م/ التثبيت الحيـوي للنيتروجيـن

Biological-Nitrogen Fixation

أن أهمية عنصـــــر النيتروجين تأتي من كونه يدخل في تركيب البروتين والاحماض النووية في الخلية الحية. كما إن وجوده بشـكل غاز في الهواء يجعله عديم الفائدة ما لم يتحد مع الهيدروجين لتكوين الامونيا أو مع الاوكسـجين لتكوين النترات مثلاً. إن عملية الاتحاد هذه يمكن الحصـول عليها بعد تحويل النيتروجين الى شكل قابل للدخول في تفاعلات الايض التي تعتمد عليها جميع اشكال الحياة.

إن تحول النيتروجين الى الشكل الذي يؤهله للدخول في الفعاليات الحيوية يمكن أن يحصل عليها بطريقة حيوية بوســـاطة الاحياء المجهرية بعملية تدعى: **تثبيت النيتروجين Nitrogen Fixation** وتعرف بأنها عملية اختزال النيتروجين الجوي الى امونيا بمســاعدة انزيم **Nitrogenase** وتوفر مصـــدراً للطاقة **(ATP)** وايون موجب ثنائي التكافؤ مثل المغنيســـيوم Mg^{++} أو المنغنيز Mn^{++} أو غيرها مع وجود عامل مختزل **Reductant** يمنح الالكترونات ومســـتلم الالكترونات الذي يختزل النيتروجين، وتثبيت النيتروجين أما أن يكون بصورة لا تكافلية (حرة) أو بصورة تكافلية.

إن النيتروجين يزال باسـتمرار من التربة خلال عملية أو فعل **الغسـل Leaching action** للماء الذي يزيل النترات بعد تكوينها ومن ثم فلابد من إضـافة النيتروجين الصـالح للاستخدام باستمرار الى التربة للحفاظ على المحتوى النيتروجيني لها.

يكون التجهيز الطبيعي للنيتروجين المثبت محدوداً جداً ويشمل:

1. كميات قليلة من النيتروجين المثبت على شـــكل ايونات الامونيوم والنترات الموجودة في ماء المطر.
2. زيادة خصـــوبة التربة قد تضـــيف نيتروجين مثبت كزيادة محتوى التربة من المادة العضـــوية وغيرها.

إن العمليتين السابقتين لا تعوض كمية النيتروجين المفقودة من التربة بوساطة عملية اختزال النترات Denitrification لذا لابد من تثبيت النيتروجين بطرق أخرى. وتمثل الكائنات المجهرية أكثر الوسائل أهمية في عملية التثبيت هذه.

إن 85% تقريباً من النيتروجين المثبت هو نيتروجين مثبت حياتياً. إذ أن تثبيت النيتروجين صناعياً يكون بكميات قليلة. إن عملية التثبيت تستهلك كميات كبيرة من النيتروجين الجوي تقدر بـ $10^6/200$ طن سنوياً بالطرق الحيوية والصناعية اضافة الى كميات أخرى مساوية لها تستهلك عن طريق الطريق الترسيب في البحر وفي القشرة الأرضية على شكل املاح النترات والنتروز والامونيوم. إن تعويض هذه الكمية الكبيرة يتم بوساطة طريقتين رئيسيتين هما:

a. عملية اختزال النترات Denitrification إذ تتحول فيها النترات الى نيتروجين جزيئي N_2 أو أوكسيد النتروز N_2O في اغلب الأحيان.
b. التعويض عن طريق التطاير Volatilization إذ يتم تعويض النيتروجين الجوي عن طريق تطاير الامونيا من التربة الى الجو لقلة امتصاص جزيئات التربة لها، وتقدر كمية النيتروجين المتطاير على هيئة غازات نيتروجينية الى الجو بـ 185×10^6 سنوياً.

إن عملية تثبيت النيتروجين تجري كما بينا آنفاً بمساعدة انزيم النيتروجينيز والصفات لهذا الانزيم هو وجود نوعين من البروتين اللذين يحتويان على بعض المعادن:

1. البروتين الأول: يحتوي على المولبيديوم Mo والحديد وكبريت في مجموعة الثايول ويدعى هذا البروتين بـ: **Mo-Fe protein** ويرمز له بالحرف **(X)** ويطلق عليه ايضاً **Molybdoiron protein** ويتراوح وزنه الجزيئي بين (120,0000-100,000).
2. البروتين الثاني: يحتوي على حديد وكبريت ويدعى **بروتين-Fe** **(Iron protein)** ويرمز له بالحرف **(Y)** ووزنه الجزيئي حوالي (50,000).

إن البروتينين المذكورين آنفاً يكونان غير فعالين عند وجودهما بصورة منفصلة، الا إن جزيئة الانزيم الفعالة تتكون من اتحاد هذين الجزأين بعضهما ببعض وهناك تشابه كبير في الوظيفة والتركيب الكيمياوي لهذا الانزيم حتى في حالة كون الكائنات الحية التي يستخلص منها بعيدة في السلم التصنيفي.

