

## Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on surface of selected materials in different temperature conditions

### Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur

Teresa Pastuszewska, Grzegorz Gryń

#### Summary

Study were conducted at the Plant Breeding and Acclimatization Institute Research, Division Bydgoszcz in 2005–2007. The aim of this study was to determine a period of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) survival on storage surface of machinery, materials, and equipment contaminated by infected tubers with the bacteria during seeding operations, cultivation, harvest, storage and transport at different temperatures.

BPR IOR 527 *Cms* strain was used. Six materials: wood, rubber, jute, plastic, paper, steel were contaminated with bacterial suspension at the concentration of  $10^9$  cfu/ml and put in Petri dishes and incubated at four temperatures. The survival of bacteria, by isolation on yeast peptone glucose agar (YPGA – Yeast peptone glucose agar) and virulence in eggplant test, periodically were controlled.

The study confirmed that *Cms* can survive for lengthy period on different surface tested.

**Key words:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, pathogenicity test, survival

#### Streszczenie

W latach 2005–2007, w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy przeprowadzono badania, których celem było poznanie czasu przeżycia bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) na powierzchniach maszyn, materiałów i sprzętów, które mogą mieć kontakt z porażonym materiałem podczas sadzenia, uprawy, zbioru, przechowywania i transportu, w warunkach różnych temperatur.

Do badań wykorzystano czyste kultury szczepu *Cms* BPR IOR 527 oraz nośniki wykonane z sześciu różnych materiałów: drewno, guma, juta, plastik, papier pakowy i stal, które kontaminowano zawiesiną bakterii o koncentracji  $10^9$  jtk/ml, umieszczano w szalkach Petriego i inkubowano w czterech temperaturach. Okresowo przeprowadzano kontrole przeżycia bakterii poprzez posiew na podłoże – agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA – Yeast peptone glucose agar) oraz testy na bakłażanie w celu określenia wirulencji.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły zdolność bakterii *Cms* do długotrwałego przeżycia na różnych powierzchniach.

**Słowa kluczowe:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, przeżywalność, test na patogeniczność

---

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział Bydgoszcz  
Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz  
t.pastuszewska@ihar.bydgoszcz.pl

## Wstęp / Introduction

Komórki bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) są odporne na wysuszenie i długo utrzymują żywotność bez kontaktu z rośliną żywicielską, na powierzchniach wielu materiałów, szczególnie w warunkach niskiej wilgotności (Elphinstone 2004; Janse 2006). Dowiedzono długoterminową przeżywalność patogenu na powierzchniach metalowych maszyn, powierzchniach produkcyjnych i przechowalniczych oraz odzieży (Nelson 1980, 1985).

W latach 2005–2007, w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy, przeprowadzono badania, których celem było określenie okresu przeżycia *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, w warunkach różnych temperatur, na wybranych powierzchniach, z którymi porażony przez patogen materiał roślinny ziemniaka może mieć kontakt podczas uprawy, zbioru, przechowywania czy przemieszczania.

## Materiały i metody / Materials and methods

W badaniach wykorzystano hodowle czystych kultur szczepu macierzystego *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (BPR IOR 527), które utrzymywano na podłożach stałych YGM – Yeast extract mineral salts medium (pożywka z wyciągiem drożdżowym wzbogaconą solami mineralnymi) i YPGA – Yeast peptone glucose agar (agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy).

Do kontaminacji zawiesziną *Cms* wybrano 6 różnych materiałów, takich jak: drewno, guma, juta, polipropylen, papier pakowy i stal. Przygotowano z nich nośniki o powierzchni około 6 cm<sup>2</sup>, sterylizowano parą wodną w autoklawie (polipropylen i guma) oraz gorącym powietrzem w sterylizatorze (drewno, juta, papier pakowy i stal).

