

### **III. DERLEMELER**



## BAKLAGİLLERDE AZOT FİKSASYONUNUN ÖLÇÜLMESİNDE ASETİLEN-ETİLEN METODUNUN KULLANILMASI

Abdülkadir AKÇİN (1)

### ÖZET

Baklagil bitkilerinin; yetiştirildikleri toprakları, bitki besin elementleri, özellikle azot bakımından zenginleştirdikleri bilinmektedir. Türlerine göre değişmek üzere, bir dekarlık alanda yetiştirilen baklagil bitkileri, yetiştirildikleri tarla toprağına 3 ila 25 kg. arasında azot fikse etmektedirler. Bu bakımdan ekim nöbetlerinde, baklagillere ayrılan pay büyük olmaktadır.

Baklagil bitkilerinin köklerinde ortak (*Symbiosis*) yaşayan nodozite bakterilerinin fikse ettikleri azot miktarının bilinmesinde yarar vardır. Azot fiksasyonunun ölçülmesinde bu güne kadar bir çok metod kullanılmıştır. Son zamanlarda geliştirilen "Asetilen-Etilen" metodunun uygulamaya konulmasıyla, ucuz, hassas ve birim zamanda çok fazla analize olanak tanıyan bu metod sayesinde, araştırmalara hız verilmiştir.

Bu çalışmaya, azot fiksasyonunun ölçülmesinde kullanılan "Asetilen-Etilen" metodunun denemelerde uygulanış tarzı ve tekniği yönünden, araştırmacılara ışık tutması amacı ile girilmiştir.

### I. GİRİŞ

Baklagiller familyasına (*Leguminosae*) giren bitkilerin köklerinde nodül denilen ve her baklagil türünde farklı yapı gösteren yumrucuklar vardır. Bu yumrucuklar genellikle yuvarlak, elipsoidal, mercan kümesi gibi üst üste yığılmış ve üzüm salkımı görünüşünde olup, içlerinde atmosferik azotu ( $N_2$ ) fikse etme yeteneğinde olan nodozite bakterileri (*Rhizobium sp.*) bulunmaktadır (Tosun, 1974; Akçin, 1976).

Nodozite bakterileri, köklerinde faaliyet gösterdikleri konukçu baklagil bitkileri ile ortak yaşama (*Symbiosis*) sistemi kurmuşlardır. Bakteriler, konukçu

(1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Doçenti.

baklagil bitikisinden karbonhidrat ve mineral maddeleri alırken, ona kendi ürünleri olan azotu verirler (Akçin, 1979).

Rhizobium bakterileri 7 farklı baklagil grubunda faaliyet gösteren 0.5 - 0.8 mikron eninde ve 1.2-3.2 mikron boyunda X, Y, çomak ve çubuk şekillerindeki bakteri topluluğundan oluşmuşlardır (Ishizawa, 1953).

Nodozite bakterileri vasıtasıyla fikse edilen azot miktarına; konukçu baklagil bitkisinin türü, toprağın reaksiyonu (pH derecesi), toprağın strüktürü ve iklim koşulları etki etmektedir. Bu bakteriler yeteri kadar kireç iltiva eden, havalanabilir, sıcak, reaksiyonu pH= 5.6-7.2 olan topraklarda en iyi şekilde gelişme ve nodülasyon olanağı bulurlar (Georlette, 1953; Norris, 1956; Small ve arkadaşları, 1968).

Baklagil bitkilerinin, türlere göre değişmek üzere nodozite bakterileri vasıtasıyla bir dekarlık tarla toprağına fikse ettikleri azot miktarı 3 ila 25 kg. arasında değişmektedir (Anderson, 1965; Beevers, 1976). Bu bakımdan azotlu gübrelerin, nodülasyonu başlatıcı belirli bir miktarın üzerindeki dozda bitkilere verilmesi, nodozite bakterilerinin fikse ettiği azot miktarını azaltmaktadır (Allos ve Bartholomew, 1955).

