الدرس العملى التاسع

تقدير كفاءة الميكروبات فى تثبيت النيتروجين الجوى

طرق تقدير النيتروجين المثبت فى التربة والنبات

١ - طريقة إختزال الأسيتيلين :

تستخدم طريقة إختزال الأسيتيلين فى تقدير قدرة التربة أو الميكروبات على تثبيت النتروجين الجوى . ويعطى إختبار إختزال الأسيتيلين صورة حقيقية لإنزيم النيتروجينيز على إختزال جزء النيتروجين وأيضا إختزال مواد أخرى مثل الأسيتلين أكسيد النيتروز الأزيد السيانيد والأيزوسيانيد .

وتختزل الطريقة الإسيتيلين إلى إثيلين بواسطة أنزيم النيتروجينيز

وتمتاز الطريقة بأنها :

- طريقة سهلة التقدير
- دقيقة
- حساسة جدا
- مستلزماتها رخيصة الثمن وذلك بالمقارنة بطريقة النيتروجين المرقم.

خطوات العمل:

١- نحقن جهاز GLC بواسطة الغاز المراد تحليلة مع ٠.٠٥ ملل عينه من الإسيتلين النقى والإثيلين النقى حتى نتأكد من إمكانية قيام الجهاز بتحليل هذين المركبين ثم نضبط الجهاز ويسجل زمن إحتجاز كل مركب . ويجب مراعاة ظروف تشغيل جهاز GLC لتحليل الأسيتلين والأيثيلين ويتم ذلك بتزويد جهاز GLC بشمعة احتراق وعمود طوله ٢ متر وقطرة ٠.٣سم ، ويراعى أن تكون درجة حرارة العمود ٥٥٠م درجة مئوية وسرعة إنسياب الغاز الخامل ٣٠ ملل/ دقيقة.

٢- بواسطة سرنجة محكمة نسحب عينة من إسطوانة الإثيلين ثم نحقن هذا الغاز فى جهاز GLC حتى يمكننا عمل منحنى قياسى للإثيلين ويتم ذلك بأن نبدأ حقن الجهاز بواحد ميكروليتر ثم نزيد كمية الحقن تدريجيا حتى واحد ملليلتر بعد الحصول على (الورق المستخدم مع جهاز GLC مرسوم علية نتائج تحليل الإثيلين فى صورة أرتفاعات وإنخفاضات) يتم رسم المنحنى القياسى بتحليل الإيثيلين بأن نأخذ أكثر إرتفاع أو نأخذ المساحة الكاملة تحت أقصى إرتفاع (مساحة المثلث) وذلك مقابل تركيز حقن الإثيلين .

٣- نضع واحد جرام تربة فى زجاجة سيرم (سعة ٣٠ ملل) ونضع أيضا قليل من العقد الجذرية فى زجاجة سيرم أخرى ثم يضاف بعد ذلك ١.٠ مل ماء لكل عينة ويحكم غلق الزجاجات بالسدادات الكاوتشوك.

٤- إسحب من كل زجاجة ٥ مل هواء ثم إحقن بدلا منه ٥ مل أسيتيلين تدريجيا وسجل زمن الحقن إنتظر خمس دقائق ثم إحقن زجاجة أخرى بواسطة ٥ مل أسيتيلين وسجل زمن الحقن للزجاجة الثانية .

٥- يتم تحضين الزجاجات فى المعمل على درجة حرارة ٢٥-٣٠ م .

