




## التشخيص الوراثي الجيني للبكتريا المعزولة من ترب الحقول الزراعية المستدامة بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل qPCR

سجى خالد قدوري<sup>1\*</sup>  ادهام علي عبد<sup>2</sup>  بيداء عبدالقادر مهدي<sup>3</sup> 

<sup>1,2</sup> كلية الزراعة - جامعة الأنبار

<sup>3</sup> كلية العلوم - جامعة بغداد

\*المراسلة الى: سجى خالد قدوري العاني، قسم علوم التربة والموارد المائية، كلية الزراعة، جامعة الانبار، الرمادي، العراق.

البريد الالكتروني: [saj20g2004@uoanbar.edu.iq](mailto:saj20g2004@uoanbar.edu.iq)

### Article info

Received: 2022-11-16  
Accepted: 2022-12-19  
Published: 2024-06-30

DOI-Crossref:  
10.32649/ajas.2024.183769

### Cite as:

kudury, S. Kh., Abed, I. A. and Mahdii, B. A. (2024). The genetic diagnosis of the bacteria isolated from the agricultural soil sustained farms by the polymerase chain reaction technique qPCR. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 22(1): 625-636.

©Authors, 2024, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



### الخلاصة

جلبت نماذج تربة من محيط جذور النباتات من 14 حقل زراعي توزعت في قضاء أبو غريب ومحافظة الانبار لغرض عزل وتشخيص بكتريا تعمل PGPR ومخصبات حيوية، تستخدم كلقاحات حيوية بعد تحديد اهم خصائصها. أجريت التحاليل والقياسات للعينات في مختبرات كلية الزراعة شملت عزل الانواع البكتيرية واختبار كفاءة العزلات المثبتة للنتروجين الجوي والمذيبة لمركبات الفسفور، إذ تم الحصول على 74 عزلة بكتيرية متنوعة وتبين وجود 15 عزلة *A. chroococcum* و 13 عزلة *Az. lipoferum* و 13 عزلة *B. megaterium* و 10 عزلة *P. putida* و 10 عزلة Actinomycetes، كما حصل على بكتريا النتريجة بنوعها Nitrosmonas و Nitrobacter و 7 و 6 عزلة. اظهرت عزلات بكتريا Bacillus قدرة الاذابة لمركبات الفوسفات بمعدل قطر اذابة تراوح بين 6-11 ملم. ان نتائج فحص تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي PCR بعد استخلاص DNA من العزلات البكتيرية المعزولة من التربة. اظهرت النتائج للمجموعة الاولى (10) عزلات لبكتريا *Pseudomonas putida* عند تضخيم الجين (GltA F, GltAR)، وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 288 زوج قاعدي لبكتريا *P. putida*، بعد التأكد من تشخيص البكتريا باستعمال الطريقة الجزيئية والاختبارات الحيوية والمجهريّة والمظهرية وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصنيف بكتريا *P. putid*،

والمجموعة الثانية (10) عزلات عند تضخيم الجين (Rp ، DF o pR ) وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 478 زوج قاعدي لبكتريا *Bacillus megaterium* ويؤكد عائدتها لبكتريا *B. megaterium* اما المجموعة الثالثة (10) عزلات لبكتريا عند تضخيم الجين (N,HF f i N) (HR f i)، اذ كانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 371 زوج قاعدي لبكتريا *Azotobacter chroococcum* ويؤكد عائدتها لبكتريا بعد التأكد من تشخيص البكتيري *A. chroococcum* اما المجموعة الرابعة (14) عزلات عند تضخيم الجين (16sAZ R و 16sAZ F) وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 646 زوج قاعدي لبكتريا *Azospirillum Lipoferum* ويؤكد عائدتها لبكتريا *Az. Lipoferum* اما المجموعة الخامسة فلم يظهر أي نوع من البكتريا المثبتة للنتروجين او المذبذبة للفوسفات في تلك الحزم بعد التضخيم، وذلك بالاستناد إلى التتابع الوراثي .SrDNA 71.

كلمات مفتاحية: البكتريا، المخصبات الحيوية، SrDNA ، qPCR ، المستدامة.

## THE GENETIC DIAGNOSIS OF THE BACTERIA ISOLATED FROM THE AGRICULTURAL SOIL SUSTAINED FARMS BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE QPCR

S. Kh. kudury<sup>1\*</sup>  I. A. Abed<sup>2</sup>  B. A. Mahdii<sup>3</sup> 

<sup>1,2</sup> College of Agriculture- University of Anbar

<sup>3</sup> College of Science - University of Baghdad

\*Correspondence to: S. K. kudury, Department of Soil Science and Water Resources, College of Agriculture, University of Anbar, Ramadi, Iraq.

