P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2010 ,(4), (2) :00-00
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
Open Access

عزل وتشخيص بكتريا *Klebsilla oxytoca* من تربة مدينة الرمادي وتحديد قدرتها في تثبيت النتروجين وخفض التوصية السمادية لنبات اللوبيا

احمد محمد تركي العيثاوي

جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠٠٩/١٢/٣٠
تاريخ القبول: ٢٠١٠/٦/٢٤
تاريخ النشر: ١٤ / ٦ / ٢٠١٢
DOI: 10.37652/juaps.2010.15275

الكلمات المفتاحية:
عزل،تشخيص،
Klebsilla oxytoca،
الرمادي،
تثبيت النتروجين،
التوصية السمادية،
اللوبيا.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة معرفة انتشار بكتريا Klebsilla oxytoca في ١٠٠ عينة تربة والماخوذه من مناطق (الجزيرة و التأميم و الخالدية و الصوفية والحبانية) إذ تراوحت نسبة تواجد هذه البكتريا بين (١٢-٨٨)% وأظهرت النتائج احتواء جميع العينات على بكتريا Klebsilla oxytoca إذ حصل على (٣٦) عزلة من هذه البكتريا . شملت الدراسة أيضا تقييم كفاءة العزلات في تثبيت النتروجين و بلغت أعلى كمية نتروجين مثبت (١.٣) ملغم نتروجين/١٠٠ مل من قبل العزلة المحلية Klebsilla oxytoca J3. وعند دراسة تأثير تراكيز مختلفة من سمادي NP واليوريا على نمو العزلة في الوسط الزرعي الصلب والسائل من حيث أقطار المستعمرات والكثافة العددية أظهرت النتائج قدرة هذه العزلة على النمو عند إضافة ربع التركيز والبالغ (٨٣ و٣.٢) جزء بالمليون لسماد NP لسماد اليوريا على التوالي إذ بلغ قطر المستعمرات النامية على الوسط الصلب (٢، ٣،٢.٥، ٣.٢، ٣،٣.٤و٤) ملم على التوالي خلال مدد التحضين (٢٤ و٤٨ و ٧٢ و ٩٦ و١٢٠ و١٤٤) ساعة بينما بلغت الكثافة العددية (٦.٩٨ و٧.٩٣ و ٨.٧٤ و٨.٩٨ و ٩.٢٣ و ٩.٢١) لوغاريتم/ مل . وأظهرت نتائج التجربة البايولوجية كفاءة هذه العزلة في تثبيت النتروجين وظهر ذلك في جميع صفات النبات المدروسة (وزن النبات، طول النبات،محتوى النبات من النتروجين، الكلوروفيل) في المعاملة التي استخدم فيها خليط العزلة مع ربع التركيز والبالغ (٨٣ و٣.٢) جزء بالمليون لسماد NP و لسماد اليوريا على التوالي إذ أشارت النتائج إلى أن خليط العزلة مع ربع التوصية تمكن من تثبيت النتروجين بمعدل ٤.٤٣ ملغم نتروجين/نبات في حين بلغ محتوى التربة من النتروجين الكلي ١٢٠.٦٣ملغم / كغم وبكثافة ميكروبية هي ٨.٠٩ لوغاريتم/ غم تربة وأعطت النباتات لهذه المعاملة أفضل معدل لها في طول النبات والجذور بلغت (٧٤ ، ٢٠) سم على التوالي وبلغ الوزن الجاف (١٧٨، ١٦.٢) ملغم /نبات.

المقدمة

وصفت بكتريا Klebsilla oxytoca من قبل Flugg (1886) وتوجد في القنوات الهضمية للإنسان والحيوان وتعزل أيضا من حالات مرضية ومن التربة ومن البيئية المائية.أن معظم سلالات هذا النوع تكون غير مكونه للمحفظة عدا القليل منها (١) يتميز هذا النوع عن باقي أنواع جنس الكلبسيلا بالعديد من الصفات وأهمها مقدرته على تحطيم البكتين وإنتاج الاندول وقدرته على استخدام مصدر الكاربون الموجود في الهستامين أو في 3- hydroxy Butyrate (٢). ينمو في مدى حراري بين (١٢ – ٤٣) والدرجة المثلى للنمو هي ٣٧ م ويقتل بواسطة الحرارة الرطبة عند درجة حرارة (٥٥) م لمدة ٣٠ دقيقة ويمكن أن يبقى على قيد الحياة لعدة شهور عندما يحفظ في درجة حرارة الغرفة ويعتبر ذو تغذية كيميائية عضوية Chemoorganotrophic ويحتوي على نوعين من الايض هما التخمري والتنفسي (٣). تتميز مستعمرات هذا النوع عند نموها على وسط MacConkey agar بكبر حجمها وارتفاعها عن الوسط، رطبة ذات لون وردي لأنها تستطيع تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط، مدورة بشكل منتظم وذات

* Corresponding author at: Anbar University - College of Science, Iraq;

لزوجة عالية وتنتشر في جميع أنحاء الطبق بعد مرور (٤٨) ساعة من الحضن (٤). تلعب أنواع Klebsilla دورا مهما في تثبيت النيتروجين بصورة حرة في التربة وخصوصا في المنطقة المحيطة بالجذور (٥)، وذلك بسبب امتلاكها لأنزيم النايتروجينيز Nitrogenase الذي هو الأساس في أحداث عملية تثبيت النيتروجين وبالتالي تعويض التربة ولو بجزء من النيتروجين المفقود بمسارات الغسل والتطاير بمسار لاتعايشي لتثبيت النيتروجين داخل خلاياها (٦) إذ وجد (٧) أن Klebsilla التي تنمو على جذور النباتات تقوم بتثبيت النيتروجين بصورة حرة . إذ ذكر (2) عند دراسته لفعالية إنزيم النايتروجينيز فيKlebsilla oxytoc أن لها دورا مهما في تثبيت النيتروجين كما أن الطبيعة الكيموحيوية لأنزيم النايتروجينيز تضع الكائنات المثبتة للنيتروجين في العديد من المشاكل الفسيولوجية بخاصة فيما يتعلق بحماية الأنزيم من الأوكسجين حيث أن كلا الروتينين المكونين للأنزيم يحطمان بوجود الأوكسجين وذلك لان عملية تثبيت النيتروجين تتم بصورة خاصة من قبل البكتريا اللاهوائية الاختيارية والبكتريا الهوائية لذا اتبعت البكتريا طرقا خاصة لحماية إنزيم النايتروجينيز من المستويات العالية من الأوكسجين (٨) فقد أكد (٩) أن لسلالات الكلبسيلا القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي لا تكافليا . وقد ذكر (١٠) أن كمية النيتروجين المثبتة بواسطة الكلبسيلا تتراوح بين (٢-٢٠) ملغم نيتروجين / غم من الكاربوهيدرات .إذ تكون كمية النيتروجين المثبتة تكون معتمدة على جين nifH المسؤول عن عملية دخول المواد في بكتريا الكلبسيلا (١١) إذ يبقى نسبة المكونات ثابتة داخل الخلايا إذ يؤشر عن طريق هذا الجين إلى أسماء الجينات الأساسية التي يشفر لها والتي يكون منفذ من خلالها (١٢) و اهتم الباحثون منذ زمن بعيد في برامج إنتاج لقاحات من هذه البكتريا لاستخدامها كمخصبات حيوية إذ تساهم في مضاعفة الإنتاج النباتي (٨).

المواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة

تم جمع (١٠٠) عينة تربة من مناطق مختلفة في مدينة الرمادي موزعة على خمس مناطق مختلفة (جدول ١) خلال المدة ما بين شباط ٢٠٠٨ ونيسان ٢٠٠٨ لغرض عزل البكتريا المثبتة للنتروجين Klebsilla oxytoca وبواقع (٠.٥ – ١.٠) كغم تربة بعد إزالة ٢ سم من سطح التربة .

جدول (١) مواقع وإعداد نماذج التربة المستعملة في الدراسة

رمز الموقع	اسم الموقع	عدد النماذج
J	الجزيرة	٢٠
T	التأميم	٢٠
K	الخالدية	٢٠
S	الصوفية	٢٠
H	الحبانية	٢٠

عزل وتشخيص بكتريا Klebsilla oxytoca

اعتمدت المشاهدات الزرعية على الوسط اكار ماكونكي والفحوصات المجهرية والكيموحيوية في عزل وتشخيص البكتريا و اعتمادا على المصادر العلمية (٣ و ١٣)استخدام نظام أبي ٢٠ للعائلة المعوية API-20E استخدم هذا النظام لتشخيص البكتريا بغية التأكد من الاختبارات الكيموحيوية الأولية المشار لها في الفقرة السابقة . يحتوي هذا النظام على ٢٣ اختبارا كيموحيوي، تم أتباع تعليمات الشركة المجهزة (Bio merieux) في استعماله.

قياس نشاط إنزيم النتروجينيز

استخدمت طريقة كلدال لقياس فعالية إنزيم النتروجينيز بصورة غير مباشرة من خلال تقدير كمية النتروجين الكلي (١٤) وان مبدأ طريقة كلدال يعتمد على أكسدة المواد العضوية باستعمال حامض الكبريتيك وتحويل النتروجين إلى آمونيا .

٥ – اختبار قدرة العزلة على النمو في ثلاثة تراكيز مختلفة من سماد اليوريا و NP

لغرض معرفة قدرة عزلة بكتريا KL.oxytoca المعزولة من التربة على النمو في تراكيز مختلفة من سمادي NP واليوريا وهي التركيز الكامل لسماد NP والبالغ ٣٣٣ جزء بالمليون أما سماد اليوريا فهي تساوي ١٢.٨ جزء بالمليون ونصف هذا التركيز والبالغ ١٦٦ و ٦.٤ جزء بالمليون لسمادي NP واليوريا على التوالي وربع التركيز والبالغ ٨٣ و ٣.٢ جزء بالمليون لسمادي NP واليوريا على التوالي مع معاملة لم يتم إضافة أسمدة لها في نمو العزلة البكتيرية وبواقع ثلاث مكررات اعتمادا على الكثافة العددية وقطر المستعمرة كدليل لتأثير المعاملة بالأسمدة . إذ استعمل وسط ماء البيتون و قسم الوسط الزرعي المستخدم إلى جزئيين الأول منه استخدم كوسط زرعي سائل والجزء الثاني كوسط زرعي صلب إذ تم إضافة الاكار للوسط للتصليب . وتم وضع ٥٠ مليليتر من الوسط السائل في دوارق زجاجية سعة ١٠٠ مليليتر حيث قسمت إلى أربعة مجاميع أضيف إلى المجموعة الأولى

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2010 ,(4), (2) :01-12

Open Access

التركيز الكامل من السماد أما المجموعة الثانية فأضيف لها نصف التركيز في حين المجوعة الثالثة أضيف لها ربع التركيز من السماد أما المجوعة الرابعة فأبقيت بدون إضافة أسمده لها. وعقمت بالموصدة باستثناء معاملات اليوريا إذ عقمت بالترشيح وأضيفت إلى الوسط بعد تعقيمه .أما بالنسبة إلى الوسط الصلب فقد تم تلقيح الأوساط في المنتصف لغرض قياس قطر المستعمرة النامية وأخذت النتائج بالنسبة للوسط السائل والصلب بعد مرور ٢٤ و٤٨ و٧٢ و٩٦ و١٢٠ و١٤٤ ساعة من الحضن.

٦- تقدير الكثافة العددية ومعدل النمو النسبي وثابت النمو النسبي

قدرت الكثافة العددية للخلايا البكتيرية حسب طريقة (١٥) وحسب معدل النمو النسبي وثابت النمو النسبي من معادلتي (١٦) المذكورتين أدناه:

$$Gr = Log\ Nt - Log\ No \text{ ------------------ } Q1$$

$$Ks = 2.3/t * Log\ Nt/ No \text{ ---------------- } Q2$$

إذ أن

Nt = عدد الخلايا بعد الحضن للمدة المقررة

No = عدد الخلايا عند الزمن صفر من الحضن

t = مدة الحضن

Gr = النمو النسبي

Ks = ثابت النمو النسبي

٧ – التجربة البايولوجية .

لغرض معرفة قدرة عزلة KL.oxytoca في تثبيت النتروجين بوجود النبات في التربة ومدى استفادة النبات منه ومقارنة كفاءة العزلة في تجهيز النبات بحاجته من النتروجين مع استعمال الأسمدة بمعدلاتها الثلاث وهي التوصية السماديه الكاملة (١٦٦.٦ كغم/ دونم لسماد NP و٣٢ كغم/ دونم لسماد اليوريا) ونصف وربع كمية سماد التوصية ورمزت لهذه المعاملات وعلى التوالي A1 وA2 و A3 ومعاملة السيطرة فرمز لها ب(C). فقد نفذت تجربة بايولوجية استخدمت فيها تربة مزيجيه جدول ٢ وسمدت باستخدام سماد NP ٢٧% و٢٧% حيث أكملت كمية النتروجين بسماد اليوريا ٤٦% N وأضيف سماد اليوريا بدفعتين الأولى بعد الإنبات ٧ أيام والثانية بعد ٢٣ يوم من الدفعة الأولى .عقمت بذور النبات اللوبيا سطحيا بواسطة كلوريد الزئبق ثم رطبت بمحلول سكري تركيز ٢٠% ثم لوثت بلقاح العزلة زرعت وبمعدل ٣ بذور للسنادنة الواحدة آما التي أضيف لها أسمدة فقط لم يضاف أليها لقاح العزلة كما استخدمت معاملة سيطرة بدون إضافة سماد كيماوي وبدون إضافة لقاح العزلة المذكورة .أضيف الماء للتربة في السنادين لإيصالها لرطوبة السعة الحقلية وتم متابعة المستوى الرطوبي طيلة مدة الدراسة بالاعتماد على الفقد في الوزن. سجلت بعد (٤٥) يوم أطوال النباتات وأوزانها الجافة (للجزء الخضري) والمجموع الجذري للنبات كما قدر محتوى النبات من النتروجين فضلا عن تقدير محتوى التربة من النتروجين الكلي وقدرت EC و pH والعدد الكلي لبكتريا KL.oxytoca والعدد الكلي للبكتريا في التربة وكذلك قدر محتوى النبات من البروتين والكلوروفيل.

