

Katarzyna Kubiak<sup>1</sup>✉, Tomasz Oszako<sup>2</sup>

## Filtry piaskowe w ochronie roślin przed chorobami w szkółkach

Slow sand filters for plant protection in nurseries

**Abstract.** In some nurseries to irrigate plants water must be taken from natural reservoirs. Rivers and lakes are often polluted with microorganisms and a proportion of these are pathogenic to cultivated forest tree species. To avoid the infection of seedlings due to plant irrigation with contaminated water, a system of Slow Sand Filters (SSF) was designed and installed in the Kiejsze forest nursery (Koło Forest District in central Poland). Tests of slow sand filters efficiency were performed using qPCR to assess their effectiveness in reducing the concentration of bacterial DNA in filtrated water. Measurements after filtration through SSF, revealed a significant reduction in bacterial DNA. After 24 hours, 60% of *Rhizobium tumefaciens* was eliminated and that progressed to 71% after 48 h. In the case of *Pseudomonas syringae*, purification of water was even more efficient, 67% after 24 h and 74% after 48 h, and there was a similar reduction for *Xanthomonas campestris* (71% and 70%, respectively). These data allow us to recommend this approach to water purification as an alternative preventive method for plant protection in nurseries.

**Key words:** filtration systems, biofilm

### 1. Wstęp

Woda pochodząca z ujęć naturalnych (jeziora, rzeki), stosowana jest w szkółkarstwie leśnym do podlewania kwater produkcyjnych. Często jest ona skażona patogenicznymi organizmami, stwarzającymi poważne zagrożenie dla materiału sadzeniowego. Jak wynika z wielu doniesień, zagrożenie takie dla sadzonek i powstających z nich upraw leśnych mogą stanowić zarówno patogeniczne grzyby, lęgniowce Oomycetes, jak i bakterie (Alanius et al. 2001). Dotychczas stosowane metody oczyszczania wody z patogenów roślin polegają na stosowaniu środków chemicznych, fizycznych (termicznych, jonizacji, promieniowania UV) oraz systemów filtracyjnych. W Holandii i Szwajcarii w ogrodnictwie powszechnie stosowane są metody termiczne, także ozonizacja oraz promieniowanie UV (Wohanka, 2000). Niestety tego typu zabiegi wymagają znacznych nakładów finansowych oraz nakładu czasu i pracy.

Oczyszczanie wody za pomocą filtrów piaskowych powolnego przesączania (slow sand filters – SSF) umożliwia eliminację patogenów roślin szkółkarskich (Alanius et al. 2001). Metoda jest całkowicie bezpieczna dla środowiska, ponieważ procesy oczyszczania w filtrze są naturalne i zachodzą także samoistnie w przyrodzie. Instalacje technologiczne, mają jedynie za zadanie ułatwienie zainicjowania, a potem zintensyfikowania procesów nakierowanych na eliminowanie patogenów roślin. Efektywność działania filtrów piaskowych zależy od aktywności procesów przebiegających w samym filtrze podczas przepływu wody, dlatego powinien być on odpowiednio zbudowany, tzn. tak, aby rozwinąć i zapewnić dostatecznie wolny przepływ wody, aby organizmy go zasiedlające były w stanie wychwycić zarodniki grzybów, lęgniowców lub komórki bakterii. Filtr piaskowy zbudowany jest z położonych na sobie warstw piasku i żwiru o różnej granulacji. W wierzchniej warstwie piasku tworzy się w ciągu pierwszych tygodni filtrowania swoisty ekosystem mikroorganizmów (tzw.

<sup>1</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa, ✉ Fax +48225952761; katarzyna.kubiak82@gmail.com

<sup>2</sup> Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary

biofilm lub błona biologiczna). Zbiornisko mikroorganizmów składa się z populacji glonów, bakterii, grzybów mikroskopijnych, promieniowców i innych organizmów. Organizmy te wykorzystują materię organiczną i nieorganiczną niesioną przez wodę do procesów metabolicznych oraz budowy masy swego ciała, a w konsekwencji oczyszczają wodę z ładunku substancji organicznych nie wyłączając patogenów roślin.

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu filtrów piaskowych do oczyszczania wody pochodzą z 1804 r. ze Szkocji, gdzie John Bibb używał tego rodzaju filtrów do oczyszczania wody pochodzącej z bielarni. Od 1892 r. filtry piaskowe znalazły zastosowanie do oczyszczania wody pitnej (Alanius et al. 2001). W połowie XX w. filtry piaskowe zastąpiono metodami chemicznymi i fizycznymi: chlorowaniem, promieniowaniem UV lub ozonowaniem. Były to metody skuteczne, aczkolwiek kosztowne i często pogarszające parametry smakowe i zapachowe wody. Obecnie filtry piaskowe stosowane są do oczyszczania wody pitnej (Filtry Warszawskie), nisko obciążonych ścieków oraz upraw ogrodniczych (szklarnie). W warunkach szkółek leśnych w Polsce zostały one po raz pierwszy przetestowane przez Zakład Fitopatologii Leśnej Instytutu Badawczego Leśnictwa.

