IRAQI Academic Scientific Journals
Samarra Journal of Pure and Applied Science
SJPAS
مجلة سامراء للعلوم الصرفة والتطبيقية
www.sjpas.com
p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

التشخيص المظهري والجزيئي لبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من التربة الملوثة بالمخلفات العضوية من بعض محافظات العراق

افراح عبد الله جاسم[1]*، وائل محمد مهدي[2]، عمر رحيم خلف العبيدي[3]
1 قسم الكيمياء، كلية التربية، جامعة سامراء
2 قسم التقانات الحيوية كلية العلوم التطبيقية جامعة سامراء
3 قسم علوم الحياة كلية التربية جامعة سامراء العراق
البحث مستل من اطروحة دكتوراه الباحث الاول

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
https://doi.org/10.54153/sjpas.2024.v6i1.638

معلومات البحث:
تأريخ الاستلام: 2023/07/22
تاريخ التعديل : 2023/11/20
تأريخ القبــول: 2023/11/26
تاريخ الـنشر: 2024/03/30
الكلمات المفتاحية:
الزائفة الزنجارية ، تفاعل البلمرة المتسلسل ، تربة، تشخيص مظهري، الاختبارات الكيموحيوية
معلومات المؤلف

الايميل:
afrah.abdullah89@gmail.com
الموبايل:07704079140

الخلاصة:
جمعت 25 عينة من التربة الملوثة بالمخلفات العضوية من ثلاث محافظات عراقية وهي محافظة صلاح الدين ممثلة بقضاء سامراء و بيجي والدجيل ومحافظة بغداد تشمل كل من أبوغريب ومركز بغداد والمحمودية ومحافظة كركوك ممثلة بمركز كركوك والحويجة وداقوق وشخصت العزلات مظهرياً عن طريق شكل المستعمرة ولونها ورائحتها ومجهرياً من خلال تفاعلها مع صبغة كرام بالإضافة الى ذلك بعض الاختبارات الكيموحيوية التي شملت (Catalase، Oxidase، IMVIC test، Biofilms production test، Kligler Iron test)، واستخدم VITEK 2 للتأكيد من تشخيص العزلات واظهرت النتائج الحصول على 9 عزلات تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، علاوة على ذلك اجري اختبار فحص الحساسية تبعاً لطريقة Kirby-Bauer (انتشار اقراص المضادات الحيوية) باستعمال 8 انواع شملت (TCC) Clavulanic، (PI) Piperacillin، (GEN) Gentamycin، (AK) Amikacin، (CAZ) Ceftazidime، (IPM) Imipenem، (MPP) meropenem، (CIP) Ciprofloxacin وقد اظهرت نتائج اختبار الحساسية لعزلات التربة تباين مختلف في مقاومتها وحساسيتها. بينت نتائج التشخيص الجزيئي بأستخدام تقنية PCR لبادئات متخصصة لجين *16SrRNA* وأبرون *phzABCDEFG* ان جميع العزلات البكتيرية تعود للنوع *P.aeruginosa* لأحتوائها على الجين النوعي *16SrRNA* ، بينما اظهرت نتائج اختبار البلمرة المتسلسل لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* لأبرون *phzABCDEFG* عدم امتلاك جميع العزلات المعزولة من التربة على اوبرون *phzABCDEFG* باستثناء العينة (S6)15.

المقدمة:
تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الأنواع الشائعة التي تتواجد في بيئات متعددة ومنها التربة ولها القدرة على استعمال مدى واسع من المواد العضوية كمصادر للغذاء، لذلك فهي تستوطن العديد من البيئات [1]. إذ تتواجد انواع الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* كفلورا طبيعية عند الانسان وفي التربة والماء وعلى السطوح الملامسة لهما وعلى سطوح النباتات والحيوانات [2]، بالإضافة الى وجودها بشكل متكرر في المياه المعدنية المعبأة ومياه الحنفية كما لوحظ وجودها في الخضار الجاهزة للأكل] 3, 4].

تمتاز هذه البكتريا بأن لها احتياجات غذائية بسيطة اذ تستطيع النمو في الماء المقطر وفي المختبر وتستخدم ابسط انواع الأوساط الغذائية للنمو كما تتحمل مدى واسع من الظروف الفيزيائية ومنها درجة الحرارة، كذلك فهي مقاومة للتراكيز العالية من الاملاح والصبغات أضافة الى ذلك فهي تميل للنمو في البيئات الرطبة وهذه الصفات الطبيعية لها شاركت في نجاحها البيئي [5]. عرفت بكتريا الزائفة الزنجارية بكونها واسعة الإنتشار في مختلف انواع الترب، فقد عزلت لأول مرة من التربة من قبل

Ringen و Drake (1952). إذ تتواجد في الترب الزراعية وكذلك في الترب الملوثة Polluted soils والتي تسهم في تفكيك المركبات الكربونية، كما تعمل على تقليل تلوث الترب الحاوية على النفايات الصناعية عن طريق قدرتها في تحطيم المعادن الثقيلة مثل الكادميوم Cd^{2+} والكوبلت Co^{2+} والزنك Zn^{2+} والمبيدات الحشرية insecticides والأحماض الهيدروكاربونية fatty Hydrocarbons[6]. كما يمكن ايضاً ان تنمو في الترب الملوثة بالنفط الخام حيث يستخدم النفط كمصدر كربوني ففي دراسة أجراها [7] أثبتا من خلالها قابلية البكتريا على المعالجة الحيوية Biodegradation للتربة الملوثة بالنفط الخام .

تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الاكثر انتشاراً واستعمالاً في جميع دول العالم والاساس الذي تعتمد عليه معظم الدراسات البحثية وهو من طرق التشخيص السريعة والدقيقة في الكشف عن الاحياء المجهرية اذ توجد العديد من الجينات التشخيصية التي يتم من خلالها الكشف عن بكتريا الزائفة الزنجارية باستخدام بوادئ نوعية منها *16SrRNA* وابرون *phzABCDEFG* [8]. هدفت الدراسة الى عزل بكتريا الزائفة الزنجارية من التربة وتشخيصها والتحري عن امتلاكها على اوبرون *phzABCDEFG*).

