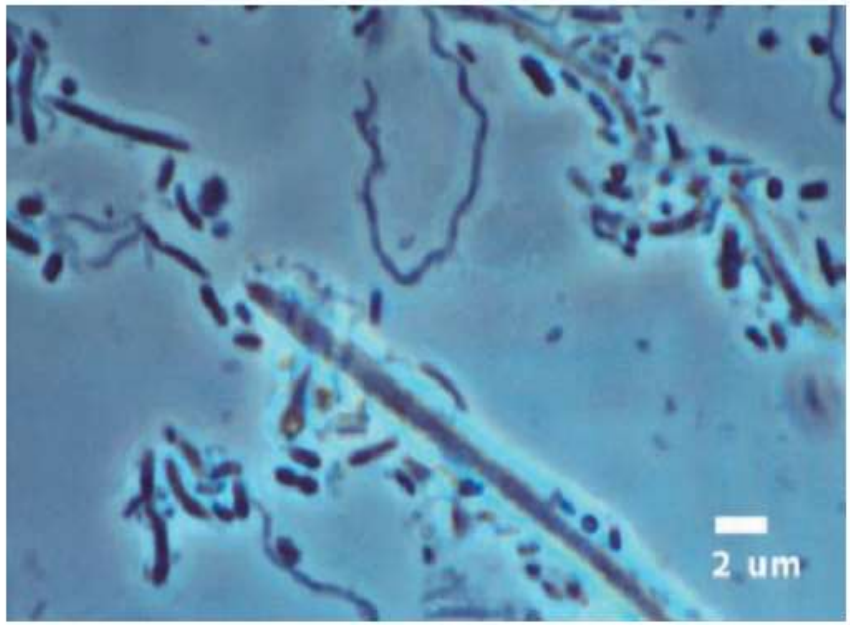
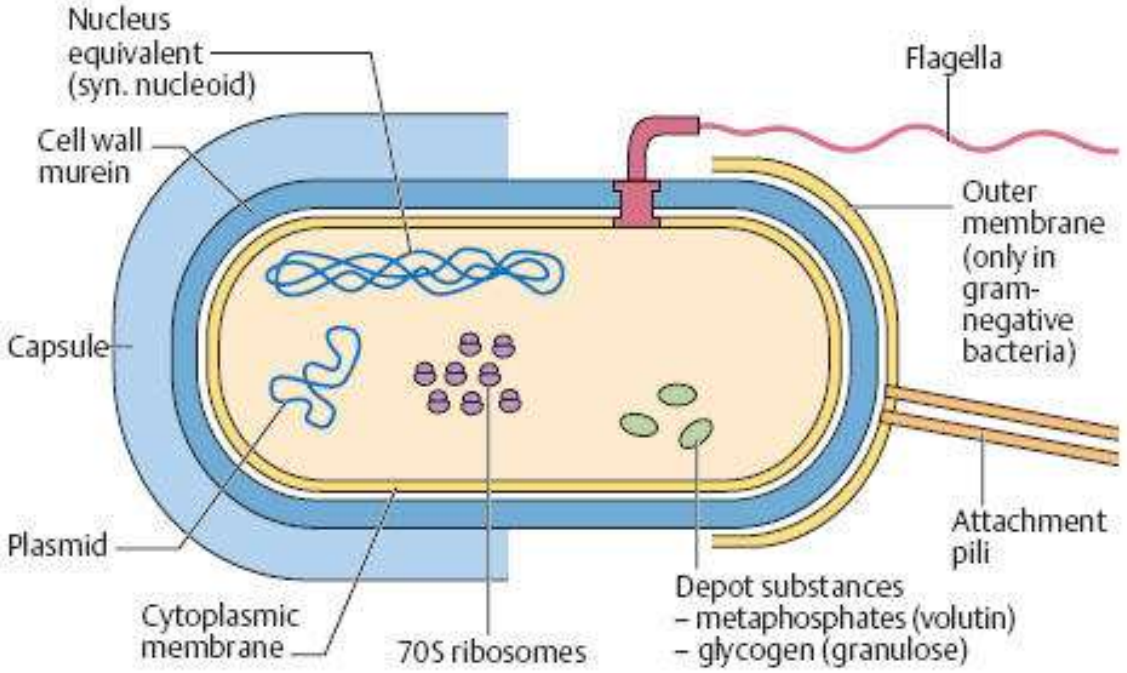
# Isolation, identification and storage of plant pathogenic bacteria

- Introduction
  - History of phytobacteriology
  - Bacteria as plant pathogens
- Collection of samples
- Methods of Isolation
- Methods of Identification
- Methods of Storage

**Bacteria were first seen by Antoni van Leeuwenhoek in 1683**



## Basic Bacterial Cell Structure




All bacteria have the same basic structure (not to scale).

## Single Colonies of a Bacterium on an Agar Plate

*Left:* Robert Koch at work in his laboratory, where he discovered that bacteria can cause disease (experiments with *Bacillus anthracis*, causing anthrax in sheep).
*Right:* One of Koch's microscopes as still present in the Robert Koch museum in Berlin.

# KOCH'S POSTULATES

1. The suspected pathogenic organism (here: the bacterium) must always be present in lesions of the diseased tissues of an organism in question and absent in healthy organisms (here: plants).

2. The suspected organism must be isolated from the diseased tissues

## History of phytobacteriology

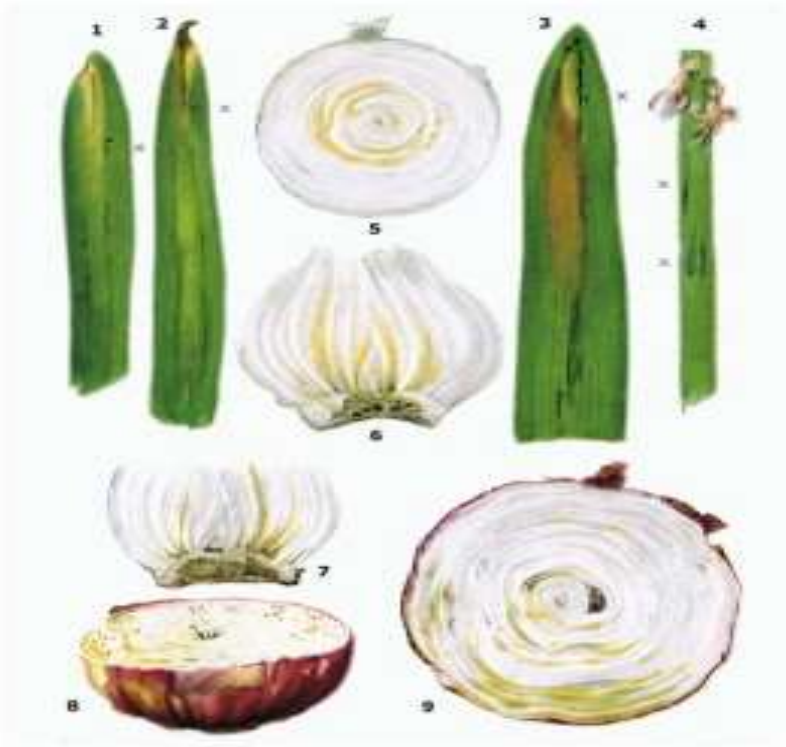
3. When the pure culture of the organism is inoculated into a healthy host (here: plant) in the laboratory it must produce a similar disease in this host.

4. The same organism must be found and reisolated from the experimentally inoculated host (here: plant) in which disease developed.

# E. F. SMITH (1854-1938), USA, FOUNDER OF PHYTOBACTERIOLOGY

Symptoms of yellow disease in hyacinth; compare with drawings of E.F. Smith

Cells of *Xanthomonas hyacinthi* as drawn by E.F. Smith from microscopic preparations. Source: as in **Fig. 26c**, page 345.

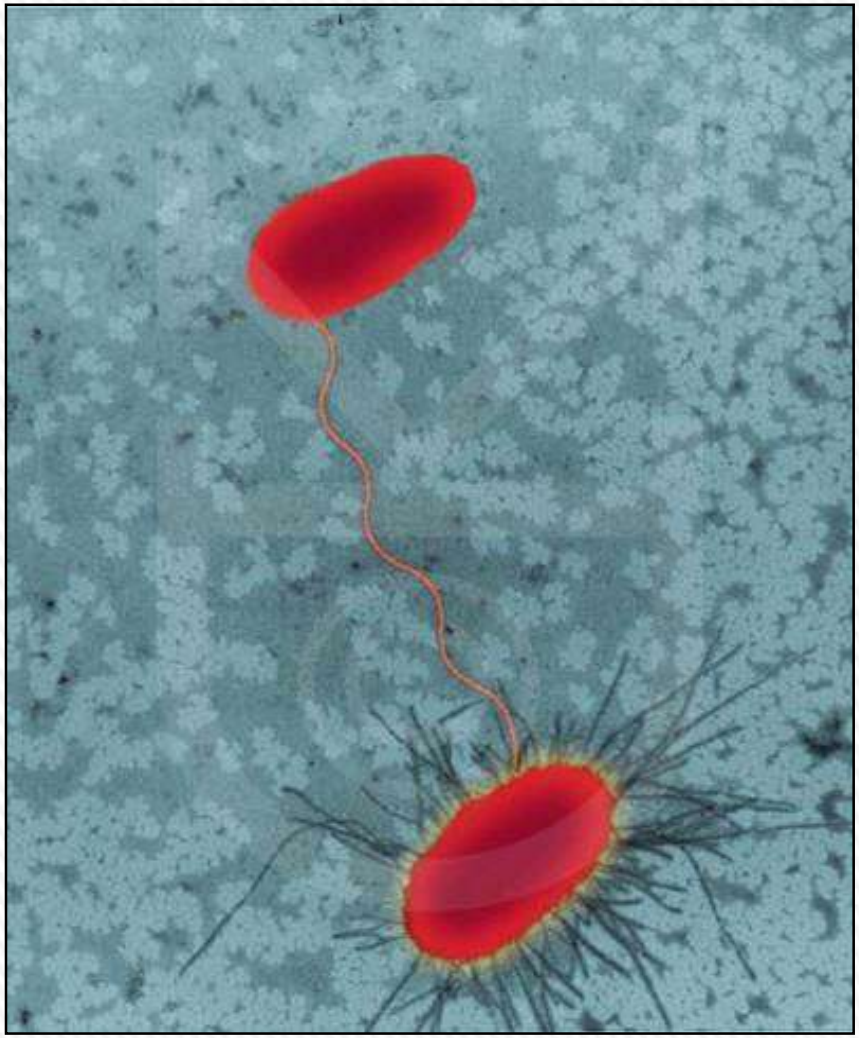



**Symptoms of yellow disease caused by *Xanthomonas hyacinthi*. Plate 19 as it appeared in E.F. Smith, Bacteria in Relation to Plant Diseases, Volume 2, page 334, 1911.**

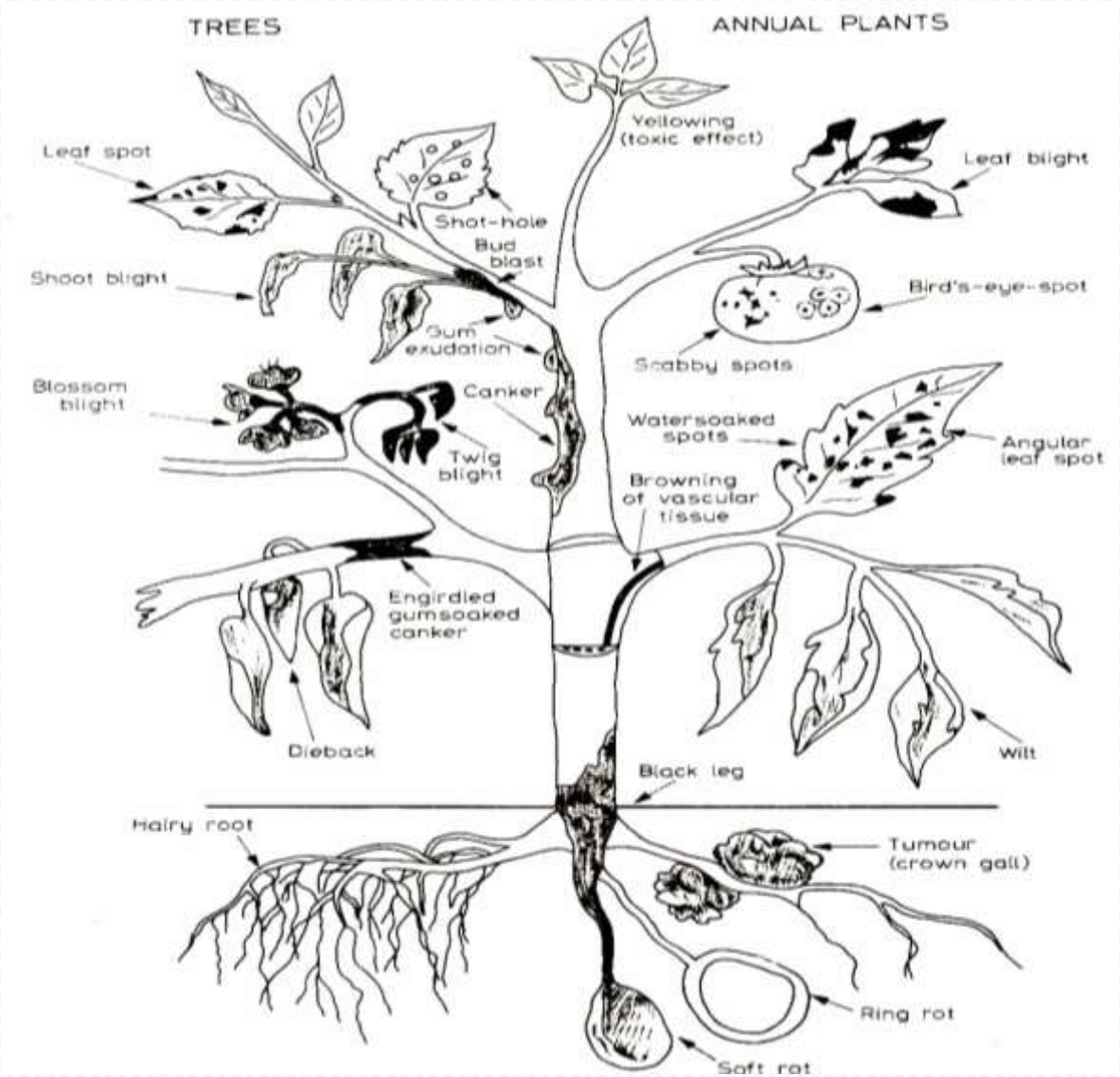
# Bacteria and plant pathology

## Properties of plant pathogenic bacteria

» **Bacteria can reproduce sexually by conjugation or asexually by binary fission.**



