

**ANTYBAKTERYJNE WŁAŚCIWOŚCI ŚRODKÓW  
DEZYNFEKCYJNYCH  
W STOSUNKU DO BAKTERYJNYCH PATOGENÓW CEBULI**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DISINFECTANTS  
TOWARDS ONION PATHOGENIC BACTERIA**

**Beata Kowalska, Urszula Smolińska**

Pracownia Mikrobiologii  
Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

**WSTĘP**

W ostatnich latach w Polsce obserwuje się znaczny wzrost liczby chorób bakteryjnych na roślinach warzywnych. Poważne straty zauważalne są w uprawach polowych, w transporcie oraz szczególnie podczas przechowywania. Ze względu na brak wystarczająco skutecznych środków ochrony istnieją ogromne trudności w zapobieganiu tym chorobom. Bakteriozy rozwijają się bardzo szybko, a początkowy proces chorobowy jest trudno zauważalny (Agrios 2005, Kowalska 2006, Schwartz i Mohan 2008). Głównym źródłem pierwotnego zakażenia są chore rośliny i zakażone resztki roślinne pozostające na polu. Dużym zagrożeniem podczas uprawy są także zabrudzone glebą maszyny, narzędzia, obuwie, natomiast podczas przechowywania i transportu - skrzynie, podłogi, palety. Działania ochronne powinny koncentrować się na lokalizowaniu i eliminowaniu pierwotnego źródła infekcji. Wydaje się, że na tym etapie dużą szansę stwarzają skuteczne środki dezynfekcyjne niszczące bakterie patogeniczne bytujące np. na narzędziach, maszynach czy skrzyniach.

Przestrzeganie higienicznych warunków prowadzenia uprawy warzyw jest nieodzowną czynnością, która zapobiega pojawianiu się patogenów. W przypadku chorób bakteryjnych odpowiednia higiena musi być zachowana podczas całego etapu produkcji, czyli podczas uprawy, przechowywania i transportu. Dla zachowania odpowiednich warunków sanitarnych wykorzystuje się różne środki dezynfekcyjne, wśród których znajdują się oparte na bazie aktywnego chloru lub np. czwartorzędowe sole amoniowe. Niestety brak jest danych określających, które dezynfektanty mogą być najbardziej skuteczne w ograniczaniu ilości bakteryjnych patogenów cebuli.

Bardzo ważną rolę w rozprzestrzenianiu bakteryjnych chorób roślin odgrywają nasiona. Za ich pośrednictwem sprawcy mogą być przenoszeni na duże odległości nie tylko na obszarze jednego kraju, ale też na inne

kontynenty. Zatem testowanie nasion pod względem ich czystości mikrobiologicznej powinno stać się rutynową praktyką. O roli nasion, jako źródła patogenów bakteryjnych, świadczą także wielkości prób jakie są zalecane do analizy. Ze względu na charakter chorób bakteryjnych oraz trudności z wykrywaniem bakterii na/w nasionach, w niektórych przypadkach wielkość reprezentatywnej próby może nawet wynosić 30 tys. nasion (Gitaitis i Walcott 2007).

W niektórych krajach, m.in. w USA, w ochronie upraw cebuli przed bakteriozami często stosowane są związki miedziowe, jednakże mają one marginalne znaczenie w zmniejszaniu nasilenia choroby. W Polsce środki na bazie miedzi nie są dopuszczone do ochrony cebuli przed bakteriozami. Dotychczas stosowane środki na bazie ekstraktu z grejpfruta - Grevit 200 SL oraz Biosept 33 SL, także zostały wycofane ze stosowania w ochronie cebuli przed bakteriozami.

Na świecie stosowanie antybiotyków w ochronie roślin przed chorobami bakteryjnymi jest bardzo ograniczone, a w Polsce, jak również w innych krajach Unii Europejskiej, całkowicie zabronione. Związane jest to z niebezpieczeństwem powstawania odporności bakterii na te związki oraz ich wysoką fitotoksycznością (McManus i Stockwell 2001; Sobiczewski i Berczyński 2002).

Celem prezentowanych doświadczeń było przetestowanie wybranych preparatów dezynfekcyjnych pod względem ich antibakteryjnych właściwości w stosunku do bakterii patogenicznych dla cebuli.

