ISSN: 1991-8941

# دراسة دور البلازميدات في تثبيت النتروجين في بكتيريا *Kl. pneumoniae* وتحديد كفاءتها في التثبيت بايولوجيا.

احمد محمد تركي العيثاوي
قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الانبار.

تاريخ الاستلام:٢٠٠٦/١١/١٠ | تاريخ القبول:٢٠٠٧/١/١٥

**الخلاصة:**

استهدفت الدراسة الحالية عزل وتشخيص بكتيريا *Kl. pneumoniae* من ترب مختلفة لمحافظة الانبار اذ تم الحصول على ٦٧ عزلة بكتيرية من بكتيريا *Kl. pneumoniae* ، شملت الدراسة ايضا تقييم كفاءة عزلات *Kl. pneumoniae* في تثبيت النتروجين . اظهرت النتائج تباينا لهذا العزلات في كفاءتها في تثبيت النتروجين اذ بلغت اعلى كمية نتروجين مثبتة (١.٨ ملغم/مل) العائد للعزلة رقم ٢٦ بينما بلغت اقل كمية من النتروجين المثبت من قبل العزلة رقم ٧ وبلغت ٠.١٢ ملغم/مل ، وتم اختيار العزلة *Kl. pneumoniae* رقم ٢٦ كاكفأ عزلة في تثبيت النتروجين .

اظهرت النتائج احتواء العزلة المذكورة على حزمة بلازميدية واحدة كبيرة الحجم (Mega plasmid) وعلى بلازميدين صغيرين متماثلين . اظهرت نتائج تحييد العزلة ٢٦ فقدان صفة تثبيت النتروجين بشكل كامل على الوسط السائل لمستعمرات *Kl. pneumoniae* وهذا يشير الى ان الزرع المتكرر ساعد على تحييد البلازميدات بوجود حامض السالسليك . اظهرت نتائج التجربة البايولوجية ان اعلى كمية نتروجين كانت في نبات الذرة الصفراء بالنسبة الى المعاملة المضاف لها التوصية السمادية الكاملة في حين كانت المعاملة الملقحة بالعزلة *Kl. pneumoniae* اعلى في محتواها من النتروجين من المعاملة المضاف لها ربع التوصية السمادية

كلمات مفتاحية: بلازميدات ، تثبيت النتروجين ، *Kl. pneumoniae* ، التثبيت بايولوجيا.

**المقدمة:**

تعد الكلبسيلا من اهم الاجناس التابعة لعائلة البكتيريا المعوية وتنتشر في البيئة بصورة واسعة اذ توجد في التربة والمياه وفي القنوات الهضمية للانسان والحيوان [١] ، والكلبسيلا بكتيريا عصوية سالبة لصبغة كرام غير متحركة مع امتلاك بعضها للاهلاب ، غير مكونة للابواغ تمتلك المحفظة مما يؤدي الى تكوين مواد مخاطية عند نموها على الوسط الزرعي [٢] ان اول اشارة الى هذه البكتيريا كانت من قبل العالم الالماني Edwen Klebs في عام ١٨٨٥ وسميت باسمه فيما بعد [٣] . تستطيع هذه البكتيريا النمو بشكل جيد في الأوساط المغذية الاعتيادية غير المدعمة بعوامل النمو ، وتتميز المستعمرات النامية بكبر

حجمها وارتفاعها عن الوسط وذات رطوبة ومخاطية وتعتمد على كمية اللزوجة المفرزة من قبل البكتيريا وهذه تعتمد على كمية الكاربوهيدرات الموجودة في الوسط [٤].

