Effect of temperature, humidity and pH of environment on survival rate of bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Wpływ temperatury, wilgotności oraz pH otoczenia na przeżywalność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Anna Maćkowiak-Sochacka, Joanna Kamasa, Agnieszka Zwolińska, Krzysztof Krawczyk

Summary

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* (Cms) is a quarantine organism, and potato tubers infected with Cms must be utilized. Utilization of large amount of potatoes is problematic, therefore there is a need for appropriate methods of treatment, and one of the methods taken into consideration is composting.

The aim of the study was to determine the survival of Cms in conditions similar to the composting process. Research results indicate that the most important factor for the survival of Cms is temperature: the higher, the shorter the survival time of the bacteria. The increase in moisture content is a factor that reduces the survival of bacteria in relation to bacteria grown in the same temperature. In the studied temperatures, the pH of the substrate is a secondary factor for the survival of the bacteria *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Key words: potato ring rot, Cms survival rate, composting

Streszczenie

Utylizacja ziemniaków porażonych bakteriami *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) jest skomplikowana ze względu na trudności organizacyjne oraz straty ekonomiczne, spowodowane koniecznością zagospodarowania dużej ilości porażonych i prawdopodobnie porażonych bulw. Z tego względu istnieje potrzeba wytypowania odpowiednich metod utylizacji, a jedną z nich jest kompostowanie.

Celem badań było określenie przeżywalności Cms w warunkach zbliżonych do tych, które panują w trakcie procesu kompostowania. Określono wpływ temperatury, wilgotności oraz pH podłoża na wzrost bakterii Cms. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na przeżywalność bakterii Cms jest temperatura otoczenia: im wyższa, tym krótszy jest czas przetrwania bakterii. Wzrost wilgotności otoczenia to powoduje skrócenie czasu przeżywalności Cms w porównaniu z bakteriami wyrosłymi w tej samej temperaturze. Zróżnicowane pH podłoża w badanych temperaturach otoczenia miało niewielki wpływ na wzrost bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Słowa kluczowe: przeżywalność Cms, bakterioza pierścieniowa ziemniaka, kompostowanie

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
A.Sochacka@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* (Cms) to bakteria podlegająca obowiązkowi zwalczania, przy czym bulwy ziemniaka porażone lub prawdopodobnie porażone Cms muszą zostać zutylizowane. Sposoby utylizacji porażonych bulw ziemniaka są określone w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 kwietnia 2011 r. w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Utylizacja ziemniaków stanowi duży problem ze względu na trudności organizacyjne oraz straty ekonomiczne, spowodowane m.in. koniecznością zagospodarowania dużej ilości porażonych i prawdopodobnie porażonych bulw. Z tego względu istnieje potrzeba wskazania alternatywnych metod utylizacji, a jedną z nich jest kompostowanie. Metoda ta obok innych jest zalecanym przez European and Mediterranean Plant Protection Organization sposobem utylizacji bulw porażonych Cms (EPPO 2006), aczkolwiek istnieje niewiele doniesień naukowych potwierdzających skuteczność kompostowania w unieszkodliwianiu tych bakterii. Prace naukowe dotyczące wpływu wilgotności oraz temperatury na przeżywalność Cms były do tej pory prowadzone najczęściej w warunkach zbliżonych do panujących w środowisku naturalnym bakterii (Nelson 1980; Van der Wolf i wsp. 2005). W dostępnej literaturze naukowej brakuje wyników wcześniejszych badań nad wpływem pH na przeżywalność bakterii Cms w warunkach zbliżonych do panujących w trakcie kompostowania.

W procesie kompostowania mikroorganizmy rozkładają substancję organiczną. Uwalnia się przy tym dwutlenek węgla, woda i ciepło, a produktem stałym przemian jest kompost. Proces kompostowania zwykle składa się z czterech faz: fazy wstępnego rozkładu, intensywnego rozkładu (w tej fazie panują temperatury termofilowe powyżej 65°C), fazy przemian (kompostowanie właściwe) i dojrzewania (kompostowanie wtórne, w tej fazie temperatura nie przekracza 35°C) (Jędrczak 2007). Sukces w eliminacji różnych patogenów roślinnych w wyniku kompostowania zależy od wielu czynników m.in. od wilgotności (im wyższa wilgotność, tym zmniejsza się przeżywalność mikroorganizmów), produkcji toksycznych substancji (kwasów organicznych i amoniaku), a także enzymów wywołujących lizę komórkową. Najważniejszym czynnikiem w eliminacji szkodliwych mikroorganizmów w trakcie procesu kompostowania jest wysoka temperatura w fazie intensywnego rozkładu (Bollen 1985).

