

UČINKOVITOST DESETIH RAZKUŽIL PROTI BAKTERIJI *Erwinia amylovora*

Igor ZIDARIČ¹, Barbara GERIČ STARE², Mojca VIRŠČEK MARN³, Irena MAVRIČ
PLEŠKO⁴, Vojko ŠKERLAVAJ⁵, Gregor UREK⁶

^{1,2,3,4,5,6}Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Bakterija *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* povzroča bolezen hrušev ožig na jablanah, hruškah in nekaterih okrasnih rastlinah iz družine Rosaceae (Bonn in van der Zwet, 2000) ter posledično obsežno gospodarsko škodo v sadjarstvu in drevesničarstvu. Eden od načinov prenosa bakterije v sadovnjakih je prenos z orodjem. Za zmanjšanje možnosti prenosa bakterij z okuženih na zdrave rastline je priporočljivo razkuževanje orodja med delom na posameznih drevesih. V okviru naloge smo določili *in vitro* učinkovitost desetih razkužil proti bakteriji *E. amylovora*. Bakterijsko suspenzijo smo zmešali z razkužilom, pustili delovati eno minuto, nato pa določili preživetje bakterije *E. amylovora* s štetjem kolonij, ki so zrasle na agarjih ploščah. Na podlagi analize smo razdeli razkužila v tri skupine glede na učinkovitost: najučinkovitejša (0,4 % Na hipoklorit, Menno florades in Persan - S15), srednje učinkovita (Virkon S, Spitaderm, Virucidal extra in Perasafe) in manj učinkovita (70 % etanol, Incidin in Sterillium). Na podlagi naših rezultatov menimo, da je ustrezno kot preventivno sredstvo za razkuževanje sadjarskega orodja sredstvo Menno florades in sredstva iz skupine srednje učinkovitih razkužil.

Ključne besede: *Erwinia amylovora*, hrušev ožig, razkuževanje, razkužila.

ABSTRACT

EFFICACY OF TEN DESINFECTANTS AGAINST BACTERIA *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora is the causative agent of the fire blight on apple and pear trees and on many ornamental plants from family Rosaceae. It causes substantial economic losses in orchards and nurseries. Infection can be transmitted from infected to healthy plants by tools; however this could be prevented by the disinfection of the tools. In order to determine the most effective disinfectant, we have tested ten disinfectants for the efficiency against *E. amylovora in vitro*. Bacterial suspension was mixed with disinfectants and incubated for one minute. Survival was determined by plate count of cfu. Based on survival of *E. amylovora* the disinfectants were classified into three efficiency groups: highly effective (0,4 % sodium hypochlorite, Menno florades, Persan - S15), moderately effective (Virkon S, Spitaderm, Virucidal extra, Perasafe) and weakly effective (70 % ethanol, Incidin, Sterillium). Based on our results we conclude that Menno florades and disinfectants from moderately effective group are suitable for preventive disinfection of pruning tools.

Key words: disinfectant, disinfection, *Erwinia amylovora*, fire blight

¹ dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

² dr., prav tam

³ dr. agr. znan., prav tam

⁴ dr. biol. znan., prav tam

⁵ univ. dipl. inž. agr., prav tam

⁶ dr. agr. znan., prav tam

1 UVOD

Hrušev ožig je rastlinska bolezen, katere povzročitelj je bakterija *E. amylovora*. Razširjena je v večini Evropskih držav, kjer je tudi na karantenski listi škodljivih organizmov. Povzroča propadanje dreves v jablanovih in hruševih nasadih, propadanje sadnih in okrasnih gostiteljskih rastlin v drevesnicah, vrtovih, na javnih mestih in v njihovih naravnih sestojih. Bolezen omejujemo s kurativnimi ukrepi kot je izrezovanje okuženih vej oz. pri močnejših okužbah z uničenjem celih dreves. Učinkovitega kurativnega fitofarmaceutskega sredstva, ki bi uničilo bakterijo v rastlinah za zdaj še ne poznamo. Zato je toliko pomembnejše hitro prepoznavanje bolezenskih znamenj na gostiteljskih rastlinah ter preventivni ukrepi kot so razkuževanje orodja, strojev in prostorov v drevesnicah, sadovnjakih in skladiščih (Steiner, 2000). Najhitrejši in najnevarnejši je prenos bakterije pri pridelavi sadilnega materiala, zato je upoštevanje vseh higienskih ukrepov za preprečevanje širjenja bolezni izredno pomembno. V drevesnicah, kjer je veliko ročnega dela, je zelo pomembna tudi higiena rok (Steiner, 2000).

