

**TERESA PASTUSZEWSKA****GRZEGORZ GRYŃ**

Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemiaka

Zakład Technologii Produkcji Roślin Okopowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Bydgoszczy

## Woda jako potencjalne źródło rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

### Water as a potential source of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* dissemination

Badano czas przeżycia *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) w środowisku sterylnej wody pochodzącej z jeziora, stawu i rzeki oraz wody destylowanej jako kontroli, przechowywanych w różnych temperaturach. Wykonano izolację bakterii z zawiesin wodnych oraz test biologiczny na roślinach bakłażana (*Solanum melongena*). Wyniki badań wykazały, że Cms może przeżyć przez długi okres czasu w 4°C w środowisku sterylnej wody z jeziora, stawu i rzeki oraz wody destylowanej, zachowując zdolność do wywołania objawów chorobowych u roślin bakłażana. Podwyższenie temperatury do 21°C spowodowało zarówno spadek liczebności bakterii w zawiesinach wodnych jak i obniżenie infekcyjności w stosunku do roślin bakłażana.

**Słowa kluczowe:** bakłażan, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, infekcyjność, przeżywalność w wodzie

The survival period of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) in the environment of sterile water originating from a lake, pond and a river and maintained at different temperatures was assessed. Distilled water was used as a control variant. Isolation of bacteria from the suspensions and biological test with the use of eggplant (*Solanum melongena*) assay plants were done. The results of the study indicated that Cms was able to survive for a long time in the water from lake, pond or river kept at 4°C. The bacteria retained the ability to cause infection in *S. melongena*. The increase in environmental temperature up to 21°C resulted both in the decrease in Cms density in water suspensions and in the diminished infectivity to eggplant plants.

**Key words:** *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, eggplant, infectivity, survival in water

#### WSTĘP

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka wywoływana przez *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff) Davis et al. (EPPO/CABI, 1997) jest poważnym zagrożeniem dla upraw ziemniaka w państwach UE. Choroba ma status choroby

kwarantannowej, więc podlega zwalczaniu z urzędu, co regulują odpowiednie akty prawne. Wystąpienie choroby może powodować poważne straty gospodarcze, związane z obniżeniem plonu na skutek zamierania roślin i gnicia bulw oraz dyskwalifikacją plantacji i nałożeniem kwarantanny.

Za główne źródło rozprzestrzeniania patogena uważa się porażone sadzeniaki. Oprócz typowych objawów w bulwach, patogen może porażać i zasiedlać ziemniaki w formie bezobjawowej i w ten sposób przetrwać nie wykryty przez kilka rozmnożeń wegetatywnych (Boer i McNaughton, 1986; Manzer i in., 1987; Slack, 1987; Boer i in., 1992; Pastuszewska i in., 2004, Pastuszewska, 2008).

Bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* jest organizmem biotroficznym, czerpiącym pokarm z żywych komórek rośliny żywiciela, którym jest ziemniak (*Solanum tuberosum*). Patogen jest odporny na wysuszenie i z tego powodu może zachować żywotność przez dłuższy okres czasu na skażonych powierzchniach. Nelson (1980) dowiódł długotrwałą zdolność do przeżycia na maszynach, powierzchniach produkcyjnych i przechowalniczych oraz odzieży, podkreślając znaczenie takich czynników jak temperatura i wilgotność, determinujących długość przeżywania Cms. Patogen utrzymał żywotność, przez co najmniej 24 miesiące na jucie, papierze i plastiku, przechowywany w warunkach niskiej wilgotności względnej 12% i w temperaturach 5°C lub 20°C. Przy podwyższonej wilgotności względnej do 94% i w tych samych temperaturach, przeżył krócej niż 14 miesięcy. Temperatury poniżej 0°C raczej wydłużają okres przeżywania bakterii Cms (Slack, 1987). Wyniki badań prowadzonych w ostatnim czasie w Wielkiej Brytanii (Elphinstone, 2004) wskazują, że przeżywalność Cms ulega znacznemu obniżeniu na mokrych powierzchniach lub na suchych powierzchniach, ale w wilgotnych warunkach.

