٥

طرق قياس التنفس

نظرا لأن دراسة التنفس تعد أساسا لدراسة أيض النسيج وعلاقاته الكيميائية، فقد درس التنفس بعدة طرق، منها ما هو سهل وسريع ومنها المعقد أو يحتاج إلى تقنية ومران كبيرين من ناحية ومن ناحية أخرى منها ما هو حساس وفعال ومنها ما هو دون ذلك. وليس من السهل رصد التجارب والطرق المختلفة التي أدت إلى إثبات الكثير من الحقائق عن التنفس الخلوي أو حتى إعطاء نبذة مختصرة عنها ولكن قد يكون من الأفضل إعطاء لمحة عن بعض أنواع الطرق المهمة في دراسة التنفس والشائع منها. عموما يتطلب قياس التنفس كمّاً معرفة إما مقدار الأكسجين الداخل إلي النسيج (الممتص) وإما مقدار ثاني أكسيد الكربون الخارج من النسيج "المتصاعد" (أي المبادلات الغازية) ويمكن استخدام بعض الطرق الأخرى للدلالة على سير عملية التنفس.

(١، ٥) الطرق الكيميائية

من الممكن قياس الأكسجين الموجود في عينة من الماء أو المحلول بطريقة ونكلر Winkler Method، والتي تتلخص في إضافة كمية من محلول كلوريد المنجنوز مع مزيج من يوديد البوتاسيوم وهيدروكسيد البوتاسيوم، ثم رج العينة بلطف حيث الأكسجين الموجود يؤكسد المنجنوز إلى منجنيز ومن ثم يحوَّل السائل إلى وسط حمضي بإضافة حمض الهيدروكلوريك أو الكبريتيك بعد ترسيب المنجنيز- لأكسدة اليوديد إلى يود. إن كمية اليود المنطلقة تتناسب مع كمية المنجنيز وبالتالي مع كمية الأكسجين الموجودة

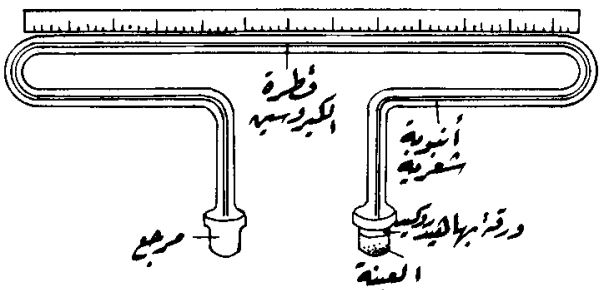
في العينة. ويمكن معرفة كمية اليود بمعايرتها بالثيوكبريتات باستعمال النشا كمؤشر. وبهذه الطريقة يمكن معرفة كمية الأكسجين المستهلكة أو المتحررة من الخلايا.

أما بالنسبة لكمية ثاني أكسيد الكربون المتحررة من الخلايا فيمكن امتزازها على هيدروكسيد الباريوم أو الكالسيوم ومن ثم المعايرة بحمض الأكساليك ولكن في هذه الطريقة يجب التأكد من أن كمية ثاني أكسيد الكربون قد امتزت بكاملها وإلا نتج خطأ كبير في تقدير الكمية.

(٢ ، ٥) الطريقة الحجمية

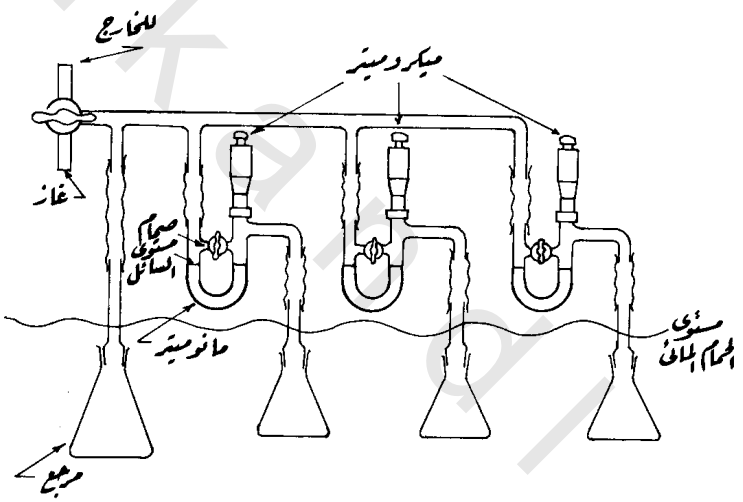
وتعتمد هذه الطريقة على تغير حجم الغاز المحيط بالعينة المراد قياس تنفسها، ومن الطرق العملية لقياس ذلك جهاز فن- وينترستين Fenn-Winterstein Apparatus (الشكل رقم ٥,١) حيث يتكون الجهاز من دورقين متصلين بوساطة أنبوبة شعرية مدرجة وبها قطرة من سائل الكيروسين وتوضع العينة في دورق والدورق الأخر يستعمل كمرجع. ويوضع مع العينة جفنة بها هيدروكسيد الصوديوم لامتصاص ثاني أكسيد الكربون المتصاعد من التنفس. ينتشر الأكسجين من ذلك المحيط إلى العينة مما يتسبب في انخفاض الضغط وبالتالي تتحرك نقطة الكيروسين في اتجاه الدورق الذي به العينة بعد فترة من الزمن. وبمعرفة حجم الأنبوبة الشعرية يمكن تقدير كمية الأكسجين المستهلكة. وهذه الطريقة لا تتأثر بتغير درجة الحرارة أو الضغط الجوي لأن النظام مغلق والحرارة تؤثر على الدورقين سويا.

