مختصر لطرق التعرف على البكتيريا الممرضة للنبات إعتماداً على سلوكها الفسيولوجى فى البيئة الغذائية

إعداد

د./ محمد عبد الرحمن الوكيل

أستاذ أمراض النبات

عضو اللجنة التنفيذية لشبكة المعلومات العلمية الأسيوية

عضو الجمعية الدولية للمترجمين واللغويين العرب

World Association of Arab Translators &Linguists

رئيس تحرير دورية أمراض النبات الدولية

Editor in Chief - Plant Pathology Journal

رئيس تحرير دورية العلوم البيئية والتكنولوجية

Editor in Chief - Journal of Environmental Science and Technology

Web: http://osp.mans.edu.eg/wakil

E-mail: mawakil@mans.edu.eg

نوفمبر 2011

عن Sands, DC.

Klement *et al.*, 1990

1- Voges-Proskauer (VP) and Methyl Red (MR) Tests:

تستخدم هذه الإختبارات للتفرقة بين أجناس العائلة Enterobacteriaceae **والتى من صفاتها إنتاج حامض نتيجة تحليلها للجلوكوز وبين التى تنتج بالإضافة للحامض مركبات طبيعية منها** Acetylmethylcarbinol and 2, 3 butanediol **فالإختبار** VP **يكشف عن وجود المركبات الطبيعية أما** MR **فيكشف عن إنتاج أحماض ذات** pH **أقل من** 4.2.

أمثلة:

- **تعطى البكتيرة** *Erwinia amylovora* **تفاعل بنفسجى مع** VP ⟵ VP(+) **بينما تعطى البكتيريات من النوع** *Pseudomonas* **تفاعل سالب** VP(-).
- **إختبار** MR **يتكون تفاعل ذو لون أحمر عندما ينخفض درجة** pH **لأقل من** 4.2 **ومعظم أجناس** *Erwinia* **أما** VP(+) **أو** MR(-).

2- Aminopeptidase activity:

ويصلح هذا الإختبار لكل أجناس البكتيريا الممرضة للنبات حيث أن معظم البكتيريا السالبة لجرام الممرضة تظهر نشاط واضح لإنزيم Alanine-aminopeptidase **إذا ما تم تغطية مستعمراتها بدليل محتوى على مادة** L-alanine α-nitroalnalide hydrochloride **وتظهر نتيجة الأختبار فى خلال خمس دقائق حيث يتكون فى صورة لون أصفر حول المستعمرات البكتيرية فى حالة البكتيريا الموجبة للإختبار يظهر بوضوح عند تعريض المزرعة فى الإطباق فى عكس إتجاه الضوء.**

3- Arginine dihydrolase- *Pseudomonas*:

يستخدم هذا الإختبار فى التعرف على البكتيريا جنس *Pseudomonas* **عن طريق مدى نشاط إنزيمين يقومان بتخليق** ATP **عن طريق تحويل** Arginine **إلى** Ornithine **مع إنتاج** CO_2 ، NH_3 **وذلك بالكشف عن الأمونيا الناتجة من التفاعل.**

وبهذا الكشف يتم التفرقة بين كل من البكتيرة *Pseudomonas fluorescens* **التى تنتشر بكثرة فى التربة وأنسجة النبات الميتة فى صورة مترممة حيث يتحول لون البيئة إلى الأحمر فى وجود كشاف وهذا دليل على أن البكتيرة موجبة لجرام** +G **بعكس البكتيرة** *P. syringae* **السالبة حيث لا يتغير اللون.**

4- Carbon Source Utilization:

يصلح هذا الإختبار مع كل الأجناس البكتيرية المسببة لأمراض النبات ويتم ذلك بطريقتين:

1- **إنتاج حامض من تحليل الكربوهيدرات.**

2- **إستهلاك الكربون دون إنتاج أحماض.**

5- Catalase activity:

يصلح لكل أنواع البكتيريا الممرضة للنبات ويعمل إنزيم الكتاليز على تكسير H_2O_2 ⟵ $H_2O + O_2$

ومعظم البكتيريا الممرضة للنبات موجبة لهذا الإختبار ولذلك فلا يعتبر هذا الإختبار من الإختبارات المفيدة فى الكشف عن البكتيريا الممرضة للنبات لعدم تخصصه.