إن لأنزيم النيتروجين القدرة على نقل الالكترونات من حوامل الى النيتروجين وله القدرة ايضـــاً على نقل الكترونين فقط في كل حالة يشـــترك فيها وهناك اقتراح بحصـــول ثلاث حالات لانتقال الالكترونات ليصـــبح مجموع الالكترونات المنقولة ستة وذلك لاختزال جزيئة النيتروجين الى امونيا كما هو موضح كالآتي:

$$N_2 + H_2 \longrightarrow N_2H_2 \text{ (di – imide)}$$

$$N_2H_2 + H_2 \longrightarrow N_2H_4 \text{ (hydrazine)}$$

$$N_2H_4 + H_2 \longrightarrow 2NH_3 \text{ (ammonia)}$$

كما إن عملية تثبيت النيتروجين تحتاج الى مانح للإلكترونات Electron donor كما تحتاج ايضـاً الى حامل للإلكترونات Electron carrier، فبالنســـبة لمانح الالكترونات فإنه يختلف باختلاف الاحياء الحرة المعيشـــة وغير ذاتية التغذية واللاهوائية مثال بكتريا ***Clostridium*** فيكون مانح الالكترونات كاربوهيدراتي مثل البايروفيت pyruvate والفاكيتوكلوتاريت α – ketoglutarate، ويكون محرراً الالكترونات بعملية التخمر Fermentation، اما في الاحياء الهوائية فإن الالكترونات تتحرر عن طريق الاكســـدة، وبالنســـبة للأحياء الهوائية التي تعيش بصـــورة تكافلية مع النبات فإن النبات يقوم بتوفير المواد الوســـطية التي تكون مصـدراً لتلك الالكترونات فلقد وجد إن $NADPH_2$ يشكل مانحاً للإلكترونات كما هو الحال في بكتريا الـــ: ***Azotobacter vinelandii*** على الرغم من إن الـ **NADP** يعد حاملاً للإلكترونات لا محرر لها، ولكن بما إن هذا المركب لا يملك القدرة على تمرير هذه الالكترونات الى انزيم النيتروجينيز مباشرة دون حملها بوساطة مواد لذلك يمكن عدّه مانحاً للإلكترونات في هذه الحالة ولذلك تنتقل الالكترونات فيه الى حاملها الآخر ثم الى انزيم النيتروجينيز.

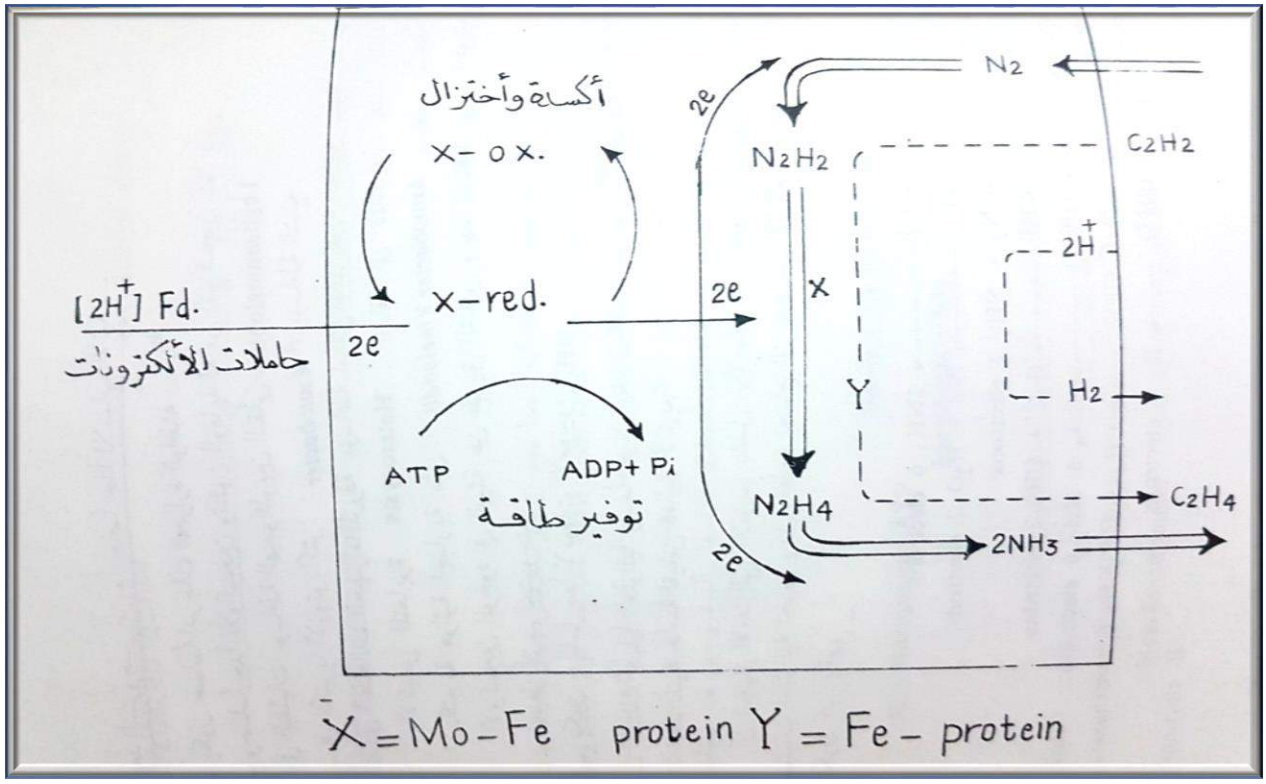
كذلك فإن عملية تثبيت النيتروجين تحتاج الى ما يحمل الإلكترونات وهذه المواد لها القدرة على حمل الالكترونات ونقل من انزيم الى اخر. إن حاملات الإلكترونات التي تشـــترك في عميلة تثبيت النيتروجين هي من نوع الفيرودوكســـينات Ferrodoxins والفلافودوكســـينات Flavodoxins التي لها القدرة على نقل الالكترونات الى انزيم النيتروجينيز الذي يســـاعد بدوره على اختزال النيتروجين الجزيئي الى امونيا، وقد تم العثور على هذه الحوامل في بكتريا لاهوائية اختبارية وبكتريا هوائية وبكتريا تكافلية مثبتة للنيتروجين وبكتريا لاهوائية مجبرة وبكتريا ضوئية التغذية والطحالب الخضراء المزرقة وفي النباتات ايضاً.