Filtr piaskowy powolnego przesączania, wykonany zgodnie z zaleceniami Wohanki (2000), zbudowany został w szkółce leśnej Kiejsze (Nadl. Koło) w celu ochrony siewek drzew leśnych przed grzybami chorobotwórczymi i patogenicznymi lęgniowcami *Oomyces*. Wyniki badań z tego zakresu będą przedmiotem odrębnego artykułu, natomiast w niniejszej pracy przedstawiono wyłącznie skuteczność oczyszczania wody w stoku do wybranych bakterii.

## 2. Materiały i metody

Obudowę filtru stanowi rura kanalizacyjna PCV o średnicy 0,25 m i wysokości 180 cm ustawiona pionowo, a materiałem wypełniającym jest (od góry): piasek o granulacji do 2 mm oraz 3 warstwy żwiru o granulacji kolejnych warstw: 2–8, 8–16, 16–32 mm, o łącznej grubości warstwy ok. 80 cm (Oszako et al. 2009). Na dnie filtru znajduje się perforowana rura (średnicy 100 mm) odbierająca przesączającą się do niej wodę, która następnie jest odprowadzana do systemu nawadniającego. Prędkość przepływu wody przez filtr wynosi 25 l/h. Przepływ może być regulowany za pomocą pływaków umieszczonych w górnej filtra. Przefiltrowana woda magazynowana jest w zbiorniku o pojemności 2000 l, skąd przepompowywana jest do podlewania roślin na poszczególnych poletkach doświadczalnych.

W celu określenia skuteczności działania systemu filtracyjnego wykonano doświadczenie polegające na

zanieczyszczeniu wody w zbiorniku przed filtrami za pomocą 3 gatunków bakterii: *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*. O skuteczności działania filtrów wnioskowano na podstawie różnicy ilości materiału genetycznego (DNA wyżej wymienionych organizmów) wykrytego w wodzie zanieczyszczonej i przefiltrowanej.

Kultury bakterii do inokulacji wody *P. syringae* i *R. tumefaciens* przygotowano na podłożu King B (pepton 20 g, MgSO<sub>4</sub> 1,5g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5g, woda destylowana 1 l), natomiast *X. campestris* hodowano na podłożu YPGA (ekstrakt drożdżowy 7 g, pepton 7 g, glukoza 7 g, woda destylowana 1 l). Do 5 kolb Erlenmayera (250 ml) wiano po 50 ml podłoża płynnego V8, YPGA, King B. Następnie kolby sterylizowano w autoklawie: V8 – w temperaturze 115°C przez 20 min, a YPGA i King B – w temp. 121°C przez 15 min. Po ostudzeniu pożywek w kolbach wprowadzono do nich fragmenty (0,5×0,5 cm) zestalonego podłoża PDA, na których rosły czyste kultury patogenicznej bakterii. Kolby trzymano w cieplarni (w ciemności) przez 5 dni w temperaturze 20°C, jednocześnie je wstrząsając (w celu lepszego napowietżenia pożywek). Namnożone w pożywkach płynnych kultury bakteryjne homogenizowano i wprowadzano do zbiornika, z którego przepompowywano wodę do filtrów. Przyjęto następujące ilości inokulum dla poszczególnych patogenów: 7,5×10<sup>6</sup> dla *P. syringae*, 10,2×10<sup>6</sup> dla *R. tumefaciens*, 9,5×10<sup>6</sup> dla *X. campestris*.

Wprowadzenie do zbiornika (2000 l) patogenów wykonano jednorazowo, po czym próbki przefiltrowanej wody pobierano do analiz z dysz odprowadzających przez 3 dni w określonych punktach czasowych (czas w którym zostały pobrane próby wody do analizy): ze zbiornika 2000 l (ilość DNA przed filtracją w zbiorniku magazynującym wodę z patogenami) oraz po upływie czasu filtracji: 0, 4, 12, 24 i 48 godzin (w trzech powtórzeniach łącznie po 3 litry wody). Wodę pobraną do jałowych kolb o objętości 1 l analizowano w laboratorium, filtrując ją dwukrotnie przez filtry o średnicy 47 mm i średnicy porów 11 μm (w celu usunięcia zanieczyszczeń) oraz filtr 5 μm (w celu zebrania osadu do dalszych analiz). Filtry z osadem umieszczano w szalkach Petriego i zalewano sterylną wodą destylowaną (5 ml). Następnie, delikatnie usuwano osad z filtrów, a zawiesinę przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano (przez 1 minutę przy 14 000 rpm). Wyodrębnioną przez wirowanie górną, płynną warstwę (supernatant) zlewano i powtarzano wirowanie. Osad traktowany był jako materiał wyjściowy do izolacji DNA grzybowego zestawem GenElute (PLANT GENOMIC DNA MINI-PREP KIT Sigma MINI Bacteria A&A Biotechnology). Wyizolowane w ten sposób DNA mikroorganizmów poddano analizie genetycznej za pomocą metody qPCR (w czasie rzeczywistym) przy użyciu specyficznych

