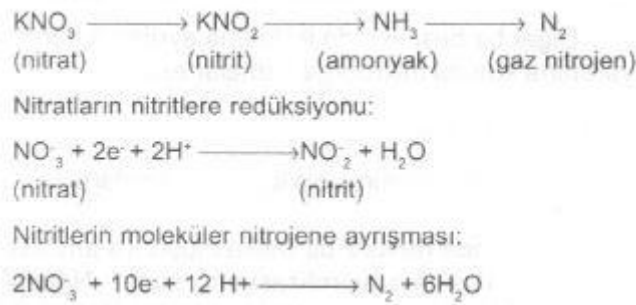


Nitrat Hidrolizi

Bu test, mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılır.

Bazı bakteriler nitratları (NO₃) redükte ederek nitritlere (NO₂) ve hatta daha ileri basamaklara (amonyak (NH₃) ve gaz nitrojen (N₂) kadar ayrıştırabilmektedir (denitrifikasyon). Olay genellikle anaerobik koşullarda ve redüktase enzimlerinin katalitik etkisiyle sürdürülür.



Test, mikropların türlerini ayırt etmede büyük yardımcı olur. *Enterobacteriaceae* familyası genellikle pozitif reaksiyon verir. Nitratların ayrışması sonu oluşan ürünler mikropların karakterine göre değişebilir. Her ne kadar gaz nitrojen meydana gelirse de bunun yanı sıra nitrik oksidi (NO) ve nitrös oksid (N₂O) veya hidroksilamin (R.NH.OH) de teşekkül edebilir. Bu maddeler hücre içinde metabolize edilerek protein ve nukleik asit yapımında yapıtaşı olarak kullanılırlar.

Materyal

- İçinde Durham tüpleri bulunan nitratlı (KNO₃, % 0.1) sıvı besi yerleri (pH 7.0, 5 ml) gerektiğinde yarı katı besi yeri.
- Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- Kontrol pozitif (*S. gallinarum*) ve negatif (*H. vaginalis*, veya *Acinetobacter anitratus*) kültürleri.
- Griess-Ilosvay ayırıcı (taze hazırlanmış) (alfa naftilamin % 0.5 (A) + sulfanilik asit %0.8 (B)).
- Ekilmemiş sıvı besi yerleri.

Metot

Üremiş mikroorganizmalarından nitratlı sıvı besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra tüpleri 37°C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Durham tüpleri içinde gazın oluşumuna dikkat edilir. Tüplere Griess-Illsoy ayıraçlarından (A+B) 5'er damla konur.

Değerlendirme

- 1) Tüplerde gaz oluşumu (N_2) denitrifikasyonu gösterir ve pozitif olarak kabul edilebilir (eğer bakteriler fermenter değilse). Ancak, böyle tüplere Griess-Illsoy ayırıcından A ve B solusyonlarından 5'er damla damlatıldıktan sonra hafifçe çalkalanır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin meydana gelmesi de nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon).
- 2) Tüplerde gaz yoksa, yine ayıraç damlatılır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif olarak kabul edilir.
- 3) Eğer, sonuç negatif (hiç reaksiyon oluşmazsa) olarak görülürse, ya nitratlar hiç ayrışmamıştır veya nitratların ayrışması nitrit safhasından da öteye (amonyak veya gaz nitrojene ulaşmış olabilir. Bu durumda, ayıraçlar konmuş olan tüplere çok az miktarda toz çinko (15-20 mg) katılır. Eğer, çinko ilavesi sonu kırmızı renk meydana gelirse (nitrat nitrite redükte olmuştur). Sonuç negatif olarak değerlendirilir. Eğer kırmızı renk oluşmazsa, bu durum, nitratların nitritten de daha öteki safhalara redükte olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon). Amonyak oluşumu de Nessler ayırıcı ile ortaya konabilir.

Dikkat edilecek noktalar

- 1) Bazı mikroorganizmalar fermentasyon sonu tüpler içinde gaz (hidrojen) meydana getirebilir. Bu durum karşısında bakterinin karakterini iyi bilmek gerekir. Eğer tüpte gaz oluşmuşsa ve mikroorganizma fermentasyon oluşturan türden değilse, gazın nitrojen (N_2) olma olasılığı büyüktür ve ayırıcı koymaya gerek olmayabilir. Ancak, bakteri fermenter türden ise ayıraçları kullanmak zorunludur.
- 2) Bazı araştırmacılar ayrı katı ortamların daha iyi sonuç verdiğini bildirmektedirler. Gerekirse içinde % 0.02 - 0.04 agar ve % 0.1 KNO_3 bulunan yarı katı besiyeri de denenebilir.

- 3) Ayıraçlar taze hazırlanmaları ve iyi çalıştıkları kontrol edilmelidir. A-reagenti buzdolabında ve buna karşın b-reagenti ise oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.
- 4) Alfa naftil amin karsinojenik etkiye sahip olduğundan dikkatlice kullanılmalıdır (pamuklu pipetle ve ağızdan çekilerek kullanılmaz).