تتميز حاملات الالكترونات هذه بامتلاكها جهد اكسدة واختزالاً واطئاً أي إنها تستطيع استلام الالكترونات من مواد لها جهد اكســـدة واختزال اعلى منها: $NADPH_2$ ثم تحولها الى مواد اوطأ جهداً وكذلك بتفاعلاتها العكسية عندما تتأكسد وتختزل، أي أن لها القدرة على التحول من حالة اكسدة الى حالة اختزال وهذا التحول عكســـي. إن عمل هذه الحاملات ليس انزيمياً إذ اتضـــح مؤخراً بإنهما المختزلان الطبيعيان الوحيدان لأنزيم النيتروجينز.

إن البحث ما يزال مســـتمراً حول تفاصـــيل عملية تثبيت النيتروجين وظهر من نتائج الأبحاث إن **بروتين- Fe** من انزيم النيتروجينيز هو الذي يختزل اولاً بوســـاطة حامل الالكترونات الفيرودوكســـين Ferrodoxin في الخلية الحية ثم يقوم الـ **ATP** بتوفير طاقة لتنشيط الالكترونات المنقولة الى البروتين هذا لكي يتم نقلها الى الجزيئة الثانية من البروتين في انزيم النيتروجينيز وهو **بروتين Mo-Fe-** الذي يقوم باختزال النيتروجين الجزيئي الى امونيا.

إن **حاملات الالكترونات الفيرودوكسينات Ferrodoxins** هي عبارة عن بروتينات تحتوي على الحديد والكبريت ولها القدرة على الاختزال والتأكسد بصورة عكسية وتملك جهد اكسدة واختزال واطئ، وتشترك هذه البروتينات في تفاعلات عديدة مثل اختزال انزيم النيتروجينز وانزيم الهيدروجينيز وغيرها. اما **الفلافودوكسينات Flavodoxins** فهي ايضاً بروتينات تنتمي الى مجموعة الـــ Flavoprotein وفعاليتها الحيوية مشابهة للفيرودوكســـينات لكنها اقل كفاءة في نقل الالكترونات لان لها جهد اكســـدة واختزالاً اعلى بقليل من جهد الفيرودوكسينات.

إن **بروتين Mo-Fe-** هو الذي يقوم باختزال النيتروجين الجزيئي الى امونيا، في حين يقوم **بروتين- Fe** باختزال الاستيلين Acetylene (C_2H_2) الى اثيلين Ethylene (C_2H_4)، كما في الشكل (1):



الشكل (1): ميكانيكة انزيم النيتروجينيز من الناحية الكيميائية الحيوية وعلاقة ذلك بتثبيت النيتروجين الجوي.

يعد النيتروجينيز انزيماً خاصاً جداً للأسباب الآتية:

1. يكون حساساً لدرجات الحرارة الواطئة.
2. حساساً جداً للأوكسجين وتكون الوقاية له من الاوكسجين كما يأتي:
   a. في البقوليات بوساطة الهيموكلوبين البقلي Leghaemoglobin.
   b. في بكتريا الازوباكتر ***Azotobacter*** بوساطة الشمع.
   c. في الطحالب الخضراء المزرقة بوساطة أماكن ذات جدار خلوي سميك تعرف بالاكياس المتغايرة Heterocysts. إضافة الى ذلك فإن هناك انواعاً بكتيرية هوائية اجبارية مثل ***Azotobacter vinelaodii*** تستطيع استخدام الاوكسجين الموجود في البيئة عن طريق التنفس وبهذا تحتفظ ببيئة لاهوائية تحيط بإنزيم النيتروجينيز.
3. يكون حساساً جداً لايونات الامونيوم NH_4.
4. يمتلك جهازاً اختزالياً واسعاً إذ يختزل الاستيلين الى اثيلين وهذه العملية تعد تنقية خاصة لقياس فعالية الانزيم.