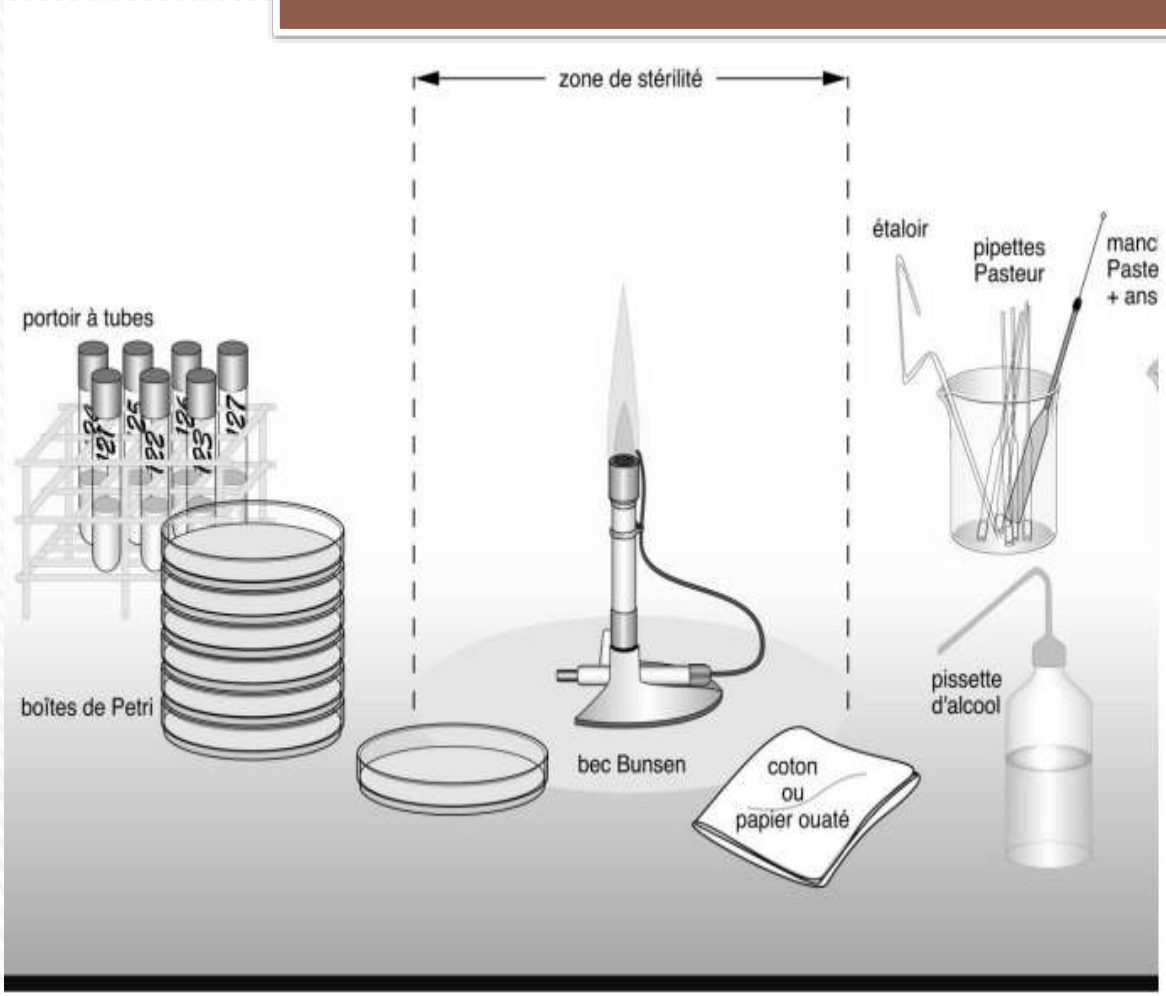
# Collection of samples



| المسبب المرضى | العرض |
| --- | --- |
| *Erwinia spp.*<br>*Pseudomonas spp.* (فى بعض الاحيان) | 1 - عفن طرى Soft rots |
| *Xanthomonas spp.*<br>*Corynebacterium spp.*<br>*Erwinia spp.*<br>*Pseudomonas spp.* | ذبول (ذبول وعائى) :<br>(Wilts(Vascular Diseases |
| *Erwinia spp.*<br>*Pseudomonas spp.*<br>*Xanthomonas spp.* | لـــفحات: Blights |
| *Agrobacterium spp.*<br>*Pseudomonas spp.*<br>*Corynebacterium spp.* | تـدرنات: Galls |
| *Pseudomonas spp.*<br>*Xanthomonas spp.* | تبقعات (موت موضعى للأنسجة):<br>(Local lesions) |
| *Streptomyces spp.*<br>*Pseudomonas spp.* | جـرب : Scabs |

# Types of sample

# Materials for isolation



# Isolation from ooze

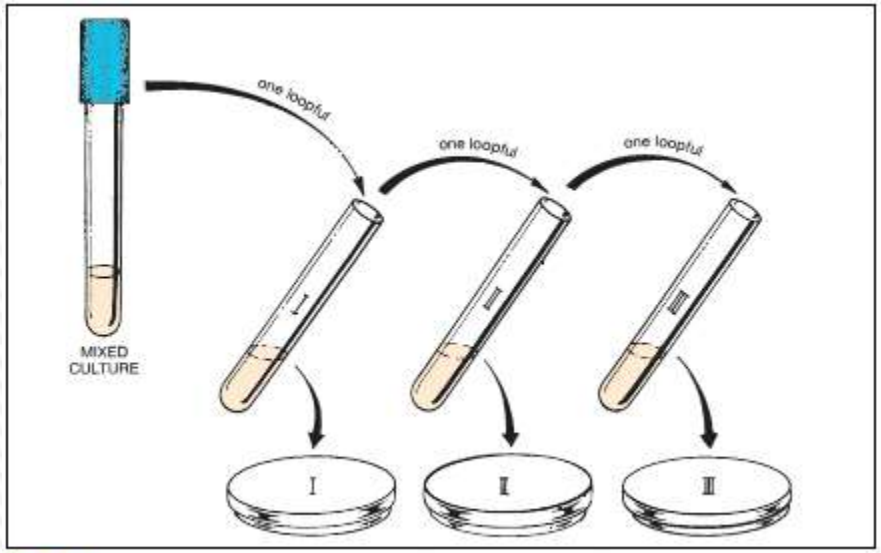
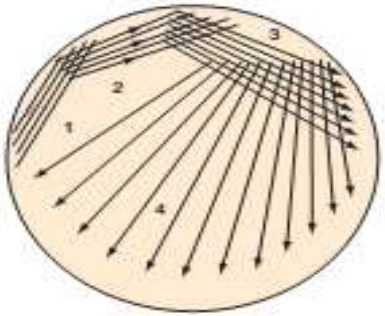
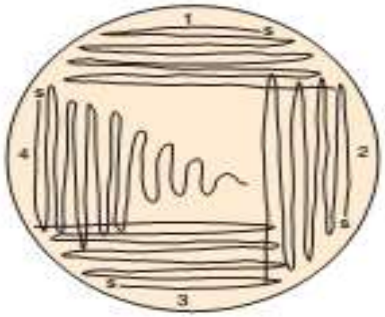



Figure 21.5 Three steps in the loop dilution technique for separating out organisms



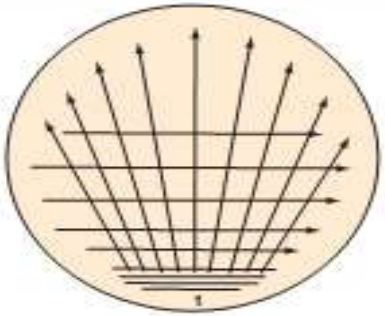

## QUADRANT STREAK
(Method A)

1. Streak one loopful of organisms over Area 1 near edge of the plate. Apply the loop lightly. Don't gouge into the medium.
2. Flame the loop, cool 5 seconds, and make 5 of 6 streaks from Area 1 through Area 2. Momentarily touching the loop to a sterile area of the medium before streaking insures a cool loop.
3. Flame the loop again, cool it, and make 6 or 7 streaks from Area 2 through Area 3.
4. Flame the loop again and make as many streaks as possible from Area 3 into Area 4, using up the remainder of the plate surface.
5. Flame the loop before putting it aside.



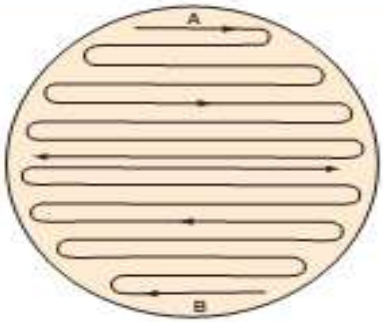

## QUADRANT STREAK
(Method B)

1. Streak one loopful of organisms back and forth over Area 1, starting at point designated by "s". Apply loop lightly. Don't gouge into the medium.
2. Flame the loop, cool 5 seconds and touch the medium in sterile area momentarily to insure coolness.
3. Rotate the dish 90 degrees while keeping the dish closed. Streak Area 2 with several back and forth strokes, hitting the original streak a few times.
4. Flame the loop again. Rotate the dish and streak Area 3 several times, hitting last area several times.
5. Flame the loop, cool it, and rotate the dish 90 degrees again. Streak Area 4, contacting Area 3 several times and drag out the culture as illustrated.
6. Flame the loop before putting it aside.




## RADIANT STREAK

1. Spread a loopful of organisms in small area near the edge of the plate in Area 1. Don't gouge medium.
2. Flame the loop and allow it to cool for 5 seconds. Touching a sterile area of the medium will insure coolness.
3. From the edge of Area 1 make 7 or 8 straight streaks to the opposite side of the plate.
4. Flame the loop again, cool it sufficiently, and cross streak over the last streaks, starting near Area 1.
5. Flame the loop again before putting it aside.




## CONTINUOUS STREAK

1. Starting at the edge of the plate (Area A) with a loopful of organisms, spread the organisms in a single continuous movement to the center of the plate. Use light pressure and avoid gouging the medium.
2. Rotate the plate 180 degrees so that the uninoculated portion of the plate is away from you.
3. Without flaming loop, and using the same face of the loop, continue streaking the other half of the plate by starting at Area B and working toward the center.
4. Flame your loop before putting it aside.

Four different streak techniques

# Isolation from plant materials

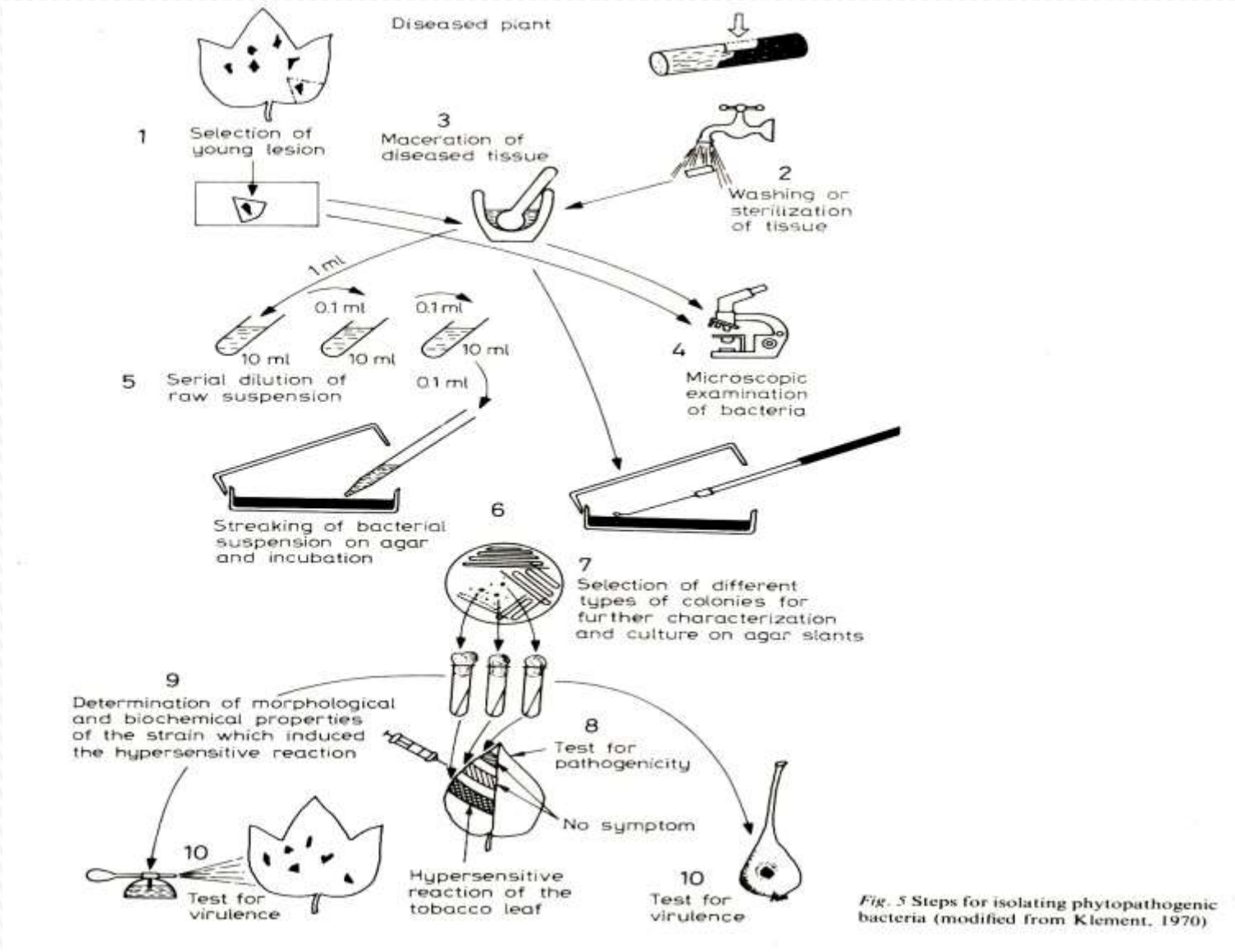
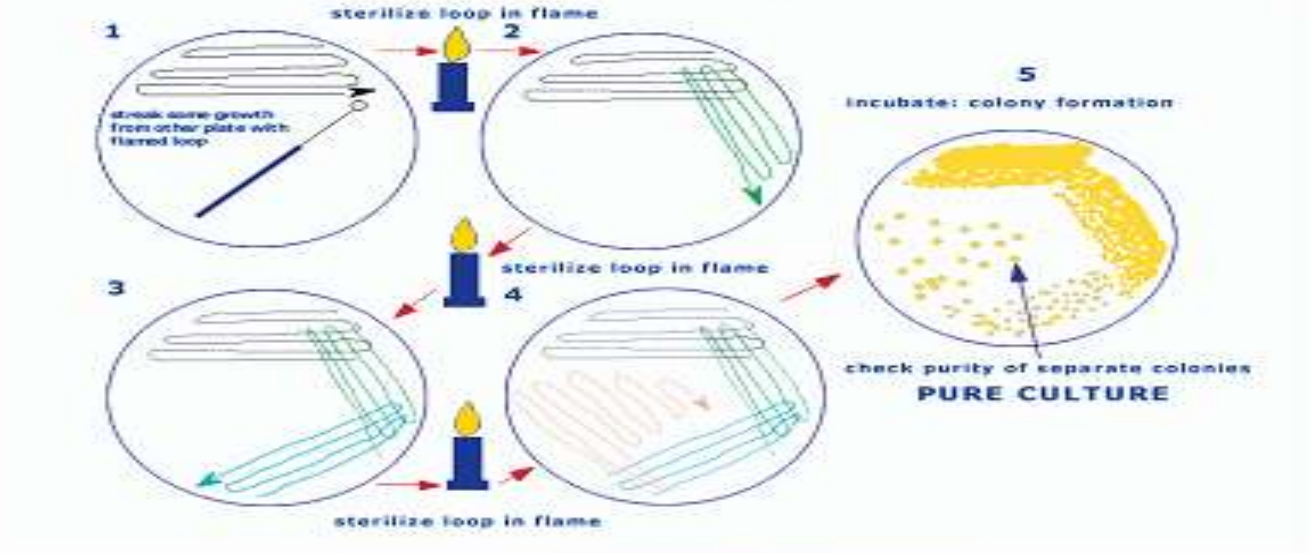