من الطريقة السابقة طوِّر جهاز للتنفس Respirometer بواسطة العالمين شولاندر و وينيسلاند Scholander and Wennesland ذو وحدات متعددة ومرجع واحد حيث يمكن استعمال أكثر من عينة أو أكثر من معاملة واحدة وقد صنع بواسطة جيلسون لذا فيعرف باسم جهاز جلسون للتنفس Gilson Multiple Respirometer وفي الشكل رقم (٥,٢) بعض الأجزاء المهمة لهذا الجهاز.



الشكل رقم (٥.١). جهاز فن– وينترستين لقياس التنفس في الكائنات وحيدة الخلية أو مجموعة من الخلايا الصغيرة.

المصدر: جيس ١٩٦٨م



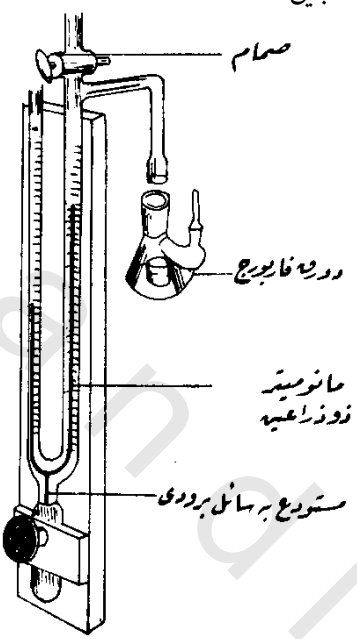
الشكل رقم (٥.٢). بعض أجزاء جهاز جلسون المتعدد للتنفس لقياس كمية الأكسجين المستهلكة مباشرة.

المصدر: أ. جيس، ١٩٦٨م

(٥، ٣) الطريقة المانوميترية

من أسهل وأنجح الطرق في قياس المبادلات الغازية وأكثرها شيوعا الطريقة التي طورها العالم فاربورج باستعمال مانوميتر حساس أو أكثر وقد عرف هذا التركيب

بجهاز فاربورج Warburg Apparatus والمانوميتر (أو جهاز قياس الضغط) يعمل على القاعدة السابقة نفسها في الطريقة الحجمية ويستعمل سائل معين هو سائل برودي مع صبغة معينة والأجزاء الرئيسية في هذا الجهاز عبارة عن مانوميتر ودورق صغير لوضع النسيج أو الخلايا (الشكل رقم ٥,٣) وحيث أن النظام غير مغلق (أي متصل بالهواء الجوي عن طريق الصمام وطرف المانوميتر) فهذه الطريقة تتأثر بالتغير في الضغط الجوي لذا لا بد من استعمال مرجع قياسي. تصل حساسية مثل هذه الأجهزة إلى قياس واحد ميكرولتر من الأكسجين.

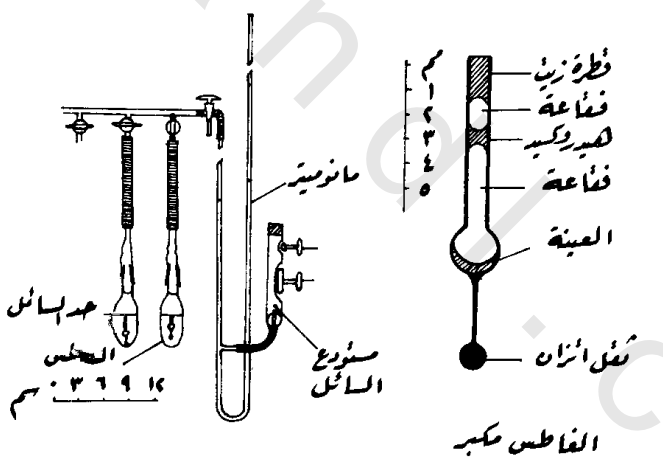


الشكل رقم (٥.٣). المانوميتر والدورق في جهاز فاربورج، ويلاحظ أن الجهاز الأصلي يحوى عددا من هذه المانوميترات والدوارق التي توضع في حمام مائي للتحكم في درجة الحرارة. يمكن استعمال الجهاز المذكور في قياس البناء الضوئي بعد تزويده بمصابيح خاصة.

