

Takım (Order) II : Rickettsiales
Familya (Family) II : Rickettsiaceae
Cins (Genus) I : *Rickettsia*

Takım (Order) IV : Sphingomonadales
Familya (Family) I : Sphingomonadaceae
Cins (Genus) I : *Sphingomonas*

Takım (Order) VI : Rhizobiales
Familya (Family) II : Rhizobiaceae
Cins (Genus) I : *Rhizobium*
II : *Agrobacterium*

Sınıf (Class) II : Betaproteobacteria

Takım (Order) I : Burkholderiales
Familya (Family) I : Burkholderiaceae
Cins (Genus) I : *Burkholderia*
VIII : *Ralstonia*

Familya (Family) IV : Comamonadaceae
Cins (Genus) I : *Acidovorax*
X : *Xylophilus*

Takım (Order) V : Nitrosomonadales
Familya (Family) I : Nitrosomonadaceae
Cins (Genus) I : *Nitrosomonas*
II : *Nitrosolobus*
III : *Nitrospira*

Familya (Family) II: Ectothiorhodospiraceae
Cins (Genus) VI : *Nitrococcus*

Sınıf (Class) III : Gammaproteobacteria

Takım (Order) III : Xanthomonadales
Familya (Family) II : Xanthomonadaceae
Cins (Genus) I : *Xanthomonas*₂
XII : *Xylella*

Takım (Order) VI : Legionellales
Familya (Family) II : Coxiellaceae
Cins (Genus) II : *Rickettsiella*

Takım (Order) IX : Pseudomonadales
Familya (Family) II : Pseudomonadaceae
Cins (Genus) I : *Pseudomonas*
II : *Azomonas*
III : *Azotobacter*
VIII : *Rhizobacter*

Takım (Order) XIII : Enterobacteriales
Familya (Family) I : Enterobacteriaceae
Cins (Genus) IV: *Brenneria*
XII: *Enterobacter*
XIII : *Erwinia*
XXIII: *Pantoea*
XXIV: *Pectobacterium*
: *Dickeya*
XXXVI : *Serratia*

Şube (Phylum) BXIII : Firmicutes

Sınıf (Class) I : Clostridia

Takım (Order) I : Clostridiales
Familya (Family) I : Clostridiaceae
Cins (Genus) I : *Clostridium*

Sınıf (Class) II : Mollicutes

Takım (Order) I : Mycoplasmatales
Familya (Family) I : Mycoplasmataceae
Cins (Genus) I : *Mycoplasma*

Takım (Order) II : Entomoplasmatales
Familya (Family) I : Entomoplasmataceae
Cins (Genus) I : *Entomoplasma*
II : *Mesoplasma*

Familya (Family) II : Spiroplasmataceae
Cins (Genus) I : *Spiroplasma*

3

Takım (Order) III : Acholeplasmatales

Familya (Family) I : Acholeplasmataceae
Cins (Genus) I : *Acholeplasma*

Sınıf (Class) III : Bacilli
Takım (Order) I : Bacillales
Familya (Family) I : Bacillaceae
Cins (Genus) I : *Bacillus*
Familya (Family) IV : Enterococcaceae
Cins (Genus) I : *Enterococcus*

Şube (Phylum) BXIV : Actinobacteria
Sınıf (Class) I : Actinobacteria
Alt sınıf (Subclass) V : Actinobacteridea
Alt takım (Suborder) IX : Micrococcineae
Familya (Family) I : Micrococaceae
Cins (Genus) II : *Arthrobacter*

Familya (Family) XII : Microbacteriaceae
Cins (Genus) VI : *Clavibacter*
VIII : *Curtobacterium*
XV : *Rathayibacter*

Alt takım (Suborder) X : Corynebacterineae
Familya (Family) I : Corynebacteriaceae
Cins (Genus) I : *Corynebacterium*

Familya (Family) V : Nocardiaceae
Cins (Genus) I : *Nocardia*
II : *Rhodococcus*

Alt takım (Suborder) XIV: Streptomycineae
Familya (Family) I : Streptomycetaceae
Cins (Genus) I : *Streptomyces*

2. BAKTERİLERİN ANATOMİSİ

2.1. Hücre morfolojisi

Bakterilerin büyük bir kısmı 0.20 - 2.0 x 2.0 - 8.0 µm boyutlarında olup, morfolojik olarak yuvarlak veya küresel (tekil: coccus - çoğul: cocci), çubuk veya çomak (tekil: bacillus - çoğul: bacilli) ve spiral şekilli bakteriler olmak üzere 3 grup altında toplanabilirler.

Yuvarlak şekilli bakteriler (coccus), 0.8 - 1.0 µm boyutlarında olup, genellikle yuvarlak yapıdadırlar. Bunun yanında oval, uzunumsu veya bir tarafı düz yapıda olanları da bulunmaktadır. Yuvarlak şekilli bakteri hücreleri, birbirleriyle oluşturdukları gruplara göre isim almaktadırlar. Buna göre tek hücreli olanlara **coccus**, ikili coccuslara **diplococcus**, dörtlü grup oluşturan coccuslara **tetracoccus**, zincir şeklindeki coccuslara **streptococcus**, küp şeklinde veya 8'li grup oluşturanlara **sarcinae**, düzensiz salkım şeklinde olanlara **staphylococcus** ismi verilmektedir

Spiral veya burgu şekilli bakterilerin vücutları, düzgün olmayıp, kendi eksenleri etrafında bir veya daha fazla kıvrılmış durumdadır. Vücutları tek kıvrımlı olanlara **vibrio** adı verilir. Vücut yapıları yumuşak, birden fazla ve sık kıvrıma sahip olan ve vücutlarının kıvrılmasıyla hareket edenlere **spirochete** denir. Bunların kamçıları yoktur. Vücutları sert yapılı, birden fazla kıvrıma sahip ve kamçıları ile hareket edenlere ise **spirillum** adı verilir

2.1.1. Kaygan tabaka (Glikokaliks)

Kaygan tabaka, hücre duvarının dış kısmında bulunan ve hücreyi tamamen kuşatan, polisakkarit,⁵ polipeptit veya her ikisinin

karışımından oluşan jelimsi veya viskoz yapılı bir tabakadır. Belirgin şekilli, kalın ve sert yapılı glikokaliks tabakasına **kapsül**, ince yapılı olanlarına ise **mikro kapsül** adı verilir. Kapsüller türler arası ve aynı tür içerisinde çevresel koşulların etkisiyle yapısal farklılık gösterir.

2.1.2. Hücre duvarı

Hücre duvarı, sitoplazmik zar ile kapsül arasında bulunan tabakadır. Bu yapı, bakteri hücrelerine sertlik ve şekil verir, hücreyi ozmotik basınçtan korur ve hücre bölünmesinde önemli rol oynar. Ayrıca yarı geçirgen özelliğe sahip olması nedeniyle 1 nm büyüklüğündeki moleküllerin hücre içerisine girmesine, hücre içerisinde sentezlenen metabolizma artıklarının ve ekzoenzimlerinin de hücre dışına çıkmasına izin verir.

Hücre duvarı teikoik asitler ise sadece peptidoglikan blokları arasından geçen ve sitoplazmik membrana bağlı olmayan teikoik asitlerdir (Şekil 2.6). Teikoik asitler, sahip olduğu fosfat gruplarından dolayı negatif yüklüdürler. Bu özellik sayesinde pozitif yüklü iyonların (katyonların) hücre içine giriş ve çıkışlarını düzenlerler ve hücre gelişiminde önemli rol oynarlar.

Gram (-) bakterilerin hücre duvarı ise 3 tabakalı bir yapıdan oluşur.

a. Dıştaki tabaka; lipoproteinler, lipopolisakkaritler ve fosfolipitlerden oluşmuştur. Lipoproteinler dış tabakanın peptidoglikana sıkı bir şekilde kovalent olarak bağlanmasını sağlar.

b. Orta tabaka, bir veya birkaç peptidoglikan katmanından meydana gelmiştir. Peptidoglikan, yoğun bir protein - enzim konsantrasyonuna sahip olan ve **periplazmik jel** ismi verilen yumuşak bir yapı içerisine gömülü olarak dış membrana bağlanmış durumdadır. Gram (-) bakterilerin hücre duvarında çok az miktarda peptidoglikan olduğu için

teikoik asit bulunmaz ve bu nedenle hücre mekanik etkilere karşı oldukça hassastır

c. Sitoplazmik zar (iç tabaka) ise orta tabakanın hemen altında, sitoplazmayı çepeçevre kuşatan ve fosfolipit ve proteinlerden oluşan ince bir tabakadır. Bu tabaka seçici geçirgenlik özelliği nedeniyle hücre içine giren ve hücre dışına çıkan moleküllere karşı bir bariyer olarak görev yapar. Seçici geçirgenlik özelliği bazı faktörlere bağlıdır: Proteinler gibi büyük moleküller sitoplazmik zardan geçemez. Buna karşılık basit şekerler, su, oksijen ve karbondioksit gibi küçük moleküller sitoplazmik zardan kolaylıkla geçerler.

2.1.2.1. Sitoplazma içinde bulunan yapılar

A. Çekirdek materyali (DNA), çift sarmallı DNA'nın uzun ve dairesel molekülünden meydana gelmiştir. Bu materyal, hücrenin yapıları ve fonksiyonları için gerekli olan tüm bilgileri taşımaktadır. Prokaryotik organizmaların çekirdek materyalinde, ökaryotik organizmaların aksine çekirdek zarı ve histonları bulunmaz. DNA; küresel, uzunumsu veya lobut şeklinde olabilir. Aktif halde gelişen bir bakteri hücresinin hacimsel olarak % 20'sini oluşturur ve sitoplazmik zara bağlı durumdadır. Sitoplazmik zarda bulunan proteinler, yeni oluşacak yavru hücre için anne hücredeki DNA'nın kopyalanmasını ve kopyalanan DNA'nın yavru hücreyle birlikte ayrılmasını sağlar.

B. Ribozomlar, bakteri hücresi için gerekli olan proteinlerin sentezlendiği, protein ve ribozomal RNA (rRNA) alt birimlerinden oluşan organellerdir ve sitoplazma içerisinde binlerce küçük yapılar olarak bulunurlar. Prokaryotik organizmaların ribozomları 70S'den daha küçük, ökaryotik organizmaların ribozomları 80S'den daha büyük

olmasıyla birbirinden ayırt edilir. Buradaki **S - Svedberg Birimi** olup, çok yüksek hızdaki santrifikasyon sırasında meydana gelen çökelmenin gerçek oransal miktarını gösteren birimdir. Çökelme oranı, partikülün boyutuna, ağırlığına ve şekline bağlıdır.

C. Granüller

C.1. Polisakkarit granülleri, bakteri hücre duvarının yapı taşıdır. Bakteri hücresinde karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Tipik olarak glukoz ve nişastadan meydana gelmiştir. Polisakkarit granüllerinin bakteri hücresinde bulunup bulunmadığını anlamak için iyot çözeltisi kullanılır. Bakteri hücresine iyot uygulaması sonucunda glukoz granülleri kırmızımsı kahverengi, nişasta granülleri ise mavi renkte görünür.

D. Endosporlar

Costridium ve *Bacillus* gibi Gram (+) bakteriler, besin maddeleri tükendiği veya hücreye yeterli su sağlayamadığı durumlarda **endospor** adı verilen “*dinlenici hücreler*” meydana getirirler. Endospor, bakteri hücresinin tüm özelliklerini taşıyan, kalın duvarlı, kuraklığa, sıcaklığa, birçok toksik kimyasal maddeye ve radyasyona karşı oldukça dayanıklı bir yapıdır.

Vegetatif bakteri hücresi içerisinde endospor gelişimine **sporulasyon** veya **sporogenesis** adı verilir. Sporogenesis oluşumunda, öncelikle DNA'nın ve sitoplazmanın küçük bir kısmı kendi kendini kopyalar. Daha sonra sitoplazmanın kendi kendini kopyalayan kısmı ile kopyalamayan kısmı birbirlerinden ayrılarak **spor bölmesi (septum)** adı verilen bir bölme meydana gelir. Spor bölmesi, içerisinde DNA bulunan sitoplazmayı kuşatarak çift tabakalı bir zar oluşturur. Çift tabakalı zar arasında kalın bir peptidoglikan tabakası meydana gelir.⁸ En son aşamada ise çift tabakalı zarın en dış kısmını kalın bir protein kılıfı sarar. Bu protein kılıfı, birçok

kimyasal maddeye karşı dayanıklılığı sağlamakta görevlidir. Endosporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, bakteri hücresinin çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Eğer endospor bakteri hücresinin ortasında ise **sentral**, ucunda ise **terminal** ve ucun biraz altında ise **subterminal** ismini alırlar

2.1.3. Kamçı (Çoğul: Flagella, Tekil: Flagellum)

Kamçılar; sitoplazmik zar ve hücre duvarına bağlı olarak çıkan, genellikle 3 - 20 µm uzunluğunda ve ipliğimsi şekilde olan, bakteri hücresine hareketlilik kazandıran yapılardır. Bir kamçı, **filament** ismi verilen halat şeklindeki yapıdan oluşur. Bu yapı **flagellin** adındaki iç kısmı boş halkadan oluşan proteinlerin birbirlerine bağlanarak oluşturdukları helezonumsu halat benzeri yapıdan meydana gelmiştir.

