

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. lęgniowców 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 pochodziły 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 lęgniowców do wody system filtracyjny pracował przez dwie doby bez przerwy. Woda z lęgniowcami 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 lęgniowców 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 lęgniowców. 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>	CTGTGCGATGTCAAAGTTG ATGGGGTTAAAAGATAAGGG	[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 lęgniowców 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.

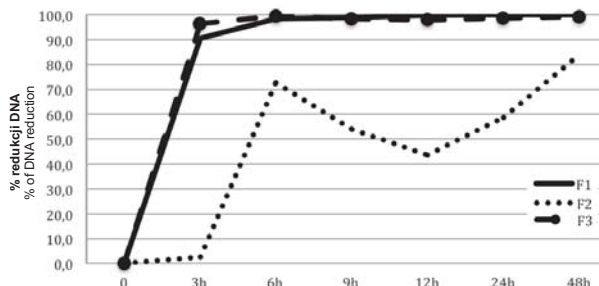
Statystyczne różnice pomiędzy średnimi wartościami ilości bakterii koptroficznych (kopio) i oligotroficznych (oligo) we wszystkich wariantach biofilmów w filtrach F1, F2 i F3 testowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie STATISTICA v.8.0.

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.

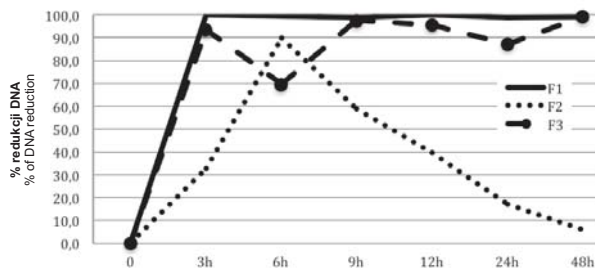
Redukcja ilości DNA *P. alni* w kontrolnym biofiltrze oraz w biofiltrze z dodatkiem PCBN przebiegała równomiernie i wydajnie, tzn. ilość DNA spadała wraz z wydłużaniem się czasu filtracji, osiągając po 48 godzinnej filtracji 99,9% i 99,1% redukcji. Natomiast w biofiltrze z dodatkiem nawozu mineralnego 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).



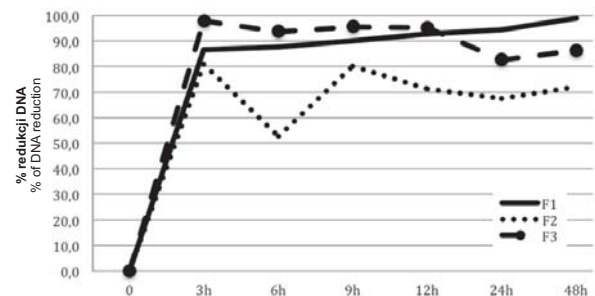
Rycina 1. Zmniejszenie ilości DNA *P. alni* (w %) w 3 wariantach biofiltrów SSF w czasie 48 godzinnej filtracji wody inokulowanej fitopatogenami

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

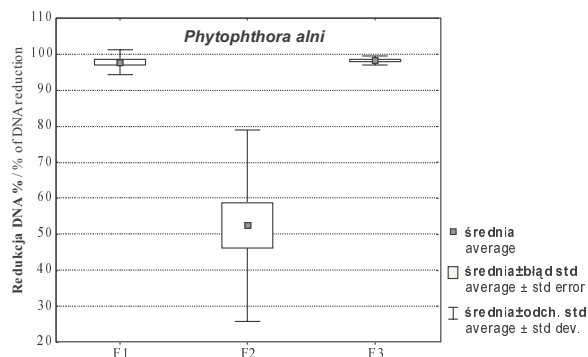
Figure 2. Reduction of *P. cactorum* DNA (in %) in three variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens



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

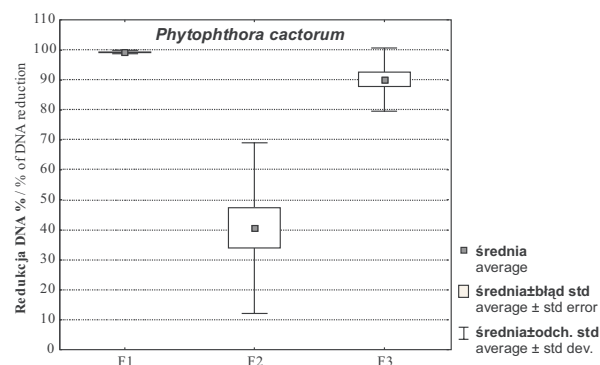
Figure 3. Reducing the amount of *P. plurivora* DNA (in%) in 3 variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens

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 ($p=0.00000$)

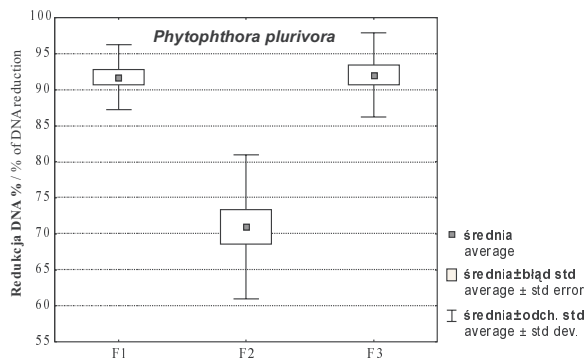
Figure 4. The reduction of pathogen - *P. alni* (Pa) by the application of three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite) and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. alni* and the type of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).