البلازميدات عبارة عن جزيئات DNA تقع في السايتوبلازم خارج الكروموسوم ويتم توارثها بثبات من جيل لاخر وتختلف البلازميدات في اوزانها الجزيئية من اقل من كيلو دالتون الى اكثر من ٢٠٠ كيلو دالتون وتوجد بأشكال مختلفة حلقية مغلقة او مفتوحة او خيطية وتنتشر البلازميدات بشكل واسع في الخلايا بدائية النواة (Prokaryotes) وتحمل البلازميدات جينات مماثلة في تركيبها الاساس الى جينات الكروموسوم ويمكن ان تشفر الى فعاليات خلوية مختلفة عادة ما تكون غير ضرورية لحياة البكتيريا الا انها توفر لها فائدة انتخابية في الوسط الذي تعيش فيه حيث يمكن ان تحمل جينات ضراوة البكتيريا مثل انتاج السموم ومقاومة مضادات حيوية متنوعة وكذلك انتاج المضادات نفسها واستهلاك بعض السكريات وكذلك انتاج الهيمولايسين والسايدروفورات وغيرها من المواد التي تسهل حياة البكتيريا في وسطها الحيواني او النباتي او البيئي.[٥]

للكلبسيلا دورا مهما في تثبيت النتروجين بصورة حرة في التربة وخصوصا في المنطقة المحيطة بالجذور والتي تدعى بـ rhizosphere وتسمى الاحياء المجهرية المثبتة للنتروجين بـ( diazotrophs) . ان تثبيت النتروجين هو عملية اختزال النتروجين الحيوي الى امونيا بمساعدة انزيم Nitroginase وتوفر مصدر الطاقة ATP وايون موجب ثنائي التكافؤ مثل المغنيسيوم والمنغنيز ، وقد ذكرت العديد من الدراسات اهمية تثبيت النتروجين بواسطة الكلبسيلا اذ ان الكلبسيلا التي تنمو على جذور النباتات تقوم بتثبيت النتروجين بصورة حيوية [٥].

ان لفاعلية انزيم النايتروجينيز في النوع *Kl. oxytoca* دور مهم في تثبيت النتروجين [٦] كما ان لسلالات الكلبسيلا القدرة على تثبيت النتروجين الحيوي لاتكافليا وخاصة النوع *Kl. pneumoniae* اذ ان له القدرة على تثبيت ٦٠ ملغم/مل من النتروجين عند حضنه مدة يومين في الاوساط الزرعية.

استهدفت هذه الدراسة تحديد دور البلازميدات المتواجدة في البكتيريا *Kl.pneumoniae* في تثبيت النتروجين واختبار فعاليتها في تجربة بايولوجية .

## طرائق العمل:.

١.جمع النماذج:

جمعت ٨٠ عينة تربة خلال المدة ما بين كانون الثاني و اذار ٢٠٠٥ شملت مواقع مختلفة من ترب مدينة الرمادي ، هيت ، الجزيرة ، الخالدية ، مجمع العامرية ، والفلوجة(جدول ١). اخذت عينة من التربة بمعدل ١ غم بعد قشط ١ سم من سطحها ووضعت في عبوة معقمة وسجلت عليه كافة المعلومات ونقلت الى المختبر مباشرة.

٢.عزل وتشخيص بكتيريا *Kl. pneumoniae*_ :

اعتمدت المشاهدات المزرعية على وسط ماكونكي الصلب والفحوصات المجهرية والكيموحيوية الواردة في المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتيريا [٧] [٨]

٣.قياس نشاط انزيم النتروجينيز:

استعملت طريقة كلدال لقياس فعالية انزيم النتروجينيز بصورة غير مباشرة من خلال تقدير كمية النتروجين الكلي اذ تعتمد هذه الطريقة على اكسدة المادة العضوية باستعمال حامض الكبريتيك وتحويل النتروجين الى امونيا. [٩]

٤.عـــزل DNA البلازميدي:اســـتخدمت طريقـــــــة الترســـــــيب بــــــــــالملح (Salting out) المحورة في التحري عن وجود البلازميــدات وذلــك بعــزل DNA البلازميــدي الكلي.[١٠]

٥. الترحيل الكهربائي للـ DNA البلازميدي على هلام الاكاروز:

اتبعــت طريقـــة [١١] [١٢] لاجــراء الترحيــل الكهربائي على هلام الاكاروز للـDNA البلازميدي.

٦.تحييد البلازميدات:

تـم تحييـد البلازميـدات فـي بكتيريـا *Kl. pneumoniae* باســـتعمال طريقـــة حـــامض السالسيليك [١٣]

٧.التجربة البايولوجية:

لغــــرض معرفـــة قــــدرة البكتيريـــا *Kl. pneumoniae* علــى تثبيــت النتــروجين بوجـود النبـات فـي التربـة وتحديـد مـدى استفادة النبات منه مقارنة مع نوعين من السماد المستخدم وهمــــا ســــماد NP و ســــماد اليوريـــا ٤٦%.