Email: [saj20g2004@uoanbar.edu.iq](mailto:saj20g2004@uoanbar.edu.iq)

### Abstract

The measurements and tests of the samples conducted in the laboratories of the College of Agriculture included isolating bio-fertilizers and testing the efficiency of isolates that fix atmospheric nitrogen and solubilize phosphorous compounds. Bacteria were isolated and identified from the rhizosphere soils of different plants collected from various agricultural areas. A total of 74 bacterial isolates were obtained based on the phenotypic characteristics of the developing colonies, as well as biochemical and microscopic traits. The results of isolation and identification showed that among the 74 bacterial isolates, there were 15 isolates of *A. chroococcum*, 13 of *Az. lipoferum*, 13 of *B. megaterium*, 10 of *P. putida*, 10 of Actinomycetes, and nitrifying bacteria

(Nitrosomonas and Nitrobacter) with 7 and 6 isolates respectively. Bacillus isolates demonstrated the ability to dissolve phosphate compounds with a dissolution diameter ranging between 6-11 mm. The results of the polymerase chain reaction (qPCR) examination confirmed the diagnostic results using the quantitative polymerase interaction technique after extracting DNA from bacterial isolates from the soil. The first group of 10 isolates of *P. putida* showed, when the gene (GltA F, GltAR) was amplified, resulting bundles with a molecular size of 288 base pairs for *P. putida* bacteria, confirming the diagnosis using molecular, biological, microscopic, and phenotypic tests. This match confirms the accuracy of the classification of *P. putida* bacteria. The second group of 10 isolates of *P. putida* showed, when the gene (PR o DF, PRp o DR) was amplified, resulting bundles with a molecular size of 478 base pairs for *B. megaterium*, confirming its classification. The third group of 10 isolates of bacteria showed, upon gene amplification (N i f HF, N i f HR), resulting bundles with a molecular size of 371 base pairs for *A. chroococcum* bacteria, confirming their identification. The fourth group of 14 isolates showed, when the gene (16sAZ F and 16sAZ R) was amplified, resulting bundles with a molecular size of 646 base pairs for *Az. lipoferum* bacteria, confirming its classification. The fifth group did not show any type of nitrogen-fixing bacteria or phosphate solubilizers after amplification, based on the Sr DNA 71 genotype sequence.

**Keywords:** Bacteria, Bio-fertilizer, SrDNA, Qpcr, Al gene, Sustainability.

### المقدمة

يتطلب باستمرار البحث عن مخصبات حيوية جديدة بسبب فقدان بعضها لكثير من الجينات الفعالة بتأثير ملوثات التربة والشدود البيئية وغالبا ما يتم وجود العزلات الجيدة في الحقول الزراعية المستدامة لذلك وضعت جهودنا في الأساس لإمكانية الكشف عن عزلات مفيدة وينبغي أن يستمر هذا النهج بتغطية شاملة، وقد وجد انخفاض اعداد الميكروبات في مناطق جذور المحاصيل التي كانت بنهاية موسم نمو النبات عند اخذ العينات وقد يرجع ذلك الى انخفاض فعالية الجذور مما ينتج عنه انخفاض في الكثافة العددية للميكروبات، كما اتفقت نتائج الدراسة مع ما توصل اليه (1، 2، 5، 6، 15، 22 و 23) أن الميكروبات المتواجدة في المحيط الجذري تختلف باختلاف أنواع النباتات المزروعة ويعزي مثل هذه الاختلافات إلي عدة عوامل كطبيعة الجذور وتركيب أنسجتها والإفرازات المنتجة منها (4، 9 و 12). تم عزل 18 عزلة بكتيرية من 23 عينة تربة ملوثة بالمبيدات المختلفة من مناطق بغداد على جانبي الكرخ والرصافة. اذ تم إجراء اختبائي PCR و qPCR وأظهرت النتائج لبكتريا *P. aeruginosa* أن أعلى قيمة تردد جيني مسجلة في المعاملة البيولوجية لكلورسبان (Chlorpyrifos) أما نتائج اختبار PCR فقد أظهرت وجود فروق وراثية في السلالات البكتيرية بين عزلة *P. aeruginosa*، وأن أعلى نسبة تشابه سجلتها بلغت العزلات 89% (15). اتجهت الدراسات الحديثة الى استعمال تقانات جديدة في التعرف على الاحياء وتصنيفاتها على أساس الطرائق الحديثة وتعد دراسة الجينات البكتيرية على تضخيم DNA و RNA وكذلك الجينات من الفحص الجيني للبكتريا اذ يواجه مشكله صعبه وذلك بسبب التباين الشديد بين نيوكلويتيدات الجينات بين انواع البكتريا المثبتة للنتروجين والمذيبة للفوسفات للكشف عن أنماط التهجين وتسلسلات الجينات