#### MATERIAŁY I METODY

Badane preparaty dezynfekcyjne: Syrlicid, Kloracid, Tsunami, Topax 91, Topax 99, Hypochloran, Oxonia (tab. 1) dobrano tak, aby zawarte w nich substancje aktywne były zróżnicowane i należały do najczęściej stosowanych do tego celu grup związków chemicznych, takich jak związki chloru, związki nadtlenowe i czwartorzędowe związki amoniowe. W badaniach wykorzystano następujące szczepy wzorcowe bakterii patogenicznych w stosunku do cebuli (*Allium cepa* L.):

- *Burkholderia cepacia* LMG 6962 z Banku Patogenów w Belgii (Belgian Collections of Microorganisms);
- *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* LMG 6979 z Banku Patogenów w Belgii (Belgian Collections of Microorganisms);
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) NCPPB 1747 z Banku Patogenów w Belgii (Belgian Collections of Microorganisms);
- *Pantoea ananatis* CCM 2407 z Banku Patogenów w Czechach (Masaryk University, Czech Collection of Microorganisms);

Tabela 1. Charakterystyka środków dezynfekcyjnych  
Table 1. Characteristic of disinfectants

Nazwa środka Name of disinfectant	Substancje biologicznie aktywne Biological active substances
Syrlucid	kwask nadoctowy, chlorki alkilobenzylodimetyloamoniowe peracetic acid, alkilbenzylodimethylammonium chlorides
Kloracid	podchloryn sodu, wodorotlenek potasu sodium hypochloride, potassium hydroxide
Tsunami	15-30% nadtlenek wodoru, 15-30% kwas octowy, 15% kwas nadoctowy, < 1% kwas fosforowy 15-30% hydrogen peroxide, 15-30% acetic acid 15% peracetic acid, < 1% phosphoric acid
Topax 91	5-15% octan alkiloamonowy 5-15% alkilammonium acetate
Topax 99	octan alkiloamonowy alkilammonium acetate
Hypochloran	70% podchloryn sodu, wodorotlenek sodu, fosfonian sodu 70% sodium hypochloride, sodium hydroxide, sodium phosphite
Oxonia	33,01% nadtlenek wodoru 33,01% hydrogen peroxide

Określano najniższe stężenia środków dezynfekcyjnych hamujące wzrost bakterii (właściwości bakteriostatyczne) - MIC (ang. minimal inhibitory concentration) oraz najmniejsze stężenia środków wykazujące bakteriobójcze właściwości w stosunku do bakterii - MBC (ang. minimal bacteriocidal concentration). Wykonano szereg rozcieńczeń każdego środka dezynfekcyjnego w jałowej wodzie destylowanej. Następnie dodano go po 1 ml do probówek zawierających 9 ml odżywczej pożywki płynnej NB. Zakres stosowanych stężeń badanych środków wynosił 0,04 - 5% w zależności od dezynfektantu. Do probówek nakraplano po 20 µl zawiesiny badanych bakterii o gęstości  $1,0-2,0 \times 10^8$  jtk/ml.

Próby inkubowano przez 48 h w temperaturze 28°C. Następnie określano wzrost bakterii w probówkach, posiewając hodowle płynne na stałą odżywczą pożywkę NA. Po 48 h inkubacji w 28°C oceniano wzrost bakterii na pożywce stałej, licząc wyrosnięte kolonie bakteryjne. Najmniejsze stężenie preparatu hamujące wzrost bakterii w hodowli płynnej (drobnoustrój wykazywał wzrost na pożywce stałej) określano jako war-

tość MIC. Najmniejsze stężenie środka, przy którym bakteria nie wykazywała wzrostu na pożywce zestalonej, określano jako MBC (Krzywicka i in. 1982).