جدول (٢) بعض صفات التربة المستعملة في التجربة البايولوجية

ت	الصفة	وحدة القياس	القيمة
١	الرقم الهيدروجيني pH	------------	٧.٦٠
٢	EC	ديسي سيمنز / م	٣.٣٢
٣	المادة العضوية	غم / كغم	١١.١١
٤	النتروجين الكلي	ملغم N / كغم	١٨٠
٥	الفسفور الجاهز	ملغم P / كغم	١٣
٦	كاربونات الكالسيوم	غم / كغم	١٣٥
٧	نسجة التربة		مزيجيه
٨	نسبة الماء الجاهز	%	١٣.٤

النتائج والمناقشة

انتشار بكتريا الكلبسيلا

أظهرت نتائج العزل والتشخيص للبكتريا أن جميع عينات التربة البالغة (١٠٠) عينة والمأخوذة من مناطق مختلفة في مدينة الرمادي (الجزيرة، التأميم، الخالدية، الصوفية، الحبانيه) تحتوي على أنواع مختلفة من البكتريا وبنسب متباينة تراوحت بين ١٢- ٨٨ % (شكل ١) وقد بلغت أعلى نسبة لانتشار البكتريا في ترب منطقة الجزيرة إذ بلغت النسبة المئوية لتواجد عزلات البكتريا ٨٨% في حين سجلت منطقة التأميم اقل معدل لانتشار البكتريا ولم تتجاوز ١٢% وقد يعزى هذا التباين إلى اختلاف طبيعة الاستغلال الزراعي للترب والمأخوذة من مناطق زراعية وحدائق منزلية ومناطق صناعية إذ أن للغطاء النباتي الموجود في المنطقة اثر كبير في تحفيز نمو بعض أنواع البكتريا وقد أكد ذلك (١٧) إذ أشاروا إلى أن هذا الاختلاف في كثافة البكتريا قد يعود إلى نوع المحاصيل الزراعية في هذه الترب بينما عزى (١٨ و١٩) سبب هذا الاختلاف إلى إفرازات جذور النباتات لبعض الأحماض

الأمينية والعضوية والسكريات والفيتامينات والتي تستفيد منها الأحياء المجهرية المتواجدة طبيعيا في هذه الترب .

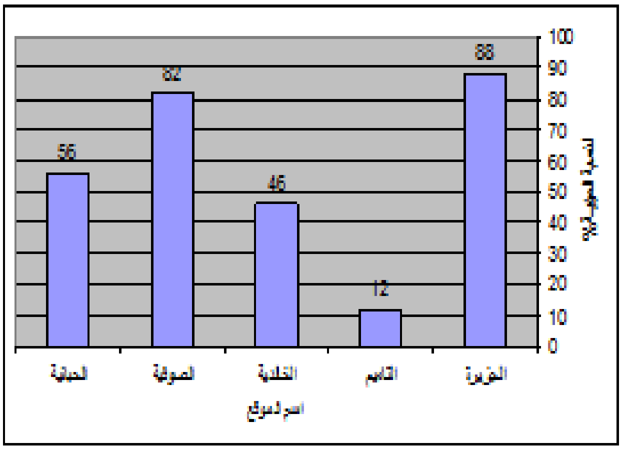
٢ – عزل وتشخيص بكتريا Kl.oxytoca

أ – العزل

أظهرت نتائج العزل والتشخيص انتشار بكتريا Kl.oxytoca في (٣٦) عينة من عينات التربة والبالغة (١٠٠) عينة والمأخوذة من مناطق الدراسة (جدول ٢) إذ تراوحت بين ٢-١٤ عزلة بكتيرية (جدول ٣) حيث كانت أعلى نسبة لانتشار بكتريا Kl.oxytoca في ترب منطقة الجزيرة، حيث تم الحصول على ١٤ عزلة بكتيرية واقل نسبة انتشار لها كانت في ترب منطقة التأميم حيث بلغت ٢ عزلة فقط، ويعزى سبب تباين الانتشار إلى وجود علاقة تعايشه ما بين البكتريا والنبات إذ أن المناطق الزراعية يكون فيها نسبة البكتريا أكثر من المناطق السكانية (٦).

ب – التشخيص

أظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية (جدول ٤) إضافة إلى نتائج اختبار نظام API 20E متعدد الاختبارات لغرض التشخيص النهائي لأنواعها السائدة والموضحة في (جدول ٥) للعزلات البكتيرية ٣٦ المعزولة من التربة .أن هذه العزلات كانت سالبة لصبغة كرام غير متحركة غير مكونة للسبورات موجبة للاندول سالبة لاحمر المثيل موجبة للفوكس بروسكاور والسيمون ستريت موجبة للكاتليز والاوكسيديز غير منتجة H2S موجبة لليوريز مختزله للنترات غير محلله للجيلاتين وبناءً على مجمل الاختبارات المجهرية والكيموحيوية مع نتائج نظام API 20E فقد ظهر أنها تحمل صفات بكتريا *Kl.oxytoca*



شكل (١) النسبة المئوية للكثافة العددية لانتشار البكتريا في

جدول (٣) عدد بكتريا Kl.oxytoca المعزولة من الترب المختلفة والنسبة المئوية لتواجدها

ت	اسم الموقع	أعداد *Kl.oxytoca*	عدد النماذج	نسبة التواجد للمنطقة %
١	الجزيرة	١٤	٢٠	٧٠
٢	التأميم	٢	٢٠	١٠
٣	الخالدية	٦	٢٠	٣٠
٤	الصوفية	١١	٢٠	٥٥
٥	الحبانية	٣	٢٠	١٥
٦	المجموع	٣٦	١٠٠	٣٦

جدول (٤) بعض الصفات التشخيصية للعزلات ٣٦ من البكتريا قيد الدراسة

النتيجة	الفحوصات	العزلة
-	Gram stan	1-36 kl.oxytoca
-	Motility	
-	Spor	
+	Indol	
-	methyl-red	
+	voges proskauer	
+	Simon citrate	
+	catalase	
+	oxidase	
+	nitrate reduction	
-	H2S	
+	Urase	
-	Gelatinase	
+	Starch	

جدول (٥) نتائج تشخيص العزلات البكتيرية باستخدام نظام API 20E

النتيجة	الفحوصات	العزلة
+	ONPG	1-36 kl.oxytoca
-	ADH	
+	LDC	
-	ODC	
+	CIT	
-	H2S	
+	URE	
-	TDA	
+	IND	
+	VP	
-	GEL	
+	GLU	
+	MAN	
+	INO	
+	SOR	
+	RHA	
+	SAC	
+	MEL	
+	AMY	
+	ARA	

٣-اختبار كفاءة عزلات KL.oxytoca في تثبيت النتروجين:

تباينت العزلات في كفاءتها في تثبيت النتروجين (جدول ٦) وتراوح عدد العزلات المثبتة للنتروجين بين ١.٠ و١.٣ ملغم N / ١٠٠