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 PCBN 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-



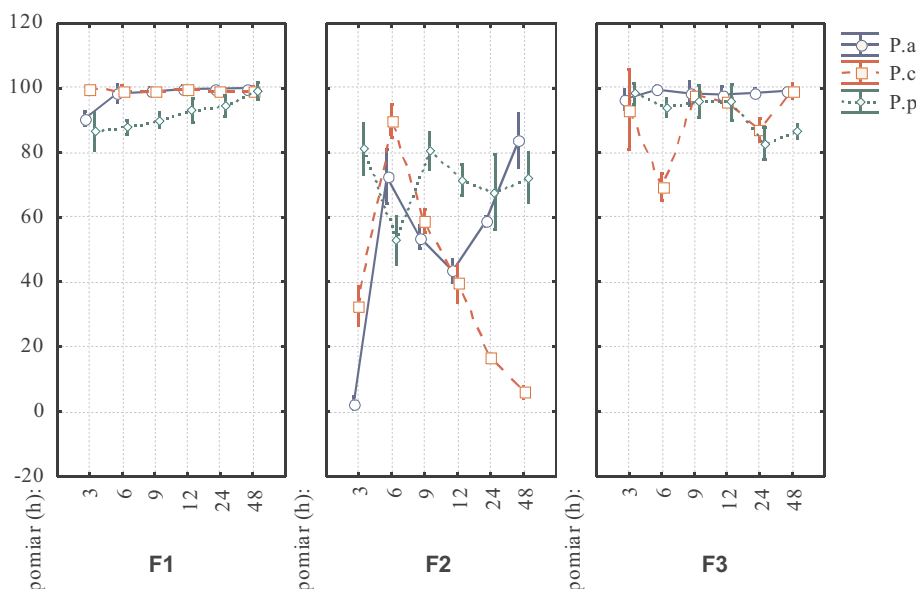
Rycina 6. Redukcja patogenów *P. plurivora* (*P. p*) w wyniku stosowania 3 wariantów filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB). Między redukcją *P. plurivora* a rodzajem filtra różnice są statystycznie istotne ($p=0.00000$)

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).

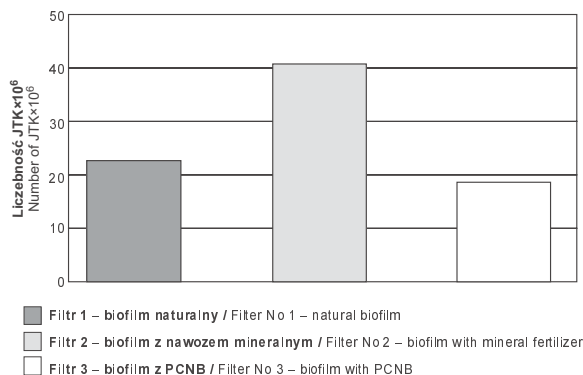
Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że skuteczność działania biofilmu w filtrach zależy od czasu pomiaru filtracji i od rodzaju zanieczyszczenia pochodzenia rolniczego. Po dodaniu nawozu mineralnego (F2) zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie efektywności filtracji 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).



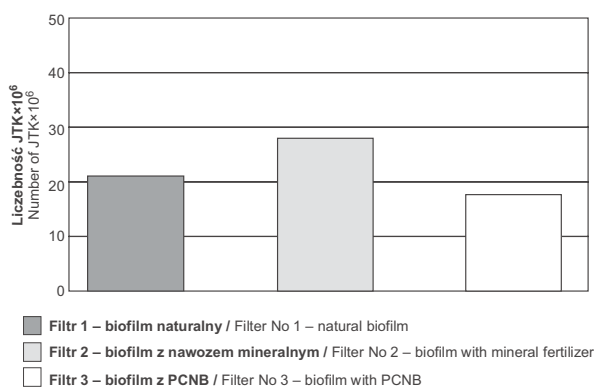
Rycina 7. Redukcja patogenów *P. alni* (*P. a*), *P. cactorum* (*P. c*) i *P. plurivora* (*P. p*) w czasie od 3 do 48 godzin dla 3 zastosowanych filtrów: F1 (kontrola), F2 (fosforyn) i F3 (PCNB)

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).



