



BİTKİ BAKTERİ HASTALIKLARI UYGULAMA NOTLARI

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU - Dr. Ümit ÖZYILMAZ

**AYDIN
2011**

BAKTERİYOLOJİ LABORATUVARI

Çalışma Kuralları

Bitkilerde hastalık oluşturan bakterilerden birkaçı hariç, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmazlar. Ancak, insanları konukçu olarak seçen çok sayıda bakteri türü laboratuvarında çalıştığımız besi yerlerinde gelişebilmektedir. Ayrıca yine laboratuvarında bulunan bazı cihaz ve kimyasalların da insan sağlığı açısından olumsuz etkilerinin olduğu akıldan çıkarılmamalıdır. Bu nedenle bakteriyoloji laboratuvarında çalışma anında bazı kurallara uyma zorunluluğu vardır.

Bu kurallardan bazılarını aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz;

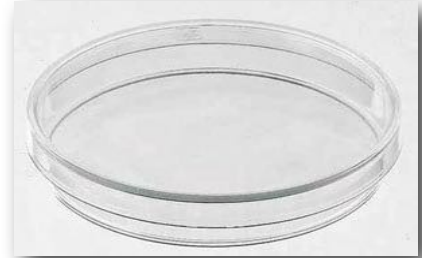
- * Laboratuvara yalnızca gerekli malzeme alınmalı palto, çanta vb. eşyalar dışarıda bırakılmalıdır.
- * Kesinlikle birşey yenip içilmemelidir.
- * Çalışmalarında dizleri örtecek uzunlukta bir laboratuvar gömleği giyilmelidir.
- * Çalışmaya başlamadan önce ve çalıştıktan sonra ellerin iyice sabunlu suyla yıkanmalıdır.
- * Göze veya cilde temas eden kimyasallar bol su ile yıkanmalı ve laboratuvar sorumlusuna haber verilmelidir.
- * Hiçbir kimyasal madde koklanmamalıdır.
- * Üzerinde çalışılacak mikroorganizmaların el, yüz, ağız gibi organlara bulaşmasını önlemek gerekmektedir.
- * İşi biten kültürler ve kullanılan tüm malzemeler yıkama bölümlerine konmalı, cam malzemeler dezenfektan bir solüsyon içerisine konmalıdır.
- * İzolasyon yapılan, aşılanan petri, tüp ve diğer kaplar üzerine;
 - ▶ Tarih
 - ▶ Numara, kod
 - ▶ İşlemi yapanın ismi (gerekiyorsa)silinmeyen cam kalemleri ile yazılmalı veya etiketlenmelidir.
- * Laboratuvarında kullanılan kimyasal madde ve malzemeler kesinlikle laboratuvar dışına çıkarılmamalıdır.
- * Laboratuvarında kullanılan aletlerin temiz tutulmasına, kullanılan kimyasal maddelerin pahalı oluşu nedeniyle ekonomik davranmaya özen gösterilmelidir.
- * Herhangi bir kaza, arıza ve şüpheli bir durumda hemen laboratuvar sorumlusuna haber verilmelidir.

Standart Bir Bakteriyoloji Laboratuvarında Bulunan Malzemeler ve Ekipmanlar

Cam ve Plastik Malzemeler:

Petri kabı (*Petri dishes*)

İçlerine dökülen besi yerlerinde mikroorganizmaların geliştirildiği camdan veya plastikten yapılmış yassı kaplardır. Plastik olanlar steril olarak 25'li paketler içinde ambalajlanmış olarak satılmaktadır. İşgücünün pahalı olduğu ülkelerde steril-plastik petriler kullanılmaktadır. Camdan yapılanlar ise, her kullanımdan sonra temizlenerek, tekrar sterilize edilir ve kullanılır. Genelde, cam bir petri 100 kez kullanılabilir. Petri çapları: 6 - 8 - 10 - 12 cm dir.



Porselen veya Cam Havanlar (*Mortar-pestle*)

Porselen veya camdan olabilir. izolasyon ve diğer işlemlerde bitki materyali ve diğer maddeleri ezmek için kullanılır. Değişik büyüklükte olanları vardır.

Lam, Lamel, Çukur Lam ve Saat Camları (*Microscope Slide*)

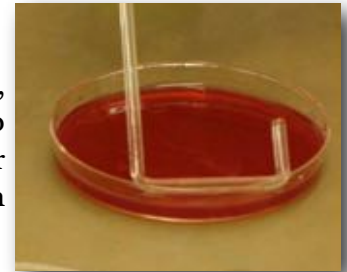
Tüm bu malzemeler camdan yapılmıştır. Otoklavda ve etüvde sterilize edilebilir. Birçok kez kullanılabilir.



Cam Bagetler, Cam Çubuklar

(*L shaped glass plate spreaders, glass rods*)

Cam bagetler (Drigalski Spatula) olarak da isimlendirilir. Petrilerde, katı besi yüzeyine ekilen bakterileri yaymak için kullanılır. Yıkayıp sterilize edilmek şartıyla pek çok kez kullanılabilir. Cam çubuklar ise, daha çok kimyasal maddeleri sıvı ortam içinde eritmek için karıştırıcı olarak kullanılır.



Balon ve Erlenmayer*(Erlenmeyer-flasks, boiling-flasks)*

Camdan yapılmıştır. Genelde besi yerlerinin yapılmasında kullanılır. Hacimleri; 50 - 100 - 300 - 500 - 1000 ve 2000 ml dir.

**Beherler (beakers)**

Plastik veya camdan yapılmıştır. Sterilize edilecekler genelde camdan olur. Ölçüleri; 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 ve 2000 ml dir.

**Mezür (graduated-cylinders)**

Sıvıların miktarlarını ölçmek için kullanılır. Cam veya plastik olabilir. Ancak, sterilize edileceklerin cam olması gereklidir. Ölçüleri; 25 - 50 - 100 - 250 - 500 ve 1000 ml dir.

Pipet (pipette)

Hacimleri 0.1 ml ile 50 ml arasında olan sıvıların ölçülmesinden kullanılır ve camdan yapılmıştır. Ayrıca, çok küçük hacimlerde maddeyi aktarmak için, mikropipetler de kullanılır.

**Test Tüpü (Test Tube)**

Test tüpleri genelde camdan yapılmaktadır. Boyları ve çapları değişik tiptedir. Genelde boyları 70 - 200 mm çapları ise, 8 - 25 mm arasında değişmektedir. Laboratuvarlarda genelde 160 x 16 mm boyutunda olan tüpler kullanılmaktadır.

Test tüplerinin ağzını kapatmak için pamuk, metal kapak yada bagalit kapak kullanılır.

Durham Tüp (Durham tube)

25-30 x 5-6 mm boyutlarında ve camdan yapılmıştır. Özellikle bakterilerin gaz oluşturmaları testinde yararlanır.

Pastör Pipet (Pasteur pipette)

Camdan yapılmış olup, 2/3 lük bölümü daha incedir. Sıvı maddelerin alınmasında ve özellikle süspansiyon halindeki bakteri kültüründen yapılacak aşılmalarda yararlanır.



Diğer Malzemeler:

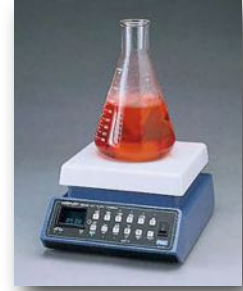
Öze ve Çubuk İğne (*Inoculating Loop and Needles*)

İnokulasyonda kullanılır. Çabuk ısınan ve soğuyan bir metalden olması gerekmektedir. En uygunu platinden olmasıdır. Platin oluşu, oksitlenme sorununu da çözer. Ancak çok pahalıdır, her zaman kullanılamaz. Bu durumda yukarıdaki şartları taşıyan bir metalden olmalıdır. Uç kısmı yuvarlak olanlarda, çap 4 mm. olmalıdır. Değişik çapta olanlar vardır. Çubuk iğne de uç kısmı düzdür. Aynı şekilde yapılır.