Zdolność do przeżywania Cms w glebie nie została jeszcze jednoznacznie określona. Bakteria może przeżyć krócej w glebie wilgotnej, a dłużej w niektórych gatunkach gleb, w warunkach małej wilgotności. Ryzyko związane z potencjalną przeżywalnością patogena w glebie jest słabo określone i zwykle uważa się je za niskie. Sądzi się, że przenoszenie choroby poprzez bakterie znajdujące się w glebie ma małe znaczenie w epidemiologii bakteriozy pierścieniowej. Jest kilka doniesień o braku możliwości przeniesienia Cms na polu, z chorych roślin na zdrowe (Dykstra, 1942; Sletten, 1985), chociaż w warunkach słabego odwodnienia może wystąpić potencjalne ryzyko porażenia roślin (Dykstra, 1941). Według Nelsona (1980; 1985) bakteria może przeżyć w suchych, zainfekowanych łodygach ziemniaka przez 26–63 miesięcy. W glebie o wilgotności odpowiadającej współczynnikowi wędnięcia i w niskiej temperaturze (0°C – 10°C) patogen utrzymał żywotność przez 278 dni, podczas gdy w tej samej glebie, ale w warunkach wodnej pojemności połowej i przy 20°C bakteria przeżyła tylko 6 dni (Nelson, 1979). W kolejnym eksperymencie bakteria zachowała żywotność w sterylnej glebie, w 3°C przez 135 dni, a znacznie krócej przeżywała w niesterylnej glebie lub w wyższych temperaturach (Dykstra, 1942). W doświadczeniach polowych nie stwierdzono porażenia roślin uprawianych w uprzednio silnie skażonej glebie, nawet, kiedy sadzeniaki przed wysadzeniem krojono (Bonde, 1942; Dykstra, 1941, 1942).

Okres przeżycia bakterii Cms w środowisku wodnym również nie jest do końca wyjaśniony. Uważa się, że ryzyko rozprzestrzeniania Cms poprzez wodę używaną do

nawadniania upraw jest niższe, niż w przypadku bakterii *Ralstonia solanacearum* (R. sol.), sprawcy choroby zwanej śluzakiem. Nie znaleziono dotychczas innych roślin bytujących w ciekach wodnych, które mogłyby być potencjalnym żywicielem dla Cms, natomiast w przypadku *Ralstonia solanacearum* taką rośliną jest psianka słodkogórz (*Solanum dulcamara*).

Celem badań było określenie czasu przeżycia *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w skontaminowanej wodzie i ustalenie ewentualnego ryzyka rozprzestrzeniania się Cms za pośrednictwem środowiska wodnego.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano polski szczep *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* BPR IOR 527, pochodzący z Banku Patogenów Roślin Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu. Prowadzono hodowlę czystych kultur szczepu, na podłożu stałym YPGA (agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy).

Jako materiał badawczy wykorzystano 4 źródła wody: z małych zbiorników stawu i jeziora, z rzeki Wisły oraz wodę destylowaną. Próby wód przefiltrowano przez sterylne membrany bakteriologiczne o średnicy porów 0,2  $\mu\text{m}$ . W każdym ze źródeł wody sporządzono zawiesiny bakteryjne szczepu Cms BPR IOR 527 i umieszczono je w zamykanych, sterylnych pojemnikach bakteriologicznych w temperaturach: 4°C, 21°C, 35°C (woda z jeziora, stawu i rzeki, woda destylowana nr 1, woda destylowana nr 2), oraz 30°C (woda destylowana).