2.1.4. Fimbriae ve Pili

Genellikle Gram (-) bakterilerde kamçıdan daha kısa, daha düz, daha sert, daha ince, saç benzeri yapılar bulunur. Bu yapılar, **pilin** adı verilen helezonik bir proteinden meydana gelmiştir. Pilin proteinin, fimbriae ve pili olmak üzere iki tipi bulunur.

2.2. Koloni morfolojisi

Bir bakteri hücresinin katı besi yerinde çoğalarak oluşturduğu kümeye **koloni** adı verilir. Bakteri kolonileri cins düzeyinde belirgin özellikler gösterir.

Bakteri kolonileri geliştiği besi ortamına göre kendilerine özgü **renk maddeleri** (pigmentler) oluştururlar. Bu renk maddeleri hücre duvarında bulunur ve sadece koloniye renk verirler. Bazı bakterilerin kolonileri ise suda eriyen ve ortama yayılan renk maddesi oluştururlar. Bu tip pigmentlere **diffuze pigmentler** adı verilir

3. BAKTERİLERİN⁹ KİMYASAL YAPISI

Bakteri hücresi % 75 - 85 oranında su, % 15 - 25 oranında kuru maddeden meydana gelmiştir. Bakteri hücresindeki kuru maddenin % 70 - 79'u organik maddelerden, % 30 - 21'i inorganik maddelerden oluşur. Bakteri hücresindeki inorganik maddeler; % 2 - 6 fosfor (P), % 1 kükürt (S), % 5 - 7 sodyum (Na), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), klor (Cl), molibden (Mo), bakır (Cu), çinko (Zn) ve silisyum (Si)'dan oluşmuştur. Organik moleküller genel olarak karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerden meydana gelmiştir. Organik moleküller hücrede; % 3 DNA, % 4 fosfolipit, % 5 polisakkarit, % 6 lipit, % 12 RNA ve % 70 protein molekülleri olarak bulunur. Organik moleküllerin yapısı % 50 karbon (C), % 20 oksijen (O), % 10 - 15 azot (N) ve % 10 hidrojen (H) moleküllerinden oluşmuştur.

3.1. Karbonhidratlar

İçerisinde şeker ve nişasta bulunan çeşitli büyük yapılı organik bileşiklerden oluşan ve hücre içerisinde birçok ana görevi yerine getiren bir gruptur. Örneğin, bir çeşit şeker olan deoksiriboz, deoksiribonükleik asit (DNA)'in yapı taşıdır. Diğer şeker molekülleri ise bakterinin hücre duvarının oluşmasına yardımcı olur. Karbonhidratlar, Gram (-) bakterilerin hücre duvarında % 15 - 20 oranında, Gram (+) bakterilerin hücre duvarında ise % 35 - 60 oranında bulunur. Basit yapılı karbonhidratlar, amino asit ve yağların sentezlenmesinde kullanılırken, makro moleküler yapıdaki karbonhidratlar ise hücre için hazır enerji ve karbon kaynağı olarak görev alır.

3.2.2. Kompleks lipitler

Kompleks lipitler, basit lipitlerde₁₀ bulunan karbon, hidrojen ve oksijene fosfor, azot ve kükürt elementlerinin ilavesi ile ortaya çıkan makro

moleküllerdir. Kompleks lipitler fosfolitidler olarak da isimlendirilir. *Fosfolipitler*, hücrenin membranında ve hücre duvarında bulunur. Hücre duvarında bulunan *glkolipitler* gibi bazı kompleks lipitler ise boyama yöntemiyle bakterilerde tanı kriteri olarak ele alınır.

3.3. Proteinler

Proteinler, amino asitlerin peptid bağları ile birbirine bağlanması sonucu ortaya çıkan yüksek moleküler ağırlığa sahip organik moleküllerdir. Hücre duvarında ve sitoplazma içerisinde bulunurlar. Bu moleküllerin hücre içerisinde kimyasal reaksiyonları katalize eden *enzimler* olarak işlev görmesinin yanında *taşıyıcı proteinler* olarak bazı kimyasal maddeleri hücre içinden dışarıya - dışarıdan da içeriye taşınmasında rol oynarlar. *Bakteriyosinler* gibi bazı proteinler ise toksik etkileri nedeniyle diğer bakterilerin veya hücrelerin ölümüne neden olurlar.

3.3.1. Amino asitler

Amino asitler, proteinleri oluşturan yapı taşlarıdır. Bu moleküller, aynı alfa karbon (C_{α}) atomuna en az bir karboksil ($-COOH$) ve bir amino ($-NH_2$) grubunun bağlanmasıyla oluşur. Bu tip amino asitler, *alfa-amino asitler* olarak da isimlendirilir. Bir protein 20 farklı amino asitten oluşmasına rağmen, 50 ila yüzlerce amino asitin farklı uzunlukta, farklı kompozisyonlarda ve farklı yapıda bir araya gelmesiyle de oluşabilir. Amino asitlerdeki bu farklı diziliş farklı proteinlerin ortaya çıkmasına neden olur.

3.4. Nükleik Asitler

Nükleik asitlerin deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki tipi bulunur.

3.4.2. Ribonükleik asit (RNA)

RNA, DNA'dan birkaç yönden farklılık gösterir. DNA çift sarmallı iken RNA genellikle tek sarmallıdır. RNA nükleotitindeki 5 karbonlu riboz şekeri, deoksiriboza göre birden fazla oksijen atomuna sahiptir. RNA'da, DNA'dan farklı olarak Timin bazı yerine Urasil (Uracil) bazı bulunur. Diğer üç baz (A, G, C) ise aynıdır.

4. BAKTERİYEL METABOLİZMA

Canlı bir organizma içindeki tüm kimyasal reaksiyonlara **metabolizma** adı verilir. Metabolizma, canlı içerisinde biriken enerji ile açığa çıkan enerjiyi dengeleyen bir sistem olup, *katabolizma* ve *anabolizma* olmak üzere ikiye ayrılır. **Katabolizma**, hücre içinde kompleks organik moleküllerin daha basit moleküllere dönüşmesi sonucu enerjinin açığa çıktığı kimyasal reaksiyonlara verilen isimdir. Bu tip reaksiyonlar **katabolik** veya **indirgeme reaksiyonlar** olarak da adlandırılır. **Anabolizma** ise hücre içinde basit organik moleküllerin daha kompleks moleküllere dönüşmesi sonucu enerji birikiminin meydana geldiği kimyasal reaksiyonlara verilen isimdir. Bu tip reaksiyonlar **anabolik** veya **biyosentetik reaksiyonlar** olarak da adlandırılır. Örneğin basit şekerlerden polisakkarit ve nükleotitler; polisakkarit ve nükleotitlerden amino asitler ve nükleik asitler, amino asitlerden ise proteinlerin meydana gelmesi anabolik reaksiyon, bu moleküllerin kompleks yapılardan daha basit yapılara indirgenmesi ve bunun₁₂ sonucunda enerjinin (ATP) açığa çıkması ise katabolik reaksiyondur

4.1. Enzimler

Kimyasal reaksiyonları hızlandıran maddelere **katalist** ismi verilir. Canlı hücrelerde ise kimyasal reaksiyonlar **enzim** adı verilen biyolojik katalistler tarafından gerçekleştirilir. **Enzimler**, canlı hücrenin fizyolojik sıcaklık ve basıncını arttırmadan kimyasal reaksiyonları katalize eden spesifik proteinlerdir. Bu proteinler, 10.000'den birkaç milyona kadar atomik ağırlığa sahip ve genellikle küresel veya yuvarlağımsı büyük boyutlu yapılardır. Bilinen enzimlerin çoğı, karakteristik olarak 3 boyutlu şekle ve spesifik bir yüzeye sahiptir. Bu spesifik yüzey, **substratı** (enzimin etkilediğı madde veya molekül) diğere moleküllerden ayırt eder. Bazı enzimlerin tamamı proteinden oluşmasına rağmen, enzimlerin çoğı protein içeren ve protein içermeyen olmak üzere iki kısımdan meydana gelmiştir. Enzimin protein içeren kısmına **apoenzim**, protein içermeyen kısmına **kofaktör** adı verilir.

Enzimler hücrede bulunuş yerlerine göre isimlendirilir. Hücre içinde bulunan ve ortama salgılanmayan enzime **endoenzim** veya **intraselular enzim**, esas aktivitesi hücre dışında olan enzime ise **ekstraselular enzim** veya **ekzoenzim** denir.

Bitkilerde patojen olan bakterilerin tanısında enzimlerden yararlanılır. Tanıda kullanılan substratlar bakteri cinsine göre farklılık gösterir

4.1.2. Enzimatik aktiviteyi etkileyen faktörler

A. Sıcaklık

Birçok kimyasal reaksiyonların artış oranı, sıcaklığın artışıyla paralellik gösterir. Enzimatik reaksiyonlarda ise belirli bir sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda reaksiyon oranında düşme meydana gelir. Bunun nedeni belirli bir sıcaklık noktasından¹³ sonra enzimin 3 boyutlu protein yapısının bozulmasıdır. Meydana gelen bozulma, yüksek sıcaklığa bağılı

olarak proteindeki hidrojen bağların ve kovalent olmayan bağların kırılmasından kaynaklanır. Düşük sıcaklıklarda ise enzimler, molekülleri sentezleyecek yeterli enerjiye sahip değildirler (Şekil 4.4).

B. pH

Enzim aktivitesi optimum pH değerinde en yüksek seviyeye ulaşır. Bu değer üzerindeki ve altındaki pH değerleri arasında enzim aktivitesinde düşme meydana gelir. Ortamdaki H⁺ iyonu veya -OH iyonu konsantrasyonu değiştiğinde enzimin amino asitlerinde ve proteinin 3 boyutlu yapısında değişiklikler ortaya çıkar. pH'daki aşırı değişiklikler ise protein yapısının bozulmasına neden olur (Şekil 4.4).

C. Substrat konsantrasyonu

Enzimin belirli bir miktarı ile substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda spesifik bir reaksiyonun katalizi en yüksek seviyeye ulaşır. Substrat konsantrasyonunun sürekli arttığı, buna karşılık enzim miktarının sabit kaldığı koşullarda enzim aktif bölgesinin substrat molekülü tarafından sürekli dolu tutulacağından, reaksiyon oranında herhangi bir artış görülmez.

D. Engelleyiciler (İnhibitörler)

Bakterilerin gelişimini önlemek için bunların enzimlerini kontrol altına almak etkili bir yoldur. Konsantre asitler ve bazlar, arsenik, kurşun ve civa gibi ağır metaller, alkol ve ultraviyole ışınlar; enzimler için zehir özelliğindedir. Bu tip faktörlerin etkisiyle enzimlerin inaktive olmaları sonucunda hücre fonksiyonları durarak hücrede ölüm meydana gelir.

4.2. Beslenme

Tüm organizmalar, genellikle metabolik olarak enerji ve karbon kaynaklarına göre sınıflandırılır. Enerji₁₄ kaynağı kullanımlarına göre;

organizmalar *fototroflar* ve *kemotroflar* olmak üzere iki grup altında toplanırlar.

Fototrofların birincil enerji kaynağı ışık iken kemotrofların enerji kaynakları organik ve inorganik bileşiklerin *oksidasyon – redüksiyon* reaksiyonları sonucu ortaya çıkan bileşiklerdir. Karbon kaynağı kullanımlarına göre; ise organizmalar; karbondioksit kullanan *ototroflar* ve bir organik karbon kaynağına ihtiyaç duyan *heterotroflar* olarak iki gruba ayrılırlar.

5. BAKTERİLERDE SALGI SİSTEMLERİ

Bakteri hücresi; kendini koruma amacıyla toksin, enzim veya çeşitli tipte virülens faktörlerini salgıladığı gibi, hücresel taşıma faaliyetleri sırasında kendisi için gerekli olan moleküllerin hücre yüzeyinden, hücre duvarından veya hücre zarından taşınması için de salgı salgılar. Ayrıca salgıyı iletişim amacıyla da kullanır.

Bitki ve hayvan patojeni bakteriler, hücre dışına protein salgılamasını kendi türüne özgü protein taşıma sistemi ile gerçekleştirir. Baz dizisi analizine göre bitki ve hayvan patojeni bakterilerin sahip oldukları hücre dışı salgı sistemleri büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu benzerliklere göre bakterilerdeki salgı sistemlerini Gram negatif bakterilerde; Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV ve Tip V olmak üzere 5 grupta, Gram pozitif bakterilerde; Tip I, Tip II ve Tip V olmak üzere 3 grupta toplamak mümkündür.

6. BAKTERİYEL GELİŞME

Bakteriyel gelişme için gerekli koşulları fiziksel ve kimyasal faktörler olmak üzere iki kısma ayırmak mümkündür.

6.1. Fiziksel faktörler

6.1.1. Sıcaklık

Bakterilerin çoğu kendi türlerine özgü belirli sıcaklık sınırları arasında gelişirler. Bakterilerin en iyi gelişme sıcaklığı *optimum sıcaklık* olarak belirtilir. *Minimum* ve *maksimum sıcaklık* değerleri ise gelişme sıcaklığının en alt sınırını ve en üst sınırını ifade eder. Bakterilerde minimum ve maksimum sıcaklık değerlerinin ötesindeki sıcaklıklarda ilk önce gelişme durur, daha sonra ölüm meydana gelir. Bakteriler, sıcaklık isteklerine göre psikrofilik, mezofilik ve termofilik olmak üzere 3 gruba ayrılırlar:

A. Psikrofilik (psychophilic) bakteriler, soğuk seven bakterilerdir ve gelişmeleri için sıcaklık istekleri; minimum 0 °C, optimum 10 - 20 °C ve maksimum 30 °C'dir. Bu tip bakteriler genellikle soğukta depolanan gıdalarda, okyanus veya denizlerin dip kısımlarında bulunurlar.