## النتائج:

١.العزل والتشخيص:

اظهـرت نتـائج العزل والتشـخيص انتشـار بكتيريـا *Kl. pneumoniae* فـي جميـع عينـات التربـة المدروسـة والبـالغ عـددها ثمـانون نموذجـا والمأخوذة من مناطق هيت ، الفلوجة ، الرمادي ، الجزيرة ، مجمع العامرية والخالدية. وبنسب متباينة موضحة في الشكل رقم ١ .ويتضح من الشكل انـه قد تم الحصول علـى ٦٧ عزلـة من بكتيريـا *Kl. pneumoniae* من مجموع العينات قيد الدراسة.

اظهـرت نتـائج الفحص المجهري لبكتيريـا *Kl. pneumoniae* بانهـا بكتيريا عصوية سالبة لصبغة كرام غير متحركة تظهر بلون احمر وردي علـى وسط مـاكونكي ، واظهرت نتـائج الفحوصـات الكيموحيويــة بانهــا ســالبة للاوكســيديز ، موجبــة للكـاتليز ، سـالبة لليـوريز ، سـالبة لاحمـر المثيـل ، موجبـة للانـدول ، وفـوكس بروسـكاور والسـترات ، موجبة لاختزال النترات ، غير محللة للجيلاتين غير مكونة للسبورات.

تتفق نتـائج هذه الدراسـة مـع مـا وجده [١٤] مـــن احتـــواء التربـــة علـــى بكتيريـــا *Kl. pneumoniae* ، وان اسباب هذا الاختلاف فـي التـرب المدروسـة وتبـاين اعـداد البكتيريـا يعـود الـى تبـاين قـدرة البكتيريـا علـى مقاومـة الظـروف البيئية المختلفة من درجة حرارة و وفرة المغذيات اذ ان البكتيريا تتاثر بشكل كبير في بالظروف البيئيـة المحيطـة وهـذا يتفـق مـع مـا وجـده [١٥] مـن ان العوامـل الحياتيـة تـؤدي الـى تثبـيط نمـو البكتيريـا او تقليـل نشـاطها ، كمـا قـد يعـزى هـذا الاخـتلاف الـى تبـاين تلـك التـرب فـي محتواهـا مـن المـادة العضـوية وقيمة الرقم الهيدروجيني فضلا عن اختلاف طبيعة الاسـتغلال الزراعـي للتـرب المدروسـة اذ ان الغطـاء النباتي له اثره في تحفيز نمو البكتيريا[١٦]

٢.اختبار كفاءة عزلات *Kl.pneumoniae* في تثبيت النتروجين:

اظهـرت نتـائج الاختبـار التـي اجريـت علـى جميــع عــزلات *Kl.pneumoniae* تباينـــا لهـــذه العزلات في كفاءتها في تثبيت النتروجين اذ بلغت اعلى كمية نتروجين مثبت (١.٨ ملغم/مل) العائد الـى العزلـة رقـم ٢٦ بينمـا بلغـت اقـل كميـة مـن النتـروجين المثبـت مـن قبـل العزلـة رقـم ٧ وبلغـت ٠.١٢ ملغم/مل (جدول رقم ١) .

ان هـذا الاخـتلاف قـد يعـود الـى اخـتلاف مصادر الطاقة او الحالة الفسلجية للعزلة البكتيرية ، كما ان الاختلاف في تثبيت النتروجين في الوسط الغـذائي المسـتخدم يعـزى الـى اسـباب وراثيـة او فسـلجية [١٧] . ان عمليـة اختـزال النتـروجين هـي عمليـــة فســـلجية معقـــدة ويكـــون فيهـــا لانـــزيم

النتروجينيز دورا كبيرا ويتطلب عمل الانزيم مصدرا للطاقة (ATP) اذ وجد انه يحتاج الى تحلل اربع جزيئات من (ATP) لنقل زوج من الالكترونات الى النتروجين لذلك فان حوالي ١٢ جزيئة من (ATP) تكون ضرورية لاختزال جزيئة واحدة من النتروجين الى جزيئتين من الامونيا [١٨] كما ان للمولبيدنيوم والمغنيسيوم والحديد دورا كبيرا في تثبيت النتروجين الجوي في التربة [١٩]

استنادا الى النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة فقد تم اختيار العزلة *Kl.pneumoniae* المرقمة ٢٦ كاكفأ عزلة في تثبيت النتروجين واستخدمت لإكمال التجارب اللاحقة.