**Tabela 1. Startery wykorzystane w reakcjach PCR oraz qPCR**

Table 1. Primers using in PCR and qPCR reactions

Gatunek patogena Species of pathogen	Sekwencje starterów Primer sequences	Źródło Source
<i>Xanthomonas campestris</i>	XcpM1: ACGCGCTACCAAAAAGGCAAAGAG, XcpM2: GATCTGCGGTTGTCTGAAGATTGG	Sulzinski et al. 2001
<i>Rhizobium tumefaciens</i>	VirD2A: ATGCCCGATCGAGCTCAAGT, vIRde: CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA	Haas et al. 1995
<i>Pseudomonas syringae</i>	MM5F: GAACGAGCTGAAGGAAGACA, MM5R: CAGCCTGGTTAGTCTGGTTA	Zaccardelli et al. 2005

starterów (tab. 1). Zmiany intensywności świecenia produktu PCR wybranych mikroorganizmów pozwoliły na określenie ich składu ilościowego w przefiltrowanej wodzie i porównanie go z DNA pochodzącym z inokulatów, które dostarczono wcześniej do zbiornika z wodą. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) była zatem kluczowym elementem oceny skuteczności działania filtrów.

### Reakcje PCR

Przygotowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej (o objętości końcowej 25 µl): 10 razy stężony PCR Buffer 2,5 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, starter 1 (10 µM) 1 µl, starter 2 (10 µM) 1 µl, Taq-polimeraza (5 jednostek/µl) 0,2 µl, woda 19,3 µl, DNA matrycowe (20–40 ng/µl) 1,0 µl. Reakcja PCR przebiegała w powtarzających się cyklach: denaturacja wstępna: 95°C – 3 min, amplifikacja – 35 cykli: denaturacja – 94°C – 30 s, przyłączenie startera – 30 s w temp. 64°C (*X. campestris*), 50°C (*R. tumefaciens*) i 57°C (*P. syringae*), wydłużanie startera – 60 s w temp. 72°C, wydłużanie końcowe – 10 min w temp. 72°C i chłodzenie w temp. 4°C. Elektroforezę wykonano w 1% żelu agarowym.

### Reakcja Real Time PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości końcowej 15 µl był następujący: 2 razy stężony qPCR Buffet Bio Rad 7,5 µl, starter 1 (10 µM) 0,5 µl, starter 2 (10 µM) 0,5 µl, woda 5,5 µl, DNA matrycowe (40–40 ng/µl) 1,0 µl. Reakcja qPCR składa się z następujących cykli: denaturacja wstępna: 95°C – 2 min, amplifikacja – 30 cykli, denaturacja – 94°C przez 30 s, przyłączenie startera przez 30 s w temperaturze 64°C (*X. campestris*), 57°C (*P. syringae*) i 50°C (*R. tumefaciens*), wydłużanie startera – 72°C – 60 s. Po każdym cyklu aparat Real time PCR dokonuje odczytu fluorescencji namnażanego produktu, a chłodzenie odbywa się w temp. 4°C. Na podstawie koncentracji DNA oraz jego dziesięciokrotnego rozcieńczenia sporządzono krzywe wzorcowe dla każdego z patogenów.

### Analiza chemiczna wody

W przefiltrowanych próbkach wody metodą chromatografii wykonano analizy stężenia jonów Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, a metodą potencjometryczną zmierzono odczyn kwasowości pH.

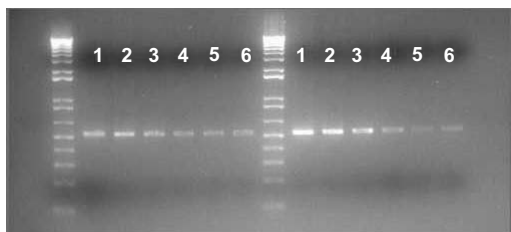
Do analizy statystycznej zastosowano program Statistica. Dla ustalenia zależności pomiędzy zawartością DNA a czasem filtracji oraz efektywnością usuwania patogenów przez filtr a gatunkiem filtrowanej bakterii posłużono się dwuczynnikową analizą wariancji. W celu porównania ilości DNA w określonych punktach czasowych z kontrolą wykorzystano test Dunnetta. Przeprowadzono analizę kontrastów pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi oraz analizę korelacji pomiędzy zawartością DNA a składem chemicznym próbek wody.