B. Mezofilik (mesophilic) bakteriler, ılık seven bakterilerdir. Gelişmeleri için sıcaklık istekleri minimum 5 - 25 °C, optimum 25 - 37 °C, maksimum 40 - 45 °C'dir. Genellikle bitki patojeni bakterilerin gelişmesi için optimum sıcaklık 25 - 28 °C'dir.

C. Termofilik (thermophilic) bakteriler ise sıcak seven bakteriler olarak isimlendirilir. Bu tip bakteriler sıcak su kaynaklarında bulunurlar. Bunların gelişmeleri için sıcaklık istekleri minimum 40 - 45 °C, optimum 60 - 65 °C ve maksimum 90 °C'dir.

6.1.2. pH

Birçok bakteri, nötre yakın 6.5 - 7.5 pH değerleri arasında, genellikle bitki patojeni bakteriler ise 6.8 - 7.0 pH değerleri arasında gelişirler. Bununla birlikte kükürtü okside ederek sülfirik asit (H_2SO_4) oluşturan ve pH 1 değerlerinde yaşayan bazı bakteriler (*Thiobacillus sp.*) de bulunur.

Bakteriler besi ortamlarında gelişirken genellikle asit oluştururlar. Asit oluşumunu nötralize etmek için besi ortamına tampon maddeler (buffers) olarak isimlendirilen kimyasal maddeler ilave edilir. Bazı besi ortamlarındaki *peptonlar*, amino asitler ve birçok besi ortamındaki fosfat tuzları tampon maddeleri olarak bilinir. Özellikle fosfat tuzları toksik özellikte olmayan, pH değerini bakterilerin gelişme aralığında tutmada etkili olan ve bakterilerin gelişmesinde besin elementi olarak kullanılan bileşiklerdir.

6.1.3. Ozmotik basınç

Bakteriler, bütün besin maddelerini su içeren koşullarda temin ederler. Bu nedenle gelişebilmeleri için % 80 - 90 oranında suya ihtiyaç duyarlar. Ortamdaki yüksek ozmotik basınç, bakteri hücresi içerisindeki suyun hareketini etkiler. Örneğin, ortamdaki tuz (NaCl) veya şeker konsantrasyonu, bakteri hücresi içerisindeki tuz veya şeker konsantrasyonundan daha yüksek ise hücre içerisindeki su, sitoplazmik zardan geçerek ortama karışır (*hipertonik durum*). Bunun sonucunda hücrede suyun ozmotik basıncı azaldığı veya kaybolduğu için, **plazmoliz** adı verilen büzülme meydana gelir. Eğer bakteri hücresi içerisindeki tuz veya şeker konsantrasyonu, ortamdaki tuz veya şeker konsantrasyonundan daha yüksek ise ortamdaki su sitoplazmik zardan geçerek bakteri hücresi içerisine girer (*hipotonik durum*).

6.2. Kimyasal faktörler

6.2.1. Karbon

Bakteriyel gelişmenin en önemli faktörlerinden birisi suyun haricinde karbon elementidir. Karbon, canlı hücrelerin omurgası durumundadır. Canlı hücrelerdeki tüm organik bileşiklerin yapı taşı karbon elementinden oluşur. Kemoheterotroflar enerji kaynağı olarak karbonu proteinlerden, karbohidratlardan ve lipitlerden elde ederler. Kemoototroflar ve fotoototroflar ise karbonu CO₂'den elde ederler.

6.2.4. Oksijen

Bakterilerin gelişebilmeleri ve hayatlarını devam ettirebilmeleri için oksijene olan ihtiyaçları farklılık gösterir. Buna göre bakteriler oksijen istekleri açısından *obligat aeroblar*, *fakültatif anaeroblar*, *obligat anaeroblar* ve *mikroaerofiller* olmak üzere 4 grup altında incelenirler:

6.3. Bakteriyel çoğalma

Bakterilerin büyük bir bölümü bölünerek çoğalırlar. Bakteri hücresi; bölünmeye başlamadan önce iki kardeş hücreye yetecek kadar enzimleri, organik ve inorganik maddeleri bünyesinde hazırlar ve biriktirir. Daha sonra hücre uzar ve kromozomal DNA ikiye bölünür. Sitoplazmik zar, içeri doğru katlanarak ikiye bölünen kromozomal DNA'yı birbirinden ayıracak şekilde hücreyi ikiye ayırır. En son aşamada ise iki sitoplazmik tabaka arasında hücre duvarı oluşarak, iki ayrı bakteri hücresi meydana gelir (Şekil 6.3).

Actinomycetes gibi bazı bakteriler ise ipliğimsi şekilde gelişirler ve tomurcuklanma ile ürerler. Bu çoğalma şeklinde ana hücre üzerinde bir gelişme meydana gelir. Bu yeni hücre, ana hücrenin boyutlarına ulaşıncaya kadar gelişimine devam eder. Sonunda ipliğimsi yapının ucunda birbirine bağlı spor zincirleri meydana gelir.

6.3.2. Bakteriyel gelişmenin ölçülmesi

Bakteri sayısını matematiksel olarak tespit etmenin yanında, süspansiyondaki bakteri yoğunluğunu belirlemek amacıyla *türbidimetrik ölçümler* [McFarland skalası ve foto elektronik ölçümler (kolorimetre ve spektrofotometre)], *petride koloni sayımı* ve *bakteri hücrelerinin doğrudan sayımı* gibi yöntemler kullanılır.

A. Türbidimetrik ölçümler

Türbidimetrik yöntemlerin avantajı, hızlı ve doğrudan süspansiyondaki yoğunluğun belirlenmesi ve bakteri hücre sayısının ayarlanabilmesidir. Dezavantajı ise sayılan bakteri hücre sayısı içerisinde cansız hücrelerin de bulunmasıdır.

B. Petride koloni sayımı

Bu yöntemin avantajı, sadece canlı bakteri hücre sayılarının doğru bir şekilde belirlenmesidir. Dezavantajı ise fazla iş gücü gerektirmesi ve zaman alıcı olmasıdır.

C. Bakteri hücrelerinin doğrudan sayımı

Bu yöntemde özel yapılmış lam ve lamel kullanılır ve ışık mikroskopunda bakteriyel süspansiyon içerisindeki bakteri hücre sayısı belirlenir. Uygulamada kullanılan özel lam 16 büyük kareden ve büyük karelerin her biri ise 25 küçük kareden meydana gelmiştir

6.3.3. Bakterilerde çoğalma dönemleri

Sıvı ortama inokule edilen bakteri hücreleri zamana bağlı olarak bir gelişme eğrisi gösterir. Bu gelişme₁₉ eğrisi, *başlangıç dönemi*,

logaritmik çoğalma dönemi, sabit dönem ve logaritmik ölme dönemi olmak üzere başlıca 4 dönemden oluşur

A. Başlangıç döneminde, ortama inokule edilen bakteri hücrelerinin sayısında herhangi bir değişiklik meydana gelmez. Fakat bakteri hücresi dormant olmadığı için özellikle DNA ve enzim sentezi gibi metabolik aktiviteler görülür. Bu dönemin uzunluğu veya kısalığı bakteri türüne bağlı olmakla birlikte, ortam pH'sına, sıcaklığına, ozmotik basınca, besi yerinin bileşimine ve inokule edilen bakterinin alındığı kültürün dönemine bağlı olarak değişiklik gösterir.

B. Logaritmik çoğalma döneminde kendisi için gerekli maddeleri sentezleyen bakteri hücreleri türlerine özgü bölünerek çoğalmaya başlarlar. Bu evrede bakteri hücrelerindeki metabolik aktivite en üst seviyededir. Buna bağlı olarak bakteri sayısı, belirli bir zaman aralığında hızla artarak çoğalma eğrisinde dik bir gelişme gösterir. Fakat bu dönemde bakteri hücreleri fizyolojik ve kimyasal etkenlere karşı oldukça duyarlıdır.

C. Sabit dönemde bakteriyel hücrelerin içerisinde bulunduğu besi ortamı, geçen süreye bağlı olarak bakteriyel gelişmeden olumsuz yönde etkilenir. Bunun sonucunda da bakteriyel hücrelerde ölüm görülmeye başlar. Bu evrede bakteriyel hücrelerin ölümü ile yeni bölünen hücreler sayıca birbirlerini dengeledikleri için canlı hücre sayısı sabit kalır. Sabit dönem uzadıkça bakterilerin hücre morfolojilerinde ve fizyolojik karakterlerinde bazı değişimler meydana gelir.

D. Logaritmik ölme döneminde ise ölen bakteriyel hücrelerin sayısı, yeni oluşan bakterilerin sayısına göre oldukça fazladır. Bu durumda bakteri popülasyonu giderek azalır; ancak popülasyondaki tüm bakteriler ölmediğinden, gelişme eğrisi sıfıra ulaşmaz.

Bakterilerde çoğalma döneminin çok uzun süre devam etmemesinin nedeni, ortamdaki besin maddelerinin veya enerji kaynaklarının harcanması, metabolizma atıkları, toksik maddelerin birikimi, ozmotik basıncın değişmesi, karbonhidratların parçalanması sonucu oluşan organik asitlerin pH'yı düşürmesi ve oksijenin azalması gibi faktörlerdir. Bakteri hücrelerini sürekli çoğalma döneminde tutabilmek için *kemostat* ve *türbidiostat* gibi özel aletler geliştirilmiştir. **Kemostat**, bakteri hücrelerinin çoğalma durumuna göre ortama belirli zaman aralıklarında taze besi yeri ilave eden ve aynı miktarda kullanılmış besi yerini dışarı çıkaran bir alettir. **Türbidiostat** ise çoğalma sonucu oluşan bulanıklık belirli bir düzeye ulaşınca foto elektronik yöntem ile kontrol edilen ortama taze besi yeri ilave eden ve aynı miktarda kullanılmış besi yerini dışarı çıkaran bir alettir.

7. BAKTERİYEL GELİŞMENİN ENGELLENMESİ

Bakteriyel gelişmenin engellenmesi, ya bakteriyel hücrelerin öldürülmesi ya da gelişmelerinin durdurulması şeklinde ele alınabilir. Bu amaçla fiziksel işlemler veya kimyasal maddeler kullanılır. Mikroorganizmaları öldüren maddeler “**sidal**”, onları öldürmeden gelişimini engelleyen maddeler ise “**statik**” ekleriyle sonlanır. Örneğin; bakterileri öldüren kimyasal maddelere **bakterisidal**, gelişimlerini engelleyenlere ise **bakteriyostatik** (bazı boyalar ve soğutucular) ismi verilir. Mikroorganizmaların öldürülmesi veya gelişmelerinin yavaşlatılması amacıyla fiziksel veya kimyasal maddelerle değişik uygulamalar yapılabilmektedir. Bir₂₁ materyalin üzerinde veya içerisindeki tüm mikroorganizmaların fiziksel uygulamalar, kimyasal

maddeler, radyasyon veya filtrasyon gibi herhangi bir işlemle öldürülmesine veya elemine edilmesine genel olarak **sterilizasyon** adı verilir.

7.1. Fiziksel uygulamalar

7.1.1. Sıcaklık uygulamaları

Sıcaklık uygulamaları, özellikle laboratuvar malzemelerinin ve besi ortamlarının sterilizasyonunda kullanılan çok yaygın ve ekonomik bir işlemdir. Bu amaçla kuru ve buharlı sıcaklık uygulaması kullanılır. Ayrıca düşük sıcaklık uygulamaları ile bakteriyel gelişme yavaşlatılıp, geciktirilebilir.

7.1.3. Filtrasyon uygulaması

Filtrasyon, bakteri ve fungus gibi mikroorganizmaların küçük delikciklere sahip (0.1 – 0.45 µm) filtrelerden geçirilerek, içinde bulunduğu sıvı veya gaz ortamından uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlem, özellikle içerisinde antibiyotik, vitamin veya amino asit gibi belirli sıcaklıklarda yapısı bozulan maddelerin bulunduğu çözeltiler için kullanılır. Bu amaçla günümüzde **membran filtreleri** kullanılmaktadır. Membran filtrelerinin yapısı selüloz esterleri veya plastik polimerlerinden oluşur. Ancak virüsler, hücre duvarı çok esnek olan Spirochete gibi bakteriler ve hücre duvarı olmayan phytoplasmalar (mycoplasmalar) bu filtrelerden geçebilmektedir.

7.1.4. Radyasyon uygulaması

Özellikle cam, polietilen veya plastik gibi malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılır. *Dalga boyu, yoğunluğu ve süresine* bağlı olarak radyasyonun hücreler üzerinde²² değişik etkileri vardır.

Radyasyon uygulamasının iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere iki tipi bulunur.

7.2. Kimyasal maddeler

7.2.1. Fenol ve fenolik bileşikler

Bu kimyasallar dezenfektan olarak kullanıldığında; sitoplazmik membran, enzim ve protein yapılarının bozulmasına neden olurlar. En yaygın olarak kullanılan fenolik bileşikler arasında *krezzoller* (*O-phenylphenol*), *lizol* ve *heksaklorofen* yer alır. Özellikle *heksaklorofen* antibakteriyel olarak sabunlarda, deodorantlarda, diş macunlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

7.2.2. Halojenler

Özellikle iyot ve klor en etkili antimikrobiyal halojen elementlerdir. Bu elementler organik ve inorganik moleküllerle bileşik oluşturabilirler. İyot; vegetatif bakteri hücrelerini ve endosporları öldürebilen çok etkili bir dezenfektandır. Bu element, amino asitlerle, enzimlerle, bazı yağ asitleriyle ve proteinlerle bileşikler oluşturup, onların aktivitelerini engelleyerek hücre ölümüne neden olur. Klorun ise sodyum hipoklorit (NaOCl) ve kalsiyum hipoklorit [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$] olmak üzere 2 tip bileşiği dezenfektan olarak kullanılır.