المواد وطرائق العمل

جمع العينات: جمعت العينات عشوائياً وبواقع 25 عينة ابتداءً من تاريخ 2022/1/15 ولغاية 2022/6/15 من مواقع مختلفة، موزعة على ثلاثة محافظات هي محافظة صلاح الدين وبغداد وكركوك وقد اخذت العينات من التربة الملوثة بالمواد العضوية وبعمق 10سم بواسطة مجرفة مختبرية معقمة، وجرى حفظ عينات التربة في اكياس بلاستيكية معقمة سجل عليها المعلومات الخاصة بكل عينة ونقلت للمختبر، اجري وزن 100غرام من التربة واذابته في 900 مل من الماء المقطر المعقم وتم اخذ 1مل منه واجراء سلسلة من التخافيف الى التخفيف الخامس الذي تم زراعته على وسط مغذي الصلب ووسط الزائفة الزنجارية الصلب. شخصت العزلات مظهرياً من خلال شكل المستعمرة ولونها ورائحتها وتفاعلها مع صبغة كرام بالإضافة الى ذلك اجريت بعض الاختبارات الكيموحيوية (Catalase، Oxidase، IMVIC test، Biofilms production test ، Kligler Iron test)، ثم شخصت بأستخدام جهاز الفايتك Vitek2 للتأكد من الانواع المعزولة . اخذت 9 عزلات بعد ان تم التأكد من تشخيصها من ثلاث محافظات هي صلاح الدين ممثلة بأقضية سامراء وقضاء بيجي وقضاء الدجيل، محافظة بغداد ممثلة في قضاء أبوغريب ومركز بغداد وقضاء المحمودية، ومحافظة كركوك متمثلة بمركز كركوك وقضاء الحويجة وقضاء داقوق ورقمت العينات كالأتي S1، S2، S3، S4، S5، S6، S7، S8،S9 وعلى التوالي .

الاوساط الزرعية:

الأوساط الزرعية الجاهزة Ready-made media

حضرت جميع الاوساط الزرعية الجاهزة وهي وسط الماكونكي الصلب MacConkey Agar، ووسط مولر هنتون الصلب Muller Hinton Agar، ووسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain Heart Infusion Agar، ومرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth، والوسط المغذي الصلب Nutrient Agar، والمرق المغذي Nutrient Broth، ووسط سيمون ستريت الصلب Simmon-Citrate Agar، ووسط كليكر الحديد الصلب Kliger Iron agar، ومرق ماء الببتون Peptone Water Broth،و مرق المثيل الأحمر والفوكس بروسكاور MR/VP Broth، اعتماداً على تعليمات الشركات المصنعة لها والمسجلة على العبوة، ثم عقمت الاوساط الزرعية بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ºم وتحت ضغط 15 باوند/ انج^2 ولمدة 15 دقيقة، وحضنت بعد صبها بالأطباق أو انابيب الاختبار بحسب متطلبات التجربة وبدرجة 37 ºم ولمدة 24 ساعة قبل الاستعمال للتأكد من خلوها من التلوث [9].

الاوساط الزرعية التركيبية Synthetic media

شملت الاوساط التركيبة وسط الزائفة الزنجارية الصلب، ووسط هايفلور الصلب Hifluoro Pseudomonas agar اذ يستعمل هذا الوسط في عزل ثلاثة سلالات من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* [10]. ووسط اساس الدم الصلب Blood agar base الذي استعمل للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج الانزيم الحال Hemolysin [11].

وسط احمر الكونغو الصلب Congo red agar

حضر هذا الوسط عن طريق خلط 37غم /لتر من مرق نقيع القلب والدماغ مع 50 غم/لتر كلوكوز و10 غم /لتر اكار ومن ثم 0.8 غم/لتر من صبغة الكونغو الحمراء، مسحوق صبغة الكونغو الاحمر حضر كمحلول مائي مركز وعقم بصورة منفصلة عن مكونات الوسط الاخرى وبعدها اضيف المسحوق للوسط المعقم بعد ان ترك ليبرد عند درجة حرارة 45 ºم مزج الخليط جيداً بعد ذلك صب في اطباق بلاستيكية معقمة (بتري)، لقح الوسط بالعزلات البكتيرية وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة

37 مº لمدة (24-48) ساعة، اعتبرت المستعمرات السوداء ذات المظهر البلوري الجاف نتيجة موجبة للعزلات البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي، بينما سجلت المستعمرات الوردية كنتيجة سالبة لإنتاج الأغشية الحيوية اذ يستعمل هذا الوسط في الكشف المظهري على تكوين طبقة الاغشية الحيوية Biofilm على الاسطح الصلبة [12].

تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على الفحوصات المظهرية المزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وشملت

التشخيص المظهري Morphological Examination

شخصت البكتريا على اساس الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع مثل وسط الزائفة الزنجارية الصلب Agar *Pseudomonas aerugionsa* و وسط هايفلور الصلبHifluoro Agar ووسط اساس الدم الصلب Blood Agar بالاعتماد على كل من شكل المستعمرة ولونها والرائحة المنبعثة منها وقدرتها على أنتاج الصبغات [13].

التشخيص المجهري Microscopic Examination

فحصت العزلات البكتيرية مجهرياً عن طريق أخذ مسحة Smear وتثبيتها على الشريحة الزجاجية ومن ثم صبغها بصبغة كرام وبعدها فحصت تحت المجهر لملاحظة تفاعلها مع الصبغة فضلاً عن شكل وترتيب الخلايا (Christensen، 1982).

الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

اجريت الفحوصات الكيموحيوية من اجل تشخيص عزلات بكتيريا *Ps.aeruginosa* وتشمل مجموعة إختبارات IMViCوالتي تتضمن اختبار انتاج الاندول Indol Production Test واختبار المثيل الاحمرMethyle red test واختبار فوكس بروسكاورVoges Proskauer Test واختبار استهلاك السترات Citrate utilization test وإختبار الاوكسيديز Oxidase Test و اختبار الكتاليز Catalase test واختبار النمو على وسط كليكر الحديد Kligler Iron(TSI) واختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test.

التشخيص بأستخدام جهاز VITEK-2 : تم استخدام نظام VITEK-2 لتشخيص بكتريا *Ps.aeruginosa* والتي تضمنت العديد من الخطوات على النحو التالي[14].

تحضير المعلق البكتيري Preparation of bacterial suspension:

حضر المعلق البكتيري بأستخدام العود الخشبي تم اخذ مستعمرة منفردة بعمر (18-24) ساعة من بكتريا *Ps.aeruginosa* في انبوب خاص Kantube حاوي على 3 مل من المحلول الفسلجي Normal Saline ومزجت للحصول على معلق بكتيري ثم تم قياس كثافته المعلق بواسطة جهاز Densichek الذي كانت كثافته ضمن المدى (0.5-0.63).

تلقيح كارت التشخيص Inoculation of identification card:

لقحت البطاقات وتم ادخالها الى الجهاز وفقاً [15].

اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics sensitivity test

استعمل في هذا الاختبار 8 من مضادات حيوية كما مبين بالجدول رقم (1)، اجري الاختبار حسب ما ورد في طريقة Bauer وآخرون (1966) باستعمال وسط مولر هنتون الصلب Muller Hinton Agar، حُضِّرت المستعمرات البكتيرية بنقل حزء من المستعمرة الى 5 مل من المرق المغذي Nutrient Broth وحضنت بدرجة حرارة (35-37) مº ولمدة 24 ساعة قورنت عكورة النمو مع عكورة محلول ماكفرلاند القياسي والذي يساوي (1.5×10^8) خلية/ مل تم غمر ماسحة قطنية معقمة Sterile Swab في العالق البكتري ونشرت على وسط اكار مولر هنتون وتركت لمدة 15 دقيقة لغرض التشرب والتخلص من الرطوبة الزائدة بعدها جرى توزيع اقراص المضادات الحيوية على الأطباق وحضنت بدرجة حرارة(35-37) مº لمدة 24 ساعة تم قياس مناطق التثبيط بجهازInterscience ومقارنتها بالجدول القياسي للجنة الوطنية لمعايير المختبرات السريرية [16].