*Fig. 5* Steps for isolating phytopathogenic bacteria (modified from Klement, 1970)

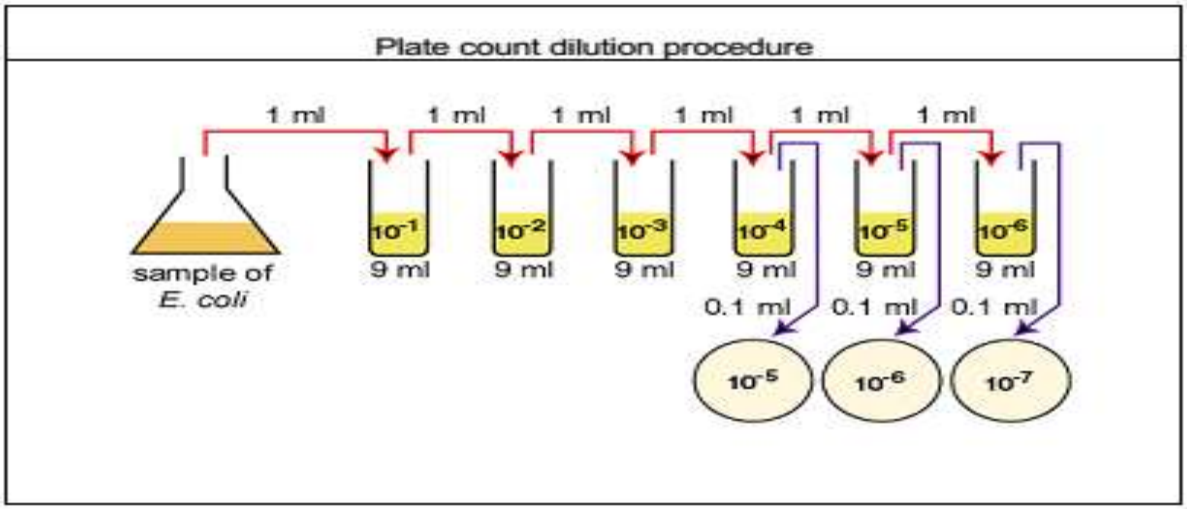
# BASIC TECHNIQUE OF OBTAINING PURE CULTURES IN BACTERIOLOGY



*Top:* Basic technique to obtain pure cultures.
*Bottom:* Pure culture of *Pseudomonas savastanoi* subsp. *fraxini*, after restreaking of a colony from an isolation plate and 3 days' growth at 27°C on nutrient agar.

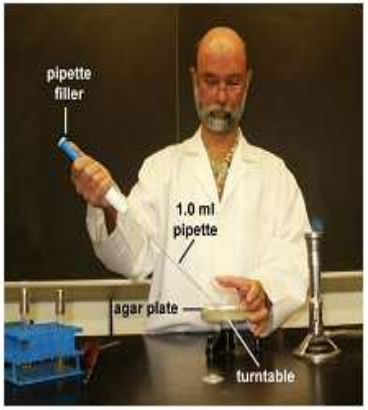
**Separate colonies allow a check for purity.**

# Isolation from soil

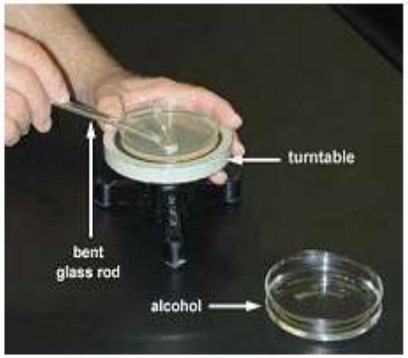



Removing bacteria from a tube with a pipette.

Using a pipette to transfer bacteria to an agar plate.




Using a turntable and bent glass rod to spread bacteria evenly over the surface of an agar plate.

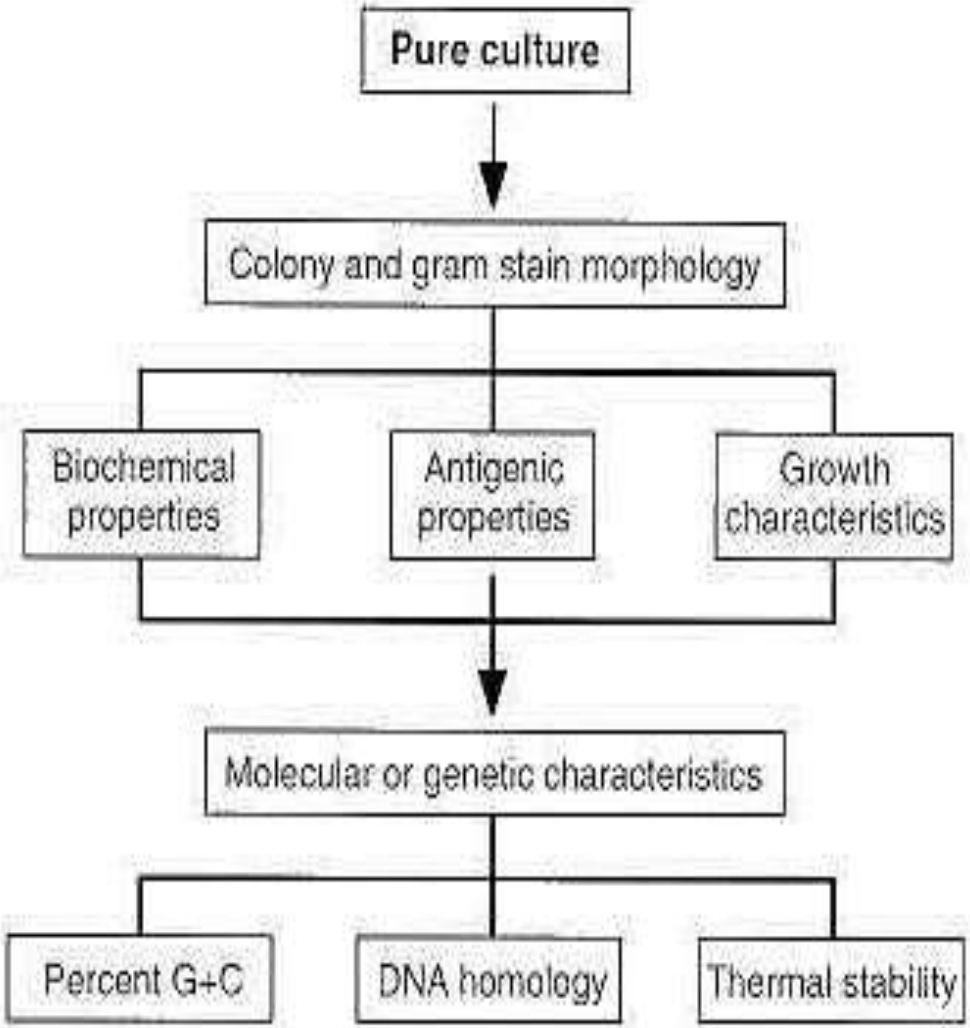


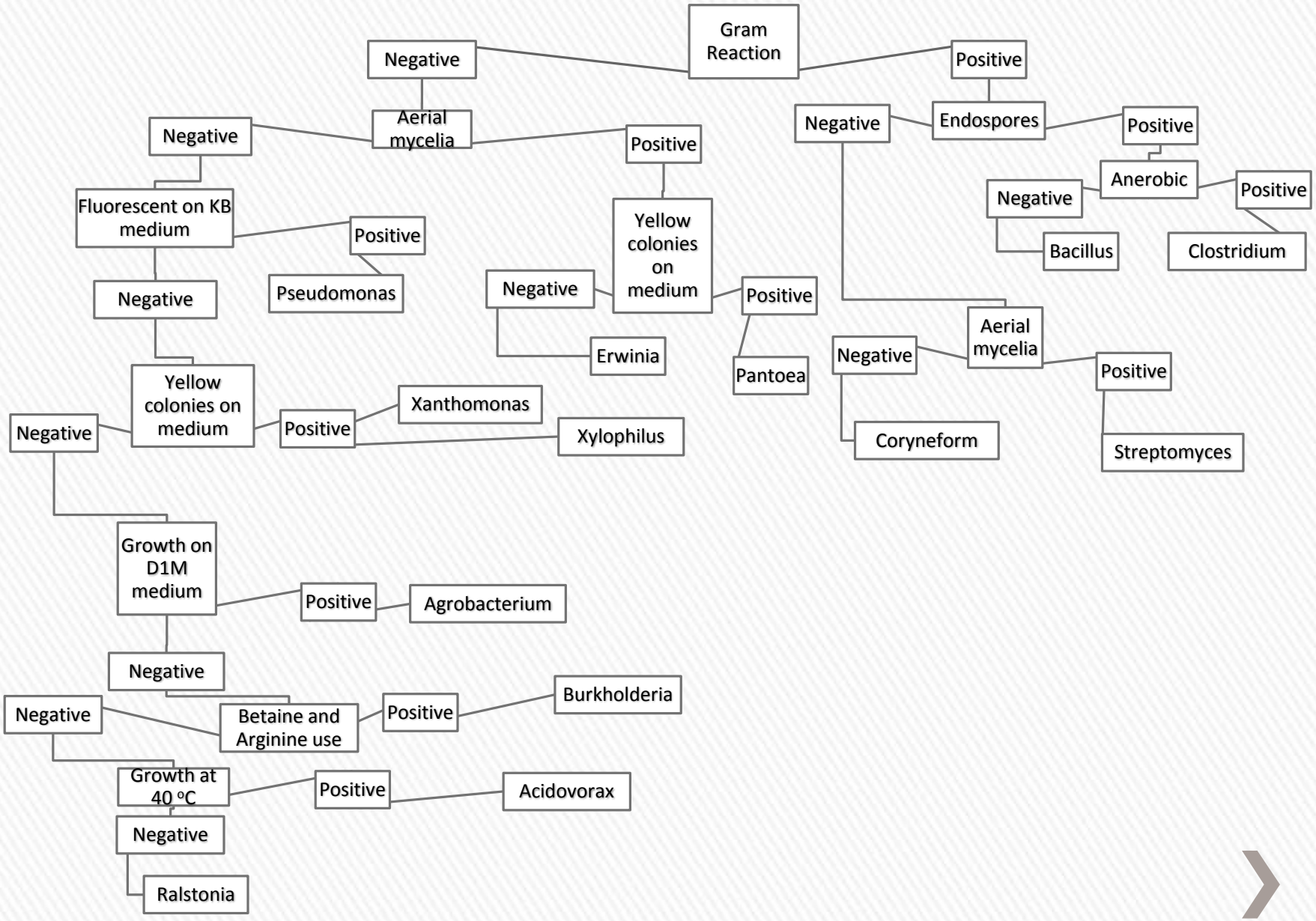

Using a vortex mixer to distribute bacteria evenly throughout the tube.