7.2.3. Alkoller

Alkoller, bakteri hücrelerini öldürmede etkili olmalarına rağmen endosporlara karşı etkisizdirler. Bakteri hücrelerinde protein yapısının bozulmasına ve lipitlerin çözülmesine neden olurlar. Bu amaçla en çok etil alkol kullanılır. Etil alkolün²³ mikroorganizmaları öldürmek için optimum % 70'lik konsantrasyonu etkilidir.

7.2.4. Ağır metal tuzları

Bakterilerin öldürülmesi amacıyla % 1'lik gümüş nitrat, % 0.1 - 0.5'lik civa klorür ve % 5'lik bakır sülfat bileşikleri kullanılır.

7.2.5. Aldehitler

Çok etkili antimikrobiyallerdir. Bunlara *formaldehit* ve *glutaraldehit* örnek verilebilir. Bu maddeler; proteinlerdeki amino (-NH₂), hidroksil (-OH), karboksil (-COOH) ve sülfidril (-SH) gibi gruplarla kovalent bağ oluşturarak proteinleri inaktif hale getirirler. Her iki maddenin de bakterisidal ve virüsidal etkisi bulunmaktadır.

7.2.6. Gazlar

Etilen oksit, kapalı bir mekanın sterilizasyonu amacıyla kullanılan en uygun gazlardan biridir. Bu gaz, -CH₂CH₂OH gibi alkil gruplarının, proteindeki -SH, -COOH veya -OH grupları yerine bağlanmasını sağlayarak protein yapısının bozulmasına neden olur. Hem vegetatif bakteri hücrelerini hem de endosporları öldürücü etkiye sahiptirler.

7.3. Antibiyotikler

Antibiyotikler, toprakta yaşayan mikroorganizmalar tarafından ikincil metabolitler olarak üretilen, düşük moleküler ağırlığa sahip, protein yapısında olmayan ve mikroorganizmaların gelişimini engelleyen veya öldüren moleküllerdir.

8. BİTKİ KORUMA AÇISINDAN ÖNEMLİ BAKTERİLER

Bitki koruma açısından en önemli bakteri grubunu bitkilerde hastalık yapan bakteriler oluşturur. Bu grubun ardından ise sırasıyla biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler ve serbest azotu fikse ederek bitkilerle ortak yaşayan bakteriler gelir.

Bitkilerde patojen olan bakterilerin belirtileri 4 grup altında toplanabilir. Bu belirti tipleri şunlardır:

- a) Bakteriyel etmenin enfeksiyonu sonucu bitki dokusundaki hücreler hızlı şekilde öler, bitkide kanser, yanıklık ve leke oluşumu gibi belirtiler meydana gelir. Lekelerin etrafı genellikle sarı, ortası ise koyu renklidir. Koyu renk oluşumu, okside olmuş polifenoller ve melanin gibi koyu renkli pigmentlerin birikiminden kaynaklanır.
- b) İletim demetlerinin bakteriyel etmenler tarafından istilası sonucu solgunluk meydana gelir.
- c) Bakteriler tarafından hücrelerin bozulması sonucu dokularda “yumuşak çürüklük” adı verilen yumuşama meydana gelir.
- d) Anormal hücre bölünmesi veya çoğalması nedeniyle, dokuların uzaması ve genişlemesi sonucu tümör - ur oluşumu veya **fasiasyon** (yassılaşıma) belirtileri meydana gelir.

Belirti tipi konukçuya ve patojenin sahip olduğu hastalık yapıcı genlere göre farklılık gösterir. Genellikle bitki patojeni bakteriler, çubuk şeklinde, aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen etmenlerdir (*Bacillus* spp. ve *Clostridium* spp. spor oluşturur). *Streptomyces* spp. ise fastidious, miselimsi gelişen bakterilerdir. Bitki patojeni olan 30 farklı cins veya grup bulunmaktadır.

8.1. Acholeplasmatales

8.1.1. Acholeplasmataceae

Bu familyaya ait türler daha önceden *Mycoplasma* türleri içerisinde iken günümüzde *Acholeplasma* cinsine dahil edilmiştir.

Acholeplasma

Bu cinse ait türler, Gram (-), fakültatif anaerobik, hücre duvarı olmayan, yuvarlağımsı (0.3 µm) veya ipliğımsi (2 - 5 µm), hareketsiz, spor oluşturmeyen, 20 - 40 °C'ler arasında gelişebilen bakterilerdir. Bitkilerde 2 adet önemli türü bulunur:

Etmen	Konukçu
<i>Acholeplasma brassicae</i>	Lahana
<i>A. palmae</i>	Palmiye

8.2. Actinomycetales

8.2.1. Micrococcineae

8.2.1.1. Micrococcaceae

Bu familyadaki bakteriler; Gram (+), obligat aerobik, yuvarlak şekilli, spor oluşturmeyen, optimum 25 - 30 °C'de gelişen bakterilerdir. Birçok türü turuncumsu veya sarı pigment üretir.

Arthrobacter

Bu cinse ait türler, Gram (+), obligat aerobik, çubuk veya yuvarlak şekilli, kutuptan bir veya birkaç kamçılı, hareketli, spor oluşturmeyen bakterilerdir. Kolonileri düzgün yüzeyli, düzgün kenarlı ve sarı renklidir. Bitkilerde patojen olan 1 adet türü bulunur:

Etmen	Konukçu	Hastalık Tipi
<i>Arthrobacter ilicis</i> Syn. <i>Corynebacterium ilicis</i>	<i>Ilex opaca</i> (Amerikan çoban püskülü)	Yanıklık

8.2.1.2. Microbacteriaceae

Bu familyada yer alan bakteriler; Gram (+), aerobik, hareketli veya hareketsiz, pleomorfik çubuklar şeklindeki bakterilerdir. Besi ortamında açık sarı veya portakal renkli akışkan (mukoid) koloniler oluştururlar. Önemli cinsleri arasında *Clavibacter*, *Curtobacterium* ve *Rathayibacter* yer alır

8.2.1.3. Nocardiaceae

Bu familyaya ait bakteriler, Gram reaksiyonları bakımından değişken olup, 0.5-1.2 µm boyutlarında, yuvarlak, çubuk şeklinde veya miselimsi gelişme gösterirler.

A. *Nocardia*

Bu cinstekiler Gram (+), aerobik, hareketsiz, miselimsi yapılı ve katalaz testine pozitif reaksiyon gösteren bakterilerdir. Bitki patojeni olarak 1 adet türü vardır.

Etmen	Konukçu	Hastalık Tipi
<i>Nocardia vaccinii</i>	Kavak	Kabuk nekrozu

8.3. Bacillales

8.3.1. Bacillaceae

Familyaya ait türler, Gram (+), çubuk şekilli, spor oluşturan, peritrik veya lateral kamçılı bakterilerdir. Endosporları yuvarlağımsı veya elipsoiddir. Familyanın *Bacillus* ve *Paenibacillus* olmak üzere 2 cinsi bulunur. Bu cinslere ait türler; aerobik veya fakültatif anaerobik, toksin oluşturan ve katalaz testine pozitif reaksiyon veren bakterilerdir. Bazı türleri bitkilerde ve böceklerde patojendirler.

8.4. Burkholderiales

8.4.1. Burkholderiaceae

A. Burkholderia

Bitki patojeni II. Grup *Pseudomonas* türlerinden bazıları, 16S rDNA sekansındaki benzerliğe göre *Burkholderia* cinsine dahil edilmiştir (Çizelge 8.4). *Burkholderia* cinsine ait türler Gram (-), obligat aerobik, çubuk veya hafif bükük çubuk şeklinde, 0.5 - 1.0 x 1.5 - 4.0 µm boyutlarında, polar kamçılı katalaz testine pozitif reaksiyon gösteren ve hücrelerinde *poli-beta hidroksibütirat* bulunduran bakterilerdir.

B. Ralstonia

Pseudomonas'ların II. grubunda bulunan bazı türler, 16S rDNA sekansındaki benzerliğe göre *Ralstonia* cinsine dahil edilmiştir. *Ralstonia* cinsi içerisinde bitkilerde patojen olan en önemli tür *Ralstonia solanacearum*'dur. Bu türün biyokimyasal testler, yağ asiti analizi, seroloji ve DNA hibridizasyonuna göre 5 adet ırk veya biyolojik varyetesi ve Restriction Length Fragment Polymorphism (RFLP) analizine göre ise 2 adet grubu saptanmıştır

8.4.2. Comamonadaceae

A. Acidovorax

Pseudomonas'a ait türlerden bazıları *Acidovorax* cinsine dahil edilmiştir. Bu cinse ait türler, Gram (-), düz veya hafif bükük çubuk şekilli, kutuptan çok kamçılı, 0.2 - 0.8 x 1.0 - 5.0 µm boyutlarında, oksidaz testine pozitif reaksiyon veren, DNA'daki G+C içeriği % 62 - 66 mol olan bakterilerdir (Çizelge 8.6).

8.5. Clostridiales

8.5.1. Clostridiaceae

Clostridium

Bu cinse ait türler, Gram (+), spor oluşturan, anaerobik, çubuk şekilli ve katalaz testine negatif reaksiyon veren bakterilerdir. Bitkilerde patojen olan 1 adet türü bulunur:

Etmen	Konukçu	Hastalık Tipi
<i>Clostridium puniceum</i>	Kavak, Karağaç, patates	Çürüklük

8.6. Entomoplasmatales

8.6.1. Entomoplasmataceae

Bu familyaya ait cinsler daha önceleri Mycoplasma cinsi içerisinde yer alırken, daha sonra *Entomoplasma* ve *Mesoplasma* olmak üzere iki cinse ayrılmıştır.

8.6.2. Spiroplasmataceae

Spiroplasma

Bu cinse ait türler Gram (-), spiral şekilli, hareketli, bitkinin floeminde bulunan ve besi ortamında da gelişebilen, DNA'daki G+C içeriği % 25 - 30 mol olan bakterilerdir. Hem bitki hem de böceklerde patojen türleri bulunmaktadır. Bitkilerde başlıca belirtiler; cüceleşme ve sararmadır. Diğer belirtileri ise yaprak, çiçek ve meyvede küçülme şeklindedir.

B. Serratia

Bu cinse ait türler Gram (-), Fakültatif anaerobik, çubuk şekilli, peritrik kamçılı, genellikle spor oluşturmayan, bazı türleri oda sıcaklığında *prodigiosin* isimli suda çözünmeyen kırmızı pigment oluşturan bakterilerdir. Hem bitkilerde hem de böceklerde patojen olan 1 türünün yanında bitki gelişimini teşvik edici türü de bulunur

8.8. Legionellales

8.8.1. Coxiellaceae

Bu familyaya ait cinsler insan,²⁹ hayvan ve böceklerde patojen

olan türlere sahiptir.

Rickettsiella

Bu cinse ait türler Gram (-), aerobik, çubuk veya yuvarlak şekilli, spor oluşturmeyen bakterilerdir. *Rickettsia* cinsi ile isim benzerliği olmasına rağmen DNA homolojisi açısından iki cins de birbirinden farklıdır. Türlerinin büyük bir bölümü böceklerde patojendir (Çizelge 8.20). Enfeksiyon sonucu sindirim kanallarına yerleşen bakteri; *lesitinaz*, *proteinaz* veya *kitinaz* gibi enzimleri yardımıyla mide dokularını tahrip ederek, böceklerde başlangıçta iştahsızlık, ishal ve kusma belirtilerine neden olur.

8.10. Nitrosomonadales

8.10.1. Nitrosomonadaceae

Bu familyadakiler bitkilerle ortak yaşama sahip olmayan, ancak havanın serbest azotunu toprağa fikse ederek, bitkilerin azotu kullanabilmesine imkan sağlayan bakterilerdir. Familyaya ait türler; Gram (-), hareketli, çubuk veya pleomorfik, spor oluşturmeyen bakterilerdir. Bu bakterilerin en önemli özellikleri enerji kaynağı olarak sadece nitriti kullanmalarıdır. Optimal gelişme koşulları 28 °C ve 7.6 - 7.8 pH değerleri arasındadır

8.10.2. Ectothiorhodospiraceae

Nitrococcus

Nitrococcus'lar da bitkilerle ortak yaşama sahip olmayan, ancak havanın serbest azotunu toprağa fikse ederek, bitkilerin azotu kullanabilmesine imkan sağlayan bakterilerdir.

8.11. Pseudomonadales

8.11.1. Pseudomonadaceae

Bu familyaya ait bakteriler; Gram (-), çubuk şeklinde, tek veya çok polar kamçılı ve katalaz testine pozitif reaksiyon verirler. Toprak ve bitkilerden izole edilirler. Familyanın cinsleri arasında *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azotobacter* ve *Rhizobacter* yer alır.