جدول 1: اقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

ت	اسم المضاد	المختصر	تركيز القرص Mg/ disc	الشركة المصنعة
1	Amikacin	AK	30	Bioanalyse
6	Ceftazidime	CAZ	10	
4	Ciprofloxacin	CIP	5	
2	Clavulanic	TCC	15	
5	Gentamycin	GEN	10	
8	Imipenem	IPM	10	
7	Meropenem	MRP	10	
3	Piperacillin	PI	100	

التشخيص الجزيئي Molecular identification

عزل الدنا DNA Extraction: عزل الحمض النووي الجيني من النمو البكتيري وفقًا لخطوات الشركة المصنعة ABIOpure وكان الاستخلاص بالخطوات الأتية:

1- نُقل 1مل من العالق البكتيرية في الوسط المغذي السائل ووضع في ابندروفات سعة2 مل، وبعدها نبذت أنابيب الأبندروف بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقتين، أهمل الطافي Supernatantواحتفظ بالراسب.
2- اضيف 200 مايكروليتر من المحلول المنظم CL المحلل لخلايا البكتريا الى راسب الخلايا البكتيرية في انابيب الأبندروف ، ومزجت محتويات الانابيب جيداً بوساطة الماصة الدقيقة.
3- اضيف 20 مايكروليتر من الأنزيم الحال للبروتين Proteinase K إلى أنابيب الأبندروف المحتوية على راسب خلايا البكتيرية، ثم مزجت الانابيب بجهازVortex بعد ذلك حضنت ألانابيب عند56ºم لمدة 30 دقيقة ولزيادة عملية التحلل حضنت مرة ثانية عند 70ºم لمدة 30 دقيقة.
4- اضيف 200 مايكروليتر من المحلول المنظم BL لأنابيب الأبندروف ثم مزجت مكونات الانابيب بجهاز Vortex وحضنت عند 70ºم لمدة 30 دقيقة.
5- اضيف 200 مايكروليتر من الإيثانول المطلق إلى انابيب الأبندروف، ومزجت بجهاز Vortex لخلطها جيداً. بعدها نقل الخليط الى انابيب الجمع المحتوية على فلاتر Mini-Column بعناية.
6- نبذت انابيب الجمع بجهاز الطرد المركزي ولمدة دقيقة بسرعة gX6.000 بعد ذلك أهمل المحلول الطافي ونقلت الفلاتر الى انابيب جمع جديدة.
7- اضيف 600 مايكروليتر من المحلول المنظم BW الى انابيب الجمع المحتوية على الفلاتر ثم نبذب بجهاز الطرد المركزي ولمدة دقيقة بسرعة gX6.000 تم التخلص من الرائق ووضع الفلاتر في انابيب جمع اخرى.
8- اضيف 700 مايكروليتر من المحلول المنظم TW ونبذت بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة بسرعة gX6.000. ثم تم التخلص من الرائق ووضع الفلاتر في انابيب جمع جديدة.
9- نبذت الانابيب الحاوية على الفلاتر بجهاز الطرد المركزي بسرعة gX13.000 لمدة دقيقة واحدة لإزالة بقايا محلول الغسل العازل، ثم تم وضع الفلاتر في أنبوب سعة 1.5 مل جديد.
10- اضيف 100 مايكروليتر من المحلول المنظم AE وحضنه لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي عند gX 000.5 لمدة 5 دقائق بعد ذلك تم التخلص من الفلاتر والاحتفاظ بالدنا المستخلص بدرجة حرارة -20 ºم لحين الاستخدام.

نقاوة المادة الوراثية Quantitation of DNA

استخدم مقياس التألق الكمي للكشف عن تركيز الحامض النووي المستخرج وكذلك للتأكد من جودة العينات لتطبيقات العمل الأخرى، اضيف لكل 1 مايكروليتر من الحامض النووي DNA، 200 مايكروليتر من مخفف صبغة Quantifluor بعدها تم خلطهم، وبعد مضي 5 دقائق من التحضين في درجة حرارة الغرفة، تم الكشف عن قيم تركيز الحامض النووي.

الترحيل على هلام الأكاروز Gel Electrophoresis

حضرت المحاليل والدوارئ المستعملة في الترحيل الكهربائي وفقاً لطريقة Samaila [17] كالأتي:

المحاليل Solutions

1 X TAE buffer
Loading Dye
DNA ladder marker
Ethidium Bromide (10mg / ml).

محلول TAE 1X buffer

حضر بإذابة 4 غرام من مادة هيدروكسيد الصوديوم في 500 مل من الماء المقطر ثم عدل pH المحلول للوصول الى 8.5 pH وذلك بإضافة حامض البوريك، ثم أكمل الحجم بالماء المقطر الى 1لتر.

صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium Bromide

حضر محلول الصبغة بتركيز 10 ملغم/ مل وذلك بإذابة 100 ملغم من مسحوق الصبغة في 10 مل من الماء المقطر وحفظت في قنينة معقمة ومعتمة في درجة حرارة 40°م لحين الأستعمال.

طريقة تحضير هلام الأكاروز وعملية الترحيل للـ DNA

1. حضر هلام الأكاروز بتركيز1.5% وذلك بإذابة 1.5 غرام من مسحوق الأكاروز الى 100 مل من TAE 1X وتمت الاذابة بوضعه في جهاز Microwave بعدها تم إضافة 1 مايكروليتر من صبغة Ethidium Bromide (10mg / ml) إلى الأكاروز Agarose، وتم تقليبه من أجل الاختلاط وتجنب الفقاعات وبعد ذلك ترك المحلول ليبرد عند (60-50) °م.
2. جهز قالب الهلام Gel Tray بإحاطة أبعاده الاربعة بشريط لاصق قوي ثم ثبت المشط Comb لتكوين الحفر wells التي تستعمل لتحميل عينات الـ DNA ثم صب الهلام بعناية في القالب لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة رفع اللاصق بعد تصلب الهلام.
3. وضع القالب مع الهلام الصلب في حوض الترحيل Tank المملوء بدارئ TAE 1X ورفع المشط برفق وغطي الدارئ سطح الهلام.
4. مزج 5 مايكروليتر من نماذج عينات الدنا مع 2 مايكروليتر من صبغة التحميل Loading Dye المجهز من شركة Promega الامريكية باستخدام الماصة الدقيقة Micropipate، ثم حملت بعناية الى الحفر المعمولة سابقاً مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة.
5. رحلت العينات وذلك بتشغيل جهاز Electrophoresis على مرحلتين الاولى بقوة 100v/mأمبير لمدة 15 دقيقة، والثانية بقوة 150v/m امبير لمدة 45 دقيقة، فحص الهلام المصبغ بصبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide في غرفة مظلمة وذلك بعد تعريضه للأشعة فوق البنفسجية وذلك بأستعمال جهاز UV Transilluminator وصور الهلام بأستعمال كاميرا رقمية.