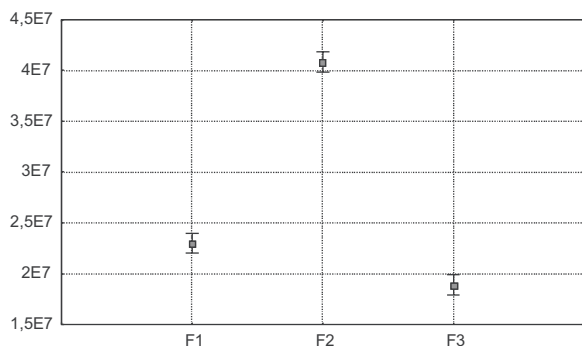
Rycina 8. Liczebność bakterii koptiotroficznych w próbach biofilmu pobranego z 3 wariantów filtrów SSF pracujących równolegle w szklarni IBL (n=3)

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)



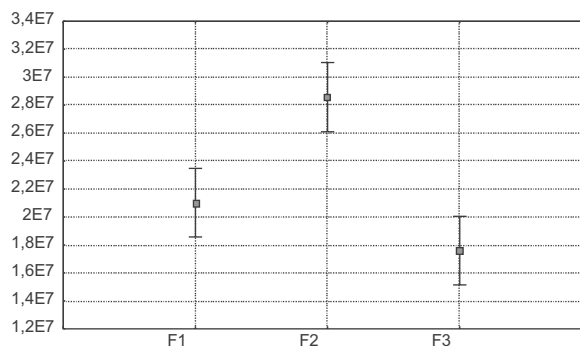
Rycina 9. Liczebność bakterii oligotroficznych w próbach biofilmu pobranego z 3 wariantów filtrów SSF pracujących równolegle w szklarni IBL (n=3)

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

- Alaboouvette 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., Utkhede 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.

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 Forest Research Institute, Department of Forest Protection, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary, 05-090 Raszyn, Poland;

² Warsaw University of Life Sciences, Faculty of Agriculture and Biology, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland;

³ Forest Research Institute, Department of Silviculture and Genetics, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary, 05-090 Raszyn, Poland.

✉ Tel. + 48 22 715 38 23, fax. +48 22 715 05 57, 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. Introduction

Taking up water from natural surface water intakes (waterways) and its use for watering plants in nurseries, is risky because of spreading phytopathogens and the development of many plant diseases (Runia 1995; Wohanka 1995; Ehret et al., 2001). Water from nearby lakes and ponds is most often used for irrigation of nurseries. Frequently, these shots are located in the catchment area of the land used for agriculture, and that is why they are mostly contaminated with phytopathogens and products originating from agricultural sources (fertilizers, pesticides). Improper or excessive use of

chemical plant protection products involves numerous risks, including contamination of the environment (residue of plant protection products), reduction of biodiversity and occurrence of resistant organisms, harmful to plants.

Slow sand filters with biological membrane (biofilm) are designed to eliminate pathogens from water (Kubiak, Oszako 2011), among others, oomycetes belonging to the genus *Phytophthora*, which affect plants for plantings. Phytopathogens removal efficiency through filters depends on their types and activity of microbial processes occurring in their biofilters (Davey and O'toole 2000), which are also affected by anthropogenic pollution (e.g., caused by agricultural activities).

The aim of the study was to assess the impact of fertilizer (N) and fungicide (PCNB) on the effectiveness of working of slow sand filters (SSF) in the removal of phytopathogens from water used for plants watering. The analysis of the impact of water pollution (e.g., fertilizer), for quantitative composition of bacteria colonizing the biofilms of filters being used for watering plants in nurseries, was carried out too.

2. Materials and Methods

Analysis of the effectiveness of the elimination of phytopathogens by biofilters (SSF)

Was prepared in three variants. A) Biofilter 1 – control (natural); B) biofilter 2 – enriched with mineral fertilizer (in the amount of 55 ml/40 l of water with the composition as follows: total nitrogen – 3%, nitrate nitrogen – 1%, urea nitrogen – 2%, phosphorus pentoxide – 5%, potassium oxide – 7%, boron – 0.02%, copper – 0.008, iron – 0.03%, manganese – 0.015%, molybdate – 0.002%, zinc – 0.015%); C) biofilter 3 – containing additive of 1 g fungicide (PCNB) dissolved in 50 ml of 96% ethanol (fig. 1). Pure cultures of *Phytophthora alni*, *P. plurivora*, and *P. cactorum* were added to the container where 120 l of tap water was accumulated. Isolates that originated from the collection of Forest Research Institute (IBL) were incubated for 4 weeks in the dark at room temperature, growing on the liquid vegetable medium (V8). The day before the filtration had started, the above cultures were transferred for 24 hours to the temperature

of 4°C (to initiate spores production), and then were homogenized and mixed together in equal volumes. After adding the mixture of oomycetes to tap water, the filtration system worked for two days without any break. The water was pumped out in parallel to the three filters (SSF) having different biofilm variants: filter 1 (F1) – biofilm control, filter 2 (F2) – a biofilm with a mineral fertilizer, and filter 3 (F3) – biofilm with PCNB. Samples of water were collected prior to and during the filtration at specified intervals (3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours after the filtration had started). Water samples were collected into sterile flasks (1 l of volume) from water storage tank (to determine the amount of pathogen DNA prior to filtration), and directly from filtrates (to compare the amount of pathogen DNA after filtration). The isolation of genomic DNA, and quantitative analysis of selected oomycetes species by qPCR (real-time PCR) allowed us to evaluate the presence of pathogen DNA in both unfiltered water and filtrates.