إن الجهاز الاختزالي للانزيم يشمل بالإضافة الى اختزال النيتروجين الجزيئي عمليات اختزالية أخرى وكل خطوة تحتاج الى عدد من الالكترونات وبصورة عامة تكون كما يأتي:

Molecular nitrogen (N_2) ⟶ **$2NH_3$** 6 electrons

Nitrous oxide (N_2O) ⟶ **N_2 + H_2** 2 electrons

Azide (N_3) ⟶ **N_2 + NH_3** 2 electrons

Acetylen ($HC \equiv CH$) ⟶ **$H_2C + CH_2$** 2 electrons

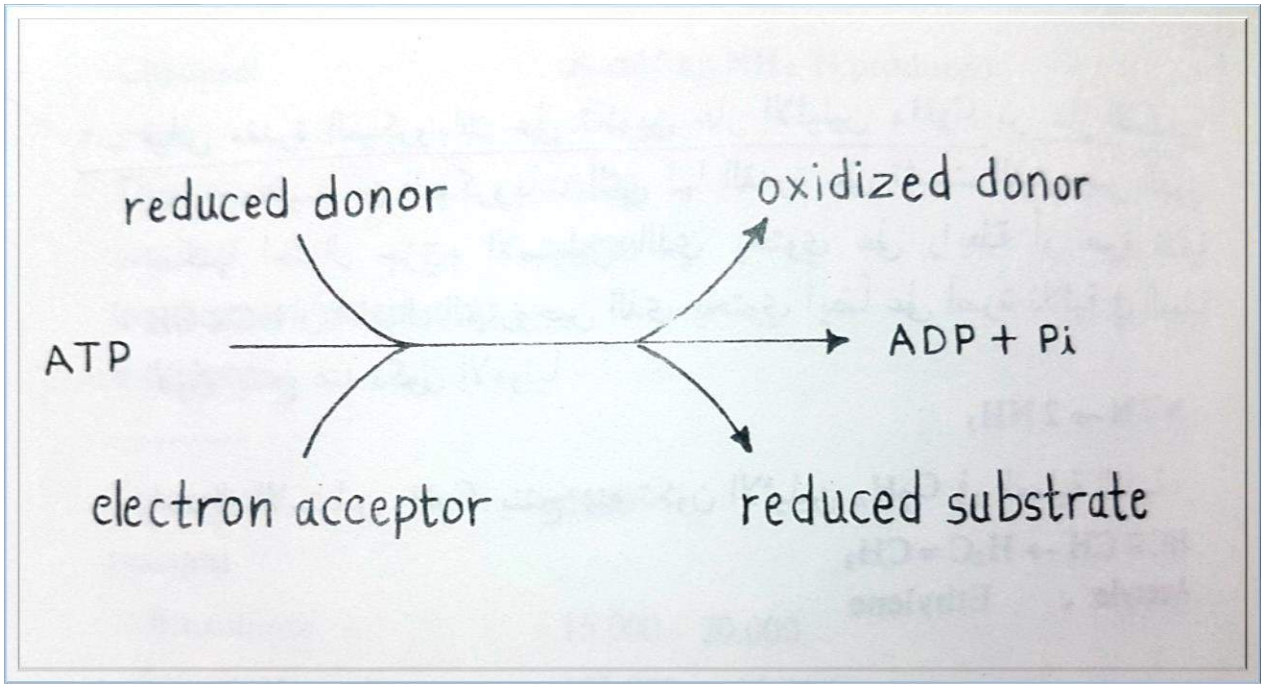
Hydrogen cyanide (HCN) ⟶ **CH_4 + NH_3** 6 electorns

Isonitriles (CH_3-N$\equiv$C) ⟶ **CH_4 + NH_3** 6 electons

Hydrogen proton ($2H^+$) ⟶ **H_2** 2 electrons

26 electrons

ونستطيع تتبع التفاعلات أعلاه بصورة عامة كما في المخطط التالي:



ومن ملاحظة التفاعلات الاختزالية ايضـــاً نجد أن انزيم النيتروجينيز له القدرة على اختزال البروتينات (H^+) الى غاز الهيدروجين (H_2) عند عدم توفر النيتروجين بوجود محرر الالكترونـات، وإن الهيدروجين يعمل كعامل تنافســـي لكنه ضـــعيف في عملية تثبيت النيتروجين، اما في البكتريا التي تحتوي على انزيم الهيدروجينيز والفيرودوكسين مثل بكتريا الـ ***Clostridium*** فإن غاز الهيدروجين قد يستخدم عامل اختزال في عملية التثبيت:

$$N_2 + \text{Nitrogenase ATP} \xrightarrow{\text{Ferrodoxin + hydrogenase + } H_2} \text{Ferrodoxin} + NH_3$$

هناك طريقتان رئيستان لتقدير التثبيت الجوي للنيتروجين:

