مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

قدرة بكتريا *Klebsiella pneumoniea* على تثبيت النيتروجين الجوي

فوز عبد السلام الصفار ، عبد الرزاق خضر ، نجوى ابراهيم البرهاوي
قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص:

استخدمت 21 عزلة من بكتريا *K. pneumoniea*، أخذت من مرضى مصابين بذات الرئة في مستشفى مدينة Leicester البريطانية مع عزلة *K. pneumoniea* 342 القياسية التي تم الحصول عليها من Prof. Jean-Marc في جامعة Leicester البريطانية واختبرت هذه العزلات على وسط المرق الخالي من النيتروجين Nitrogen-free broth (NF). أوضحت النتائج تباين في نمو العزلات البكتيرية، ومن اختبار دانكن تبين ان العزلة رقم 18 اعطت نموا أفضل مقارنة مع بقية العزلات ثم العزلة رقم 20 و19 على التوالي، اما من حيث تثبيت النيتروجين فقد اظهرت النتائج ايضا تباين العزلات في كفاءتها لتثبيتها النتروجين اذ كانت العزلة 18 الامثل من حيث تثبيتها للنيتروجين بالاعتماد على قياس فعالية انزيم النيتروجينيز بوساطة كاشف نسلر ثم العزلتين 20 و 19 على التوالي.

الكلمات المفتاحية: تثبيت النيتروجين اللاتعايشي، تثبيت النيتروجين في الكلبسيلا

المقدمة:

ينصب اهتمام الباحثين على عملية تثبيت النيتروجين لما لهذا العنصر من اهمية كبرى بوصفه أحد العناصر الأساسية الداخلة في تركيب البروتين والمادة الوراثية الداخلة في بناء الخلية الحية وتكوين الكلوروفيل والهرمونات والاوكسينات والسايتوكانينات (1). ان النيتروجين الجوي N_2 (الجزيئي) هو غاز خامل لا يتفاعل مع المواد الكيمائية الاخرى ليولد مركبات جديدة يمكن الاستفادة منها لذلك فان عملية تثبيته هي تحويله من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال (الامونيوم) بمساعدة انزيم النيتروجينيز (Nitrogenase) (2).

بالرغم من أن النيتروجين الجوي لايكون متاحا من الناحية الأيضية بصورة مباشرة للمحاصيل الزراعية، نجد أن ذلك يكون متاحًا لبعض من الكائنات الحية الدقيقة والتي يطلق عليها (Diazotrophs) والتي تقسم بالاعتماد على طريقة تثبيتها للنيتروجين الى الكائنات التي تدخل مع النبات بعلاقة تعايشية تكافلية Symbiotic واهم مثال عليها هو البكتريا العائدة لجنس الـ *Rizobium* والـ *Bradyrhizobium* المكونة للعقد الجذرية على جذور النباتات البقولية (3)، والنوع الاخر المثبتة للنيتروجين بطريقة لا تكافلية Free living nitrogen-fixingbacteria اي بمعزل عن النبات Nonsymbiotic منها بكتريا الـ *Klepsiella*. المعروف عن هذا الجنس انها مرضية لكن اكثر الدراسات التي تمت على بكتريا *K.pneumoniae* ركزت على كونها لها قابلية على تثبيت النيتروجين اضافة لكونها منتجة لمادة 1,3propanediol المهمة اقتصاديا لاستخدامها في انتاج الـ polyurethanes والـ polyesters (4). يمكن العثور على الـ *Klepsiella* من مجموعة متنوعة من النباتات دون ان تسبب لها الامراض، وتمتلك البكتريا دوراً مهماً في تثبيت النيتروجين (5). كما اشار كل من (6 و7) الى دور *K.pneumoniae* في عملية تثبيت النيتروجين، وتعتبر *K.pneumonia* و *K. oxytoca* من اهم انواع العائلة المعوية القادرة على تثبيت النيتروجين من الغلاف الجوي وتوفيره للنبات لذلك يطلق عليها اسم Diazotrophs (8). وقد اشار الباحث (9) ان لهذه البكتريا اهمية من الناحية الزراعية لقابليتها في زيادة المحصول، وان سبب تواجدها على الاغلب باعداد كبيرة في النباتات والتصاقها لفقدانها الاسواط (10).