Magnetik Karıştırıcı (*Magnetic stirrer*)

Sıvı maddelerin karıştırılmasında kullanılır. Sıvı içine atılan ve balık adı verilen manyetik bir parçanın cihaz tarafından döndürülmesi ile çalışır. Bu cihazın ısıtıcılığı olanları da vardır.



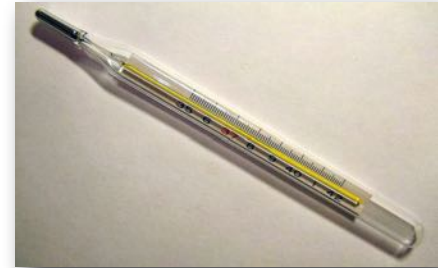
Pens, Bistürü, iğne

(*Forceps, Scalpel, needle*)

Bu malzemeler, genelde paslanmaz çelikten yapılmıştır. Gerekmedikçe uzun süre alevde tutulmamalıdır. Aksi halde oldukça pahalı olan bu malzemeler kullanılmaz hale gelebilir. Sterilizasyon veya yüzeysel dezenfeksiyonu, alkol veya başka bir madde ile yapılmalıdır.

Termometre (*Thermometer*)

Çalışılan sıvıların ve ortamların sıcaklıklarının ölçümünde kullanılır.



Şırınga (*Syringe*)

Şırıngalar; özellikle inokulasyon çalışmalarında kullanılır. Cam ve plastik olabilir. Cam olanlar sterilize edilerek birçok kez kullanılabilir.

Ekipmanlar

Bunzen (*Bunsen burner*)

Havagazı veya bütangazla çalışabilir. Öze ve diğer malzemelerin sterilizasyonu veya yüzeysel dezenfeksiyonu için kullanılır.

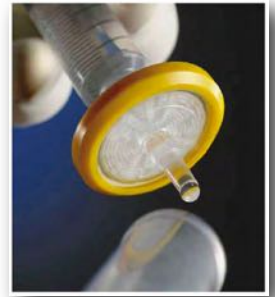


Karıştırıcı (*Vortex*)

Tüplerdeki sıvı maddeleri karıştırmak için kullanılır. Titreşim yapan cihazın başlığına tüpün değdirilmesi ile çalışır.

Bakteri Filtresi (*Syringe filter*)

Bozulmaları nedeniyle otoklavda sterilize edilemeyen bazı maddelerin sterilizasyonu için kullanılır. Bunlar iki tiptir; Birincisi şırınga şeklinde olup elle çalıştırılır. Diğeri ise vakumla çalışır. Vakum, hava pompası ya da su trompu ile elde edilebilir.



Koloni Sayma Aleti (*Colony counter*)

Petrilerde oluşan bakteri kolonilerini saymak için kullanılır.

Buzdolabı (*Refrigerator, freezer*)

Bakteriyoloji laboratuvarında izole edilen kültürlerin saklanması genelde +4 °C gibi düşük sıcaklıkta olmaktadır. Ayrıca, bazı kimyasal maddeler, besiyerleri, bitki örnekleri ve diğer malzemeler buzdolabında saklanır.

Eğer olanak varsa değişik sıcaklıklara ayarlı küçük soğuk hava depoları yapmak ekonomik ve uygundur. Çok fazla malzemeyi saklamak mümkün olur.

Derin dondurucu (*Deep-freezer*)

Koleksiyon kültürleri, serum, antibiyotik gibi bazı maddelerin çok düşük sıcaklıkta saklanması gerekmektedir. Bunlar için, -18°C'de çalışan derin dondurucular kullanılır.

Yıkama Makinesi (*Lab washer*)

Kullanılan cam ve diğer malzemelerin yıkanması için kullanılır. Pipet'lerin yıkanmasında ayrı bir aletten yararlanır.

Damıtık Su Cihazı (*Water Distiller*)

Bakteriyoloji laboratuvarında kullanılan suların damıtık olması gereklidir. Bu cihaz yardımıyla musluk suyu damıtılır.

**Etüv** (*Sterilisers oven*)

Bakteriyoloji laboratuvarında en çok kullanılan aletlerdendir. Cam ve ısıya dayanıklı diğer malzemelerin sterilizasyonunda, bazı malzemelerin kurutulmasında yararlanılır. Genelde; 100 - 300°C arasında çalışırlar. Bakteriyolojide, 120 - 180°C arasında yararlanılır.

Liyofilize Cihazı (*Lyophilizer*)

Bakterilerin uzun süre saklanması için liyofilize cihazlarından yararlanılır. Ancak çok pahalı olduklarından her laboratuvarında bulundurma olanağı yoktur.

**Hassas Teraziler** (*Analytical balance*)

Bakteriyolojide kullandığımız bazı maddelerden oldukça az miktarlarda yararlanılır. Bu nedenle laboratuvarında çok hassas ve normal olmak üzere iki tip teraziye gerek vardır.

Spektrofotometre (*Spectrophotometer*)

Bakteri süspansiyonlarında, türbidimetrik olarak yoğunluk ölçmek için spektrofotometreden yararlanılır.

Sprey (*Sprayer*)

Bakterilerin bitkiye inokulasyonunda yada ortamın dezenfeksiyonu için spreylere yararlanılır. Cam ve plastikten olanları vardır. Cam olanların sterilize edilme şansı olduğundan inokulasyonda tercih edilir. Spreylerle püskürtme elle mekanik olduğu gibi bir ucu hava pompasına bağlanarak da yapılabilir.

Vakum Pompası (*Vacuum pump*)

Laboratuvarında filtrasyon, püskürtme ve diğer işlerde basınç pompasından yararlanılır.

Parçalayıcı ve Öğütücü (*Blender*)

Hastalıklı tohum veya diğer bitki kısımlarından yapılan izolasyonlarda materyalin parçalanmasında yada diğer bazı parçalama işlemlerinde kullanılır.



Santrifüj (Centrifuge)

Bakteriyoloji laboratuvarında özellikle serolojik ve moleküler çalışmalarda ve diğer işlemlerde santrifüjlerden yararlanılır. Çoğunlukla dakikada devir sayısı 6000-10000 olanlar kullanılmaktadır. Bu cihazda kullanılan tüpler 1.5 - 50ml hacminindedir.

**İnkübatör (Incubator)**

Bakteriyoloji laboratuvarında en çok kullanılan aletlerdendir. Bu aletler mikroorganizmaların gelişmesi için gereken optimum sıcaklığı sağlarlar. 15 - 50°C arası çalışanlar. Sıcak bölgeler için soğutmalı olanlar kullanılmalıdır.

**Su Banyosu (Waterbath)**

Besin maddelerinin eritilmesinde, eritilen besin maddelerinin belirli bir sıcaklıkta tutulmasında su banyolarından yararlanılır. 20 - 100°C arası çalışanlar yeterlidir.

Otoklav (Autoclave)

Özellikle besi yerlerinin ve sıvıların sterilizasyonunda kullanılır. Bunların değişik tipleri vardır. Yarı otomatik olan ve elle ayarlanabilen tipleri olduğu gibi tamamen otomatik olarak çalışanları da vardır.

**pH Metre (pH meter)**

Bakteriyolojide hazırlanan besiyerlerinde pH değeri oldukça önemlidir. Genelde hazırlanan tüm besiyerlerinin pH değeri ölçülür.

Çalar Saat (Timer)

Bakteriyoloji laboratuvarında yapılan bazı deneyler ve işlemler sürelidir. Bunların zamanında yapılması için araştırmacıyı zamanında uyaran çalar saatler kullanılır.