Na jałowe powierzchnie nośników наносzono 20 µl objętość inokulum bakteryjnego o liczebności komórek *Cms* 10<sup>9</sup> jtk/ml. Następnie nośniki umieszczono w sterylnych szalkach Petriego i inkubowano w czterech stałych temperaturach: –10, 4, 21 i 50°C.

W odstępach czasowych tygodnia dla temperatury 50°C i miesiąca dla pozostałych temperatur (–10, 4, 21°C) przeprowadzano kontrole przeżycia bakterii. Bakterie ekstrahowano ze skażonych powierzchni przez wytrząsanie nośników w 20 ml sterylnych pojemnikach z polipropylenu z dodatkiem jałowego roztworu fizjologicznego. Następnie wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń zawiesiny bakteryjnej (od 10 do 10<sup>7</sup>), które wysiewano powierzchniowo na płytki Petriego z podłożem YPGA. Ocenę wzrostu kolonii *Cms* przeprowadzano po 3, 5, 7, 10 i 14 dniach.

W celu oceny wirulencji bakterii wykonano 8 testów biologicznych na bakłażanie (*Solanum melongena* L., odmiana Black Beauty), w tym dla wyizolowanych z powierzchni, utrzymywanych w temperaturze 4°C – 3 testy, a dla pozostałych temperatur po 2 testy. Siewki bakłażana w stadium trzeciego liścia inokulowano zawiesinami bakterii otrzymanymi po wytrząsaniu badanych nośników w roztworze NaCl. Rośliny zakażano pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem, przy pomocy igły do iniekcji. Każdą

próbę wykonywano w pięciu powtórzeniach. Jako kontrole wykorzystano sterylny bufor PB i zawieszinę *Cms*, szczep BPR IOR 527. Infekowane rośliny utrzymywano w pokoju hodowlanym w temperaturze 21–24°C, przy 14-godzinym oświetleniu, przez okres 40 dni. Obserwacje objawów chorobowych rozpoczęto po pięciu dniach od inokulacji, następne przeprowadzano w odstępach tygodniowych. Pierwsze objawy chorobowe pojawiły się po dwóch tygodniach.

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

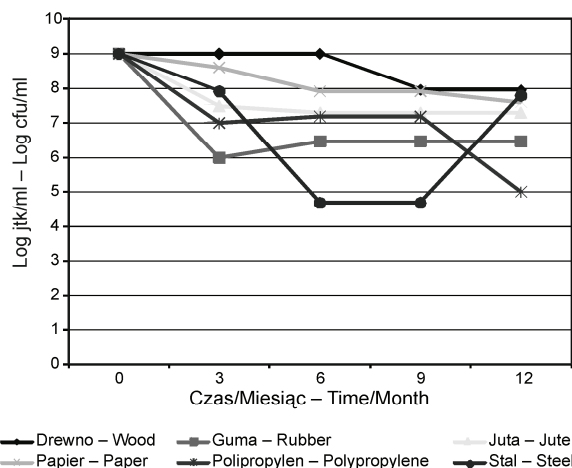
Uzyskany czas przeżycia komórek bakterii *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na materiałach testowanych w badaniach przedstawiono w tabeli 1. i na rysunkach 1–4. Bakterie najdłużej pozostały żywe w temperaturze 4°C, po 21 miesiącach uzyskano wzrost kolonii na podłożu mikrobiologicznym pobrano z wszystkich badanych sześciu powierzchni. Od 18 miesiąca zaobserwowano wyraźny spadek liczebności izolowanych bakterii ze stali, od 20 miesiąca mniejszy spadek zanotowano na gumie i papierze, natomiast na drewnie i polipropyle nie wystąpiły istotne różnice w liczebności izolowanych bakterii w porównaniu z inokulum *Cms*.