يعرف الانزيم المثبت للنيتروجين بانزيم النيتروجينيز هذا الانزيم ناتج عن التعبير الجيني للاوبرون المكون من ثلاث جينات تركيبية وهي *nifH*, *nifD*, *nifK* من اصل 20 جيناً من الجينات المثبتة للنيتروجين Nitrogen fixation (*nif*) genes (11)، ليتم تمثيله فيما بعد إلى الحامض الأميني Glutamine ونواتج ثانوية أخرى في الـ *Klepsiella* (12). يتكون انزيم النيتروجينيز من نوعين من البروتينات المعدنية النوع الاول عبارة عن بروتين يحتوي على الموليبدنم والحديد Mo-Fe-protein ويسمى ايضا بانزيم الـ Dinitrogenase (المركب ا) وهذا المركب مكون من اربع وحدات فرعية ($\alpha_2\beta_2$)، يُشفر الجين *nifD* الوحدة الفرعية من نوع الفا (α) ويشفر الجين *nifK* الوحدة الفرعية من نوع β، وهذا البروتين هو المسؤول عن اختزال النيتروجين، اما النوع الثاني فهو عبارة عن البروتين المحتوي على الحديد Fe-protein ويدعى بانزيم Dinitrogenase reductase (المركب اا) ويُشفر من قبل الجين *nifH* الذي هو واحد من 20 جين التي تشفر مسار تثبيت النيتروجين وتستخدم بشكل عام لتشخيص الكائنات المثبتة للنيتروجين(13). وجاء الهدف من هذه الدراسة للتحري عن قابلية العزلات المختلفة من بكتريا الـ *Klebsiella* المرضية على تثبيت النيتروجين.

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة في مختبرات جامعة Leicester البريطانية التابعة لقسم الاصابة والمناعة والالتهاب. تم تشخيص 21 عزلة بكتيرية من *Klebsiella pneumoniea* المرضية المستحصل عليها من مستشفى مدينة Leicester اضافة الى العزلة القياسية *K. pneumoniea* 342 المأخوذة من المختبر الذي اجريت فيه الدراسة.

وسط المرق المغذي الخالي من النيتروجين Nitrogen-free broth:

حضرت مكونات وسط المرق المغذي الخالي من النيتروجين ثم اكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر والمعقم وكما مبين في جدول رقم (1) ثم ضبط الاس الهيدروجيني على 7 وعقم الوسط بالمؤصدة تحت ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة وزع الوسط على انابيب اختبار بسداد محكم سعة حجم 30 سم^3 بواقع 15 سم^3 لكل انبوب واستخدمت هذه الانابيب لتنمية البكتريا ومعرفة قدرتها على تثبيت النيتروجين (14).

جدول (1) مكونات وسط (NF)

المكونات	التركيز g/L
Glucose	10 g
K_2HPO_4	0.52
KH_2PO_4	0.41
$MgSO_4.7H_2O$	0.16
NaCl	0.20
$CaSO_4.2H_2O$	0.20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.002
$FeSO_4.7H_2O$	0.005
MgSO4.7H2O	0.1

وسط المرق المغذي Luri Broth (LB):

حضرت مكونات وسط المرق المغذي (LB) ثم اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر المعقم وكما مبين في جدول رقم (2) ثم ضبط الاس الهيدروجيني على 7 وعقم الوسط بالمؤصدة تحت ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة حفظ بعدها في درجة حرارة 4°م، استخدم هذا الوسط لزرع العزلات وتنشيطها (15).