وتوصيف سلالات الاحياء، لذا فقد استعمل فحص DNA على نطاق واسع في تحديد اشكال النيوكلووتيدات المنفردة والكشف عن وجود طفرات وراثية وعن وجود الجينومات المقارن والتعرف على الانواع البكتيرية وتصنيفاتها وهذا بينه كلا من (8، 11 و18)، وهذه العمليات تتم عن طريق تضخيم DNA باستخدام PCR تقايل البلمرة المتسلسل وتحديد جينات معينه في أنواع البكتريا والكشف عن هذه الأنواع وتصنيفها ضمن مجموعاتها (10 و14).  
اذ تستخدم تقنية (PCR) للاستدلال والانتماء والنشوء والتطور بين المجتمعات الاحيائية كما انها تستعمل لاختبار نقاء السلالات البكتيرية الرصد وعزل البكتريا من البيئة (5، 13 و16). تتم دراسة بكتريا المثبتة للنتروجين والمذبية للفوسفات بالتشخيص الجزيئي من أجل الكشف عنها وتحديد أنواع البكتريا باستعمال تقنية PCR واستعمال الفحص الوراثي بصورة ادق (3 و22) وهذا ما توصل اليه (20 و21) في دراسة للكشف عن أنواع بكتريا المثبتة للنتروجين والمذبية للفوسفات عن طريق تحديد برايمرات PCR، ويتم الكشف عن الاشكال والانواع عن طريق DNA بين سلالات من نفس النوع باستعمال PCR والتنوع البكتيري ونسب الحزم العائدة لكل نوع من البكتريا والمتسلسل وغيرها من بكتريا التربة السالبة او الموجبة لملون كرام كما يمكن استعمالها في تصنيف البكتريا عن طريق استعمال PCR وعملية الاستنساخ والتمييز بين البكتريا من حيث الأنواع والسلاسل (7، 19 و21). اذ تم عزل عزلات من البكتريا المثبتة للنتروجين والمذبية للفوسفات من منطقة الرايزوسفير في التربة والكشف عنها بواسطة DNA واعادة تلقيحها على بعض النباتات ودراسة التغيرات التي تجري عليها، كما تم أخذ عزلات من منطقة الرايزوسفير في التربة للبكتريا وتحديد أنواعها وأصنافها وتحديد سلالاتها اعتمادا على استعمال DNA وتضخيم PCR - في تشخيص وتصنيف هذه الاحياء (11 و15). تهدف الدراسة الى تحديد التنوع الحيوي والاستدامة عن طريق عزل وتشخيص المخصبات البكتيرية الكفوة من عدة حقول والكشف عن عزلات كفوة ونشطة في بيئة التربة لمصلحة النبات مع الحفاظ على نشاط المخصبات لاستدامه الحقول الزراعية.

### المواد وطرائق العمل

أجريت سلسلة من الفحوصات والاختبارات لغرض تشخيص جنس عزلات البكتريا المعزولة من عينات التربة المستخدمة أجريت عملية عزل البكتريا المذبية للفوسفات بتقنية التخافيف العشرية وصب الأطباق (9 و15)، إذ وضع 1 مل من تلك التخافيف في أطباق بترى معقمة محتوية على وسط Pikovskaya's (6) معقم بالمؤصدة وبعد وصوله لدرجة الحرارة 47 م ثم صب وحركت الاطباق حركة مدوره ثم تركت للتصلب الاوساط ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة  $28 \pm 2$  لمدة 72 ساعة في الحاضنة وللتعرف على المستعمرات البكتيرية المذبية للفوسفات والتي أمكن تمييزها من خلال تكوينها هاله شفافة رائقة حول مستعمراتها كدلالة على إذابة الراسب الفوسفاتي المتكون وسجلت اقطار الهالة الشفافة وعدد المستعمرات النامية (9 و12)، أجريت عملية عزل البكتريا المثبتة للنتروجين بتقنية التخافيف العشرية وصب الأطباق (11) على وسط الفوسفاتية المانيتول YEMA، وللتعرف على المستعمرات البكتيرية المثبتة للنتروجين والتي أمكن تمييزها من خلال تكوينها مستعمرات بيضاء اللون زجاجية او تبنية او صفراء اللون (4). انتخبت العزلات للمستعمرات المميزة لإذابة مركبات الفوسفات المثبتة للنتروجين حسب قطر الاذابة وأعيد زراعتها على وسط الاكار المغذي المائل Slant Nutrient Agar لغرض معرفة كفاءتها في