Po 14 miesiącach utrzymywania *Cms* w temperaturze –10°C uzyskano wzrost kolonii na podłożu mikrobiologicznym z wszystkich badanych powierzchni. Najniższą liczebność bakterii zanotowano dla polipropylenu – około 10<sup>5</sup> jtk/ml, dla gumy – 10<sup>6</sup> jtk/ml, juty i papieru – 10<sup>7</sup> jtk/ml, a dla stali i drewna – 10<sup>8</sup> jtk/ml. Nelson (1985) oraz Nelson i Kozub (1990) również wykazali zdolność *Cms* do długiego zachowania żywotności w temperaturze ujemnej. Na workach jutowych przechowywanych w stałych temperaturach –40°C oraz –20°C bakterie zachowały żywotność przez 53 miesiące, przy zmiennej temperaturze od –40°C do –5°C czas przeżycia uległ skróceniu do 18 miesięcy.

Z powierzchni skażonych *Cms* i przechowywanych w temperaturze 21°C po 12 miesiącach nie wyizolowano bakterii z żadnego z zastosowanych materiałów. Najdłużej bakterie przeżyły na gumie i polipropyle – 11 miesięcy. Krócej, tj. 10 miesięcy na jucie, 8 miesięcy na stali, 7 miesięcy na papierze i najkrócej na drewnie – 6 miesięcy.

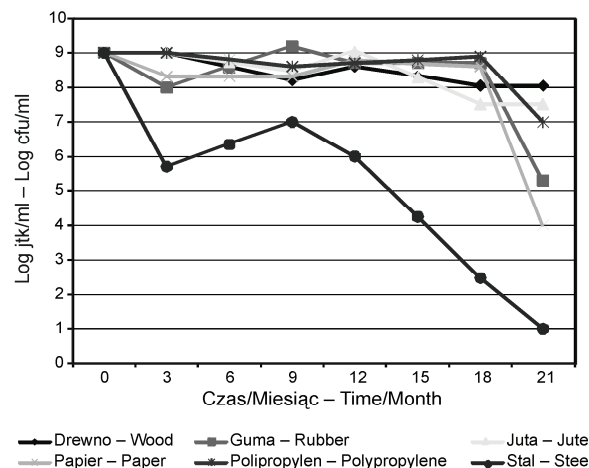
Bakterie najkrócej utrzymały się przy życiu w temperaturze 50°C na powierzchni drewna, gumy i stali – 2 tygodnie, podczas gdy na jucie, polipropyle i papierze pakowym – 4 tygodnie.

Nelson (1978, 1979, 1980, 1985) badał również wpływ temperatur dodatnich stałych i zmiennych oraz różnych warunków wilgotności na długotrwałość przeżycia *Cms*. Komórki bakterii przeżyły na wielu powierzchniach przechowalniczych, maszynach i odzieży, w nieogrzewanym hangarze przez okres ponad 10 miesięcy. Na workach jutowych, papierze i plastiku w 5°C i 20°C, przez co najmniej 24 miesiące przy wilgotności 12%, podczas gdy w warunkach wilgotności 94% tylko 14 miesięcy. Autorzy pracy uważają, że zróżnicowanie w przeżywalności patogenu sugeruje, że temperatura i wilgotność determinują długość życia bakterii *Cms* na skażonych



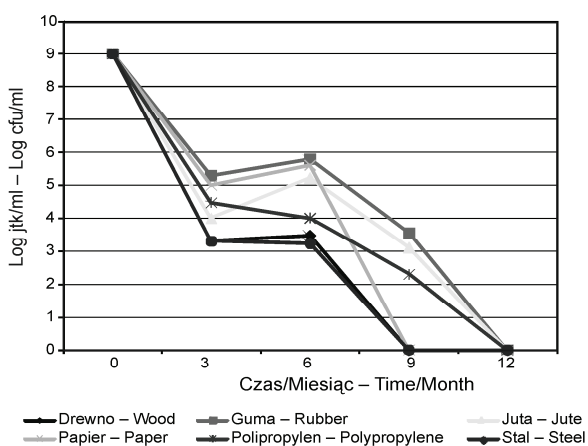
Rys. 1. Przeżywalność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na różnych rodzajach materiałów w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$

