



Das Lebensmittelministerium



Zur Phytohygiene von Kartoffelabfällen

Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft

Heft 17/2006

Freistaat  Sachsen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

**Zur phytohygienischen Unbedenklichkeit von Kartoffelabfällen -
Ein Verfahrensvorschlag zur Prüfung von Gärresten aus Biogasanlagen
auf die bakteriellen Quarantäneschaderreger
Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* (Cms) und *Ralstonia solanacearum* (Rs)**

(Abschlussbericht)

Dr. Wolfram Wiedemann, Olaf Enderlein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Gesamtziel	1
2	Kenntnisstand und Literatur	2
3	Aufgabenstellung und Arbeitsetappen	3
4	Material und Methoden	4
4.1	Laborbiogasanlage.....	4
4.2	Probengewinnung	5
4.3	Versuchsdurchführung	5
4.3.1	Extraktion der Probe	5
4.3.2	Molekularbiologische Untersuchung	6
4.3.3	Selektivausstrich	7
4.3.4	Untersuchung der Proben auf <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	7
4.3.5	Untersuchung der Proben auf <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
4.3.6	Untersuchungen mit Immun-Fluoreszenz-Colony-Staining (IFC).....	11
5	Ergebnisse.....	12
5.1	Einfluss der Probenextraktion auf die Vitalität der Erreger.....	12
5.2	Einfluss der Lagertemperatur.....	12
6	Diskussion und Schlussfolgerung	16
7	Literatur	20

1 Einleitung und Gesamtziel

In Deutschland fallen jährlich 3 bis 4 Millionen Tonnen Reststoffe aus der Kartoffel verarbeitenden Industrie an (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Arbeitsunterlagen). Nach einer Analyse zur Verbreitung von Quarantäneschadorganismen aus Kartoffelabfällen (STEINMÖLLER, BÜTTNER, MÜLLER UND BECKERS, 2004) besteht in Abhängigkeit der Verarbeitungsverfahren und Abfallbehandlung ein grundsätzliches Risiko der Weitergabe von Infektionen. Im Sinne des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes (KrW-/AbfG) müssen diese Reststoffe umweltverträglich beseitigt und zur Schonung der natürlichen Ressourcen eingesetzt werden. Die Bioabfallverordnung (BioAbfV), das Düngemittelgesetz (DÜNGMG) und die Düngemittelverordnung (DüMV) geben den gesetzlichen Rahmen zur Einhaltung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit der dabei in Umlauf gebrachten Produkte. Stoffe dieser Art werden dann als Düngemittel zugelassen, wenn sie „bei sachgerechter Anwendung die Fruchtbarkeit des Bodens, die Gesundheit von Menschen, Haustieren und Nutzpflanzen nicht schädigen und den Naturhaushalt nicht gefährden“ (DüMV § 2). Andernfalls kann das Inverkehrbringen sowie die Anwendung verboten oder beschränkt werden, wenn „...dies zum Schutz der Fruchtbarkeit des Bodens oder der Gesundheit von Mensch, Haustieren oder Nutzpflanzen oder zur Abwehr von Gefahren für den Naturhaushalt erforderlich ist“ (DÜNGMG § 4).

Die BioAbfV schreibt für die hygienisierende Behandlung dieser und anderer organischer Abfälle bestimmte Parameter (Dauer und Temperatur) vor. Zur Überprüfung der phytohygienischen Unbedenklichkeit dienen Indikatororganismen, die in das Behandlungsgut eingesetzt bzw. mitgeführt werden. Es handelt sich dabei um das Tabakmosaikvirus (TMV), *Plasmodiophora brassicae* (der Erreger der Kohlhernie) und Tomatensamen, die stellvertretend für alle phytopathogenen Erreger geprüft werden. Nach Abschluss der Hygienisierungsmaßnahmen werden die Überlebensraten dieser Organismen ausgewertet.

Neben den gesetzlichen Vorgaben zur phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus Biogasanlagen verlangt auch der Berufsstand in besonderen Fällen eine zusätzliche Untersuchung der ‚organischen Düngemittel‘ (neue Bezeichnung nach gültigem Düngemittelrecht) auf Quarantäneschadereger. Im Falle der beiden Bakteriosen, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), dem Erreger der Ringfäule, und *Ralstonia solanacearum* (Rs), dem Erreger der Schleimkrankheit, existieren zwar mit der Überarbeitung der Erregerrichtlinien sehr detaillierte Untersuchungsvorschriften, für die Matrix ‚Gärrest‘ liegen jedoch keine oder nur wenige Aussagen zur Sensitivität vor. Die Frage nach der Verlässlichkeit derartiger Rückstandsuntersuchungen stellt sich umso mehr, nachdem aus Ergebnissen eines vorangegangenen F/E-Projektes (WIEDEMANN UND ENDERLEIN, 2005) entgegen allgemeiner Angaben der Literatur durchaus Ringfäulebakterien in mesophil gefahrenen Biogasanlagen überleben können und ihre Pathogenität behalten.

Erklärtes Projektziel vorliegender Arbeit ist eine Anleitung zur Prüfung bakterieller Quarantäneerreger – Cms und Rs – in Gärrestproben aus Biogasanlagen im Rahmen der Düngemittelverkehrskontrolle.

2 Kenntnisstand und Literatur

Zu Fragen der Biologie und Diagnose von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), dem Erreger der **bakteriellen Ringfäule der Kartoffel**, wurde im Abschlussbericht 2005 (WIEDEMANN UND ENDERLEIN, 2005) umfassend informiert und muss an dieser Stelle nicht wiederholt werden. Im Bearbeitungszeitraum vorliegender F/E-Leistung wurden die Anhänge der Richtlinie 93/85/EWG vom 4.10.1993 zur Diagnose des Erregers überarbeitet und um neue Methoden ergänzt. Gleiches geschah auch für die Bekämpfungsrichtlinie der Schleimkrankheit (s. u.).