Rhizobium bakterilerinin fikse ettiği atmosferik azot ( $N_2$ ) miktarının saptanmasında farklı metodlar kullanılmakta ise de, son zamanlarda, tatbikata intikal ettirilen "Asetilen ( $C_2H_2$ ) - Etilen ( $C_2H_4$ )" metodu, en doğru ve çabuk sonuç vermesi yönünden tercih edilmektedir (Hardy ve arkadaşları, 1968; Hardy, Burns ve Holsten, 1973; Sloger, 1973; Philips, 1974; Burns ve Hardy, 1975). "Asetilen-Etilen" metodunu il defa geliştirip denemelere uygulayan Hardy (1971), olmuştur. Azot fiksasyonunu ölçmek için kullanılan metodların yüksek maliyetli oluşu, oldukça karışık yapılı aletlerle işi görmesi, hassas olmayışı ve birim zamanda çok az sayıda analize olanak tanınması gibi mahzurları dolayısıyla, "Asetilen - Etilen" metodunun uygulamaya konulmasından sonra bu eski metodlar terkedilmiştir (Havelka ve Hardy, 1977).

"Asetilen - Etilen" metodunu kullanmak suretiyle üç kişilik bir ekip, tarla koşullarında bir günde yüzden fazla örnek alabilirler.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. MATERYAL

"Asetilen ( $C_2H_2$ ) - Etilen ( $C_2H_4$ ) metodu ile baklagil bitkilerinin fikse ettiği azot miktarının ölçülmesinde aşağıda sıralanan alet ve cihazlar kullanılmaktadır.

a. Tarladan sökülen örneklerin içerisinde temizlendiği 20 cm. en ve boyu, 30 cm. derinliği olan 5 ile 10 adet sac su tankı.

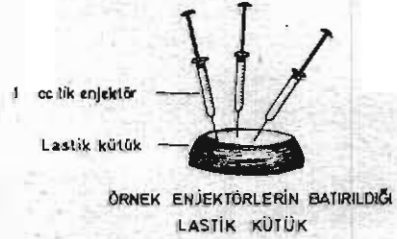
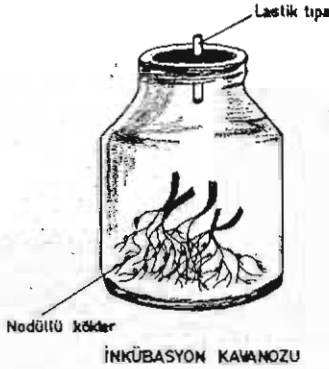
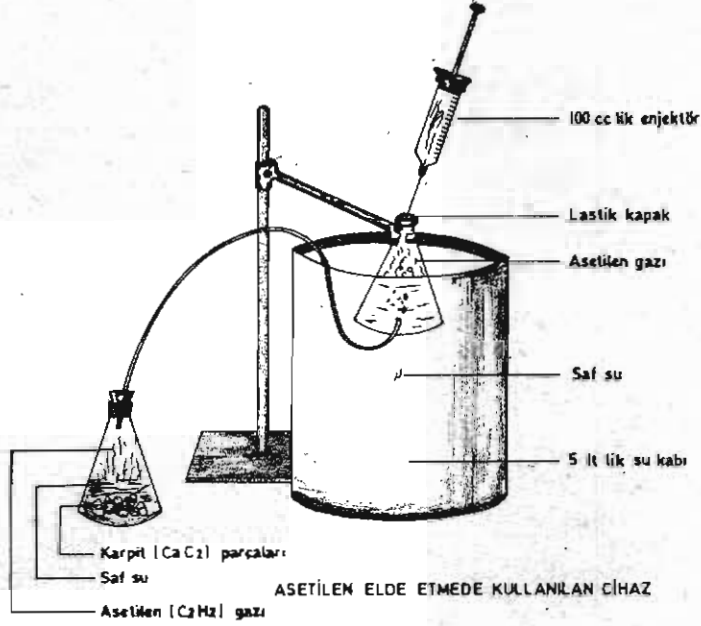
- b. 970 cc. lik 50 ila 100 adet kapaklı cam kavanoz (Şekil: 1).
- c. 5 Lt. hacminde silindir şeklinde su kabı(Şekil: 1).
- d. 500 cc. lik erlanmeyer (Şekil: 1).
- e. 500 cc. lik cam huni (Şekil: 1).
- f. 5 ila 10 adet lastik kütük ve lastik huni kapağı (Şekil: 1).
- g. 100 ila 300 adet 1 cc. lik steril plastik enjektör (Şekil: 1).
- h. 100 cc. lik 1 adet enjektör (Şekil: 1).
- k. Şekil: 1'de gösterilen aygıt yardımıyla asetilen gazı üretebilecek 1 kg. karpit ( $CaC_2$ ).
- l. Tüpte ticarî etilen gazı.
- m. Gaz kromatografisi ve kaydedicisi.