Isolation by needle puncture method

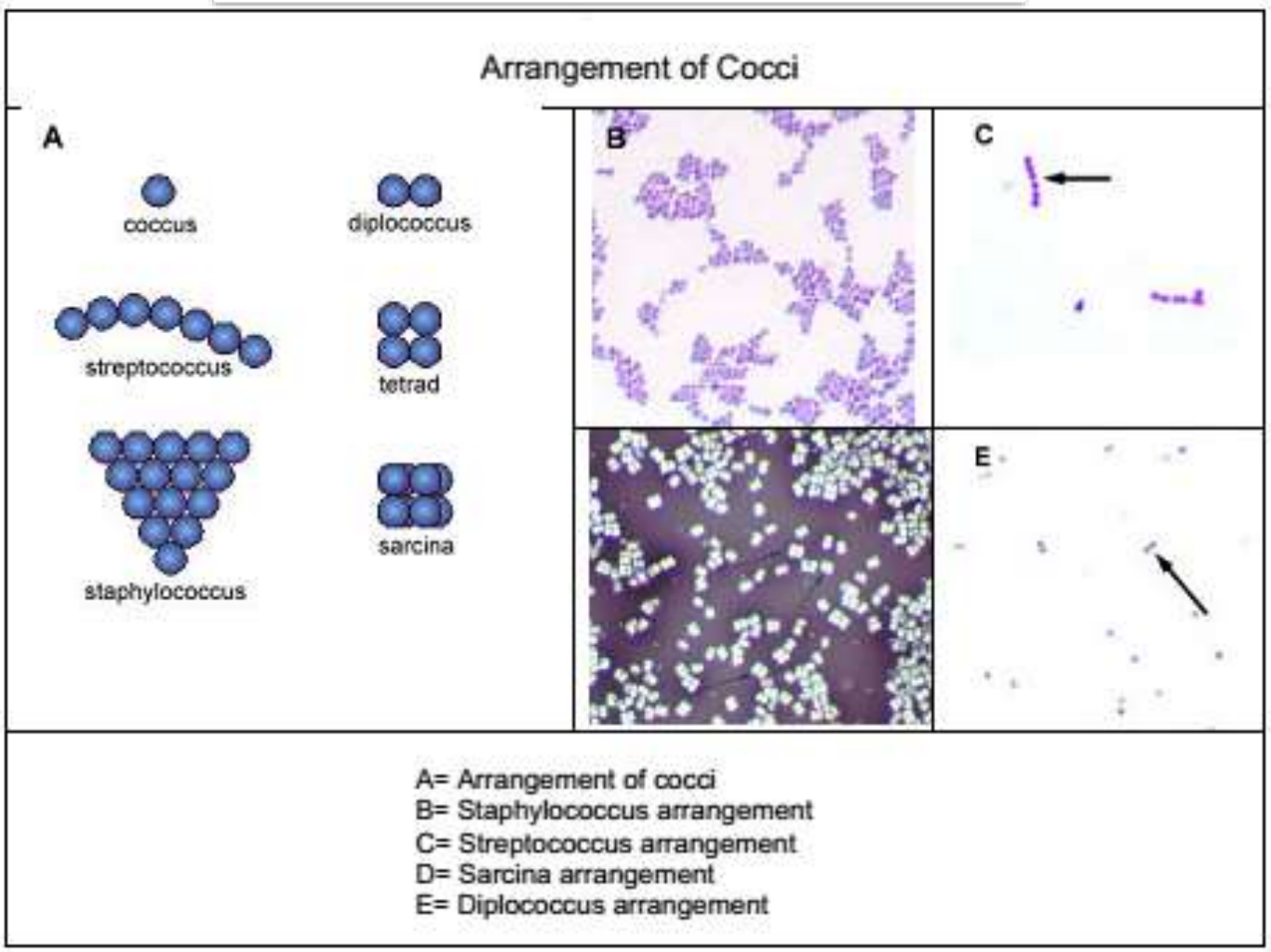
Isolation like fungi

# Isolation by selective media

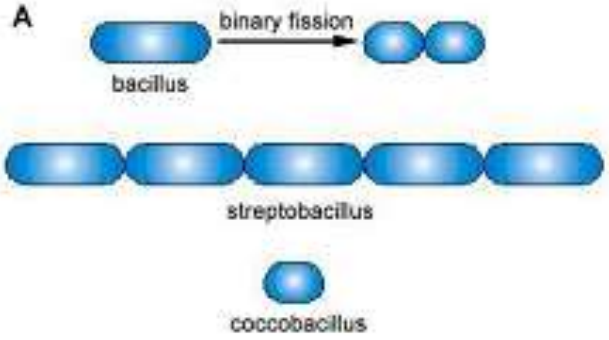

Pure culture
Colony and gram stain morphology
Biochemical properties
Antigenic properties
Growth characteristics
Molecular or genetic characteristics
Percent G+C
DNA homology
Thermal stability

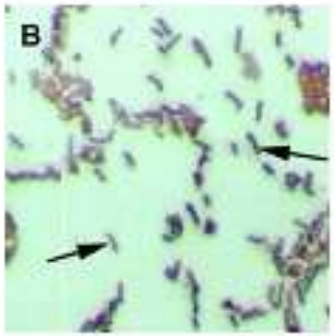

Gram Reaction
Negative
Positive
Aerial mycelia
Negative
Positive
Fluorescent on KB medium
Positive
Pseudomonas
Negative
Yellow colonies on medium
Negative
Positive
Erwinia
Pantoea
Yellow colonies on medium
Negative
Positive
Xanthomonas
Xylophilus
Growth on D1M medium
Positive
Agrobacterium
Negative
Negative
Betaine and Arginine use
Positive
Burkholderia
Growth at 40 °C
Positive
Acidovorax
Negative
Ralstonia
Negative
Endospores
Positive
Negative
Anerobic
Positive
Bacillus
Clostridium
Aerial mycelia
Negative
Positive
Coryneform
Streptomyces