Fig. 1. Survival of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* on different contaminated surface stored at temperature  $-10^{\circ}\text{C}$



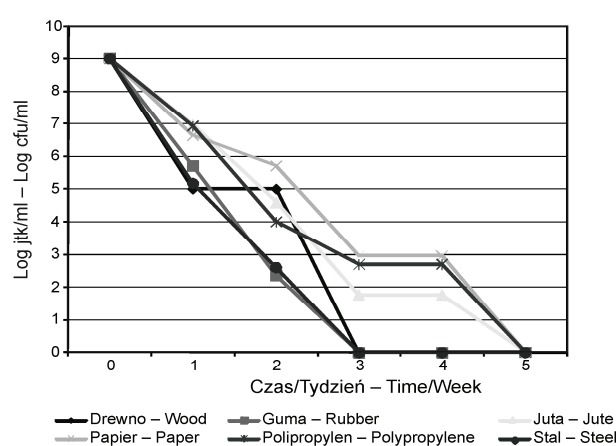
Rys. 2. Przeżywalność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na różnych rodzajach materiałów w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$

Fig. 2. Survival of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* on different contaminated surface stored at temperature  $4^{\circ}\text{C}$



Rys. 3. Przeżywalność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na różnych rodzajach materiałów w temperaturze  $21^{\circ}\text{C}$

Fig. 3. Survival of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* on different contaminated surface stored at temperature  $21^{\circ}\text{C}$



Rys. 4. Przeżywalność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na różnych rodzajach materiałów w temperaturze  $50^{\circ}\text{C}$

Fig. 4. Survival of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* on different contaminated surface stored at temperature  $50^{\circ}\text{C}$

Tabela 1. Przeżywalność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* na skażonych powierzchniach przechowywanych w warunkach zróżnicowanej temperatury

Table 1. Survival of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* on contaminated surfaces stored in different temperatures

| Rodzaj powierzchni<br>Surface | Okres przeżycia w temperaturze – Survival period in temperature |                 |     |       |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-----|-------|
|                               | tydzień – week                                                  | miesiąc – month |     |       |
|                               | 50°C                                                            | 21°C            | 4°C | -10°C |
| Drewno – Wood                 | 2                                                               | 6               | 21* | 14*   |
| Guma – Rubber                 | 2                                                               | 11              | 21* | 14*   |
| Juta – Jute                   | 4                                                               | 10              | 21* | 14*   |
| Papier – Paper                | 4                                                               | 7               | 21* | 14*   |
| Polipropylen – Polypropylene  | 4                                                               | 11              | 21* | 14*   |
| Stal – Steel                  | 2                                                               | 8               | 21* | 14*   |

\*przez co najmniej tyle miesięcy – at least

Tabela 2. Wyniki testu patogeniczności na bakłażanie  
Table 2. Pathogenicity test in eggplants results

| Rodzaj powierzchni<br>Surface          | Temperatura przechowywania – Storage temperature                                                             |     |     |     |     |     |      |     |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
|                                        | –10°C                                                                                                        |     |     | 4°C |     |     | 21°C |     |
|                                        | czas przechowywania na powierzchniach w miesiącach<br>storage time in month – depending on a type of surface |     |     |     |     |     |      |     |
|                                        | 7                                                                                                            | 10  | 14  | 14  | 17  | 20  | 6    | 11  |
|                                        | liczba roślin z objawami/liczba roślin inokulowanych<br>number plants with symptoms/number inoculated plants |     |     |     |     |     |      |     |
| Drewno – Wood                          | 1/5                                                                                                          | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 2/5 | 0/5 | 3/5  | 0/5 |
| Guma – Rubber                          | 4/5                                                                                                          | 5/5 | 2/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5  | 0/5 |
| Juta – Jute                            | 5/5                                                                                                          | 4/5 | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 3/5 | 0/5  | 0/5 |
| Papier – Paper                         | 4/5                                                                                                          | 3/5 | 3/5 | 5/5 | 3/5 | 3/5 | 2/5  | 0/5 |
| Polipropylen – Polypropylene           | 4/5                                                                                                          | 5/5 | 4/5 | 5/5 | 3/5 | 3/5 | 4/5  | 0/5 |
| Stal – Steel                           | 2/5                                                                                                          | 4/5 | 5/5 | 4/5 | 2/5 | 3/5 | 1/5  | 0/5 |
| Kontrola pozytywna<br>Positive Control | 5/5                                                                                                          | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5  | 5/5 |