Ultra Violet (UV) Lambası (UV lamp)

Özellikle fluoresan pigment veren *Pseudomonas* genusunda yer alan bakterilerin test edilmesinde kullanılır.

**Elisa Okuyucu (Elisa reader)**

Bakterilerin ve virusların immunolojik olarak tanınmasında ELISA okuyucu denilen aletlerden yararlanır.

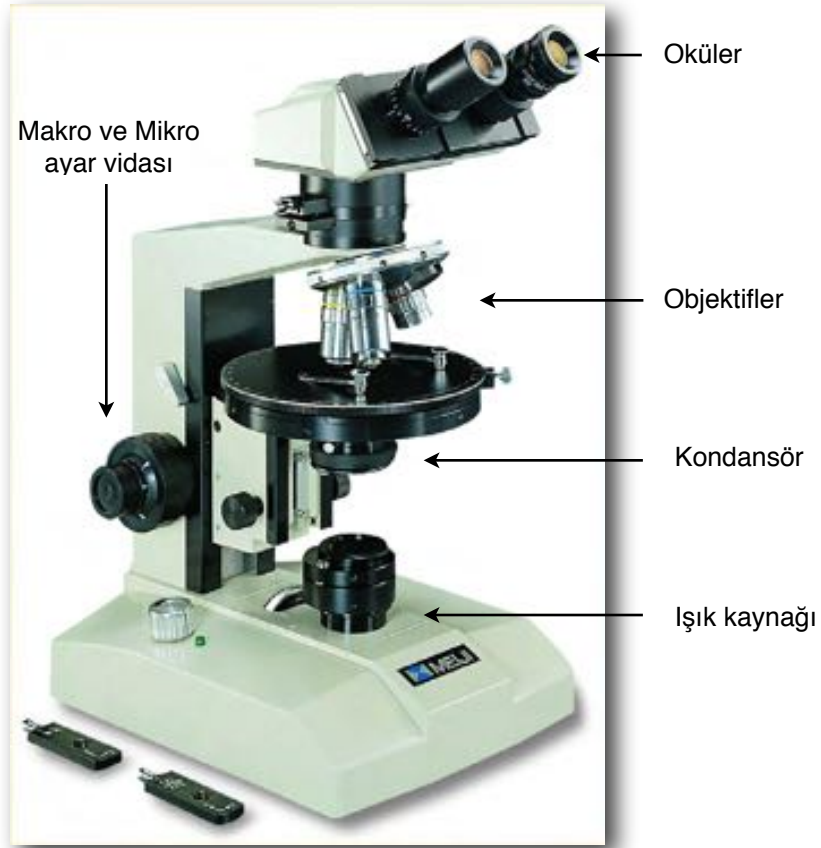
Mikroskop (Microscope)

Gram boyama, endospor boyama gibi işlemlerde yapılan preparatların incelenmesinde kullanılır. Değişik tipte olanları vardır. Genelde normal ışık mikroskoplarından yararlanır. Bakterilerin incelemesinde kullanılan diğer mikroskoplar;

- * Faz - Kontrast Mikroskop
- * Fluoresan Mikroskop



IŞIK MİKROSKOPU



Genel olarak ışık mikroskobu iki büyük kısma ayrılarak incelenir:

Mekanik kısım

Mikroskobun mekanik kısmı ayak, gövde, tabla ve tüpten ibarettir.

Mikroskop ayağı Genellikle fonttan yapılmış ağır ve iyi denge sağlayacak nal şeklinde olup, mikroskobun bütün ağırlığını taşıyan kısımdır. Mikroskop gövdesi Mikroskobun diğer parçalarının tesbit edildiği oynaklı madeni kısımdır. Özel bir vida ile görmede istenilen rahatlığı temin edecek şekilde tesbit edilebilir. Mikroskop tablası Daire veya kare şeklinde olabilen sabit ve bazan hareket edebilecek şekilde, ortasında aynadan (ışık kaynağından) yansıyan ışığın geçmesine yarayan bir deliği bulunan kısımdır. Tabla, preparatı koymaya yarar. Üzerinde ekseriya, kendisini hareket ettiren vidalar ve preparatı tesbitte kullanılan maşalar bulunur. Mikroskop tüpü İççe geçmiş iki madeni borudan ibarettir. Dış tüpü, düz bir dişliyle gövdeye tesbit edilmiştir. Bu kısım büyük ve küçük ayar vidalarıyla aşağı ve yukarı hareket edebilir. Bu sayede göze göre nesnenin (objenin) net görülmesi ayarlanmış olur.

Optik kısım

Mikroskobun ikinci ve en önemli kısmı optik kısmıdır. Optik kısmı okülerle objektifleri taşıyan ve dairesel dönebilen rovelver denilen kısımdan ibarettir. Oküler, farklı büyütmelere sahip, göze gelen tarafta bulunan yakınsak bir mercekten ibarettir. Objektifin meydana getirdiği gerçek görüntüyü büyütür zahiri bir görüntü verir. Objektif ise cisme yakındır, cismin büyütülmüş ters görüntüsünü verir. Büyütme dereceleri her ikisinde farklı büyüklüklerde olabilir. Mesela, bir ışık mikroskobunda objektif büyütmesi, 100x,40x,10x olabildiği gibi, oküler büyütmesi de 5x, 10x, 20x olabilir. (Büyütmeler x işaretiyle belirtilir.)

Rovolver: Bir, iki, üç veya daha fazla objektif takılmasına yarayan ve mikroskop tüpünün alt ucunda bulunan kısımdır. Rovelere takılan mercekler de yakınsak merceklerdir. Nesneyi aydınlatma sistemi ayna veya ışık kaynağı, kondansör ve diyaframdan ibarettir. Ayna gelen ışığı alır. Ayna yerine bir ışık kaynağı da olabilir. Kondansör ise bir mercek sistemidir. Aynadan veya ışık kaynağından gelen ışınları preparat üzerlerinde toplayıp, objenin aydınlanmasını sağlar. Diyafram, kondansörün altında bir kol aracılığıyla ortasındaki delik kısmı istendiği kadar daraltıp genişletmek suretiyle nesneye gelen ışık miktarını ayarlar.

Mikroskopta incelenecek olan madde, mikroskobun tipine göre lam ve lamel adı verilen farklı kalınlıklarda iki ince cam kısım arasında veya doğrudan mikroskobik olarak gözlenir. (Lam: 75 mm boyunda 25 mm eninde ince camdan yapılmış bir plaktır. Lamel: 14, 18, 20 veya 22 mm en ve boyunda çok ince (0,2 mm kalınlıkta) bir cam karedir.)

Mikroskopların çoğu, 4x ile 15x arasında değişen büyütme özelliğini haiz üç objektif ihtiva eder. Bunların odak noktaları, üzerlerinden ayarlanabilir özelliktedir. Her bir objektifte iki veya daha fazla mercek bulunur. Oküler, objektife nazaran daha basittir. Yine merceklerden meydana gelmiştir. Büyütme oranı 10x ile 20x arasında değişir. Mikroskobun büyütme oranını, objektifle oküler büyütme oranı tayin eder. Mesela objektifi 100x; oküleri 20x büyütme oranına sahip mikroskobun büyütmesi 2000x olarak tarif edilir. Objektif ve okülerin, vazifelerini yapabilmesi için yeterli ışığa ihtiyaç vardır. Işığı toplayıp incelenecek cisimden geçirerek objektife ulaştıran optik kondansör kısmı da yine birkaç mercekten meydana gelmiştir. Kondansöre ışık ayna ile veya gelişmiş mikroskoplarda halojen lamba ile gönderilir. Objektife giden ışık miktarı ise, fotoğraf makinalarında olduğu gibi diyaframla sağlanır. İncelenecek cismin ışığı geçirme özelliğine göre diyafram açıklığı değiştirilerek objektife gidecek ışık miktarı ayarlanır.