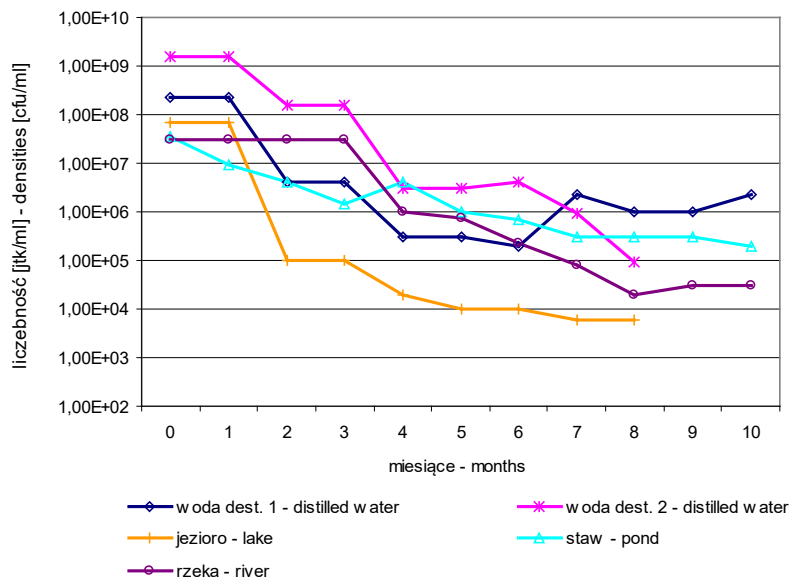
Jednocześnie, w celu określenia liczebności bakterii w momencie rozpoczęcia doświadczenia, wykonano posiew zawiesin na szalki Petriego z podłożem mikrobiologicznym YPGA. Przeprowadzono kontrole przeżycia bakterii w poszczególnych rodzajach wody i różnych warunkach temperatury, w odstępach czasowych 1 miesiąca dla 4°C (przez okres 10 miesięcy) i 21°C (przez 3 miesiące), natomiast dla 30°C w odstępach 4 dni, a dla 35°C w 6 i 8 dniu.

Wykonano izolowanie bakterii sporządzając szereg 10-krotnych rozcieńczeń zawiesiny w 0,9% NaCl i posiewając powierzchniowo na płytki Petriego z podłożem YPGA. Po upływie 3, 5, 7, 10 i 14 dni oceniono wzrost kolonii Cms.

Przeprowadzono 3 testy bakłażanowe dla oceny patogeniczności bakterii Cms, według następującej procedury. W tym celu siewki bakłażana (*Solanum melongena* L), odmiana Black Beauty, w stadium trzeciego liścia inokulowano zawiesinami badanych wód. Inokulację roślin (po 5 roślin dla każdego rodzaju wody) przeprowadzano przy pomocy igły do iniekcji 23 G (0,6  $\times$  25) i strzykawki (2 ml), pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem. Do eksperymentu dołączano kontrolę negatywną (sterylny bufor PB) i pozytywną (zawiesina Cms szczep BPR IOR 527). Zakażone rośliny bakłażana inkubowano w pokoju hodowlanym, w 21°C, przy 14. godz. oświetleniu przez okres 40. dni. Począwszy od 7. dnia trwania testu notowano występowanie objawów.

## WYNIKI

Cms wyizolowano po 10 miesiącach utrzymywania w zawieszynie wody destylowanej nr 1 w temperaturze 4°C (rys. 1). Liczebność bakterii w badanej zawieszynie zmniejszyła się z  $2,2 \times 10^8$  do  $2,3 \times 10^6$  jednostek tworzących kolonie w ml (jtk/ml). Po 8 miesiącach utrzymywania Cms w wodzie destylowanej nr 2 (rys. 1) liczebność bakterii zmniejszyła się z  $1,6 \times 10^9$  jtk/ml do  $9 \times 10^4$  jtk/ml, natomiast w wodzie z jeziora (rys. 1) z  $7 \times 10^7$  jtk/ml do  $6 \times 10^3$  jtk/ml. Brak danych w kolejnych miesiącach był spowodowany kontaminacją zawiesiny niepożądanym gatunkiem bakterii, uniemożliwiającym identyfikację kolonii Cms. W pozostałych rodzajach wód (staw i rzeka) Cms nadal utrzymuje żywotność, stwierdzono jednak wyraźną redukcję liczebności kolonii bakteryjnych (rys. 1).



Rys. 1. Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawieszinach wodnych w temperaturze 4°C (log jtk/ml)

Fig. 1. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in water suspensions at 4°C (log cfu/ml)

W 21°C, do trzech miesięcy trwania testu, bakterie Cms izolowano z wszystkich zawiesin (rys. 2). Największą redukcję liczebności uzyskiwanych kolonii bakteryjnych zanotowano w wodzie z jeziora, natomiast najmniejszy spadek liczebności bakterii wykazano w środowisku wody destylowanej.