(٤، ٥) طريقة الغاطس الكارتيزي

وهذه الطريقة خاصة بقياس معدل التنفس لعدد قليل من الخلايا أو البويضة أو بعض الكائنات وحيدة الخلية أو الأولية.

والغاطس الكارتيزي عبارة عن أنبوبة صغيرة كما في الشكل رقم (٥,٤) ذات ثقل مناسب في أسفلها، وتوضع العينة في قاع تلك الأنبوبة المنتفخ نسبيا ثم توضع قطرة من هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم في جزء الأنبوبة الشعري تاركة بينها وبين العينة فقاعة هوائية ومن ثم يسد الطرف بقطرة من الزيت تاركة فقاعة هوائية أيضا بينها وبين الهيدروكسيد بحيث يكون النظام مغلقا. وتعتمد هذه الطريقة على قانون الطفو حيث توضع هذه الأنبوبة في حمام مائي داخل نظام آخر متصل بمانوميتر فتطفو، وعند استهلاك الأكسجين الموجود في الفقاعة الهوائية وتحرر ثاني أكسيد الكربون الذي يمتص بواسطة الهيدروكسيد فإن الغاطس ينزل في اتجاه القاع نتيجة لانخفاض مقدرته على الطفو. ويمكن جعل الأنبوبة تطفو مرة أخرى بتغير الضغط حوله ومن ثم تسجل الفروق في الضغط ويحسب معدل التنفس النسبي. كما قد يتضح مما سبق أن هذه الطريقة من الصعوبة بمكان نظرا لدقة الأجهزة والمران الطويل المطلوب لإنجاحها إلا أن بعضها حساس جدا وقد يقيس إلى ١٠ $^{-5}$ ميكرولتر من استهلاك الأكسجين.



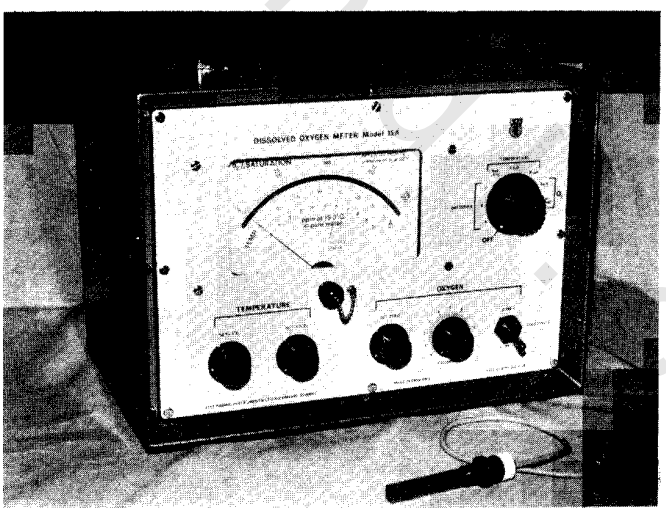
الشكل رقم (٥.٤). الغاطس الكارتيزي وتوصيله إلى اليسار، وفي الناحية اليمنى يبدو الغاطس مكبرا.

المصدر: جنسن، ١٩٦٢م، بتصرف

(٥,٥) طريقة إلكترود الأكسجين

يستعمل إلكترود البلاتين لقياس كمية الأكسجين الموجودة في سائل ما مثله في ذلك كمثل قياس البروتونات عند تقدير الرقم الهيدروجيني، ولذا فيمكن استخدامه في مجالات كثيرة منها التنفس والبناء الضوئي حيث أن هذا الإلكترود يقيس ما يعرف بشد الأكسجين Oxygen tension، وهو عبارة عن ضغط غاز الأكسجين الجزئي الذي يكون في حالة اتزان مع سائل ما. والقياس يتم بصورة مستمرة لذا فإنه من أنسب الطرق في الدراسة المتواصلة والعاجلة لتقدير مقدار التغير في التنفس. والشكل رقم (٥,٥) صورة لأحد الأنواع التجارية.

هناك طرق أخرى لقياس معدل التنفس ولكن من أهمها طريقة تحليل الطيف لغاز ثاني أكسيد الكربون الحديثة. والتي تعد من أكثر الطرق دقة مع أن الشائع في قياس معدل التنفس والأكثر استخداما هو استعمال جهاز فاربورج السابق الذكر أو جهاز التنفس المطور حديثا والذي يعمل على القاعدة نفسها غير أن الضغط به ثابت حيث يستعمل به جهاز صغير لتغيير الحجم.