٣. عزل DNA البلازميدي لبكتيريا *Kl.pneumoniae*.

اظهرت النتائج احتواء العزلة المحلية *Kl.pneumoniae* المرقمة ٢٦ على حزمة بلازميدية واحدة كبيرة الحجم (Mega plasmid) وعلى بلازميدين صغيرين متماثلين (صورة ١)

تمتاز الصفة المحمولة على البلازميد بانها ذات اهمية كبيرة اكثر من تلك المحمولة على الكروموسوم وذلك لقابليتها على الانتقال وسرعة الانتشار بين الانواع البكتيرية المختلفة وتزداد اهميتها عندما تشفر البلازميدات لصفة معينة مثل مقاومة المضادات الحيوية وانتقالها من البكتيريا المرضية الى البكتيريا غير المرضية مسببة مشاكل خطيرة [٢٠] ، كما ان المحتوى البلازميدي له اهمية كبيرة تظهر من خلال توصيف البلازميدات المستخلصة من العزلات البكتيرية العائد للنوع البكتيري نفسه او للانواع البكتيرية المختلفة وذلك عند وجود تماثل في عدد وحجم البلازميدات المستخلصة من النوع البكتيري الواحد او بين الانواع البكتيرية المختلفة [٢١] وقد وجد [٢٢] عند دراسة ١٦ عزلة بكتيرية من نوع *Kl.pneumoniae* ان المحتوى البلازميدي لهذه العزلات كان مشتركا في احتوائها على بلازميد واحد على الاقل ومن الممكن ان يحدث انتقال البلازميدات بين العزلات وذلك عن طريق الاقتران او التحول الوراثي.

٤. تحييد البلازميدات في البكتيريا *Kl.pneumoniae*.

اظهرت نتائج اضافة تراكيز مختلفة من حامض السالسليك هي (٥٠ ، ١٠٠ ، ١٥٠ ، ٢٠٠ ، ٢٥٠ ، ٣٠٠ ) مايكروغرام/مل في نمو العزلة المحلية ٢٦ *Kl.pneumoniae* في الوسط الزرعي السائل عدم تاثر نمو العزلة بالتركيزين ٥٠ و ١٠٠ مايكروغرام/مل (شكل ٢) ، وهذا يتفق مع ما وجده [٢٢] من انه ليس للحامض أي تاثير على نمو العزلات البكتيرية عند التراكيز المنخفضة للحامض.

تم دراسة الزرع المتكرر للعزلة ٢٦ *Kl.pneumoniae* عند وجود ١٥٠ مايكروغرام/مل من هذا الحامض اذ كرر الزرع كل ثلاث ساعات وحضن بدرجة حرارة ٢٨ درجة مئوية ثم حضرت تخافيف من المزروع البكتيري تصل الى $10^{-5}$ ونشر على الوسط الزرعي الصلب وحضن بنفس درجة الحرارة مدة ٢٤ ساعة وذلك للحصول على مستعمرات مفردة ، بعد ذلك تم التقاط ما يقارب ١٥٠ مستعمرة زرعت على الوسط الخالي من النتروجين ثم ثم حضنت في الحاضنة الهزازة مدة ثلاثة اسابيع عند نفس درجة الحرارة بعدها تم تقدير الامونيا المتكونة وذلك باخذ ٢ مل من الوسط السائل وتقديره بجهاز كلدال .

اظهرت النتائج فقدان صفة تثبيت النتروجين وبشكل كامل على الوسط السائل للمستعمرات وهذا يشير الى ان الزرع المتكرر ساعد على تحييد البلازميدات بوجود حامض السالسليك

وكذلك نستنتج ان صفة تثبيت النتروجين قد تكون محمولة على البلازميدات.