### 3. Wyniki

Wyniki reakcji PCR i qPCR przedstawiono na fotografiach, które wskazują, że we wszystkich przypadkach wystąpiło zmniejszenie intensywności świecenia produktu DNA otrzymanego z filtratów (przesączy z wody filtrowanej), w porównaniu do DNA wyjściowego, pochodzącego ze zbiornika magazynującego wodę (do którego sztucznie dodano zawiesinę patogennych bakterii) (fot. 1 i 2).

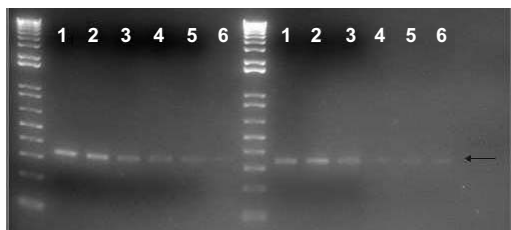
Wyniki reakcji qPCR dostarczyły ilościowych danych, na podstawie których wnioskowano o stopniu eliminacji patogena, przejawiającego się zmniejszeniem zawartości DNA bakterii w wodzie przefiltrowanej. Zmniejszenie ilości materiału genetycznego *R. tumefaciens* przebiegało nierównomiernie. Po 4 godzinach zaobserwowano spadek ilości DNA tego patogena o 10% (w stosunku do wyniku poprzedniego). Po 24 godzinach pozostałość DNA patogena spadła do poziomu 40%, a po 48 godzinach ilość materiału genetycznego była najmniejsza (29%), a tym samym woda była najlepiej oczyszczona z tej bakterii (ryc. 1).

W przypadku *P. syringae* zmniejszenie zawartości tego patogena w filtracji (skuteczność oczyszczania) po 4 godzinach była niewielka, ale już po 24 godzinach pozostałość DNA patogena wynosiła jedynie 33% i dalej zmniejszała się, aby po 48 godzinach osiągnąć swoje minimum na poziomie 26% (ryc. 1).



**Fot. 1.** Wynik reakcji PCR ze specyficznymi starterami dla *Pseudomonas syringae* (produkt ok. 500pz). Po lewej próbki pobrane z instalacji filtracyjnej nr 1, po prawej – z instalacji nr 2: 1 – zbiornik 2000 l, 2 – filtrat bezpośrednio po przesączeniu, 3 – filtrat po 4 godzinach, 4 – filtrat po 12 godzinach, 5 – filtrat po 24 godzinach, 6 – filtrat po 48 godzinach

Photo 1. The result of PCR with specific primers for *Pseudomonas syringae* (about the product 500pz). Samples from the first installation of filter – on the left, samples from the second installation of filter – on the right: 1 – tank 2000 l, 2 – the filtrate immediately after filtration, 3 – filtrate after 4 hours, 4 – filtrate after 12 hours, 5 – filtrate after 24 hours, 6 – filtrate after 48 hours



**Fot. 2.** Wynik reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla *Rhizobium tumefaciens* (produkt ok. 340pz). Zapis ścieżek jak w Fot. 1

Photo 2. Result of PCR with primers specific for *Rhizobium tumefaciens* (approximately 340pz product). Record paths as in Photo 1



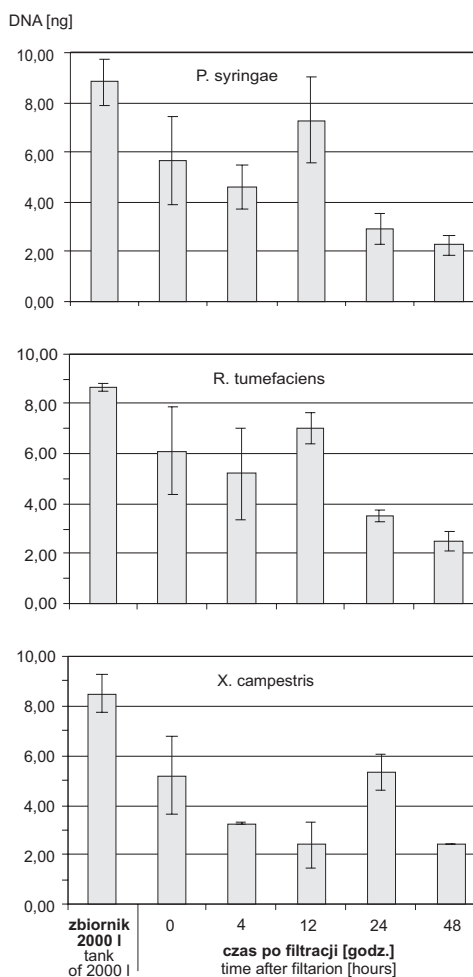
**Fot. 3.** Zwizualizowany obraz wyniku reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla *Xanthomonas campestris* – (produkt ok. 200pz). Zapis ścieżek jak w Fot. 1.