جدول (2) مكونات وسط (LB)

المكونات	التركيز g/L
Tryptone	10
Yeast Extract	5
NaCl	10

كاشف نسلر Nessler reagent:

استخدم هذا الكاشف في تجارب الكشف عن قابلية انزيم النيتروجينيز لتثبيت النيتروجين، وحسب تعليمات الشركة المصنعة Sigma وحفظ في مكان بارد ومظلم لحين استخدامه.

طرائق العمل

ظروف تنمية وحفظ البكتريا قيد الدراسة:

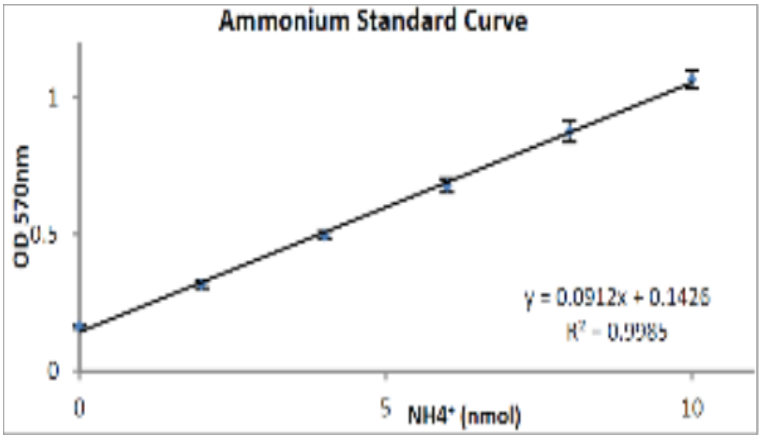
زرعت العينات البكترية قيد الدراسة على وسط المرق المغذي LB لغرض تنشيطها بواقع 10 µl لقاح بكتيري لكل 100سم^3 من الوسط وحضنت ليلة واحدة في جهاز الحاضنة الهزازة (Shaker) 200 دورة/دقيقة نقلت لاطباق زجاجية حاوية على وسط LB الصلب وحضنت في حاضنة النمو incubator Growth عند درجة (37±1 °م)، بعدها حفظت الاطباق في الثلاجة عند درجة (4°م) لحين استخدامها في التجارب اللاحقة.

تنمية البكتريا على وسط Nitrogen-free broth:

اجريت عملية اعادة الزرع لـ 21 عزلة من بكتريا *K. pneumoniea* على وسط NF المذكور اعلاه بواقع مكررين لكل عزلة، بمزج حملة loop واحدة من الزرع البكتيري المنشط مع 100 µl من DDH_2O وزع في انبوبتي اختبار واضيف لكل منهما 10 سم^3 من الوسط الخالي من النيتروجين علقت الانبوبتان وحضنت بدرجة حرارة 30°م بشكل مائل Slants، وتم قياس كثافة النمو بعد 6 ايام بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 nm.

اختبار قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين باستعمال كاشف نسلر:

أجري قياس قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين بعد 6 ايام من تحضينها وذلك بمزج 1.75 سم^3 ماء مقطر معقم مع 0.5 سم^3 من عينة الزرع البكتيري ثم اضيف 0.25 سم^3 من الكاشف في انابيب اختبار ومزج الخليط بجهاز الـ vortex لمدة 10 ثواني وتركت الانابيب لمدة 10 دقائق. قيست الامتصاصية لجميع الانابيب بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 480 nm. اما معاملة السيطرة الـ control (المكون من مزيج من الكاشف والماء والوسط غير الملقح) فاستخدمت لتصفير الجهاز. اعتمد على المنحنى القياسي لاختبار الامونيا والممثل بالشكل (1) والذي جرى بموجبه قياس القابلية على تثبيت النيتروجين.