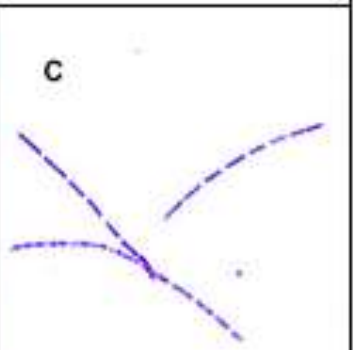
# Colony morphology



## Arrangements of Bacilli

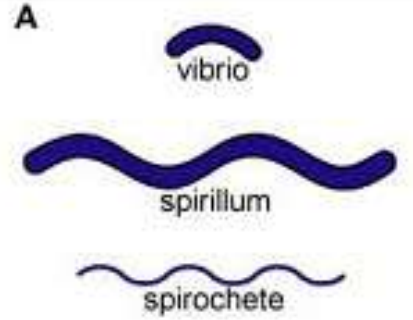


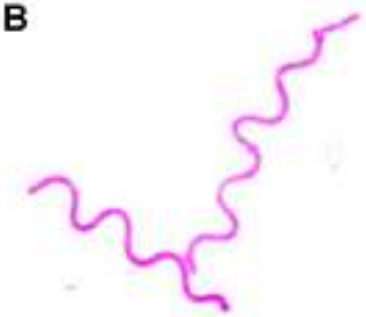



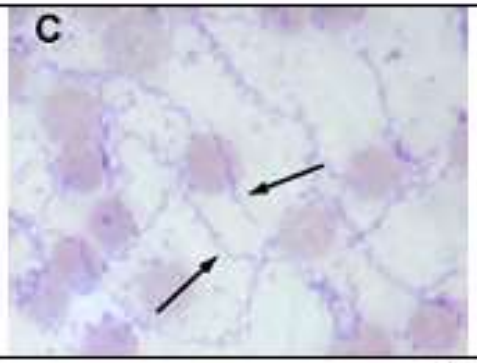



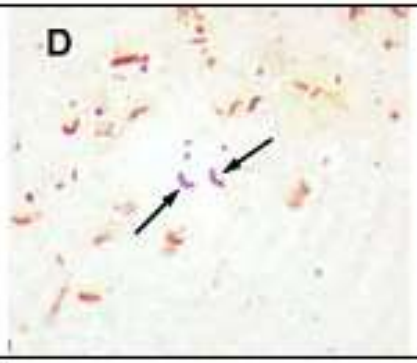

A= Arrangements of bacilli
B= Single bacillus
C= Streptobacillus

## Spiral Forms



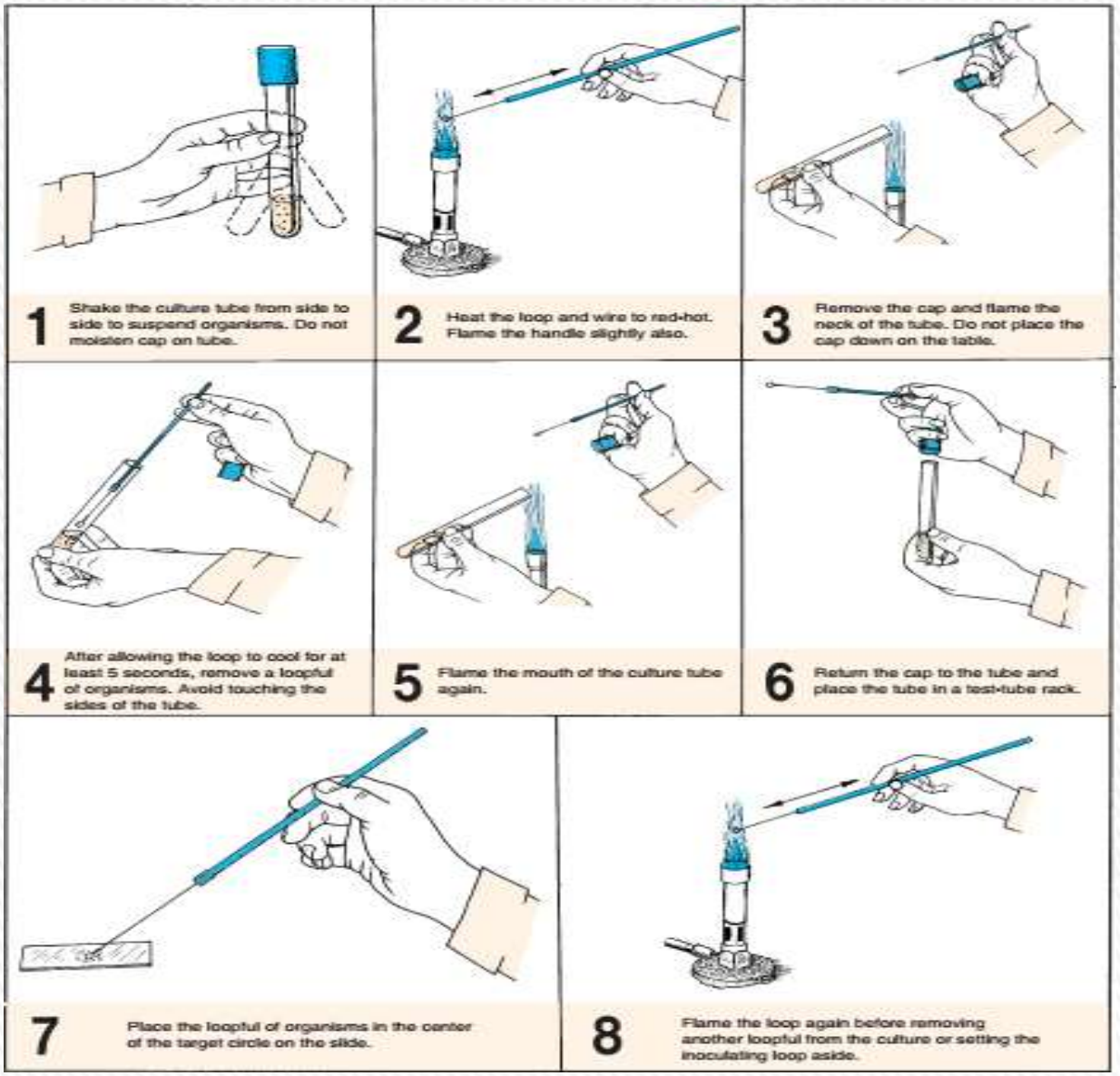



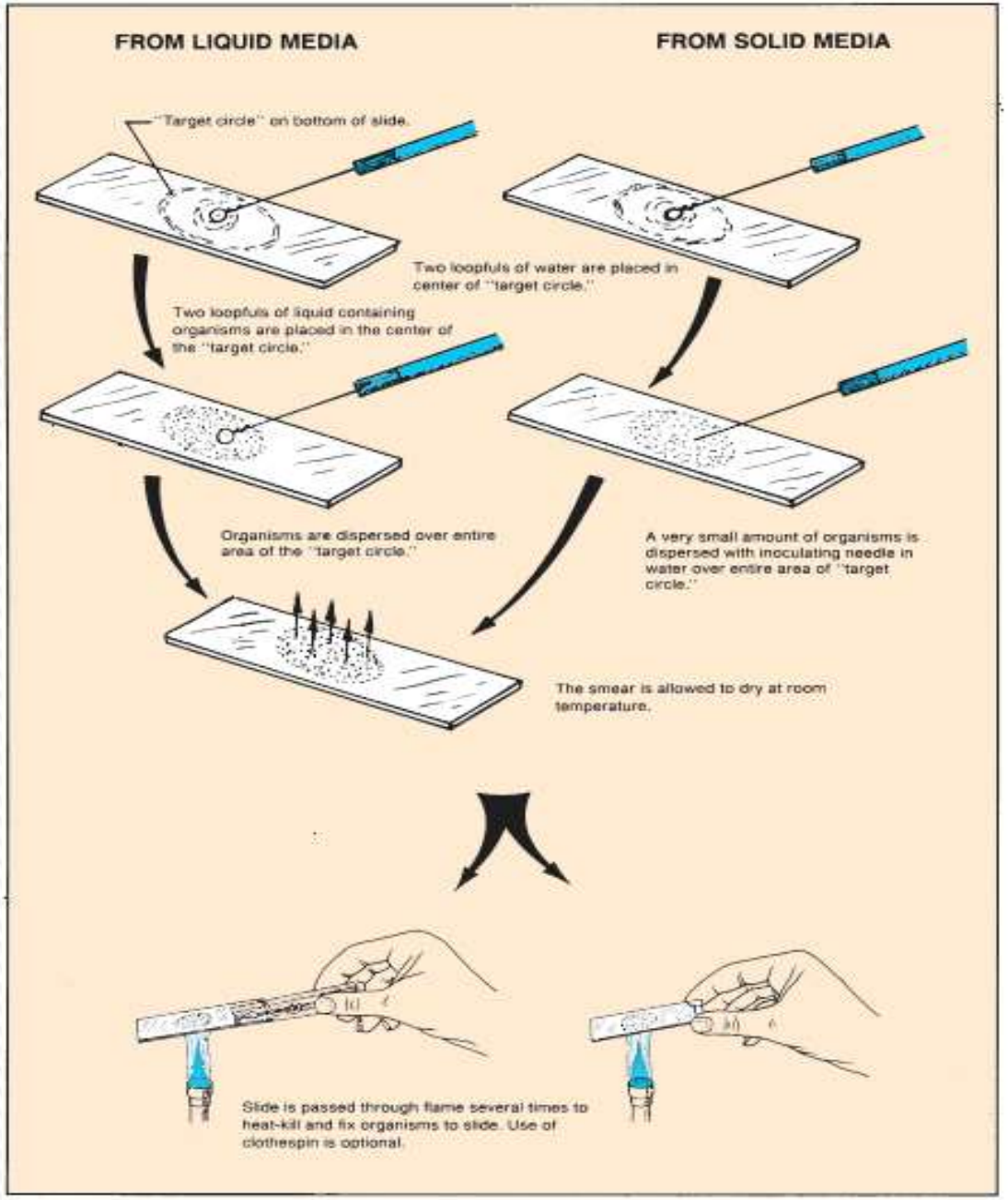



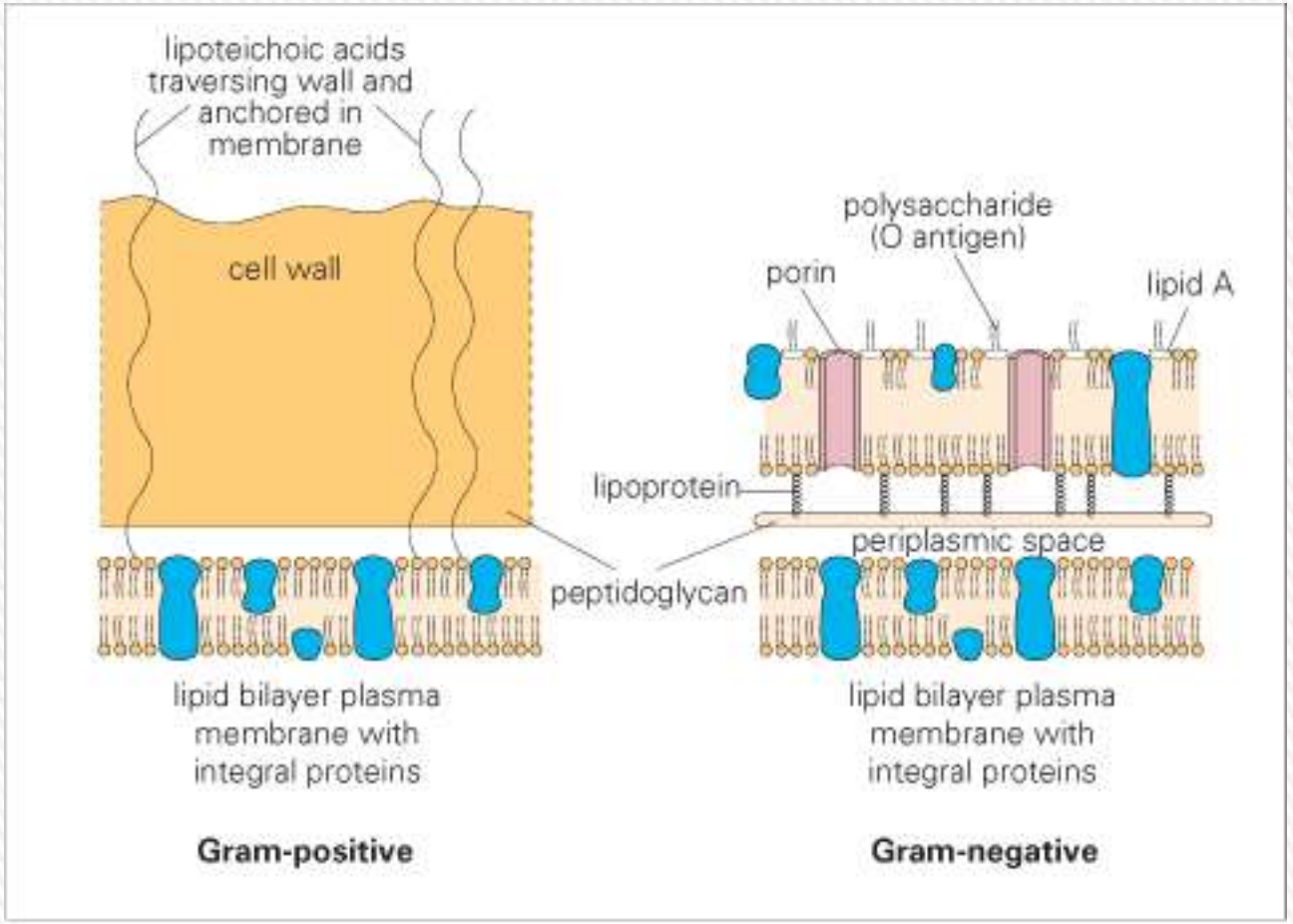

A= Spiral forms
B= Spirillum
C= Spirochete (arrows) mixed with red blood cells
D= Vibrio

# Smear preparation

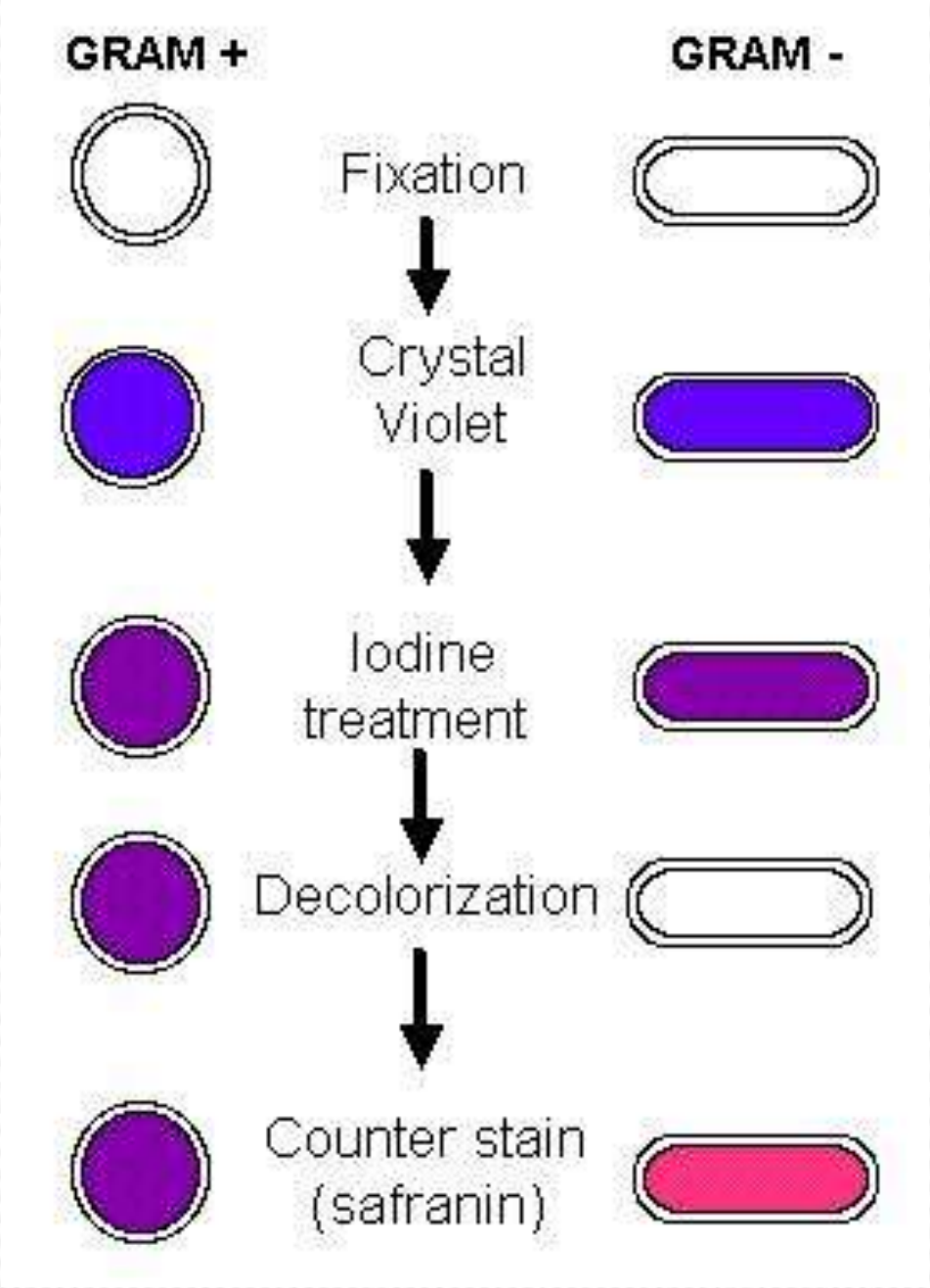



FROM LIQUID MEDIA
FROM SOLID MEDIA
"Target circle" on bottom of slide.
Two loopfuls of water are placed in center of "target circle."
Two loopfuls of liquid containing organisms are placed in the center of the "target circle."
Organisms are dispersed over entire area of the "target circle."
A very small amount of organisms is dispersed with inoculating needle in water over entire area of "target circle."
The smear is allowed to dry at room temperature.
Slide is passed through flame several times to heat-kill and fix organisms to slide. Use of clothespin is optional.

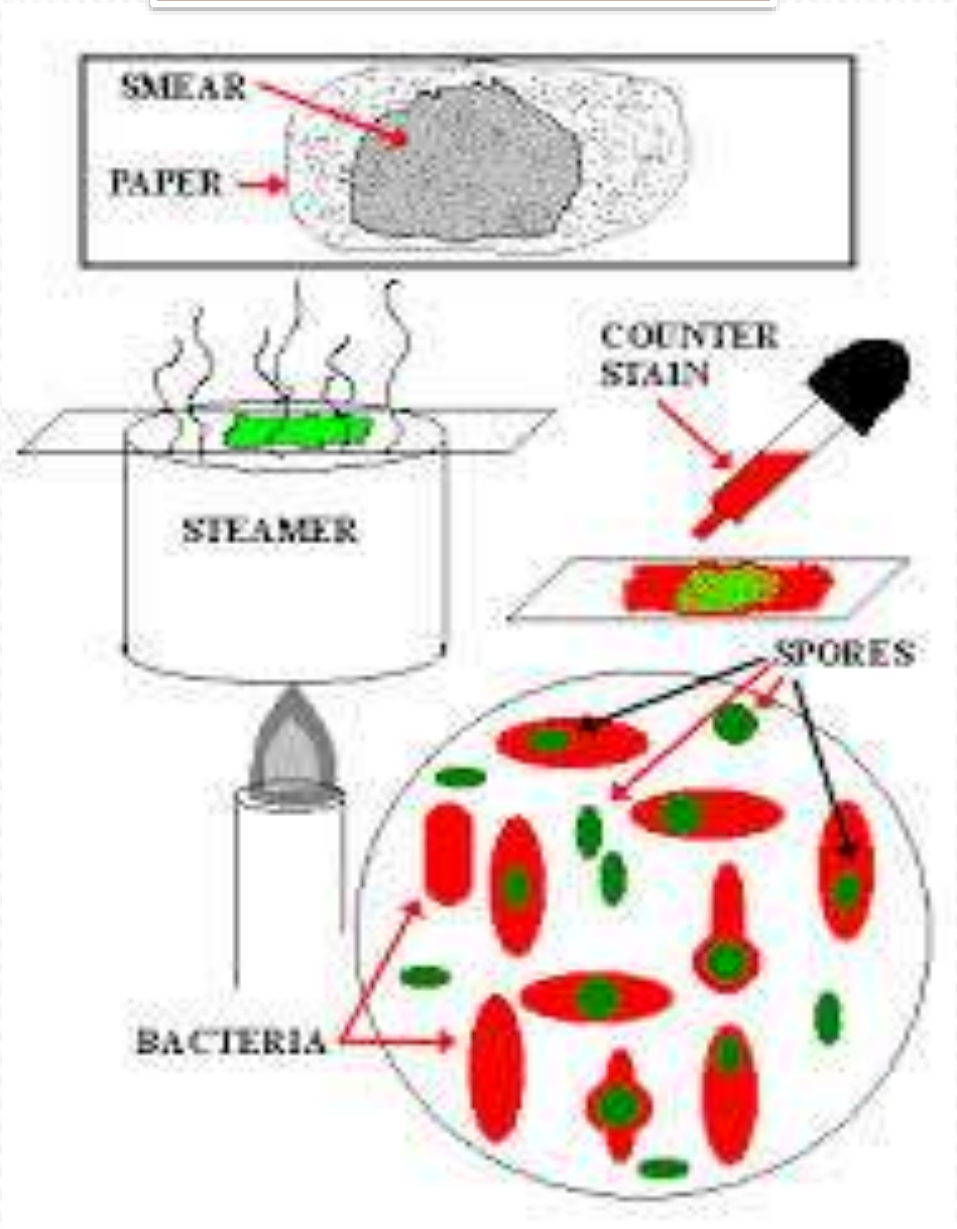
# Gram stain

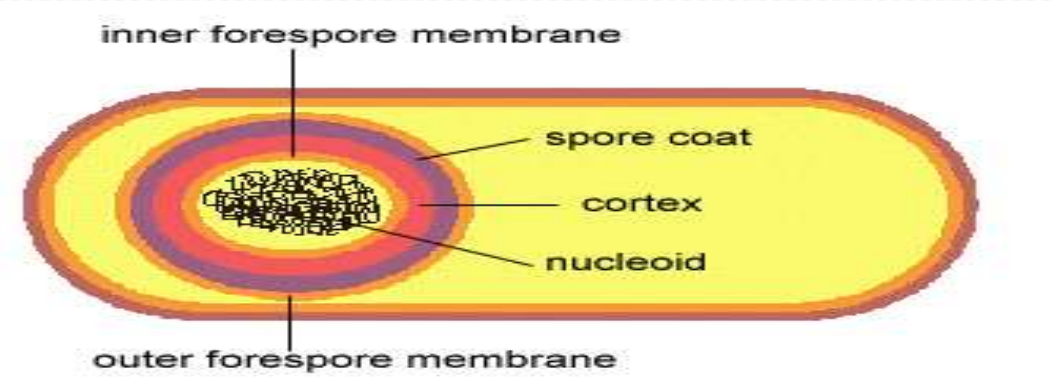



© Elsevier Ltd. Mims et al: Medical Microbiology 3E www.studentconsult.com

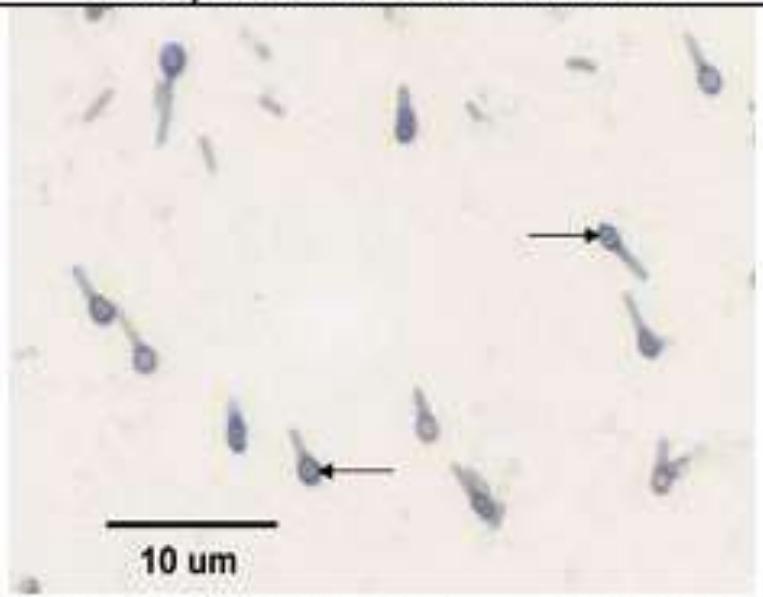

GRAM +
GRAM -
Fixation
Crystal Violet
Iodine treatment
Decolorization
Counter stain (safranin)