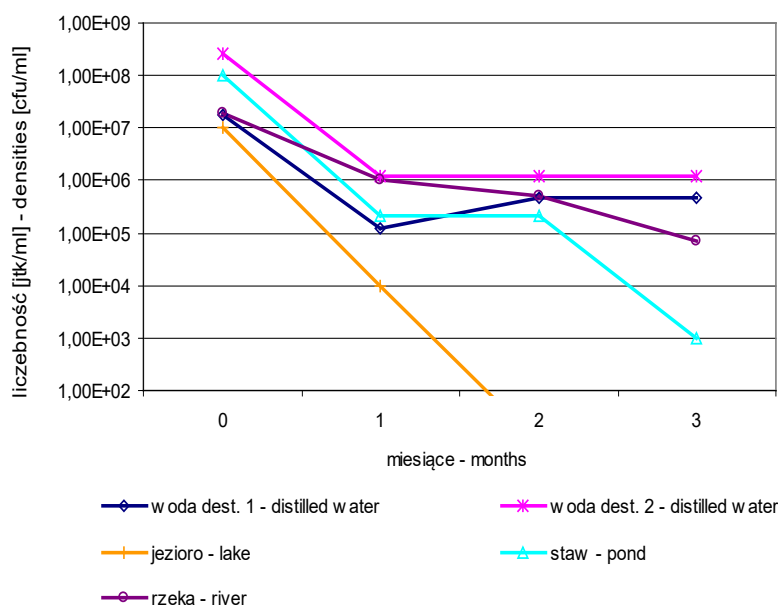
Po 30 dniach utrzymywania zawiesiny bakterii w wodzie destylowanej, w 30°C (tab. 1), bakterie nadal były żywe, chociaż zaobserwowano wyraźny spadek liczebności kolonii Cms z  $4,2 \times 10^9$  jtk/ml do  $1 \times 10^3$  jtk/ml. Badając w 6 i 8 dniu zawiesiny wodne z jeziora, stawu i rzeki oraz z wody destylowanej 1 i 2, utrzymywane w 35°C (tab. 2), nie odnotowano wzrostu bakterii na pożywce.

Tabela 1

**Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawiesinie wody destylowanej w temperaturze 30°C (jtk/ml)**

**Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in distilled water suspension at 30°C (cfu/ml)**

Rodzaj wody Kind of water	Koncentracja początkowa Initial concentration	4 dzień 4 <sup>th</sup> day	8 dzień 8 <sup>th</sup> Day	12 dzień 12 <sup>th</sup> day	18 dzień 18 <sup>th</sup> day	22 dzień 22 <sup>nd</sup> day	26 dzień 26 <sup>th</sup> day	30 dzień 30 <sup>th</sup> day
Woda destylowana Distilled water	$4,2 \times 10^9$	$1,03 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$6 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$3 \times 10^3$	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^3$



**Rys. 2. Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawiesinach wodnych w temperaturze 21°C (log jtk/ml)**

**Fig. 2. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in water suspensions at 21°C (log cfu/ml)**

Przeprowadzono 3 testy infekcyjności bakterii na bakłażanie dla kombinacji przechowywanej w 4°C (po dwóch tygodniach, po 5 i 10 miesiącach) oraz jeden dla kombinacji w 21°C (po dwóch tygodniach). Bakterie Cms straciły całkowicie infekcyjność po dwóch tygodniach trwania doświadczenia, dla kombinacji przechowywanej w 21°C — w wodzie z jeziora, stawu oraz wody destylowanej; oraz po 10 miesiącach, dla kombinacji w 4°C, — w zawiesinie wody z jeziora i wody destylowanej nr 2. Bakterie Cms zachowały infekcyjność do końca doświadczenia, w kombinacji przechowywanej w 4°C, w wodzie ze stawu i rzeki oraz w wodzie destylowanej nr 1.

**Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w różnych zawiesinach wodnych w temperaturze 35°C (jtk/ml)**  
**Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in different distilled water suspensions at 35°C (cfu/ml)**

Rodzaj wody Kind of water	Koncentracja początkowa Initial concentration	6 dzień 6 <sup>th</sup> day	8 dzień 8 <sup>th</sup> day
Woda dest. 1 — Distilled water 1	3×10 <sup>7</sup>	0	0
Woda dest. 2 — Distilled water 2	2,6×10 <sup>7</sup>	0	0
Jezioro — Lake	4,7×10 <sup>7</sup>	0	0
Staw Pond	7×10 <sup>8</sup>	0	0
Rzeka — River	2×10 <sup>7</sup>	0	0