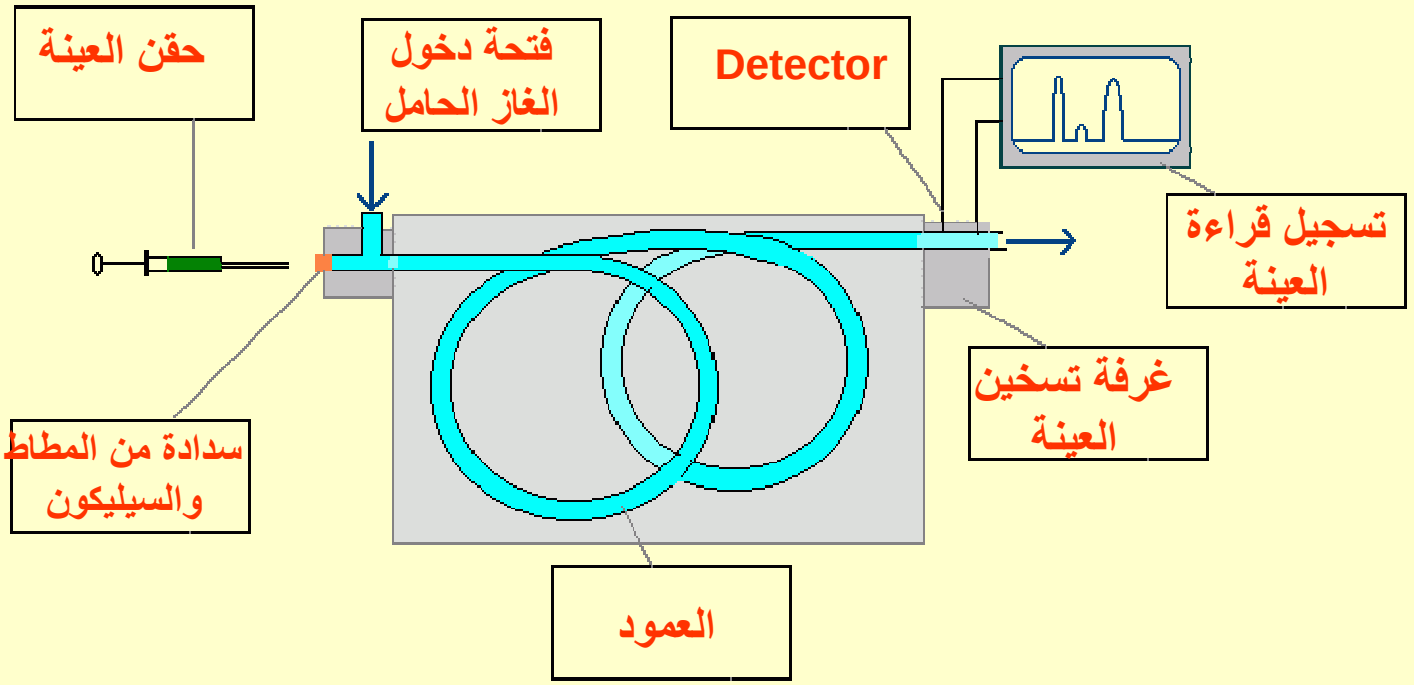
٦- إجمع ٢.٠ مل عينة من كل زجاجة ويتم إجراء ذلك كل عشر دقائق ولمدة ٩٠ دقيقة ثم إحقن العينة المأخوذة فى جهاز GLC باستخدام حرارة العمود ٥٠ مئوى.