powierzchniach. Elphinstone (2004) i Janse (2006) wskazują również na istotny wpływ wyższej wilgotności na skrócenie przeżycia *Cms*, zarówno na mokrych, jak i suchych powierzchniach, ale przechowywanych w wilgotnych warunkach.

W przeprowadzonych testach na bakłażanie (tab. 2), najdłużej, bo po 20 miesiącach inkubacji, na powierzchni drewna, gumy, juty, papieru, polipropylenu i stali, obserwowano objawy chorobowe na roślinach inokulowanych komórkami bakterii pozyskanymi z powierzchni gumy, juty, papieru, polipropylenu i stali, przechowywanych w temperaturze 4°C. Do 17. miesiąca objawy notowano także dla komórek *Cms* pozyskanych z powierzchni drewna.

W temperaturze –10°C do 7. miesiąca trwania doświadczenia stwierdzono objawy na roślinach zakażanych inokulum bakterii pozyskanych z wszystkich badanych materiałów. Natomiast po 10 miesiącach, objawów nie notowano na roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii pozyskanych z drewna oraz do 14. miesiąca z pozostałych badanych powierzchni.

Najkrótszy okres, poniżej 6 miesięcy uzyskano dla gumy i juty przechowywanej w temperaturze 21°C. Po 11 miesiącach objawy nie wystąpiły na żadnej z inokulowanych roślin.

## Wnioski / Conclusions

1. Badania potwierdziły zdolność *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* do długotrwałego przeżywania na powierzchniach różnych materiałów, jak: drewno, guma, juta, polipropylen, papier pakowy i stal.
2. Poziom temperatury istotnie wpływał na czas przeżycia bakterii *Cms*. Najkrócej (2 tygodnie), przeżyły bakterie utrzymywane w temperaturze 50°C na powierzchni drewna, gumy i stali.
3. Komórki *Cms*, wyizolowane z wszystkich badanych powierzchni, zachowały najdłużej żywotność i zdolność do tworzenia kolonii na podłożu YPGA, przez co najmniej 21 miesięcy w temperaturze 4°C.
4. Testy biologiczne na bakłażanie potwierdziły zachowanie przez *Cms* patogeniczności, przez co najmniej 20 miesięcy na skażonych powierzchniach, utrzymywanych w 4°C (guma, juta, papier pakowy, polipropylen, stal) i 14 miesięcy w temperaturze –10°C (guma, juta, papier, polipropylen i stal). Na roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii obserwowano typowe objawy chorobowe, jak plamistości pomiędzy nerwami i więdnienie liści. W 11. miesiącu nie wystąpiły żadne objawy na roślinach oberżyny inokulowanych zawiesiną z komórek *Cms* przechowywanych w temperaturze 21°C.

## Literatura / References

- Elphinstone J.G. 2004. Bacterial Ring Rot of Potato – the Facts (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). British Potato Council, 46 pp.
- Janse J.D. 2006. Phytobacteriology. Principles and Practice. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 360 pp.
- Nelson G.A. 1978. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces. Am. Potato J. 55: 449–452.
- 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. 57: 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.
- Nelson G.A., Kozub G.C. 1990. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* at freezing and at wide fluctuations between freezing and above-freezing temperatures. Am. Potato J. 67: 625–630.