Dla wszystkich dezynfektantów przeprowadzono test fitotoksyczności na roślinach cebuli. Do tego celu wykorzystano płytki Phytotoxkit (Tigret). W jednej płytce umieszczono 10 nasion badanych roślin. Na każde nasienie nakraplano po 200 µl badanego roztworu w wybranych stężeniach. Kombinację kontrolną stanowiły nasiona, na które nakraplano po 200 µl wody. Płytki inkubowano w komorze wzrostowej (Sanyo) w następujących warunkach: dzień - 14 godzin, 25°C oraz noc - 10 godzin, 20°C. Po 10 dniach inkubacji określano liczbę wykiełkowanych nasion oraz masę każdej rośliny. Każdą kombinację wykonano w trzech powtórzeniach (3 płytki Phytotoxkit) dla każdego badanego roztworu. Doświadczenie przeprowadzono trzykrotnie.

#### WYNIKI

Wyniki oceny aktywności następujących środków dezynfekcyjnych: Syrlicidu, Kloracidu, Tsunami, Topaxu 91 i 99, Hypochloranu i Oxonii w stosunku do patogenów cebuli: *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *allii-cola*, *P. ananatis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* przedstawiono w tabelach 1 i 2. W doświadczeniach określono najmniejsze stężenie preparatu hamujące wzrost bakterii w hodowli płynnej (MIC) oraz najmniejsze stężenie preparatu, przy którym mikroorganizm nie wykazywał wzrostu na pożywce zestalonej (MBC). Wartości tych stężeń były zróżnicowane i zależne od badanego środka i patogena. Najskuteczniejszym dezynfektantem był Tsunami, gdyż skutecznie działał na wszystkie badane bakterie nawet przy dosyć niskim stężeniu: 0,1-0,3%. Skuteczność dezynfektantów Hypochloranu i Kloracidu obserwowano w znacznie wyższych stężeniach. Przykładowo wartości MBC i MIC Hypochloranu dla *B. cepacia* wynosiły odpowiednio 4,5% i 4,0%, a dla *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 3,2% i 3,0%. Bakteria *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* wykazała wysoką wrażliwość na działanie preparatów Topax 91 i Topax 99, wartości MBC wynosiły odpowiednio 0,05% i 0,3%, natomiast MIC - 0,04% i 0,2% (tab. 2 i 3).

Tabela 2. Bakteriobójczy wpływ środków dezynfekcyjnych (MBC) w stosunku do bakterii patogenicznych dla cebuli

Table 2. Minimal bacteriocidal concentration towards onion pathogenic bacteria

Dezynfektant Disinfectant	Najniższe stężenie bakteriobójcze środków dezynfekcyjnych Minimal bacteriocidal concentration of disinfectants (%)			
	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliiicola</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Syrlicid	1,0	2,0	0,4	0,4
Kloracid	1,0	2,0	2,5	3,0
Tsunami	0,3	0,2	0,3	0,2
Topax 91	1,1	0,4	0,3	0,05
Topax 99	1,0	1,6	1,6	0,3
Hypochloran	4,5	1,5	1,5	3,2
Oxonia	-	3,0	-	2,0

Tabela 3. Bakteriostatyczny wpływ środków dezynfekcyjnych (MIC) w stosunku do bakterii patogenicznych dla cebuli

Table 3. Minimal inhibitory concentration towards onion pathogenic bacteria

Dezynfektant Disinfectant	Najniższe stężenie środków dezynfekcyjnych hamujące wzrost bakterii (%) Minimal inhibitory concentrations of disinfectants (%)			
	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliiicola</i>	<i>P. ananatis</i>	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Syrlicid	0,9	1,5	0,3	0,3
Kloracid	0,9	1,5	2,0	2,5
Tsunami	0,2	0,1	0,2	0,1
Topax 91	1,1	0,3	0,2	0,04
Topax 99	0,9	1,5	1,5	0,2
Hypochloran	4,0	1,3	1,4	3,0
Oxonia	-	2,5	-	1,5