الشكل رقم (٥.٥). صورة فوتوغرافية لأحد الأنواع التجارية لإلكترود الأكسجين وجهاز القراءة (شركة ايل).

(٦ ،٥) معدل التنفس

مهما كانت الطريقة في القياس إلا أنه يجب دائما الحذر عند مقارنة النتائج التي أجريت بطرق مختلفة إلا إذا أخذ في الحسبان اختلاف الظروف المحيطة بالتجربة وتساوي الوحدات. لذا فعند قياس التنفس عن طريق قياس المبادلات الغازية (الداخلة في التنفس أو الناتجة عنه) فإن حجم الغاز المقاس يعدل إلى الظروف القياسية (درجة الحرارة الصفر المئوي والضغط العادي ضغط جوي واحد أي ٧٦٠ مم زئبق) وذلك لأن وزنا جزيئيا جراميا لأي غاز يحتل ٢٢,٤ لتر أو ٢٢,٤ ×١٠^{٦} ميكرولتر، لذا يمكن تحويل حجم الغاز إلى وزن جزيئي جرامي بالقسمة على ٢٢,٤ والعكس صحيح، ومن ثم القسمة على الوزن الجزيئي للغاز المقاس (٣٢ للأكسجين، ٤٤ لثاني أكسيد الكربون) للحصول على أوزان بالجرامات.

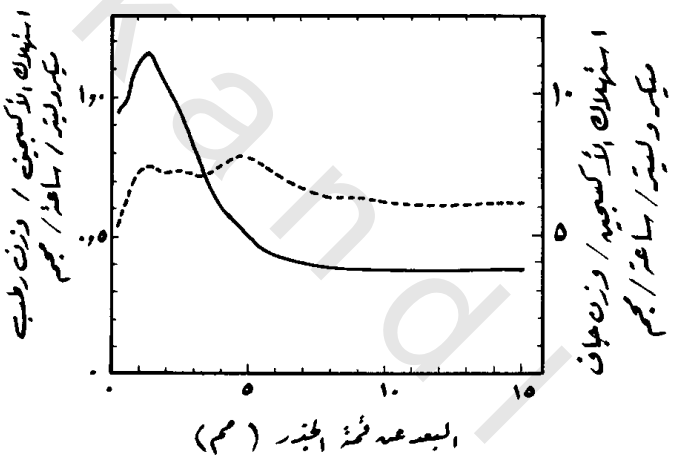
لقد جرت العادة على حساب معدل التنفس وهذا يعرَّف بأنه معدل تفكك مادة التفاعل في وحدة الزمن من وحدة كمية النسيج أو للخلية أو حتى لوحدة من البروتين الخلوي. يمكن حساب معدل التنفس بناء على الوزن الرطب أو الجاف كوحدة لكمية النسيج والفرق في التعبيرين واضح من الشكل رقم (٥,٦) لنبات الذرة حيث المقارنة قد تكون مضللة وبعيدة عن الحقيقة إذا لم يؤخذ في الحسبان وحدة كمية النسيج. قد يكون أحيانا من المناسب استبدال وحدة الوزن بوحدة العضو كالورقة أو البادرة أو الخلية أو حتى كمية البروتين الموجودة في النسيج وهذا عائد إلى نوع المسألة الفسيولوجية المدروسة.

دأب بعض العلماء منذ السبعينيات من القرن العشرين الميلادي (والتأييد لهذا الاتجاه في ازدياد) على تقسيم التنفس طوال حياة النبات أو أحد أعضائه عموما إلى نمطين:

١- نمط يكون معدل التنفس في النبات أو أحد أعضائه طرديا مع معدل النمو وقد يسمى تنفس النمو growth respiration حيث الحاجة ماسة إلى الهيكل الكربوني (المركبات الوسطية) وما يحتاجه النبات من مركبات حاملة للطاقة (مركبات ATP وNADH وNADPH، على سبيل المثال) لمسارات البناء في جسم النبات.

٢- نمط يكون فيه معدل التنفس كافيا للمحافظة على تركيب النبات أو العضو وإصلاحه(أي الاستمرار في عملية الهدم والبناء) وقد يسمى تنفس البقاء أو الصيانة maintenance respiration.

وهذا التقسيم فيه محاولة لربط العوامل البيئية بمعدلات التنفس وقد وضعت عدة نماذج لذلك (Johnson, 1990).



الشكل رقم (٥.٦). تنفس بادرات الذرة *Zea mays* مبينا على أساس الوزن الرطب (الخط المتصل) أو الوزن الجاف (الخط المتقطع). لاحظ، أيضا، الاختلاف في التنفس باختلاف النسيج (البعد عن قمة الجذر).

المصدر: جودوارد وبونر، ١٩٦٠م