Photo 3. Result of PCR with primers specific for *Xanthomonas campestris* (approximately 200pz product). Record paths as in Photo 1

Eliminacja z wody *X. campestris* po 24 i 48 godzinach filtracji niewiele różniła się od wyników uzyskanych dla innych bakterii, w obu przypadkach pozostałość materiału genetycznego wynosiła odpowiednio 29% i 30% (ryc. 1).

Analiza chemiczna wody podczas filtracji wykazała wzrost zawartości jonów magnezu (Mg), sodu (Na), potasu (K) oraz  $\text{NO}_3$ , natomiast zmniejszenie zawartości jonów  $\text{NH}_4$  (ryc. 2 i 3).

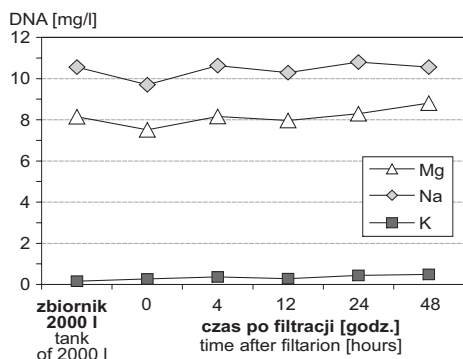
Pomierzona ilość DNA wybranych patogenów była istotnie statystycznie różna w poszczególnych punktach czasowych ( $p=0,000001$ ,  $F_{\text{emp}}=12,3$ ). Natomiast statystycznie nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy ilością DNA, a gatunkiem bakterii. Test Dunnetta, zastosowany do porównania ilości materiału genetycznego w różnym czasie po przefiltrowaniu z ilością DNA w zbiorniku 2000 l (kontrola), wykazał istotne różnice w



**Rycina 1.** Stopień redukcji materiału genetycznego patogenów roślin w filtrach piaskowych powolnego przesączania (SSF) w czasie 48 godzin filtracji

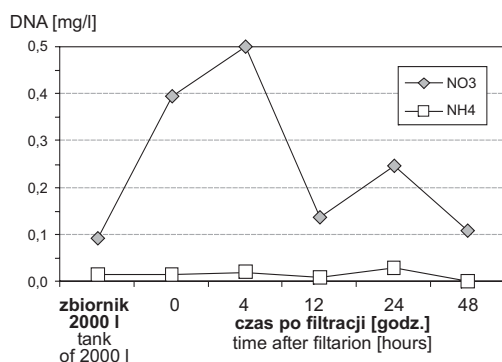
Figure 1. The degree of reduction of the genetic material of plant pathogens in the sand filters of slow filtration (SSF) within 48 hours of filtration





Rycina 2. Zmiany zawartości jonów Na, K, Mg w wodzie po przesączeniu przez filtry piaskowe powolnego przesączania (SSF) w czasie 48 godzin filtracji

Figure 2. Changes in the content of Na, K, Mg in the water after filtering through the sand filters of slow filtration (SSF) within 48 hours of filtration



Rycina 3. Zmiany zawartości jonów NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> w wodzie po przesączeniu przez filtry piaskowe powolnego przesączania (SSF) w czasie 48 godzin filtracji

Figure 3. Changes in content of NO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub> in the water after filtering through the sand filters of slow filtration (SSF) within 48 hours of filtration

Tabela 2. Korelacja między zawartością jonów azotanowych (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), amonowych (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), wapniowych (Ca<sup>+</sup>), magnezowych (Mg<sup>2+</sup>), sodowych (Na<sup>+</sup>), potasowych (K<sup>+</sup>) a zawartością DNA patogenów bakteryjnych podczas filtracji wody przez SSF (obliczenia dokonano przy użyciu programu Statistica 8.0)

Table 2. Correlation between the content of ions of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), calcium (Ca<sup>+</sup>), magnesium (Mg<sup>2+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>), potassium (K<sup>+</sup>) and content of DNA of bacterial pathogens in water filtration by SSF (The calculations were made using Statistica 8.0)

DNA patogenów: DNA of:	Współczynnik korelacji R The correlation coefficient R					
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ca <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
<i>P. syringae</i>	-0,01	0,11	0,56	-0,44	-0,20	0,94
<i>X. campestris</i>	-0,16	0,40	0,38	-0,27	0,02	0,65
<i>R. tumefaciens</i>	0,19	0,03	0,84	-0,61	-0,32	0,86

stosunku do kontroli. Zawartość DNA po 24 i 48 godzinach różniła się istotnie ( $p=0,05$ ). W przypadku innych prób nie stwierdzono istotnych różnic, chociaż próby po 12 i 24 godzinach znalazły się na granicy poziomu istotności ( $p=0,059$ ).