Z raziskavo smo ovrednotili učinkovitost desetih izbranih razkužil proti bakteriji *E. amylovora* in vitro.

2 Material in metode

2.1 Bakterijska suspenzija

Pri testiranju razkužil smo uporabili bakterijo *E. amylovora* sev 683 iz zbirke NCPPB. 24 ur stare bakterijske kolonije *E. amylovora* porasle na trdnem gojišču King B pri 25°C smo pripravili v fiziološki raztopini in nato s turbodimetrom (model 21907, BIOLOG Inc. America) določili transmitanco (svetlobna prepustnost). Za štiri suspenzije smo pripravili serijske razredčitve ter določili koncentracijo bakterij s štetjem poraslih kolonij (cfu – enota, iz katere se razvije posamezna kolonija) tako, da smo iz vsake razredčitve nacepili 0,1 ml suspenzije na plošče King B v treh ponovitvah. Plošče smo inkubirali pri 25 °C. Število cfu/ml smo določili s štetjem kolonij po 24 in 48 urah.

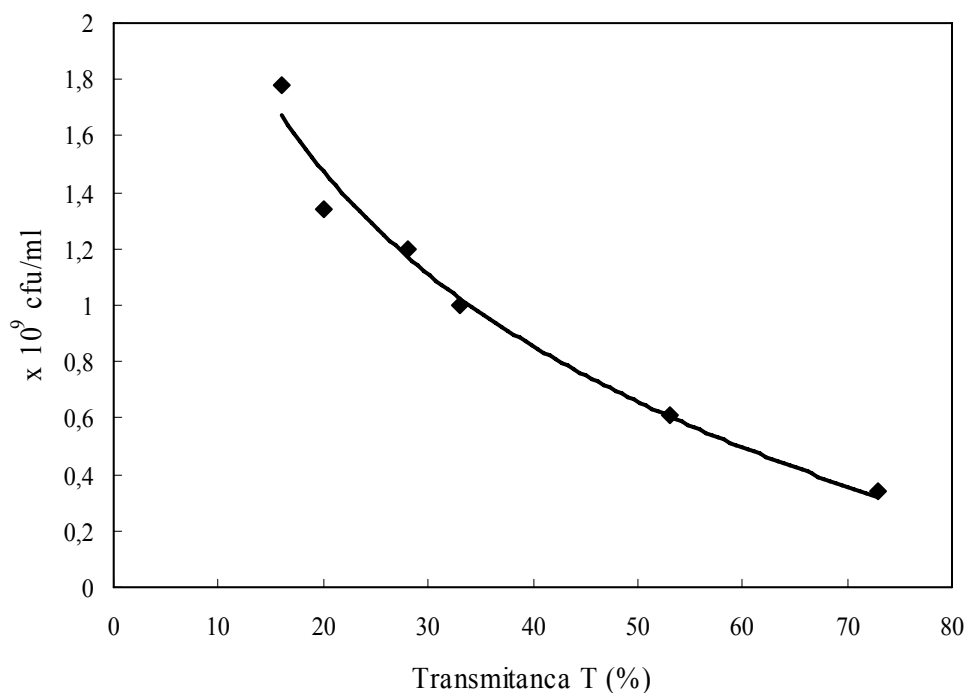
2.2 Test učinkovitosti razkužil

Testirali smo učinkovitost desetih sredstev za razkuževanje proti *E. amylovora*, ki so na voljo na slovenskem trgu: 70 % etanol, 0,4 % natrijev hipoklorit, Incidin liquid (Ecolab GmbH & Co. OHG), Menno florades (9 %, MENNO Chemie Vertrieb GmbH), Perasafe (16,2 g/l, Day – Impex Limited), Persan - S15 (Belinka), Spitaderm (Ecolab GmbH & Co. OHG), Sterillium (BODE Chemie Hamburg), Virkon S (10g/l, Krka), Virucidal extra (10g/l, AVG Manufacturing & Marketing Ltd). Za kontrolo smo uporabili fiziološko raztopino. Bakterijski suspenziji znane koncentracije (volumni 975, 950, 900 in 500 µl) smo dodali razkužilo do skupnega volumna 1 ml ter pustili delovati 1 minuto pri sobni temperaturi in pri tem večkrat premešali. Nato smo nemudoma pripravili serijske razredčitve suspenzije s fiziološko raztopino, da bi preprečili podaljšano delovanje razkužil. Preživetje bakterij smo določili s štetjem poraslih kolonij kot je opisano zgoraj.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Z merjenjem transmitance ter določitvijo koncentracije bakterijske suspenzije s štetjem poraslih kolonij pri serijskih razredčitvah smo določili krivuljo korelacije med transmitanco in koncentracijo (slika 1). Bakterijsko suspenzijo s 33 % transmitanco, kar ustreza bakterijski koncentraciji 10⁹ cfu/ml, smo uporabili v nadaljnjih testih preskušanja