## 2.2. Metod:

Baklagil bitkilerinin azot fiksasyonunu ölçmek için, araştırmanın amacına uygun bir şekilde deneme deseni seçilir. Azot fiksasyonunu ölçmek istediğimiz baklagil türü ve azot fiksasyonuna etkisini bilmek istediğimiz bazı faktörler (*Rhizobium* sp. bakterileri ile aşılama, münavebe, gübre, sentetik hormonlar, ozon ve karbondioksit gazı uygulamaları v.s.) sera veya tarla koşullarında deneme parsellerine dağıtılır. Baklagil bitkilerinin tomurcuklanma döneminde, bitkiler çiçek açmadan hemen önce, her alt deneme parselinden bir kürek veya bel yardımıyla, bitki efektif kök derinliğine bağlı olmak üzere tahminen 30 cm. derinliğinde ve 20 cm. çapında bir toprak kütlesi çıkarılır. Bitkilere, söküldükleri parselin etiketi bağlanır. Üzerinde bir kaç bitkinin bulunduğu bu toprak kütlesi yıkama tanklarına taşınır. İçerisinde su bulunan bu tanklarda bitkiler zedelenmeden topraklarından temizlenir. İyiye temizlenen bitkiler, bir makas yardımıyla kök ile gövdenin birleştiği kısımdan kesilir. Bitkinin toprak üstü kısmı etiketli naylon torbalara, nodül içeren kök kısmı ise 970 cc. lik steril cam kavanoza bırakılır ve kavanozun kapağı sıkıca kapatılır. Her alt deneme parselinin ortasından sökülen bitkilere sırasıyla yukarıdaki işlemler uygulanır.

Nodül içeren kökler kök, kısımlarından temizlenen nodüllere göre daha yüksek bir asetilen indirgeme değeri gösterirler (Criswell, Hardy ve Havelka, 1976).

Nodüllü kök örneklerini içeren her kavanoza, kapaklarının ortasında bulunan lastik tıpadan, 100 cc. lik steril bir enjektör yardımıyla, Şekil: 1'de gösterilen aygıtın üretilen asetilen gazı enjekte edilir ve o andaki saat kavanozun etiketine yazılır. Kavanozlara enjekte edilen 100 cc. lik asetilen gazı 0.1 atmosferlik bir basıncı meydana getirir ki, bu miktar asetilen gazı 0.8 atmosferlik azot ( $N_2$ ) gazının, nitrojenase enzimini doyurduğu seviyeye eşittir (Hardy ve Holsten, 1975).



Şekil :1. ASETİLEN-ETİLEN METODUNUN UYGULANMASINDA KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER

Bilindiği gibi, baklagil bitkilerinin köklerinde bulunan nodüller nitrogenase enzimi ihtiva ederler. Nitrogenase enzimleri demir, demir-molibden proteinlerinden meydana gelmiş olup, fiksasyon olayını üstlenirler (Burns ve Hardy, 1972; 1975; Dilworth, 1974).

Nitrogenase enzimi, üç bağlı karbon veya azot atomlarını içeren asetilenin ( $C_2H_2$ ), etilene ( $C_2H_4$ ) indirgenmesini kataliz etmektedir. Asetilenden dönüşen etilen miktarı, nitrogenase enziminin aktivitesini göstermektedir (Burris, 1975).

Kavanoza 100 cc. lik asetilen gazı enjekte edilir ve nodüller bir saat süreyle inkübasyona terk edilir (Criswell, Hardy ve Havelka, 1976). Bu miktar asetilen gazı, ortamda mevcut olan nitrogenase enzimini tamamen doyurur. İnkübasyon esnasında nitrogenase enzimi asetilene ( $C_2H_2$ ) elektron verir ve etilen ( $C_2H_4$ ) meydana getirmek üzere indirgenir. Ortamdaki asetilenin yokluğunda ise enzim, kavanoz içerisindeki atmosferik azota ( $N_2$ ) elektron ilave ederek amonyak ( $NH_3$ ) hasil eder.

Ayrıca, nodüllü kök örneklerini içeren her 20 kavanozda bir kavanoz, asetilen enjekte edilmeden yalnız kapağı açılıp kapatılmak suretiyle normal hava kontrolü için ayrılır. Yine başka bir boş kavanoza da sadece asetilen gazı enjekte edilir ve nodüllü kökleri içermeyen bu kavanoz ise asetilen kontrolü için ayrılır. Bu boş kavanoza enjekte edilen ve % 1'lik standart örnek olan asetilen gazı, etilenin orijinini belirtmeye hizmet edecektir (Hardy ve Burns, 1973).