ومن اجل اثبات ان صفة تثبيت النتروجين محمولة على البلازميدات فقد تم استخلاص DNA من البكتيريا فوجد عدم احتوائها على أي حزمة بلازميدية (صورة ٢) مما يؤكد قابلية حامض السالسليك على تحييد البلازميدات اذ يعمل هذا الحامض على سحب الايونات الموجبة الثنائية التكافؤ والمهمة في ثباتية الغشاء الخارجي للبكتيريا وبالتالي حدوث تغير في نفاذية الغشاء مما يقود الى تسرب البلازميدات الى خارج الخلية البكتيرية ، كذلك يعتقد انه يؤثر في مناطق ارتباط البلازميدات بالغشاء السايتوبلازمي للخلية البكتيرية [٢٢]

ان اختفاء الحزم البلازميدية في العزلة المحيدة يشير وبشكل واضح الى ارتباط الصفات المفقودة بتلك البلازميدات والى ان الجينات المنفردة لهذه الصفات كانت محمولة على البلازميد الذي تم تحييده [٢٣] ومن هذا نستنتج بان البلازميد كان له دور في حمل صفة تثبيت النتروجين لبكتيريا ***Kl.pneumoniae*** وعند فقدان هذا البلازميد فقدت هذه البكتيريا قابليتها على تثبيت النتروجين الجوي.

٥.التجربة البايولوجية:

اظهرت نتائج هذه التجربة ان اعلى كمية نتروجين كانت في نبات الذرة الصفراء المزروعة في التوصية السمادية الكاملة اذ بلغت ١٠.١٢ ملغم نتروجين/نبات في حين كانت المعاملة الملقحة بالعزلة ***Kl.pneumoniae*** اعلى في محتواها من النتروجين من المعاملة المضاف لها ربع التوصية السمادية (جدول ٢) والتي بلغت كمية النتروجين المأخوذ فيها ٤.١٢٦ ملغم نتروجين/نبات في حين وجد ان اقل محتوى للنتروجين في النبات المزروع في التربة المستخدمة كمعاملة سيطرة بدون تلقيح بالعزلة البكتيرية وبدون اضافة اسمدة معدنية فبلغت كمية النتروجين الماخوذ في النبات ٠.٣٨٥ ملغم نتروجين/نبات ، وكذلك الحال بالنسبة للوزن الجاف ونسبة البروتين وطول النبات ومحتواه من الكلوروفيل اذ كانت اقل كمية سجلت خلال فترة الدراسة للمعاملة المستخدمة كسيطرة بدون اضافة اسمدة معدنية او عزلة بكتيرية اليها.

كذلك اظهرت النتائج اختلاف قيم الاوزان الجافة ونسبة البروتين وطول النبات ومحتواه من الكلوروفيل للاجزاء الخضرية لنبات الذرة الصفراء باختلاف المعاملات المستخدمة في هذه الدراسة فقد ادى استخدام لقاح العزلة البكتيرية الى حصول زيادة واضحة في معدل نمو النبات مقارنة مع المعاملة المضافة لها ربع التوصية السمادية ومعاملة السيطرة اذ ظهر ذلك واضحا من خلال محتواه من النتروجين والوزن الجاف ونسبة البروتين وطول النبات ومحتواه من الكلوروفيل (جدول ٢)

ومن خلال النتائج نلاحظ ان ذلك يعكس كفاءة العزلة البكتيرية المستعملة كلقاح لوحدها مقارنة مع الاسمدة المعدنية المستعملة وان ذلك قد ساهم في زيادة نمو النبات سواء للعزلة البكتيرية او الاسمدة بجميع المستويات قيد الدراسة.