Wykonano analizę rozkładu normalności otrzymanych danych. Według testu Shapiro-Wilka rozkład normalny mają dane *R. tumefaciens* i jonów Mg<sup>2+</sup> oraz NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Dlatego wykonano dla nich analizę korelacji testem Pearsona. Pozostałe dane nie miały rozkładu normalnego, zbadano więc korelacje testem (nieparametrycznym) Spearmana. Istotność korelacji oceniono dla  $n=18$ . Współczynnik korelacji pomiędzy zawartością DNA a ilością poszczególnych jonów w badanych próbach wody świadczy o bardzo silnej zależności dodatniej pomiędzy ilością materiału genetycznego *P. syringae* a zawartością jonów potasu i wapnia oraz słabej dodatniej między tą cechą a zawartością jonów amonowych. Analiza dla *X. campestris* wykazała słabszą, dodatnią zależność pomiędzy ilością DNA tej bakterii a zawartością jonów potasu oraz słabą dodatnią zależność między tym parametrem a zawartością jonów wapniowych i amonowych. Natomiast w przypadku *R. tumefaciens*, zawartość DNA była silnie skorelowana z zawartością jonów wapnia (Ca<sup>+</sup>) i potasu (K<sup>+</sup>) (tab. 2).

#### 4. Podsumowanie

Powyższe badania są pionierskie w leśnictwie, dlatego nie ma możliwości porównania ich z innymi tego typu na szkółkach leśnych. Wybudowane filtry są prototypami wykonanymi według oryginalnego projektu.

Inspiracją do przeprowadzenia doświadczeń w szkółce Kiejsze były pozytywne wyniki uzyskane w produkcji roślin metodą bezglebową w szklarniach Uniwersytetu Nauk Stosowanych w Lullier. Szwajcarzy zastosowali metody biologii molekularnej, które potwierdziły dużą skuteczność działania filtrów w stosunku do grzybów i lęgniowców oraz nieco mniejszą w stosunku do bakterii (Calmin et al. 2008). Profesorowie Lefort i Wigger przybyli do Polski na zaproszenie RDLP w Poznaniu, gdzie wygłosili w Leśnym Ośrodku Szkoleniowym w Puszczykowie i IBL w Sękocinie referaty podsumowujące ich doświadczenia oraz przeprowadzili konsultacje w Nadleśnictwie Koło i szkółce w Kiejszach. Możliwością zastosowania filtrów typu SSF zainteresowali się również niemieccy szkółkarze, ze względu na fakt, że używanie do podlewania roślin wody ze studni może być w przyszłości poważnie ograniczone. Dodatkowo, zmiany klimatyczne (upalne lata i susze) zaostrzają niedostatek wody w wielu rejonach Europy. W przeliczeniu na powierzchnię zasoby wodne w Polsce wynoszą zaledwie 1/3 średnich zasobów

europejskich, nic więc dziwnego, że w południowo-zachodniej części kraju (Wielkopolska 60 tys. km<sup>2</sup>) obserwuje się procesy odwodnienia (stepowienia). Niemieckie szkółki komercyjne, w których wybudowano systemy z zamkniętym lub półzamkniętym obiegiem wody, będą lepiej przystosowane do zmieniających się warunków środowiska, przewidywanych zmian w legislacji i tym samym staną się bardziej konkurencyjne, a być może wiodące, na przyszłym trudnym rynku szkółkarskim (Werres et al. 2007; Wagner 2009). Obserwowane w Europie stale rosnące zagrożenie roślin w szkółkach (w tym wielu gatunków drzew lasotwórczych) ze strony organizmów związanych ze środowiskiem wodnym było przedmiotem dyskusji podczas spotkania w Brukseli w 2009 r. grupy roboczej COST FP0801 „Established and Emerging *Phytophthora*: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe”. W Polsce zainteresowanie budową filtrów przejawiały już nadleśnictwa Czerniejewo (przygotowano projekt na zamknięty system obiegu wody) oraz Cewice (zainstalowano filtry piaskowe dzięki wsparciu Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej).