1. باستخدام نظير النيتروجين $^{15}N_2$ إذ تتمكن الميكروبات المثبتة للنيتروجين من استخدام هذا الغاز ودمجه في بروتوبلازم الخلايا، الا أن هذه الطريقة مكلفة اقتصادياً وتحتاج الى جهاز Mass spectrometer.
2. قياس مقدرة الميكروبات على تكوين غاز الاثيلين C_2H_4 من غاز الاستيلين C_2H_2، إذ إن الميكروبات التي لها القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي يمكنها اختزال جزيء الاستيلين الذي يحتوي على آصرة ثلاثية $HC \equiv CH$ إن اختزال النيتروجين الذي يحتوي ايضاً على آصرة ثلاثية في العملية الأولى ينتج عنه تكوين الامونيا:

$$N \equiv N \longrightarrow H_2C = CH_2$$

واختزال الاستيلين C_2H_2 ينتج عنه تكون الاثيلين C_2H_4 في العملية الثانية:

$$HC \equiv CH \longrightarrow H_2C = CH_2$$

Acetylene Ethylene

يتم تثبيت النيتروجين بوساطة نوعين من الكائنات منها تعيش بصورة حرة وأخرى تعيش في علاقة تكافلية مع نباتات مختلفة. إن هذه البكتريا لها القدرة على اختزال غاز النيتروجين وتحويله في النهاية الى مجموعة امين NH_2^- للأحماض الامينية التي تؤلف البروتينات.

وعلى سبيل المثال فإن المتطلبات اللازمة لتثبيت (150) كغم نيتروجين في التثبيت التكافلي هي (1000) كغم كاربوهيدرات، اما ما يعادل 15–20 % من صافي انتاج النبات من الكاربوهيدرات، اما المتطلبات اللازمة لتثبيت الكمية في حالة التثبيت بصورة حرة فالمثبتات الهوائية مثل ***Azotobacter*** و ***Beijerinckia*** هي (4000) كغم كاربوهيدرات والمثبتات اللاهوائية مثل : ***Clostidium*** و ***Desulfovibrio*** و ***Methanobacterium*** . فإنها تحتاج الى (2000) كغم لتثبيت نفس الكمية أعلاه.

وبصورة عامة فإن اختزال النيتروجين الى امونيا NH_3 يحتاج او يتطلب طاقة عالية جداً وعلى ضوء الدراسات الأخيرة قدرت تلك المتطلبات من الناحية الكيمياوية والبايوكيمياوية ومن النواحي النظرية والتطبيقية كما يأتي:

Chemical	Kcal/ Kg NH_4-N produced
Theoretical	5100
Practical	1500
Biochemical	
Theoretical	5100
Practical	
Rhizobium	15.000 – 20.000
Azotobacter	100.000 – 400.000

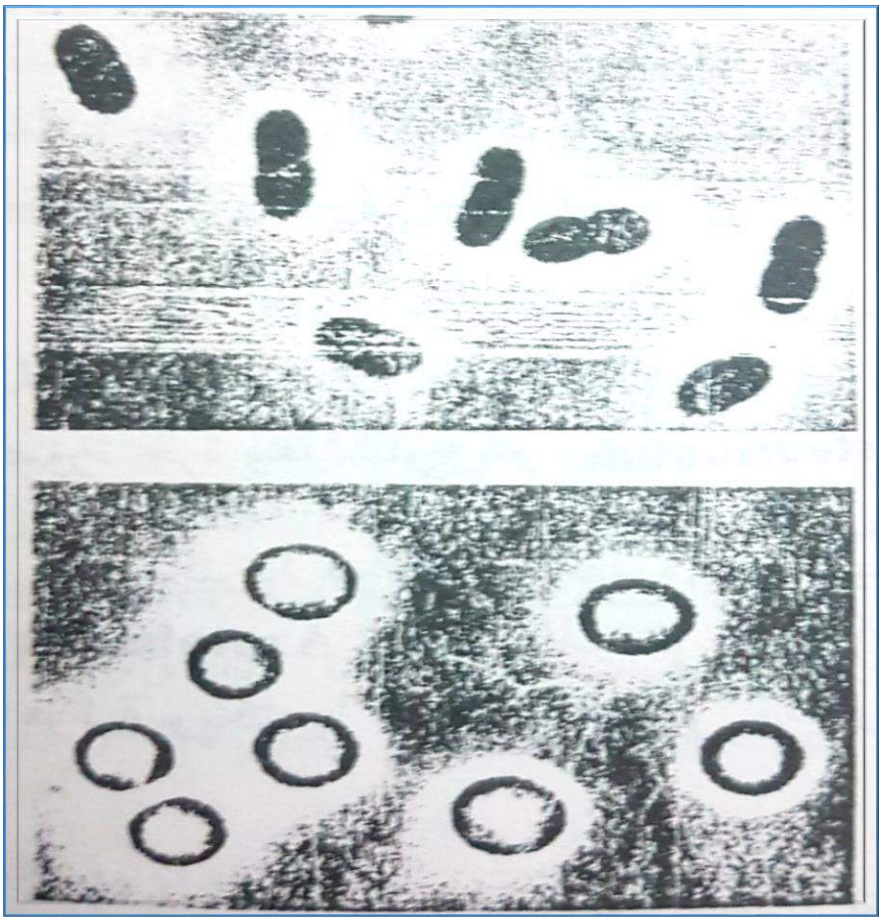
تثبيت النيتروجين بصورة لا تكافلية (بصورة حرة) Non Symbiotic Nitrogen Fixation

إن الاحياء التي تقوم بهذه العملية تعيش بصورة حرة في التربة وتثبت النيتروجين وذلك للاستفادة منه في بناء مكونات الخلية وبعد موت الخلايا ينطلق هذا النيتروجين المثبت داخل الاحياء الى التربة ليفيد منه النبات ويطلق على هذا النوع من التثبيت **بالتثبيت اللاتكافلي للنيتروجين**.