تحضير البوادئ Primer preparation

تم توفير جميع البادئات الخاصة بجينات دراستنا من قبل شركة Macrogen بشكل مجفف بالتجميد كما موضح بالجدول 2، إذ تم إذابة البوادئ في ماء خالٍ من الأيونات لإعطاء تركيز نهائي قدره 100 بيكومول لكل مايكروليتر لتكوين محلول الخزن Stock Solution ، تم تحضير محلول العمل لجميع البادئات بإضافة 10 مايكروليتر من محلول الخزنStock Solution (المخزن في الفريزر 20°C-) إلى 90 مايكروليتر ماء خالي من الأيونات للحصول على محلول العمل الفعال بتركيز 10 بيكومول لكل مايكروليتر واجري التفاعل بحجم نهائي 20 مايكروليتر اعتماداً على ما ذكر[18].

جدول 2: البوادئ المستخدمة لتشخيص البكتريا المعزولة من التربة

المصدرReference	حجم الحزمة Product size (bp)	درجة حرارة الالتحام Annealing Temp. (°C)	التسلسل`3-`5 Sequence	اسم البادئ Primer Name
(2022، ahmed)	956	60	GGGGGATCTTCGGAACCTCA TCCTTAGAGTGCCCAAACCCG	16SrRNA-F 16SrRNA-R
(Jamileh وآخرون، 2012)	448	60	CCGTCGAGAAGTACATGAAT CATAGTTCACCCCTTCCAG	phzABCDEFG-F phzABCDEFG-R

الكشف عن الجينات Detection of genes

حضر خليط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لجين *16SrRNA* و ابرون *phzABCDEFG* بحجم تفاعل كلي مقداره 20 مايكروليتر لكل عينة وحسب الجدول 3.

جدول 3: محتويات تفاعل البوادئ

مكونات التفاعل	عينة واحدة
Master Mix	10 µl
البادئ الامامي Forward primer	1 µl
البادئ العكسي Reverse primer	1 µl
ماء منزوع الأيونات Nuclease Free Water	5 µl
دنا القالب DNA Template	3 µl
الحجم الكليTotal volume	20 µl

مزجت مكونات التفاعل جيداً باستعمال ماصة دقيقة معقمة ثم وضعت الانابيب في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler بعناية لإنجاز التفاعل باستعمال البرنامج الخاص به.

برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR المستخدم لمضاعفة بادئ الجينات *16SrRNA*

تضمن برنامج التفاعل الخاص بالجين *16SrRNA* على عدة خطوات حسب الجدول 4 كما موصي بها من قبل [19].

جدول 4: برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR المستخدم لمضاعفة الجين *16SrRNA*

الخطوات	°C	m:s	عدد الدورات
المسخ الأوليInitial Denaturation	95	05:00	1
المسخ Denaturation	95	00:30	30
الإلتحام Annealing	60-52	00:30	
الإستطالة Extension	72	00:30	
مرحلة الإستطالة النهائية Final extension	72	07:00	1

برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR المستخدم لمضاعفة بادئ الاوبرون *phzABCDEFG*

تضمن برنامج التفاعل الخاص بالأوبرون *phzABCDEFG* على عدة خطوات حسب الجدول 5 كما موصى بها**[20]**.

جدول 5: برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR المستخدم لمضاعفة الاوبرون *phzABCDEFG*

الخطوات	°C	m:s	عدد الدورات
المسخ الأوليInitial Denaturation	94	05:00	1
المسخ Denaturation	94	00:30	30
الإلتحام Annealing	60	00:30	
الإستطالة Extension	72	00:30	
مرحلة الإستطالة النهائية Final extension	72	10:00	1

بعد انتهاء عملية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR رحل ناتج التفاعل الخاص ببوادئ الجين *16SrRNA* و ابرون *phzABCDEFG* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% والمصبوغ بصبغة Ethidium bromide وفحص بواسطة جهاز U.VTransilluminator، للكشف عن الحزم الخاصة ببوادئ الجين (956bp)*16SRNA* والأبرون *phzABCDEFG* (448 bp).

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

عزلت تسعة عينات والتي يعتقد بأنها تعود للزائفة الزنجارية بعد تشخيصها اولياً فعند تصبيغها كانت سالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، كما اظهرت العزلات عند نموها عند نموها على وسط الزائفة الزنجارية الصلب Pseudomonas Agar Base بأنها ذات مستعمرات كبيرة ولماعة وانتجت رائحة تشبه رائحة العنب وكان لون المستعمرة اخضر مصفر وعند تنميتها على وسط هايفلور الصلب Hifluoro Pseudomonas Agar اظهرت المستعمرات ذات لون اصفر لإنتاجها صبغة البايوفردين Pyoverdin ذات اللون الاخضر المصفر.

التشخيص الكيموحيوي لبكتريا *P.aeruginosa*

تبين نتائج الجدول 6 بأنها موجبة لاختبار الكتاليز Catalase والاوكسيديز Oxidase واستهلاك السترات Citrate utilization و Kligler Iron وسالبة لاختبار الأندول وأحمر المثيل Methyle red والفوكس بروسكاور Voges-Proskauer اما بالنسبة لاختبار H_2S فكانت معظم العزلات موجبة سوى (1، 3، 9) فقد اظهرت نتيجة سالبة.

جدول 6: الأختبارات المستخدمة في تشخيص بكتريا *P.aeruginosa*

ت	اسم العزلات	G+ve	Catalase	Oxidase	Indol	MR-VP Test	Cimmon Citrate	H_2S	Kligler Iron
.1	S1(سامراء)	-	+	+	-	-	+	-	+
.2	S2(بيجي)	-	+	+	-	-	+	-	+
.3	S3(الدجيل)	-	+	+	-	-	+	+	+
.4	S4(ابوغريب)	-	+	+	-	-	+	+	+
.5	S5(بغداد)	-	+	+	-	-	+	+	+
.6	S6(محمودية)	-	+	+	-	-	+	+	+
.7	S7(كركوك)	-	+	+	-	-	+	+	+
.8	S8(حويجة)	-	+	+	-	-	+	+	+
.9	S9(داقوق)	-	+	+	-	-	+	-	+

اختبار تكوين الاغشية الحيوية

بينت نتائج اختبار عينات التربة لإنتاج الغشاء الحيوي Biofilm ان العينات S1(سامراء) و S2(بيجي) و S5(بغداد) وS7(كركوك) وS8(حويجة) و S9 (داقوق) امتازت بقابليتها على انتاج الاغشية الحيوية بينما كانت العينات S3(الدجيل) و S4(ابوغريب) وS6(المحمودية) غير قادرة على انتاج الاغشية الحيوية وتتعارض هذه النتائج مع ما توصل اليه [21] بدراستهم حول قدرة العزلات البكتيرية المأخوذة من مصادر مختلفة كالمياه الجوفية والتربة على إنتاج الأغشية الحيوية بأستخدام تقنية الاليزا اذ اظهرت نتاجهم بأن 6.8% من العزلات كانت غير منتجة للأغشية الحيوية و61.3% كانت ضعيفة او متوسطة لإنتاج الاغشية الحيوية و31.8% تنتج الأغشية الحيوية .ان السبب في اختلاف النتائج يعود الى طبيعة ونوع العينة بالإضافة الى الموقع الجغرافي الذي جمعت فيه العينة اذ ان قدرة الانواع البكترية على إنتاج الأغشية الحيوية وقابليتها على احداث المرض يأتي من خلال قدرتها على مقاومة العديد من المضادات الحيوية فضلاً عن مقاومتها للظروف البيئية المختلفة [23,22].