Celem badań było określenie przeżywalności Cms w warunkach zbliżonych do panujących w trakcie kompostowania, co pozwoli w przyszłości na ustalenie czy proces ten jest skutecznym sposobem utylizacji bulw ziemniaków porażonych przez *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Materiały i metody / Materials and methods

Szczep bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* PD 406 (pochodzący z kolekcji Pracowni Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego) hodowano przez 72 godziny na podłożu NBY (Nutrient Broth Yeast Agar) (Schaad 1988), następnie bakterie zawieszano w sterylnej wodzie i turbidymetrycznie ustalano stężenie inokulum. Końcowe stężenie bakterii w badanym materiale wynosiło 5×10^8 jtk/ml (jednostek tworzących kolonie/ml).

Bakterie zawieszano w homogenizowanej tkance z ziemniaka lub nanoszono na paski sterylnej bibuły, następnie umieszczano w inkubatorach o temperaturach: 23, 35, 50 i 70°C.

W homogenizowanej tkance ziemniaka ustalano pH za pomocą NaOH oraz stężonego HCl tak, aby jego wartość wynosiła 3,0; 5,5; 9,0. Następnie sterylizowano homogenizat w aparacie Kocha (tyndalizacja).

W określonych odstępach czasowych pobierano 100 µl homogenizowanej tkanki ziemniaka zawierającej zawiesinę Cms w i nanoszono na powierzchnię selektywnego podłoża NCPP-88 (Schaad 1988). Po trzech dniach inkubacji każdą płytkę zmywano trzykrotnie 1 ml sterylnej destylowanej wody, zmywy zlewano do wspólnego naczynia i rozcieńczano seryjnie do stężenia 10^{-3}. Z każdej z tych zawiesin izolowano DNA za pomocą zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Obecność bakterii potwierdzano za pomocą techniki Polymerase Chain Reaction (PCR) z wykorzystaniem jednej pary starterów PSA-1 i PSA-R. Sekwencja starterów pochodzi z intergenowego regionu zlokalizowanego w obrębie 16S- 23S rRNA bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Pastrik 2000). Równolegle bakterie wysiewano na podłoże NCPP-88 i po 72 godzinach inkubacji dokonywano oceny morfologii wyrosłych kolonii bakteryjnych. Uzyskane kolonie bakteryjne przeszczepiano na podłoże NBY, przeprowadzano test PCR i sprawdzano patogeniczność na oberżynie.

Kontrolę negatywną stanowiła tkanka ziemniaka lub bibuła bez dodanych bakterii Cms. Kontrolą pozytywną były bakterie Cms hodowane w temperaturze 23°C, ponieważ jest to temperatura optymalna dla wzrostu bakterii Cms.

W celu zbadania wpływu wilgotności otoczenia na przeżywalność Cms bakterie nanoszono na sterylne paski bibuły o wymiarach 7 mm x 120 mm. Bibuła była zwilżona sterylną wodą (wilgotność wówczas wynosiła około 99%) lub sucha (wilgotność takiej bibuły wynosiła średnio 15%). Pomiaru wilgotności względnej dokonywano za pomocą stacji pomiarowej Thermo-Hydro-Stadion firmy TFA.

W określonych odstępach czasu (tab. 1, 2) dokonywano zmywu bakterii z pasków bibuły poprzez wytrząsanie za pomocą worteksu (~1 min) w probówce zawierającej sterylną wodę destylowaną. Zawiesinę posiewano następnie na podłoże NCPP-88 i inkubowano w temperaturze 23°C. Wyrosłe bakterie przeszczepiano na podłoże NBY i podobnie, jak w poprzednich doświadczeniach przeprowadzano test PCR i sprawdzano patogeniczność na oberżynie.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Doniesienia naukowe dotyczące przeżywalności bakterii z gatunku *Clavibacter michiganensis* w wyniku kom-