أذابة مركبات الفوسفور، وشخصت البكتريا المعزولة في مركز التقانات الغذائية والإحيائية ومختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا وقد اشتملت فحوصات التشخيص على الخواص المزرعية للمستعمرات على الاوساط الزرعية، واجريت الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية وفحص DNA (12، 14 و16). درست الصفات المزرعية لمستعمرات العزلات على وسط الصلب Agar Sucrose mineral- salt SMSA. ثم الحصول على عزلات نقية من البكتريا (BSP) Bacteria soluble phosphate و(BNF) Bacteria fixation nitrogen. استكمل تشخيصها بواسطة تفاعل سلسلة (PCR) استخلص DNA من العزلات البكتيرية المثبتة للنتروجين والمذبية للفوسفات المنمات كلا حسب الوسط المناسب (وسط الخميرة - المانيتول السائل - وسط البيكوفسكيا - وسط Nutrient Agar) واستخلص الحامض النووي DNA حسب الخطوات المثبتة والمرفقة مع العدة المجهزة من الشركة المصنعة (الجدول 1) لاستخلاص DNA مع استخدام البرايمرات التابعة للبكتريا، اذ تم نقل 100 مل من محلول يحتوي على خلايا البكتريا الى انبوبة 10 مل ثم نقلت الى جهاز الطرد المركزي 1 دقيقة -14000 16000 دوره بالدقيقة تم التخلص من الراشح، ثم اضيف 180 مايكرو لتر GT Buffer ثم اضافه 20 مايكرو لتر)، وحضنت بدرجة 60 °C لمدة 10 دقائق وخلال مدة الحضانة قلبت الأنبوبة كل 3 دقائق وإضافة 200 مايكرو لتر GB بفر وخط بجهاز الرج 10 ثواني ثم حضن عند 70 لمدة 10 دقائق إلى ان تحول لونه الى صافي وخلال مدة الحضانة قلب كل ثلاث دقائق ثم حضر Elution بفر، إضافة 200 مايكرو لتر من Absolut ethanol إلى العينة ثم خلطت جيداً، بعد ظهور الراسب تم كسيرة باستعمال أنبوب زجاجي ثم حولت الى GD Colim بعد تركيبه في انبوبة جهاز الطرد المركزي 16000- 14000 لمدة 2 دقيقة، للتخلص من الراشح في انبوبة التجميع ثم نقل GO الى انبوب تجميع جديد، إضافة 400 مايكرو لتر من Wash Buffer الى عمود GD ثم الى جهاز الطرد المركزي 10000 دوره لمدة 30 ثانية، إضافة 600 مايكرو لتر W. Butter ثم جهاز الطرد المركزي 10000 دوره لمدة 30 ثانية، ثم خلص من الراشح في أنبوب التجميع ثم نقل GD الى انبوب جديد ثم جهاز الطرد المركزي 10000 دورة المدة 3 دقائق لكي يجف الخليط، نقل GD الى أنبوب جديد 1.5 مل واطيف 100 مايكرو لتر من بفر، اضاف عمود E.Buffer في أنبوبة ثم حضر وعقم الماء المقطر لغرض استعمالها في PCR. ثم حضر محلول PCR المكون من مزيج التفاعل (بحجم 20 مايكرو لتر) لسلسلة تفاعلات البلمرة اذ حضر مزيج التفاعل في أنابيب PCR Per Mix tube بإضافة 5 مايكرو لتر من DNA العزلة و5 مايكرو لتر من Master mix الحاوي على مكونات DNA تفاعل البلمرة ثم أضيف 5 مايكرو لتر من الماء الأيوني و2.5 مايكرو لتر من البادي، الأمامي و2.5 مايكرو لتر من البادي، العكسي لكل بكتريا للحصول على حجم 20 مايكرو لتر. بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة ثم علق الأنابيب مع الرج بعناية بجهاز Vortex لمدة 5 ثوان ونقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermo cycler PCR من نوع Prime Thermal Cycler DNA (Amplification) UK بعد أن تم برمجته على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermo.

جدول 1: تسلسل او تتابع البادئ المستخدم في تضخيم RAPD المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل .PCR

Isolates	Primer	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	A aneling	Product
<i>Pseudomonas putida</i>	GltA F	GGTGACAATGGCATTCTGC	19	59	288
	GltAR	GTGCTGCGGGTTATTGATGT	20	59	288
<i>Bacillus megaterium</i>	R p o D F	ATTACACGTGCCATTGCAGA	20	58	478
	R p o D R	ATTTGCGAAGTGCTTTTGCT	20	58	478
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Nif H F	GGTTGTGACCCGAAAGCTGA	20	59	371
	Nif H R	GCGTACATGGCCATCATCTC	20	59	371
<i>Azospirillum Lipoferum</i>	16sAZ F	GCGGTAATACGAAGGGGGC	19	59	646
	16sAZ R	CTTGTCACCGGCAGTTCCACCAG	23	59	646

Table 1. The sequence of the primer used to amplify the RAPD used in the polymerase chain reaction (PCR).

Then, pure isolates of bacteria were obtained (Bacteria soluble phosphate (BSP) and Bacteria fixation nitrogen (BNF). Their diagnosis was completed using a chain reaction (PCR). DNA was extracted from the nitrogen-fixing and phosphate-soluble bacterial isolates according to the appropriate medium (yeast medium - liquid mannitol - Albikovskaya - Nutrient Agar medium) and DNA extraction according to the proven steps included with the kit prepared by the manufacturer.

### النتائج والمناقشة

عملية المسح الميداني والتحري في الحقول المستدامة في محافظة الانبار وابو غريب التي بلغت 14 موقع والتي انتخبت بناءً على مساحة وعمر الحقول والتاريخ الزراعي لها والتنوع البيئي والمكاني، وشملت العينات التي جمعت مزارع مستدامة في مناطق البوعيثة وابوغريب والنعيمة وعامرية الفلوجة والرمادي والصوفية والنعيمة (الزعانثة) والحبانية والرحالية والفلوجة والصفلاوية وهيت وبصاير والمحمدي وجد ان هذه الحقول مزروعة بمحاصيل متنوعة (فلفل ولوبيا وجت وشعير وخضروات وطماطة وحنطة وبطاطا وبرسيم ولوبيا وشعير وباذنجان وحمضيات ومشمش). بينت النتائج لعينات التربة التي اختيرت من حقول زراعية استمرت زراعتها خلال مدد تراوحت بين 33 و25 سنة الحصول على 76 عزلة بكتيرية متنوعة.