مليليتر لثلاث عزلات وبنسبة ٨.٣ % وشملت كل من العزلات KL.oxytoca رقم J1 و J3 و J15 بينما كان عدد العزلات المثبتة للنتروجين بمعدل ٠.٧ و ١.٠ ملغم N / ١٠٠ مليليتر ٨ عزلات وبنسبة ٢٢.٢ % وكانت أعلى نسبة للعزلات المثبتة للنتروجين بمعدل ٠.٧ – ٠.٤ حيث بلغت ١٥ عزلة وبنسبة ٤١.٧ بينما بلغ عدد العزلات المثبتة للنتروجين اقل من ٠.٤ ملغم N /١٠٠ مليليتر ١٠ عزلات بنسبة ٢٧.٨ %. أظهرت نتائج الاختبارات التي أجريت على جميع عزلات KL.oxytoca والمبينة في (جدول ٦) تباين هذه العزلات في كفاءتها في تثبيت النتروجين إذ بلغت أعلى كمية نتروجين مثبت (١.٣) ملغم/ ١٠٠مليليتر العائد إلى العزلة رقم J3 في حين بلغت اقل كمية نيتروجين مثبت من قبل العزلة رقم (٢١) وهي ٠.١٢ ملغم/ ١٠٠مليليتر أن هذا الاختلاف قد يعود إلى الحالة الفسلجية للعزلة البكتيرية (٦) كما ذكر (٢٠) أن الاختلاف في تثبيت النيتروجين في الوسط الغذائي المستخدم عائد إلى أسباب قد تكون وراثية أو فسلجية في حين بين (٢١) أن عملية اختزال النتروجين هي عملية فسلجية معقدة يكون فيها لأنزيم النتروجينيز دور كبير ويتطلب عمل الأنزيم مصدر للطاقة من نوع ATP إذ وجد انه يحتاج إلى تحلل أربع جزيئات ATP لنقل زوج من الإلكترونات إلى النتروجين لذلك فان حوالي اثنتي عشرة جزيئه من ATP تكون ضرورية لاختزال جزيئه واحدة من النتروجين إلى جريئتين من الامونيا . ويحتاج الأنزيم لعوامل مساعدة مثل الحديد والموليبديوم التي تزيد من كفاءة البكتريا في تثبيت النتروجين في حالة وجودها (٧) . وقد تم اختيار العزلة رقم J3 كأفضل عزلة مثبتة للنتروجين والتي بلغت ١.٣ ملغم /١٠٠ ملم ورمز لها في الدراسة ب KL.oxytoca J3 جدول (٦).

جدول (٦) يوضح نتائج اختبار كفاءة العزلات في تثبيت النتروجين

العزلة	عدد العزلات	النسبة المئوية	كمية النتروجين المثبتة ملغم / ١٠٠ مليلتر
KL.oxytoca J1, KL.oxytoca J3, KL.oxytoca S15	٣	%٨.٣	١.٣ -1
KL.oxytoca J5, KL.oxytoca J 10, KL.oxytoca J 11, KL.oxytoca J 14, KL.oxytoca S 23, KL.oxytoca S 24, KL.oxytoca K 26, KL.oxytoca K 27	٨	%٢٢.٢	١ - ٠.٧
KL.oxytoca J 2, KL.oxytoca J 7, KL.oxytoca J8, KL.oxytoca J 12, KL.oxytoca J13, KL.oxytoca S 22, KL.oxytoca S25, KL.oxytoca K28, KL.oxytoca K29 KL.oxytoca K31, KL.oxytoca H32, KL.oxytoca H33 KL.oxytoca H34, KL.oxytoca T35, KL.oxytoca T36	١٥	٤١.٧	– ٠.٤ ٠.٧
KL.oxytoca J4, KL.oxytoca J6 KL.oxytoca J9 , KL.oxytoca S16, KL.oxytoca S17, KL.oxytoca S18, KL.oxytoca S19, KL.oxytoca S20, KL.oxytoca S21, KL.oxytoca K30	١٠	٢٧.٨	اقل من ٠.٤

٤ – قدرة العزلة KL.oxytoca على النمو في تراكيز مختلفة من سمادي اليوريا و NP

أظهرت نتائج التجربة زيادة معدل قطر المستعمرة النامية على الوسط ألزرعي الصلب بعد مرور ٢٤و٤٨ و٧٢ و٩٦ و١٢٠ و١٤٤ ساعة عند إضافة ربع التركيز والبالغ ٨٣ و ٣.٢ جزء بالمليون لسمادي NP واليوريا على التوالي للوسط ألزرعي إذ بلغ قطر المستعمرة ٢، ٢.٥، ٣، ٣.٢، ٣.٤، ٣.٤ مليمتر (جدول ٧) مقارنة مع عزلة السيطرة الخالية من السماد .وانخفضت معدلات أقطار مستعمرات العزلة عند استخدام نصف التركيز إذ قاربت أقطارها من أقطار معاملة السيطرة في حين قلت أقطار نمو هذه العزلة مع التركيز الكامل في الوسط ألزرعي وأعطت أقطار نمو اقل من معاملة السيطرة . من جانب آخر فقد أظهرت نتائج النمو في الوسط السائل من حيث الكثافة العددية عند مستويات الاسمدة المختلفة المضافة إلى الوسط ألزرعي السائل كانت النتائج مشابهة لنتائج معاملات أقطار المستعمرات إذ بلغت أعلى كثافة عددية لها عند استخدام ربع التوصية مع العزلة البكتيرية وكانت ٦.٩٨ و ٧.٩٣ و ٨.٧٤ و ٨.٩٨ و ٩.٢٣ و ٩.٢١ لوغاريتم/ مل على التوالي تلتها المعاملة التي استخدم فيها نصف التركيز بينما بلغت اقل كثافة عددية للمعاملة التي استخدمت فيها التركيز الكاملة (جدول ٨) .

واظهر التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي $(P < 0.05)$ في قطر المستعمرات خلال المدد الزمنية وقد تفوقت المعاملة التي أضيف لها ربع تركيز السماد المستعمل (جدول٧).

من جانب آخر فقد بين التحليل الإحصائي أيضا وجود فرق معنوي $(P < 0.05)$ في الكثافة العددية للمعاملة التي أضيف لها ربع التركيز المستعمل في حين لم يظهر أي فرق معنوي للمعاملة التي أضيف أليها التركيز الكامل من السماد (جدول ٨).

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2010 ,(4), (2) :01-12

واظهر التحليل الإحصائي تأثير تراكيز السماد على قطر المستعمرات حيث اظهر أن أفضل قطر لنمو العزلات كان مع ربع التركيز تلاها في ذلك نصف التركيز أما المعاملة التي أضيف لها التركيز الكامل فقد انخفض قطر المستعمرات فيها بشكل كبير وكما مبين في(شكل٢) .وتبين أن الزيادة في أقطار المستعمرات تزداد لحد ١٢٠ يوم

ويبن شكل (٣) أن ٥٩.٧ % من معدل التغير في قطر المستعمرات يعود إلى معدل انقسام الخلايا وزيادة كثافتها العددية تحت تركيز مختلفة من السمادين .

من خلال ما تقدم نجد أن أفضل نمو كان للعزلة البكتيرية J3 KL.oxytoca سواء كان من حيث قطر المستعمرة أو الكثافة العددية للخلايا مع ربع التركيز في الوسط ألزرعي الصلب والسائل في حين أدى استخدام التركيز الكامل إلى تقليل نمو هذه العزلة من حيث قطر المستعمرة النامية في الوسط الصب أو الكثافة العددية في الوسط السائل مقارنة مع معاملة السيطرة التي أعطت معدلات نمو عالية (جدول ٧و8) ونستنتج من هذا انه كلما زاد مستوى تركيز السماد فان ذلك يكون مؤثرا في نمو البكتريا إذ أن الكميات القليلة من السماد مع العزلة البكتيرية المستخدمة يعطي نتائج أفضل أي كلما قلت كمية السماد زادت فعالية العزلة ويزيد من كفاءة وفعالية هذه العزلة (شكل٢). وقد يكون التركيز المرتفع من الأسمدة تأثير مثبط لنمو العزلات إذ وجد (٢٢) أن زيادة تركيز الفسفور والى حد معين يزيد من نمو وبقاء مختلف أنواع البكتريا كما أن إضافة الأسمدة الكيماوية والتي هي عبارة عن أملاح سوف تؤدي إلى تغير محتوى الوسط من العناصر الغذائية إذ أن المستويات العالية من هذه الأملاح تؤثر في مسار النمو الطبيعي للبكتريا والذي بدوره يؤدي إلى أحداث خلل فسلجي يؤثر سلبا في بناء ونمو الخلايا البكتيرية .كما أن لهذه الأملاح تأثير كبير في فعالية الكثير من الأنزيمات المهمة في تنشيط الفعاليات الحيوية وبالتالي تؤدي إلى إعاقة تمثيل النواتج الايضية مما يؤثر سلبا في نمو هذه العزلات البكتيرية (٢٣).