A. *Pseudomonas*

Bu cinse ait türler düz veya hafif bükük çubuk şekilli, 0.5 - 1.0 x 1.5 - 4.0 µm boyutlarında, kutuptan tek veya çok kamçılı bakterilerdir. DNA'daki G+C içeriği % 58 - 71 mol'dür. Bazı türleri suda çözünebilir *pyoverdine* isimli pigment maddesine sahiptir (*Pseudomonas aeruginosa* mavi renk oluşturan *phycocyanin* pigmentine sahiptir). Bu pigment maddeleri ultraviyole ışık altında mavimsi veya yeşilimsi - sarı renkli floresan parlama özelliğindedir.

B. *Azomonas*

Bu cinslere ait türler Gram (-), aerobik, 2.0 x 4.0 µm boyutlarında çubuk veya lobut şekilli, hareketli, bitkilerle ortak yaşama sahip olmayan, ancak havanın serbest azotunu fikse ederek bitkilere dolaylı faydası olan bakterilerdir. Demir eksikliği görülen topraklarda floresan siderefor özelliğinde olan *azoverdin* maddesi üretirler. Türleri arasında; *Azomonas agilis*, *A. insignis* ve *A. macrocytogenes* yer alır.

C. *Azotobacter*

Bu cinse ait türler Gram (-), aerobic, 2.0 x 4.0 µm boyutlarında, yuvarlağımsı-çubuk veya yuvarlak şekilli, bazı türleri peritrik kamçılı (*Azotobacter chroococcum*, *A. armeniacus* ve *A. paspali*) bazıları (*A. beijerickii* ve *A. nigricans*) ise kamçısız, endospor oluşturmeyen, suda çözünebilir sarımsı-yeşil (*A. vinelandii* ve *A. paspali*) veya kırmızımsı-mor / kahverengimsi-siyah (*A. nigricans* ve *A. armeniacus*) koloni oluşturan, optimum 20 - 30 °C ve 7.0 - 7.5 pH değerlerinde gelişen katalaz testine pozitif reaksiyon gösteren, G+C oranı % 63 - 66 mol olan bakterilerdir.

B. *Rhizobium* (Syn. *Azorhizobium*)

Bu cins içerisinde yer alan türler Gram (-), çubuk şeklinde, aerobik, peritrik veya polar kamçılıdırlar. Generasyon süresi 6 saatten azdır. *Rhizobium* türlerinin tarımsal açıdan önemi, bitkilerin köklerini istila edip, kolonilerinin bulunduğu bölgelerde nodüller oluşturması ve faaliyetleri sonucu azotu amonyağa dönüştürerek, bitkilerin azottan yararlanmasını sağlamasıdır. Azotun fikse edilmesine neden olan etken, aynı *operon* üzerindeki H, D ve K genleridir. Bu genler *Bradyrhizobium*'dan farklı olarak hem plasmit hem de kromozom üzerinde bulunur.

8.14. Rhodospirallales

8.14.1. Acetobacteriaceae

Bu familyaya ait bakterilerin çoğu Gram (-), aerobik, spor oluşturmeyen, çubuk veya elipsoid hücreye sahiptirler. Familya üyelerinden *Acetobacter* peritrik kamçılı iken, *Gluconobacter* polar kamçılıdır. Optimal gelişme koşulları 25 - 30 °C dir.

8.15. Sphingomonadales

8.15.1. Sphingomonadaceae 32

***Sphingomonas* (Syn. *Rhizomonas*)**

Bu cinse ait türler; Gram (-), aerobik, çubuk şekilli, yandan, kutup altından veya kutuptan tek kamçılı, ortası kubbeli (umbonate), katı ve kenarları kırışık kremimsi-beyaz koloni oluşturan bakterilerdir. Optimum 29-33 °C’de gelişirler. Oksidaz, katalaz ve nitratı nitrite indirgeme testlerine pozitif; jelatini eritme, nitrogenaz ve arjinin dehidrolaz testlerine negatif reaksiyon verirler. Bitkilerde patojen olan türleri Çizelge 8.34’de verilmiştir.

B. *Xylella*

Xylella fastidiosa; önceleri ksilem demetlerinde bulunan asmada Pierce’s hastalığı olarak bilinen viral bir etmen, 1973 yılında ise rickettsia benzeri organizma şeklinde tanısı yapılmıştır. 1986 yılında *X. fastidiosa* ismini almıştır. Etmen Gram (-), düz veya hafif bükük çubuk şekilli, 0.2 - 0.4 x 1.0 - 4.0 µm boyutlarında, kamçısız, hücre duvarı iki katlı ve dıştaki tabaka kıvrımlı yapıya sahip olan bakteridir. Katalaz ve jelatinaz testlerine pozitif; oksidaz, lipaz, amilaz ve indol oluşumu testlerine ise negatif reaksiyon verir.

Etmen birçok bitkide hastalığa neden olur. Bunlar arasında asmada Pierce’s hastalığı; yonca cüceliği; bademde yaprak kenarı nekrozu; erikte yaprak yanıklığı; şeftalide cücelik; turunçgil, meşe ve karaağaçta kuruma yer alır. Etmenin taşınmasında cüce ağustos böcekleri rol oynar.

9. BİTKİ PATOJENİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU

Bitki patojeni bakterilerin izolasyonunda en önemli güçlük, bitki içerisinde veya yüzeyinde saprofitik olarak bulunan ve genel besi yerlerinde çok hızlı çoğalıp gelişen bakterilerin varlığıdır. Bitki patojeni bakteriler genellikle bitki dokusunun hücreleri arasında bulunurlar ve hareketlidirler. Böylece hastalıklı doku su içerisine konduğunda patojen bakteriler suya geçecektir. Bu nedenle enfeksiyonlu bitkiden parçaların agar ortamına funguslarda olduğu gibi doğrudan konması uygun değildir. Çünkü bu durumda saprofit bakteriler daha hızlı gelişeceğinden karışık bir kültür elde edilecektir. İzolasyon yönteminin amacı; hızlı gelişen saprofitlerden yavaş gelişen, fakat daha fazla bulunan bitki patojeni bakterileri mümkün olduğu kadar çabuk ayırmak olmalıdır. Genellikle izolasyon işlemi, enfeksiyonlu materyalden bir süspansiyon hazırlayıp, bir öze dolusu süspansiyonun agar ortamına çizilmesiyle gerçekleştirilir. Daha sonra gelişen kolonilerden seçim yapılarak birkaç alt kültür şeklinde saflaştırma gerçekleştirilir.

9.2. Enfeksiyonlu materyallerden bakterilerin ekstraksiyonu

9.2.1. Bitki materyalinin dezenfeksiyonu

Bitki yüzeyinde epifitik veya saprofitik olarak birçok bakteri bulunması nedeniyle yüzeysel bir sterilizasyon gereklidir. Ancak, ince ve narin bitki dokuları bakterisit içeren çözeltilere batırılmamalıdır. Özellikle sterilantlar, solgun veya kuru yaprakları kolaylıkla penetre ederek patojen bakterinin ölümüne neden olur. Böyle dokular akan saf su altında yıkanabilir. Tomurcuk, meyve, gövde kesitleri, kanserler veya urlar gibi kalın yapılı dokular ya % 70'lik etil alkolle batırılıp alevden geçirilir ya da % 0.5'lik NaOCl'ye batırılır ve steril su ile birkaç kere durulandıktan sonra hafifçe steril kurutma kağıdı ile kurulanır. Bitki dokuları, NaOCl'de dokunun tipine, kalınlığına ve bulaşma derecesine bağlı olarak 30 saniye ile 20 dakika arasında bekletilir.

9.2.5. Bitki dokusunun parçalanması

Parçalanmış bitki dokularından bakterilerin izolasyonu yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde enfeksiyonlu dokular, bistüri ve izolasyon iğnesi ile steril bir mikroskop lamı üzerine konmuş bir damla steril süspansiyon ortamı içinde parçalara ayrılır. Daha sert dokular ise % 70' lik alkole batırılmış pamuk ile silinir, sonra alkolde yakılarak sterilize edilen bir havan ve tokmak veya homojenizatör yardımıyla ezilerek parçalanabilir. Bakteriler 50 °C civarındaki sıcaklıklarda öldükleri için homojenizatörde sıcaklığının fazla yükselmemesine dikkat edilmelidir. Bitki dokusu parçalarını (gövde, tomurcuk, dal gibi) aseptik olarak küçük parçalara ayırdıktan sonra steril tamponlanmış fizyolojik serum içinde 1 - 2 saat kuvvetli şekilde çalkalamak da bakteri izolasyonu için yeterli olmaktadır.

9.3.2. Bakteriyel kolonilerin seçim kriterleri

Kolonilerin seçimi, şekli, büyüklüğü, iç ve yüzey yapıları, yüksekliği, kenar tipi, kıvamı, rengi, ışığı geçirgenliği ve gelişme oranları gibi kriterlere göre belirlenir.

Ortamda çok fazla sayıda koloninin olması onların patojen olduğunu göstermez. Çok çabuk ortaya çıkan ve hızlı gelişen koloniler genellikle saprofitik özelliktedir.

9.4. Farklı bitki dokularından izolasyonlar

9.4.1. Yapraklardan izolasyon

Bitki patojeni bakteriler taze ve sulu lekelerden kolaylıkla izole edilebilirler. Ancak, nekrotik dokuları hastalığın ileri aşamalarında saprofit bakteriler istila ederler. Bu nedenle izolasyonlar, ya nekrotik ve sağlam bitki dokusunun birleştiği yerden ya da çok küçük nekrotik lekelerin bulunduğu alanlardan yapılmalıdır.

9.5. Bitki patojeni bakteriler için bazı genel besi ortamları

Bakteriler genellikle nötr veya hafif alkali ortamları tercih ederler ve fungal ortamlarda gelişemezler. Bitki patojeni bakterilerin izolasyonu ve gelişmeleri için Nutrient Agar (NA) uygun besi ortamıdır. Günümüzde birçok seçici ortam olmasına rağmen, izolasyon çalışmalarında seçici olmayan genel besi ortamları kullanılmalıdır.

10. BİTKİ PATOJENİ BAKTERİLERİN İNOKULASYONU

İnokulasyonlar 2 temel amaçla yapılabilir:

- a. Bakterilerin patojenitelerini test etmek için; hastalıklı bir bitki parçasından patojenitesi bilinmeyen bir bakteri elde edildiğinde; bitkide aynı belirtiyi gösterip göstermediğini anlama, bakteri ırkını belirleme veya genetik mutantların patojenite veya virulans özelliklerini saptama amacı güdülür.
- b. Bitkilerin hastalıklara hassasiyet veya dayanıklılıkları için; bakteri türlerinin veya pathovarlarının konukçu sınırlarını belirleme, bitki çeşitlerinin dayanıklılıklarını belirleme, bakterisitleri gözden geçirme, bitkilerin savunma mekanizmalarını inceleme ve epidemiyolojik çalışmalar yapma amaçlanır.

Başarılı bir inokulasyon için; patojenik veya virulent özellikteki bakteriyel etmen, hassas konukçu, enfeksiyon ve hastalık gelişimini teşvik edici koşulların birlikte bulunması gerekir. Bitkilerde hastalığa yol açan bakteriyel etmenlerin patojeniteleri çok önemli bir özelliktir. Bazı bitki patojeni bakterilerin patojeniteleri, canlılıkları süresince devam ederken, bazıları ise uzun süre tekrarlı olarak kültürden kültüre aktarıldıklarında bu özelliklerini kaybederler. Eğer yaşlı izolatlar patojenite özelliğini kaybetmiş ise, izolata bu özelliğini tekrar kazandırmak amacıyla konukçu bitkiye inokulasyon yapılır.

Hassas bitkiler bakteriyel etmenler tarafından doğal olarak enfekte edildiklerinde hastalığa özgü tipik belirtiler meydana getirirler. Fakat bakteriyel etmenin konukçusu³⁷ olmayan bitkilerde veya

dayanıklı çeşitlerde ise tipik olmayan belirtiler meydana gelir.

10.1.1. Tütünde aşırı duyarlılık (hypersensitive reaction - HR) testi

Bu test; hastalıklı bitkilerden bakteriyel etmenleri izole edip, bunların patojenitelerini kontrol etmek ve saprofit bakterilerden ayırt etmek amacıyla yapılır. Patojen özellikteki bakteriyel etmenler tütün yapraklarında kuru nekrotik leke şeklinde belirti meydana getirirler. Bu test şu şekilde yapılır:

- Besi ortamında geliştirilen 24 - 48 saatlik izolatların steril saf su ile 10^6 - 10^7 hücre/ml'lik konsantrasyonunda süspansiyonları hazırlanır. Hazırlanan süspansiyonlar hipodermik bir iğne ile sağlıklı tütün (*Nicotiana glutinosa*) yaprağının hücreleri arasına enjekte edilir ve 24 - 26 °C'de 48 - 96 saat süreyle inkübe edilir.
- Yapraktaki nekrotik leke oluşumu, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.

11. BAKTERİLERDE TAKSONOMİK YÖNTEMLER

Günümüzde bakteriler yaygın olarak; agaroz jel elektroforez, restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve polimeraz chain reaction (PCR) gibi nükleik asitlere dayalı modern taksonomik tekniklerle sınıflandırılmaktadır. Biyokimyasal ve fizyolojik testler ise çok zaman alıcı olması, farklı koşullar ve besiy ortamlarında yanıltıcı sonuçlar verebilmesi nedeniyle teşhiste destekleyici yöntemler olarak kullanılmaktadır.

11.1. Fizyolojik ve biyokimyasal testler

11.1.1. Hücre morfolojisi

Hücre şekli (çubuk, yuvarlak, spiral veya pleomorfik), boyutu, kamçı durumu (atrachous,³⁸ peritrichous, monotrichous,

amphitrichous, lophotrichous), koloni boyutu, rengi ve şekli incelenir. Fastidious bakteriler, besi ortamında geliştirilemediğinden, hücre morfolojisi bunlar için teşhis kriteri değildir.