Nach den Informationen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft ist nach amtlichen Erhebungen der letzten Jahre eine deutliche Trendwende in der Befallsentwicklung der bakteriellen Ringfäule in Deutschland zu beobachten. Dies kann „als Ergebnis aller amtlichen Maßnahmen sowie der Information und der Vorsorgemaßnahmen der Wirtschaft gewertet werden“ (BBA 2006, Arbeitsmaterialien). Im EU-Beitrittsland Polen ist die Situation bezüglich der Verbreitung von Ringfäule jedoch nach wie vor äußerst angespannt und hat in der Pflanzenbeschauverordnung im Paragraph 1b - Anzeigepflichten in besonderen Fällen - mit Datum vom 19. August 2004 zu einer Gesetzesänderung geführt. Auch wenn die Verarbeitung und jeglicher Handel von Kartoffeln mit Ursprung Polen in Deutschland angezeigt werden muss und Kontrollteste durchgeführt werden, ist das „epidemiologische Risiko“ beim unerkannten Befall ganz offensichtlich.

Die **Schleimkrankheit der Kartoffel** hat in den zurückliegenden Jahren der Befallserhebungen in der Europäischen Union trotz anfänglicher Befürchtungen (MÜLLER, 1996) keine weitere Ausbreitung erfahren, obwohl einzelne lokale Infektionsereignisse in Großbritannien, den Niederlanden, Belgien und auch in Niedersachsen durchaus zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führten. Eine nachlassende Vorsorge könnte jedoch fatale Folgen haben, zumal bei Einfuhren ägyptischer Frühkartoffeln in den zurückliegenden Jahren¹ der Erreger immer wieder festgestellt wurde und Nachweise in Oberflächenwasser- und Wildkrautproben in einzelnen Kartoffelanbauregionen Deutschlands zu Verboten bei der Entnahme von Beregnungswasser führten (RETZER u.a., 2006). Nachfolgend soll über diesen Erreger kurz berichtet werden:

Bakterielle Schleimkrankheit der Kartoffel, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Biologie, Diagnose und Infektionsquellen

Mit über 200 Wirtspflanzen hat der Erreger gegenüber der bakteriellen Ringfäule einen sehr großen Wirtspflanzenkreis. Zunehmend geraten an Gewässern wachsende Wildkräuter als Überhälterpflanzen in den Blickpunkt der epidemiologischen Forschung. Es werden verschiedene Rassen und Biotypen

¹ für 2005/2006 gibt der Bericht der BBA über Einfuhren von Speisekartoffeln aus Ägypten keine nachgewiesene Befallsfeststellung des Erregers in Deutschland an.

unterschieden; die an Kartoffeln und seltener auch an Tomaten vorkommende Rasse 3 ist durch ihre Anpassung an kühlere Klimate in Europa von Bedeutung.

In den überarbeiteten Anhängen der RL 98/57/EG vom 20.07.98 (ABl. L 235/1 NF 66/3/90) ist die Diagnose in Proben symptombehafteter, aber auch symptomloser Kartoffelknollen, Tomatenpflanzen, anderer Wirtspflanzen, im Wasser sowie im Boden mit validierten Verfahren exakt beschrieben. Grundsätzlich unterscheidet man Schnell-Screeningtests wie IF-Test und PCR, Isolierungsverfahren und Bestätigungstests. Das Ergebnis über den Nachweis des Erregers in einer Probe schließt immer mehrere Tests ein und hat bei einem rechtsverbindlichen Nachweis die Isolierung und damit den Beweis der Lebensfähigkeit des Erregers zum Ziel. PCR und IF-Test erfassen auch bereits abgestorbene, nicht mehr lebensfähige Zellen. In solchen komplexen Substraten wie Gärrestproben muss zudem immer mit zahlreichen Inhibitoren bzw. serologisch kreuzreagierenden Bakterien gerechnet werden. In einem umfassenden Literaturbericht zur Detektion und Eradikation von Pflanzenpathogenen in behandelten Bioabfällen (MIKKELSEN, ELPHINSTONE, JENSEN, 2006) ist deshalb die Isolation auf Selektivmedien als kostengünstige, schnelle und vor allem sichere Methode explizit genannt.

3 Aufgabenstellung und Arbeitsetappen

Wie auch im Bericht 2005 festgehalten (s. o.) gehört Sachsen zu den Bundesländern mit beträchtlichen Kapazitäten in der Kartoffel verarbeitenden Industrie. Mit vergleichsweise geringer Anbaufläche sind Zukäufe von Rohware – auch EU-weit – notwendig. Damit sind gerade bei der Verwertung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln unerkannte Infektionen mit Ringfäule oder Schleimkrankheit nicht ausgeschlossen und könnten als Gärrestabfall zu deren Verbreitung beitragen. Wie von STEINMÖLLER u. a. (2004) eingeschätzt, zählt die indirekte Verwertung von (Kartoffel-) Abfällen über Gärreste aus Biogasanlagen, Kompost, Klärschlamm etc. zur Risikostufe 3 (gegebenenfalls hohes Risiko). Bewusst wurde – wie im vorangegangenen Projekt – die mesophile Anaerobbehandlung bei 34 - 36°C gewählt. In Kooperation mit der TU Bergakademie Freiberg wurden Gärrestproben aus dem Substrat Kartoffeln erstellt, in denen ein Nachweis von Cms und Rs nach Zugabe in abgestuften Konzentrationen „nachgestellt“ wurde. Das Projektziel lautete zusammengefasst:

- Erarbeitung eines Verfahrensvorschlages zum sicheren Nachweis von Cms und Rs in Rückständen (Gärrest) der Anaerobbehandlung von Kartoffelabfällen (Biogas)
- Nutzung validierter Methoden aus Bekämpfungs-RL unter verschiedenen Lagerbedingungen der Probe

4 Material und Methoden

4.1 Laborbiogasanlage

Die Herstellung der Proben erfolgte an der TU Bergakademie Freiberg im Institut für Wärmetechnik und Thermodynamik. Zur Vergärung diente ein Glasbehälter mit einem Fassungsvermögen von ca. drei Litern. Davon wurden zwei Liter effektiv mit Substrat befüllt. Dieser Fermenter wurde in einem Warmwasserbad bei einer Temperatur von ca. 36°C gelagert. Die Durchmischung des Substrates erfolgte durch manuelles Aufschütteln. Täglich wurden 5 bis 20 ml zerkleinerte Kartoffelmasse, abhängig von der Prozessstabilität, zugegeben.