جدول 2: عدد العزلات البكتريا الكلية المذيبة لمركبات الفوسفات والمثبتة للنتروجين والذاتية والرمية التغذية.

Autotrophic	Heterotrophic	BSP	N-fixation	No. Isolates	Isolates
0	15	7(4-6 mm)	15	15	<b>A.chroococcum</b>
0	13	13(6-10 mm)	0	13	<b>B.megaterium</b>
0	13	4(3-5 mm)	13	13	<b>Az.Lipoferum</b>
0	10	10(5-9 mm)	3	10	<b>P. putida</b>
0	10	6(4-7 mm)	2	10	<b>Actinomyces</b>
7	0	0	0	7	<b>Nitrosmonas</b>
6	0	0	0	6	<b>Nitrobacter</b>
13	61	40	33	74	<b>Total isolates</b>

Table 2. Number of P-solubilizing, N-fixation-bacterial isolates (Autotrophic and Heterotrophic).

It was found that there were chroococcum.A 15 isolates, megaterium.B 13 isolates, putida.P 10 isolates and lipoferum. Az 13 isolates and Actinomycetes 10 isolates, and nitrifying bacteria of both types, Nitrosmonas 7 isolates and Nitrobacter 6 isolates, were present. The highest rate of biodiversity of isolates was found in the Fallujah Naimiya field, an area of 11 hectares, planted with pepper, with 11 species, while the lowest rate of presence was 2 species in the soil of the Hit Basayer 2 field cultivated. With palm trees, with an area of 4 hectares. Bacillus bacteria isolates showed the ability to dissolve

phosphate compounds with a dissolution diameter ranging between 6-11 mm, followed by *Pseudomonas* bacteria isolates with a dissolution diameter ranging between 5-9 mm.

وتبين وجود *A.chroococcum* 15 عزلة و *B. megaterium* 13 عزلة و *P.putida* 10 عزلة و *Az. lipoferum* 13 عزلات و Actinomycetes 10 عزلات، كما تواجدت بكتريا النتريجة بنوعيهما Nitrosmonas 7 عزلات و Nitrobacter 6 عزلة، وان اعلى معدل للتنوع الحيوي للعزلات وجد في حقل فلوحة نعيمية مساحة 11 هكتارا المزروع بالفلفل وجود 11 نوع بينما اقل معدل وجود 2 نوع في تربة حقل هيت بصاير 2 المزروعة بالنخيل وبمساحة 4 هكتارات. واطهرت عزلات بكتريا *Bacillus* قدرة الاذابة لمركبات الفوسفات بمعدل قطر اذابة تراوح بين 6-11 ملم، تلتهما عزلات بكتريا *Pseudomonas* بقطر اذابه تراوح بين 5-9 ملم. كما بينت نتائج اختيار الكتلة الحيوية للعزلات البكتيرية المشخصة بتقنية PCR 14 للمواقع المختلفة واختيرت العزلات المتشابهة بالاعتماد على اعلى معدل للكتلة الحيوية (OD) فكانت اعلى قيمة للكتلة الحيوية لبكتريا *P. putida* و *B. megaterium* و *Az. lipoferum* و *A. chroococcum* Actinomycetes للعزلات اذ بلغت 1.400، 0.745، 0.82، 0.806 و 0.729.

تبين من النتائج ان طبيعة ونوع وكثافة النباتات السائدة تلعب دورا في سيادة أجناس وأنواع معينة من البكتيريا، إضافة إلى أن جميع العوامل البيئية اثرت هي الأخرى في أعداد وأنواع البكتيريا السائدة في التربة، وقد وجد (13 و 17) سيادة بعض الأجناس البكتيرية على عكس اجناس اخرى، اذ احتوت بعض الترب على بكتريا ذاتية التغذية وأخرى عضوية التغذية، وهذا يعني وجود منطقة رايزوسفير مناسبة لنمو ونشاط وتكاثر البكتريا وزيادة اعدادها (7)، (17 و 18). وقد وجد انخفاض اعداد الميكروبات في مناطق جذور المحاصيل التي كانت بنهاية موسم نمو النبات عند اخذ العينات وقد يرجع ذلك الى انخفاض فعالية الجذور مما ينتج عنه انخفاض في الكثافة العددية للميكروبات، كما اتفقت نتائج الدراسة مع ما توصل اليه (21 و 23) أن الميكروبات المتواجدة في المحيط الجذري تختلف باختلاف أنواع النباتات المزروعة ويعزي مثل هذه الاختلافات إلى عدة عوامل كطبيعة الجذور وتركيب أنسجتها والإفرازات المنتجة منها (1، 2 و 8).