وعلية فان هذه النتائج تعكس وبشكل واضح اختلاف العزلة في فسلجتها وفي قدرتها على النمو والتطبع للظروف المختلفة من حيث الأسمدة المضافة إذ لاحظنا وبشكل واضح أن هذه العزلة تأثرت بشكل سلبي عند إضافة مستويات عالية من الأسمدة من خلال انخفاض أعداد خلاياها وأقطار مستعمراتها .

جدول (٧) تأثير مستويات سمادي NP واليوريا في أقطار مستعمرات بكتريا KL.oxytoca مقدره بالمليمتر خلال فترات زمنية مختلفة

المعاملات	مدد التحضين (ساعة) ٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	٧٢ ساعة	٩٦ ساعة	١٢٠ ساعة	١٤٤ ساعة	المعدل	LSD= P<0.05
C	١.٤	١.٦	١.٩	٢.٣	٢.٨	٢.٨	2.133	٠.١٤٢
A1	٢	٢.٥	٣	٣.٢	٣.٤	٣.٤	٢.٩١٧	
A2	١.٥	١.٧	١.٩	٢.٥	٣	٣	٢.٢٦٧	
A3	٠.٣	٠.٨	٠.٩	١.١	١.٣	١.٣	٠.٩٣٩	
المعدل	١.٣	١.٦٥٠	١.٩٢٥	٢.٢٥٨	٢.٦٢٥	٢.٦٢٥		
LSD= P<0.05	٠.١٧٤							٠.٣٤٩٤

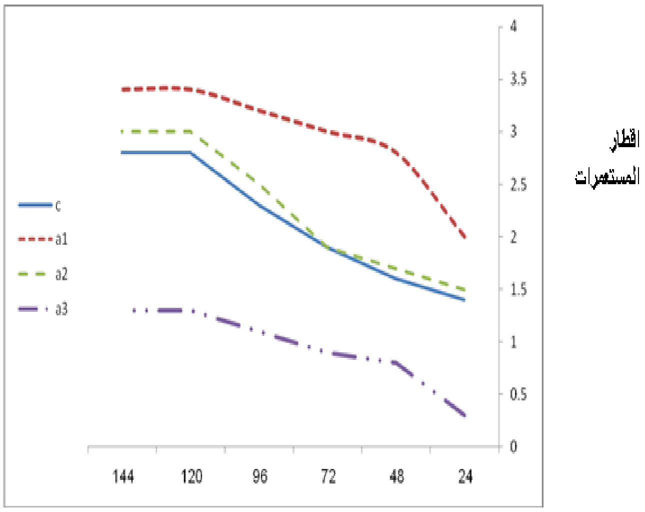
C = معاملة السيطرة العزلة لوحدها بدون إضافة أسمدة A1= خليط العزلة مع ربع التوصية السمادية

A2 = خليط العزلة مع نصف التوصية السمادية A3 = خليط العزلة مع التوصية السمادية كاملة

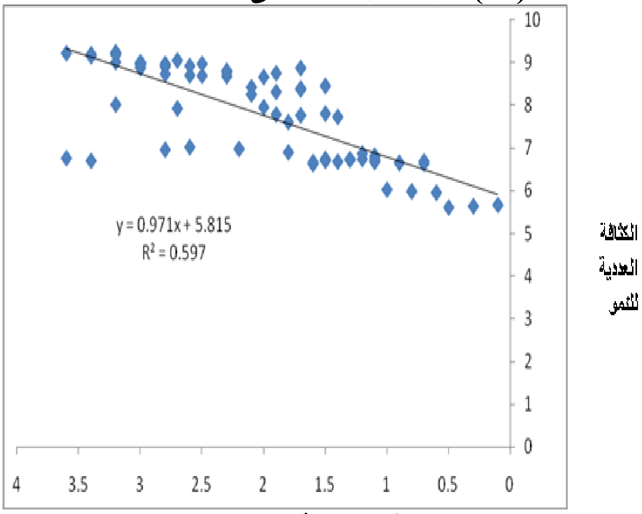
جدول (٨) تأثير مستويات سمادي NP واليوريا في الكثافة العددية لبكتريا KL.oxytoca خلال فترات زمنية مختلفة من الحضن في الوسط الزرعي السائل

المعاملات	الكثافة العددية (لو.وحدة تكوين المستعمرة / مل) ٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	٧٢ ساعة	٩٦ ساعة	١٢٠ ساعة	١٤٤ ساعة	المعدل	LSD= P<0.05
C	٦.٦٦	٧.٦٧	٨.٣٢	٨.٦٩	٨.٩١	٨.٨٨	٧.٩٢٦	٠.٣٠٦
A1	٦.٩٨	٧.٩٣	٨.٧٤	٨.٩٨	٩.٢٣	٩.٢٠	٨.٣٧٢	
A2	٦.٧٣	٧.٧٩	٨.٤٣	٨.٨٢	٩.٠٢	٨.٩٩	٨.٥٥٩	

A3	٥.٦٣	٥.٩٨	٦.٦٥	٦.٧١	٦.٧٨	٦.٧٣	٦.٤١٤
المعدل	٦.٧٥٧	٧.٥٠٢	٨.٠٥٨	٨.٣٧٥	٨.٤٧٦	٧.٧٣٩	
LSD= P<0.05	٠.٣٧٥						٠.٧٥



شكل(٢) تأثير تركيز NP على قطر نمو العزلات



شكل (٣) العلاقة بين الكثافة الميكروبية للخلايا وقطر النمو

١ – الكثافة العددية ومعدل وثابت النمو النسبي:

يظهر من جدول (٩) تباين معدل الكثافة العددية لخلايا عزلة KL.oxytoca J3 في التربة خلال مدد التحضين المختلفة باختلاف المعاملات المستعملة إذ بلغ معدل عدد الخلايا ٩.٢٣ لوغاريتم / غرام للمعاملة التي أضيف لها ربع التركيز والبالغ ٨٣ و ٣.٢ جزء بالمليون لسمادي NP واليوريا على التوالي بعد مرور ١٢٠ ساعة من التحضين. في حين سجلت المعاملة التي أضيف لها نصف التركيز معدل عدد خلايا بلغ ٩.٠٢ لوغاريتم / غرام تربة . ومن جانب أخر فقد كانت المعاملة التي أضيف إليها التركيز الكامل من السماد الأقل قابلية للبقاء في التربة بعد مرور ١٢٠ ساعة من التحضين مقارنة مع معاملة السيطرة وهكذا الحال بالنسبة لجميع مدد التحضين(شكل٤).

من جانب أخر فقد تباين معدل النمو النسبي للمعاملات المختلفة للعزلة البكتيرية خلال مدد التحضين المختلفة إذ تراوح بين ٠.٦٨ لمعاملة السيطرة بعد ٢٤ ساعة من التحضين إلى– ٠.٣٧ للمعاملة التي أضيف لها التركيز الكامل من السماد خلال نفس المدة الزمنية (جدول ٩).