Für den Prozess galten folgende Bedingungen:

- mesophiler Temperaturbereich bei 34 - 36°C
- pH-Wert zwischen 6,5 und 8,0
- einstufige Prozessführung
- batch und quasi kontinuierlicher Betrieb (täglich ein- bis mehrmalige manuelle Substratzugabe und -entnahme, Gewährleistung von kontinuierlichem Wochenendbetrieb)
- Raumbelastung entsprechend der Prozessstabilität (beurteilt nach pH-Wert und Methangehalt; analog Biogasanlage Friweika e. G., Raumbelastung zwischen 0,5 und 4 kg oTTS/(m³*d)
- Durchmischung manuell
- Entnahme von Probenmaterial in Abständen von zwei bis vier Wochen



**Abbildung 1 und 2: Laborbiogasanlage der TU Bergakademie Freiberg (linke Abb.)
3-Liter-Fermenter mit Kartoffelmonosubstrat (rechte Abb.)**

Für die Untersuchungen wurden Kartoffeln mesophil unter kontrollierten Bedingungen als Monosubstrat vergärt.

4.2 Probengewinnung

Die Entnahme des Gärsubstrates erfolgte zeitnah vor Untersuchungsbeginn.

Zur Inokulation wurden die Referenzstämmen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) (KLM 50, BBA Kleinmachnow) sowie *Ralstonia solanacearum* (Rs) NCPPB 4156 genutzt. Zur Herstellung der Proben mit definierten Zelldichten wurde der Gärrest mit Bakteriensuspension der Erregerkultur versetzt. Eine 72-Stunden-Kultur von Cms, auf YGM-Medium kultiviert, wurde in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,2 suspendiert und mittels Photometer auf eine optische Dichte von 0,20 bei 600 nm eingestellt, was einer Zelldichte von ca. 2×10^8 cfu/ml entspricht. Von Rs wurde eine 48-Stunden-Kultur von King's B-Medium verwendet, mit gleichem Puffer suspendiert und eine optische Dichte von 0,15 bei 600 nm eingestellt, um eine Zelldichte von ca. 2×10^8 cfu/ml zu erhalten.

Aus diesen Suspensionen wurden arithmetische Verdünnungsreihen angefertigt und ausgewählte Verdünnungsstufen dem Gärrest im Verhältnis 1 : 10 zugegeben (im Folgenden wird der Ansatz als ‚Probe‘ bezeichnet). Die Proben – jeweils 60 g – wurden während der Versuchsreihe bei einer Temperatur von 6°C gelagert.

4.3 Versuchsdurchführung

4.3.1 Extraktion der Probe

Von jeder Probe wurden jeweils Teilproben an vier aufeinander folgenden Tagen entnommen und für die Untersuchung bearbeitet. Nach der Lösung von 4,5g PVP K20 (Polyvinylpyrrolidon) in 90 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0) wurden 10 g Probenmaterial zugegeben und bei Raumtemperatur 20 min mit 120 rpm geschüttelt. Dieser Ansatz wurde niedertourig bei 180 g und 8 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde mit 90 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH-Wert 7,0) gemischt und anschließend filtriert. Zur Filtration dienten Spritzenvorsatzfilter mit 5 µm Porengröße. Das Filtrat wurde ein zweites Mal bei 10.000 g und 8 °C 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) resuspendiert.

4.3.2 Molekularbiologische Untersuchung

Für die molekularbiologische Analyse kam das Verfahren der Polymerasekettenreaktion zum Einsatz. Die für diese Methode notwendigen Extraktionen der DNA erfolgten in Minisäulen mit dem DNeasy Plant Mini Kit für Rs bzw. dem QIAamp Kit für Cms von der Firma QIAGEN GmbH. Für diese Untersuchungen wurde mit 200µl Probematerial nach den Protokollen der Richtlinien 93/85/EWG des Rates zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel sowie 98/57/EG des Rates zur Bekämpfung von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* gearbeitet.

Für die Polymerasekettenreaktion wurden Oligonucleotid-Primer nach PASTRIK genutzt.

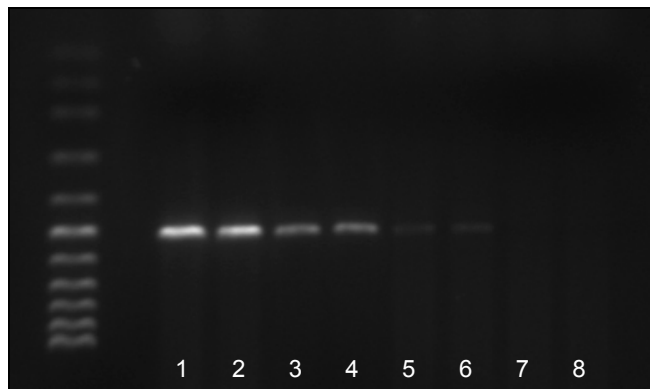


Abbildung 3: Agarosegel nach der Elektrophorese. Das PCR-Produkt für Cms erscheint bei 502 Basenpaaren. Unterschiede der Erregerdichte sind sehr gut erkennbar. Bei 10^2 cfu/ml war Cms nicht mehr nachweisbar. Nr. 1, 2: Probe mit 10^6 cfu/ml, Nr. 3, 4: 10^4 cfu/ml, Nr. 5, 6: 10^3 cfu/ml, Nr. 7, 8: 10^2 cfu/ml. Links im Bild DNA-Leiter.



Abbildung 4: Agarosegel nach der Elektrophorese mit Rs-Proben. Fragmentlänge der Rs-Template-DNA = 718 Basenpaare. Nr. 1: Probe mit 10^6 cfu/ml, Nr. 2: 10^4 cfu/ml, Nr. 3: 10^3 cfu/ml. Links im Bild DNA-Leiter.