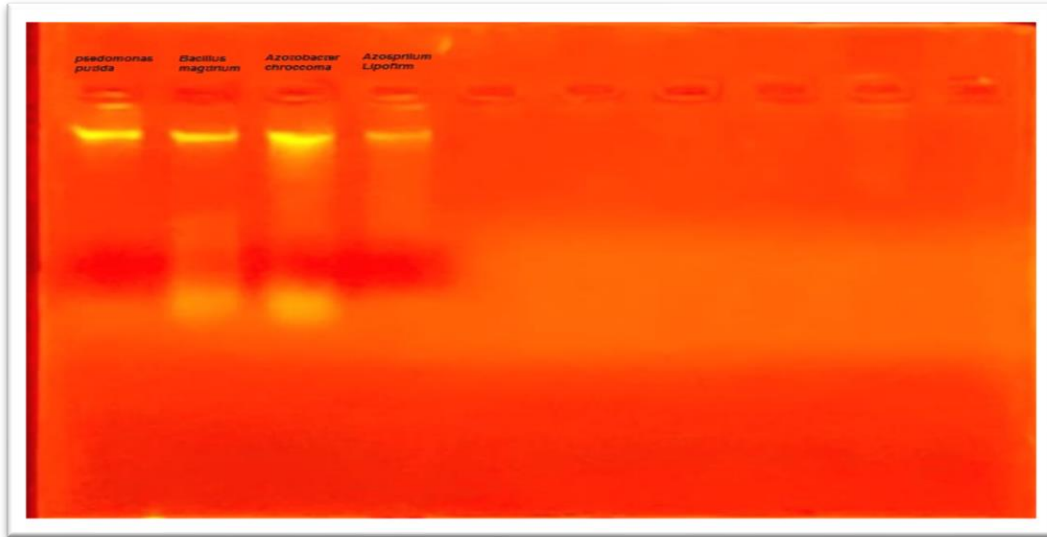
جدول 3: الكتلة الحيوية للعزلات البكتيرية المشخصة عند الطول الموجي 600 نانوميتر.

Az.Lipoferum	A.chroococcum	B.megaterium	P.putida	Actinomyces	No.
0.806	0.057	0.458	0.860	0.572	A1
0.572	0.820	0.681	0.671	0.140	A2
0.689	0.170	0.726	0.271	0.098	A3
0.707	0.140	0.745	0.781	0.483	A4
0.380	0.095	0.483	0.461	0.729	A5
0.292	0.098	0.306	0.700	0.113	A6
0.385	0.080	0.446	0.729	0.588	A7
0.770	0.088	0.671	0.588	0.726	A8
0.465	0.113	0.461	0.606	0.770	A9
0.292	0.154	0.350	0.3110	0.605	A10

Table 3. Bio-Mass of Characterized bacterial isolate at 600 nm.

The results of selecting the biomass of the bacterial isolates diagnosed using the PCR technique showed 14 for the different locations, and similar isolates were selected based on the highest rate of biomass (OD). The highest biomass value was for *B. putida*. 745.0, 82.0, 0.806 and 729.

التعبير الجيني Gene expression: تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي PCR للعزلات البكتيرية: بينت نتائج التحري الاولي عن DNA المستخلص من العزلات البكتيرية وظهور حزم DNA كما في الصورة 1 مما يؤكد دقة طريقة الاستخلاص إذ تم اختيار 43 عزلة من البكتريا من أصل 74 عزلة بكتيرية بعد تشخيصها مظهرها من خلال الاطباق الزرعياً والمجهريةً بواسطة الاختبارات الكيموحيوية. كما وضحت نتائج الصورة 2 تشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من الترب الزراعية المستدامة في محافظة الانبار وابوغريب باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، بعد استخلاص DNA من العزلات البكتيرية المعزولة من التربة اذ اظهرت النتائج للمجموعة الاولي (3) عزلات لبكتريا *P. putida* عند تضخيم الجين (GitA F، GitAR) باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR نتائج التضخيم لهذا الجين، وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 288 زوج قاعدي لبكتريا *P. putida* اذ اظهرت النتائج ان العزلات تحتوي على نفس الجين وبنفس الحجم الجزيئي ويؤكد عائديتها لبكتريا *P. putida* بعد التأكد من تشخيص البكتريا باستعمال الطريقة الجزيئية والاختبارات الحيوية والمجهرية والمظهرية وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصنيف بكتريا *P. putida*.



صورة 1: توضح تفاعل البلمرة المتسلسل لنواتج DNA التي استخلصت من العزلات البكتيرية والمرحلة على هلام الاكاروز بنسبة 2%.

Figure 1. The electrophoresis of the agarose gel (2%) of the total DNA extracted from bacterial isolates. The results of the initial investigation of the DNA extracted from the bacterial isolates showed the appearance of DNA bands as in picture 1, which confirms the accuracy of the extraction method, as 43 bacterial isolates were selected out of 74 bacterial isolates after they were diagnosed phenotypically through culture and microscopic dishes by means of biochemical tests.