# Spore stain



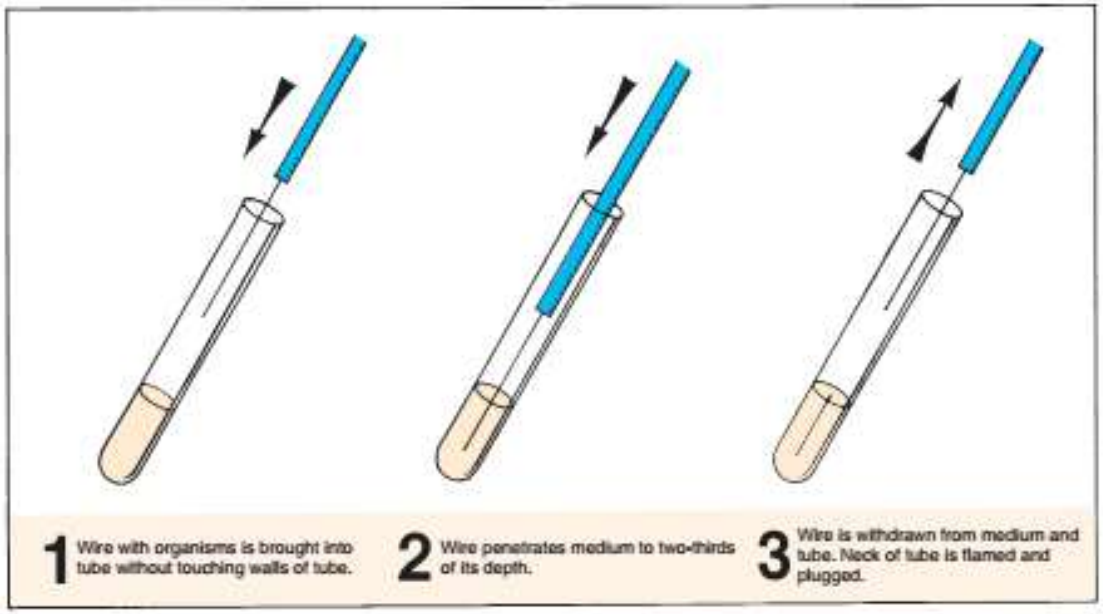


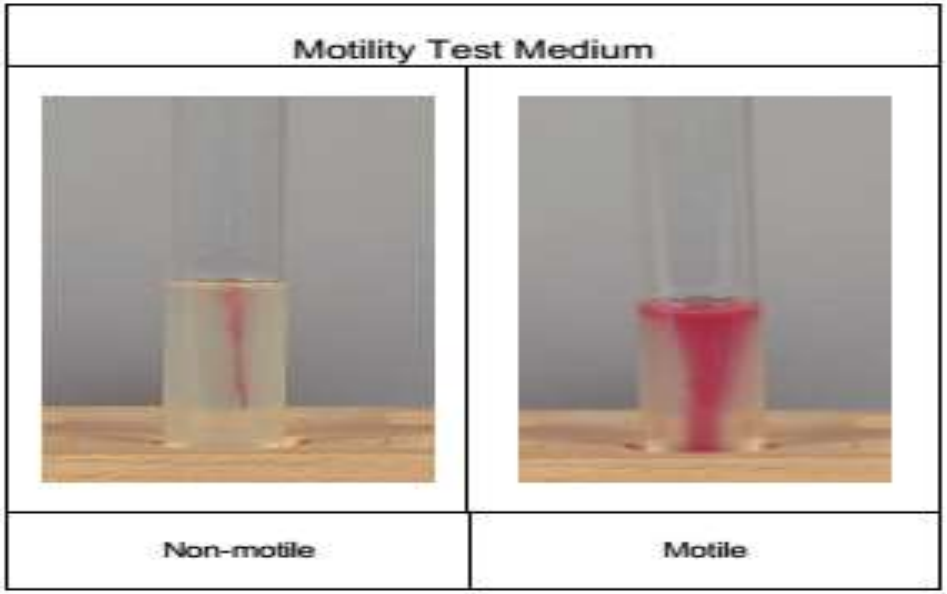

**Endospore stain *of Clostridium tetani***



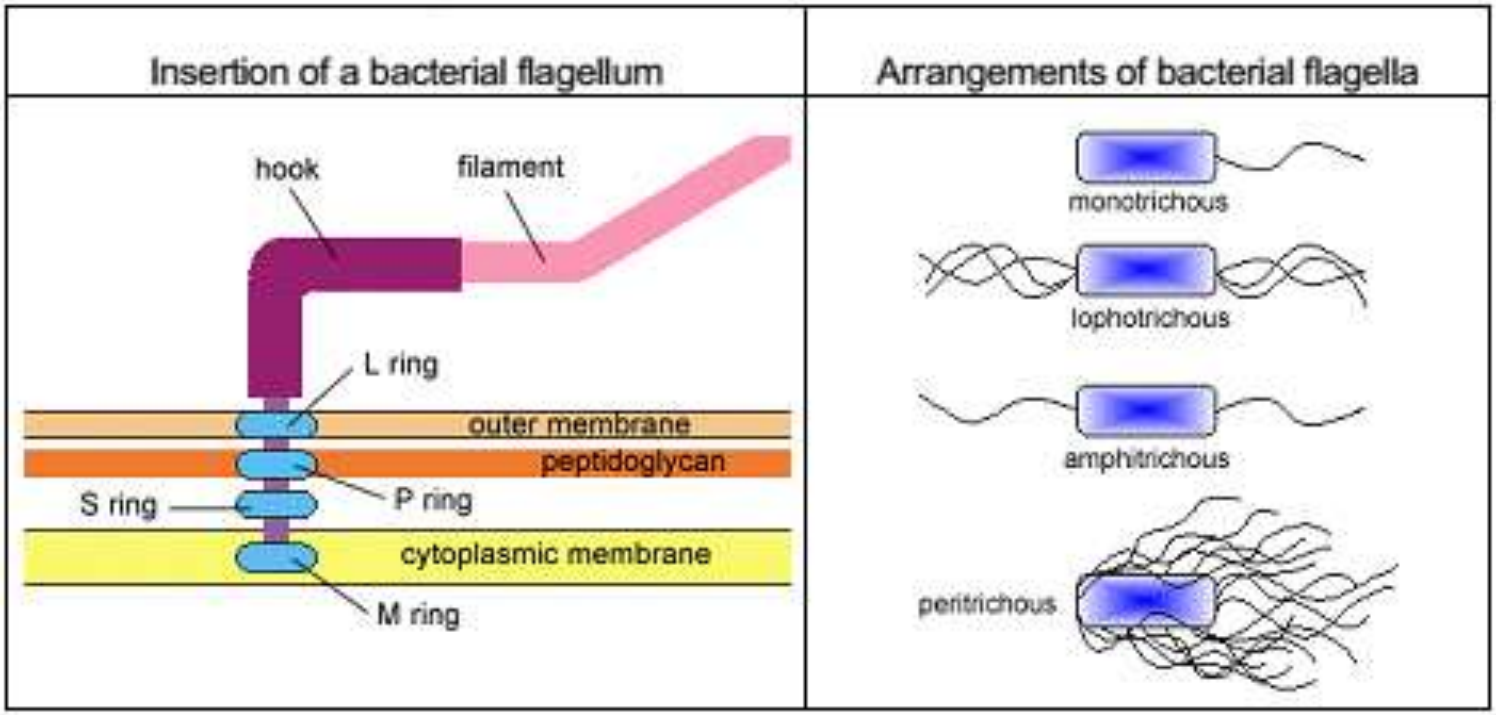

Note the endospore within the rod gives the bacterium a "tennis racquet" shape (arrows).

# Motility test



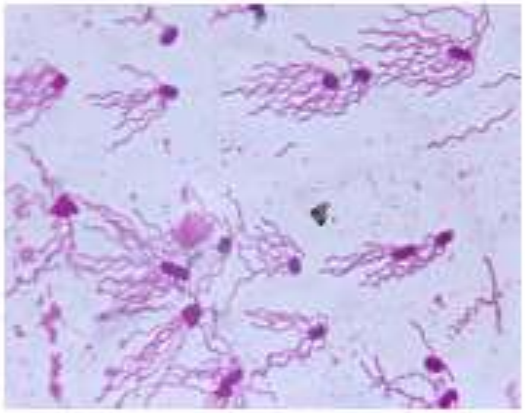
# Flagella stain



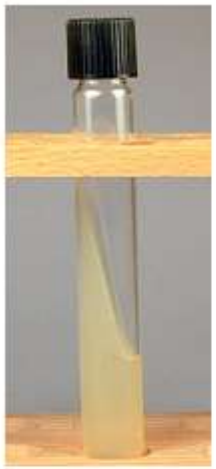
Monotrichous arrangement of flagella

Lophotrichous arrangement of flagella

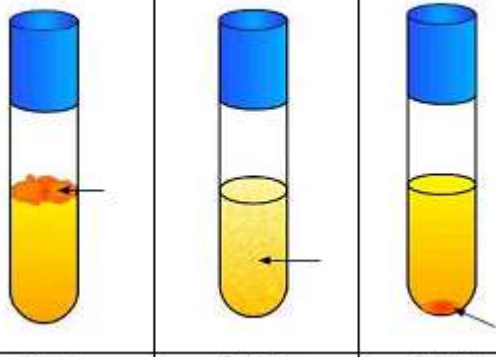
Peritrichous arrangement of flagella



# Growth characteristics

| Slant Tube | Slant Culture |
| --- | --- |
|  | |
| Uninoculated slant tube (side view) | Bacterial Growth on a Slant tube |

Bacterial Growth in Broth Tubes



Pellicle | Turbidity | Sediment

Bacterial Growth in a Stab Tube

# الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تعريف البكتيريا ( الإنزيمات البكتيرية)

# Biochemical activity tests for bacterial identification (Enzymes)

تقوم الكائنات الدقيقة (كالبكتيريا) بافراز انواع عديدة من الانزيمات لتحليل الكثير من المواد المعقدة الكربوهيدراتية والبروتينية والدهنية لتحوله الى جزيئات صغيرة الحجم يمكن امتصاصها

## التحلل المائي للنشا Starch hydrolysis

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على تحليل النشا

**الهدف من التجربة:** التمييز بين الكائنات الدقيقة عن طريق قدرتها على تحليل النشا

- من المعروف إن النشا مادة كربوهيدراتية عبارة عن نوعين من الوحدات:

• **اميلوز** Amylose ( سلاسل مستقيمة من الجلوكوز) **و اميلوبكتين** Amylopectin ( سلاسل متفرعة من الجلوكوز)

- لكي يتمكن الكائن من تحليل النشا لابد من إفراز الإنزيمات:

ά-B amylase ( يكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة إلى وحدات الجلوكوز)

1-6 glucosidase amilo (يكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة الى وحدات الجلوكوز)

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم

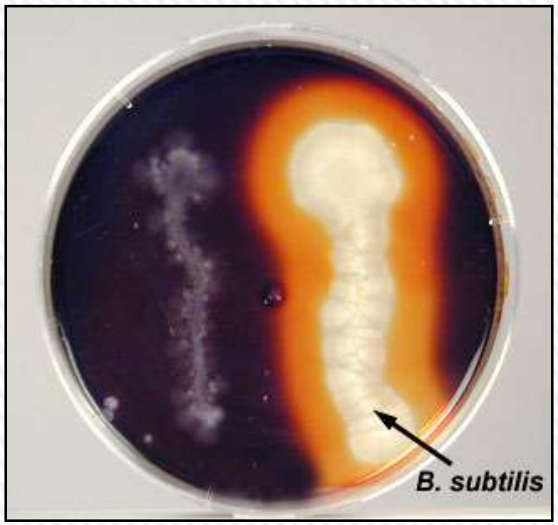
•كل مجموعة لديها 2 طبق بتري يحتوي على بيئة اجار النشا

•يلقح منتصف الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمربواسطة ابرة تلقيح ويترك الطبق الاخر كنترول للمقارنة

•يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24-48ساعة

•يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل النشا باسخدام اليود, حيث يغمر سطح البيئة بكمية مناسبة من اليود. وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا قادرة على تحلل المشا (نشا +يود ← لون أزرق) أي انها تفرز انزيم الأميليز للوسط الخارجي الذي يكسر النشا الى سكريات بسيطة ( الجلوكوز) وبالتالي تظهر المنطقة الشفافة الخالية من النشا

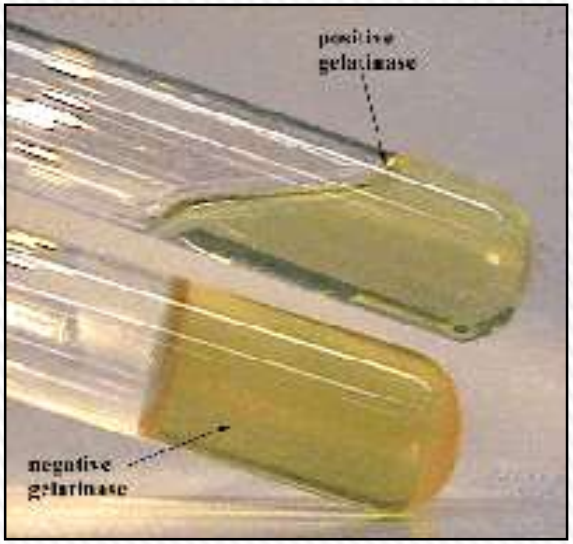
•اذا لم يوجد منطقة عديمة اللون حول النمو يعني ان عدم قدرة البكتيريا على تحليل النشا



# Gelatin Liquefaction اسالة الجيلاتين

**اسم التجربة:** دراسة قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين
**الهدف من التجربة:** التعرف على البكتيريا القادرة على اسالة الجيلاتين
الجيلاتين مادة بروتينية محضر من التحلل المائي للكولاجين
بعض أنواع البكتيريا قادرة على انتاج انزيم خارجي **Gelatinase** الذي يحلل الجيلاتين