4.3.3 Selektivausstrich

Von jeder Probe wurden Dezimalverdünnungen in 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) hergestellt und 100 µl dieser Lösungen anschließend auf einem semiselektiven Nährmedium mit dem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Zur Kultivierung von Cms fand MTNA-Medium und für Rs SMSA-Medium Verwendung. Die Inkubation der Proben erfolgte bei einer Temperatur von 21°C (Cms) bzw. 28°C (Rs). Parallel zum Ausstrich der zu untersuchenden Proben wurde immer eine Vergleichskultur eines Referenzstammes mit Zelldichten zwischen 10^1 bis 10^4 cfu/ml mitgeführt.

4.3.4 Untersuchung der Proben auf *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Bei Cms erfolgte die Kontrolle von MNTA ab dem fünften Tag nach Inkubationsbeginn. Die visuelle Auswertung wurde mit Hilfe eines Stereomikroskops bei mindestens 6,5-facher Vergrößerung durchgeführt. In der Regel war das erst ab der Dezimalverdünnung 1 : 100 möglich. Es wurden Kolonien für eine Passage auf YGM-Medium ausgewählt und mit einer Impföse übertragen. Charakteristische Kolonien haben ein weißes bis cremefarbenes Aussehen. Sie sind kuppelförmig und von flüssiger bis cremeartiger Konsistenz. (siehe Abb. 5). Die Vergleichskultur war bei der Auswahl typischer Kolonien sehr hilfreich.



Abbildung 5: Gärrestprobe mit Cms 10^6 cfu/ml in der Verdünnung 1 : 1 000 auf MTNA-Medium, Cms-Kolonien sind klein und weiß

Zur Anreicherung wurden die Bakterien auf YGM-Medium subkultiviert. Nach vier bis fünf Tagen waren ausreichend Bakterien gewachsen, um einen Pathogenitätstest anzuschließen. Dazu wurden ein bis zwei Impfösen Bakterienmaterial in 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) suspendiert und mit einer Spritze in Auberginenjungpflanzen oberhalb der Keimblätter geimpft. Es wurden nur Pflanzen im Zweiblatt-Stadium genutzt, die vor der Inokulation trocken gehalten wurden. Die Pflanzen wurden bei 21°C in Klimakammern bei regelmäßiger Bewässerung inkubiert. Es wurden pro Probe 10 Pflanzen verwendet.

Erste Symptome zeigten sich nach fünf Tagen. Bei einzelnen Pflanzen bekamen die Blätter ein schwammiges Aussehen und welkten später. In den Interkostalfeldern traten teilweise chlorotische Verfärbungen auf, die im weiteren Verlauf nekrotisierten.



Abbildung 6: Welkesymptome an *Solanum melongena* 'Black Beauty', verursacht durch Cms



Abbildung 7: Chlorose der Interkostalfelder an *Solanum melongena* 'Black Beauty', beginnende (links) und fortgeschrittene Chlorose (rechts)

Diese Pflanzen wurden für die Reisolation oberhalb der Impfstelle abgeschnitten und die Blätter entfernt. Diese Stängelstücke wurden mit 70 Prozent Ethanol desinfiziert und im Anschluss mit 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0) mazeriert. Von diesem Mazerat wurde eine Dezimalverdünnungsreihe angefertigt bis 1/1 000. Jeweils 20 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf die Kavitäten eines Multitest-Slide-Objektträgers aufgetragen. Der Objektträger wurde entsprechend der Richtlinie 93/85/EWG präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiolab bei 1 000-facher Vergrößerung ausgewertet.

Die getestete Probe wurde als positiv bewertet, wenn hell fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Cms-Morphologie auftraten.

Bei Pflanzen ohne Ausbildung von Symptomen wurde der Rücktest vier Wochen nach Inokulation durchgeführt.

4.3.5 Untersuchung der Proben auf *Ralstonia solanacearum*

Die Kontrolle von SMSA erfolgte bei Rs ab dem zweiten Tag nach Inkubationsbeginn. Die visuelle Auswertung wurde analog zu Cms durchgeführt. Auch hier war eine Auswertung erst ab der Dezimalverdünnung 1 : 100 möglich. Es wurden Kolonien für eine Anreicherung auf King's B-Medium ausgewählt und mit einer Impföse übertragen. Charakteristische Kolonien haben auf SMSA eine rotviolette Farbe und sind von einem weißen Hof umgeben. Sie sind flach gewölbt und flüssig. Auffällig war, dass diese Kolonien von einer hellen Schicht überzogen waren, die ihnen ein mattes Aussehen verlieh. Nach zwei Tagen der Subkultivierung waren ausreichend Bakterien gewachsen. In der Regel färbte sich dabei das Medium King's B braun (siehe Abb. 10).

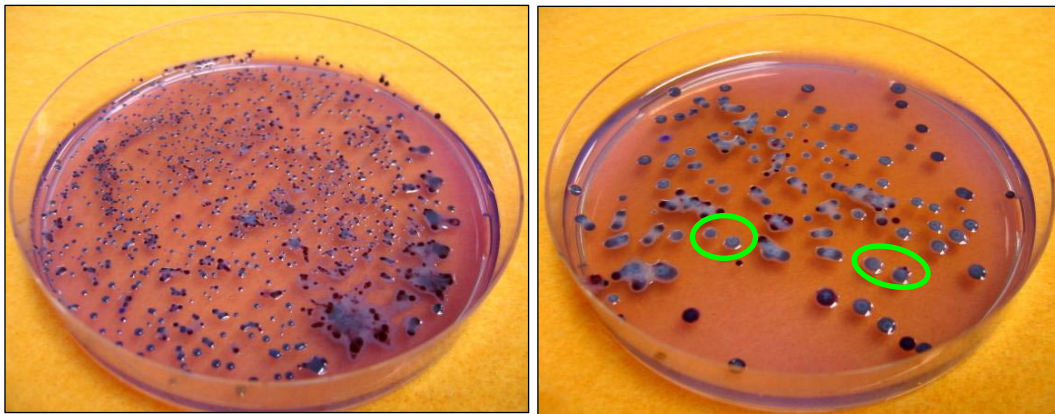


Abbildung 8: Gärrestprobe mit Rs in verschiedenen Verdünnungsstufen auf semiselektivem Nährmedium SMSA. (1:100 links, 1 : 1 000 rechts). Charakteristische Rs-Kolonien sind markiert (rechte Abbildung).