والمجموعة الثانية (10) عزلات عند تضخيم الجين (DR o Rp، DF o pR) وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 478 زوج قاعدي لبكتريا *B. megaterium* اذ اظهرت النتائج ان العزلات تحتوي على نفس الجين وبنفس الوزن الجزيئي ويؤكد عائديتها لبكتريا *B. megaterium* بعد التأكد من تشخيص البكتريا باستعمال الطريقة الجزيئية والاختبارات الحيوية والمجهرية والمظهرية وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصنيف بكتريا *B. megaterium* اما المجموعة الثالثة (10) عزلات لبكتريا عند تضخيم الجين (HR Nif، HF Nif)، اذ كانت



الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 371 زوج قاعدي لبكتريا *A. chroococcum* اذ اظهرت النتائج ان العزلات تحتوي على نفس الجين وبنفس الوزن الجزيئي ويؤكد عائديتها لبكتريا بعد التأكد من تشخيص البكتريا *A. chroococcum* باستعمال الطريقة الجزيئية والاختبارات الحيوية والمجهرية والمظهرية وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصنيف بكتريا *A. chroococcum*. اما المجموعة الرابعة (10) عزلات عند تضخيم الجين ( 16sAZ F و6sAZ R) وكانت الحزم الناتجة ذات الحجم الجزيئي 646 زوج قاعدي لبكتريا *Az. Lipoferum* اذ اظهرت النتائج ان العزلات تحتوي على نفس الجين وبنفس الوزن الجزيئي ويؤكد عائديتها لبكتريا *Az. Lipoferum* بعد التأكد من تشخيص البكتريا *Az. Lipoferum* باستعمال الطريقة الجزيئية والاختبارات الحيوية والمجهرية والمظهرية وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصنيف بكتريا *Az. Lipoferum* اما المجموعة الخامسة فلم يظهر أي نوع من البكتريا المثبتة للنتروجين او المذيبة للفوسفات في تلك الحزم بعد التضخيم من وهذه النتائج تتفق مع عدد من الدراسات السابقة (14، 15 و22).



صورة 2: الترحيل الكهربائي لتفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد PCR Multiplex لسلسلة DNA باستعمال البوادئ معاملة السيطرة بتركيز الاكاروز 1.5M%.

Figure 1. The electrophoresis of gel agarose (1.5%) using primers of bacterial isolates. The results of image 2 showed the diagnosis of bacterial isolates isolated from sustainable agricultural soils in Anbar and Abu Ghraib governorates using polymerase chain reaction (PCR) technology, after extracting DNA from the bacterial isolates isolated from the soil.

### الاستنتاجات

نجحت الدراسة في تنفيذ فحوصات PCR لتحديد عزلات تستخدم مخصبات حيوية في الحقول الزراعية كانت مصادرها الحقول الزراعية المستدامة. وهكذا، وضعت جهودنا الحالية الأساس لإمكانية الكشف عن عزلات مفيدة اخرى، وينبغي أن يستمر هذا النهج بتغطية شاملة. توفر دراستنا تحديد مصادر المخصبات والحصول عليها والتي يمكن تنفيذها بشكل ملائم في البلدان النامية والمتوسطة الدخل، والتي يمكن تنفيذها وبأسعار معقولة.

### Supplementary Materials:

No Supplementary Materials.

### Author Contributions:

Saja Khalid kudury has searched and contributed to writing this article. Idham Ali Abed and Beadaa Abdalqader Mahdii have designed the paper.

**Funding:**

The funders had no role in preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:**

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the protocol, Soil and Water Resources Dep. Collage of Agriculture, University of Anbar, IRAQ.

**Informed Consent Statement:**

No Informed Consent Statement.

**Data Availability Statement:**

Data Availability Statement.

**Conflicts of Interest:**

The authors declare that they have no known competing financial or non-financial, professional, or personal conflicts that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Acknowledgments:**

The authors are thankful for the help of the College Dean, and the Head of the Soil and Water Resources Sciences Dept. The College of Agriculture, University of Anbar, Iraq. We would also like to thank the graduate students for their valuable help and technical assistance in conducting this research.

**Disclaimer/Journal's Note:**

The statements, opinions, and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of AJAS and/or the editor(s). AJAS and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions, or products referred to in the content.

**المصادر**

1. Abdulilah, H. A. Q., Ali Abed Al-Asafi, E., and Hameed, A. T. (2019). Role of rhizobia (*Rhizobium meliloti*) of alfalfa in the bioremediation of contaminated soil with hydrocarbons. *Plant Archives*, 19: 146-152.
2. Abed, I. A., Marzoog, A., Addaheri, A. M. S., and Al-Issawi, M. H. (2022). Isolation and diagnosis of cadmium-resistant bacteria and its potential phytoremediation with the broad bean plant. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 54(2): 416-425. <http://doi.org/10.54910/sabrao2022.54.2.17>.
3. Adams, J. P., Brown, M. J., Diaz-Rodriguez, A., Lloyd, R. C., and Roiban, G. D. (2019). Biocatalysis: A pharma perspective. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 361(11): 2421-2432. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900424>.
4. Al-Hammadi, M., and Iman, A. (2014). Recognizing the effect of different plants growth on the microbial community in both soil and the Rhizosphere Soil and water department, Tripoli University, Libya, *Assuit J. Agric*, 45(5): 90- 102.
5. Allobaidy, B. S. J., Al-Joboory, W., and Al-Esawi, J. S. E. (2020). Effect of bio-fertilizer and salicylic acid on dry weight and leaf content of some nutrient elements of fenugreek plant under saline stress. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, 16: p1935.
6. Allobaidy, B. S. J., and Al-joboory, W. (2021). The Effect of Bio and Mineral Fertilizers on Growth and Yield of Wheat (*Triticum estivum* L.). In IOP