نتيجة التشخيص بأستخدام جهاز الفايتك2 Result Diagnosis by VITEK 2 system

بينت نتائج التشخيص باستخدام جهاز الفايتك2 VITEK بأن التسعة عزلات المشخصة سابقاً تعود لبكتريا *P.aeruginosa* والمعزولة التربة بنسب احتمالية بلغت S1(88%) وS2(90%) وS3 (93%) وS4(95%) وS5(95%) وS6(99%)

و7S(93%) و8S(93%) و9S(91%). ان الاختبارات البايوكيميائية لنظام VITEK 2 2) استخدام البطاقات اللونية) يعد من الاختبارات واسعة الانتشار في المستشفيات ويستعمل للكشف السريع عن البكتريا [24].

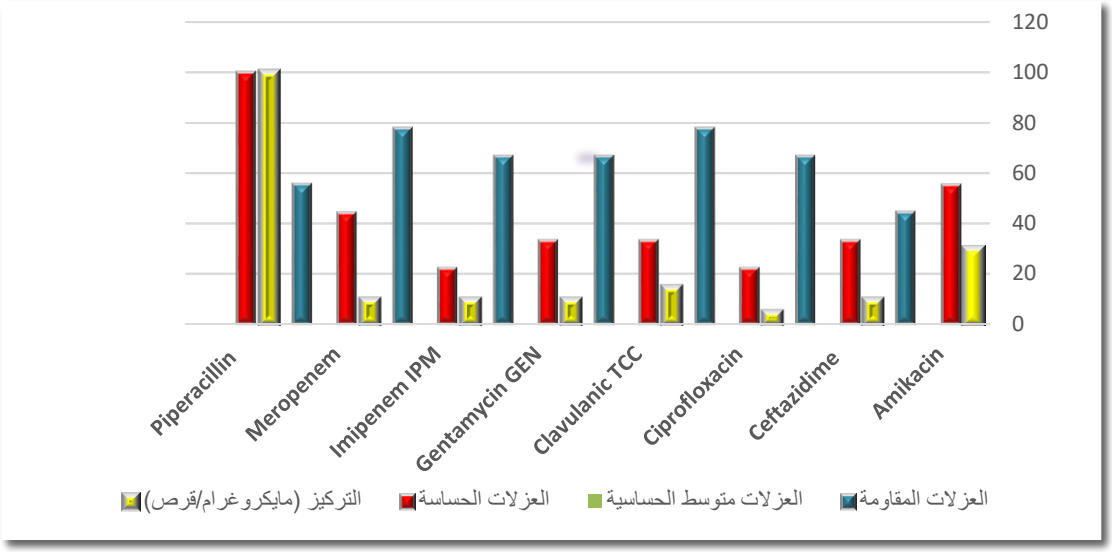
حساسية عزلات بكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية

اظهرت نتائج اختبار فحص حساسية عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التربة تجاه ثمانية انواع من المضادات الحيوية اذ بينت النتائج تباين في نسب المقاومة والحساسية للعزلات كما بالجدول 7 والشكل (1) حيث كانت عينة البكتريا المعزولة من قضاء سامراء مقاومة للمضادات TCC ، AK ، IPM وحساسة للمضادات CAZ،PI ، CIP، GEN، MRP وعينة البكتريا المعزولة من قضاء بيجي كانت حساسة للمضادات TCC، PI، AK، CAZ، MRP، IPM ومقاومة للمضادات CIP ، GEN اما البكتريا المعزولة من قضاء الدجيل فكانت متعددة المقاومة اذ كانت مقاومة لبقية المضادات TCC، CIP، GEN، AK، CAZ، MRP، IPM وحساسة فقط للمضاد PI.

اما عينة البكتريا المعزولة من قضاء أبو غريب فكانت حساسة لجميع المضادات TCC، PI، CIP، GEN، AK، CAZ، MRP، IPM اما عينة البكتريا المعزولة من مركز بغداد فكانت حساسة فقط لمضاد PI ومقاومة لجميع المضادات المستخدمة TCC، CIP، GEN، AK، CAZ، MRP، IPM وعينة البكتريا المعزولة من قضاء المحمودية فكانت حساسة لنوعين من المضادات PI، AK ومقاومة لبقية المضادات المستخدمة TCC، CIP، GEN، CAZ، MRP، IPM. اما عينة البكتريا المعزولة من قضاء كركوك كانت حساسة للمضادات PI، AK، MRP ومقاومة لبقية المضادات TCC، CIP، GEN، CAZ، IPM وعينة البكتريا المعزولة من قضاء الحويجة فكانت حساسة لنوعين من المضادات TCC، PI ومقاومة لبقية المضادات المستخدمة CIP، GEN، AK، CAZ، MRP، IPM اما عينة البكتريا المعزولة من قضاء داقوق فكانت حساسة للمضادات PI، GEN، AK ومقاومة للمضادات TCC، CIP، CAZ، MRP، IPM .من خلال النتائج نلاحظ ان عزلات التربة كانت اغلبها مقاومة للمضادات TCC، CIP، GEN، CAZ، IPM وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات الاخرى ففي دراسة اجراها [25] اذ ابدت عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من التربة مقاومة كبيرة وبنسبة 100% لكل من مضادات Clavolanic acid، Amoxicillin، Cephoxitin، Ceftazidime، Cortimoxazole، Erythromycin في حين اقل مقاومة وبنسبة 90% لمضاد Chloramphenicol، الا انها كانت حساسة وبنسبة 100% لمضادات Imipenem، Meropenem، Polymyxin B، Ciprofloxacin، Amikacin، Gentamicin في حين ابدت حساسية وبنسبة 60% لكل من مضادات Pefloxacin، Gatifloxacin. وفي دراسة اخرى تم من خلالها عزل44 عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* من مصادر بيئية وصنفت الى 29 عزلة منها حساسة و15 عزلة منها مقاومة وتم الكشف عن العزلات المقاومة من المياه والتربة الملوثة بالهيدروكاربونات إذ كانت العزلات مقاومة للمضاد Cefotaxime18.2% والمضادان Ceftriaxone و Imipenem بنسبة 25.0%، بينما كانت المضادات Cefepime، Ciprofloxacin، Gentamicin كانت فعالة ضد جميع العزلات [21].