Ein bis zwei Impfösen Bakterienmaterial wurden in 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) suspendiert und mit einer Spritze in Tomatenjungpflanzen oberhalb der Keimblätter geimpft. Dafür wurden nur Pflanzen im Zweiblatt-Stadium genutzt, die vor der Inokulation trocken gehalten wurden. Die Pflanzen wurden bei 28°C in Klimakammern bei regelmäßiger Bewässerung inkubiert. Es wurden pro Probe 10 Pflanzen verwendet.

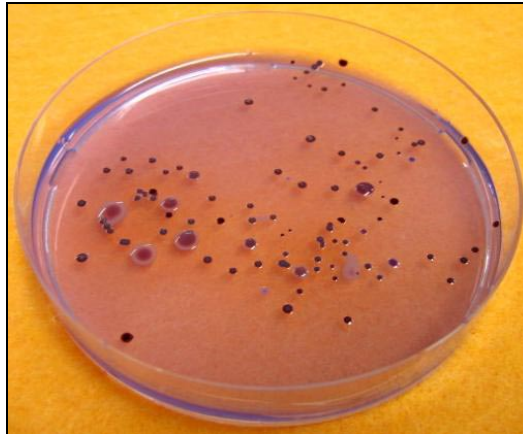


Abbildung 9: Gärrestprobe mit Rs Verdünnungsstufen auf semiselektivem Nährmedium SMSA (Verdünnung 1 : 10 000)

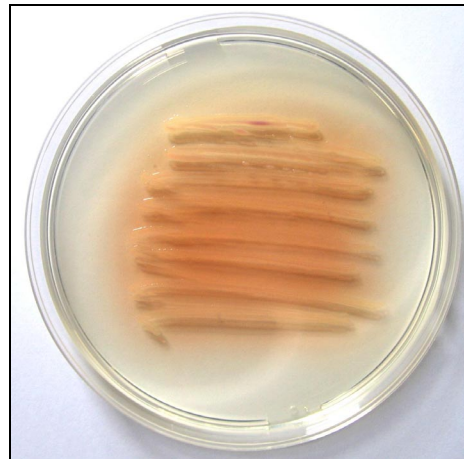


Abbildung 10: Rs-Kultur zwei Tage nach Passage auf King's B-Nährmedium. Die Bakterien bilden ein braunes Pigment im Nährmedium.

Erste Symptome zeigten sich nach vier Tagen. Bei einzelnen Pflanzen setzte eine Welke der Blätter ein. Diese Pflanzen wurden für die Reisolation oberhalb der Impfstelle abgeschnitten und die Blätter entfernt. Es wurde ein Abschnitt der Sprossachse von 1 bis 2 cm Länge verwendet. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie oben beschrieben. Der Objektträger wurde entsprechend der Richtlinie 98/57/EG präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop AxioLab bei 1 000-facher Vergrößerung ausgewertet.

Die getestete Probe wurde als positiv bewertet, wenn hell fluoreszierende Zellen mit charakteristischer *R. solanacearum*-Morphologie gefunden wurden.



Abbildung 11: durch Rs verursachte Welkesymptome an *Lycopersicon esculentum* 'MoneyMaker'

4.3.6 Untersuchungen mit Immun-Fluoreszenz-Colony-Staining (IFC)

Bei dieser Methode wird die Probe in einer kleinen Menge semiselektiven Nährmediums mehrere Tage inkubiert. Kolonien des Zielbakteriums werden mit Hilfe von Antikörpern markiert. Das Nährmedium wird bei 100-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop nach stark fluoreszierenden Kolonien untersucht und diese Kolonien werden mit sterilen Zahnstochern aus dem Nährmedium präpariert und auf ein Anreicherungsmedium gegeben. Mit dem angereicherten Material wird ein Biotest durchgeführt.

Es wurden mehrere Versuche mit dem IFC zur Untersuchung des Gärrestes zunächst auf Cms durchgeführt. Von jeder Probe wurde eine arithmetische Verdünnungsreihe angefertigt. Von den Verdünnungen 1 : 100 bis 1 : 100 000 wurden jeweils 100 µl Material untersucht.

Bei diesen Versuchen traten immer wieder Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen grampositiven Bakterien auf. In keinem der Fälle glückte die eindeutige Identifikation von Cms-Bakterien und damit die Isolation und letztlich ein Vitalnachweis, so dass diese Methode nicht weiter verfolgt wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss der Probenextraktion auf die Vitalität der Erreger

Es sollte ermittelt werden, inwieweit die Aufbereitung der Probe, insbesondere die hochtourige Zentrifugation, Auswirkungen auf die Vitalität der Erreger zeigten. Es wurden Bakteriensuspensionen mit verschiedenen Erregerdichten dem Gärrest zugesetzt und sofort untersucht. Die Proben wurden wie oben beschrieben aufbereitet und auf ein semiselektives Nährmedium ausplattiert. Bei der visuellen Auswertung wurden Kolonien mit gleicher Morphologie gezählt.

Tabelle 1: Einfluss der Probenextraktion auf die Vitalität von Cms

Probennummer	Zelldichte Cms nach Zugabe im Gärrest cfu/ml (in 10 ml Probe)	Zelldichte nach Auszählung auf Selektivmedium MTNA nach Zentrifugation und Resuspension cfu/ml (in 1 ml Probe)
42	$2,4 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$
43	$2,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^4$

Tabelle 2: Einfluss der Probenextraktion auf die Vitalität von Rs

Probennummer	Zelldichte Rs nach Zugabe im Gärrest cfu/ml (in 10 ml Probe)	Zelldichte nach Auszählung auf Selektivmedium SMSA nach Zentrifugation und Resuspension cfu/ml (in 1 ml Probe)
123	$2,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
124	$2,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$

Auswertung: Es wurde bei beiden Erregern kein nennenswerter Verlust lebensfähiger Bakterien festgestellt. Die Zunahme der Zelldichte erklärt sich durch das „Einengen“ auf 1 ml.