11.1.2. Asılı damla yöntemi

Bu yöntem bakterilerin hareketliliğini incelemek amacıyla yapılır. NGA'da 24 – 48 saat süreyle 24-26 °C'de geliştirilen bakteriyel kültürden seyreltik bakteriyel süspansiyon hazırlanır. Bu süspansiyondan bir öze dolusu alınarak lamelin ortasına damlacık şeklinde konur. Damlacık çukur lamın çukur kısmına gelecek şekilde lamel ters çevrilerek konur. Damlacığın dağılmamasına özen gösterilmelidir. Lamelin kaymaması için önceden lamelin dört köşesine vazelin sürülebilir. Hazırlanan preparat 40x veya 100x'lik objektifte incelenir. 100x'lik objektifte immersiyon yağı kullanılmalıdır

11.1.3. Gram boyama

Testte kullanılan ortamların içerikleri:

<u>I. Çözeltinin içeriği:</u>	<u>Litre'de</u>
A Çözeltisi: Crystal violet	2 g
Ethyl alcohol (% 95)	20 ml
B Çözeltisi; Ammonium oxalate	0.8 g
Saf su	80 ml

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanıp, karıştırıldıktan sonra filtre kağıdından geçirilir.

<u>II. Lugol Çözeltisinin içeriği:</u>	
Iodine	1 g
Potassium iodide	2 g
Saf su	300 ml

<u>III. Safranin Çözeltisinin içeriği:</u>	
Stok Çözeltisi: Safranin O	2.5 g
Ethyl alcohol (% 95) ³⁹	100 ml
Kullanma Çözeltisi: Stok çözeltisi	10 ml

Saf su

90 ml

Boyama İşlemleri:

- Lamın ortasına bir damla steril su damlatıldıktan sonra, besi yerinde gelişen 24 saatlik kolonilerden bir öze ile alınır, su damlası içerisinde karıştırılır ve lam üzerine yayılır, daha sonra bakterilerin lama fikse edilmesi için lam hafif alevden geçirilip oda sıcaklığında bekletilerek iyice kuruması sağlanır.
- I. Solüsyondan lam üzerine dökülüp, 1 dakika beklendikten sonra çeşme suyu ile indirekt olarak yıkanıp, lam üzeri hafifçe kurulanır.
- Daha sonra lam üzerine Lugol solüsyonu konup, 1 dakika sonra tekrar indirekt olarak çeşme suyu ile yıkanır ve kurutma kağıdı ile hafifçe kurulanır.
- % 95'lik etil alkol bulunan bir kaba lam batırılarak 30 saniye kadar beklenir ve birkaç saniye suda yıkandıktan sonra, tekrar hafifçe kurulanır.
- Son olarak lam üzerine Safranin solüsyonunda 10 saniye süreyle zıt boyama yapılır, tekrar suda indirekt olarak yıkanıp, kurutma kağıdında kurulandıktan sonra izolatlar 100'lük objektifte incelenir.
- İzolatlar mavi - mor renkte ise Gram (+), pembe - kırmızı renkte ise Gram (-) olarak değerlendirilir.

11.1.4. Potasyum hidroksit (KOH)'de çözünme testi

Bu test Gram boyama testi sonuçlarını doğrulamak amacıyla yapılır:

- Test için 1 - 2 damla % 3'lük KOH solüsyonu lamlar üzerine konur, besi ortamında 24 saatlik geliştirilen bakteriyel izolatların kolonileri öze yardımıyla alınıp, lam üzerindeki % 3'lük KOH solüsyonunda bir süre karıştırılarak yavaşça yukarı doğru kaldırılır.
- %3'lük KOH solüsyonunun viskoz bir ⁴⁰ durum alırsa ve öze yukarı

doğru yavaşça kaldırıldığında iplik gibi uzama görülürse pozitif reaksiyon, bakteriyel süspansiyon viskoz değil de sulumsu yapıda olursa ve ze yukarı doğru kaldırıldığında iplik gibi uzama görülmezse negatif reaksiyon meydana gelir.

- İplik gibi uzamanın nedeni, Gram (-) bakterilerin hücre duvarı daha narin olduğu için bu kimyasal madde karşısında kolayca parçalanıp içerisindeki DNA'nın serbest hale geçmesinden kaynaklanır. Dolayısıyla reaksiyonun pozitif çıkması Gram (-) bakterilerin varlığını gösterir. Gram (+) bakterilerin hücre duvarı daha kalın ve sağlam olduğu için hücre duvarında parçalanma görülmez. Bu nedenle reaksiyonun negatif çıkması Gram (+) bakterilerin varlığını gösterir.

11.1.6. Katalaz testi

Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijen şeklinde parçalayan bir enzimdir.

- Lamlar zerine % 3 'lk hidrojen peroksit (H₂O₂)'ten 1 ml konur ve üzerine 24 saat süreyle besi ortamında geliştirilmiş bakteriyel izolatlardan, bir öze dolusu olacak şekilde bu çözelti içerisine ilave edilir.
- Reaksiyon sonucu, hava kabarcıklarının ortaya çıkması, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu testte negatif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* kullanılabilir.

11.1.7. Oksidasyon - fermentasyon testi

Karbonhidratların oksijenli ve oksijensiz ortamda kullanımlarını anlamak amacıyla yapılır.

Ortam İçeriği: I. Grup

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g	41
KCl	0.2 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g	

Bromthymolblue 0.08 g

Saf su 900 ml

Agar 3 g

pH: 7.0-7.1

II. Grup

Glucose 10 g

Saf su 100 ml

pH: 7.0 - 7.1

- I. Grup maddeler agar dışında tartılıp, erlenmayer içerisinde çözelti haline getirildikten sonra, çözeltinin pH'sı % 40'luk NaOH ile pH 7.0 - 7.1'e ayarlanır. Bu durumda ortamın rengi zeytin yeşiline dönüşür. Daha sonra ortama agar ilave edilip, 121 °C'de maddelerin homojenizasyonu sağlanır ve 4.5 ml'lik miktarlarda deney tüplerine paylaşılır ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir.
- II. Grupta bulunan glukoz, saf suda eritilerek tinalizasyon işlemi ile sterilize edilir. Bu ortam, 0.5 ml'lik miktarlarda; daha önce hazırlanan 4.5 ml'lik ortamın bulunduğu tüplere 45 - 50 °C'lik sıcaklıkta aseptik koşullarda paylaşılır.
- Her bakteriyel izolat için iki tüp kullanılır. Her iki tüpe bir öze dolusu aynı bakteriyel izolattan batırılır, daha sonra bu tüplerden bir tanesinin üzeri % 3'lük agar ile örtülerek hava ile teması kesilir ve izolatlar 24 - 26 °C'de inkübe edilir.
- Bakterilerin oksijenli veya oksijensiz koşullarda gelişme gösterdikleri tüplerde glukozdan asit üretimi sonucunda ortamın rengi zeytin yeşilinden portakal sarısı rengine dönüşür.
- Deneme sonuçları 7 - 14 gün içerisinde kontrol edilir, aynı tipte izolat aşılınmış iki tüpten hava ile teması kesilmeyende renk değişikliği meydana gelirse, buna karşın hava ile teması kesilende renk değişikliği

görülmezse izolatlar oksidatif, eğer hem hava ile teması kesilmiş hem de kesilmemiş olan her iki tüpte de renk değişikliği görülürse izolatlar fermentatif olarak kabul edilir. Bu testte *Erwinia* türleri pozitif, *Pseudomonas* türleri ise negatif kontrol olarak kullanılabilir.

11.1.8. Jelatini eritme testi

Pseudomonas, *Xanthomonas*, *Erwinia* türlerinin çoğu jelatini hidrolize eder.

<u>Ortam İçeriği:</u>	<u>Litre'de</u>
Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Jelatin	120 g

- Ortam 121 °C'de homojenize edildikten sonra 5 - 8 ml'lik miktarlarda tüplere paylaştırılarak, 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir.
- İzolatlar, tüplere iğne yardımıyla batırılarak aşılır, 20 °C'de 7 - 14 gün süreyle inkübe edilir. Kontrolde önce 30 dakika süreyle +4 °C'de buzdolabında bekletilir.
- Tüpteki ortamın akıcı hale gelmesi reaksiyonun pozitif, ortamın katı halde kalması ise reaksiyonun negatif olduğunu gösterir.

11.1.9. Nişastanın hidrolizi testi

<u>I. Ortam İçeriği:</u>	<u>Litre'de</u>
Yeast extract	5.0 g
Peptone	5.0 g
Beef extract	5.0 g
Agar	15.0 g
Eriyebilir nişasta	2.0 g
<u>II. Lugol Solüsyonu</u>	
Iodine	1.0 g
Potassium İodide	2.0 g
Saf su	100 ml

- I. Ortam, 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir ve petrilere dökülür.
- İzolatlar, petrilere çizilir ve yoğun bir gelişme elde edilinceye kadar 24 - 26 °C'de inkübe edilir. Daha sonra petrilerin üzeri Lugol Solüsyonu ile kaplanır.

- Reaksiyon sonucunda ortamın rengi, koyu mavi-siyah renge dönüşür. Kolonilerin etrafındaki açık bölgelerin oluşması reaksiyonun pozitif, açık bölgelerin oluşmaması ise reaksiyonun negatif olduğunu gösterir. Bu testte bazı *Xanthomonas* pathovarları pozitif, *P. syringae* ise negatif kontrol olarak kullanılabilir.

11.1.10. Arjinin dehidrolaz testi

Bu test bazı *Pseudomonas*'ların anaerobik koşullarda gelişmesini sağlayan iki enzimin varlığını ortaya koyan bir testtir. Bu enzimler, CO₂ ve NH₃ çıkararak arjinin'i ornithin'e dönüştürmeleri sonucu ATP üretirler.

Ortam İçeriği: g / l

Peptone	1.0
NaCl	5.0
K ₂ HPO ₄	0.3
Agar	3.0
Phenol red	0.01
L-Arginine	10.0
pH: 7.2	

- Ortam içeriği, agar dışında tartılıp, pH 7.2'ye ayarlanır ve agar ilavesinden sonra 121 °C'de homojenize edilip, 5 - 7 ml'lik miktarlarda tüplere paylaştırılır ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir.
- İzolatlar, öze yardımıyla tüplere batırılarak aşılır ve bunların üzerlerine yaklaşık 2 cm kalınlığında % 3'lük steril agar dökülür. Tüpler, 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün süreyle inkübe edilir.

- Ortamın açık pembe renginin, kırmızı - pembe renge dönüşmesi; pozitif reaksiyon, ortamın renginde değişiklik olmaması ise negatif reaksiyon şeklinde değerlendirilir. Pozitif kontrol *Pseudomonas fluorescens* (kırmızı renk değişikliği), negatif kontrol ise *Pseudomonas syringae* pathovar'ları tarafından (renk değişimi yok) sağlanabilir.

11.1.11. Lesitinaz (Fosfolipaz) aktivitesi testi

- Taze yumurtalar yıkanıp, % 70'lik alkolde 10 dakika süreyle bekletilir ve alevde kurulanır. Yumurtalar aseptik olarak kırılarak, sarıları ayrılır. Daha sonra yumurta sarıları hacminin 1.5 katı fazlası steril saf su ile seyreltme yapılır ve bu süspansiyonun 100 ml'si 55 °C'de erimiş olan 900 ml'lik steril nutrient agara aseptik koşullarda ilave edilir.
- Hazırlanan ortam petrilere dökülür ve bakteriyel izolatların çizimi yapılır. Çizim yapılan petrilere 24 - 26 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilir.
- Lesitinaz oluşturan kolonilerin çevresinde serbest yağ asitlerinin oluşturduğu bulanık bir halkanın meydana gelmesi, reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Bu teste *Pectobacterium chrysanthemi* pozitif, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* negatif reaksiyon gösterir.

11.1.12. Esteraz aktivitesi (Tween'nin hidrolizi) testi

Erwinia, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* türleri için uygulanan bir testtir. Bakteri hücrelerinin esteraz₄₅ aktivitesi, kalsiyum klorür ve

Tween 80 (polioksietilensorbitan monooleat içeren bir polimer) içeren nutrient agarda gözlenir.

Ortamın İçeriği:

Peptone	10.0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
Saf su	990.0 ml
pH: 7.4	

- Yukarıdaki maddeler agar dışında tartılıp, pH 7.4'e ayarlanır, Tween 80 (Sigma) ise 10 ml/litre oranında ayrı olarak 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir ve daha önce hazırlanan ortama ilave edilir. Daha sonra iyice karıştırılan ortam petrilere dökülür.
- Bakteriyel izolatlar, petrilere çizildikten sonra 24 - 26 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilir.
- Tween 80'nin oleik asite hidrolize olması sonucu kolonilerin etrafında kristallerden ibaret opak bir bölgenin meydana gelmesi, pozitif reaksiyonun sonucudur. Bu teste *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pozitif, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ise negatif reaksiyon verir.