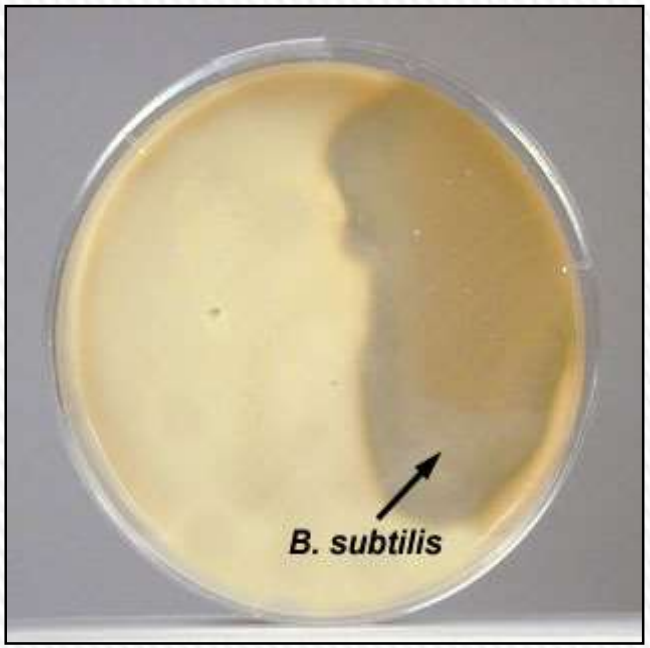
**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على كمية مناسبة من بيئة الجيلاتين المغذي **nutrient gelatin**
تلقح الانبوبة بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بطريقة الوخز( الانبوبة الثانية كنترول)
تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 48-72ساعة
يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين بوضع الانابيب في وعاء يحتوي على ثلج ويترك لمدة 15 دقيقة, ثم تمسك الانبوبة ويتم امالتها, اذا وجدت ان البيئة مازالت متماسكة يعني ان الجيلاتين لم يتحلل بواسطة البكتيريا أما اذا لاحظت اسالة الجيلاتين فهذا يدل على ان البكتيريا افرزت انزيم **Gelatinase** الذي يحلل الجيلاتين



# Casein hydrolysis تحلل الكازين

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على تحليل الكازين
**الهدف من التجربة:** تمييز الانواع البكتيرية المحللة للكازين
الكازين هو البروتين السائد في اللبن ( يعطي اللون الابيض)
الكثير من البكتيريا تفرز الانزيم الخارجي **Caseinase** الذي يحلل الكازين الى مواد ذائبة شفافة

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
كل مجموعة لديها 2 طبق يحوي وسط اجار اللبن
يلقح منتصف الطبق ببكتيريا حديثة العمر بابرة التلقيح ( الطبق الاخر كنترول)
يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24-48 ساعة
تسجل النتيجة بعد التحضين مباشرة, اذا لاحظت وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا حللت الكازين بافراز نزيم الكازينيز, واذا لم يوجد منطقة رائقة حول النمو دليل على عدم قدرة البكتيريا على تحلل الكازين



# تحلل الدهون Lipid hydrolysis

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على تحلل الدهون
**الهدف من التجربة:** التعرف على قدرة الانواع البكتيرية على تحليل الدهن
قدرة البكتيريا على تحليل الدهون راجع الى افراز انزيم **Lipase** الذي يقسم جزيء الدهن الى جزيء جليسرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
1- لديك 2 طبق يحتوي بيئة اجار الدهن, يلقح وسط الطبق بمزرعة حديثة العمر بابرة التلقيح والطبق الثاني كنترول
يحضن الطبق عند 37م لمدة 96 ساعة
يكشف عن قدرة البكتيريا هلى تحلل الدهن باضافة كمية من محلول كبريتات النحاس 10-20% لمدة 10 دقائق, ثم تخلصي من المحلول.
ظهور لون أزرق مخضرعلى النمو دليل على قدرة البكتيلريا على تحليل الزيت بافرازها للانزيم المحلل

# Amino Acids Hydrolysis تحلل الاحماض الامينية

الاحماض الامينية هي ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيريا ان تحلل بعض هذه الاحماض الامينية محولة اياها الى مواد ابسط تركيبا

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على انتاج كبريتوز الايدروجين $H_2S$ Production

**الهدف من التجربة:** توضيح نشاط بعض البكتيريا في تحليل cyctine وانتاج $H_2S$

بعض البكتيريا تنتج غاز كبريتوز الايدروجين عند تحللها للحمض الاميني Cysteine ( حمض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة افرازها لانزيم Cysteine desulforase

تستعمل بيئة كليجلر للكشف عن انتاج $H_2S$ حيث تحتوي على كبريتات الحديدوز الذي يتفاعل مع $H_2S$ مكونا راسب اسود من كبريتيد الحديدوز

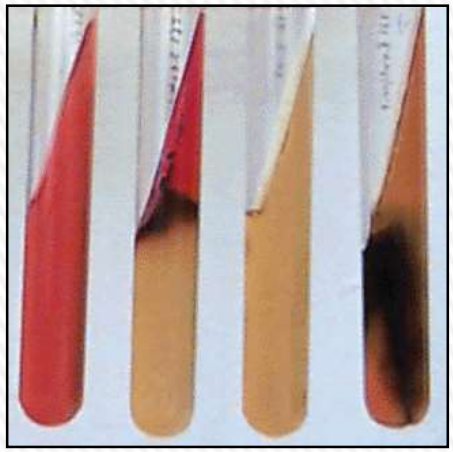
**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم

كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على بيئة كليجلر Kligler

تلقح الانبوبة بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة ( ***Proteus vulgaris*** ) ويحتفظ بالانبوبة الثانية بدون تلقيح

تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 2-7 ايام

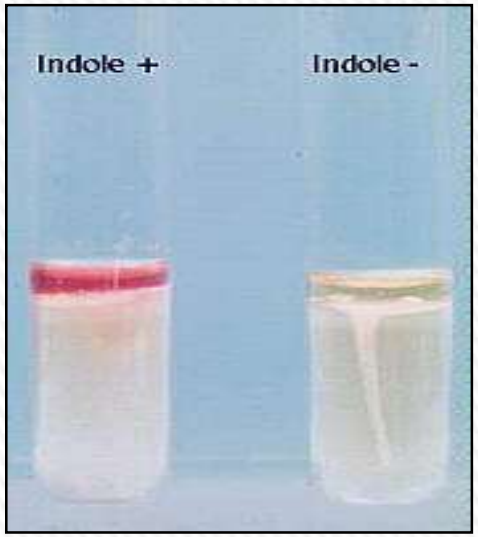
تسجل النتيجة الموجبة على اساس وجود راسب اسود على طول خط الوخزفي حالة تكون غاز $H_2S$, كما يلاحظ تغير لون البيئة الاحمر الى الاصفر نتيجة انخفاض قيمة PH بسبب تكون الاحماض



# تحلل الاحماض الامينية الحلقية ( التربتوفان)

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على انتاج الاندول
**الهدف:** تمييز وتشخيص بكتيريا ***E.coli*** عن بكتيريا القولون المشابهة لها
بعض البكتيريا مثل ***E.coli*** تحلل جزيء التربتوفان الى جزيء الاندول وحمض البيروفيك بواسطة انزيم **Tryptophanase**

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
لديك انبوبتين لبيئة مرق التربتون الغنية بالحمض الاميني التربتوفان
تلقح الانبوبة ببكتيريا حديثة العمر وتترك الانبوبة الاخرى للمقارنة
تحضن الانابيب عند 30م لمدة 48ساعة
يكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الاندول باضافة **0.5** مل من الكاشف كوفاك **Kovack's reagent** ( بارا داي ميثيل امينوبنزالدهيد) للانبوبة, تكون حلقة وردية عند سطح البيئة دليل على ايجابية الاختبار



# Biooxidations الاكسدة البيولوجية

هي تلك التفاعلات الانزيمية المختصة بعمليات التنفس والتخمر

**اسم التجربة:** اختبار انتاج انزيمات الاكسيديز

**الهدف من التجربة:** تشخيص الاجناس المختلفة من البكتيريا السالبة لجرام

الاوكسيديز انزيمات مؤكسدة ضمن سلسلة الانزيمات التنفسية المسؤلة عن تفاعلات الفسفرة التاكسدية البكتيريا التابعة لعائلة ***Enterobacteriaceae*** (سالبة) ومعظم انواع الجنس ***Pseudomonas*** ( موجبة)

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم

يلقح بواسطة التخطيط بيئة اجار الجلوكوز بالبكتيريا ***Pseudomonas aeroginosa***

تحضن عند 30–37م لمدة 24 ساعة

يغمر سطح المزرعة بقليل من محلول الاكسيديز ( 1% داي ميثيل فينيلين داي امين هيدروكلورايد **Dimethyl phenylenediamine hydrochloride**), تظهر المستعمرات الموجبة وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء داكنة ثم سوداء

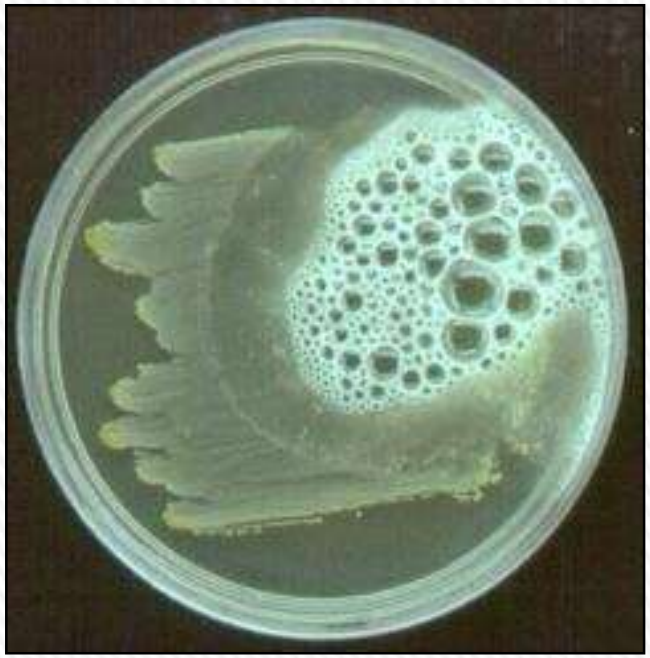
## اسم التجربة: اختبار الكاتاليز Catalase production test

**الهدف:** التعرف على البكتيريا المنتجة للكاتاليز( عادة يستخدم للتفرقة بين المكورات العنقودية والسبحية)
معظم البكتيريا الهوائية اجبارا واختيارية التهوية ( تستعمل O2 ) تنتج $H_2O_2$ ( فوق اكسيد الهيدروجين) واستمرار نموها في وجود هذا الناتج السام يعود لاكتلاكها انزيم الكاتاليز الذي يحلل $H_2O_2$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O2$$

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم

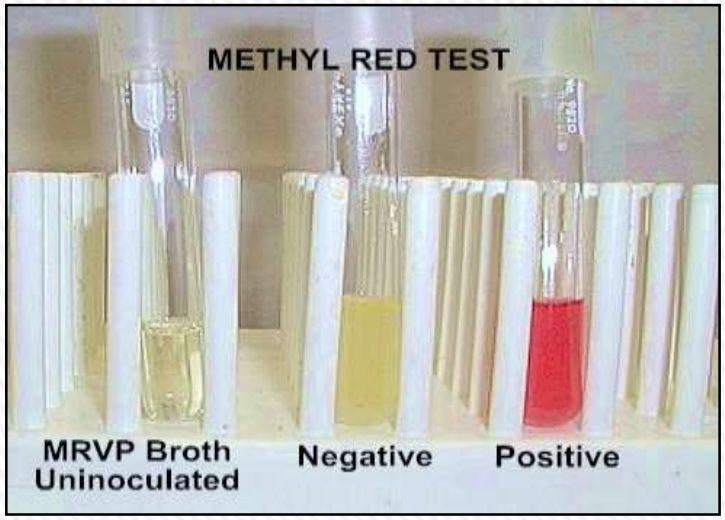
- لديك مزرعة حديثة العمر واخرى قديمة
- يغمر سطح المزرعة بكمية من محلول 3%فوق اكسيد الهيدروجين
- لاحظي تصاعد فقاعات من المزرعة الحديثة نتيجة انطلاق غاز O2 بفعل انزيم الكاتاليز



# التخمر الحمضي المختلط Mixed acid fermentation

**اسم التجربة:** اختبار احمر الميثيل Methyl Red (MR) Test
**الهدف:** التمييز بين البكتيريا على اساس نواتج تخمرها للجلوكوز وانتاج كمية الاحماض بالبيئة
الكثير من البكتيريا السالبة لجرام التي تعيش بامعاء الانسان يمكنها ان تخمر الجلوكوز مكونة كميات كبيرة من احماض اللاكتيك والخليك والسكسينيك والفورميك علاوة على Co2 والكحول والهيدروجين
تكدس هذه الاحماض بالبيئة سيخفض قيمة PH , فاذا اضيف للمزرعة دليل احمر الميثيل سيظهر لون احمر ممايدل على ان الميكروب Mixed acid fermenter

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
تلقح انبوبة محتوية على بيئة فوجس بروسكاور–احمر الميثيل MR-VPmedium بمزرعة حديثة، والانبوبة الاخرى كنترول
يتم التحضين عند 37م لمدة 48 ساعة
نختبر قدرة البكتيريا على انتاج الحمض باضافة عدة نقاط من دليل احمر الميثيل للمزرعة ( لونه احمر بالوسط الحمضي واصفر بالوسط القاعدي), اذا احتفظ الدليل بلونه الأحمر يعني ان الاختبار موجب



## اسم التجربة: اختبار فوكس برسكاور Voges Proskaur (VP) Test

**الهدف:** الكشف عن المركب المتعادل التاثير **Acetyl Methyl Carbinol (a.m.c)** اثناء عملية تخمر الجلوكوز

عند نمو البكتيريا في البيئة تنتج للوسط الخارجي كمية من الاحماض وتراكمها يثبط البكتيريا نتيجة خفض قيمة **PH**، الان هناك بعض انواع البكتيريا تنتج مواد قاعدية وسطية تعادل فعل تلك الاحماض وبالتالي تنمو.