učinkovitosti razkužil. Pri večkratni pripravi bakterijske suspenzije s transmitanco 33 % je določena koncentracija cfu/ml nekoliko nihala, vendar razlike niso bile večje od 3 %. Kljub temu smo za večjo natančnost v testu učinkovitosti razkužil uporabili isto bakterijsko suspenzijo za vseh deset razkužil.



Slika 1: Korelacija povprečne koncentracije bakterijske suspenzije določene s štetjem kolonij in transmitance.

Figure 1: Correlation between average concentration of bacterial suspension determined by the plate count and transmittance.

Preglednica 1: Število preživelih kolonij (cfu/ml) po dodatku 25, 50, 100 in 500 μ l razkužila v bakterijsko suspenzijo in 48 urni inkubaciji pri 25 °C.

Table 1: Number of surviving colonies (cfu/ml) after addition of 25, 50, 100 in 500 μ l disinfectant in to bacterial suspension and 48 hours incubation at 25 °C.

bakterijska suspenzija + razkužilo (μ l)	975 + 25	950 + 50	900 + 100	500 + 500
razkužilo	število preživelih bakterij (cfu/ml)			
Menno florades	0	0		
Persan - S15	0	0		
0,4 % Na hipoklorit	0	0		
Virkon S	63,64	0		
Spitaderm	$22,11 \times 10^3$	0		
Virucidal extra	$36,06 \times 10^6$	0		
Perasafe	$11,18 \times 10^7$	0		
Sterillium	$67,47 \times 10^7$	$60,12 \times 10^7$		
70 % etanol	$84,98 \times 10^7$	$82,48 \times 10^7$	70×10^5	0
Incidin liquid	$98,80 \times 10^7$	$18,15 \times 10^7$	$10,50 \times 10^2$	0
kontrola	$99,10 \times 10^7$	$96,39 \times 10^7$	$91,12 \times 10^7$	$51,12 \times 10^7$

Učinkovitost razkužil smo določili prek števila oz. odstotka bakterij, ki so preživele tretiranje s sredstvom (preglednici 1 in 2). Test smo izvedli z različnimi deleži bakterijske suspenzije oz. razkužila, čas delovanja razkužila pa je bil vedno isti (1 min).

Preglednica 2: Odstotek preživelih bakterij po delovanju razkužila.

Table 2: Percentage of surviving bacteria after treatment with disinfectants.

bakterijska suspenzija + razkužilo (μ l)	975 + 25	950 + 50	900 + 100	500 + 500
razkužilo	odstotek preživelih bakterij (%)			
Menno florades	0	0		
Persan - S15	0	0		
0,4 % Na hipoklorit	0	0		
Virkon S	$6,46 \times 10^{-6}$	0		
Spitaderm	$2,23 \times 10^{-3}$	0		
Virucidal extra	3,64	0		
Perasafe	11,28	0		
Sterillium	68,08	62,37		
70 % etanol	85,75	85,57	0,77	0
Incidin liquid	99,7	18,83	$1,15 \times 10^{-4}$	0
kontrola	100	100	100	100