Systemy z zamkniętym systemem obiegu wody do podlewania roślin są niestety wrażliwe na infekcje patogenicznymi bakteriami, grzybami czy łęgniowcami, o czym przekonano się już niejednokrotnie w ogrodnictwie, w uprawach hydroponicznych (bezglębowych) w szklarniach w Szwajcarii (Leffort et al. 2008). Z tego powodu stworzono tam zaawansowane systemy biologicznego oczyszczania wody z niepożądanych mikroorganizmów. Wizyta pracowników IBL w Uniwersytecie Nauk Stosowanych w Lullier (koło Genewy) umożliwiła transfer technologii oczyszczania wody (z powodzeniem stosowanych dotychczas w ogrodnictwie) do praktyki leśnej. Powstał projekt filtrów piaskowych powolnego przesączania w szkółce leśnej Kiejsze sfinansowany ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej. Wprawdzie podlewanie roślin na szkółce nie odbywa się tam jeszcze w zamkniętym systemie wody (jak w Szwajcarii), jednak nie wymaga już pobierania wody ze studni, ponieważ woda transportowana jest na szkółkę z pobliskiego jeziora leśnego. Przeprowadzone badania chemiczne jakości wody wypadły dobrze, jednak pod względem mikrobiologicznym stwierdzono jej zanieczyszczenie bakteriami oraz łęgniowcami (w tym odkrytym po raz pierwszy na świecie gatunkiem *Phytophthora polonica* (Belbahri et al. 2006). Podjęte badania skuteczności oczyszczania wody za pomocą filtrów piaskowych powolnego przesączania zdały w tym względzie egzamin i zostały polecone do zastosowania w praktyce (dokumentacja naukowa IBL 2008). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez zespół badawczy w Szwajcarii

(Calmin et al. 2008). W obu filtrach procesy oczyszczania wody zachodziły głównie w kilkucentymetrowej, wierzchniej warstwie piasku, której skuteczność była przedmiotem niniejszych badań. O znacznej redukcji liczebności bakterii po przejściu przez biologiczny filtr piaskowy SSF świadczą ilości materiału genetycznego poszczególnych patogenicznych bakterii. Podczas filtrowania zaobserwowano zróżnicowaną skuteczność zatrzymywania poszczególnych patogenicznych bakterii. Monitoring przebiegu procesu filtracji wykazał największą skuteczność w stosunku do bakterii *P. syringae*, gdyż po dwóch dobach poziom eliminacji tego patogena osiągnął ponad 74%. Jest to nieco mniej niż wyniki uzyskane przez badaczy w Niemczech, gdzie Brand i Wohanka (1998) uzyskali skuteczność w przedziale od 83,2–98,5%. Natomiast Ehret i in. (2001) badając skuteczność filtrowania patogenów rodzaju *Pythium* (przez podobny system filtrujący) uzyskali skuteczność nawet stuprocentową. Z innych danych literaturowych wynika, że grzyby rodzaju *Fusarium* zatrzymywane są ze skutecznością od 93% (Ehret et al. 2001) do 99,9% (Wohanka, Helle 1996 oraz Runia et al. 1996). Oznacza to, że skuteczność filtrów piaskowych powolnego przesączania jest większa w przypadku grzybów i łęgniowców niż w przypadku bakterii.

W przypadku wprowadzenia bakterii do zbiornika w sposób sztuczny, po 12 godzinach filtracji zaobserwowano wyraźne zmniejszenie ilości ich materiału genetycznego. Obserwowane zmiany w ilości DNA badanych bakterii mogą być powiązane z zaburzeniem aktywności metabolicznej mikroorganizmów wchodzących w skład biofilmu, co odzwierciedliło się okresowym obniżaniem zawartości jonów azotanowych w wodzie. Być może było to rezultatem zmian zachodzących w składzie mikrobiologicznym całego zbiorowiska lub ich metabolitów oddziałujących wzajemnie na siebie. Zmniejszenie się zawartości jonów amonowych oraz zwiększająca się ilość jonów azotanowych świadczą o zachodzącym procesie nityfikacji, co może prowadzić do reorganizacji składu ilościowego i jakościowego biofilmu.

Uzyskane wyniki redukcji materiału genetycznego patogenów przez instalacje filtrujące świadczą o przydatności tego typu urządzeń w eliminowaniu mikroorganizmów z wody służącej do podlewania roślin, zarówno w szkółkach roślin ozdobnych, jak i w szkółkach leśnych. Badania molekularne dostarczyły wizualnych i liczbowych danych świadczących o skuteczności działania filtrów w stosunku do badanych bakterii. Będą one w przyszłości standardem w sprawdzaniu skuteczności działania filtrów typu SSF. Zostały one także zastosowane do weryfikacji o wiele większych filtrów biologicznych wybudowanych w Niemczech, o maksymalnej wydajności prawie 30 000 m<sup>3</sup> na miesiąc.