لقد تم التعرف على هذا النوع من التثبيت عندما استطاع العالم الروسي Winnoggradsky سنة 1895 من عزل بكتريا لاهوائية في التربة لها لاقدرة على تثبيت النيتروجين بصورة حرة وهذا النوع هو ***Clostridium pasteurianum***.

كما أعقب ذلك عزل بكتريا هوائية لها القدرة على تثبيت النيتروجين بصورة حرة تتبع الجنس: ***Azotobacter*** وبعد ذلك تم التعرف على أنواع أخرى من البكتريا هوائية ولاهوائية وبكتريا التركيب الضوئي وبعض الأنواع من الطحالب الخضراء المزرقة.

إن البكتريا الرئيسة التي تقوم بتثبيت النيتروجين بصورة لاتكافلية تتبع لعائلة:***Azotobacteriaceae*** إذ تضم هذه العائلة انواعاً ذات كفاءة عالية في تثبيت النيتروجين الجوي. خلاياها عصوية او بيضوية سالبة لصبغة كرام ولا تكوّن سبورات بعضها يكوّن حويصلات cysts وغير ذاتية التغذية هوائية اجباريةوتعيش في التربة وعلى المياه وعلى سطوح أوراق النباتات. تضم هذه العائلة أربعة اجناس تختلف فيما بينها ببعض الصفات وهي: ***Derxia*** و***Beijerinckia*** و ***Azomonas*** و***Azotobacter*** واهم الاجناس المذكورة أعلاه هو جنس الـ ***Azotobacter*** وهي اول بكتريا هوائية عرفت بقابليتها على تثبيت النيتروجين الجوي وقد عزلها العالم Beijerinckia سنة 1908 من التربة. خلايا هذا الجنس كبيرة بيضوية الشكل وتوجد اما بصورة منفردة أو في ازواج بعضها متحرك بوساطة اسواط محيطية Peretrichous وبعضها غير متحرك. سالبة لصبغة كرام في الغالب أو متغيرة الصبغة احياناً، ولا تكوّن سبورات الا إنها تكوّن حويصلات cysts كما في الشكل (2)، وتتكون الحويصلة عندما تتجمع كميات كبيرة من حامض polyhydroxy butaric acid (PHB) الذي يخزن في البكتريا المتقدمة في العمر ويتحول شكلها من البيضوي الى الكروي وتفقد حركتها مع ازدياد سمك جدارها وتتجمع محتويات الخلية في الوسط لتكوّن الجسم المركزي للحويصلة الذي يحاط بغلاف داخلي يسمى Intine وغلاف خارجي يعرف بـ Exine.



الشكل (2): يوضح البكتريا المثبتة للنيتروجين بصورة حرة للنوع *Azotobacter vinelandii* وتظهر الخلايا الخضرية للبكتريا الفتية بشكلها العصوي والمتقدمة بالعمر كروية ذات حوصلة.

والحويصلة تكون اقل مقاومة للحرارة من السبورات الا إنها تقاوم الجفاف. تنمو بكتريا ازوتوباكتر على وسط الاكار مانيتول وتكون مستعمراتها شفافة تشبه قطرات الماء ثم تتحول تدريجياً ويصبح لونها داكناً. أما في الأوساط السائلة فتكوّن اغشية بيضاء ثم تتحول الى بنية داكنة، وتكوّن هذه البكتريا مادة مخاطية كثيفة حول الخلية لتكوّن ما يشبه الحافظة Capsule. تحتاج البكتريا الى المركبات العضوية مصدراً للكاربون في اثناء نموها مثل السكريات والاحماض القلوية والكحول. كما تفضل درجة حرارة بين 20 30 م° والـ pH المفضل لها بين (7 – 7.5) إذ إنها لا تنمو في الوسط الحامضي.

يشمل جنس الـ ***Azotobacter*** على أربعة أنواع اكثرها انتشاراً هو النوع ***A.Chroococcum***. تنتشر بكتريا الازوتوباكتر في التربة والمياه وعلى أسطح النباتات والبكتريا الموجودة على أسطح جذور النباتات تكون

انشـــط من تلك التي توجد في التربة وذلك لأنها تفيد من افرازات الجذور مصـــدراً للكاربون. إن النوعين ***A.Chroococcum*** و ***A.vinelandii*** تعد من اكثر الأنواع انتشاراً في التربة العراقية.

تقاس كفاءة البكتريا المثبتة للنيتروجين بتنمية البكتريا على وســـط خالٍ من النيتروجين ثم تقدر كمية النيتروجين اما بطريقة كلدال Kjeldahl أو باســتخدام النظائر المشــعة ^{15}N أو باختبار اختزال الاســتيلين Acetylene reduction test وكمية الاثيلين المتكونة من الاستيلين إذ يستخدم جهاز الـــ (G.C) Gass chromatography لهذا الغرض كما اوضحنا ذلك سابقاً.