11.1.13. Floresan pigmentasyon testi

Belirli *Pseudomonas*'lar bazı ortamlarda floresan özellik (yeşil parlama) gösterirler, bu da onların kolay teşhis edilmelerini sağlar. Bu gözlenen pigment; suda eriyen, kloroformda erimeyen ve yeşil floresan parlama gösteren, *fluorescein* tipinde bir pteridin pigmentidir. Bu ortam genel bir izolasyon ortamı olarak kullanıldığında *P. syringae*'nin iki tip kültürü görülür. Bunlardan birincisi daha az virüent olup; düz ve berrak (*translucent*) kolonilere sahiptir. ⁴⁶

Diğeri ise buzlu cam (*opak*) saydamlığında, mukoid (*sümüksü*) kolonilere sahiptir ve daha virülenttir. *Pseudomonas syringae*'nin patojenik varyeteleri ve *P. fluorescens* KBA'da *fluorescein* pigmenti, *P. aeruginosa* ise *pyocyanin* pigmenti oluşturur.

<u>Ortam içeriği (King's B Agar - KBA)</u>	<u>g / l</u>
Proteose peptone (Difco) 3	20.0
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5
Agar (Difco)	15.0
Glycerol	15.0

İzolatlar, KBA'da 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat süreyle geliştirilir. Daha sonra izolatların floresan parlama gösterip göstermediğine, ultraviyole ışıkta bakılır. Floresan gelişme gösteren izolatlar pozitif, floresan gelişme göstermeyen izolatlar ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilir.

11.1.14. Levan oluşumu testi

Levan (fructan) oluşumu levan sucrase enziminin sakkaroz üzerindeki aktivitesi ile oluşur. Glukoz ve fruktozdan oluşan bu disakkaritin ayrışması sonucunda ayrılan glikoz metabolize, fruktoz ise polimerize edilir.

<u>Ortam içeriği:</u>	<u>g / l</u>
Nutrient agar (Difco)	23.0
Sucrose	5.0

- Ortam 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildikten sonra 10 - 15 ml'lik miktarlarda petrilere dökülür. Bakteriyel izolatların çizimi yapıldıktan sonra kültürler 24 - 26 °C' de 5 gün süreyle inkübe edilir.

- Ortamda mukoid ve kubbemsi koloni gelişimi, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu testte *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pozitif, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ise negatif kontrol olarak kullanılır.

11.1.15. Nitrat indirgenmesi testi

<u>Ortamın İçeriği</u>	<u>g / l</u>
KNO ₃	1.0
Peptone	5.0
Yeast extract	4.0
Oxoid ion agar No.2	3.0
pH: 7.0 - 7.2	

- Ortam içeriği agar katılmadan önce pH 7.0 - 7.2'ye ayarlanıp, agar ilave edildikten sonra 121 °C'de homojenize edilir ve 4 - 5 ml'lik miktarlarda tüplere paylaşılır. Tüpler 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir. İzolatlar tüplere aşılandıktan sonra 24 - 48 saat süreyle 24 - 26 °C'de inkübe edilir. Testin yapılacağı zaman hazırlanan çözelti (1 kısım glasiyal asetik asit ve 2.5 kısım saf su içerisine % 0.5'lik alfa naftilamin ve % 0.8'lik sulfanilik asit çözeltilerinden her bir tüp için 1'er ml ilave edilerek hazırlanır)'den eğik agardaki bakteriyel kolonilerin seviyesine kadar pipet yardımıyla damlatılır ve 1 saat içerisinde ortamdaki renk değişikliği gözlenir. Kontrol olarak çizim yapılmamış tüpe sadece hazırlanan çözeltiden damlatılarak, ortamda renk değişikliğinin olup olmadığına bakılır.
- Çözelti renginin pembe - kırmızı renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu testte; *Pseudomonas fluorescens* pozitif kontrol, *P. syringae* negatif kontrol ve inokule edilmemiş kontroller kullanılır.

11.1.16. Eskulinin hidrolizi

Bir glukozit olan esculin tüm *Xanthomonas campestris* pathovarları tarafından parçalanarak glukoz ve koyu kahve renkli bir bileşik olan dihidrocumarin'e ayrıştırılır.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g / l</u>
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.5
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
Ferric amonyum sitrat	50.0 mg
Eskulin (Sigma)	1.0
pH 6.8	

Bu reaksiyon, 28 °C'de 28 gün süreli olarak çalkalayıcı üzerinde izolatların inkübe edilmesi sonucu meydana gelir. Besi yeri renginin kahverengi – siyah renge dönüşmesi pozitif reaksiyonun, dolayısıyla esculinin hidrolizinin bir sonucudur. Bu testte *Xanthomonas fragaria* negatif, diğer tüm *Xanthomonas* türleri pozitif kontrol olarak kullanılabilir.

11.1.17. Oksidaz testi

% 1'lik glukoz içeren nutrient agarda 24 - 48 saat süreyle geliştirilen bakteriyel koloniler; öze yardımıyla alınarak üzerine % 1'lik *tetramethyl - p - phenylnediamine dihydrochloride* çözeltisi damlatılmış filtre kağıdına sürülür. 10 saniye içerisinde oluşan mavimsi - mor renk değişimi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu teste; *Pseudomonas syringae* negatif, *P. flourescens* ise pozitif reaksiyon verir. Negatif reaksiyonda genellikle boya maddesi indirgenerek soluk beyaz bir renk oluşturulur.

11.1.18. Karbon kaynaklarının kullanılması testi

Bitki patojeni bakterilerin beslenme uygunluklarını incelemek amacıyla yapılır.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g / l</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast extract (Difco)	0.8
Agar	12.0
Brom cresol purple	0.7 ml (% 70'lik etil alkolde % 1.5'luk brom cresol purple solüsyonu hazırlanır. Bu tampon solüsyondan 0.7 ml alınır)
Karbon kaynağı	2.0
pH:	6.8

- Ortam içeriği agar katılmadan önce pH'sı 6.8'e ayarlanıp agar ilave edildikten sonra 121 °C'de homojenize edilir ve tüplere paylaşılır. Tüpler, 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilerek eğik agar şeklinde dondurulur. Tüplere izolatlar çizildikten sonra 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün süreyle inkübe edilir.
- Ortamdaki renk değişikliği pozitif reaksiyon, renk değişikliğinin meydana gelmemesi ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilir.
- Glukoz pozitif kontrol olarak, karbon kaynaksız ortam ise negatif kontrol olarak kullanılır. Bu teste *Pectobacterium atrosepticum* pozitif, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ise negatif reaksiyon verir.

11.1.19. Fosfataz testi

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Peptone (Difco)	10.0
Beef extract (Difco)	5.0
Agar	15.0
pH: 7.0	

- Ortamın içeriği agar ilave edilmeden önce pH 7.0'ye ayarlanıp, agar ilave edildikten sonra 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir. Daha sonra ortam sıcaklığı 50 °C'ye soğutularak, içerisine filtrasyon ile sterilize olmuş % 5'lik sodyum fenolftalein difosfat (Sigma) çözeltisinden 10 ml ilave edilir. Hazırlanan bu ortam cam petrilere dökülür. İzolatlar petrilere çizilerek 24 - 26 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilir. Daha sonra ters çevrilmiş petri kapakları içerisine birkaç damla amonyum hidroksitten damlatılır ve 15 - 20 dakika süreyle kolonilerdeki renk değişimi gözlenir.
- Fosfataz enzimi organik fosforlu bileşiklerden fosforu ayırmakta, alkali gaz (NH₃) ise fosfataz içeren kolonilerin rengini 15 - 20 dakika içerisinde pembe renge dönüştürmektedir. Koloni renginin parlak pembe renge dönüşmesi pozitif, pembe renge dönüşmemesi ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu teste *Dickeya chrysanthemi* pozitif, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* negatif reaksiyon gösterir.

11.1.20. Sakkarozdan indirgen bileşikler testi

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Beef extarct	5.0
Peptone	10.0
Sakkaroz	40.0

Benedikt ayıracı

Çözelti A: 173 g sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ve 100 g Na_2CO_3 , 600 ml saf su içerisinde ısıtılarak eritilir ve son hacmi 850 ml'ye tamamlanır.

Çözelti B: 18 g $CuSO_4$, 100 ml saf su içerisinde eritilmiş ve son hacmi 150 ml'ye tamamlanarak, yavaşça Çözelti A içerisine karıştırılır.

- Hazırlanan ortam 121 °C'de homojenize edildikten sonra, tüplere 3 - 4 ml olacak şekilde paylaştırılarak, 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir. Nutrient agarda 24 saat süreyle geliştirilen bakteriyel izolatlar tüplere aşılanır. Tüpler 27 °C'de 48 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edilir. İnkübasyondan sonra Benedict ayıracından tüplere 3 - 4 ml konarak, hafifçe çalkalanır ve kaynar su içerisinde 10 dakika süreyle bekletilir.
- Tüp içerisinde sarımsı - turuncu renk oluşumu indirgen şekerler için pozitif reaksiyon, renkte değişiklik olmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu teste *Pectobacterium atrosepticum* pozitif, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* negatif reaksiyon verir.

11.1.21. Asetoin ve Metil Kırmızısı testleri

Bu testler; *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerde, glukozdan asit veya glukozdan *acetoin* (acetylmethylcarbinol) ve *2,3-butanediol* gibi nötral ürünler oluşturanları birbirinden ayırmak amacıyla yapılır. **Asetoin** testi nötr ürünleri belirlerken, **Metil Kırmızısı** testi pH 4.2'nin altında asit oluşumunun gözle görülmesini sağlar. Testler genellikle ya Asetoin testine pozitif ya da Metil Kırmızısı testine pozitif şekilde sonuçlanır. Ancak Asetoine pozitif sonuç veren bazı ırklar, glukozu nötr ürünlere dönüştürmeden önce belirgin şekilde asit oluşturabilirler.

<u>Ortamin içeriği</u>	<u>g / l</u>
Glukoz	5.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast Ekstrakt (Difco)	5.0

- **Asetoin testinde**; izolatlar 27 °C'de 2 - 5 gün süreyle inkübe edilir. Daha sonra 1 ml'lik bir örnek süspansiyon, bir test tüpü içerisinde 0.6 ml'lik *alfa naftol* (% 100' lük etil alkolde % 5'lik w/v) ile karıştırılır. Bu tüpe % 40'luk KOH'den 0.2 ml ilave edilir ve 2 saat kadar güçlü bir şekilde karıştırılır.
- Pembe renk oluşumu pozitif, renk değişimi olmaması negatif reaksiyon sonucudur. Bu testte *Erwinia amylovora* pozitif, *Pseudomonas*'lar ise negatif kontrol olarak kullanılabilir.
- **Metil Kırmızısı testinde** ise, yukarıdaki 5 günlük VP kültürüne birkaç damla methyl red (methyl red 0.1 g, % 95' lik etil alkol 300 ml, saf su 200 ml) çözeltisi damlatılır.

- Kırmızı renk oluşumu, reaksiyonun pozitif (ortam pH'sı 4.2 olur) olduğunu gösterir. *Erwinia* grubu türlerin çoğu Metil Kırmızısı testine negatif, Asetoin testine ise pozitif reaksiyon verir.

11.1.22. Indigoiodin (Mavi) pigment oluşumu

Indigoiodin, *Dickeya chrysanthemi* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* tarafından oluşturulan suda çözünmeyen, mat mavi-siyah renkli, hücre içi bir pigmenttir.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Nutrient broth (Difco)	8.0
Yeast extract (Difco),	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
Glukoz	5.0
1 M MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.0
Agar	15.0

- Yukarıdaki ortam (Glukoz ve MgSO₄ hariç) 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edilir. Glukoz ise 50 ml suda eritildikten sonra MgSO₄ ile birlikte ayrı olarak otoklavda sterilize edilir ve bu çözelti diğer ortama 50 °C' ye soğutulduktan sonra ilave edilir.
- Ortamda hücre içi mavi pigment ve sarı pigment oluşumları birlikte görülebilir.

11.1.23. Indol oluşumu

Dickeya chrysanthemi, indolü *tryptophan*'dan oluşturur, diğer yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* grubu türler ise indol oluşturamaz.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g / l</u>
Yeast extract	5.0 g
Tryptophan	10.0 g

- Ortam, tüpler içerisinde 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edilir. İzolatlar, bu tüplere inokule edildikten sonra bir çalkalayıcıda 27 °C'de 2 - 5 gün süreyle inkübe edilir. 1 ml'lik Kovacs ayırıcı'na 1 ml'lik kültür çözeltisi ilave edilir. Kovacks ayırıcının hazırlanışı şu şekildedir; 75 ml'lik amil alkol veya isoamil alkol 50 °C'lik bir su banyosunda ılıtılır, 5 g *p - dimetilaminobenzaldehit* ilave edilir. Bu madde eridiğinde ortam soğutulur ve daha sonra ortama 25 ml'lik konsantre HCl eklenir. Ayıraç buzdolabında saklanmalı ve açık renkli değilse atılmalıdır.
- Kiraz kırmızısı renk oluşumu indol oluşumunun, başka bir ifade ile pozitif reaksiyonun göstergesidir.

11.1.24. Hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu

Hidrojen sülfür (H₂S), çok sayıda kükürt içeren organik bileşikten oluşturulabilir. Bitki patojenlerinin ayrılmasında en fazla kullanılan kükürtlü bileşik *cystein*'dir. *Xanthomonas* ve *Erwinia* grubu türlerin çoğu cysteinden H₂S oluşturur.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast extract (Difco)	5.0
l-cysteine hydrochloride	0.1

- Ortam 5 ml' lik kısımlar halinde tüplere konur ve 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edilir. Kurşun asetat emdirilmiş 5 mm'lik şerit kağıtlar ise kurutulduktan sonra otoklavda sterilize edilir.
- Kurşun asetat emdirilmiş şerit kağıtlar, bakteriyel izolatların inokule edildiği tüplere pamuk tıkaçlar yardımıyla asılır. Reaksiyon 28 °C'de 1 - 2 haftalık süre içerisinde gözlenir.
- Pozitif reaksiyonda H₂S, şerit kağıt üzerindeki kurşun asetatı etkileyerek şeritlerde bir siyahlık oluşturur. Pozitif kontrol olarak, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *X. campestris* pv. *campestris*, negatif kontrol olarak inokule edilmemiş bir tüp kullanılabilir.