- Conference Series: Earth and Environmental Science, 761(1): p. 012004. DOI: 10.1088/1755-1315/761/1/012004.
7. Calvo, P., Zebelo, S., McNear, D., Kloepper, J., and Fadamiro, H. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *Journal of Plant Interactions*, 14(1): 224-231. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1602887>.
  8. Cárceles Rodríguez, B., Durán-Zuazo, V. H., Soriano Rodríguez, M., García-Tejero, I. F., Gálvez Ruiz, B., and Cuadros Tavira, S. (2022). Conservation agriculture as a sustainable system for soil health: A review. *Soil Systems*, 6(4): 87. <https://doi.org/10.3390/soilsystems6040087>.
  9. Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., and Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and environmental microbiology*, 71(7): 4117-4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>.
  10. Hai, B., Diallo, N. H., Sall, S., Haesler, F., Schauss, K., Bonzi, M., ... and Schloter, M. (2009). Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 75(15): 4993-5000. <https://doi.org/10.1128/AEM.02917-08>.
  11. Igiehon, N. O., and Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International journal of environmental research and public health*, 15(4): 574. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>.
  12. Kudury, S. K., Abed, I. A., and Mahdi, B. A. (2023). The Effect of Local Bio Fertilizer and Their Enzymatic Activity on Growth of Maize Plant and some Biological Therites in the Soil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1252(1): p. 012050. DOI: 10.1088/1755-1315/1252/1/012050.
  13. Kudury, S. K., Abed, I. A., and Mahdii, B. A. (2023). Microbial Fertilizers existence and its relationship to heavy metals in some sustainable agricultural in Anbar Governorate. *Anbar Journal of Agricultural Sciences*, 21(1): 44-53. DOI: 10.32649/AJAS.2023.179714.
  14. Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., and Song, P. (2005). Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88(1): 136-155. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.1.136>.
  15. Mahdii, B. A., and Turke, A. M. (2020). The relationship between gene expression and Biodegradation of clorspan and ground up pesticides by *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Ecology, Environment and Conservation*, 26: 9-17.
  16. Naji, H. F. . . , & AL-Jabber , M. A. . (2024). Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Iraqi Hospitals. *Journal of Life Science and Applied Research*, 5(1), 8–15. <https://doi.org/10.59807/jlsar.v5i1.93>.

17. Owaid, M. N., Muslat, M. M., and Abed, I. A. (2018). Mycodegradation of reed straw, *Phragmites australis*. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, 8(2): 290-297. DOI: 10.5943/cream/8/2/12.
18. Rashid, H. M., Abed, I. A., and Owaid, M. N. (2018). Effect of *Sesbania sesban* on cultivation of *Agaricus bisporus*, Basidiomycota, and properties of spent mushroom compost outcome. *Open Agriculture*, 3(1): 652-657. <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0068>.
19. Salim, S. A., Al-Hadiethy, I. K. H., Abed, I. A., and AlKubaisy, S. A. (2021). Effect of sewage sludge on heavy metals accumulation in soil and wheat, mung bean and quinoa crops. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 761(1): p. 012013. DOI: 10.1088/1755-1315/761/1/012013.
20. Sharma, K. L., Rao, C. S., Chandrika, D. S., Nandini, N., Munnalal, Reddy, K. S., ... and Kumar, T. S. (2016). Assessment of GMean biological soil quality indices under conservation agriculture practices in rainfed Alfisol soils. *Current Science*, 11(8): 1383-1387.
21. Singh, G., Bhattacharyya, R., Das, T. K., Sharma, A. R., Ghosh, A., Das, S., and Jha, P. (2018). Crop rotation and residue management effects on soil enzyme activities, glomalin and aggregate stability under zero tillage in the Indo-Gangetic Plains. *Soil and Tillage Research*, 184: 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.08.006>.
22. Thwaini, Q. S., Abed, I. A., and Alrawi, A. A. (2021). Evaluation of the efficiency of date seeds as a carrier of pgpr inoculants under different storage temperature. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 761(1): p. 012021. DOI: 10.1088/1755-1315/761/1/012021.
23. Van Groenigen, K. J., Bloem, J., Bååth, E., Boeckx, P., Rousk, J., Bodé, S., ... and Jones, M. B. (2010). Abundance, production and stabilization of microbial biomass under conventional and reduced tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.023>.
24. Zakaria, L., Kulaveraasingham, K., Tan, S. G., Abdullah, F., and Ho, Y. W. (2005). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Random Amplified Microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from Infected Oil Palm and Coconut Stumps in Malaysia. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 13(1): 23-34.