جدول 7: نتائج اختبارحساسية *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	التركيز (مايكروغرام/قرص)	العزلات الحساسة العدد(%)	العزلات متوسط الحساسية العدد(%)	العزلات المقاومة العدد (%)
Amikacin(AK)	30	(55.5) 5	(0.0) 0	(44.4) 4
Ceftazidime (CAZ)	10	(33.3)3	(0.0) 0	(66.6) 6
Ciprofloxacin (CIP)	5	(22.2)2	(0.0) 0	(77.7) 7
Clavulanic (TCC)	15	(33.3)3	(0.0) 0	(66.6) 6
Gentamycin (GEN)	10	(33.3)3	(0.0) 0	(66.6) 6
Imipenem (IPM)	10	(22.2)2	(0.0) 0	(77.7) 7
Meropenem (MRP)	10	(44.4)4	(0.0) 0	(55.5)5
Piperacillin (PI)	100	(100)9	(0.0) 0	(0.0)0

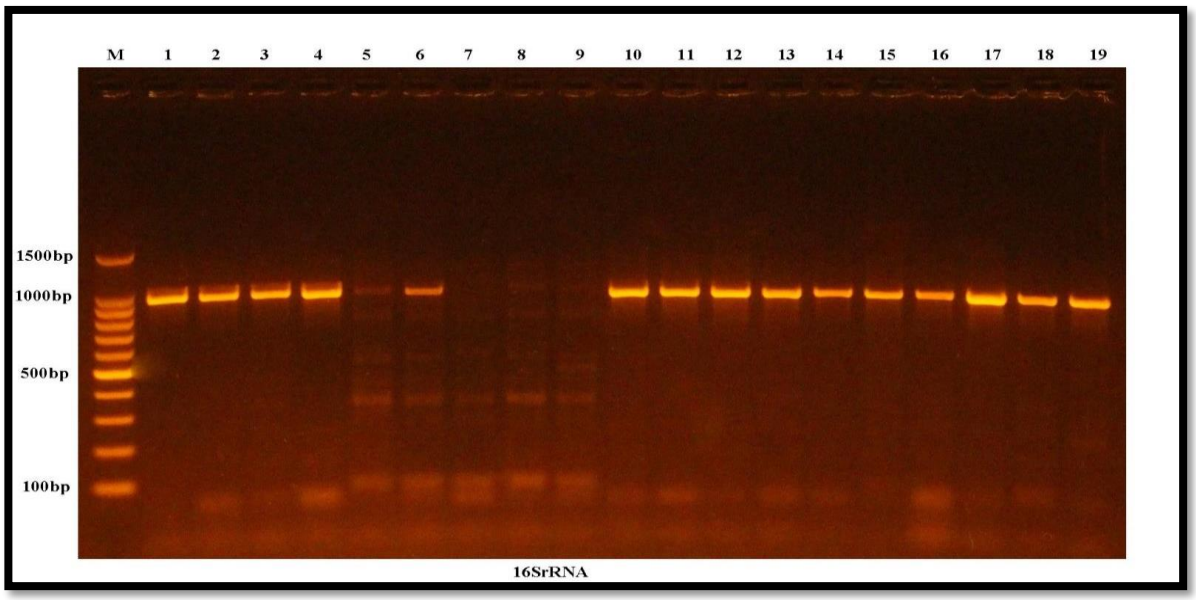


شكل 1: نتائج اختبار حساسية *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية

التشخيص الجزيئي Molecular identification

الكشف الجزيئي للجين التشخيصي *16SrRNA* لعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

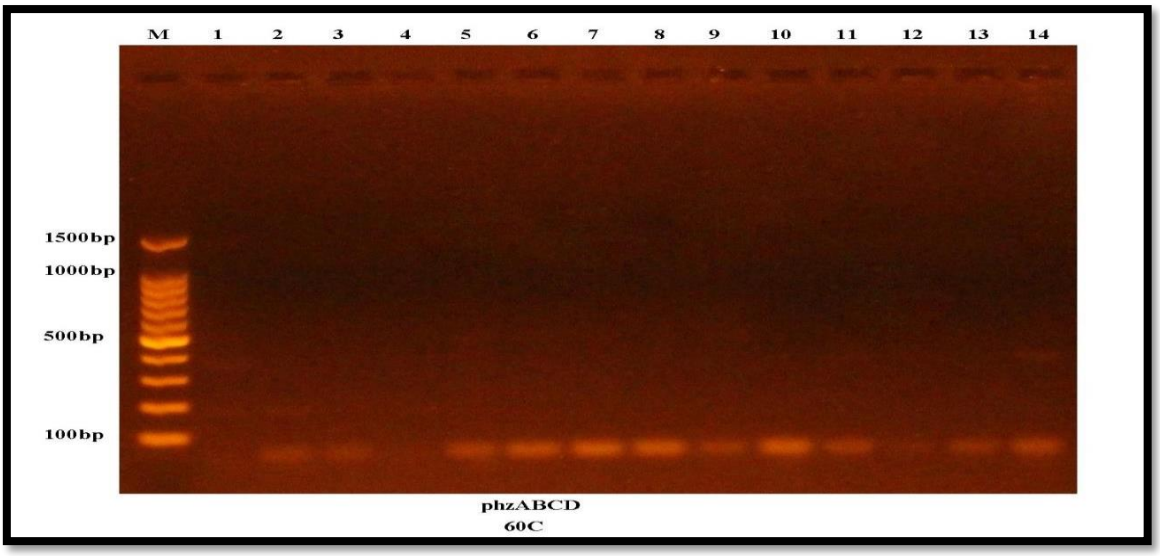
تراوحت نقاوة الحامض النووي من (1.5-1.9) واما التراكيز فقد كانت ما بين (20-30) نانوغرام/مايكروليتر لعزلات بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* التسعة بعدها اجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام بادئ نوعي للجين التشخيصي *16SrRNA*، وبعد الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%، تبين لدينا حزمة ذات حجم جزيئي bp956 وهي الحزمة التي أشارت المصادر العلمية الى ظهورها عندما تكون العينة المطلوب الكشف عنها تعود الى بكتريا *P.aeruginosa* وبنسبة ظهور للجين بلغت 100% لعينات التربة والمرقمة من (10-18) شكل 2، وهذا يتوافق مع ما توصل Ahmed[19] اذ بين ان العزلات والبالغ عددها 20 عزلة تعود الى جنس *P.aeruginosa* وتم التأكد منها بالاعتماد على *16SrRNA* وبأستخدام تقنية البلمرة المتسلسل PCR، كما كانت جميع العزلات عند الكشف عنها بجهاز Vitek2 تعود الى نفس النوع. يستخدم الجين *16SrRNA* في تشخيص بكتريا *Ps.aeruginosa* والمعزولة من مصادر مختلفة لكونه يمتلك تسلسل ثابتاً لكل نوع من الانواع البكتيرية الاخرى [26]،