## DYSKUSJA

W celu określenia ryzyka rozprzestrzeniania Cms poprzez wody powierzchniowe i ściekowe oraz porażenia roślin ziemniaka za pośrednictwem skażonej wody użytej do nawadniania, zbadano wpływ czynnika źródła wody i temperatury na długość okresu przeżywania bakterii. Przeprowadzono izolację patogena na pożywce mikrobiologicznej i inokulację roślin bakłażana. Ze względu na powolny wzrost Cms na sztucznym podłożu, niewspółzawodniczenie z innymi bakteriami patogenicznymi i saprofitycznym oraz brak pożywki selektywnej, w badaniach ograniczono się do wody sterylizowanej filtrowanej przez membrany bakteriologiczne.

Ryzyko przenoszenia Cms w wodzie powierzchniowej używanej do nawadniania, uważane jest za mniejsze, niż w przypadku śluzaka (*Ralstonia solanacearum*). Cms nie jest patogenem dla *Solanum dulcamara*, jednym z nielicznych wodnych gatunków europejskich, należących do *Solanaceae* (Knorr, 1948, Wolf i Beckhoven, 2004). Jak podaje Elphinstone (2004) w Anglii dowiedziono, że istnieje ryzyko zakażenia zdrowych bulw ziemniaka poprzez mycie w wodzie użytej dwie doby wcześniej do umycia bulw, porażonych przez Cms. Autor dopatruje się, że w taki sposób, w 2002 roku, w miejscu pakowania, mogło dojść do zakażenia ziemniaków towarowych, od porażonej przez Cms, partii ziemniaków, importowanych do Wielkiej Brytanii. Wolf i Beckhoven (2004) wykrywali żywe komórki Cms do 7 dnia przechowywania w niesterylnej wodzie powierzchniowej, wcześniej skażonej Cms, bez względu na źródło pochodzenia wody. Autorzy sugerują, że w tym czasie, patogen może być transportowany drogą wodną na duże odległości, szczególnie w rzekach. Zakażone wody stwarzają pewne zagrożenie dla upraw ziemniaka, jednak z drugiej strony, by to nastąpiło musiałoby istnieć stałe źródło uwalniania bakterii, bowiem w wodzie koncentracja patogena ulega zmniejszeniu.

W badaniach nie zaobserwowano wzrostu liczebności jednostek tworzących kolonie Cms (rys. 1), w żadnym ze źródeł wody użytych do przygotowania zawiesin bakteryjnych. Czyste kultury Cms wyosobniono po 10 miesiącach utrzymywania w 4°C w wodzie destylowanej, oraz w wodzie ze stawu i rzeki. Liczebność populacji Cms zmniejszyła się odpowiednio w wodzie destylowanej nr 1 z  $2,2 \times 10^8$  do  $2,3 \times 10^6$ , w wodzie ze stawu z  $3,5 \times 10^7$  do  $2 \times 10^5$ , w wodzie z rzeki z  $3 \times 10^7$  do  $3 \times 10^4$  jtk/ml. W przypadku wody z

jeziora i wody destylowanej nr 2, Cms był izolowany do 8. miesiąca, potem nastąpiła kontaminacja wody niepożądanym gatunkiem bakterii, który uniemożliwił identyfikację kolonii Cms na pożywce.

Wolf i Beckhoven (2004) zaobserwowany brak wzrostu populacji Cms we wszystkich zastosowanych rozcieńczalnikach tłumaczyli względnie niską zdolnością patogena do przeżywania w środowisku wodnym. Niewielki wzrost liczebności, jaki wystąpił w sterylnej wodzie wodociągowej, przypisali rozdzieleniu się tworzących agregaty kolonii Cms. Autorzy uznali 35 dni za maksymalny czas przeżywania Cms w sterylnej wodzie z kranu, w 20°C. Krótszy okres uzyskali dla zawiesiny sterylnej wody MiliQ i sztucznego płynu z ksylemu.

Z wszystkich zawiesin utrzymywanych w 21°C, do 3. miesiąca trwania badań izolowano Cms (rys. 2). Największą redukcję w liczebności populacji zanotowano w wodzie z jeziora, najmniejszą w wodzie destylowanej. W 30°C bakteria przeżyła w wodzie destylowanej do 30 dni, chociaż nastąpiła znaczna redukcja koncentracji, z  $4,2 \times 10^9$  do  $1 \times 10^3$  jtk/ml (tab. 2).