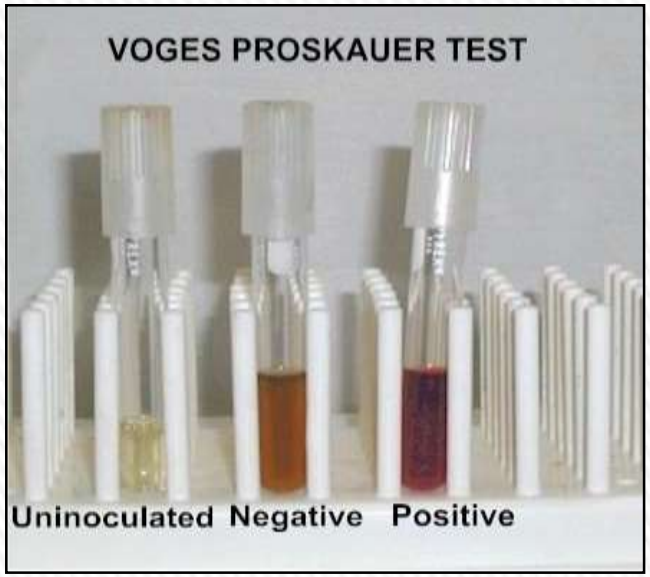
يمكن التحقق من وجود ( **a.m.c**) بواسطة كاشف باريت **Barritt's reagent**

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم

كل مجموعة تلقح انبوبة بها بيئة **MR-VP medium** بمزرعة بكتيرية حديثة

تحضن الانابيب عند 37م لمدة 48 ساعة

يكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج **(a.m.c)** باضافة بضع قطرات من كاشف باريت أ ( يتكون من الفانفثول) ثم مقدار من كاشف باريت ب ( عبارة عن محلول هيدروكسيد البوتاسيوم) , تترك الانابيب لمدة 5-15 دقيقة تكون حلقة حمراء عند سطح البيئة دليل على ان الاختبار موجب



# انزيم الكواجيوليز Coagulase Enzyme

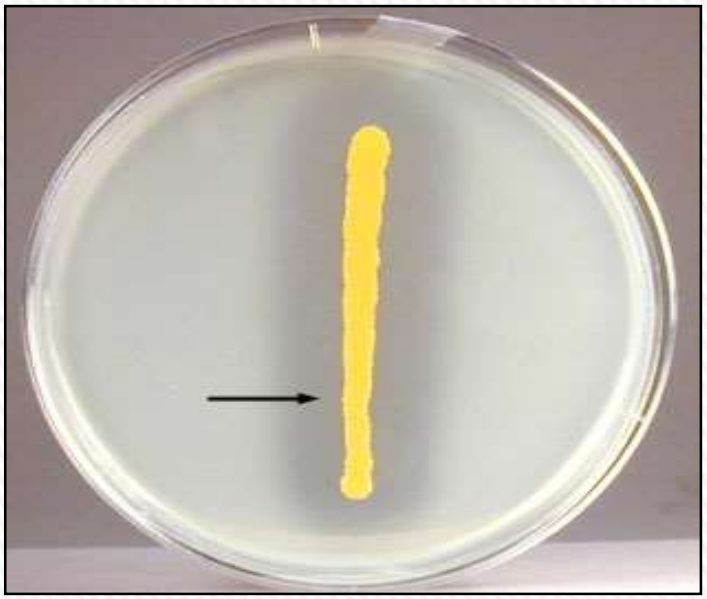
**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكواجيوليز
**الهدف من التجربة:** التمييز بين المكورات العنقودية الممرضة Pathogenic والغير ممرضة Non pathogenic
يؤدي هذا الانزيم الى تخثر Coagulation بلازما الدم حيث يحول مادة الفيبرينوجين Fibrinogen الموجودة في البلازما الى فيبرين Fibrin

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
ينقل 0.5 مل من البلازما الى انبوبة اختبار معقمة
يضاف كمية من المزرعة البكتيري الحديثة
تحضن عند 37م لمدة24 ساعة مع مراعة فحص الانبوبة كل نصف ساعة حتى تظهر علامات التخثر.

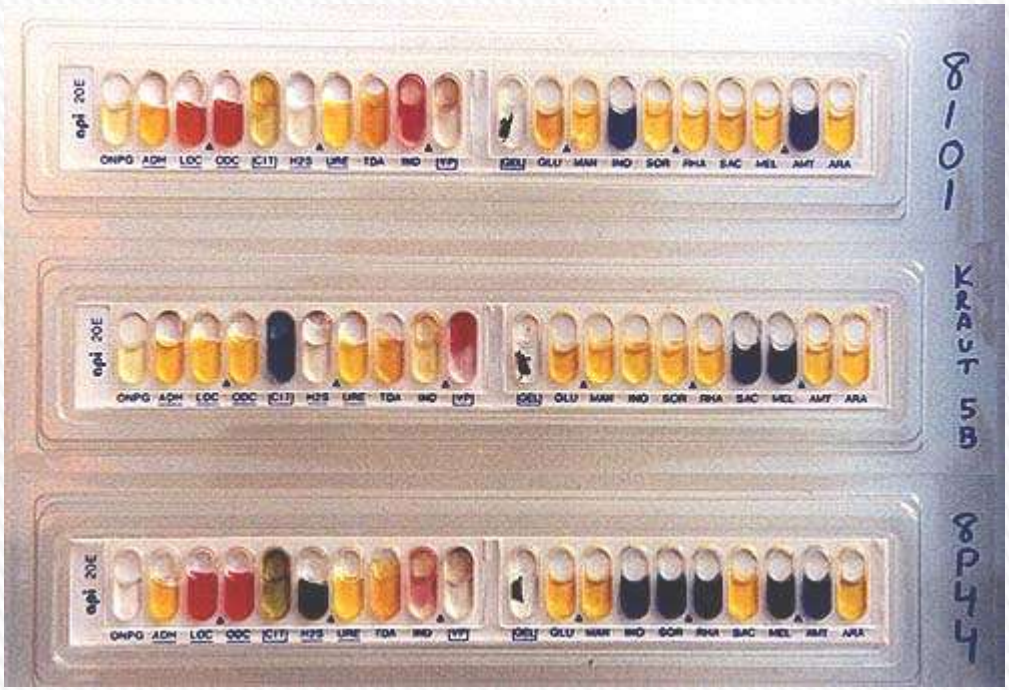
## (DNase) Reoxyribonuclease Test انزيم تحلل الحمض النووي

**اسم التجربة:** اختبار قدرة البكتيريا على افراز انزيم DNase
**الهدف:** التعرف على البكتيريا التي تفرز انزيم DNase

**طريقة العمل:** تحت ظروف التعقيم
لديك طبق بتري يحتوي على بيئة الاجار المغذي المضاف اليها الDNA
يلقح الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمرويحضن عند 37م لمدة 24ساعة
يكشف عن تحلل الDNA باضافة (1N HCL) , تكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على ان البكتيريا انتجت انزيم DNase للوسط الخارجي وحللت مادة DNA في البيئة.

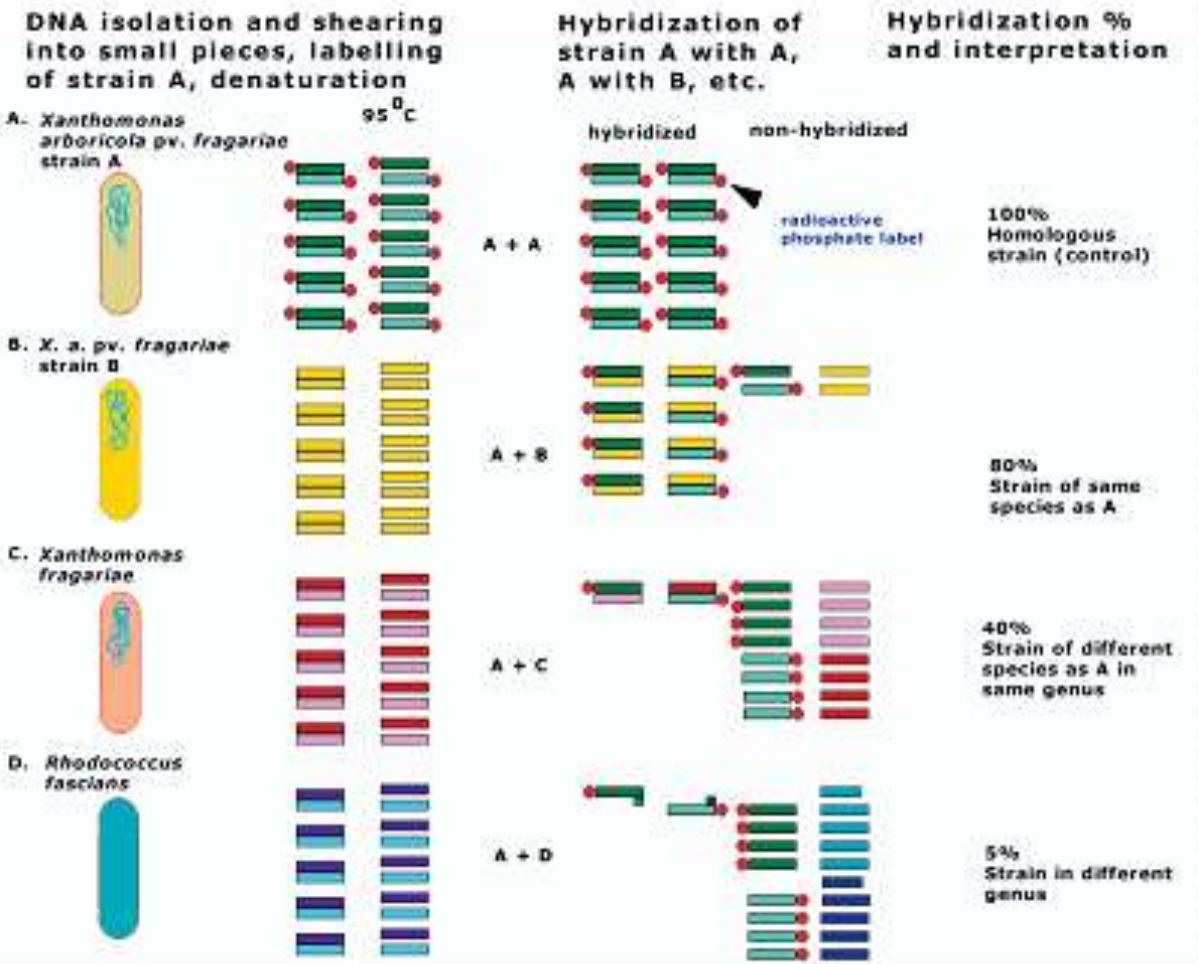


Biolog Systems

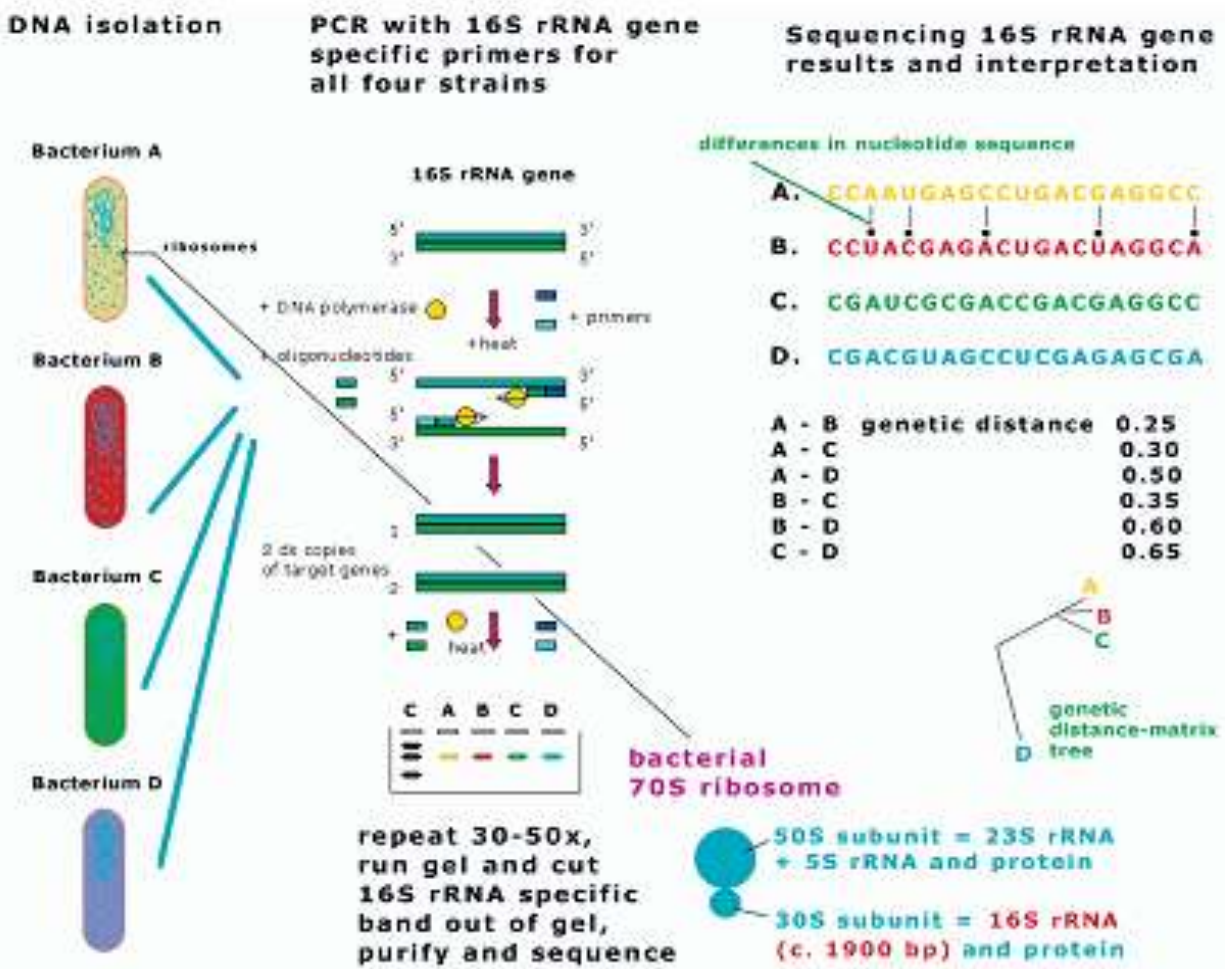


# The API-20E® Enteric Identification System

# THE USE OF DNA:DNA HYBRIDIZATION IN BACTERIAL TAXONOMY



# THE USE OF 16S r(ibosomal)RNA SEQUENCING IN BACTERIAL TAXONOMY



Thanks!
CHERRYBAH.COM