الشكل (1): المنحنى القياسي للامونيا

التحليل الاحصائي:

حللت النتائج باختبار تحليل التباين F-value و F-test وقورنت المتوسطات الحسابية باختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى احتمالية $P\leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

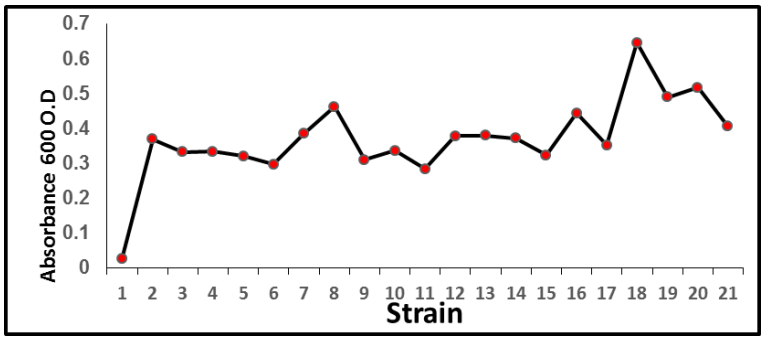
تشخيص قدرة نمو العزلات البكتيرية وتثبيتها للنيتروجين على وسط Nitrogen-free broth:

يقتصر وجود الاحياء المثبتة للنتروجين على التربة الا انه ثبت ان بعض انواع البكتريا المرضية لها القدرة على تثبيته ايضا , لذا حظيت تلك الاحياء بدراسات اوسع من تلك التي تثبت النيتروجين كما انها القت بظلالها وبشكل مكثف على التطبيقات الحقلية وكانت محط انظار الباحثين. ان اختلاف القابلية على تثبيت النيتروجين من قبل الاحياء المجهرية المختلفة هي احدى السمات المميزة لتلك الاحياء لذا اختبرت قابلية 21 عزلة بكتيرية من بكتريا *K. pneumoniea* على النمو في الوسط الخالي من النيتروجين (NF) Nitrogen-free broth، وبعد مرور 6 ايام من تحضيها بالحاضنة بدرجة 30° م.

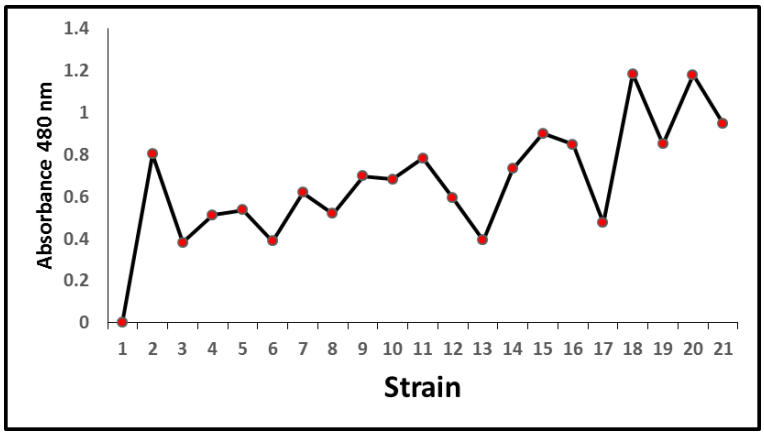
من جدول تحليل التباين تبين ان تجربة نمو العزلات وتثبيتها للنيتروجين على وسط N-free broth كانت معنوية ضمن مستوى احتمال $P\leq 0.05$.

تبين من اختبار دانكن ان هناك تفاوتا واضحا في قابلية العزلات البكتيرية المختلفة على النمو اذ ابدت العزلة رقم 18 نموا أمثل مقارنة مع بقية العزلات (وذلك للحصول على اكبر فرق معنوي) تلتها العزلة رقم 20 والعزلة 19على التوالي(التي اعطت نفس الفرق المعنوي فيما بينها) من حيث القابلية على النمو مقارنة مع العزلة المنوه عنها اعلاه كما جاء في الشكل رقم (2). وشهدت العزلتين رقم 6 و 11 انخفاضا في قابلية النمو على نحو واضح. اظهرت النتائج الموضحة في شكل رقم (3) تباين العزلات في تثبيتها للنيتروجين بالاعتماد على قياس فعالية انزيم النيتروجينيز باستخدام كاشف نسلر، اذ كانت العزلة رقم 18 مقارنة بالعزلات الاخرى الامثل من حيث فعالية انزيم النيتروجينيز والذي انعكس على قابليتها لتثبيت النيتروجين (وذلك لحصول اكبر فرق معنوي)، تلتها من حيث الفعالية العزلتين 20 و 21 على التوالي وتدنت فعالية الانزيم في العزلتين 3 و 13 مقارنة ببقية العزلات، علما بان العزلة القياسية 342 *K. pneumoniea* اعطت فرقا معنويا في نموها وقابلية تثبيتها للنيتروجين وهذا دليل يثبت ان هذه العزلة لها قدرة على تثبيت النيتروجين وامتلاكها لانزيم النيتروجينيز.