Wykazano, że patogen utrzymywany w 4°C w sterylnych zawiesinach wodnych wody destylowanej nr 1 i 2, oraz z jeziora, rzeki i stawu zachował patogeniczność przez okres 5 miesięcy, po 10 miesiącach nie obserwowano objawów na roślinach infekowanych wodą destylowaną nr 2 oraz wodą z jeziora. Natomiast dla 21°C, po dwóch tygodniach od rozpoczęcia badań objawy choroby uwidoczniły się jedynie na roślinach bakłazana inokulowanych zawiesiną z rzeki.

#### WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki badań wskazują na zdolność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* do długotrwałego przeżywania w sterylnej wodzie destylowanej, oraz pochodzącej z jeziora, stawu i rzeki, przechowywanej w temperaturze 4°C.
2. Stwierdzono istotny wpływ poziomu temperatury na utrzymywanie się przy życiu bakterii Cms, temp. 21°C wpłynęła na spadek liczebności bakterii w zawiesinach.
3. Woda o temperaturze powyżej 30°C stanowi nieodgodne środowisko dla przeżycia bakterii Cms.
4. Przeprowadzone testy biologiczne na bakłazanie potwierdziły zachowanie przez Cms infekcyjności w środowisku wodnym, w temp. 4°C, po upływie, co najmniej 10 miesięcy. Uwidoczniło się to w postaci typowych objawów chorobowych na roślinach testowych, inokulowanych zawiesiną bakterii w wodzie destylowanej nr 1 oraz w wodzie ze stawu i rzeki.
5. Temperatura 21°C wpłynęła na obniżenie infekcyjności Cms w stosunku do bakłazana.

#### LITERATURA

- Bonde R. 1942. Ring rot in volunteer plants. Am. Potato J. 19: 131 — 133.  
Boer De S. H., McNaughton M. E. 1986. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. Am. Potato J. 63: 533 — 543.

- Boer De S. H., Vaerenbergh Van J., Stead D. E., Janse J. D., McKenzie A. R. 1992. A comparative study in five laboratories on detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato stems and tubers. *Potato Research* 35: 217 — 226.
- Dykstra T. P. 1941. Results of experiments in control of bacterial ring rot of potatoes in 1940. *Am. Potato J.* 18: 27 — 55.
- Dykstra T. P. 1942. Compilation of results in control of bacterial ring rot in 1941. *Am. Potato J.* 19: 175 — 196.
- Elphinstone J. G. 2004. Bacterial ring rot of potato — the facts (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). *British Potato Council Report*: 24 — 27.
- EPPO/CABI. 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. In: Quarantine pests for Europe. Second Edition. (Ed. By Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M.). CAB International, Wallingford, UK: 986 — 990.
- Knorr L. C. 1948. Suspect range of the potato ring rot bacterium. *Am. Potato J.* 25: 361 — 371.
- Manzer F. E., Gudmestad N. A., Nelson G. A. 1987. Factors affecting infection, disease development and symptom expression of bacterial ring rot. *Am. Potato J.* 64: 641 — 676.
- Nelson G. A. 1979. Persistence of *Corynebacterium sepedonicum* in soil and in buried potato stems. *Am. Potato J.* 56: 71 — 77.
- Nelson G. A. 1980. Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems. *Am. Potato J.* 75: 595 — 600.
- Nelson G. A. 1985. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems and on surfaces held at freezing and above freezing temperatures. *Am. Potato J.* 62: 23 — 28.
- Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I., Grzech W., Brzozowski S. 2004. Rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w rozmnożeniach wegetatywnych roślin. *Biul. IHAR* 233: 277 — 287.
- Pastuszewska T. 2008. Tempo rozwoju bakteriozy pierścieniowej ziemniaka z formy bezobjawowej w objawową w potomstwie bulw ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 531: 161 — 168.
- Slack S. A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Potato J.* 64: 665 — 669.
- Sletten A. 1985. The effect of *Corynebacterium sepedonicum* on symptoms and field of four potato cultivars. *Potato Research* 28: 27 — 33.
- Wolf Van der J. M., Beckhoven Van J. R. C. M. 2004. Factors affecting survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in water. *J. Phytopathology* 152: 161 — 168.