5.2 Einfluss der Lagertemperatur

Ziel des Untersuchungsansatzes war festzustellen, welche Auswirkungen auf die Vitalität von Cms bzw. Rs durch unterschiedliche Lagertemperaturen der Probe zu erwarten sind. Für diesen Test wurde der Gärrest mit Cms und Rs in der Zelldichte 10^6 cfu/ml und 10^4 cfu/ml versetzt. Diese Proben wurden geteilt und gekühlt bei 6°C sowie bei Raumtemperatur gelagert. Die Untersuchung der Proben begann am 3. Tag der Lagerung und endete am 7. Tag. Es wurden die PCR und ein Selektivausstrich durchgeführt. Charakteristische Kolonien auf dem Selektivmedium wurden weiter mit dem Immunfluoreszenztest (IFT) geprüft.

Tabelle 3: Lagerung des Kartoffelgärrestes bei 6°C und 20°C, Cms 10⁶ cfu/ml Gärrest

Untersuchung nach Tagen	6°C		20°C	
	PCR vom Gärrest	IFT von Cms-ähnlichen Kolonien auf MTNA	PCR vom Gärrest	IFT von Cms-ähnlichen Kolonien auf MTNA
0	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+

Tabelle 4: Lagerung des Kartoffelgärrestes bei 6°C und 20°C, Cms 10⁴ cfu/ml Gärrest

Untersuchung nach Tagen	6°C		20°C	
	PCR vom Gärrest	IFT von Cms-ähnlichen Kolonien auf MTNA	PCR vom Gärrest	IFT von Cms-ähnlichen Kolonien auf MTNA
0	+	+	+	+
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	-	-	-

Auswertung: Der Nachweis von Cms in der Zelldichte 10⁶ cfu/ml war an allen Untersuchungstagen bei beiden Lagertemperaturen sowohl in der PCR als auch beim Selektivausstrich mit Rücktestung (IFT)

positiv. Bei der Zelldichte 10^4 cfu/ml treten bei den gewählten Lagertemperaturen größere Unterschiede auf; bei 6 °C konnten lebende Zellen nur nach 4 Tagen, bei 20 °C lediglich am Tag der Zugabe nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Lagerung des Kartoffelgärrestes bei 6°C und 20°C, Rs 10^6 cfu/ml Gärrest

Untersuchung nach Tagen	6°C		20°C	
	PCR vom Gärrest	IFA von Rs-ähnlichen Kolonien auf SMSA	PCR vom Gärrest	IFA von Rs-ähnlichen Kolonien auf SMSA
0	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+

Tabelle 6: Lagerung des Kartoffelgärrestes bei 6°C und 20°C, Rs 10^6 cfu/ml Gärrest

Untersuchung nach Tagen	6°C		20°C	
	PCR vom Gärrest	IFA von Rs-ähnlichen Kolonien auf SMSA	PCR vom Gärrest	IFA von Rs-ähnlichen Kolonien auf SMSA
0	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	-	+	-

Auswertung: Unterschiede treten bei den gewählten Lagertemperaturen erst bei einer Zelldichte von 10^4 cfu/ml zu Tage. Rs konnte bei der Zelldichte 10^4 cfu/ml zwar an allen Tagen mittels PCR nachgewiesen werden, der Nachweis mit Selektivmedium und IFT war aber nur bis zum 4. Tag positiv.

Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* bei mehrtägiger Lagerung der Probe

Tabelle 7: Mit Cms und Rs kontaminierte Gärsubstanz unterschiedlicher Zelldichten wurde an vier aufeinander folgenden Tagen mit PCR und Selektivausstrich untersucht. Die Virulenz isolierter Kolonien wurde nach Passage auf einem Anreicherungsmedium im entsprechenden Bioindikator geprüft (Vitalnachweis).

Untersuchungszeitpunkt	Zelldichte (cfu/ml)	pH-Wert	Cms		Rs	
			PCR	Biotest	PCR	Biotest
1. Tag	10^6	8,29	+	+	+	+
	10^4		+	+	+	+
	10^3		+	+	+	+
	10^2		-	-	+	-
	10^1		-	-	-	-
2. Tag	10^6	8,50	+	+	+	+
	10^4		+	+	+	+
	10^3		+	+	+	+
	10^2		-	-	+	-
	10^1		-	-	-	-
3. Tag	10^6	8,71	+	+	+	+
	10^4		+	+	+	+
	10^3		+	+	+	-
	10^2		-	-	-	-
	10^1		-	-	-	-
4. Tag	10^6	8,75	+	+	+	+
	10^4		+	+	+	+
	10^3		+	+	+	-
	10^2		-	-	-	-
	10^1		-	-	-	-

Auswertung: Cms ist in der PCR bis zu einer Zelldichte von 10^3 cfu/ml Gärrest bis zum vierten Tag nach der Probenahme nachweisbar und konnte durch den Vitalnachweis bestätigt werden. Die Nachweisbarkeit von Rs im Gärrest war mittels PCR bis zu einer Zelldichte von 10^3 cfu/ml über die Dauer von vier Tagen nach Probenahme möglich, an den ersten beiden Tagen sogar bis 10^2 cfu/ml. Im Vitalnachweis

wurde Rs an den ersten zwei Tagen bis 10^3 cfu/ml und später bis 10^4 cfu/ml positiv bestätigt. Während der Lagerung der Proben wurde ein Anstieg des pH-Wertes beobachtet.

Prüfung der Proben mit Indikatorpflanzen

Tabelle 8: Proben mit definierten Zelldichten zwischen 10^6 und 10^1 cfu / ml wurden direkt in die Indikatoren (Aubergine, Tomate) inokuliert. Nach vier Wochen wurde der Rücktest vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit IF-Test.

Zelldichte cfu/ ml	1.Tag		2.Tag		3.Tag		4.Tag	
	Cms	Rs	Cms	Rs	Cms	Rs	Cms	Rs
10^6 cfu/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
10^4 cfu/ml	+	+	+	-	+	-	+	-
10^3 cfu/ml	-	-	-	-	-	-	-	-
10^2 cfu/ml	-	-	-	-	-	-	-	-
10^1 cfu/ml	-	-	-	-	-	-	-	-

Auswertung: Bei Proben mit hoher Zelldichte (10^6 cfu/ml) konnten Cms und Rs an allen vier Versuchstagen mit dem Biotest nachgewiesen werden. Cms war im Ansatz 10^4 cfu/ml noch am 4. Tag nachweisbar, Rs nur am 1. Tag. In der Zelldichte 10^3 cfu/ml sind beide Bakterienarten nicht mehr im direkten Biotest nachzuweisen.