6- Crystal violet pectat medium:

ويستخدم هذا الإختبار فى الكشف عن أجناس البكتيريا المحللة للبكتين *Erwinia* and *Pseudomonas* **وقد إستطاع** Cupples and Kelman **من إبتكار بيئة للكشف عن البكتيريا المحللة للبكتين من أجناس** *Pseudomonas* and *Erwinia* **باستخدام ملح** Sodium polypectate **حيث يسبب وجوده فى البيئة الصلبة إلى تكون حفر غائرة بها البيئة فى بعض الأنواع بينما يكون البعض الأخر حفر ضحلة وكلاهما ناشئ من تحلل البكتين.**

7- Egg yolk agar for detecting lecithinase:

يحتوى صفار البيض على كميات كبيرة من الفوسفوليبيدات وإنزيمات Lecithinase and Phospholipase **وفى هذه الطريقة يستخدم بيض طازج يعقم خارجياً بعد غسله بالماء الجارى وذلك بغمسه فى كحول 70% لمدة (5-10 دقائق) ثم يلهب البيض من أجل تجفيفة خارجياً – يتم تكسير البيض ويفصل الصفار تحت ظروف معقمة ويخفف بنسبة 1.5 مرة بواسطة ماء معقم ثم يؤخذ من المعلق 100 ملل ليضاف إلى 900 ملل NA منصهر وعلى درجة حرارة 55°م وتصب البيئة فى أطباق معقمة ثم تلقح بالبكتيريا بالتخطيط.**

والنتيجة الموجبة له تكون فى صورة مخروط عكر مكون من الأحماض الدهنية الحرة حول المستعمرات وذلك بعد التحضين لمدة 7 أيام على درجة حرارة 28°م حيث تقوم البكتيريا بإنتاج إنزيم Lecithinase.

ويستخدم هذا الإختبار فى التعرف على البكتيرة *Erwinia chrysanthemi* **حيث تعطى نتيجة موجبة بينما يكون الإختبار سالب مع البكتيرة** *E. carotovora* var. *carotovora*.

8- Erythromycin Sensitivity - *Erwinia*

تظهر نتيجة هذا الإختبار بعد 24 – 48 ساعة من التحضين على درجة 28°م حيث نجد أن كل من البكتيريا *E. carotovora* var. *atroseptica* **و** *E. carotovora* var. *carotovora* **مقاومتين لهذا المضاد الحيوى بينما البكتيرة** *Erwinia chrysanthemi* **تكون حساسة له.**

9- Esculin hydrolysis - *Xanthomonas*

الـ Esculin **عبارة عن** Glucoside **تنتجه البكتيرة** *X. campestris pathovas* **ويتركب كيماوياً من** Glucose and dihydrocoumarin **وهو مركب داكن اللون يستخدم فى هذا الإختبار بعد خلطه فى البيئة مع الخميرة وبعض الأملاح المعدنية حيث يحدث التفاعل فى مدة طويلة تصل إلى 28 يوم فى المزارع السائلة المحضنة فى** Shaker incubator.

ويفرق هذا التفاعل بين معظم أنواع البكتيريا من الجنس *Xanthomonas* **حيث تعطى نتيجة موجبة فى صورة تحلل كامل للبيئة بينما لا يحدث تحلل (نتيجة سالبة) مع بعض الأنواع الأخرى مثل** *X. ampelina* **المسببة للفحة البكتيرية فى العنب والثانية المسببة للتبقع الزاوى فى الفراولة** *X. fragariae*.

10- Estrase Activity (Tween hydrolysis)

يستخدم هذا الإختبار فى الكشف عن البكتيريا من الأجناس *Xanthomonas – Pseudomonas – Erwinia* **ويعتمد الطريقة على نشاط إنزيم** Fatty acid estrase **الذى يمكن مشاهدة نشاطه عن طريق تخطيط البكتيريا على بيئة أجار مغذى** NA **تحتوى على أملاح كلوريد الكالسيوم +** Polymar + Tween 80 **محتوى على المركب** Polyxyenthylensorbitanmonooleate **ويظهر الإختبار موجب عندما يتحلل** Oleic acid **من** Tween 80 **والكالسيوم فى البيئة مكونا مركب غير ذائب بإتحاده مع الأحماض الدهنية ليعطى هالة معتمة مكونة من بللورات متجانسة حول المستعمرات الموجبة.**