Szkółkarzy niemieckich do zainstalowania filtrów zmusił brak na rynku zarejestrowanych środków chemicznych, które można by zastosować do oczyszczenia zbiorników gromadzących wodę (od 2000 do 30 000 m<sup>3</sup>) z patogenicznych łęgniowców rodzaju *Phytophthora*. Niemcy (Federal Research Centre for Cultivated Plant, Institute for Plant Protection in Horticulture and Forests), w prowadzonych czteroletnich doświadczeniach, w 4 szkółkach kontenerowych (o pow. 5×5 ha) uzyskali bardzo dobre wyniki, całkowicie eliminując z wody (dzięki filtrowaniu) gatunki rodzaju *Phytophthora* (Wagner 2009). Szacują oni, że koszty budowy filtru piaskowego (65 200 euro) zwrócą się po 10 latach (przyjmując jego roczną amortyzację jako 11 200 euro), a koszt przefiltrowania 1 m<sup>3</sup> wody wyniesie ok. 13 eurocentów. Filtr piaskowy w nadleśnictwie Koło jest pierwszym tego typu urządzeniem zainstalowanym na szkółce leśnej w Polsce (w Kiejszach) i wpisuje się w nurt poszukiwania ekologicznych metod ochrony materiału sadzeniowego przed patogenami, alternatywnych do stosowania chemicznych środków ochrony roślin. Ma to szczególne znaczenie w świetle dyrektywy Komisji Europejskiej ograniczającej stosowanie środków chemicznych (91/414), nowej strategii zintegrowanej ochrony roślin (prezentowanej na 50 sesji IOR w lutym 2010) i rosnącym na świecie zagrożeniu ze strony patogenicznych łęgniowców, będących tematem spotkania grupy roboczej IUFRO w marcu br. w Nowej Zelandii (The Fifth Meeting of the International Union of Forest Research Organisations, Working Party 7.02.09 *Phytophthora* in Forests & Natural Ecosystems, 2010).

## Literatura

- Alanius B.W., Ehret D.L., Ng K., Wohanka W. 2001. Slow filtration for disease control. *Greenhouse Canada*, January 2001: 20–26.
- Brand T., Wohanka W. 1998. Importance and characterization of the biological component in slow filters. *Acta Horticulturae* 554: 313–321
- Belbahri L., Moralejo E., Calmin G. Oszako T., García J.A., Descals E., Lefort F. 2006. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *FEMS Microbiology Letters*, 261(2): 165–74.
- Calmin G., Dennler G, Belbahri L, Wigger A., Lefort F. 2008. Assessing Efficacy of Ultrafiltration and Biofiltration Systems Used in Soil-Less Production Through Molecular Detection of *Pythium oligandrum* and *Bacillus subtilis* as Model Organisms. *Archives des Sciences*, 61(1): 7–16.
- Filtry w zamkniętym obiegu wody w szkółkach leśnych jako metoda eliminowania z materiału sadzeniowego organizmów pasożytniczych i kwarantannowych. Dokumentacja naukowa Instytutu Badawczego Leśnictwa, Sękocin Stary, 2008.
- Haas J.H., Moore L.W., Ream W.I., Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 8: 2879–2884.
- Oszako T., Kalaji H., Gaszczyk K., Kubiak K. 2009. Alternatywne metody ochrony sadzonek w szkółkach. *Notatnik Naukowy Instytutu Badawczego Leśnictwa*, 7(87).
- Runia W.Th., Michielsen J.M.G.P., Van Kuik A.J., Van Os E.A. 1997. Elimination of root infecting pathogens in recirculation water by slow sand filtration. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Soilless Culture, St Helier, Jersey: 395–407.
- Sulzinski M. A. 2001. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pvs. pelargonii and hederiae by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 149, 1: pp 45–49.
- Werres S., Wagner S., Brand T., Kaminski K., Seipp D. 2007. Survival of *Phytophthora ramorum* in Recirculating Irrigation Water and Subsequent Infection of *Rhododendron* and *Viburnum*. *Plant Diseases*, 91, 8: 1034–1044
- Wohanka W., Helle IM. 1996. Suitability of various filter media for slow filtration. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Soilless Culture, St. Helier, Jersey: 551–557.
- Wohanka W. 2000. Preventing disease in closed irrigation system. *Flower Tech*, 3, 4: 8–11.
- Wagner S. 2009. Four years of experience with filtration systems in commercial nurseries for eliminating *Phytophthora* species from recirculation water. Materiały konferencyjne grupy roboczej COST FP0801 „Established and Emerging *Phytophthora*: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe”, Bruksela.
- Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., Merighi M. 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato using PCR amplification of hrpZ<sub>Pst</sub>. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 85–90.