Preparation of water samples for analysis of molecular qPCR

Water samples were filtered twice with a vacuum pump by a Millipore membrane filter (47 mm Ø) (Millipore ®) with the pore diameter of 11 microns; the filtrate was further filtered through a membrane filter with a pore diameter of 5 mm in order to retain the spores and mycelia fragments of oomycetes. Then, the membrane filter with the sludge was placed in Eppendorf tubes to which 2 ml of sterile and distilled water was added, and the water was shaken for 60 min at room temperature at a speed of 1400 rpm. The suspension thus obtained was centrifuged for 15 min at 13 000 rpm; the filter was removed and the precipitate was collected at the bottom and treated as a starting material. DNA isolation was performed using a set of GenElute PLANT GENOMIC DNA Miniprep Kit from Sigma Aldrich according to the manufacturer's instructions with some modifications. Namely, during the cell lysis, 20 µl of glass beads was added to Eppendorf tubes containing the precipitate of water and shaken with lysis buffer for 15 min at 65°C (1400 rpm), and then for 15 min at room temperature under manual MoBio vortexing at maximum speed; the action was repeated twice. Isolated genomic DNA was purified by Clean Up kit A & A Biotechnology and separated by electrophoresis in 1% agarose gel.

Quantitative analysis – qPCR

In order to determine the presence and to estimate the DNA quantity of selected oomycetes species (before and after filtration), both molecular primers and TaqMan probes were used (tab. 1). Each sample was analyzed

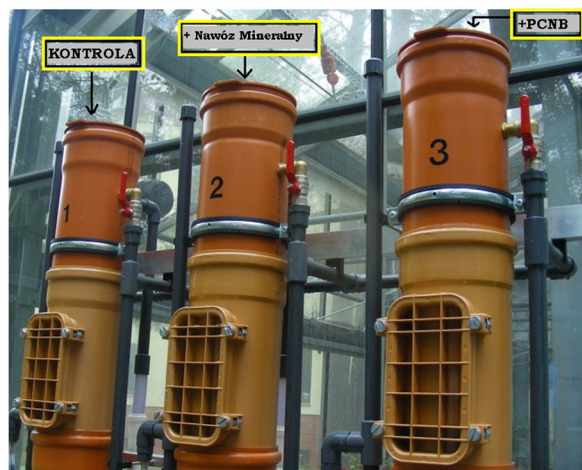


Photo 1. Prototypes of Slow Sand Filters installed in Forest Research Institute greenhouse

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

Species	Sequences of starters	Probe of TaqMan type
<i>Phytophthora alni</i>	CTGTCGATGTCAAAGTTG ATGGGTTTAAAGATAAGGG	[HEX]ACCCAAACGCTCGCCATGATA[HBQ1]
<i>Phytophthora cactorum</i> :	ACGTGAACCGTTTCAAAC CAGCCGCCAACATAAAG	[TET]CAGCCGCCACCAGACAAGAC[HBQ1]
<i>Phytophthora plurivora</i>	CCGTATCAACCCTTTTAG GCAGTATAATCAGTATTGTAGA	[6FAM]CCCAGACCGAAGTCCAAACAT[HBQ1]

three times, and therefore the result is the average of these three replicates. The composition of the qPCR reaction mixture to a volume of 20 μ l was as follows: 10 μ l of mixture of Lumino Ct, 2 μ l primer mixture (10 mM each), 2 μ l probe (*P. alni* – 5 mM, *P. cactorum* – 10 mM, *P. plurivora* – 1 mM), 2 μ l of DNA (approximately 20 ng), 4 μ l of MilliQ-water. Quantitative PCR reaction consisted of the following cycles: denaturation initial – 94°C for 3 min, amplification – 40 cycles, denaturation – 94°C for 30 s, primer attachment of – 55°C for 30 s, elongation of the primer – 72°C for 30 s. The obtained quantitative results were statistically analyzed. The differences between the mean values of respondents reduction of pathogens in all variants of biofilms in filters F1, F2, and F3 were tested using multivariate ANOVA in STATISTICA v.8.0, assuming $\alpha = 0.05$.

Analysis of the quantitative composition of the biofilm colonizing bacteria SSF

In order to assess the presence of oligotrophic and copiotrophic bacteria in the biofilm, the microbial analysis was performed by dilution and culture on solid media. 1 g of biofilm from each variant of SSF biofilter was taken and transferred to 9 ml of sterile 0.85% saline, and then the whole product was shaken for 15 min in a bath. In the succeeding stage, a further series of dilution of the parent sample in the tubes containing 9 ml of sterile saline solution was done, transferring 1 ml of the previous dilution to the next one. Then, inoculation by bacteria was done using 0.1 ml of the suspension on nutrient agar (for copiotrophic bacteria) or nutrient agar diluted 1000-fold (for oligotrophic bacteria) from a dilution series (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) in triplicates. After the incubation process, which was done at room temperature for 3 days (copiotrofs) and 7 days

(oligotrofs) the number of grown colonies was counted. Statistical differences between mean values for copiotrophic bacteria (copio) and oligotrophic (oligo) in all variants of biofilms (in filters F1, F2, and F3) were tested using univariate ANOVA in STATISTICA v.8.0.