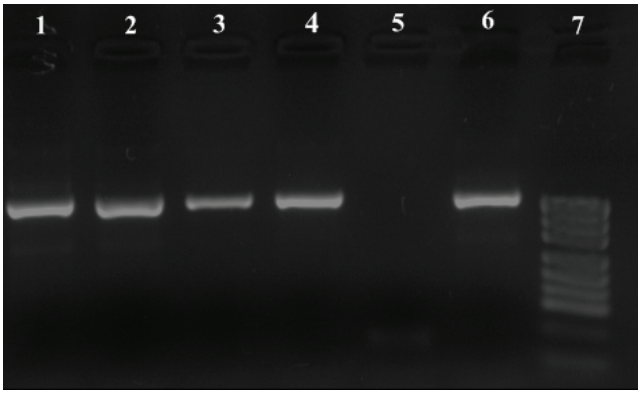
postowania odpadów roślinnych są nieliczne, a opublikowane w nich rezultaty rozbieżne. Wczesne badania dotyczące kompostowania odpadów pomidora porażonych blisko spokrewnionymi z Cms bakteriami *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm), sprawcami bakteryjnego raka pomidora wykazały, że Cmm mogą być skutecznie wyeliminowane podczas inkubacji temperaturze 35°C przez przynajmniej dwa tygodnie (Turner i wsp. 1983). Tymczasem z nowszych doniesień wynika, że w trakcie fazy termofilowej kompostowania trwającej około 70 dni populacja bakterii Cmm została zmniejszona o 5–6 rzędów wielkości, a całkowita inaktywacja patogena następowała w następującej po niej fazie mezofilowej, w której temperatura wynosi około 40°C lub mniej (Raviv i wsp. 2011). Opublikowanych dotychczas wyników z zakresu przeżywalności bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* jest jeszcze mniej, np. Secor i wsp. (1987) donosili, że w procesie sanitacji odpadów ziemniaka skażonych Cms temperatura minimalna 82°C utrzymywana przez 5 minut jest wystarczająca do całkowitej inaktywacji bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. W przeprowadzanych w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym doświadczeniach *in vitro* na stałym podłożu (bibule) efekt bakteriobójczy pojawiał się po półgodzinnej inkubacji bakterii Cms w temperaturze 70°C przy wilgotności wynoszącej około 99%. Zmniejszenie wilgotności do 15% wydłużało czas przeżywalności bakterii Cms w 70°C do około 48 godzin. Z kolei, w temperaturze 50°C przeżywalność w podłożu suchym (15%) wynosiła 28 dni. Zwiększenie wilgotności do około 99% spowodowało, że inkubacja w temperaturze 50°C dawała efekt bakteriobójczy już po 48 godzinach. W przypadku inkubacji w 35°C czas przeżycia bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* wynosił 30 dni (w podłożu o wilgotności około 100%) oraz 128 dni przy wilgotności 15% (tab. 1).

Tabela 1. Wpływ temperatury i wilgotności względnej otoczenia na czas przeżycia *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*
Table 1. The effect of temperature and relative humidity on survival time of *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Temperatura Temperature [°C]	Przeżywalność bakterii przy wilgotności względnej Survival time at relative humidity [%]	
	100	15
23	2 miesiące – months	8 miesięcy – months
35	30 dni – days	128 dni – days
50	48 godzin – hours	28 dni – days
70	0,5 godziny – hour	24 godziny – hours

Steinmöller i wsp (2007) sygnalizowali, że temperatura poniżej 50°C panująca podczas kompostowania trwającego ponad 2 miesiące oraz powyżej 65°C przez 21 dni nie powodowała dezaktywacji bakterii Cms. Nasuwa się jednak pytanie, czy w tym konkretnym przypadku wartość temperatury była taka sama w całej objętości pryzmy kompostowej?

W doświadczeniach duże różnice w czasie przeżycia bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* wynikały nie tylko z różnic w temperaturze, lecz także i w wilgotności otoczenia (tab. 1). Im wyższa wilgotność, tym przeżywalność bakterii Cms była krótsza. Różnice w czasie przeżycia bakterii można wytłumaczyć tym, że termostabilność komórek bakteryjnych spada w miarę wzrostu wilgotności otoczenia (Jędrczak 2007). Ujemny wpływ wzrostu wilgotności otoczenia na czas przeżycia *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* odnotowali Nelson (1980) oraz Van der Wolf i wsp. (2005), aczkolwiek ich badania dotyczyły przeżywalności Cms w temperaturach 5–20°C. Na rysunku 1. przedstawiono przykładowy rozdział elektroforetyczny, w którym uzyskano wynik wskazujący na obecność bakterii Cms dla wszystkich badanych prób.