Her kavanozun üzerine, tekerrür sayısına göre 1 cc. lik 2 ila 3 adet steril plastik enjektör bırakılır. Bir saatlik inkübasyon süresinin sonunda, bu enjektörler yardımıyla kavanozun içerisindeki gaz karışımından 1 cc. lik miktarlar çekilir ve enjektörler, gazın kaçmaması için hemen lastik bir kütüğe batırılarak o andaki hava sıcaklığı kaydedilir.

Daha sonra kavanozlar laboratuvara taşınır ve bitkinin toprak üstü kısımlarını içeren naylon torbalar soğuk hava deposuna yerleştirilir. Bu arada boş bir kavanoza 100 cc. ticarî etilen ( $C_2H_4$ ) gazı enjekte edilerek, % 1'lik standart etilen örneği elde edilir.

Asetilen ve etilenin analizleri, gaz kromatografisi alev iyonizasyonu dedektörü ile yapılır (Criswell, Hardy ve Havelka, 1976). Plastik enjektörlere çekilmiş bulunan örnek gaz karışımları, sıcaklık ve basınç ayarları yapılan, hidrojen, azot ve hava basınç tüplerini ihtiva eden gaz kromatografisinin lastik tıpasına batırılarak enjekte edilir. İlk önce, standart etilen ve asetilen gazlarının ayrı ayrı kolon pikleri, gaz kromatografisinin kaydedicisi vasıtasıyla elde edilir. Bu pikler, aletin kalibre edilmesine hizmet edecektir (Hardy, Burns, ve Holsten, 1973). Daha sonra, deneme örneklerinin ayrı ayrı kolon pikleri aynı metotla bulunur. Örneklerin pik yükseklikleri veya alanlarının, standart etilen ve asetilen gazlarından elde edilen pik yükseklikleri veya alanları ile mukayese edilmelerinden, baklagil bitkilerinin nodozite bakterileri vasıtasıyla fikse etmiş oldukları azot ( $N_2$ ) miktarı, aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır (Hardy ve Holsten, 1975).

$$A = \frac{e - b - i}{s} \times c \times r \times v \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{f} \times 28$$

A= Bir saatte örnek tarafından fikse edilen azotun gram olarak miktarı (gr.  $N_2$  ( $C_2H_2$ )).

e= Örneğin (asetilen + nodüllü kök) pik yüksekliği (mm.).

b= Asetilen enjekte edilmeyen ve yalnız nodüllü kök içeren kavanozdaki havanın pik yükseliği (mm.).

i= Etilen gazının safiyetini ölçmek için boş kavanoza enjekte edilen standart asetilen gazının pik yüksekliği (mm.).

s= Ticari etilen gazının pik yüksekliği (mm.).

c= Ticari etilen tüpünün üzerindeki etikette yazılı olan fabrika konsantrasyon değeri (mol./Lt.).

r= Yalnız nodüllü kök içeren örneğin pik yüksekliğinin, nodüllü kökle birlikte asetilen gazı içeren örneğin pik yüksekliği oranı (b/e).

v= İnkübasyona maruz kalan kavanozun hacmi (kavanozun hacmi-nodüllü kök hacmi) (Lt.).

t= İnkübasyon süresi (saat).

f= Dönüşüm faktörü (3).

28= Azot gazının ( $N_2$ ) molekül ağırlığı.

Uygun bir dönüşüm faktörünün saptanması, fikse edilen azotun hesaplanmasına yardım eder. Teorik olarak, asetilenin azota dönüşüm faktörü ( $C_2H_2/N_2$ ), indirgenen asetilen moleküllerinin azot fiksasyonundaki kullanıma esasına dayanır. Bu oran da, elektron gereksiniminin 3 olması ile ifade edilir. Yani, indirgenen her 3 molekül asetilen ( $C_2H_2$ ) fikse edilen 1 molekül azot gazının ( $N_2$ ) karşılığı olmaktadır (Criswell, Hardy ve Havelka, 1976).

Öte yandan, soğuk hava deposuna yerleştirilmiş bulunan kavanozlardaki bitki kökleri çıkarılır, nodüller teker teker sayılır, tartılır ve bitki başına düşen nodül miktarı ve ağırlığı hesap edilir. Ayrıca, nodüllerinden ayrılan kök kısımları da tartılarak, kurutulmak üzere kurutma fırınına bırakılır.

