

SKUTECZNOŚĆ PRZEMYSŁOWEJ UTYLIZACJI ZIEMNIAKÓW PORAŻONYCH PRZEZ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* (BAKTERIOZA PIERŚCIENIOWA)

ANNA MAĆKOWIAK-SOCHACKA, JOANNA KAMASA,
AGNIESZKA ZWOLIŃSKA, KRZYSZTOF KRAWCZYK

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

I. WSTĘP

Bakterioza pierścieniowa jest jedną z najgroźniejszych chorób bakteryjnych ziemniaka – często występuje w naszym kraju, a jej sprawca należy do organizmów kwarantannowych. Zgodnie z obowiązującym wcześniej rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 6 kwietnia 2007 r. w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), bulwy lub rośliny ziemniaka, uznane za porażone muszą ulec utylizacji. Wybór dostępnych do tej pory metod utylizacji był ograniczony – zgodnie z rozporządzeniem porażone bulwy można umieścić na bezpiecznym składowisku odpadów, spalić, przeznaczyć do konsumpcji (skarmiania) lub do przemysłowego przetworzenia. Wprowadzone 9 kwietnia 2011 r. nowe rozporządzenie w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka dopuszcza stosowanie kolejnych metod zagospodarowania bulw ziemniaków porażonych Cms: zakopanie na polu, na którym były one uprawiane, konsumpcję w zakładach zbiorowego żywienia oraz skarmienie przez zwierzęta na surowo lub po wcześniejszym uparowaniu.

Celem badań prowadzonych w ubiegłych latach w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym (IOR – PIB) było sprawdzanie obecności bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* w pozostałościach z przemysłowego przerobu bulw porażonych bakteriozą pierścieniową (Maćkowiak-Sochacka i Zwolińska 2008). Najnowsze wyniki dotyczą badań odpadów pochodzących z gorzelni, w której przetwarzano bulwy ziemniaków zainfekowanych Cms. Ta metoda utylizacji, choć należy do tradycyjnych metod zalecanych dla unieszkodliwiania bulw porażonych przez Cms była rzadko stosowana, w związku z tym do tej pory nie badano jej bezpieczeństwa fitosanitarnego.

II. MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto produkty pozostałe po fermentacji alkoholowej (pulpę pofermentacyjną) oraz odpady płynne powstałe podczas wstępnego przygotowywania bulw do przeróbki. Próby pobierano w gorzelni, w miejscowości Łąkie w województwie wielkopolskim.

Do badań wykorzystano metodykę pochodzącą z załączników Dyrektywy Komisji 2006/56/WE z dnia 12 czerwca 2006 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, zmodyfikowaną w IOR – PIB w latach ubiegłych.

Ekstrakcja bakterii

Odpady pozostałe z przerobu bulw ziemniaków porażonych przez Cms pobierano bezpośrednio po przetworzeniu i dwukrotnie odwirowywano celem oddzielenia większych zanieczyszczeń, a później zageszczenia. Ekstrakty poddawano testom serologicznym z wykorzystaniem surowicy z firm Agdia i Aden, izolowano z nich DNA za pomocą zestawu DNeasy Plant Kit z firmy Qiagen. Następnie wykonywano test PCR metodą wg Pastrika (Pastrik 2000). Oprócz tego dokonywano posiewu 100 µl próbki o stężeniach 1×10^{-3} oraz 1×10^{-4} na płytki Petriego zawierające selektywne podłoże NCP-88 (Schaad i wsp. 2001). Każdy posiew wykonywano w trzech powtórzeniach. Po 4 dniach oceniano wzrost kolonii bakteryjnych i na podstawie morfologii dokonywano selekcji kolonii bakteryjnych do dalszych badań.

Diagnostyka bakterii

Kolonie bakteryjne o charakterystycznym dla Cms wyglądzie przeszczepiano na podłoże TSA. Diagnostyka wybranych kolonii bakteryjnych oraz ekstraktów uzyskanych bezpośrednio z odpadów obejmowała barwienie metodą Grama, oraz molekularne i serologiczne procedury diagnostyczne. Szczegółowy opis procedur wykorzystanych procedur znajduje się w załącznikach do Dyrektywy Komisji 2006/56/WE.