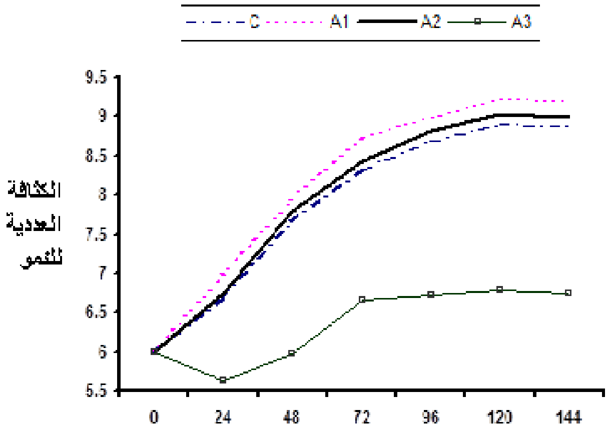
أظهرت النتائج زيادة معدل النمو النسبي للمعاملة التي أضيف لها ربع التركيز من السماد المستعمل مقارنة مع باقي المعاملات وهذا يتوافق مع ما سجل من كثافة عددية (جدول ٩) في حين شهد معدل النمو النسبي للمعاملة التي أضيف إليها التركيز الكامل من السماد انخفاضا واضحا إذ لم يتجاوز في أحواله ٠.٦٧ بعد مرور ٧٢ ساعة على تحضين تلك المعاملة واستمر هذا الانخفاض ليصل بعد ١٤٤ ساعة إلى – ٠.٠٠٥ .

إما ثابت معدل النمو النسبي فقد تراوح بين ٠.١٠ لمعاملة السيطرة بعد ٢٤ ساعة من التحضين إلى ٠.٠٨ للمعاملة التي أضيف إليها التركيز الكامل من السماد خلال نفس المدة الزمنية وقد أظهرت نتائج ثابت معدل النمو النسبي حدوث انخفاض واضح لهذه القيم مع تقدم مدد التحضين إذ بلغ (٠.١١، ٠.٠٦ ، ٠.٠٤ ، ٠.٠٣ ، ٠,٠٢ ، ٠.٠٢) للمعاملة التي أضيف إليها ربع التركيز خلال مدد التحضين (جدول ٩).

Open Access
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2010 ,(4), (2) :01-12

إن معدل الكثافة العددية للبكتريا يرتبط مع نوعية المادة العضوية في التربة مما يؤدي إلى ظهور بعض التغيرات في إعداد البكتريا (٧) كما أشار (٦) إلى إن هناك ارتباطا عاليا بين وجود النتروجين والكاربون وإعداد البكتريا في التربة وان تلقيح التربة بها يعمل على زيادة إعدادها.

إن التغيرات التي حصلت في الكثافة العددية ومعدل وثابت النمو النسبي للبكتريا قد يرتبط ببعض مكونات التربة من المادة العضوية وقدرة هذه العزلة في البقاء .



الزمن (ساعات)

شكل (٤) تأثير تركيز سماد NP على كثافة العزلات

جدول (٩) الكثافة العددية ومعدل وثابت النمو النسبي لخلايا عزلة البكتريا KL.oxytoca J3 في التربة خلال مدد تحضين مختلفة

المعاملات	٢٤ ساعة			٤٨ ساعة			٧٢ ساعة			٩٦ ساعة			١٢٠ ساعة			١٤٤ ساعة		
	Gr	Ks	Log	Gr	Ks	Log	Gr	Ks	Log	Gr	Ks	Log	Gr	Ks	Log	Gr	Ks	Log
C	0.68	٠.١٠	٦.٦٨	٠.٠١-	٠.٠٥	٦.٦٧	١.٦٥	٠.٠٤	٨.٣٢	٠.٣٧	٠.٠٣	٨.٦٩	٠.٢٢	٠.٠٢	٨.٩١	٠.٠٣-	٠.٠٢	٨.٨٨
A1	0.98	٠.١١	٦.٩٨	٠.٩٥	٠.٠٦	٧.٩٣	٠.٨١	٠.٠٤	٨.٧٤	٠.٢٤	٠.٠٣	٨.٩٨	٠.٢٥	٠.٠٢	٩.٢٣	٠.٠٣-	٠.٠٢	٩.٢٠
A2	0.72	٠.١٠	٦.٧٣	١.٠٦	٠.٠٦	٧.٧٩	٠.٦٥	٠.٠٤	٨.٤٣	٠.٣٩	٠.٠٣	٨.٨٢	٠.٢٠	٠.٠٢	٩.٠٢	٠.٠٣-	٠.٠٢	٨.٩٩
A3	٠.٣٧-	٠.٠٨	٥.٦٣	٠.٣٥	٠.٠٤	٥.٩٨	٠.٦٧	٠.٠٣	٦.٦٥	٠.٠٦	٠.٠٢	٦.٧١	٠.٠٧	٠.٠٢	٦.٧٨	٠.٠٥-	٠.٠٢	٦.٧٣

التجربة البايولوجية

١- صفات النبات

يتبين من الجدول (١٠) أن أعلى كمية نتروجين تحققت مع خليط العزلة وربع التوصية السمادية إذ بلغ ١.٠٠ ملغم نتروجين / نبات ، في حين حققت المعاملة الملقحة بعزلة KL.oxytoca J3 بدون أسمدة أعلى محتوى من النتروجين مقارنة بمعاملة السيطرة ومن المعاملة المضاف لها ربع التوصية السمادية إذ بلغت كمية النتروجين فيها ٤.٤٣ ملغم نتروجين/ نبات ، وكانت معاملة السيطرة التي لم يتم استخدام العزلة أو الأسمدة فيها اقل في محتواها من النتروجين المأخوذ في النبات إذ بلغ ١.٢ ملغم نتروجين / نبات . كما أعطت النباتات أفضل معدل لها في طول النبات والجذور عند معاملة النبات مع خليط العزلة وربع التوصية السمادية إذ بلغ ٢٠ سم للجذور و ٧٤ سم للجزء الخضري للنبات بينما كان اقل معدل لها مع معاملة ربع التوصية السمادية إذ بلغ ١١ سم للجذور و ٤٨ سم للجزء الخضري . كذلك أظهرت النتائج اختلاف في قيم الأوزان الجافة ومحتوى النبات من الكلوروفيل للأجزاء الخضرية لنبات اللوبيا باختلاف المعاملات المستخدمة في الدراسة (جدول ١٠) فقد أدى استخدام لقاح العزلة لوحدها إلى حصول زيادة في معدل نمو النبات ومحتواه من الكلوروفيل مقارنة مع المعاملة المضاف لها ربع التوصية السمادية فقط ومعاملة السيطرة بينما كان التفوق في الصفات المدروسة للنبات من حيث محتوى النبات من النتروجين والوزن الجاف وطول النبات ومحتواه من الكلوروفيل للمعاملات التي استخدم فيها خليط العزلة مع ربع التوصية السمادية والمعاملة التي استخدم فيها التوصية السمادية الكاملة فقط . ومن خلال هذه النتائج نلاحظ أن ذلك يعكس كفاءة البكتريا المضافة كلقاح لوحده أو كخليط مع الأسمدة المعدنية المستخدمة مقارنة مع معاملة السيطرة أو الأسمدة المعدنية المستخدمة لوحدها وان ذلك قد ساهم في زيادة ونمو النبات سوى للعزلة البكتيرية لوحدها أو مع الأسمدة

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2010 ,(4), (2) :01-12
(JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة
Open Access

أو للأسمدة بجميع المستويات المستخدمة . وان البكتريا المستعملة قد يكون لها دور محفز من خلال إفرازها لبعض المركبات التي لها دور في زيادة امتصاص النبات للنتروجين المثبت من قبل البكتريا نفسها كما أن التلقيح البكتيري يزيد من النتروجين مما ينعكس إيجابيا على نمو النبات (٢٤) إذ أن أعظم فائدة من استخدام اللقاح البكتيري يمكن أن تحصل مع استعمال لقاح مختلط مع توفر ظروف نجاح نشاط اللقاح في البيئية كاستعمال المواد التي تضمن استمرار نشاطه مع إضافة اللقاحات بكثافة عالية لضمان الاستيطان الميكروبي (٢٥).