3. Results

Quantitative results obtained using qPCR with TaqMan probes provided data on the basis of which the degree of elimination of pathogens was expressed as reduced content of their DNA in the filtered water. DNA reduction of *P. alni* in the control biofilter and biofilter with PCBN proceeded smoothly and efficiently, namely the quantity of DNA was decreasing with increasing time of filtration, and reached the high level of DNA reduction (99.9% and 99.1% respectively) after 48 hour of filtration. However, in the biofilter with fertilizer, the elimination *P. alni* was significantly affected. Till 6th hour of continuous filtration, the DNA reduction of *P. alni* was recorded at the level of 72.5%, and subsequent measurements after 9 and 12 hours showed changes in the effectiveness of the reduction to only 43.5%, then after 24 and 48 hours the filtration efficiency again increased by almost half, and reached after 48 hours, the level of 83.7% (fig. 1).

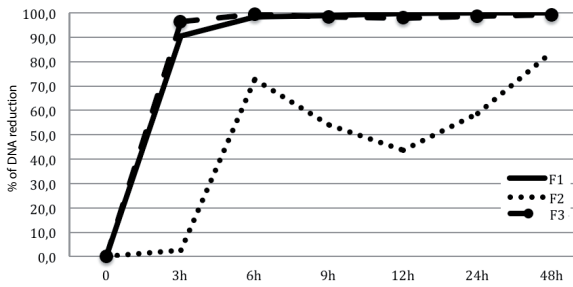


Figure 1. Reducing the amount of DNA of *P. alni* (in%) in three variants of SSF biofilter during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens

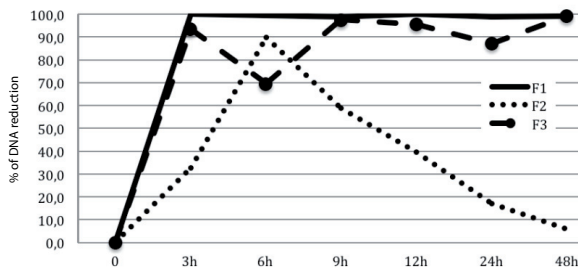


Figure 2. Reduction of *P. cactorum* DNA (in %) in three variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens

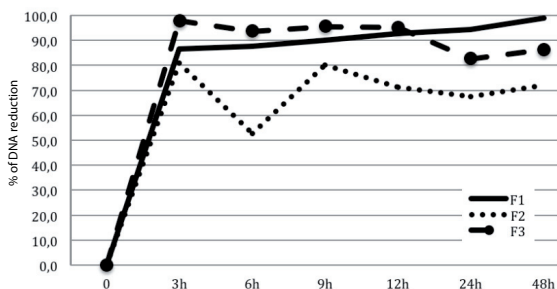


Figure 3. Reducing the amount of *P. plurivora* DNA (in%) in 3 variants of SSF biofilters during 48 hours of water filtration inoculated with phytopathogens

Reducing the amount of *P. cactorum* DNA in the control biofilter proceeded efficiently and evenly and reached the level of 99.1% reduction of pathogen DNA after 48 hours of filtration. The biofilter with PCBN after two days of filtration, to reduce the level of DNA, was also high at 99%. However, after 6 and 24 hours, there was a slight decrease in filtration efficiency for the level of 69.4% and 86.9%, respectively. In the biofilter with mineral fertilizer, the elimination of *P. cactorum* was high (at 89.7%) until the expiry of six hours, and then showed

a tendency to decrease, reaching the value only 6% after 48 hours (fig. 2).

Reducing the amount of *P. plurivora* DNA in the control biofilter proceeded efficiently and evenly

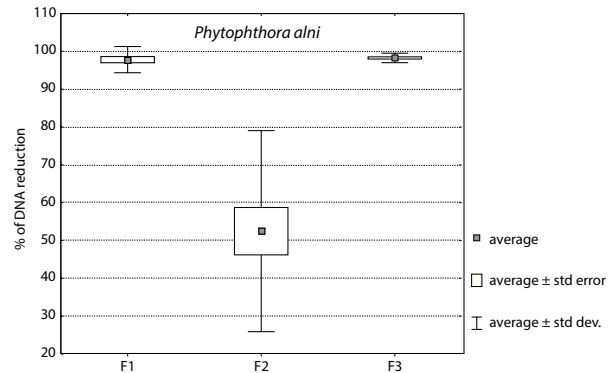


Figure 4. The reduction of pathogen *P. alni* (Pa) by the application of three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite), and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. alni* and the type of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).

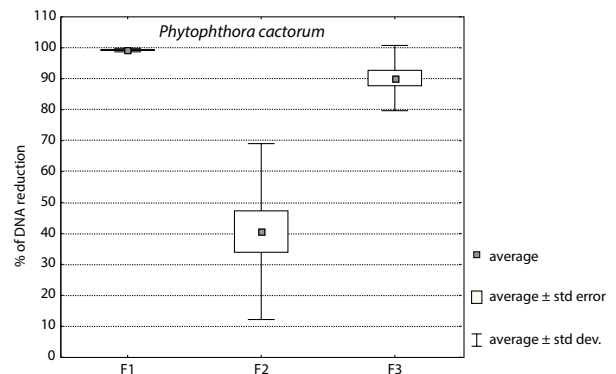


Figure 5. The reduction of pathogen *P. cactorum* (Pc) in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite), and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. cactorum* and the type of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).