Görüntünün meydana gelmesi Ayna veya ışık kaynağından gelen ışınlar, optik kondansörden bir ışık hüzmesi halinde çıkarak incelenecek cisimden geçip objektife varır. Objektif, kuvvetli bir projeksiyon makinasında olduğu gibi, mikroskop tüpünün üst kısmından 11 mm aşağıda birinci görüntüyü meydana getirir. Burada bir prizma vasıtası ile okülerden çıkan görüntü, gözün retinasına ulaşır. Oküler mercekleri, objektiften gelen görüntüyü gözden 25 cm uzakta tekrar büyütür gösterir. Aslında göz retinasına düşen görüntü bu son görüntünün, görüntüsüdür. Objektifte 150x mertebesinde büyüyen ilk görüntü, okülerle 20x kadar daha büyütülünce; göz, cismi 150x20= 3000x misli büyük görmüş olur.

Mikroskop optiđi:

Mikroskop optiğinde bilinmesi gerekli iki önemli özellik vardır. Birincisi objektif açıklığıdır. Mikroskobun cisimleri inceleme kabiliyeti, objektif açıklığına bağlıdır. Objektif açıklığı formülü ile tarif edilmiştir. Burada n ortamın kırılma indeksi U ise objektife gelen ışık hüzmesinin açısının yarısıdır. Hava için $n = 1$, daha güçlü mikroskoplarda kullanılan özel yağlar için ise $n = 1,40$ ile $1,52$ 'dir. İkinci mühim özellikse mikroskobun gücüdür. Objektifin ışığı kırması ve dolayısıyla tam toparlayamaması sebebiyle, ortada meydana gelen nokta ışık etrafında, dairevi ışık çizgileri hasıl olur. Dışa doğru gittikçe soluklaşan bu ışık halkaları aslında mikroskop gücü için kayıptır. Mikroskobun gücü, merceklerde meydana gelen ışık halkalarına bağlı olarak değişir. Mikroskop gücü nokta ışığın yarıçapı olarak tarif edilir ve:formülü ile ifade edilir. r küçüldükçe mikroskop gücü artar. Buna göre ışığın dalga boyunun küçülmesi, n kırılma indisinin ve objektife gelen ışık konisinin açısının U büyümesi istenir ve mikroskop mercekleri buna göre sečilir.

BESİ YERLERİ

Bakterilerin içinde veya üzerinde geliştikleri sıvı veya katı besi ortamlarına besi yeri adı verilir. Besi yerleri herhangi bir canlı organizma içermemeli yani steril olmak zorundadır. Genellikle besi yerleri buharla otoklavda 121 °C de 15 dakika sterilize edilirler. Besi yerleri içinde bakterilerin gelişmeleri için gerekli olan makro ve mikro besin elementleri yer alır. Bunlar;

C	Glikoz, çeşitli organik maddeler (Alkol, organik asitler), maya ekstraktı, et ekstraktı, pepton
H	Damıtık su ve çeşitli organik maddeler
O	Damıtık su ve çeşitli organik maddeler
N	Organik: amino asitler, azot bazları, pepton ve kompleks organik maddeler İnorganik: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3
P	KH_2PO_4 , Na_2HPO_4
S	Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, H_2S
K	KCl , K_2HPO_4
Mg	MgCl_2 , MgSO_4
Na	NaCl
Fe	FeCl

Mikro besin elementleri: ZnCl_2 , CaCl_2 , Na_2MoO_4 , CuCl_2 , MnSO_4 , NiCl_2 , Na_2SeO_4

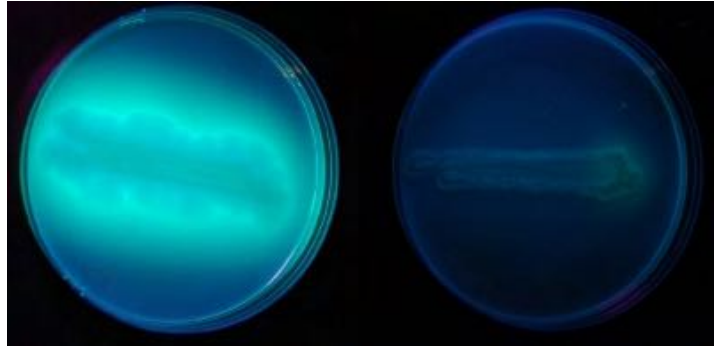
Yukarıda belirtilen maddeler kullanılarak hazırlanan besi yerleri sıvı besi yerleridir. Şayet katı besi yeri hazırlanacaksa katılaşmayı sağlamak ve geçirgen bir yapı elde etmek üzere deniz yosunundan yapılan agar adı verilen bir madde ilave edilir. Agar yaklaşık 80-90°C de erir ve 42-43°Cnin altında sertleşir. Bitki patojeni bakterilerin gelişimi için kullanılan besi yerlerinde agar ilave edilmeden önce ortamın pH değeri bir pH metre ile ölçülerek ayarlanmalıdır. Fitopatojen bakteriler için optimum pH değeri 6.8-7.2 arasındadır. Besi yeri hazırlanacağı zaman, besi yeri hacminin iki katı kadar hacimde bir erlen kullanılmalıdır. Daha sonra erlenin ağzına alüminyum folyo kapatılarak otoklav edilmelidir. Besi yeri petri kaplarına veya tüplere dökülmeden önce 50-55°C ye kadar soğutulmalı ondan sonra steril petrilere (petri kabının içinde 0.4-0.5cm kalınlık yapacak şekilde) dökülmelidir.

Besi yeri kullanıldığı amaca göre çeşitli isimler alır.

1- Genel besi yeri: Genel olarak pek çok bakterinin üreyebildiği besi yerlerine denir. Bunlar: Peptonlu su; Peptone (Protein hidrolizi ile elde edilmiş çözülebilir maddeler) %1, NaCl %0.5 Nutrient broht: Peptone %1, NaCl %0.5, Et ekstraktı %0.5-1 Nutrient agar: Nutrient broth + %1.5-2 agar

2- Seçici besi yeri: Bu besi yerleri sadece bir cinsin yada türün gelişmesine imkan veren diğer bakterilerin ve mikroorganizmaların gelişimini engelleyen besi yerleridir. Örnek: Sadece *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* ve *E.c.* ssp. *atroseptica* nın tipik krater şeklinde koloniler oluşturarak geliştiği Crystal Violet Pectate (CVP) besi yeri.

3- Ayırıcı besi yeri: farklı bakteri türlerinin farklı gelişme, koloni şekli veya koloni rengi oluşturdıkları besi yerleridir. Örnek *Pseudomonas* lardan bazıları King B adı verilen besi yerinde (Proteose peptone [Difco No 3] 20g, K₂HPO₄ 3 H₂O 1.5g, MgSO₄ 7 H₂O 1.5g, Glycerol 10g, Damıtık su 1000ml, agar 15g, pH 7.2) ultraviolet ışık altında parlak mavimsi yeşil renkli ışımaya yapan koloniler oluşturmaktadır.



King B ayırıcı besiyerinde UV ışık altında fluoresans veren bakteri kolonileri, sağda fluoresans vermeyen koloniler

Besi yerine inokulasyon

Bir bakteri türünü besi yerinde geliştirebilmek için o türün canlı hücrelerini içeren bir miktar bakteri kitlesini veya sulandırılmış bakteri süspansiyonundan küçük bir hacmi steril besi yerine ilave etmek gerekir. İşte canlı bakteri hücrelerini içeren bu küçük miktara inokulum, bunun besi yerine ilave edilme işlemine inokulasyon adı verilir. İnokulasyon işlemleri aseptik koşullarda yapılmalıdır.