جدول (١٠) بعض صفات النبات المقدرة بعد ٤٥ يوم من النمو باستخدام الأسمدة والعزلة وبدونها

المعاملات	الوزن الجاف(ملغم)		طول النبات (سم)		محتوى النبات من النتروجين (ملغم / نبات)	الكلوروفيل		
	جذر	خضري	جذر	خضري		A	B	Total
C	6.5	٨٥	٩	٣٦	١.٢	٠.٤٨	٠.٢١	٠.٦٩
A1	٩.٢	١٤٥	١٥	٥٣	٤.٤٣	٠.٩٢	٠.٤٦	١.٣٨
A2	١٦.٢	١٧٨	٢٠	٧٤	١٠.٠	١.٨١	١.١٢	٢.٩٣
A3	٧.٢	٩٦	١١	٤٨	٣.٩	٠.٧٢	٠.٢٨	١.٠
A4	٩.٤	١٥٢	١٧	٦١	٥.٦٨	٠.٨٤	٠.٣٤	١.١٨
A5	١٦.٠	١٧٦	١٩	٧٦	١٠.٢	١.٤٢	١.١٤	٢.٥٦
LSD= p<0.o5	1.53	٨.٣٢	٣.٥٥	٥.٢٨٧	٠.٢١٦٦	٠.٥٦	٠.٢٨	٠.١٢٥

C = معاملة السيطرة النبات لوحده بدون إضافة العزلة أو الأسمدة
A1 = خليط النبات مع العزلة فقط بدون أسمدة
A2 = خليط العزلة مع ربع التوصية السمادية مضاف إلى النبات
A3 = ربع التوصية السمادية مضافة إلى النبات
A4 = نصف التوصية السمادية مضافة إلى النبات
A5 = التوصية السمادية الكاملة مضافة إلى النبات

صفات التربة المقدرة

أدى استعمال العزلة J3 KL.oxytoca لوحدها إضافة إلى خلطها مع سمادي NP واليوريا ومع استعمال هذين السمادين لوحدها إلى تحسين صفات التربة المقدرة بعد ٤٥ يوم من إضافة المعاملات إلى التربة والى تحسين محتوى التربة من النتروجين الكلي والذي بلغ ١٢٠.٦٣ ملغم نتروجين / كغم في المعاملة التي استخدم فيها خليط العزلة البكتيرية مع ربع التوصية السمادية في حين كانت المعاملة التي أضيفت لها التوصية السمادية الكاملة مقاربة أو مشابه لها في النتائج . في حين بلغت كمية النتروجين الكلية في التربة الملقحة بالعزلة البكتيرية لوحدها ١٠٨.٢٢ ملغم نتروجين / كغم تربة وانخفض محتوى النتروجين في المعاملة التي استخدمت كسيطرة بدون إضافة أسمدة أو العزلة إذ بلغ ٧٦.٣٤ ملغم نتروجين / كغم تربة كذلك وجد تغير طفيف في معدل الرقم الهيدروجيني والايصالية الكهربائية بفعل استعمال المعاملات المختلفة من العزلة وسمادي NP واليوريا (جدول ١١).

من جانب آخر وجد أن المحتوى الميكروبي الكلي قد ازداد في المعاملات التي استخدم خليط العزلة مع ربع التوصية السمادية والمعاملات التي استخدم فيها ربع ونصف التوصية السمادية في حين انخفظ في المعاملة التي استخدم فيها التوصية السمادية الكاملة . وقد وجد أيضا أن محتوى التربة من البكتريا المثبتة للنتروجين J3 KL.oxytoca قد زاد في المعاملات التي استعمل فيها العزلة لوحدها أو مع ربع التوصية السمادية إذ بلغ ٧.٨٩ و ٨.٠٩ لو.وحدة تكوين المستعمرة / غم تربة والذي أدى بدوره إلى زيادة كمية النتروجين المثبتة في التربة كما لوحظ في النتائج (جدول ١١). تؤكد هذه النتائج أن التلقيح البكتيري يزيد من النتروجين مما ينعكس إيجابيا على نمو النبات (٢٦) كما أكد (٦) أن لسلالات الكلبسيلا القدرة على تثبيت النتروجين الجوي لا تكافليا وخاصة النوع KL.pneumoniea حيث له قدرة

تثبيت ٦٠ ملغم/ مل من النتروجين . وقد اعتبرت الكلبسيلا أهم أجناس البكتريا اللاهوائية الاختيارية المثبتة للنيتروجين حيث تزيد من محتوى التربة من النتروجين بواسطة هذه البكتريا من خلال تواجدها في التربة وخاصة في منطقة الرايزوسفير حيث تصل أعدادها ١٠ – ٦ – ١٠ –٨ خلية / غم من التربة وبدورها تزيد من كمية النتروجين المثبتة بواسطة هذه البكتريا (١٢).

جدول (١١) بعض صفات التربة المقدرة بعد ٤٥ يوم من زراعة النبات وباستخدام السماد والعزلة وبدونهما

المعاملات	النتروجين الكلي ملغم / كغم تربة	E.C ديسيمينز / م٢	PH	KL.oxytoc Log.cfu/g	العدد الكلي Log .cfu/ g
C	76.34	٣.٣٢	٧.٦٢	---------	٥.٦٧
A1	١٠٨.٢٢	٣.٣٣	٧.٦٤	٥.٣١	٧.٨٩
A2	١٢٠.٦٣	٣.٣٥	٧.٦٥	٥.٨٢	٨.٠٩
A3	٩٢	٣.٣٤	٧.٦٦	--------	٦.٣٨
A4	٩٨	٣.٣٥	٧.٦٩	--------	٦.٧٩
A5	١١٨	٣.٣٨	٧.٧٢	-------	٤.٣٧

المصادر

1- Green wood,D.; Slack : R.C.B.; and peutherer ,J.F.(1997)Medical microbiology: Aguide to microbiol. Infection : Pathogensis immunity, Laboratory Diagonsis and control .15th ed .

2- Liu-J.; Liu,c.; and lin, c.(1997). The role of Nitrogenase in acyanid -degrading klebsilla oxytoca strin. proce.Nation scien. Councl., 21(2) : 37-42 .

٣- Holt ,J.G.; Krieg ,N.R.; Sneath ,P.H.A.;Staley, J.T.; and Williams ,S.T. (1994). Bergey's manual of Determinative Bacteriology.

4- Cruickshank,R.;Duguid,J.P.; Marmiom, B.P.; and swain, R.H.A. (1975) . Medical Microbiology: The practice of medical microbiology. 12th .ed., vol 2 churchill Living ston, Edinburgh, London and Newyork.

