajów *Actinobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* (*M. luteus*, *Micrococcus* sp.), *Microbacterium* (*M. foliorum*) i *Streptomyces* (*S. avermitilis*). Ich obecność w SSF została stwierdzona przez odpowiednio Manage i in. [2010], Kim i in. [2005], Gajewską i Cieniek [2009] oraz Rickarda i in. [2004].

Wnioski

- ✦ Analiza biofilmu powolnych filtrów piaskowych metodami biologii molekularnej oraz klasyfikacyjnej pozwoliła wyróżnić w jego składzie przedstawicieli domeny *Bacteria* występujących z największą liczebnością oraz pełniących prawdopodobnie kluczową rolę w usuwaniu fitopatogenów z przepływającej przez filtr wody.
- ✦ Wyizolowane szczepy stanowią materiał do dalszych badań nad biopreparatami w ochronie roślin szkółkarskich. Na szczególną uwagę zasługują przedstawiciele należący do rodzaju *Pseudomonas* lub *Bacillus*, które wykorzystywane są dotychczas w biopreparatach przeznaczonych do biologicznej ochrony roślin.
- ✦ Poznanie składu biofilmu jest kluczowe w konstruowaniu nowych filtrów do biologicznego oczyszczania wody dla potrzeb gospodarki leśnej.

Literatura

- Alsanius B. W., Ehret D., Ng K., Wohanka W. 2001. Slow filtration for disease control. *Greenhouse Canada* 1: 20-26.
- Belbahri L., Calmin G., Oszako T., Moralejo E., Sanchez-Hernandez E., McLeod A., Descals E., Lefort F. 2006a. New *Pythium* species: *Pythium quercum*, *Pythium sterilum*, *Pythium spiculum*. W: Evans H. F., Oszako T. [red.]. *Alien Invasive Species and International Trade*. Warszawa, Wydawnictwo IBL
- Belbahri L., Calmin G., Sanchez-Hernandez E., Oszako T., Lefort F. 2006b. *Pythium sterilum* sp. nov. isolated from Poland, Spain and France: its morphology and molecular phylogenetic position. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 209-214.
- Belbahri L., Moralejo E., Calmin G., Oszako T., Garda J. A., Descals E., Lefort F. 2006c. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *FEMS Microbiol. Lett.* 261: 165-174.
- Calvo-Bado L. A., Pettitt T. R., Parsons N., Petch G. M., Alun J., Morgan W., Whipps J. M. 2003. Spatial and Temporal Analysis of the Microbial Community in Slow Sand Filters Used for Treating Horticultural Irrigation Water. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2116-2125.
- Davey M. E., O'toole G. A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4): 847-867
- Gajewska J., Cieniek K. 2009. Identyfikacja mikroorganizmów tworzących biofilmy na filtrach basenowych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 41: 310-321.
- Jung T. 2008. Widespread *Phytophthora* infestations of nursery stock in Central Europe as major pathway of *Phytophthora* diseases of forests and semi-natural ecosystems. 3rd International Workshop *Phytophthora/Pythium* and related genera. 9th Congress of Plant Pathology, Turin, Italy, August 24-29, 2008.
- Jung T., Blaschke M. 2006. *Phytophthora* dieback of alders in Bavaria: distribution, pathways and management strategies. W: Brasier C. M., Jung T., Obwald W. [red.]. *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Proceedings of the 3rd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, 11-17 Sept. 2004, Freising, Germany. Forest Research, Farnham, Surrey, UK. 61-66.
- Kim S. I., Kim S. J., Nam M. H., Kim S., Ha K. S., Oh K. H., Yoo J. S., Park Y. M. 2002. Proteome analysis of aniline-induced proteins in *Acinetobacter kwoffii* K24. *Current Microbiology* 44 (1): 61-66.
- Małecka M., Oszako T., Gąszczyk K., Kubiak K., Hilszczańska D., Sierota Z., Kalaji H., Cordier T., Belbahri L. 2008. Filtiry w zamkniętym obiegu wody w szkółkach leśnych jako metoda eliminowania z materiału sadzeniowego organizmów pasożytniczych i kwarantannowych. Dokumentacja naukowa IBL, Sękocin Stary.