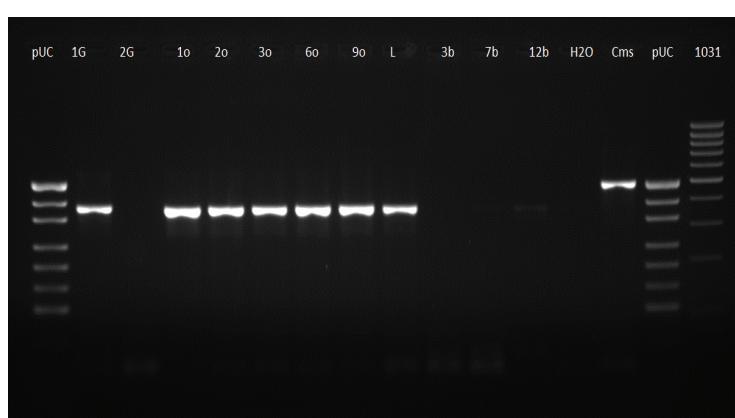
Testy biologiczne

Zarówno zagęszczony ekstrakt uzyskany bezpośrednio z wycierki, jak i z zawiesiny wybranych bakterii Gram- dodatnich o stężeniu 10^7 cfu/ml (colony forming units/1 mililitr) wstrzykiwano do podstawy pędu siewki oberżyny odmiany Black Beauty, następnie do 40 dni oczekiwano na charakterystyczne objawy – więdnięcie oraz nekrozy liścia. Kontrolę dodatnią stanowiła zawiesina bakterii *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* o stężeniu 10^7 cfu/ml, kontrolę negatywną – sterylna woda destylowana. Na każde powtórzenie przypadało 10 sztuk roślin oberżyny.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Odpady pozostałe po przerobie ziemniaków porażonych przez Cms badano przede wszystkim pod kątem obecności żywych bakterii Cms. W wycierce (pozostałościach z przemysłowego przerobu ziemniaków na skrobie) badanej w ubiegłych latach nie stwierdzono obecności bakterii Cms (Maćkowiak-Sochacka i Zwolińska 2008). Podob-

nie wyglądają ostatnie wyniki badań nad obecnością bakterii *Cms* w pozostałościach po fermentacji alkoholowej w gorzelni. Bulwy ziemniaka zostają poddawane parowaniu pod ciśnieniem w temperaturze wynoszącej około 150°C, dlatego stwierdzono znaczne ograniczenie liczby bakterii wyizolowanych z pulpy pofermentacyjnej (w porównaniu do liczby izolatów bakteryjnych z odpadów pozostałych po wstępnej obróbce bulw ziemniaka). W pulpie pofermentacyjnej nie stwierdzono obecności żywych bakterii *Cms* a testy molekularne i serologiczne wykonane bezpośrednio na ekstraktach pulpy również dały negatywne wyniki (rys. 1).



Rys. 1. Wynik PCR – elektroforeza w żelu agarozowym. 1G – odpady z gorzelni (przed obróbką); 2G – (pulpa pofermentacyjna); 1o, 2o, 3o, 6o, 9o, L – izolacja z oberżyny; 3b, 7b, 12b – wybrane kolonie bakteryjne; H₂O – kontrola negatywna; Cms – kontrola pozytywna; pUC, 1031 – markery

Fig. 1. PCR result – agarose gel electrophoresis. 1G – waste from distillery (before processing); 2G – fermentation residues; 1o, 2o, 3o, 6o, 9o, L – isolation from the eggplant; 3b, 7b, 12b – selected bacterial colonies; H₂O – negative control; Cms – positive control; pUC, 1031 – markers