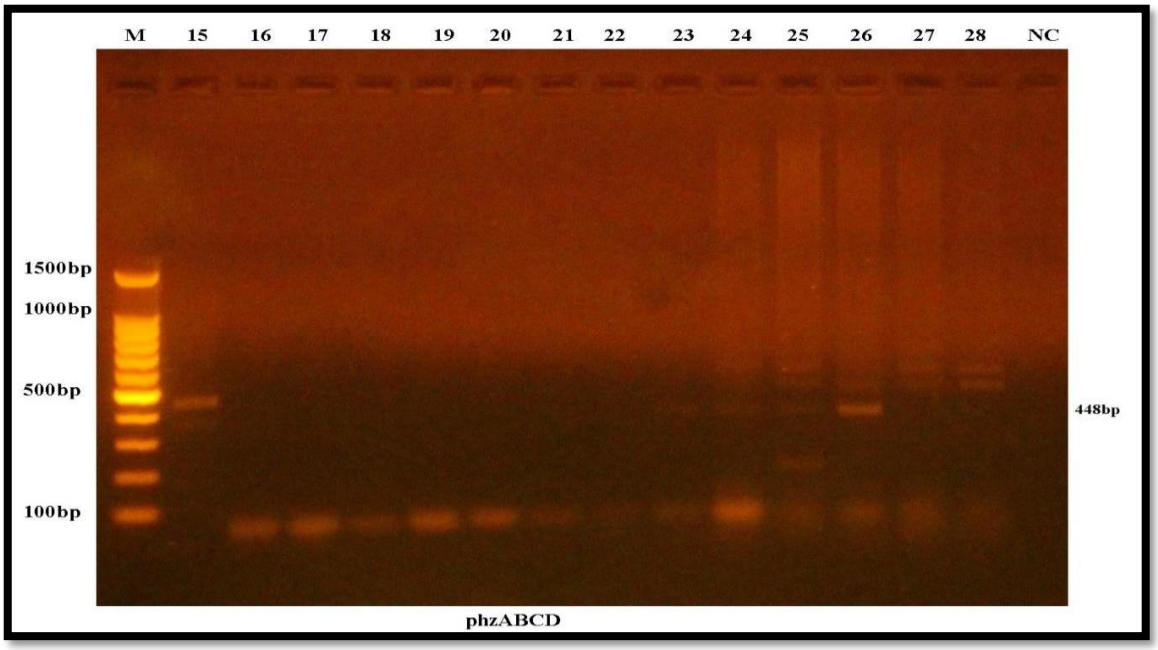


شكل2: نتائج تضخيم بادئ الجين *16SrRNA*(bp956) لعزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* بعد الترحيل على هلام الاكاروز وبتركيز 1.5% والمصبغ بصبغة Ethidium bromide وهي مرتبة كالأتي:M = الدليل الحجمي Ladder 100bp العينات (10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18) تمثل العينات المعزولة من التربة وهي تمثل الأرقام (S1، S2، S3، S4، S5، S6، S7، S8، S9).

الكشف الجزيئي عن اوبرون *phzABCDEFG* لعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

تظهر نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* باستخدام بادئ الاوبرون *phzABCDEFG* ذات الحجم الجزيئي *bp448* بعد التشخيص كيمو حيوياً عدم ظهور الحزمة اعلاه كما بالشكل 3 لجميع العزلات مما يعني عدم احتوائها على الاوبرون *phzABCDEFG* باستثناء العزلة رقم 15 . وهذا يتعارض ما اشار اليه Nowroozi [27] في دراستهم لعينات تم جمعها من مصادر مختلفة شملت عينات سريرية و عينات من التربة و من النبات تم خلالها التحري عن مدى امتلاك هذه العزلات للجينات المسؤولة عن انتاج صبغة البايوسيانين والتي تشمل اوبرون تكوين الفينازين Phenazine Biosynthetic Operons وجينات *phzM* و *phzS* ، اذ ظهرت نتائج الترحيل احتواء جميع العزلات المعزولة من الحالات السريرية والبيئية على اوبرون *phzABCDEFG* .[28]، يبدأ التخليق الحيوي للبايوسيانين في بكتريا *Ps.aeruginosa* في الموقع المتفرع من حامض Chorismic acid اذ يتحول حامض Chorismic acid الى Phenazine-1- Carboxylic acid(PCA) بواسطة انزيمات من اوبرون *phzABCDEFG* بعد ذلك ينتج الجين *phzM* انزيم Methyltransferase فيعمل على تحويل PCA الى 5-Methyl PCA ، بعد ذلك يتم اضافة مجموعة الهيدروكسيل بواسطة انزيم Flavoprotein Monooxygenase والذي يشفر من قبل الجين *phzS* الى بايوسيانين Pyocyanin .ان حصول أي طفرة في اوبرون *phzABCDEFG* تؤدي الى انخفاض في تخليق البايوسيانين لذا تعد *phzM* و *phzS* من الجينات المهمة والتي تتواجد فقط في بكتريا *Ps.aeruginosa* والتي تشفر لأثنان من الانزيمات المهمة في تكوين البايوسيانين [29].





شكل 3: نتائج تضخيم بادئ الاوبرون *phzABCDEFG* لعزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* بعد الترحيل على هلام الاكاروز وبتركيز 1.5% والمصبغ بصبغة Ethidium bromide وهي مرتبة كالأتي:M = الدليل الحجمي Ladder 100bp ، العينات (10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18) تمثل العينات المعزولة من التربة وهي تمثل الأرقام (S1، S2، S3، S4، S5، S6، S7، S8، S9).

الاستنتاجات

ان الانتشار الواسع لبكتريا الزائفة الزنجارية Pseudomonas aeruginosa في التربة الملوثة بالمخلفات العضوية، اظهر التشخيص الجزيئي أمتلاك جميع العزلات على جين sRNA16 بينما لا تمتلك اغلب العزلات على اوبرون phzABCDEFG وبذلك لا يمكن الاعتماد عليه في التشخيص.