كما تقاس كفاءة البكتريا في تثبيت النيتروجين ايضــاً في المختبر بوســاطة اســتهلاكها للســكر، إذ يبلغ مقدار النيتروجين المثبت من أكثرية الأنواع التابعة الى الـــــ ***Azotobacter*** من (5 – 20) ملغم لكل غرام واحد من سكر تستهلكه البكتريا، اما كفاءة بكتريا ***Clostridium*** فتكون اقل إذ أنها تثبت من (6 – 8) ملغم نيتروجين لكل غرام واحد، اما أنواع الطحالب الخضــراء المزرقة التي لها القابلية على تثبيت النيتروجين فتكون كفاءتها (30 – 115) مايكروغرام لكل 1 سم^3 من الوسط الغذائي السائل الخاص بالطحالب لمدة 60 يوم مع توفر الضوء الكافي في درجة حرارة بين 30 – 35 م^o .

العوامل التي تؤثر في عملية تثبيت النيتروجين بصورة لاتكافلية (بصورة حرة):

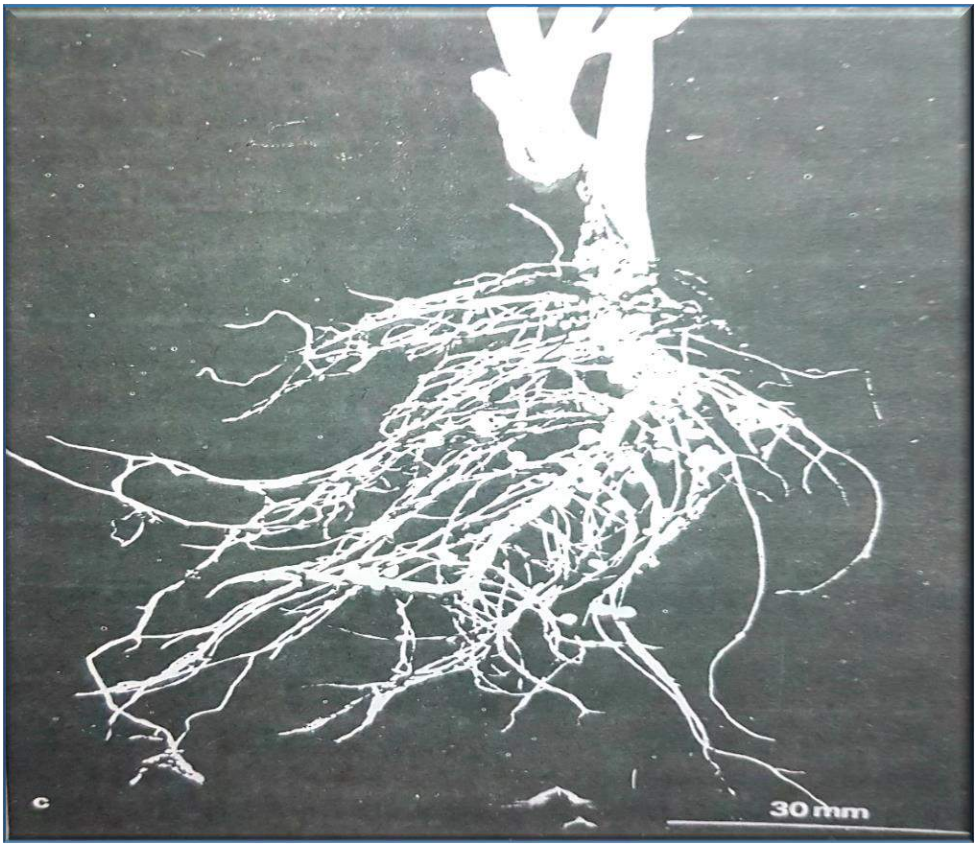
1. **وجود المركبات النيتروجينية في التربة:** إذ أن وجود كميات كبيرة من املاح الامونيوم والنترات تؤدي الى تثبيط عملية تثبيت النيتروجين إذ أن الاحياء المســـؤولة عن تثبيت تفضـــل الايونات الجاهزة كمصدر للنيتروجين وذلك لسهولة استغلالها والاستفادة منها.
2. **وجود السـكريات البسـيطة في التربة:** إذ تعد هذه السـكريات مصـدراً كاربونياً سـهل الاسـتغلال من الاحياء التي تقوم بعملية تثبيت النيتروجين بصـــورة حرة. إضـــافة الى توفير اللازمة لعملية التثبيت نتيجة استهلاك هذه السكريات.
3. **وجود بعض العناصر الخاصة في التربة كالمولبيديوم والحديد:** إذ يدخل هذان العنصران في تركيب جزيئة انزيم النيتروجينيز كما موضح سابقاً ولهذا السبب تزداد كفاءة التثبيت.
4. **درجة الاس الهيدروجيني الـــ pH:** إن الوسط الحامضي يقلل من نشاط البكتريا المثبتة للنيتروجين بصورة حرة، وبصورة عامة تقل اعدادها في pH اقل من (5) وهناك بعض الحالات الاستثنائية التي لا تتأثر بدرجة الحموضة مثل الاجناس ***Clostridium*** و ***Beijerinckia*** .