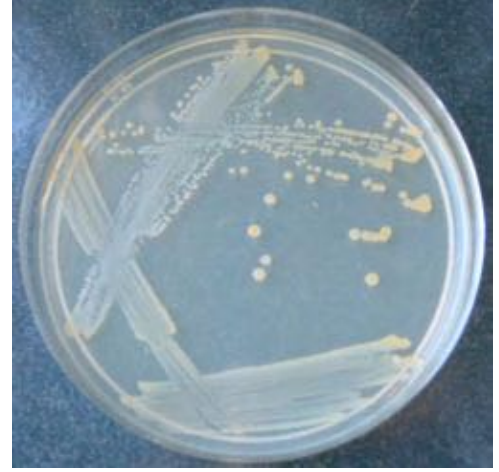
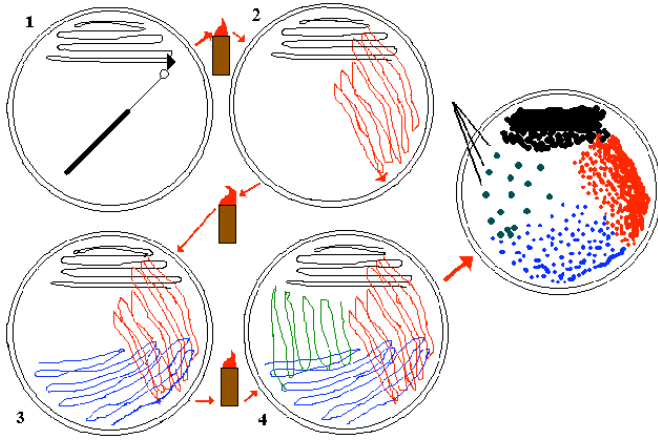
Aseptik teknik: Laboratuvar da bakterilerle ilgili olarak yapılan çalışmalarda aletlerin, besi yerlerinin ve ortamın çevredeki diğer mikroorganizmalar ile bulaşmasının önlenmesi anlamındadır. Bakteriyolog bu koşulları yerine getirmek için bir dizi önlemler almak durumundadır. Örneğin: besi yerleri, kullanılan aletler, petri kapları sterilize edilir. Öze, bistüri, pens gibi aletler alevden geçirilir. Çalışılan masa veya banko üstü %70 lik etil alkolle iyice silinip temizlenir. Çoğunlukla laboratuvar çalışmalarında Laminar Flow kabin veya steril bench adı verilen steril hava üfleyen ekim kabinleri kullanılır.

Sıvı besi yerinin inokulasyonu: Alevden geçirilmiş ve soğutulmuş öze (Şekil 1) yardımıyla daha önce geliştirilen bakteri kolonisinden veya sıvı besi yerinden bir miktar sıvı (Bir öze dolusu yaklaşık 0.01-0.005ml) alınarak tüp içindeki besi yeri inokule edilir.



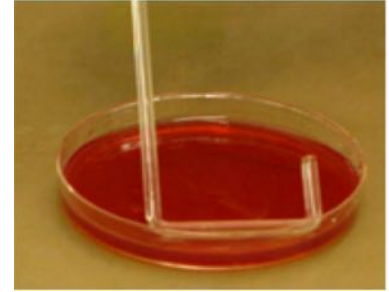
Şekil 1. Özenin sterilize edilmesi

Katı besi yerinin inokulasyonu: Katı besi yeri bir kaç şekilde inokule edilebilir. En çok kullanılan yöntem çizgi ekimdir. Bunun için alevden geçirilmiş ve soğutulmuş öze ile bir miktar bakteri alınır ve petri kapları şekil 2 de belirtildiği gibi inokule edilir. Önce steril öze yardımıyla alınan inokulum petri kabının bir kenarına karalama şeklinde çizim yapılarak bakteriler iyice yayılır (1). Daha sonra öze tekrar alevden geçirilip soğutulularak 1 nolu alandan bir çizgi çekilerek tekrar temiz bir alanda çizgi ekim yapılır (2). Aynı işlemler tekrarlanarak 3 ve 4 nolu alanlara ekim yapılır. Bu şekilde bakterilerin besi yeri yüzeyinde tamamen seyreltilerek tek bir bakterinin oratama dağılması sağlanmaya çalışılır. Öze ile çizgiler çekilirken öze mümkün olduğu kadar yüzeye paralel tutulmalı ve fazla bastırılmamalıdır.



Şekil 2. Öze ile besiyerine bakteri ekimi, sağda çizgi ekimi yapılmış bir besiyerinde 24 saat inkubasyon sonrası kolonilerin görünümü

Bazı durumlarda katı besi yerleri L şeklinde kıvrılmış cam çubukla (baget) inokule edilirler. Bunun için bakteri süspansiyonundan bir pastör pipeti yardımıyla 0.05-0.1ml alınıp petri kabının ortasına damlatılır. Daha sonra alevden geçirilmiş ve soğutulmuş bagetle dairesel hareketlerle bakterileri içeren su damlasının besi yeri yüzeyinin yüzeyine tamamen homojen bir şekilde yayılması sağlanır (Şekil 3).



Şekil 3. Bagetle besiyerine ekim

Daha sonra besi yerleri bir inkubatöre konularak bakterilerin gelişmesi sağlanır. Fitopatojen bakteriler genellikle 25-27°C sıcaklıklarda geliştirilirler. Bu işleme inkubasyon adı verilir. Eğer petrilere yapılan çizgi veya bagetle yapılan ekimlerde yeterli seyreltme yapılabilmişse 24-48 saat sonra katı besi yerinde tek tek koloniler görülür (Şekil 2). İyi seyreltme yapılamayan durumlarda bakteriler tabaka halinde koloniler üst üste binmiş şekilde gelişirlerki saflaştırma ve tanılama işlemi yapılamaz. Bu durumda ekim tekrarlanmalıdır.

KOLONİ MORFOLOJİSİ

Bir bitki patojeni bakterinin tanılanması yada aktivitesinin saptanabilmesi için o mikroorganizmanın kültür ortamında saf olarak yetiştirilmesi gerekir. Yani kültür tamamen diğer mikroorganizmalardan arınmış olmalıdır. Çok küçük olan bir mikroorganizma için bu saflığı sağlamak oldukça zordur. Bir damla bitki öz suyu yada bir damla vücut sıvısı içinde birbirinden farklı birçok mikroorganizma bulunmakta ve besi yerinde birlikte gelişmektedirler. Bir sıvı içindeki mikroorganizmalar yeterince seyreltilip geniş bir katı besi yeri yüzeyine yayıldıklarında her bir mikroorganizma hücresi çoğalıp kendi başına gözle görülebilir aynı tür hücreler topluluğu oluşturmaktadır. Buna **koloni** adını verilmektedir. Robert Koch ilk defa mikroorganizmaları katı besi yerinde geliştirerek onların koloniler oluşturduğunu saptayan bilim adamıdır. Koch'un bu **saf kültür** elde etme bulgusundan günümüzde agar içeren katı besi yeri kullanılarak tıp, veterinerlik ve bitki koruma alanlarında geniş çapta yararlanılmaktadır.