References

1. Namaki, M., Habibzadeh, S., Vaez, H., Arzanlou, M., Safarirad, S., Bazghandi, S. A., *et al*. (2022). Prevalence of resistance genes to biocides in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Mol. Biol. Rep.* 49, 2149–2155. doi: 10.1007/s11033-021-07032-2 .
2. Zheng P, Renee R, Bernard R, Tong JL, Zhenyu C.(2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology Advances. 2019 January–February; 37(1):177-192.
3. Pelegrin, A. C., Palmieri, M., Mirande, C., Oliver, A., Moons, P., Goossens, H., *et al*. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update. *FEMS Microbiol. Rev.* 45:fuab026. doi: 10.1093/femsre/fuab026.
4. Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., *et al*. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in raw vegetables: molecular and phenotypical analysis of their antimicrobial resistance and virulence-related traits. *Int. J. Mol. Sci.* 22:12626. doi: 10.3390/ijms222312626.
5. Qarah, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
6. Deredjian, A., Colinon, C., Hien, E., Brothier, E., Youenou, B., Cournoyer, B., & Ranjard, L. (2014) .Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils with and without organic amendment. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*, 53.
7. AL-Saleh, E., & Akbar, A. 2015-Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in Kuwait soil. *Chemosphere*, *120*, 100-107.
8. Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology, 2 (2), 1-9.
9. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology.4th ed, Short Course: 245 – 258.
10. Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2007). Laboratory Exercises in Microbiology. 7th.ed. McGraw-Hill Higher Education. New York.
11. Atlas, R.M. ; Brown. A.E.and Parks, L.C. (1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology, Mosby – Comp .
12. Freeman, D.;Falkiner, F.; and Keane(1989). New method for detecting slime production by coagulase –negative staphylococci. J.Clin.Pathol.42;874.
13. Levinson, W.(2016). Review of medical microbiology and immunology. 14 th ed.McGraw- Hill Eduction.
14. Edwards, K.; Kaufmann, M. and Saunders, N. (2001). Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. journal of Clinical Microbiology. 39: 3047-3051.
15. Ibrahim, E. S.; El-Baghdady, K. Z.; El-All, A.; Said, M.; Warda, M. A.; Prince, A. M. and Ibrahim, M. K. (2020). Prevalence of multidrug Reference 003 resistance in the Egyptian methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. African Journal of Biological Sciences, 16(1), 43-52.

16. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.(2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M 100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
17. Samaila, A., Massi, N., & Sjahril, R. (2014). Identification Bacteria inAir Intensive Care Unit (ICU) Wahidin Sudirohusodo Hospital. Journal "dr. Aloei Saboe, 1(2), 23-28.
18. Anderson, H. L. (1999). Building molecular wires from the colours of life: conjugated porphyrin oligomers. Chemical communications, (23), 2323-2330.
19. Ahmed, Z.F.(2022). Antimicrobial Activity of Saussurea costus extract and Helenin against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa Isolated from clinical samples. Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies, University of Baghdad,179 pages.
20. Jamileh N, Abbas AS and Afrooz R.(2012). pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanin's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. *J Cell*, 14(1): 7-18.
21. Kaszab,E., Radó,J., Kriszt,B., Pászti, J., Lesinszki,V., Szabó,A., Tóth,G., Khaledi ,A.,& Sándor Szoboszlay,S,.(2019). Groundwater, soil and compost, as possible sources of virulent and antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa. nternational Journal of Environmental Health Research, DOI: 10.1080/09603123.2019.1691719.
22. Bentzmann S.De and. Bordi, C. (2011) ; Hacking into bacterial biofilms : a new therapeutic challenge. Annals of Intensive Care , 1:19.pp.2-8.
23. Khan, F. ; Shukla, I. ; Rizvi, M. ; Mansoor, T. and Sharma, S. C. (2011). Detection of biofilm formation in Staphylococcus aureus .Does it have a role in treatment of MRSA Infection. Trends in Med. Res. Academic J., 6(2): 116-123 .
24. Misbah, S.; Hassan, H.; Yusof, M. Y.; Hanifah, Y. A.; and AbuBakar, S. (2005). Genomic identification of Acinetobacter of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore medical journal, 46(9), 461.
25. . Homsi, Ahmed Abdel-Maguid. (2017). Molecular characterization and investigation of some virulence genes of the pathogenic *Ps aeruginosa*. Master's Thesis, College of Science / Department of Plant Biology. Aleppo University.
26. Altaai, M. E.; Aziz, I. H.; and Marhoon, A. A. (2014). Identification Pseudomonas aeruginosa by 16s rRNA gene for Differentiation from Other Pseudomonas Species that isolated from Patients and environment. Baghdad Science Journal (2), 1028-34.
27. Nowroozi, J.; Sepahi, A.A.; Rashnonejad, A.(2021). Pyocyanine Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas aeruginosa and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. CELL JOURNAL(Yakhteh), Vol 14, No 1, Spring pages 12.
28. Khadim, M.M.; and AL Marjani, M.F. (2019). Pyocyanin and Biofilm Formation in Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Infections in Baghdad, Iraq. Jordan Journal of Biological Sciences. ISSN 1995-6673 Pages 31 – 35.
29. Farag,H.A.M.; Abd El Tawab; Maarouf,A.A.A.; Ahmed,W.(2022). Molecular Detection of some Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Freshwater Fishes at Qalubiya Governorate, Egypt. Journal Issued by Faculty of Veterinary Medicine, BVMJ 43 (2): 80-84.

IRAQI Academic Scientific Journals

Samarra Journal of Pure and Applied Science

SJPAS

www.sjpas.com

p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

Phenotypic and molecular diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contaminated soil from some Iraqi governorate

Afrah Abdullah Jasim [1], Wael Mohammed Mahdi[2] and Omar Raheem Khalaf AL-Obaidi[3]

1-Department of Chemistry College of Education, University of Samarra, Iraq
2- Department of Biotechnology, College of applied Sciences, University of Samarra, Iraq
3- Department of Biology College of Education, University of Samarra, Iraq

Article Information

Received: 22/07/2023
Revised: 20/11/2023
Accepted: 26/11/2023
Published: 30/03/2024

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa, *PCR*,*Soil*, *Phenotypic diagnosis*, *biochemical tests*

Corresponding Author

E-mail: ahmed@gmail.com
Mobile:

Abstract

Twenty-five samples of contaminated soil with organic waste were collected from three iraqi governorates: Salah Al-Din Governorate, which included the city of Samarra, Baiji, and Dujail, Baghdad Governorate, which included Abu Ghraib, Baghdad Center, Mahmudiyah, and Kirkuk Governorate, which included Kirkuk, Hawija, and Daquq. The isolates were diagnosed phenotypically by the shape of the colony, its color and odor, and microscopically by its interaction with the gram stain. In addition,some biochemical tests were carried out, including(Catalase, Oxidase, IMVIC test, Biofilms production test, Kligler Iron test).The use of the Vitek 2 system to confirm the diagnosis of the isolates,as 9 isolates of *P. aeruginosa* bacteria were isolated, and the sensitivity test was conducted according to the Kirby-Bauer method (antibiotic disc diffusion) and using 8 types that included (TCC) Clavulanic, (PI) Piperacillin, (GEN) Gentamycin , (AK) Amikacin, Ceftazidime (CAZ), (IPM) Imipenem, (MPP) meropenem, Ciprofloxacin (CIP), as the results of the sensitivity test for soil isolates showed a different variation in their resistance and sensitivity. The results of the molecular diagnosis using PCR technique for specialized primers for the *16SrRNA* gene and the *phzABCDEFG* operon showed that all bacterial isolates isolated from the soil belong to the type *P.aeruginosa* because they contain the specific gene *16SrRNA*, while the results of the polymerase chain reaction of the isolates of *P.aeruginosa* bacteria showed the *phzABCDEFG* operon Not all isolates have the *phzABCDEFG* operon except for sample (S6)15.