11.1.25. Proteinin parçalanması testi

- Yağsız toz süte, 40 mg / l bromecresol purple (bromkresol moru) ilave edilerek 30 dakika süreyle 100 °C'de bekletilir ve 37 °C'de inkübe edilir. Bu işlem 3 gün tekrarlandıktan sonra aseptik koşullarda steril tüplere dağıtılır. Daha sonra bir öze dolusu bakteri hücresi bu tüplere inokule edilir.
- Pozitif reaksiyonda, 27 °C'de 3 - 7 gün süre içerisinde süt proteini (casein) parçalanır ve tüplerde bir berraklaşma meydana gelir. Bu test *Xanthomonas* türlerinin ayrımında kullanılır.

11.1.26. Fenilalanin deaminaz testi

Fenilalanin deaminaz, fenilalanin'den fenil pürivik asit oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyon, son ürün olan demir klorürün fenilalanini indirgemesiyle tespit edilebilir.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Yeast extract	3.0
NaCl	5.0
Agar	12.0
Na ₂ HPO ₄	1.0
DL-phenylalanine	2.0

- Bakteriyel izolatlar 27 °C'de 3 gün süreyle yukarıdaki ortamda geliştirildikten sonra % 10'luk (w/v) demir klorür, petri kaplarındaki izolatlara ilave edilir. Yeşil renk oluşumu pozitif reaksiyonun göstergesidir. *Pantoea agglomerans* pv. *agglomerans* ve *Pectobacterium cypripedii* türleri hariç, diğer *Erwinia* grubu türleri, teste negatif veya zayıf reaksiyon gösterirler.

11.1.27. 2-Keto glukonat oluşumu

Bazı *Pseudomonas* ve *Erwinia* ırkları tarafından potasyum glukonat'tan indirgen şekerler oluşturulur.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Peptone (Difco)	10.0
Beef extract (Difco)	5.0
Potasyum glukonat	40.0
pH 7.0	

- Ortam homojenize edildikten sonra tüplere dağıtılarak sterilizasyonu yapılır. İzolatların tüplere inokulasyonundan sonra 27 °C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir ve bu tüplerin üzerine eşit miktarda Benedict ayırıcı konur. Tüpler kaynayan su banyosunda 10 dakika süreyle tutulur.
- Benedict ayırıcı şu şekilde yapılır: Çözelti A: Sodyum sitrat 173 g ve sodyum karbonat 100 g, 600 ml'lik sıcak suda eritilir ve 850 ml'ye seyreltilir. Çözelti B: Bakır sülfat 18 g, 100 ml suda eritilir ve 150 ml'ye seyreltilir. Bu çözeltiler ayrı olarak uzun süre saklanabilir. Çözelti B, çözelti A'ya son oran 15:85 olacak şekilde yavaşça ilave edilir.
- Sarı - portakal renk oluşumu pozitif reaksiyonun göstergesidir. Bu testte *Pseudomonas fluorescens*'in tüm biyotipleri pozitif, *P. syringae*'nin tüm pathovarları ise negatif reaksiyon verir.

11.1.28. 3-Keto laktoz oluşumu

Agrobacterium tumefaciens'in biovar 1'i laktozu okside ederek indirgen bir şeker olan 3-ketolaktoz oluşturur.

Ortamın içeriği (Laktoz Agar) g / l

Laktoz	10.0
Yeast extract	1.0
Agar (Difco)	15.0

- Laktoz agara aşılana izolatlar, 20 °C'de 48 saat inkübe edilir. Daha sonra petri kapları 5 - 10 ml Benedict ayırıcı ile kaplanır.
- Pozitif reaksiyonda 60 dakika içerisinde indirgen şeker oluşturan kolonilerin etrafında parlak sarı-portakal renginde bir bölge oluşur.
- Pozitif kontrol olarak *A. tumefaciens* biovar 1 kullanılabilir. Herhangi bir negatif kontrol olarak ise herhangi bir *Pseudomonas* türü kullanılabilir.

11.1.29. Eritromisine duyarlılık testi

- % 1'lik glukoz içeren nutrient agar birinci kat olarak petrilere dökülerek soğutulur. Daha sonra yine 10 ml'lik miktarlarda tüpler içerisinde sterilize edilmiş ve 45 °C'de su banyosunda tutulan % 1'lik glukoz içeren nutrient agar besi ortamına; 10^5 - 10^6 hücre/ml yoğunluğunda ve 24 saat süreyle nutrient broth'ta geliştirilen bakteriyel kültürden 1 ml ilave edilir. Bu tüpler hafifçe çalkalandıktan sonra ikinci kat olarak petrilere dökülerek soğutulur. Soğuyan agar üzerine 15 µg eritromisin (Oxoid) diski konarak 24 - 48 saat süreyle 24 - 26 °C'de inkübe edilir.
- Agar yüzeyindeki eritromisin diski etrafında engelleme bölgesinin oluşumu eritromisine duyarlılık için pozitif, engelleme bölgesinin oluşmaması ise eritromisine duyarlılık için negatif olarak kabul edilir. *Pectobacterium atrosepticum* ve *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* teste dayanıklı, *P. cypripedii* ve *Dickeya chrysanthemi* ise hassastır.

11.1.30. Kristal violet pektat ortamı (CVP)

Erwinia ve *Pseudomonas*'ların tespiti için CVP iyi bir ortamdır.

- 500 ml kaynayan saf su önceden ısıtılan 2 litrelik bir blendıra konarak düşük hızda aşağıda verilen maddeler sırasıyla su içerisinde çözülür:

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
% 0.075' lik w/v sulu kristal viyole	1.0 ml
1 M NaOH	4.5 ml
% 10'luk $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3.0 ml
Difco agar	2.0 g
NaNO_3	1.0 g

- Bu maddeler yüksek hızda 15 sn. süreyle iyice çözülür. % 0.9'luk sodyum polipektat ortama ayrı olarak ilave edilir ve düşük hızda kümeleşmeyi önlemek için karıştırılır. Daha sonra 15 sn süreyle yüksek hızda karıştırılır.
- Ortam, en az 2 litre büyüklüğünde bir erlene konulmalı ve ağzları alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edilmelidir. Ortam kaplara sıcak iken dökülür 2 gün süreyle kuruması beklenir.
- *Erwinia* grubu türler bu ortamda derin çukurlar oluştururken diğerleri daha sığ çukurlar meydana getirir.

11.1.31. Tetrazolium klorür agar (TCA) testi

Bu test *Ralstonia solanacearum* için kullanılır. Bu ortamda stabil avirüentler koyu kırmızı, stabil olmayanlar kenarı beyaz ortası pembe koloniler oluşturur. Ayrıca akıcı koloni oluşturanların virüent olduğu tespit edilir. Bu ortam, aynı zamanda *R. solanacearum*'un virüent ırklarının belirgin koloni özelliklerini gösterdiği için başlangıç teşhis testi olarak da değerlidir.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Pepton (Difco)	10.0
Caseine hydrolysate (Difco)	1.0
Glukoz	5.0
Agar (Difco)	15.0

- İndikatör *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (Sigma)'in % 0.5 (w/v) 'lik çözeltisi ayrı olarak sterilize edilir ve daha sonra besi ortamına 10 ml'lik kısmı ilave edilir. Bu indirgenebilir indikatör çok sayıda farklı ortama *Pseudomonas*'ların koloni tiplerini belirginleştirmek amacıyla da ilave edilebilir.

11.1.32. Tyrosinaz testi

Bitki patojeni *Streptomyces*'lerin çoğu tyrosin içeren ortamlarda kahverengi bir pigment oluştururlar. Tyrosinaz enzimi tüm *Streptomyces* türlerinin yaklaşık % 20'sinde oluşturulur.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
Nutrient broth (Difco)	8.0
Agar	15.0
L-tyrosine (Serbest baz Sigma)	5.0
pH 7.0	

- Ortam 121 °C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edildikten sonra 50 °C'ye soğutulur ve L-tyrosine kristalleri homojen bir şekilde karıştırılarak petrilere dökülür.
- Pozitif reaksiyonda *Streptomyces scabies* ırklarının çoğu koloniler olgunluğa ulaşırken tyrosinaz etkisiyle agar içine koyu kahve renkli bir pigment meydana getirirler.

11.1.33. Üreaz oluşumu testi

Uygun bir şekilde tamponlanmış sıvı bir ortamda üreaz enzimi üreyi parçalaması sonucu ortamda amonyak gazı oluşur, pH ise 9.0'un üzerine yükselir. Bu durumda indikatör boyanın rengi, sarıdan parlak koyu kırmızıya döner.

<u>Ortamın içeriği</u>	<u>g / l</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast extract (Difco)	1.0
Cresol kırmızısı	0.006
Saf su	800 ml
pH 6.8	

- Ortam 121°C'de 15 - 20 dakika süreyle sterilize edilir ve 55 °C'ye soğutulduktan sonra 200 ml % 10'luk üre, filtrasyon ile ortama ilave edilir. Elde edilen bu ortam 5 ml'lik kısımlar halinde steril tüplere dağıtılır. Tüpler 7 gün süreyle gözlenir.
- Aynı ortamın üresiz olanı kontrol olarak kullanılır. Bu testte *Brenneria nigrifluens* hariç diğer *Erwinia* grubu türler negatif, *Xylophylus ampelinus* pozitif kontrol olarak kullanılır.

11.1.34. Poli - beta hidroksibütirat yapıları testi

Düşük azot ve yüksek karbonhidrat içeren ortamlarda geliştirildiklerinde bazı *Pseudomonas* ve *Agrobacterium*'lar hücre içi yapılar oluştururlar. Bu yapılar faz kontrast mikroskopunda hücre içinde ışığı kıran granüller olarak görülürler.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g / l</u>
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
KCl	0.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
DL- Beta-hydroxybutyrate (Sigma)	5.0

- Nutrient agarda geliştirilen izolatlar, daha sonra yukarıda içeriği verilen tüplere aktarılır.
- Sudan black B (Sigma) çözeltisi (100 ml % 70' lik etil alkolde 0.3 g) hazırlanarak 1 gece bekletilir.
- Yukarıda verilen çözeltide geliştirilen izolatlar, bir lam üzerine çizilir, havada kurutulup, alevde fikse edilir.
- Lam boyama çözeltisi ile kaplanır ve 10 - 15 dakika süreyle beklenir.

- Lam üzerindeki boya dökülür, kurutma kağıdı ile kurulanır, daha sonra xylol veya su içine batırılarak temizlenir, tekrar kurulanır ve % 0.5'lik sulu safranin ile 5 - 10 dakika süreyle zıt boyama yapılır, tekrar suda yıkanır ve kurulanır.
- Son aşamada lam, bir ışık mikroskopunda 100'lük objektifte immersiyon yağı yardımıyla incelenir. Poly- β -hydroxybutyrate yapıları mavi-gri veya mavi - siyah renkli görülür. Bakteri hücresinin geri kalan kısmı ise zıt boyama yapılması nedeni ile pembe renklidir. Pozitif kontrol olarak *Ralstonia solanacearum* veya *Burkholderia cepacia*, negatif kontrol olarak ise *Pseudomonas syringae* kullanılır.

11.1.35. Sodyum klorüre tolerans testi

Bakteriyel izolatlar, eğik olarak dondurulmuş % 1, 2, 3, 4 ve 5 (w/v)'lik sodyum klorür içeren nutrient agarlı tüplere inokule edilir. Vida kapaklı tüpler otoklavdan önce ve depolama sırasında buharlaşma ve artık tuz birikiminin önüne geçmek için sıkı bir şekilde kapatılmalıdırlar. 27 °C'de 14 gün süreyle inkübe edildikten sonra bakteriyel gelişmeler kontrol edilir. Karşılaştırma için % 1'lik tuza nadiren tolerans gösteren *Xanthomonas*'lar ve toleranslı olan *Erwinia* grubu türler kullanılabilir. Bu testte *Pectobacterium atrosepticum* ve *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* % 5'lik tuza tolerans gösterirler.

11.1.36. Sıcaklık istekleri

Bakteriler farklı sıcaklıklarda geliştirilerek sıcaklık istekleri belirlenebilir. Bunun için zengin bir sıvı ortam kullanılır; ancak bu ortamın içeriği test edilecek izolatla uyumlu olmalıdır. Her tüpte yaklaşık 10^6 hücre/ml konsantrasyonunda bakteriyel hücre bulunmalıdır. Bakteriyel gelişmeyi saptamak amacıyla spektrofotometrede 14 gün süreyle ölçüm yapılır.

- Bakteriyel gelişme için genellikle 4, 27, 30, 37 ve 41 °C'lerdeki sıcaklıklar test edilir. Bitki patojeni bakterilerin çoğu ve toprak mikroorganizmaları 27 ± 1 °C'de gelişirlerken, *Pseudomonas syringae* 4 °C'de, *P. aeruginosa* 41 °C'de gelişebilirler. Bazı coryneform grubu türlerin de 27 °C'de iyi gelişmedikleri unutulmamalıdır.