Hastalıklı bitki kısımlarından yapılan izolasyon amaçlı ekimlerde inkubasyonun ardından katı besi yeri yüzeyinde pek çok koloninin geliştiği görülür. Bunlar renkleri, yapıları ve şekilleri itibarıyla birbirinden farklılık göstermektedirler. Tek bir koloni bir öze yardımıyla alınarak çizgi ekim yöntemiyle katı bir besi yerine tekrar ekilip bir süre inkube edilirse renk ve şekil olarak aynı özellikte bir çok bakteri kolonisinin geliştiği görülür. Eğer gelişen koloniler arasında farklı koloniler mevcutsa aynı işlemi besi yerinde aynı özellikte homojen koloniler elde edilinceye kadar devam ettirmek gerekir. Bu şekilde yapılan işlemlere **saflaştırma** adı verilir. Ancak yeterli saflaştırma yapıldıktan sonra bu bakteri üzerinde tanılama, patojenisite ve benzeri çalışmalar yapılabilir. Karışık kültürlerle yapılan çalışmaların boşa zaman harcamaktan başka bir işe yaramıyacağı ve bu durumda elde edilen sonuçlara da hiçbir zaman güvenilemeyeceği unutulmamalıdır. Saflaştırılan izolatlar eğik besi yerlerine ekim yapılarak bir süre geliştirilir ve buzdolabında yada diğer saklama yöntemlerinden biriyle stoklanır, ardından tanılama, aktivite testleri gibi işlemlerine geçilir. Çalışmalar sırasında kullanılan izolatin saflığından şüphe ediliyorsa tekrar katı besi yerine ekim yapılır ve aynı tip kolonilerin gelişip gelişmediği kontrol edilir.

Katı besi yerinde gelişen bakteriler şekil, tekstür, yüzey şekilleri, kenar şekilleri, renk, ışık geçirgenliği (saydam, mat) ve gelişme hızı yönünden farklılıklar göstermektedirler. Bu özellikler, kullanılan besi yerinin içeriğine, geliştikleri sıcaklık vs. gibi çevre koşullarına göre de değişebilmektedir. Bitki patojeni bakterilerin tanılanmasında genel amaçlı besi yerlerinde bakteriler geliştirilerek ön ayırım yapılabilir. Genel olarak hastalıklı dokudan yapılan izolasyonlarda iyi bir yüzey dezenfeksiyonu yapılmışsa gelişen patojen bakteriler oldukça saftır ve aynı tipte bir çok koloni oluştururlar. Bununla birlikte besi yerinde yinede bitki, toprak vs. de bulunan pek çok diğer bakteri ve fungusun gelişmesi de olasıdır. Bitki patojeni bakterilerin saprofit olanlardan bir diğer farkıda ortamda saprofitlere göre daha yavaş gelişmeleridir. Saprofit bakteriler hızlı gelişir ve ortamı kısa zamanda kaplayabilirler.

Çizelge 1'de genel amaçlı besi yerinde saf kültür halinde geliştirilen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin morfolojik özellikleri verilmiştir. Bu morfolojik özelliklere bakarak fitopatojen bakterilerin ön tanılamaları yapılabilir. Ancak bu şekilde yapılan ön ayırım sadece ilerideki testleri kolaylaştırmak amacıyla. Hiçbir zaman bakteriler koloni yapısı ve şekline bakarak genel amaçlı besi yerinde teşhis edilemezler.

Çizelge 1. Genel amaçlı besi yerinde saf kültür halinde geliştirilen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin morfolojik özellikleri

	Nokta	Düzgün	İpliksi	Düzensiz	Rhizoit	İğ (Mekik)
BİÇİM						
YÜKSEKLİK	Düz	Kabarık	Konveks	Kubbe	Düğmeli	
KENAR	Düz	Dalgalı	Loblu	Dişli	İpliksi	Bukleli

Koloni Renkleri; Saydam, yarı saydam, opak (mat), krem, beyaz, kırmızı.

Ayrıca bazı bakteriler besi yerinde yayılan ve suda eriyebilir pigment oluşturabilmektedirler.

Fitopatojen bakterilerin genel amaçlı besi yerinde (Nutrient Agar), 25-27°C de, 24-48 saat inkubasyon sonrasında oluşturdukları kolonilerin özellikleri ise aşağıda verildiği gibidir;

Biçim : Düz

Yükseklik : Düz, kabarık, konveks ve kubbeli

Kenar : Düz, dalgalı

Renk : Saydam, yarı saydam, opak (mat), krem, parlak sarı, bej

GRAM BOYAMA

Canlıları birbirinden ayırt etmek için bazı karakteristik özelliklerini diğer canlılar ile karşılaştırır, farklılık ve benzerliklerini ortaya koyarak isimlendirmeye çalışırız. İşte birbirine çok benzeyen ve mikroskopik canlılar olan bakterilerin tanımlanmasında da bu temel kurallardan yararlanılır. Çoğunlukla renksiz olan bakterileri mikroskop altında inceleyebilmek için öncelikle onları sabitleyip boyamak gereklidir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biride **Gram boyama**'dır. İlk defa 1880 yılında Cristian Gram isimli Danimarkalı bir bilim adamı tarafından bulunan bu yöntemle bakteriler 2 büyük ana gruba ayrılmaktadır. Fitopatojen bakterilerde gram pozitif ve gram negatif olarak 2 ana grupta toplanmaktadır.

Boyama

Gram boyama; ısı ile öldürülmüş ve lam üzerine sabitlenmiş bakteri hücrelerinin crytal violet adı verilen bir boya ile boyanması, daha sonra bu boyanın iyotla bir kompleks oluşturması temeline dayanır. Şayet crytal violet ve iyotla işlem görmüş bakteri hücreleri organik bir çözücü (etil alkol veya aseton) ile yıkanırse bakteri türüne göre değişen 2 farklı sonuç çıkmaktadır. Bunlardan birincisinde hücre çeperindeki boya-iyot kompleksi organik çözücüde çözünmez ve bakteriler mavimsi-mor renkli görünürler. Bu gruba **gram pozitif** adı verilir. İkincisinde ise boya-iyot kompleksi çözünür ve bakteriler renksiz görünür. İşte bu hücreleri mikroskopta görebilmek için kırmızı renkli safranin adı verilen bir boya ile boyanır. Sonuçta bu hücreler pembemsi-kırmızı renkte görülürler. Bunlara da **gram negatif** adı verilir.

Gram Boyamada Kullanılan Solüsyonlar (Hucker'in Değiştirilmiş Yöntemi)

1- Crytal violet solüsyonu

Crystal violet 100 ml su içine 0.5 g boya konup eritilip ve filtre kağıdından süzülerek kullanılır.

2- Lugol solüsyonu

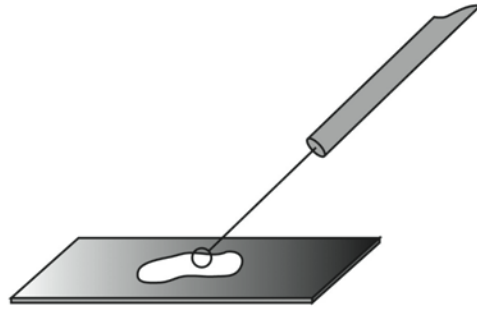
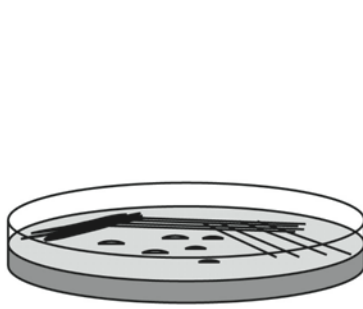
İyot 1g

25 ml damıtık su içinde Potasyum iyodür 2g eritilir, üzerine 1 g iyot ilave edilir ve 100 ml tamamlanarak koyu renkli şişede karanlıkta saklanır.

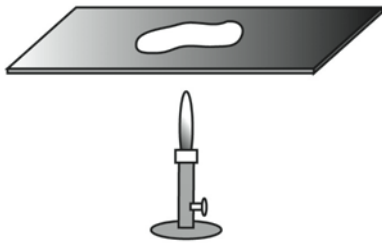
3- Safranin solüsyonu

Safranin O 0.5 g boya tartılı ve 100 ml suda eritilerek kullanılır.