5-Bracker, G.; Fesefeldt, A.; and Witzel, K. (1998). Development of PCR primer system for amplification of Nitrata Reductase Genes (nirk and nirs) to detect Denitrifying Bacteria in Environmental samples, App.and Envir . Microbiol., 64 (10): 3769- 3775 .

6- Mark Doolittle ,Ashok Raina, Alan Lax and Baj Boopathy (2008). Presence of nifrogen fixing klebsiella pneumoniae in the gut of the for mosan subterranean termite (coptotermes formosanus) Bioresource Technology 99: 3297- 3300.

7- Ronkko, R.; Smolander, A.; Nurmiaho- Lassila ,EL.; and Heahtla ,k. (1993). Frankia in the rhizosphere of nonhost plant : Acomparsion with root–associated N2– Fixing Enterobcter, klebsiella and pseudomonas . plant and soil ., 153: 85 – 95.

8 – Y. Ding, J. Wang ,Liu and S. Chen .(2005). Isolation and identifcation of nitrogen fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region . Joumal of Applied Microbiology, (1271- 1281) .

9- Podschun, R.; Ullman ,U (2009) . Klebsiella spp as Nosocomial pathogens : Taxonomy , Typing methods, and clinical microbiology Reviews 11(4):589-603.

10- Tate, R.L.(1995). Soil microbiology : Johnwily and sons . Inc . Newyork .

11- F.C. Cannon & J.R. Postgate.(2010) Expression of klebsiella nitrogen fixation gens (nif) in Azotobacter .Journal Home current lssue Aop Archive (260- 272).

12 – Artur k. Zlothikov, Yelena N. Shapovalova and Alexei A. Makarov (2001). Association of Bacillus furmus E3 and klebsiella terrigena E6 with increased ability for nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry: 33(1525- 1530).

13- Baron ,E.F.; and Fingold, S.M.(1990).Baily and scott diagnostic microbiology C.V. mosby company,st . ious .Batihore , philadelphia tornoto.

14- Maynes, R.J.A. (1980). Companism of two modifical kgeldale olcyestion techniqa for mutti-

Azotobacter chroococcm ,cultivation for use in biofertilizers .Biotechnol .Lett . London ,UK :chopmam & Hall V.17 (4) : 453 – 458

22–Subba- Rao, N.S. (1982). Phosphate solubilizing by soli microorganisms in advancing agricultural microbiology. Ed. Butter worth. Scientific .London Bston . Singapore. Toronto : 205 – 303 .

23– Cordvilla , MP.Ligero , F.Liuch ,C.(1995). The effect of salinity on N-fixation & assimilation in viciafaba. J. Exp. Bot Oxford .45(279): 1483-1488.

٢٤– العيثاوي، احمد محمد تركي (٢٠٠٧). دراسة دور البلازميدات في تثبيت النتروجين في بكتريا KL.Pneumoniae وتحديد كفاءتها في التثبيت بايولوجيا. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، العدد الاول، المجلد الاول: ١٥-٢٣.

٢٥– العسافي، ادهام علي ، احمد محمد العيثاوي وظافر فخري الراوي (٢٠٠٨). استخدام العزلة Azotobacter vinelandii المحورة وراثيا مع تحضير سماد عضوي حيوي من مواد محلية واختباره حيويا. مجلة الانبار للعلوم الزراعية، مجلد: ٦ العدد (٢): ٢٧٥-٢٧٨.

26–Tomar, R. Raghu, J. Yadaf, L & Ghuraya ,R.S.(1992) . Effect of phosphorus ,Rhizobioum inoculation & Zinc on the Yeild of soybean (Glycine max .L) int .J. Trop Agricult .9 (3): 211-214.

.

element Gmmunceotion in soil science & plant Analsis II : 459 – 467 .

15- Louw, H.A & Webley, D.M.(1985). Plate method for estimatig the numbers of phosphate dissolving and acid productivity bacteria in soil natur Lond .182:1317-1318

16– Le-van ,N;A. Lewan, Gt; Nideman, T.S; Trueb, W; Boeisterterli, JJ. And sanglier, JJ. (1992). Anoval class of axs intibtors cuonin A and B form strepto. Spp. Cited by sanglier jj . Haag, H., Huck , T. A and Fehr,T. (1992). Res . Microbial.

17 –Venkateswarlu, B.V. Rao & P. Raina. (1984). Evalution of phosphorus solubilization by microorgansim islated form aridisolis.J. Indian .Soc .Soil Sci . : 273- 277.

18 – Vora ,M.S. & Shelat , H.N .(1999) . Impact of addition of different carbon & nitrogen sources on solubilizing of rock phosphate by phosphate solubilizing of microorganisms , Indian J .Of Agri .Sciences V. 68 (6) : 292 – 294 .

19 – Haller, T.& Stople, R.H.(1985). Quantitative estimation of root exudation of maize plant & soil., 86: 207- 216 .

٢٠– الظفيري، محمد ابراهيم (١٩٩٩). تاثير مستوى الكاربون في المواد العضوية المضافة والتلقيح بـ Azotobacter Vinelandii في تغير التربة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

21– Santck, B.& Maric , V.(1995) .Temperatur & dissolved oxygen concentrions as parameters of

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2010 ,(4), (2) :01-12

ISOLATION OF IDENTIFICATION OF KLIBSILLA XYTOCA FROM RAMADI SOIL AND DETERMINE ITS ABILITY TO NITROGEN FERTILIZER ECOMMENDED FOR COWPEA PLANT

AHMED M.TURKY

ABSTRACT :

The present study sheds light on knowing the spread of klibsilla oxytoca Bacteria in (100) soil sample taken from the regions of AL-Jazeera, AL-Taameem, AL-Khaldiya, AL-Sufiya and AL-Habbaniya .The ratio of the existence of these Bacteria ranges between 12-88%. The results indicate that all samples contain klibsilla oxytoca Bacteria ;and (36) isolate has been obtained from these Bacteria . The study also includes the evaluation of the effeiency of isolates in foxing Nitrogen .It is appeared that the highest quantity of foxing Nitrogen reaches at (1.3) mlg Nitrogen / 100 ml . by local isolation klibsilla oxytoca J3 .When studying the effect of different concentrations of NP and Urea fertilizers on the growth of isolate in the solid and liquid cultures from the vrem point of colonies diameters and numerical density, the result show the ability of this isolate on the growth at the addition of a quarterly concentration (83 and3.2) per million to NP fertilizer and Urea fertilizer respectively . the diameter. Colonies that grow in the solid culture is (2,2,5,3,2,3,4,4,and3) ml ,respect rely ,during the periods g incubation (144,120,96,72,48,and 24) hour. While the nureoced density reaches at (9.21,9.23,8.98,8.74,7.93,6.98)Log/ml .The results eg .Biology experiment proved the efficiency of this isolate in foxing Nitrogen . Appeared in all the features g plant , (plant weight ,plant length , plant content of nitrogen and chlorophyll) ,that are studded in the treatment in which isolate mixture is used with quarter of concentration (3.2, 83) per million to NP fertilizer and Urea fertilizer respectively . The results state that the mixture of isolate with a quarter of recommendation is able to foxing Nitrogen at a rate of 4.43 mlg Nitrogen / plant . while the soil content of total Nitrogen is 120.63 mlg/kg and the 8.09 microbial density Log/g soil . It is found that the best rote to these plant ,in this treatment reaches (20 , 74)in the plant bight and rote con respectively and the dry weight reaches at (178 ,16.2) mg /plant.