Na podlagi rezultatov smo razkužila razdelili v tri skupine glede na učinkovitost. Kot najučinkovitejša so se izkazala sredstva: Menno florades, Persan - S15 in 0,4 % Na hipoklorit. Ta sredstva so uničila vse bakterije že pri najnižjem uporabljenem volumnu razkužila. Sredstvo Menno florades se uporablja v vrtnarstvu za razkuževanje orodja in delovnih površin. Na podlagi dobljenih rezultatov menimo, da je ustrezno preventivno sredstvo za razkuževanje orodja, opreme in prostorov pri zatiranju bakterije *E. amylovora* v drevesnicah in nasadih. Sredstvo je nekorozivno (Magnetik, 2003; Gril, 2004) in prav tako ni fitotoksično (Gril, 2004). Na hipoklorit in Persan - S15 sta zelo učinkoviti sredstvi, vendar zaradi svoje kemijske sestave pri neposrednem stiku strupena za ljudi. Ustrezni sta le za razkuževanje prostorov in nekatere opreme, ne pa tudi sadjarskega orodja kot so škarje in cepilni noži neposredno pri njihovi uporabi. Na hipoklorit je namreč koroziven, poleg tega lahko pride tudi do stika sredstva s kožo ali celo očmi.

V skupino srednje učinkovitih sredstev, ki so uničila vse bakterije po dodatku 50 μ l razkužila k bakterijski suspenziji smo uvrstili Virkon S, Spitaderm, Virucidal extra in Perasafe. Iz omenjene skupine lahko vsa sredstva uporabljamo za razkuževanje orodja, saj po navedbah proizvajalcev niso korozivna. Pri testiranju korozivnosti je Tjaša Gril (2004) ugotovila, da sredstvo Perasafe ni korozivno, sredstvo Virkon S pa pušča na kovinskih delih opazne drobne spremembe. Za razkuževanje rok lahko iz te skupine uporabimo le Spitaderm, katerega osnovna namembnost je razkuževanje kože.

V skupino manj učinkovitih sredstev smo uvrstili 70 % etanol, Incidin liquid in Sterillium. Sredstva iz te skupine po dodatku 50 μ l razkužila k bakterijski suspenziji niso uničila vseh bakterij. Etanol je znano dezinfekcijsko sredstvo in ga marsikje uporabljajo za razkuževanje prostorov in opreme. Tako etanol kot Incidin liquid lahko dražita kožo, slednji pa je nevaren tudi za oči. Sestava sredstev Incidin liquid in Sterillium temelji na različnih oblikah alkoholov, kot sta 1-propanol in 2-propanol. Pri manjši količini sredstva v tej skupini je najučinkovitejši Sterillium, pri večji količini pa Incidin liquid.

4 SKLEPI

Sredstva za razkuževanje orodja smo na podlagi analiz učinkovitosti razdelili v tri skupine: (1) najučinkovitejša sredstva: Menno florades, Persan - S15 in Na hipoklorit; (2) srednje učinkovita sredstva: Virkon S, Spitaderm, Virucidal extra in Perasafe; (3) manj učinkovita sredstva: 70% etanol, Sterillium in Incidin liquid.

Na podlagi rezultatov menimo, da je kot preventivno sredstvo za razkuževanje sadjarskega orodja ustrezno sredstvo Menno florades ter sredstva iz skupine srednje učinkovitih razkužil. Na hipoklorit in Persan - S15 sta zelo učinkoviti razkužili, vendar zaradi strupenosti za človeka in korozivnosti ne ustrezata za razkuževanje rok in orodja. Uporabimo ju lahko le za razkuževanje prostorov in nekatere opreme. Za razkuževanje rok je najprimernejše sredstvo Spitaderm. Pri uporabi vseh razkužil je za varno delo pomembno ravnanje v skladu z navodili proizvajalca.

5 LITERATURA

- Bonn, W., van der Zwet, G. T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. V: Vanneste, J. (ur.). Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, CABI Publishing Hamilton, New Zealand: 37-54.
- Gril, T. 2004. Učinkovitost nekaterih razkužil proti bakteriji *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. (Hrušev ožig). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 65 str.
- Magnetik. 2003. Menno florades. Varnostni list: 4 str.
- Steiner, P.W. 2000. Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. V: Vanneste, J. (ur.). Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing Hamilton, New Zealand: 339-358.