W odpadach i ściekach powstających w wyniku przygotowania bulw do przerobu także nie wykryto obecności żywych bakterii *Cms* (rys. 1). Przyczyna tego stanu rzeczy jest najprawdopodobniej taka, iż bakterie te bardzo wolno rosną i słabo współzawodniczą z innymi organizmami, poza tym w dużej masie odpadów płynnych i stałych *Cms* podlegają znacznemu rozcieńczeniu. Dlatego odpadów z gorzelni, które powstały przed obróbką termiczną nie można traktować jako bezpieczne i wolne od bakterii *Cms*. Zgodnie z Rozporządzeniem (2011), aby zachować bezpieczeństwo fitosanitarne, ważne jest, by ścieki nie wydostawały się poza obieg zamknięty w zakładzie produkcyjnym, lecz zostały skierowane do oczyszczalni biologicznych i następnie przechodziły dalszą utylizację, np. poprzez zastosowanie odpowiednich środków dezynfekcyjnych i/lub wysokich temperatur (min. 74°C przez 4 godziny), co eliminuje ryzyko wydostania się *Cms* do środowiska.

Dotychczasowe doświadczenia wskazują, że przemysłowy przerób bulw zarówno w gorzelniach, jak i w Zakładach Przemysłu Ziemniaczanego nie zawsze jest możliwy, dlatego istnieje potrzeba opracowania nowych metod utylizacji ziemniaków zainfekowanych bakterią pierścieniową tak, aby można było dostosować sposób przerobu do indywidualnych potrzeb i możliwości producentów oraz hodowców ziemniaka. Wyniki nowych badań nad kolejnymi metodami utylizacji ziemniaków mogą stanowić podstawę do późniejszych zmian w ustawodawstwie, umożliwiających w przyszłości rozszerzenie katalogu sposobów utylizacji bulw ziemniaka porażonych przez Cms.

IV. WNIOSKI

Przemysłowe przetwarzanie bulw ziemniaka porażonych przez Cms zarówno w Zakładach Przemysłu Ziemniaczanego, jak i w gorzelniach stanowi skuteczną metodę ich utylizacji, jednak aby w pełni kontrolować bezpieczeństwo fitosanitarne tych metod, wskazany jest monitoring odpadów pozostałych po procesie przetwarzania.

V. LITERATURA

- Dyrektywa Rady 93/85/EWG z dnia 4 października 1993 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka zmieniona przez: Dyrektywę Komisji 2006/56/WE z dnia 12 czerwca 2006 r. Dz.U. L 182 str. 1 z 4.7.2006.
- Maćkowiak-Sochacka A., Zwolińska A. 2008. Wykrywanie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w pozostałościach z przemysłowego przerobu ziemniaków porażonych bakterią pierścieniową. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 48 (2): 477–481.
- 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.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 9 kwietnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Dz. U. Nr 94 poz. 556.
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, 373 pp.

ANNA MAĆKOWIAK-SOCHACKA, JOANNA KAMASA,
AGNIESZKA ZWOLIŃSKA, KRZYSZTOF KRAWCZYK

EFFICACY OF INDUSTRIAL DISPOSAL OF POTATO TUBERS INFECTED BY *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* (BACTERIAL RING ROT)

SUMMARY

According to the regulation of the Polish Minister of Agriculture and Rural Development dated on 6 of April 2007 on the specific practices for controlling and preventing the spread

of bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, tubers or potato plants considered to be contaminated by the pathogen must be utilized. The selection of available disposal methods was limited to placing infested tubers in a secure landfill, burning, and using them for consumption (feeding) or industrial processing. In accordance with changes in legislation dated on 9 of April 2011, more methods of disposal (utilization of tubers by burial in the field where infected potatoes were grown, consumption in catering establishments and raw feeding of animals) are allowed.

The aim of our research in recent years was to detect the presence of the bacteria *C. michiganensis* ssp *sepedonicus* (Cms) in the residues from industrial processing of infected tubers. The latest results included testing of wastes from the distillery, where potato tubers infected with Cms were processed. This way of disposal, although it belongs to the traditional methods, that are recommended for utilization of infected with Cms tubers, has been little used so far and phytosanitary safety of this method has not been studied. Disposal of tubers through industrial processing in distillery appears to be safe in terms of phytosanitary measure, but requires monitoring.

Key words: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, bacterial ring rot of potatoes, disposal, legal regulation