- Manage P. M., Edwards C., Lawton L. A. 2010. Bacterial Degradation of Microcystin. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Biological Responses to Contaminants: 97-104.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M. 2009. Rola chwastów ruderalnych i wody w przeżywalności i rozprzestrzenianiu *Phytophthora cryptogea* w środowisku. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 49 (3): 1085-1090.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Trzewik A., Orlikowska T. 2007. Occurrence of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* species in nurseries, trade stands, forests and water. Journal of Plant Protection Research 47 (4): 453-463.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2008a. Współzależność pomiędzy źródłem wody i porą roku a występowaniem *Phytophthora* spp. w środowisku. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 48 (1): 246-251.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2008b. Water as the source of *Phytophthora* species in rivers and their pathogenicity to some plants. Ecol. Chem. Eng., A 15: 31-35.
- Oszako T., Orlikowski L. B., Gąszczyk K. 2008. Strategia postępowania ochronnego w szkółkach i drzewostanach zagrożonych przez fitoftorozę – nową chorobę wielu gatunków drzew leśnych. Dokumentacja naukowa IBL, Sękocin Stary.
- Park S. J., Yoon J. C., Shin K-S., Kim E. H., Yim S., Cho Y-J., Sung G. M., Lee D-G, Kim S. B., Lee D. U., Woo S-H., Koopman B. 2007. Dominance of Endospore-forming Bacteria on a Rotating Activated *Bacillus* Contactor Biofilm for Advanced Wastewater Treatment. The Journal of Microbiology 45 (2):113-121.
- Rickard A. H., McBain A. J., Stead A. T., Gilbert P. 2004. Shear Rate Moderates Community Diversity in Freshwater Biofilms. Applied & Environmental Microbiology 70 (12): 7426-7435.
- Simões C. L., Simões M., Vieira M. J. 2009. Susceptibility of drinking water biofilm bacteria to sodium hypochlorite. European Congress on Microbial Biofilms Eurobiofilms 2009: book of abstracts. 124-125.
- Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o leśnym materiale rozmnożeniowym. Dz.U. 2001 nr 73 poz. 761.
- Wohanka W., Luedtke H., Ahlers H., Luebke M. 1999. Optimization of slow filtration as a means for disinfecting nutrient solutions. Acta Horticulturae 481: 539-544.
- Xu P., Qian X. M., Wang Y. X., Xu Y. B. 1996. Modelling for waste water treatment by *Rhodospseudomonas palustris* Y6 immobilized on fibre in a columnar bioreactor. Applied Microbiology & Biotechnology 44 (5): 676-682.
- Zellner G., Feuerhake E., Jördening H. J., Macario A. J. L., Conway de Macario E. 2004. Denitrifying and methanogenic bacteria in the biofilm of a fixed-film reactor operated with methanol/nitrate demonstrated by immunofluorescence and microscopy. Applied & Environmental Microbiology 43 (3): 566-571.
- Zwart G., Crump B.C., Kamst-van Agterveld M., Hagen F., Han S-K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. Aquatic Microbial Ecology 28: 141-155.

SUMMARY

Slow Sand Filter as a method of protection forest plants against phytopathogens in forest nurseries

Avoiding plant diseases in nurseries became an important issue these days because of the fact that a retail trade of plant protection products decreased significantly on European market. The result of the current policy launched in European Union, which introduced an obligation to test the environmental impact of any active chemical compound, caused restrictions of the fungicides list available to control forest disease. Slow Sand Filters (SSFs) successfully introduced in horticulture are proposed to be used in forestry in order to protect seedlings against water-borne pathogens. The most important part of each SSF is its biofilm microbial community, which consists of bacteria, fungi and algae. The aim of this work was to study the biodiversity of biofilms and to identify some crucial microorganisms taking part in water purification process. The paper proposes molecular techniques like PCR amplification of 16S rRNA genes and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study bacterial communities. Bacteria such as alpha-, beta- and delta-Proteobacteria, Acidobacterium, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria and Firmicutes were found in the biofilm. The paper describes the performance of microorganisms living in SSFs being used for biological water treatment in forest nurseries. An innovative

metod of diseases control applying microorganisms, which are antagonistic or suppressive to phytopathogens maybe the part of an integrated and reproducible method largely used in the future forest practice.