5. **درجة الحرارة:** إن الدرجة الحرارية المثلى بصورة عامة لعملية تثبيت النيتروجين بصورة حرة بين 20 و 30 م^{o} إذ إن نشاط البكتريا المسؤولة تقل في درجات الحرارة العالية والواطئة على حد سواء.
6. **الرطوبة والتهوية:** إن الرطوبة المناسبة لعملية التثبيت هي الرطوبة الواقعة بين 60 – 65 % من القابلية التشعبية للتربة إذ الجفاف غير ملائم لعملية التثبيت، كذلك تكون الرطوبة الزائدة وخصوصاً في التربة الغدقة إذ تتوفر ظروف لاهوائية غير ملائمة لعملية التثبيت ما عدا بعض البكتريا اللاهوائية اختياراً مثل بكتريا ***Clostridium*** وهي في الغالب اقل من البكتريا الهوائية التي لها القدرة على تثبيت النيتروجين بصورة حرة.
7. **وجود بعض الفاجات المتخصصة في إصابة الأنواع التي تقوم بعملية التثبيت في التربة:** فكلما كانت اعدادها كبيرة في التربة فهناك احتمال شل حركة ونشاط تلك البكتريا مما تقلل من كفاءة التثبيت نيتروجين.

تثبيت النيتروجين بصورة تكافلية Symbiotic Nitrogen Fixation

هناك مجموعة من الاحياء تعيش تكافلياً مع بعض النباتات ولا تتمكن من تثبيت النيتروجين الا عند وجودها في النبات، وفي هذه الحالة تستفيد الاحياء المجهرية والنباتات من النيتروجين المثبت ويطلق على هذه العملية تسمية **التثبيت التكافلي للنيتروجين**. والتكافل لغوياً يعرف (بالعيش معاً) Living together وقديماً كانت تطبق على العلاقات التطفلية اما حاليا فتستخدم لوصف العلاقات ذات المنفعة المتبادلة والتي نحن في صددها.

إن اهم الاجناس التي تثبت النيتروجين بصورة تكافلية هو جنس الرايزوبيوم ***Rhizobium*** تنتمي هذه البكتريا الى عائلة: Rhizobiaceae ولها القدرة على تكوين عقد جذرية على جذور النباتات البقولية كما موضح في الشكل (3) وهي عبارة عن خلايا عصوية هوائية سالبة لصبغة كرام، متحركة ولا تكوّن سبورات. تستخدم بكتريا الرايزوبيوم مصادر كاربون عضوية مختلفة مثل المانيتول والكلوكوز ومصدراً نيتروجينياً كالأمونيا والنترات. اما في حالة خلو الوسط من أي مصدر نيتروجيني فإنها تستخدم النيتروجين الجوي، ويستخدم وسط: Manitol Yeast Extra Agar لعزل بكتريا الرايزوبيوم إذ تنمو على شكل مستعكرات شفافة مختطية يتحول لونها بالتدريج الى اللون الأبيض.



الشكل (3) العقد على جذور نبات الباقلاء المتكونة بوساطة الـ *Rjizobium leguminosarum*.

تقسم بكتريا الرايزوبيوم الى مجاميع حسب العائل النباتي الذي تصيبه، إذ أن عدد هذه المجاميع يكون حوالي (25) مجموعة درست ستة مجاميع منها بإسهاب كما موضح في الجدول (1) وهي التي وصفها العالم Jensen عام 1958.

أنواع الرايزوبيوم ***Rhizobium***	المجاميع النباتية التي تصاب بها
R. meliloti	مجموعة الجت Alfafa group
R. trifolii	مجموعة البرسيم Clover group
R. leguminosarum	مجموعة البازلاء Pea group
R. Phaseoli	مجموعة الفاصوليا Bean group
R. lupine,	مجموعة الترمس Lupin group
R. japonicum	مجموعة فول الصويا Soybean group

من التقسيمات المعتمدة لتمييز بين تلك المجاميع هي زمن الجيل Generation Time ومقدرا انتاجها للحموضة وعدد الاسواط وترتيبها، فمثلاً الأنواع الأربعة الاتية:

R. trifolii, R. meliloti, R. leguminosarum, R. Phaseoli لها زمن جيل بين (2 – 4) ساعات ومنتجة للاحماض في الوسط الذي تنمو في كما إنها تتحرك بوساطة (2 – 6) اسواط محيطية، في حين يكون زمن الجيل للأنواع الأخرى مثل:

R. lupine, R. japonicum بين (6 – 8) ساعات ويجعلان الوسط قلوياً ويتحركان بسوط واحد طرفي.

هناك جنس بكتيري موجود في التربة **Agrobacterium** يكون مشابهاً تماماً لبكتريا العقد الجذرية وبعض انواعه تسبب امراضاً للنبات كمرض التضخم التاجي مثل النوع **A. tumefaciens** وأنواع أخرى تستطون سطوح جذور النباتات وغير ممرضة مثل النوع **A. radiobacter**.