ان البكتيريا المستعملة قديكون لها دور محفز من خلال افرازها لبعض المركبات التي لها دور في زيادة امتصاص النبات للنتروجين المثبت من قبل البكتيريا [٢٤] ، كما ان التلقيح البكتيري يزيد من النتروجين مما ينعكس ايجابيا على نمو النبات [٢٥]

المصادر

١- درويش ،محمد احمد (2000) عزل وتشخيص الكلبسيلا من التربة والحالات المرضية ودراسة حساسياتها للمضادات الحياتية وفعالية انزيم النايتروجينيز .اطروحة ماجستير .كلية العلوم –جامعة الانبار

٢- الظفيري، محمد ابراهيم (1999) .تاثير مستوى الكاربون في المواد العضوية المضافة والتلقيح ب *Azotobacter vinelandii* في تغير التربة .رسالة ماجستير –كلية الزراعة – جامعة بغداد

[3]. Greenwood ,D Slack,R. and Peutherer,J. (1997) . Medical microbiology Aguide to microbs infections :pathogenesis, immunity ,laboratory diagnosis, and control ;15ed mosby .landon .

[4]. Lennet, E.F.H. ; Balows,A.; Hausler,W.J;and Shadomy, H.J.(1995). Maniual of Clinical Microbiology ;4th ed.,American Society for Microbiology.,washington.

[5]. Krieg , N.R. and Holt ,.J.G (1984).Bergeys manual of systematic Bacteriology .Volume .1. Willmias and Wilkins.U.S.A

[6]. Cruickshank , R. and Duguid,J.M, and Swain, R. (1975) Medical Microbiology ; The practice of Medical Microbiology 12.ED.volum(2) Churchill living stone-London .

[7]. Liu , Y.; Mee, B. J; and Mulagrave , L. (1997) . Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella* spp., including *Kledsiella pneumoniae*, and agenetic and molecular analysis B.lactamases. J.clin. Microbiol., 35 :2365-2369.

[8]. Holt , T.G. Krieg , N R.Sneath ,PH . Staley,J. and Williams , ST.(1994). Bergey's Manual of determinative Bacteriology . 9th ed .U.S.A.

[9]. Baron,E.F; and Fingold, S . M.(1990). Baily and Scott diagnostic Microbiology . Mosby company, philadeiphia.

[10]. Maynes,R.A (1980).companism of two modifical kgeldale olcyestion techniqa for mutti-element gmmunceotion in soil science and plant Analysisll:459-467

[11] Prifer, U . (1984) . Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis in : Advanced molecular genetics. p.26-37.Berline.

[12]. Sambrook, J.; Fritgah, E . and maniatis T . (1989) . Molecular cloning , a laboratory manual , cold spring Harbour laboratory. New York.

[13]. Pospiech and Neuman (1995). Salting out procedure for isolation of genomic DNA. cited by kiesser, t.(1995). U.K.

[14]. Domenico , P., Schwartz, S. and Cunha, B. (1989).Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. Infect. Immun ,57:3778-3782.

[15]. Barcina,I. Lebaron,P.& Vives-Rogo,J.(1997). Survival of all Ochthonous bacteria in aquatic systems. Abiological approaches. Fems . Microbiology - Ecology (23):1-9.

[16]. Santck , B. & Maric,v .(1995). Temperature & dissolved oxygen concenteration as parameter of *Azotobacter chroococcum,* cultivation for use in biofertilizers. Biotechnol. Lett. London ,UK:Chopman& Hall V. 17(4):453-458.

[17]. Suneja,S.N. Narula,R.C. Anand & K. Lokshmin (1996). Relationship of *Azotobacter chroococcum* siderophores with nitrrogen fixation. Folia Microbiological 41(2) :154-158.

[18]. Yahya,A.I. & S.K.AL-Azawi (1989). Occurrence of phosphate solubilizing bacteria in some Iraq soils. Plant & soil 177:135-141.

[19]. Johnsen ,J.,R.L.Warren and A.A. Branstrom (1991) .Effects of Fp2 and a mercury Resistance plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* PA103on Exoenzymes production. Journal of clinical Microbiology 29(5): 940-944.

[20]. Threifall ,E .and Frost ,J. (1990). The identification typing and finger printing of *Sallmonella* laboratory aspects and epidemiological application .J.APPL. Bacteriol-68(1):5-16.

[21]. Watson, J.D.N.H Hopkins, J.W.Roberts, J.A.steitz and A.M Weiner (1987). Molecular Biology of the gene 4th ed. Benjamin cummings publshing company inc. California.