اظهرت نتائج هذه التجربة ان هناك اختلاف في نمو العزلات البكتيرية قد يعزى لطريقة العزل حيث لم تجمع من عينة واحدة وانما من عينات مختلفة وهذا ما اكده الباحث (16) ان السلالات المختلفة لنوع واحد من البكتيريا تختلف في قدرتها على تثبيت النيتروجين وقد أطلق على السلالات التي لا تثبت النيتروجين أو تثبته بكميات ضئيلة اسم سلالة غير فعالة Ineffective تميزًا عن السلالات الفعالة Effective. كما جاءت نتائج الكشف مقارب لما توصل اليه (17)، وجاءت ايضا مقاربة لما توصلت اليه دراسة (18) حول فعالية انزيم النيتروجينيز وانعكاسها على قابلية العزلات البكتيرية في تثبيتها للنيتروجين مؤيدة وداعمة لنتائج هذا الكشف اذ انه لفعالية انزيم النيتروجينز تأثير على كفاءة تثبيت النيتروجين فقد يكون فعال في عزلة وخامل في اخرى كالملاحظ في العقد الجذرية الوردية لـ بكتريا الـ *Rizobium* ذات الكفاءة في تثبيت النيتروجين لاحتوائها على انزيم النيتروجينز الفعال على عكس العقد الجذرية البيضاء التي يكون فيها الانزيم خامل. ان الاختلاف الملاحظ في فعالية انزيم النيتروجينيز الذي انعكس على العزلات البكتيرية وقابليتها تثبيتها للنيتروجين قد يعزى ايضا كذلك الى اسباب وراثية او للحالة الفسلجية للعزلة البكتيرية المختلفة رغم انها عائدة لنفس النوع لبكتريا *K.pneumoniae* (19).



شكل رقم (2) نمو عزلات بكتريا الـ *K. pneumoniea*.



شكل رقم (3) فعالية انزيم النيتروجينيز في تثبيت النيتروجين لبكتريا *K. pneumoniea*

المصادر

1) Miyawak, K.; Tarkowski, P.; Kitano, M.M; Kato, T.; Sato, S.; Tarkowska , D.; Tabata,S.; Sandberg , G. and Kakimoto, T. (2006). Role of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyl transferases and tRNA isopentenyl transferases in cytokinin biosynthesis . J.PNAS., 103:16598-16603.

2) Latysheva, N.; Junter, V.L.; Palmer, W.J.; Codd, G. and Baker. D. (2012). The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. J. Bioinformatics., 28 (5) 603-606.

3) Berman-Frank, I.; Lundgren, P and Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. J. Res. Microbiol., 154(3):157-64.

4) Petersen, J. C.; Gessner, K.; Fisher, C. J.; Mitchell, D.; Lowe, J.; and Lubitz, W. (2005) . Mn2+-adenosine nucleotide complexes in the presence of the nitrogenase iron-protein: Detection of conformational rearrangements directly at the nucleotide binding site by EPR and 2D-ESEEM (two-dimensioml electron spin-echo envelope modulation spectroscopy) . J. Biochem., 391:527-539.

5) Douglas, F. (2008). Colifroms- Medical Microbiology Book. USA.