6 Diskussion und Schlussfolgerung

Vorliegender Bericht lehnt sich in Thematik, Darstellung und Aussage eng an das vorangegangene Projekt zur ‚Dekontamination von bakterielle Ringfäule-infizierten Speisekartoffelpartien durch mesophile Anaerobbehandlung in Biogasanlagen‘ an. Auf die hier erfolgte Einordnung in grundlegende Zusammenhänge, Ausgangsbedingungen und Gesetzmäßigkeiten in Deutschland zur Behandlung von Bioabfällen und dem Risiko des Eintrags phytopathogener Keime über Bioabfälle kann verwiesen werden (vgl. WIEDEMANN UND ENDERLEIN, 2005, Diskussion S. 21). Ein von MIKKELSEN et al. im Januar 2006 vorgelegter Literaturbericht zur Umsetzung bestehender EU-Richtlinien bei der Behandlung und Nachweis von Pflanzenpathogenen in verschiedenen Arten von Bioabfällen verweist auf deren Zunahme und Bedeutung in aufbereiteten qualitativ hochwertigen Substraten zur Hebung der Bodenfruchtbarkeit im Gartenbau und der Landwirtschaft. Obwohl es offensichtlich nur wenige exakt belegte Beispiele einer direkten Infektionsübertragung von Pilzen, Bakterien, Viren und Nematoden aus Klärschlämmen und Komposten bei Beachtung guter fachlicher Praxis gibt, messen die Autoren diesen Fragen der Risikoabschätzung

große Bedeutung bei. Pflanzenpathogenen Bakterien wird in dieser Studie allgemein eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit in Kompostmaterial oder Klärschlämmen eingeräumt. Der schleichende Charakter bakterieller Infektionsketten im Kartoffelbau lässt eine umfassende Vorsorge jedoch angeraten erscheinen, auf die die ‚Leitlinie zur Durchführung von Maßnahmen zur Bekämpfung der Bakteriellen Ringfäule in Deutschland‘ (BAnz. 1999, S. 18397 NF 67/5/216) verweist.

Gärreste aus dem Monosubstrat Kartoffelabfälle sind ein Spezialfall der Aufbereitung biogener Abfällen (vgl. Punkt 1 Einleitung), haben aber für das Bundesland Sachsen in Fragen der Phytohygiene einen nicht zu unterschätzenden Stellenwert. Eine Zufuhr von Speise- und Wirtschaftskartoffeln aus benachbarten EU-Ländern erscheint für die Zukunft real. Nicht überall ist ein Rückgang der gelisteten Fälle mit Ringfäule zu beobachten (vgl. aktuelle BBA Statistik zum Vorkommen der Ringfäule und Schleimkrankheit in der EU, im Abschlussbericht nicht publiziert). Die im Themenkomplex ‚Phytohygiene‘ gestellten Fragen zur Überlebensfähigkeit von Cms und Rs nach Anaerobbehandlung in Biogasanlagen und Fragen des Nachweises der Erreger in Gärrestproben ergänzen die Kenntnis zur Biologie der Erreger und lassen Schwachstellen bestehender Maßnahmen zur phytosanitären Vorsorge besser erkennen.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit gestatten einen begründeten Vorschlag zur Nachweisführung von Restmengen der beiden Quarantäneerreger *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* in Gärrestproben. Der Schwerpunkt der Aussage zielt auf die Untersuchung der Gärreste vom Monosubstrat Kartoffel. Die Untersuchung denkbarer Mischpartner in der Biogaserzeugung (Kofermentation) blieb weitgehend unberücksichtigt. Sollte eine erwartete Novellierung des Erneuerbaren Energiengesetzes (EEG) auch die Verwendung von Kartoffelabfällen zulassen, ergeben sich schwerpunktmäßig weitere Untersuchungsansätze. In Abbildung 12 ist der Untersuchungsgang zusammengefasst.