٢٢-السعيد ،محمد صبري (1997) ،الاصابات البكتيرية الهوائية الاعلى الجهاز التنفسي في محافظة بابل ودراسة النسق الوراثي لبكتريا الكلبسيلا .رسالة دكتوراة.كلية العلوم –جامعة بغداد.

[23]. Elshanshoury , A.R. (1995) interactions of *Azotobacter choococcum , Azopirillum blasilense* and *Streptomyces mutabilis,* in Relation to their Effect on wheat Development .J. Agro and cropsci-zeitschrift fur Ackerund. Pflanzenbau. 175 (2):199-127

[24]. Tomar ,R . Raghu,J, Yadaf, L and ghuraya, R.S.(1992). Effect of phosphorus , Rhizobium inoculation and Zinc on the yeild of soybean (glycine max.L) int .J.trop Agricuit .9(3)211-214 .

[25]. Hardy , K.(1986) Bacterial plasmids . 2nd ed. American Socieaty for Microbioloy.

صورة ١: المحتوى الوراثي للعزلة ***Kl.pneumoniae*** قبل التحييد

صورة ٢: المحتوى الوراثي للعزلة ***Kl.pneumoniae*** بعد التحييد.

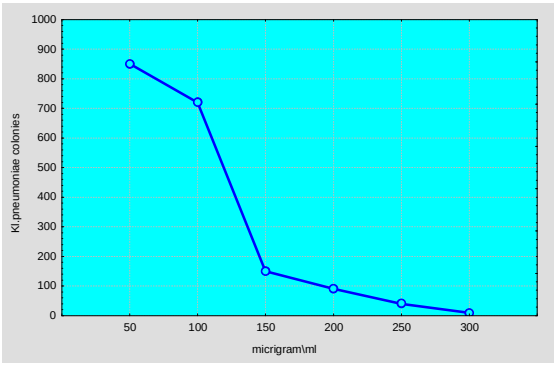
**جدول رقم ١: كمية النتروجين المثبتة (ملغم/مل) بوساطة عزلات *Kl.pneumoniae*.**

| رقم العزلة | كمية النتروجين المثبتة (ملغم/مل) | رقم العزلة | كمية النتروجين المثبتة (ملغم/مل) | رقم العزلة | كمية النتروجين المثبتة (ملغم/مل) | رقم العزلة | كمية النتروجين المثبتة (ملغم/مل) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ١. | ٠.٨٨ | ١٨. | ٠.٨٢ | ٣٥. | ٠.٩٨ | ٥٢. | ١.٥ |
| ٢. | ١.١ | ١٩. | ٠.٢٦ | ٣٦. | ٠.٨٣ | ٥٣. | ٠.٨٩ |
| ٣. | ١.١ | ٢٠. | ١.٢٦ | ٣٧. | ١.٤ | ٥٤. | ١.٣٣ |
| ٤. | ٠.١٥ | ٢١. | ٠.٤٣ | ٣٨. | ١.٦ | ٥٥. | ١.٣ |
| ٥. | ١.٠ | ٢٢. | ١.٥ | ٣٩. | ١.٢ | ٥٦. | ٠.٩٢ |
| ٦. | ٠.٤٢ | ٢٣. | ٠.٥٢ | ٤٠. | ١.٥ | ٥٧. | ٠.٨٢ |
| ٧. | ٠.١٢ | ٢٤. | ٠.٩ | ٤١. | ١.٦٨ | ٥٨. | ٠.٢٨ |
| ٨. | ٠.٢٥ | ٢٥. | ١.١ | ٤٢. | ١.٠ | ٥٩. | ٠.٢٦ |
| ٩. | ٠.١٨ | ٢٦. | ١.٨ | ٤٣. | ١.٥٤ | ٦٠. | ١.٢ |
| ١٠. | ٠.١٣ | ٢٧. | ٠.٨٥ | ٤٤. | ١.٧٢ | ٦١. | ١.١ |
| ١١. | ٠.٣٣ | ٢٨. | ١.٣ | ٤٥. | ١.٣ | ٦٢. | ١.٥٤ |
| ١٢. | ١.١ | ٢٩. | ١.١ | ٤٦. | ٠.٩٨ | ٦٣. | ٠.٥٨ |
| ١٣. | ٠.٧٥ | ٣٠. | ١.٣ | ٤٧. | ١.١٨ | ٦٤. | ١.٢ |
| ١٤. | ٠.٦٧ | ٣١. | ٠.٨٤ | ٤٨. | ٠.٣٣ | ٦٥. | ١.٥ |
| ١٥. | ٠.١٦ | ٣٢. | ١.٢ | ٤٩. | ١.٥ | ٦٦. | ١.٤ |
| ١٦. | ٠.٢٧ | ٣٣. | ١.٠ | ٥٠. | ١.٢ | ٦٧. | ١.٦ |
| ١٧. | ٠.٣٥ | ٣٤. | ٠.٩٥ | ٥١. | ١.٤ | | |

