



جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة تأثير الانتقال الافقي لجينات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* المثبتة للنيتروجين الجوي بتقنية
(SOEing) PCR gene

فوز عبد السلام خليل الصفار

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / نبات

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة

نجوى ابراهيم البرهاوي

الأستاذ الدكتور

عبد الرزاق خضر محمود

2016م

1437هـ

الخلاصة

أظهرت نتائج نمو 21 عَزلة من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* المرضية تباينا

واضحاً في مقدرتها على النمو في الوسط الخالي من النيتروجين Nitrogen-free broth فضلاً عن الاختلاف في قابليتها على تثبيت النيتروجين.

وبينت نتائج التشخيص الجزيئي التي أُخضعت لها العزلات باعتماد تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باعتبارها الأكثر حساسية ودقة للكشف عن الجينات المشفرة لانزيم النيتروجيناز وباستخدام البادئات المتخصصة المتداخلة (P1، P2، P5، P6) عن ظهور حزمتين للجينات الثلاث *nifH*، *nifD*، *nifK*. وبناءً على نتائج القواعد النيتروجينية بعملية التتابع وبعد إدخال التتابعات الخاصة بالجينات الثلاثة ضمن قاعدة بيانات بنك الجينات تم رسم شجرة التقارب الوراثي بإجراء محاذاة لتتابع القواعد النيتروجينية للجينات المشفرة لانزيم النيتروجيناز مع السلالة القياسية *Klebsiella pneumoniae* 342 والسلالة القياسية العائدة لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* SMA0825 من بنك الجينات وكانت نسبة الثبات الاحصائي 100%، عند اضافة معدن الحديد بالتركيز 0.5 مليمول حقق أعلى فعالية لأنزيم النيتروجيناز بعد ثلاثة ايام من التحضين، بينما وجد ان لإضافة معدن الموليبدنم بالتركيز 0.5 مليمول مساهمة فعالة ضمن السياق نفسه إذ اعطى اعلى فعالية لانزيم النيتروجيناز بعد خمسة ايام من التحضين.

تُقي السكر المتعدد الدهني بصورة جزيئية لثلاث عزلات وأسفرت عملية تشخيصه بوساطة طيف الرنين النووي المغناطيسي عن وجود حزم مختلفة تعود لمجاميع الـ CH_2 و CH و CH_3 و O و N ولسوء الحظ ابرزت النتائج صعوبة في التفسير بالرغم من المحاولات العديدة لتحديد نوع السكر.

كما نجحت محاولة حذف أحد الجينات المشفرة لانزيم النيتروجيناز الـ *nifD* وجزء من الجينين *nifH* والـ *nifK* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل التطفييري واستبداله بالجين المعلم بالمضاد الحيوي Kanamycin (Antibiotic casstte). وأشارت نتائج التعبير الجيني لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* البرية الى قدرتها على النمو بالوسط الخالي من

النيتروجين في حين اخفقت العزلة المطفرة في ذلك. وكشفت النتائج عن تمكن كلا العزلتين المطفرة والبرية في النمو على وسط المرق المغذي Luria- Bertani. وأبدت عزلة البكتريا قابلية واضحة على انتاج السكر المتعدد الدهني الخارجي (الغشاء الحيوي biofilm) عند تنميتها على الوسط الخالي من النيتروجين على العكس من العزلة المطفرة. وانخفض التعبير الجيني لصفتي تكوين الالهلاب والغشاء الحيوي عند الكشف عنه باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي.

Summary

The result of growth 21 pathogenic isolates *Klebsiella pneumoniae* showed that there is a variation in their growth in Nitrogen-Free broth that involved differences in their ability in Nitrogen Fixation. And the result of molecular diagnosis for all isolates according to PCR technique which is considered a more and accurate in diagnosing the gene in nitrogenase enzyme and by specific primer (P1, P2, P5,P6), is that there are two bands of three genes *nifH*, *nifD*, *nifK*. According to sequences of nitrogen bases by sequences and then after adding aspecial sequencing of three genes in analysis base of genetic bank, similarity tree was drawn with the sequencing of nitrogen bases of genes for nitrogenase enzyme with standard strain of *K pneumoniae* 342 and standard strain of bacteria *Sinorhizobium meliloti* SMa0825 from genetic bank. The percentage of static analysis was found 100%.

In concentration 0.5 millimol, iron metal prove high activity in nitrogenase enzyme after three days of incubation, whild if we add molbidinm metal in 0.5 millimol concentration of molbidinm metal give also high activity in nitrogenase enzyme after five days of incubation. Purification of lipopolysaccharide molecular analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) showed that there is different bands for groups N, O, CH₃, CH₄, CH and these result make difficult explanation, despite if many attempt to shaw even done the kind of the succharide and of the cancel one of the gene for nitrogenase enzyme *nifD* by the method Splicing overlap

extension PCR (SOEing) and add the gene kanamycin antibiotic cassette.

The results of the gene expression of *K pneumoniae* showed its ability of growth in Nitrogen-Free broth while the mutant isolates failed in nitrogen free broth. The results showed that each isolated mutant and with their ability of growing in Luria Bertani. The *K pneumoniae* isolates showed its ability to produce the exopolysaccharide (biofilm) when it was growing in Nitrogen-free broth in contrast to mutant isolates and the gene expression of forming biofilm and fimbriae was decreased. When it was discovered by Real-Time Quantitative PCR.

**University of Mosul
College of Education Pure
Sciences**



**Effect study of horizontal transfer for
atmospheric nitrogen fixing genes bacteria
Klebsiella pneumoniae by (SOEing) PCR gene
Technique**

Fawz Abdel-Salam AL-Saffar

**Ph.D. Thesis
In
Biology / Botany**

Supervised By

Pro. Dr. Abdul Razak Kidher

Dr. Najwa Ibraheem Al-Barhawi

2016 A.D.

1437 A.H