reaching the level of 99% reduction of pathogen DNA after 48 hours of filtration. During filtration (in the biofilter with PCBN) a low decrease of filtration efficiency was observed after 3 and 12 hours (the levels of 93.9% and 82.8%, respectively) and after 48 hours the performance of pathogen elimination from contaminated water was high again, 86.5%. In the biofilter with mineral fertilizer, the filtration efficiency was interfered after 3, 9, and 24 hours, when the reduction of *P. plurivora* DNA amounted to 52.9%,

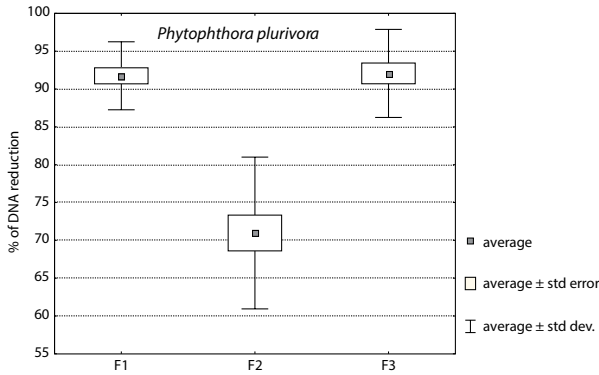


Figure 6. The reduction of pathogen *P. plurivora* (Pp) in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite), and F3 (PCNB). Differences between the reduction of *P. plurivora* and the kind of filter are statistically significant ($p = 0.00000$).

71.4%, and 67.7%, respectively; but after 48 hours of filtration it rose again to 72.3% (fig. 3).

Based on the results of the statistical analysis it was found that the effectiveness of the biofilm in the filter depends on the measurement time and the type of filter contamination of agricultural origin. After the addition of a mineral fertilizer (F2), a statistically

significant reduction in the filtration efficiency of the tested species was shown, regardless of the pathogen (*P. alni*, *P. cactorum* or *P. plurivora*), for $\alpha = 0.05$ (fig. 4, 5, and 6). When PCNB was added to the filter (F3), there was no statistically significant difference with the control filter (F1), calculated using the Tuckey test for heterogeneous samples, $\alpha = 0.05$. The effectiveness of the elimination of 3 studied pathogenic species from contaminated water stabilized and reached its maximum after 48 hours (fig. 7).

Quantitative analysis of the biofilm collected from the control filter No. 1 showed that the number of oligotrophic and copiotrophic bacteria was similar and amounted to 23×10^6 and 21×10^6 JTK / 1 g of biofilm (colony forming units in 1 g of biofilm). The biofilm samples collected from filter No. 2 after application of fertilizer revealed 77% more copiotrophs and 33% oligotrophs (compared to control); their number was: 40.8×10^6 and 28×10^6 . In biofilm samples after application of PCNB, 18% less copiotrophs and 17% less oligotrophs were noted (compared to control); their number was: 18.9×10^6 and 17.6×10^6 JFK / 1 g of biofilm (fig. 8, 9). Statistical analysis showed that the differences between the average amounts of copiotrophic bacteria and a kind of filter were statistically significant ($p = 0.00001$ for $\alpha = 0.05$) (fig. 10), and that differences between the average

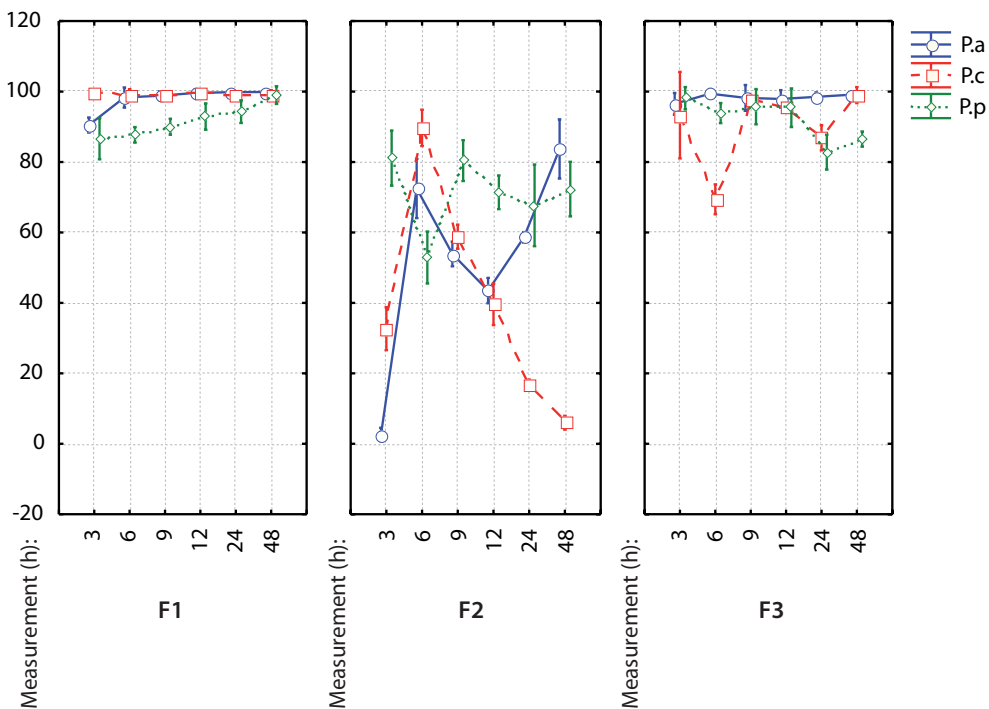


Figure 7. The reduction of pathogens *P. alni* (Pa), *P. cactorum* (Pc) and *P. plurivora* (Pp) at the time of from 3 to 48 hours for three of the filters F1 (control) F2 (phosphite) and F3 (PCNB).