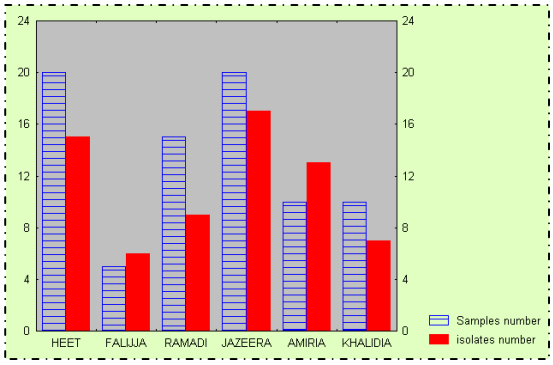
جدول ٢ : تاثير التلقيح بالعزلة *Kl. pneumoniae* والاسمدة المعدنية في مواصفات نبات الذرة الصفراء

| المعاملات | النتروجين الماخوذ في النبات ملغم/نبات | الوزن الجاف غم | نسبة البروتين % | طول النبات سم | النتروجين الكلي ملغم/كغم | محتوى النبات من الكلوروفيل | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | A | B | Total |
| C | 0.38 | 2.45 | 1.83 | 28 | 59.40 | 0.42 | 0.19 | 0.61 |
| F1 | 10.12 | 8.88 | 6.22 | 68 | 98.50 | 1.46 | 1.09 | 2.56 |
| F2 | 7.45 | 8.12 | 4.88 | 58 | 95.20 | 0.81 | 0.38 | 1.20 |
| F3 | 3.63 | 5.43 | 3.96 | 43 | 89.20 | 0.81 | 0.35 | 1.16 |
| F4 | 4.12 | 5.92 | 4.11 | 49 | 92.60 | 0.81 | 0.37 | 1.19 |

| الرموز | |
|---|---|
| C | التجربة الضابطة |
| F1 | التجربة السمادية الكاملة |
| F2 | نصف التوصيةالسمادية |
| F3 | ربع التوصية السمادية |
| F4 | استعمال العزلة البكتيريةKl. pneumoniae لوحدها |




شكل ٢: تاثير حامض السالسليك في نمو العزلة ٢٦ *Kl.pneumoniae*




شكل١: توزيع وانتشار العزلات البكتيريه في النماذج قيد الدراسة

# STUDY OF PLASMIDS ROLE IN NITROGEN FIXATION IN *KL. PNEUMONIAE* AND DETERMINATION THEIR BIOLOGICAL FIXATION EFFICACY .

**AHMED MOHAMMED TURKEY AL-ETHAWII.**
**E.mail: sci_coll@yahoo.com**

## Abstract:

**The goal of this study to isolation and idenfication *Kl. pneumoniae* from Al-Anbar governorate soils . 67 bacterial isolates for *Kl. pneumoniae* was obtained . Study include evaluation isolates effecacy to nitrogen fixation.**

**Results showen different effecacy in nitrogen fixation between 1.8 mg/ml in isolate No. 26 and 0.12 mg/ml in isolate No. 7, according this , the *Kl. pneumoniae* No.26 was choosed which contain Mega plasmid and identacal two small plasmids , and the curring experments by salcylic acid showed loss ability of nitrogen fixation .**

**The biological experment showed the highest level of nitrogen fixation was in corn when compelete of recommended fertilization level, while with *Kl. pneumoniae* the highest level of nitrogen fixation was when quarter recommended fertilization level.**