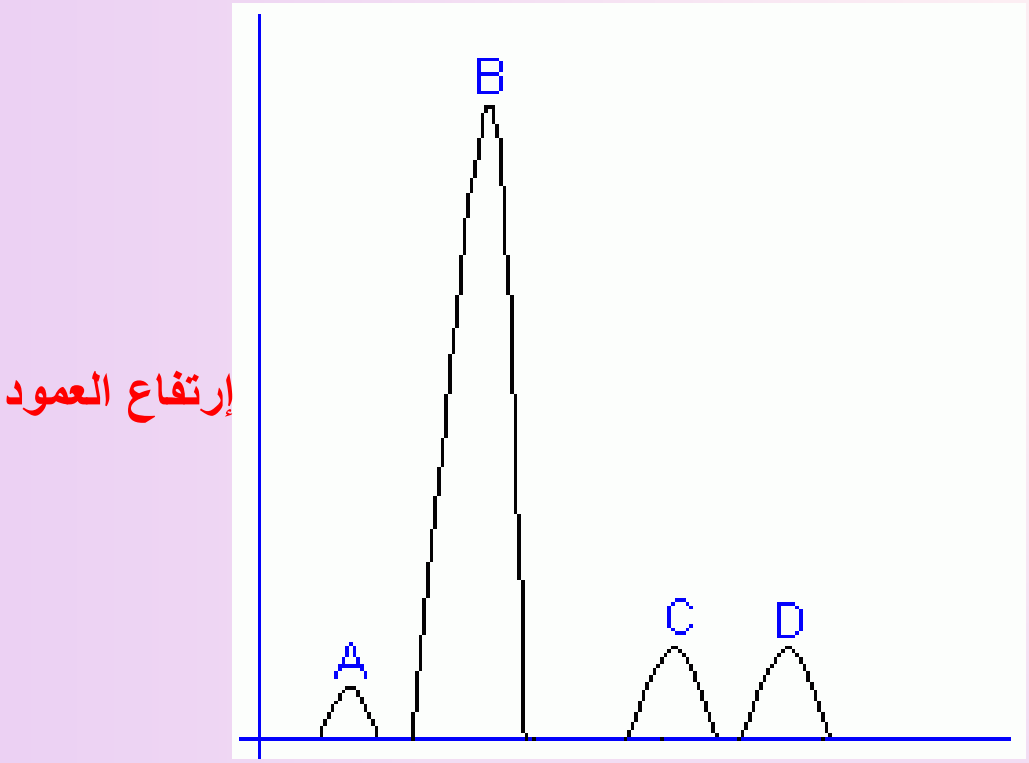
٧- سجل نتائج المنحنى الذى نحصل عليه ويلاحظ أنه يمكن إستخدام مقلل السرعة عند اللزوم لإظهار المنحنى بدرجة تمكنا من حساب أقصى إرتفاع أو المساحة الكاملة تحت المنحنى للإثيلين.

٨- إستخدام المنحنى القياسى (الذى سبق رسمه) لتقدير كمية الإثيلين الناتجة من التجربة ثم ارسم نسبة الإثيلين لكل من التربة والعقد الجذرية على ورق رسم بيانى.

ويمكن حساب كمية الإثيلين التى تكونت فى الساعة باستخدام معادلة خاصة :

رسم تخطيطى مبسط لجهاز GLC





الورق المستخدم مع جهاز GLC مرسوم علية نتائج تحليل الإثيلين فى صورة أرتفاعات وإنخفاضات (المنحنى القياسى)

عند تحليل الإيثيلين نأخذ أكثر إرتفاع أو نأخذ المساحة الكاملة تحت أقصى إرتفاع (مساحة المثلث) وذلك مقابل تركيز حقن الإثيلين .

٢ - طريقة النيتروجين المرقم $^{15}N_2$:

تمتاز هذه الطريقة بأنـها :

- حساسة للكميات الصغيرة من النيتروجين الغازى المثبت
- دقيقة جدا فى عملية التقدير
- يمكن أن تستخدم للتأكد من قدرة ميكروب جديد على تثبيت النيتروجين
- معرفة مصدر النيتروجين الموجودة بالنبات سواء أكان مصدرة نتيتروجين التربة أو الهواء الجوى أو الأسمدة المضافة أو العمليات الزراعية الأخرى .

عيوب الطريقة والأسباب الذى جعل هذه الطريق غير واسعة الإنتشار:

- إرتفاع ثمن النيتروجين المرقم $^{15}N_2$
- إرتفاع ثمن جهاز Mass Spectrometer الازم لإجراء هذه الطريقة.

خطوات العمل:

أ- تقدير كمية النيتروجين المثبت فى التربة:

١- تحضن عينة التربة فى جو يحتوى على نيتروجين مرقم لمدة تتراوح من ٦-١٢ ساعة وفى هذه الخطوة يتم تحويل النيتروجين المرقم إلى أمونيا تحتوى على نيتروجين .

٢- تهضم العينة بطريقة كلداهل (كما سبق شرحة فى الدروس السابقة) ثم يتم تقطيرها للحصول على الأمونيا.

٣- تختبر الأمونيا الناتجة المحتوية على $15N_2$ استخدام جهاز Mass Spectrometer وبذلك تقدر كمية النيتروجين المثبته .