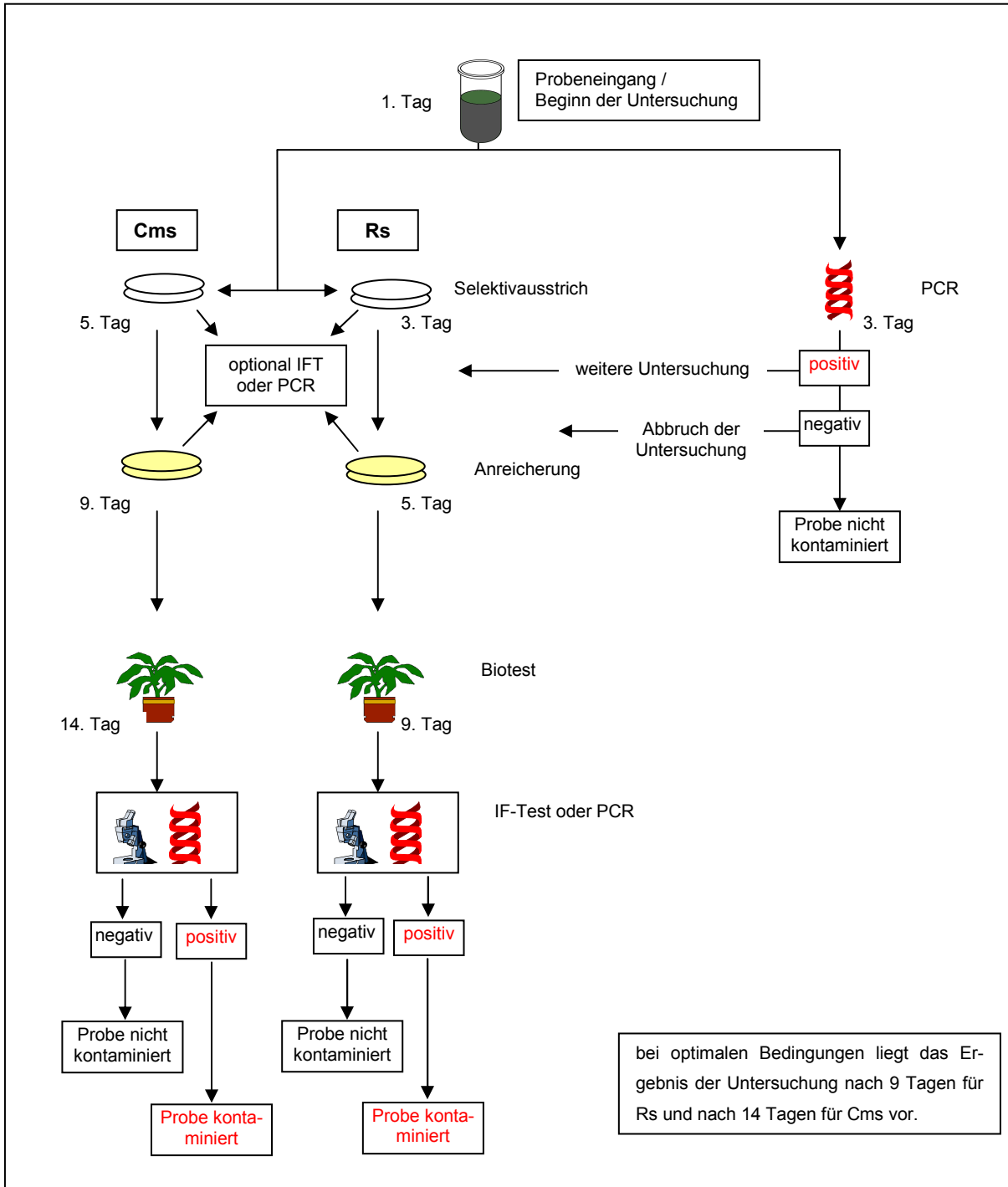


Abbildung 12: Verfahrensvorschlag zur Untersuchung von Gärrestproben auf Cms und Rs (Minstdauer unter optimalen Versuchsbedingungen)

In Stichpunkten kann zusammenfassend festgehalten werden:

- Der Zeitpunkt der Probenahme sollte in Nähe des Datums des Inverkehrbringens liegen.
- Bei der Probenahme ist die nachfolgende unverzügliche Bearbeitung der Probe zu sichern (ein bis zwei Tage).
- Von repräsentativen Stellen ist jeweils 1 kg Material zu entnehmen und gekühlt zum Untersuchungs-ort zu transportieren.
- Pro Kilogramm Untersuchungsmaterial werden 10 Teilproben á 10 g untersucht.
- Der Selektivausstrich ist in seiner Empfindlichkeit als Untersuchungsmethode optimal geeignet.
- Ein Referenzstamm ist mitzuführen.
- Bis zum 2. Tag nach Probenahme können Cms und Rs in geforderter Konzentration von 10^3 cfu/ml nachgewiesen werden.
- Der Biotest besitzt beim direkten Nachweis von Cms und Rs im Gärrest eine geringere Sensitivität und ist in Erwartung niedriger Erregerdichten ungeeignet.
- Während der Lagerung lässt der Anstieg des pH-Wertes keinen Einfluss auf die Vitalität von Cms und Rs erkennen.
- Bei Rs ist nach neun Tagen, bei Cms nach 14 Tagen mit einem Ergebnis zu rechnen; optimale Bedingungen sind dazu die Voraussetzung.
- Das Erkennen der erregertypischen Kolonien ist schwierig, es ist eine hohe fachliche Kompetenz dazu erforderlich.

7 Literatur

MIKKELSEN, L., ELPHINSTONE, J., JENSEN, D. F. (2006). Horizontal Standards on Hygienic Microbiological parameters for Implementation of EU Directives on Sludge, Soil and Treated Biowastes. Literature review on detection and eradication of plant pathogens in sludge, soils and treated biowaste. Abschlussbericht 53 S.

MÜLLER, P. (1996) Schleimkrankheit der Kartoffel. Kartoffelbau 47. Jg (1/2), S. 45 - 47

M. RETZER, R. BURCKHARDT, L. SEIGNER, G. POSCHENRIEDER (2006). *Ralstonia solanacearum* Biovar2/Rasse3 (Erreger der Schleimkrankheit der Kartoffel) in Oberflächengewässern und *Solanum dulcamara* – Ergebnisse eines mehrjährigen Monitorings in Bayern. Gesunde Pflanzen Band 58, Nummer 1, S. 12 - 17

STEINMÖLLER, S.; BÜTTNER, C.; MÜLLER, P.; BECKERS, F. (2004). Bewertung des Risikos der Verschleppung von Quarantäneschadorganismen mit Abfällen aus kartoffelverarbeitenden Betrieben und praktische Bedeutung. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtsch. 396, S 343, 2004

WIEDEMANN, W. UND ENDERLEIN, O. (2006). Zur Phytohygiene von Kartoffelabfällen – Dekontamination von bakterielle Ringfäule-infizierten Speisekartoffelpartien durch mesophile Anaerobbehandlung in Biogasanlagen. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Abschlussbericht 28 S., Heft 5 - 10. Jahrgang 2005

Impressum

- Herausgeber:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden
Internet: www.landwirtschaft.sachsen.de/lfl/publikationen
- Autoren:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Fachbereich Pflanzliche Erzeugung
Dr. Wolfram Wiedemann, Olaf Enderlein
Alttrachau 7
01139 Dresden
Telefon: 0351/85304-23
Telefax: 0351/85304-44
E-Mail: wolfram.wiedemann@smul.sachsen.de
- Redaktion:** siehe Autoren
- Endredaktion:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Birgit Seeber, Ramona Scheinert, Matthias Löwig
Telefon: 0351/2612-345
Telefax: 0351/2612-151
E-Mail: birgit.seeber@smul.sachsen.de
- ISSN:** 1861-5988
- Redaktionsschluss:** November 2006

Für alle angegebenen E-Mail-Adressen gilt:

Kein Zugang für elektronisch signierte sowie für verschlüsselte elektronische Dokumente

Verteilerhinweis

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.