Rys. 1. Wynik reakcji PCR – elektroforeza w żelu agarozowym
1–4 – bakterie wyrosłe na podłożu NCP-88 po inkubacji w temperaturze 50°C
5 – kontrola negatywna
6 – kontrola pozytywna (*C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*)
7 – marker pUC (MBI Fermentas)

Fig. 1. Results of PCR assay – agarose-gel electrophoresis
1–4 – bacteria grown on NCP-88 medium after incubation at 50°C temperature
5 – negative control
6 – Cms – positive control (*C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*)
7 – pUC – marker (MBI Fermentas)

Przeżywalność bakterii Cms w tkance ziemniaka (tab. 2) znacznie spadała we wszystkich zakresach temperatur w porównaniu z przeżywalnością bakterii inkubowanych na stałym podłożu (bibule). Najprawdopodobniej było to wynikiem konkurencji różnych mikroorganizmów rozwijających się na ziemniaku i powodujących skrócenie przeżywalności bakterii (tab. 2). Znaczny wpływ na przeżycie patogenów w wyniku kompostowania ma bowiem antagonizm pomiędzy mikroorganizmami – pasożytnictwo, produkcja antybiotyków, konkurencja w dostępie do składników pokarmowych, a także zjawisko naturalnej utraty żywotności patogena pojawiające się w miarę upływu czasu (Coventry i wsp. 2002).

Tabela 2. Wpływ temperatury i pH otoczenia na czas przeżycia *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*
Table 2 . The effect of temperature and pH on the survival time of *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Temperatura Temperature [°C]	Przeżywalność bakterii przy pH Survival time at pH		
	3,0	5,5	9,0
23	> 8 dni – days	> 8 dni – days	> 7 dni – days
35	8 dni – days	8 dni – days	8 dni – days
50	< 3 godziny – hours	< 8 godzin – hours	< 3 godzin – hours
70	< 0,5 godziny – hour	< 0,5 godziny – hour	< 0,5 godziny – hour

Doświadczenia wykazały, że pH tkanki ziemniaka miało minimalny wpływ na przeżywalność bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* bez względu na temperaturę inkubacji (tab. 2).

Wnioski / Conclusions

1 Największe znaczenie dla czasu przeżycia *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* ma temperatura otoczenia – im jest wyższa, tym krótsza jest przeżywalność bakterii.
2. Wzrost wilgotności podłoża jest czynnikiem skracającym przeżywalność bakterii w odniesieniu do bakterii hodowanych w tej samej temperaturze.
3. Odczyn podłoża nie ma wpływu na przeżywalność bakterii Cms w tkance ziemniaka.
4. Dotychczasowe wyniki nie wskazują jednoznacznie na to, czy przetwarzanie bulw porażonych *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* w kompostowniach stanowi skuteczny sposób utylizacji porażonych bulw, dlatego badania te powinny być kontynuowane.

Literatura / References

Bollen G.J. 1985. The fate of plant pathogens during composting of crop residues. p. 282–290. In: „Composting of Agricultural and Other Wastes" (J.K.R. Gasser, ed.). Elsevier Applied Science, London, UK.
EPPO 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. EPPO Bull. 36: 99–109.
Coventry E., Noble R., Mead A., Whipps J.M. 2002. Control of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) with composted onion waste. Soil Biol. Biochem. 34: 1037–1045.
Jędrczak A. 2007. Biologiczne Przetwarzanie Odpadów. PWN SA, Warszawa, s. 94, 198; 465 ss.
Nelson G.A. 1980. Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems. Am. J. Potato Res. 57 (12): 595–600.
Pastrik K.H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. Eur. J. Plant Pathol. 106: 155–165.
Raviv M., Krassnovsky A., Kritzman G., Kirshner B. 2011. Minimizing the risk of bacterial canker spread through plant residue composting. Acta Hort. (ISHS) 915: 151–156.
Schaad N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Edition. APS Press, St. Paul, MN, p. 4, 223; 374 pp.
Secor G.A., De Buhr L., Gudmestad N.C. 1987. Chemical sanitation for bacterial ring rot control. Am. Potato J. 64: 699–700.
Steinmöller S., Müller P., Büttner C. 2007. Effect of composting and pasteurisation on two important quarantine pests of potato. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 72 (2): 341–351.
Turner J., Stafford D.A., Hughes D.E. 1983. The reduction of three plant pathogens (*Fusarium*, *Corynebacterium* and *Globodera*) in anaerobic digesters. Agric. Wastes 6: 1–11.
Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzger M., Müller P., Hukkanen A., Karjalainen R. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Res. Int. B.V. Wageningen, Report 95: 7–19.