Yine, soğuk hava deposuna yerleştirilmiş bulunan naylon torbalar içeresindeki bitkinin toprak üstü kısımları da çıkarılarak tartılır, yapraklar sayılır, alanları ölçülerek, bitki başına düşen toplam asimilasyon alanı hesap edilir.

## KAYNAKLAR

AKÇİN, A., 1976. Erzurum ekolojik şartlarında yetiştirilen tarla fasulyelerinde sulama ve azotla gübrelemenin tane verimine, tanenin protein miktarına ve köklerdeki nodül sayısına etkisi üzerinde bir araştırma. Atatürk Üniv. Zir. Fak. (Basılmamış doçentlik tezi).



- AKÇİN, A., 1979. Yemelik baklagiller ders notları. Atatürk Üniv. Zir. Fak. Tarla Bitkileri Bölümü.
- ALLOS, H. F., ve Bartholomew, W. V. 1955. Effect of available nitrogen on symbiotic fixation. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. Vol. 19, S. 182-184.
- ANDERSEN, A. L., 1965. Dry bean production in the lake and Northeastern States. Agr. Res. Ser. U.S.D.A. Handbook No: 285, S: 31.
- BEEVERS, L., 1976. Nitrogen metabolism in plants. Amer. Elsevier Publ. Comp., Inc. 52, New York, 10017, S: 4.
- BURNS, R. C., ve Hardy, R. W. F., 1972. Purification of nitrogenase and crystallization of its Mo-Fe protein, IN San Pietro, A., ed. Methods in Enzymology, Vol. 24 B, 480-492. New York: Academic Press.
- , 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants, Heidelberg: Springen-Verlag. New York.
- BURRIS, R. H., 1975. The acetylene-reduction technique. IN Stewart, W.D.P., ed Nitrogen Fixation by Freelifing Microorganisms, 249-257. London: Cambridge University Press.
- CRISWELL, J. G., Hardy, R.W.F., ve Havelka, U.D., 1976. Nitrogen fixation in soybeans: Measurement Techniques and Examples of Applications, Central Res. and Development Depart. E. I. du Pont de Nemours and Company, Inc. Wilmington, Delaware, U.S.A., S: 1-26.
- DİLWORTH, M. J., 1974. Dinitrogen fixation. Annu. Rev. Plant Physiol. 25: 81-114.
- GEORLETTE, R., 1953. Aperçu de travaux récents consacrés a la fixation symbiotique d'azote chez les légumineuses, Annales Gembloux Vol. 59, S: 215-236.
- HARDY, R.W.F., ve arkadaşları., 1968. The acetylene-etylene assay for N<sub>2</sub> fixation: Laboratory and Field Evaluation. Plant. Physiol. 43: 1185-1207.
- , 1971. Determination of nitrogen-fixing activity based of conversion of acetylene to etylene. U.S. Patent No: 3, 591, 458.
- , Burns, R. C., ve Holsten, R. D., 1973. Applications of the acetylene-etylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem, 5: 47-81.
- , ve Holsten, R. D., 1975. Methods for measurement of N<sub>2</sub> fixation. E.I. du Pont de Nemours and Company, Inc. Wilmington, Delaware. U.S.A. S: 452-486.

- HAVELKA, U. D., ve Hardy, R.W.F., 1977. Research on nitrogen and carbon input to increase domestic crop protein production, Washington State University. S: 16-18.
- ISHIZAWA, S., 1953. Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants, Japon Sci. Soil. Tokyo, Vol. 23, S: 125-244.
- NORRIS, D. O., 1956. Legumes and the rhizobium symbiosis. Empire Jour. of Exp. Agr. Vol. 24, no: 96, S: 247-270.
- SLOGER, C., 1973. Assimilation of ammonia by glutamine synthetase and glutamate synthetase in  $N_2$ -fixing bacteroids from soybean nodules. Plant Physiol. U.S.A. 51: 34.
- SMALL, J. G. C., ve arkadaşları, 1968. The effect of temperature on nodulation of Whole Plants and Isolated roots of (*Phaseolus vulgaris* L.). Sout African Jour. of Sci., Vol. 64, S: 218-224.
- PHILLIPS, D. A., 1974. Promotion of acetylene reduction by *Rhizobium* soybean cell associations in vitro. U.S.A. Plant Physiol. 54: 654-655.
- TOSUN, F., 1974. Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri kültürü. Atatürk Üniv. Yay. Erzurum No: 242. S: 54-60.