Bakterilerin Mikroskopta İncelenmesi



Petride Nutrient Agar besi yerinde 24-48 saat geliştirilen kültüründen alevden geçirilmiş ve soğutulmuş steril bir öze yardımıyla bir miktar bakteri alınır ve üzerinde bir damla su bulunan lam üzerinde ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayılır.



Lam oda sıcaklığında bekletilerek üzerindeki suyun kuruması sağlanır. Kısa sürede kuruma sağlamak için lam çok kısa süreli alevden geçirilir. Bu işlem bakteri hücrelerinin boyama ve yıkama işlevleri sırasında lam yüzeyinde sabit kalmasını sağlar. Bu işleme **fiksasyon** adı verilir.

Aşağıdaki sıraya göre fiksasyonu yapılan bakterilerin boyaması yapılır.

GRAM BOYAMA

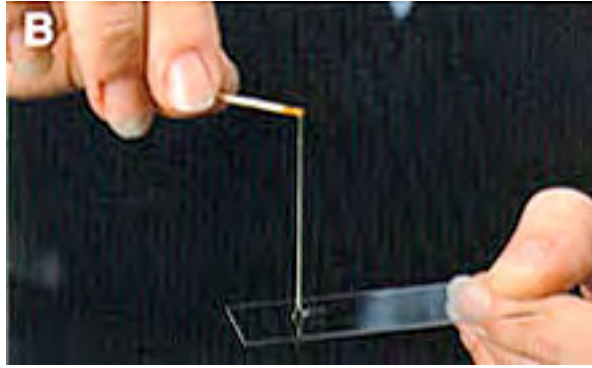
- Lam üzerine crytal violet solüsyonundan dökülür ve 1 dakika beklenir,
- Musluk suyunda yıkanır,
- İyot solüsyonu dökülür ve 1 dakika beklenir,
- Musluk suyunda yıkanır,
- Etil alkol dökülür ve 30 saniye beklenir,
- Musluk suyunda yıkanır,
- Safranin solüsyonu dökülür ve 30 saniye beklenir,
- Musluk suyunda yıkanır ve ardından hafifçe kurutma kağıdı ile kurulur.

Hazırlanan preparatlar mikroskopta 100 büyütme objektif ile incelenir. Bu objektif ile çalışırken immersiyon yağının kullanılması gerektiği unutulmamalıdır. Boyama sonucunda bakteri hücrelerinin gram pozitif veya gram negatif olduklarının yanında hücre şekilleri hakkında da bir bilgiye sahip olunur.

POTASYUM HİDROKSİT TESTİ

- Gram-negative and Gram-positive bacterial kültürleri
- Steril yassı kürdan
- Lam
- %3 KOH içeren damlalık

Kültür ortamından bir miktar bakteri kitlesi kürdan yardımıyla alınır ve temiz bir lam üzerinde 2-3 damla KOH solusyonu içinde iyice dairesel hareketlerle çabucak yayılarak karıştırılır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı %3 KOH içinde erir (liziz) ve 15-20 saniye içinde yapışkan ağdalı (viskoz) bir sıvı haline gelir. Kürdan aşağıdaki şekilde sıvıya dokundurulup yavaşça kaldırılırsa sıvının uzadığı görülür. Bu gram negatif bakterinin hücre duvarının erimesi sonucu açığa çıkan DNA'dır. Gram pozitif bakterilerde ise %3 KOH hücre duvarını etkilemediği için sıvıda bir değişiklik olmaz ve uzama görülmez.



PATOJENİSİTE TESTLERİ

Bitkilerde hastalık yapan bakterilerin en önemli özellikleri patojenik olmaları yani konukçu bitkileri hastalandırma yeteneğine sahip olmalarıdır. İzole edilen bir bakterinin bitkide hastalık oluşturup oluşturmadığını yada virülensini laboratuvar koşullarında patojenisite testleri dışında başka bir yöntemle ölçmek mümkün değildir. Bu nedenle canlı bitkiler kullanılarak suni inokulasyonlarla doğal infeksiyonlar oluşturulmaya çalışılır. Fitobakteriyolojide suni inokulasyonlar başlıca 2 amaçla kullanılır. Birincisi bakterinin patojen olup olmadığını belirlemek ikincisi de bitkileri hastalığa duyarlılık yada dayanıklılık amacıyla testlemektir. Bunlardan birincisi hastalıklı bir bitkiden izole edilen bir bakterinin hastalığı oluşturan etmen olup olmadığını belirlemek yani Koch postülatını doğrulamak amacıyla kullanılır. Bu postulat mikroorganizmaların canlılarda hastalık oluşturduğunu ilk kez bulan Robert Koch tarafından ortaya konmuştur. Kısaca 4 koşuldan oluşur.

- 1- Hastalığa neden olan etmen o canlı da sürekli mevcuttur.
- 2- Etmen o canlıdan izole edilmeli ve suni besiyerinde saf olarak yetiştirilmelidir (İzolasyon)
- 3- İzole edilen etmen aynı fakat sağlıklı canlıya tekrar verildiğinde aynı hastalığı oluşturmalıdır (Reinokulasyon)
- 4-Hastalık etmeni tekrar izole edilebilmeli ve suni besiyerinde saf kültür halinde tekrar yetiştirildiğinde ilk izole edilen etmenle aynı özellikleri taşımalıdır (Reizolasyon)

İzole edilen ve saf kültür olarak geliştirilen bir fitopatogen bakterinin başarılı şekilde inokulasyonu için ise 3 önemli koşul yerine getirilmelidir. Bunlar;

- 1- Virulent ve patojenik bir bakteri,
- 2- Duyarlı konukçu,
- 3- Hastalık oluşumu ve belirtilerin ortaya çıkması için optimum koşullar olarak tanımlanır.

Başarılı bir inokulasyon için öncelikle üzerinde durulması gereken bitkiye verilecek olan patojen miktarı yani inokulum' un hazırlanmasıdır. Bu amaçla saf kültür olarak genel besiyerlerinde 24-48 saat geliştirilmiş taze kültürler kullanılmalıdır. Bu kültürlerden içinde 10-12 ml steril damıtık su veya steril fizyolojik serum (1 litre suda 8.5 gram NaCl) bulunan bir tüp içinde bakteri süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyonlardaki bakteri konsantrasyonu çok önemlidir. Hazırlanan süspansiyonun mililitresindeki canlı bakteri sayısı çok düşük olursa hastalık belirtileri oluşmayabilir. Konsantrasyon çok yüksek olursa (10^8 den fazla) patojen olmayan bakteriler (saprofitler) konukçu bitkilerde aşırı duyarlılık nedeniyle yumuşak çürüklük yada suda haşlanmış görünüm gibi bazı yanıltıcı belirtilere neden olabilirler. Bunun için 10^7 - 10^8 hücre/ml' lik bakteri konsantrasyonu pek çok amaç için yeterlidir.

Suni inokulasyon yöntemleri patojen bakteri türü ve konukçu bitkiye göre değişmektedir. Bunlar her hastalık grubu için önem sırası dikkate alınarak aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Yaprak hastalıkları

- Püskürtme
- Yüksek basınçlı bir pülverizatör veya el sprayi ile doku içine infiltrasyon,
- Şırınga ile doku içine infiltrasyon,
- Yaprak yüzeylerine steril yumuşak bir obje (ucuna pamuk sarılmış bir çubuk) ile inokuluma bandırarak sürmek yada ovalamak. Bu amaçla daha önceden karborandum tozu serpilerek yaprak yüzeyinde yara açılabilir.