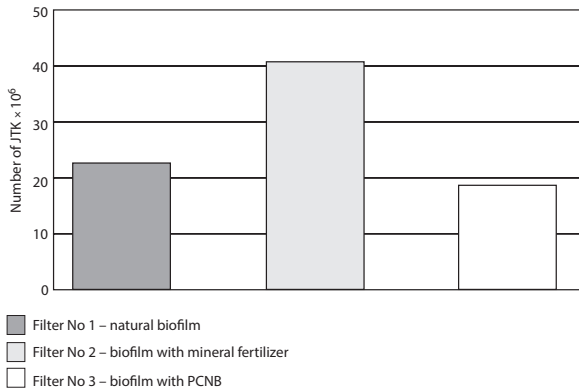


Figure 8. The number of copiotrophic bacteria in biofilm samples taken from three variants of SSF filters working in parallel in the IBL greenhouse (n = 3)

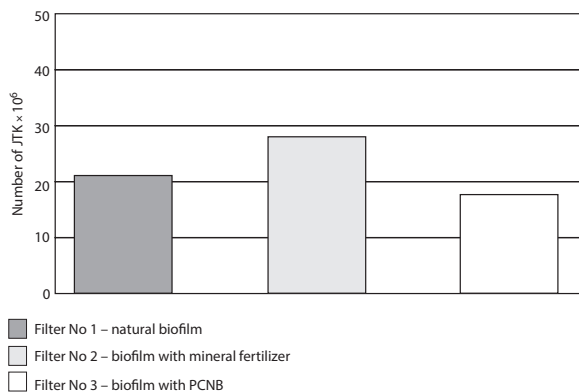


Figure 9. The number of oligotrophic bacteria in biofilm samples taken from the three variants of SSF filters working in parallel in the Forest Research Institute (IBL) greenhouse (n = 3)

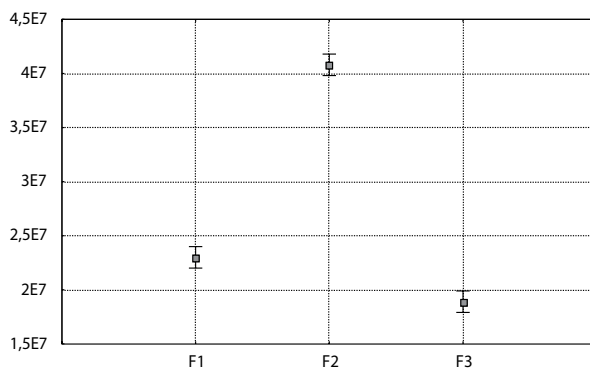


Figure 10. Measurement of the average number of copiotrophic bacteria (copio) +/- in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite), and F3 (PCNB).

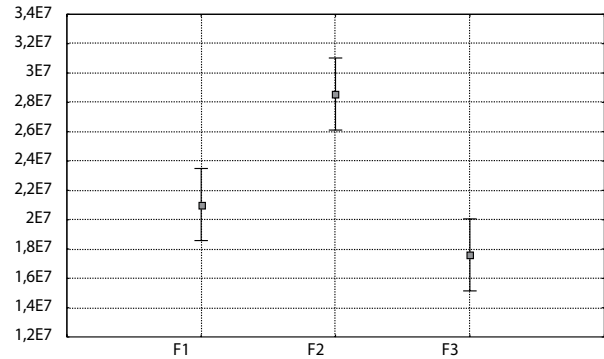


Figure 11. Measurement of the amount of oligotrophic (oligo) bacteria +/- in three variants of filters: F1 (control), F2 (phosphite), and F3 (PCNB).

amounts of oligotrophic bacteria and the type of filter were statistically significant ($p=0.04867$ for $\alpha=0.05$) (fig. 11). In the case of oligotrophic bacteria p -values are on the border of significance (at $p = 0.05$).