Oceniano fitotoksyczność dezynfektantów w stosunku do roślin cebuli odm. Grabowska. Wartości stężeń dezynfektantów, które używano do tego testu, ustalono na podstawie wyników MIC i MBC uzyskanych dla badanych bakterii. Badano następujące roztwory: 3,0% Syrlicid, 0,5% i 1,0% Tsunami, 1,0% i 1,5% Topax 91, 2,0% i 3,0% Topax 99, 3,0% i 5,0% Hypochloran, 4,0% Kloracid oraz 1,0% i 2,0% Oxonia. Wszystkie środki stosowane w tych stężeniach nie wykazały toksycznego

wpływu na kiełkowanie nasion cebuli. Wschody mieściły się w granicach 7-10 kiełkujących nasion na 10 wyłożonych nasion w jednej płytce, ale nie były to wartości różne pod względem statystycznym. W kombinacji kontrolnej średnia masa siewek wyrosłych w jednej płytce Phytotoxkit wynosiła 609,67 mg, w innych kombinacjach wartości te mieściły się w granicach 423-701 mg, w zależności od badanego środka i przeprowadzonego doświadczenia. Najmniejszą masę siewek oraz najmniejszą liczbę skielkowanych nasion obserwowano w przypadku preparatu Topax 91, użytego w stężeniu 1,0% i 1,5%. Wartości te nie były jednak istotne statystycznie (tab. 4).

Tabela 4. Wpływ traktowania dezynfektantami nasion cebuli na ich kiełkowanie oraz masę uzyskanych siewek

Table 4. Effect of disinfectants treatment of onion seeds on germination and weight of seedlings

Kombinacja Treatment	Liczba skielkowanych nasion w jednej płytce Phytotoxkit (na 10 wysianych nasion) Number of germinated seeds in one plate Phytotoxkit (per 10 sown seeds)	Masa części nadziemnej siewek wyrosłych w jednej płytce Phytotoxkit (mg) Weight of above-ground parts of seedlings grown in one plate Phytotoxkit (mg)
kontrola control	8,67	609,67
Syrlicid - 3,0%	8,00	630,67
Tsunami - 0,5%	8,33	610,67
Tsunami - 1,0%	8,33	608,67
Topax 91 - 1,0%	7,33	423,00
Topax 91 - 1,5%	7,33	444,67
Topax 99 - 2,0%	7,67	506,67
Topax 99 - 3,0%	9,00	657,33
Hypochloran - 5,0%	8,67	637,67
Kloracid - 4,0%	9,67	682,33
Oxonia - 1,0%	9,33	674,33
Oxonia - 2,0%	9,33	701,00

Liczby w kolumnach nie różnią się istotnie wg testu Newmana-Keuls'a ( $\alpha < 0,05$ ).

The results in the columns were insignificant according to Newman-Keuls test at ( $\alpha < 0,05$ ).

## DYSKUSJA

Jednym z warunków uzyskania wysokich plonów cebuli jest zachowanie odpowiednich warunków higienicznych podczas całego procesu produkcji. Ważnym etapem jest uprawa oraz zbiór, gdyż wtedy bardzo łatwo można przenieść mikroorganizmy z jednej chorej rośliny na drugą zdrową. Rozwój choroby może nastąpić w trakcie przechowywania cebul, powodując znaczne straty ekonomiczne.

W pracy testowano skuteczność dezynfektantów o nazwach: Syrlicid, Kloracid, Tsunami, Topax 91, Topax 99, Hypochloran i Oxonia. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że środki te będą mogły znaleźć zastosowanie przy odkażaniu, np. powierzchni w przechowalniach, skrzynek lub narzędzi podczas uprawy. Jednakże należy pamiętać, że na działanie preparatu dezynfekcyjnego ma wpływ duża liczba czynników, m.in. rodzaj powierzchni (Krawczyk i Kamasa 2007; Springthorpe 2000).

Czyszczenie i odkażanie pomieszczeń oraz opakowań przeznaczonych do przechowywania warzyw wpływa na ograniczenie rozwoju chorób infekcyjnych w przechowalni. Nawet jeśli rozwijające się mikroorganizmy na opakowaniach lub ścianach przechowalni nie powodują bezpośrednio chorób przechowywanych warzyw, to wydzielany przez nie etylen przyspiesza starzenie się produktów i wpływa na pogorszenie ich wartości. Bardzo ważne jest także zwalczanie owadów w przechowalni. Niektóre owady mogą być wektorami dla bakterii, jak na przykład wciornastki, szczególnie *Frankliniella fusca* dla bakterii *P. ananatis*. Dlatego też po zakończeniu każdego okresu przechowalniczego należy oczyścić i odkazić pomieszczenia oraz opakowania.