ب- تقدير كمية النيتروجين المثبت فى نبات ما :

حيث يتم إستخدام النيتروجين المرقم $15N_2$ على نبات مثبت للنيتروجين وأخر غير مثبت (للمقارنة) ويتم تقدير كمية النيتروجين المثبت من خلال معادلات خاصة:

Mass Spectrometer

Mass Spectrometer

٣ - طريقة تقدير الأمونيا باستخدام وحدة كلداهل:

وتعتبر هذه الطريقة :

- من أسهل الطرق المستعملة فى تقدير كمية النيتروجين المثبت فى التربة أو النبات
- أسرع الطرق .
- أقل الطرق تكلفة.
- يعيب هذه الطريق أن :
- كمية الأمونيا المقدرة تكون غالبا أقل من الكمية المثبتة فعلا .

والسبب : (دخول الأمونيا فى تكوين الأحماض الأمينية داخل جسم الميكروب)

وللتغلب على ذلك : (بمنع تحول الأمونيا المثبته داخل الخلايا إلى أحماض أمينية باستعمال مادة **methionine sulphoximine** المثبطة للنظام الإنزيمى , **Glutamine synthetase** **Glutamate synthase** وبذلك تقدر كمية الأمونيا المتكونة من عملية تثبيت النتروجين الجوى

وتتلخص هذه الطريقة فى تحويل النيتروجين العضوى فى التربة أو النبات إلى أمونيا عن طريق إجراء عملية الهضم باستخدام حامض كبريتيك مركز ثم إمتصاص الأمونيا الناتجة وتقديرها كميا

وحدة كلداهل

إستخدام وحدة السبيرموسفير فى كفاءة الميكروبات المثبتة لأزوت الهواء الجوى

تستخدم وحدة السبيرموسفير فى تقدير كفاءة الميكروبات المثبته لآزوت الهواء الجوى مثل بكتيريا العقد الجذرية والأزوتوباكتر والأزوسبيريللا والطحالب الخضراء الزرقة وغيرها ويتم ذلك باستخدام طريقة إختزال الإسيتيلين.

خطوات العمل:

١- توضع بادرة النبات موضع الدراسة (بقولى أو نجيلى) فى وحدة السبيرموسفير (شكل ٣) مع مراعاة ظروف التعقيم .

٢- تلقيح البيئة المعدنية المعقمة الخالية من النيتروجين والكربون بالسلالة المراد إختبارها ، وأيضا تلقح السلالات الأخرى كل على حدا فى وحدة السبيرموسفير خاصة وتحت نفس الظروف وذلك لإختبار أكفأها فى تثبيت نتروجين الهواء الجوى.

٣- نترك بعض الوحدات من السبيرموسفير بدون تلقيح للمقارنة.
٤- تغطى الوحدات الملقحة وغير الملقحة بسدادات قطنية.
٥- بعد تكون العقد البكتيرية على البذور تستبدل السدادات القطنية بسدادات من الكاوتشوك .
٦- يتم إستبدال ١٠% من هواء وحدة السبيرموسفير وذلك باستخدام سرنجة ونحقن بدلا منه غاز الأسيتيلين .
٧- بواسطة حقنة يتم سحب كمية معلومة (حوالى ٠.٥سم٣) من الغاز الموجود فى وحدة السبيرموسفير وذلك على فترات مختلفة .
٨- تقدر كمية غاز الإثيلين الناتجة عن إختزال غاز الإسيتيلين وذلك باستخدام جهاز GLC.
٩- إرسم رسم بيانى يوضح العلاقة بين الزمن وكمية الأيثيلين المتكونة من غاز الأسيتيلين خلال مدة التقدير على فترات (كل ١٢ ساعة) ويجب مراعاة عدم زيادة مدة التقدير عن ٨ -١٢ يوم على الأكثر.

المراجع :

http://www.acsion.com/index.cfm?pageID=44
www.alibaba.com/catalog/.../Disposable_Products.html
http://www.climate.unibe.ch/~jcor/Group/Procedure_description.html
http://www.behr-labor.com/ehtemel/prods/01505c.html
http://www.microbelibrary.org/
http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3
http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect_21/f15_5.JPG
http://www.labx.com/v2/b.cfm?a=794
http://structbio.vanderbilt.edu/wetlab/fermentor.phtml
http://czbiom.ecn.cz/index.shtml?x=148446