4. Summary

Literature focuses on the construction, operation, and effectiveness of the SSF type of sand filters in removing phytopathogens from the contaminated water. Not much research describes modifications of biofilms by the addition to filtered water substances such as fungicides or fertilizers. In our experiments, pollution of filtered water originated from agriculture reduced the performance of SSF biofilters, interfering their efficiency of the elimination of phytopathogens. Both the mineral fertilizer as well as PCNB influenced the SSF biofilm microbial balance. The quantitative composition and species of bacteria and microscopic fungi was changed, which is also confirmed in the literature (Macedo et al. 2007; Barragán-Huerta et al. 2007; Davey, O'toole 2000). It was observed that the presence of a mineral fertilizer in the filtered water decreased the elimination of phytopathogens more than the performance of SSF filtration of water containing fungicide, PCNB. Biofilm's efficiency depends on the spatial structure and species' composition of the microbial communities that inhabit them (Davey, O'toole 2000). Both of these items, unless they are violated, ensure the proper functioning of the alive and dead elements of biofilm as a whole, which is consistent with the results of other authors (Lewandowski et al. 1993; Moller et al. 1996). In water and soil environment under the influence of mineral –

nutrients – fertilizers both the quantity and species of microorganisms are in the realignment form that mainly starts growing microorganisms with high nutritional requirements, which are widespread in the environment (Koch 2001). They are biologically less active than microorganisms with medium or very poor nutritional requirements (Kuznetsov et al. 1979; Alabouvette 1986). It was found that the presence of fungicide (PCNB) in filtered water probably slowed down the development of microscopic fungi normally inhabiting the SSF biofilter. Microscopic fungi in the community of microbial biofilms play a dual role, because they produce exogenous active substances (enzymes) and due to the complex structure of the mycelia are additional mechanical barrier for pollutants carried with water flowing through the biofilter (Wohanka 1995). Integrated protection of nurseries has been validated legally by orders of the European Commission (EU) (Directive No. 2009/128/EC of 21.10.2009 and Regulation No 546/2011 of 10.06.2011 on the integrated protection of plants against pests). This idea is based on the complementary use of several (or all) of the possible methods for plant protection. Legislatives were established to protect the environment in order to reduce the proportion of chemicals (pesticides), which residues are found in drinking water (Aslan 2005). Accordingly, the Ministry of Agriculture and Rural Development elaborated a project of the national action plan to reduce the risks associated with the use of plant protection products during 2013-2017. The tests performed have shown the ability to remove fertilizer from water using SSF at the expense of losing efficiency in eliminating filter phytopathogens. This phenomenon was not observed (not statistically significant) in the presence of fungicide, PCNB, probably because it does not affect so strongly the bacteria present in the biofilm than the fertilizer added to the filtered water. In the presence of water pollution of agricultural origin one must take into account the deterioration of the filtering properties of biofilms. Common presence of phytopathogens in surface waters is crucial for the health of seedlings, if water is used for watering the plants for plantings. Without filtering, pathogens will be easily distributed in nurseries. It should be noted that the increased number of sand filters (working under pressure) are not as effective as biological filters (SSF) due to too rapid flow of water through a bed of sand. They can only capture the weed seeds. The offered new technologies like the use of membrane filters or application of UV radiation are effective but very expensive. In contrast, the use of such chemicals like sodium hypochlorite is cheaper but contrary to the principles of environmental protection

(Wohanka 1995). Water resources in Poland per capita amounts to one-third of the European average, so in the future, the water drawn from deep wells will be a privilege (taxed accordingly), or developing international environmental legislation generally will prohibit its use for this purpose, hence the need to increase the use of natural water surface, although they contain a lot of human and plant pathogens (pathogenic bacteria). Nurseries with appropriate filter systems for this task will be better prepared and will be more competitive on the market of the nursery plants production. Sand filters of SSF type will become particularly important in the nursery, arising in the future nursery farm with a closed water circulation, perhaps with a set of filters in sequence to remove residues of pesticides and fertilizers, and phytopathogens. Closed water circuits installed in nurseries contribute significantly to water economy. Perhaps, the Polish State Forests will follow German nurseries soon and will build the first full-size type SSF filter in one of the nurseries in Poland. Interested forest districts could then benefit from its experience and become convinced about the efficacy of water treatment as a part of integrated plant protection in nursery practice. This will limit the use of pesticides to a minimum and thus minimize the pressures on the environment and will have a beneficial effect on the conservation of forest biodiversity.

5. Conclusions

1. Natural slow sand filters are effective in removing pathogens of the genus *Phytophthora*, only when water is contaminant-free from agricultural sources (fertilizers, except fungicide PCNB).
2. It is not recommended to add the nitrogen-containing fertilizer and phosphites to tanks storing water for watering plants in nurseries, as it reduces the effectiveness of the biofilm.
3. If adding of fertilizer to the water reservoir for irrigation is necessary, then water intended for watering the plants should be filtered for at least 48 hours.
4. Addition of a mineral fertilizer (containing nitrogen and phosphites) and fungicide (PCNB) causes changes in the size and the composition of bacteria colonizing the biofilm, which affects the efficiency of the elimination of pathogens by the SSF.
5. Adding of fertilizer increases over double the number of bacteria in the biofilm, both copiotrophic and oligotrophic, as compared to the control.
6. Addition of PCNB reduces the number of bacteria, both copiotrophic and oligotrophic by nearly one-fifth compared to the control.

Acknowledgements

The study was carried out in the framework of a research project funded by the National Science Centre entitled ‘The impact of selected environmental factors on phytopathogens removal from water’, contract No. 7124/B/P01/2011/40.

References

- Alaboouvette 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., Alsanius B., Wohanka W., Menzies J., G., Utkhede R. 2001. Disinfestation 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. *Sylwan*, 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 studieren 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.

Source materials

- 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.