6) Fout, D.; Tyler, H.; Deboy, R.; Dougherty, S.; Ren, Q.; Badger, J. Durkin, A.; Hout, H.; Shirvastava, S.; Kothary, S.; Robert, J.; Donson, R.; Mohamoud, Y.; Khouri, H.; Roesh, L.; Kragfeld, K.; Struve, C.; Triplett, E. and Methe, B. (2008) . Complete genome sequence of the N2. fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumonia* 342 and virulence prediction verified in Mice – Plos. J. Gene., 4 (7):1-18.

7) Prescott, L . (2002) . Microbiology. 5th ed . The McGraw - Hill Companies, U.S.A.

8) Brisse, S.; Grimont , F. and Grimont , P. A. D. (2006) . Prokaryotes. New York, NY: Springer New York . p. 159-196.

9) Riggs, P.J.; Chelius, M.K.; Iniguez, A. L.; Kaeppler, S. M.; and Triplett, E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria., Aus. J. Plant Physiol., 28(9): 829-836.

10) Haahtela, K.; Laakso, T., and Korhonen, T.K. (1986) . Associative nitrogen fixation by *Klebsiella spp*. adhesion sites and innoculation effects on grass roots. J. Appl. Environ. Microbiol., 52(2):1074-1079.

11) Freiberg, C.; Fellay, R.; Bairoch, A.; Broughton, W. J.; Rosenthal, A.; and Perret, X. (1997) . Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes .J. Nature., 387(6631): 394-401.

12 Verma, D.P.S., and Long ,S. (1983) .The Molecular Biology of Rhizobium-Legume Symbiosis. In:International Review Cytology, New York: A cademic Press.,pp:211-254.

13) Jenkins, B. D.; Steward, G. F.; Short, S. M.; Ward, B. B.; and Zehr, J. P. (2004). Finger printing diazotroph communities in the chesapeake bay by using a DNA macroarray. J. Appl. Environ. Microbiol., 70: 1767-1776.

14) Wilson, P.W. and Knight, S.C. (1952) . Experiments in Bacterial Physiology. Burguess, Minneapolis, USA. 49.

15) Green, M.; and Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

16) Veeger, C. W. E. Newton.(1984). Advances in Nitrogen Fixation Research. roceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout, The Netherlands.

17) الراوي، علي عبد الهادي.(2010). تأثير إضافة نوعين من المادة العضوية في فعالية بكتريا الازوتوبكتر وزيادة تثبيتها للنتروجين الجوي في تربة ملحية. مجلة الانبار للعلوم الزراعية، المجلد 8 :العدد (4) كلية الزراعة / جامعة الانبار.

18) Schulze, J., 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? J. Plant Nutr. Soil Sci., 167:125-137.

19) Suneja, S.N. Narula, Anand, R.C. and Lokshmin, K. (1996). Relationship of *Azotobacter chroococcum* siderophores with nitrrogen fixation.J. Folia Microbiolo., 41(2) :154-158.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016

Comparison between various strain from *Klebsiella pneumoniea* on Nitrogen fixation

Fawz Abdul Salam K.AL-Saffar , Abdul Razak K. Mahmood , Najwa I. AL- Barhawi
Department of Biology , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq

Abstract:
Twenty one isolates of *K. Pneumonia* isolated from infected pneumonic patients in Leicester city hospital in Britain, with *K. pneumonia*342 standard strain which obtained from Prof. Jean-Marc in Leicester British university were used in this study . These isolates were tested by inoculating in Nitrogen free broth medium .The results revealed variation in their growing and from Danken test it was appeared that the 18th isolate gave the best growth in comparison with the rest, then the 20th ,19 th isolates respectively. While in respect to nitrogen fixation, the results showed variation in it's efficiency for it's nitrogen fixation, the 18th bacterial isolate was the best according to it's fixation ,depending on measuring the activity of nitrogenase enzyme by Nesler reagent ,then 20th,19th isolates respectively.
key words: Non-symbiotic fix nitrogen, Fix nitrogen in *K. pneumoniea*, nif HDK