Kanser ve geriye doğru ölüm hastalıkları

- Yaralama
- Budama
- Genç sürgünlere veya meyvelere ucunda inokulum bulunan steril bir iğne ile batırma
- Gövde veya sapa şırınga ile enjeksiyon

İletim demetleri solgunlukları

- Gövdeye ucunda inokulum bulunan bir iğne ile batırma,
- Kesik yaprak saplarına bakteri süspansiyonu damlatma,
- Kesik kökleri bakteri süspansiyonuna bandırma

Yumuşak çürüklük hastalıkları

- Bitkinin etli kısımlarına (patates) ucunda inokulum bulunan bir iğne veya kürdanla batırma,
- Kesik yüzeye bakteri süspansiyonu damlatma,
- Şırınga ile doku içine bakteri süspansiyonunun infiltrasyonu

Tümörler

- Gövdeye veya sapa ucunda inokulum bulunan bir iğne ile batırma,
- Yaralama şeklindedir.

İnokulasyondan sonra patojenin konukçusu içine yerleşip hastalık ilişkisinin kurulabilmesi için (**enfeksiyon**) bitkilerin optimum koşullarda bulundurulması gerekir. Bu nedenle patojenisite çalışmaları sıcaklık, nem ve ışık kontrolü yapılabilen iklim odalarında yürütülür. Sıcaklık patojenin kolaylıkla gelişip çoğalabileceği optimum değerde olmalıdır. Işık 12 saat karanlık 12 saat aydınlık periyodu pek çok çalışma için yeterlidir. Orantılı nem ise ilk 48 saat için %95-99 gibi yüksek değerde olmalıdır. Bu amaçla İnokulasyondan hemen sonra (özellikle püskürtme şeklinde yapılan inokulasyonlarda) bitkilerin üzeri ıslatılmış polietilen torbalarla örtülür ve 36-48 saat beklenir. Daha sonra torbalar çıkarılarak bitkiler sıcaklığı sabit bir ortamda yaklaşık % 60-70 nisbi nemde belirtiler oluşuncaya değin tutulur. Belirli aralıklarla kontrol edilerek sonuçlar değerlendirilir. Değerlendirmeler amaca göre, örneğin patojen leke oluşturuyorsa leke çapı veya sayısı, sapa kanser oluşturuyorsa lezyon boyu, bitkide tümör oluşturuyorsa ur çapı veya ağırlığı gibi kriterler dikkate alınarak yapılabilir.

Patojenisite çalışmalarında hastalıklı bitkiden izole edilen ve patojenisite testi yapılacak bakterinin yanısıra daha önceden tanılanmış bilinen bir bakteri kültürü de kullanılmalı ve bu bakteri ile ayrı bir bitki de inokule edilerek sonuçta belirtiler karşılaştırılmalıdır.

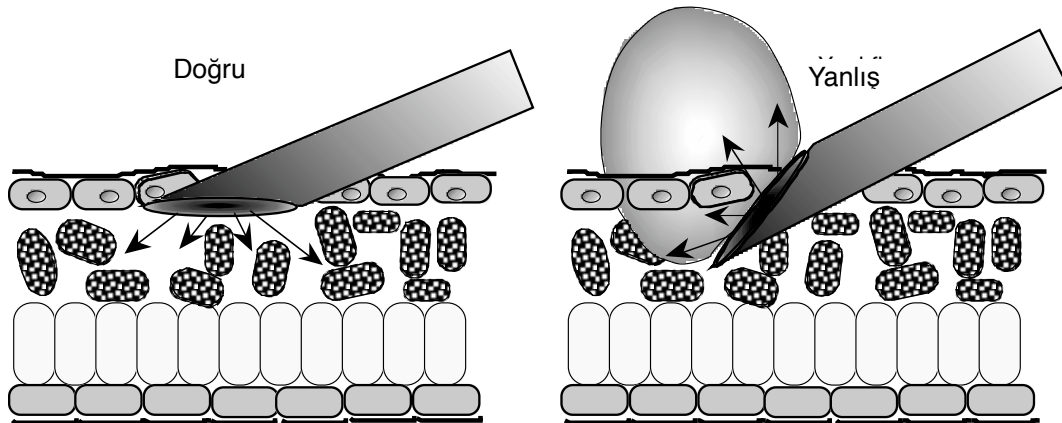
TÜTÜNDE AŞIRI DUYARLILIK (Hipersensitiv Reaksiyon=HR) TESTİ

Bilindiği gibi hastalıklı bitki materyalinden izolasyonda genel besiyerinde pek çok bakteri kolonisi gelişmektedir. Bu kolonilerden bazıları bitki patojeni bakterilere ait olabileceği gibi bazıları da saprofit karakterli bakterilere ait olabilir. İlk bakışta koloni şekline göre bunları gözle ayırtmak mümkün değildir. Öncelikle birbirlerine benzeyen her koloniden temsilci bir koloni öze ile alınıp besiyerine saflaştırılır. Bu saf kültürlerin elde edilmesinden sonra tanılama testleri yapılabilir. İşte bitki patojeni bakterileri saprofit olan bakterilerden ayırt etmek için kullanılan yöntemlerden birisi de Tütünde Aşırı Duyarlılık testidir. Bu test Zoltan Klement isimli bir Macar araştırmacı tarafından 1963 yılında geliştirilmiş olup günümüzde kısa zamanda sonuç vermesi ve pek çok bitki patojeni bakteri için doğru sonuç vermesi nedeniyle bakteriyoloji laboratuvarlarında pratikte kullanılmaktadır.



Bu amaçla saksılarda yetiştirilmiş White Burley çeşiti tütün bitkileri kullanılır. Tütün bitkilerinin 5-6 yapraklı olduğu dönemde, testlenecek her bakteri izolatu için süspansiyon hazırlanır ve ince uçlu bir şırınga yardımıyla tütün yaprağında iki damar arasına enjeksiyon yapılır. Bakteri süspansiyonu yapraklara şırınga edilirken iğnenin kesik ucu yaprak içine bakacak şekilde olmak üzere (Şekil 1) iğne hafifçe damar kenarından yaprak dokusu içine sokulur ve piston ileri itilerek sıvının hücreler arası boşluğu doldurması sağlanır. Bir yaprak üzerinde birer sıra atlamak kaydıyla birkaç tane bakteri izolatu testlenebilir. Testlenecek her bakteri süspansiyonu bitkilere verildikten sonra ayrıca bir yaprağa da steril su kontrol amacıyla verilmelidir. Daha sonra bitkiler 20-25 °C de bir iklim odasına konur ve belirti oluşumu için beklenir. *Xanthomonas* cinsi bakteriler için önce bitkiler 18-20 °C de tutulmalı enjeksiyon sonrası 30-32 ° de bekletilmelidir.

İnokulasyondan 24 saat sonra (*Pseudomonas* cinsi bitki patojeni bakteriler 6-7 saat) bakteri süspansiyonu şırınga edilen damar aralarında beyazlaşma şeklinde doku ölümü (nekroz) gözlenirse enjekte edilen bakteri izolatu bitki patojeni olabileceği kanısına varılır. Saprofit bakteriler nekrotik belirtilere neden olmazlar, ancak bir kaç gün sonra hafif bir sararma gözlenebilir. Su enjekte edilen yapraklarda da herhangi bir sararma, nekroz vb belirti gözlenmemelidir. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması için 24-48 saat süre içinde besiyerinde saf olarak yetiştirilmiş bakteri kültürleri kullanılmalıdır. Bu kültürlerden steril bir öze yardımıyla bir tüp içine bir miktar steril su konur ve koloniden bir miktar alınarak su içinde karıştırılır. Hazırlanan süspansiyonun mililitresindeki bakteri sayısı 10^7 - 10^8 civarında olmalıdır. Bu konsantrasyon basit olarak daha önceden hazırlanmış farklı bulanıklık derecelerine sahip MacFarland tüpleri yardımıyla bakteri süspansiyonu karşılaştırılarak kabaca yapılabilir.



Şekil 1. Bakteriyel süspansiyonun şırınga ile tütün yaprağına verilşi