Istotne jest, aby w kolejnych procesach odkażania powierzchni lub opakowań stosować preparaty dezynfekcyjne zawierające różne substancje aktywne. Pozwala to zminimalizować uzyskiwanie odporności izolatów na działanie preparatu. Kamasa (2008) zaobserwowała zjawisko uodparniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na działanie dezynfektantu, gdy stosowano go trzykrotnie, kolejno po sobie. Dlatego na rynku powinny być dostępne preparaty dezynfekcyjne zawierające różne substancje aktywne, aby można było je stosować na przemian.

Badania nad możliwością wykorzystania związków zawierających chlor w ochronie roślin przed bakteriami były prowadzone także przez innych badaczy. Mahovic i in. (2007) badali wpływ dwutlenku chloru na porażenie owoców pomidora (*Lycopersicon esculentum*) przez *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Stwierdzono, że w przechowalni gaz ten może być wykorzystany w ochronie owoców pomidora przed gniciem spowodowanym przez tego patogena.

Otrzymane wyniki wskazują, że analizowane dezynfektanty (Syrlicid, Kloracid, Tsunami, Topax 91, Topax 99, Hypochloran i Oxonia) mogą skutecznie ograniczać wzrost bakterii patogenicznych dla cebuli, a ponadto sprzyjają możliwości wymiennego ich stosowania do zwalczania tych patogenów. Z przeprowadzonych badań wynika także, że środki te stosowane na nasiona cebuli odm. Grabowska, nie wykazały szkodliwego wpływu na ich kiełkowanie oraz masę siewek. Podobne wyniki uzyskali Krawczyk i in. (2009), którzy nie stwierdzili negatywnego wpływu dezynfektantów, zawierających kwas solny i podchloryn sodu, na zdolność kiełkowania nasion pomidora.

## Literatura

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press: 615-703.
- Gitaitis R., Walcott R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology 45: 371-397.
- Janse J.D. 2009. Phytobacteriology principles and practice. CABI.
- Kamasa J. 2008. Odporność bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na dezynfektanty. Postępy w Ochronie Roślin 48 (2): 468-471.
- Kowalska B. 2006. Bakteryjne choroby cebuli. Nowości Warzywnicze 43: 67-74.
- Krawczyk K., Kamasa J. 2007. Badanie dostępnych w Polsce preparatów do dezynfekcji powierzchni skontaminowanych bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Postępy w Ochronie Roślin 47 (2): 161-165.
- Krawczyk K., Maćkowiak-Sochacka A., Zwolińska A. 2009. Wpływ powszechnie stosowanych metod dezynfekcji na kiełkowanie nasion pomidora. Progress in Plant Protection 49 (3): 1291-1297.
- Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E., Tadeusiak B. 1982. Metody badania aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych. Wydawnictwo metodyczne PZH.
- Mahovic M.J., Tenney J.D., Bartz J.A. 2007. Applications of chlorine dioxide gas for control of bacterial soft rot in tomatoes. Plant Disease 91: 1316-1320.
- Schwartz H.F., Mohan S.K. 2008. Compendium of onion and garlic diseases and pests. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, USA.
- Sobiczewski P., Berczyński S. 2002. Antybiotyki w ochronie roślin przed chorobami bakteryjnymi. Materiały z III Konferencji Bakteryjne Choroby Roślin. Skierniewice: 94-101.
- Springthorpe S. 2000. Disinfection of surfaces and equipment. J. Can. Den. Assoc. 66: 558-560.



Beata Kowalska, Urszula Smolińska

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DISINFECTANTS  
TOWARDS ONION PATHOGENIC BACTERIA**

Summary

In onion protection against pathogenic bacteria, prevention plays a key role. Accordingly, some disinfectants (Syrlicid, Kloracid, Tsunami, Topax 91, Topax 99, Hypochloran i Oxonia) were studied. Their antibacterial activity towards *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pantoea ananatis* was studied. Minimal inhibitory and minimal bacteriocidal concentrations of each disinfectant were defined. It was found that these disinfectants are effective in inhibiting of tested bacteria growth.