

IJST

INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

Vol. (11), NO. (4)- DECEMBER 2016

ISSN:2305-9346

SJIF: 4.487/ICV:4.32/GIF:0.81

www.ijst-jo.com

IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology

المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا

Volume 11. No. 4/ December 2016 / ISSN: 2305-9346

A Refereed Scientific Journal Since 2006

مجلة علمية محكمة منذ عام 2006

Issued By:

The International Centre for Advancement of Sciences and Technology

In a cooperation with TSTC - Jordan

IJST Contact Information:

P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan

Tel. +962796543469

E-mails: info@ijst-jo.com / ijst.jordan@yahoo.com

URL: www.ijst-jo.com



Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.

(Editor-in- Chief)

Professor of Microbiology / Dept. of Medical Laboratory Sciences / Faculty of Sciences / Al-Balqa' Applied University / Al- Salt / Jordan
shammari@ijst-jo.com

Abbas, Jamal A.

Professor of Plant Ecophysiology / Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq
phdjamal@yahoo.com

Abdul- Ghani, Zaki G.

Professor of Microbiology/ Faculty of Pharmaceutical Sciences / Amman Private University / Jordan
zaki_abdulghani@yahoo.com

Abdul- Hameed, Hayder M.

PhD in Environmental Engineering / Environmental Engineering Dept./ Faculty of Engineering/ University of Baghdad/ Iraq
hayderalmunshi@yahoo.com

Abdullah, Ahmed R.

PhD in Cancer Immunology and Genetics /Biotechnology Research Centre / Al- Nahrain University / Baghdad / Iraq
ahmedrushdi1970@yahoo.com

Al- Daraji, Hazim J.

Professor of Avian Reproduction and Physiology / Animal Resources Dept./ College of Agriculture / University of Baghdad / Iraq
prof.hazimaldaraji@yahoo.com

Al- Douri, Atheer A. R

PhD in Microbiology/Faculty of Veterinary Medicine/ University of Baghdad / Iraq
aaldouri96@yahoo.com

Al- Faris, Abdulbari A.

Professor of Surgery / Dept. of Surgery and Obstetrics / College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Iraq
Vetedu2000@yahoo.com

Al- Jashami, Najim A.

Professor of Nuclear Material Sciences / Dept. of Physics / College of Sciences / Kufa University / Iraq
na_phys@yahoo.com

Al- Mashaykhi, Akram Othman

PhD in IT / Amman Arab University for Graduate Studies / Jordan
akram.othman@gmail.com

Al- Mathkhoury, Harith J F.

Professor of Medical Microbiology / Dept. of Biology / College of Sciences / University of Baghdad/ Iraq
harith_fahad@yahoo.com

Al- Murrani, Waleed K.

Professor of Genetics and Biostatistics / University of Plymouth/ UK
profmurrani@yahoo.com

Al- Noor, Nadia H.

PhD. in Statistics, Mathematical Statistics / Dept. of Mathematics / College of Sciences / Al-Mustansiriya University / Baghdad / Iraq

Al- Noor, Taghreed H.

Professor of Chemistry / Dept. of Chemistry / College of Education – Ibn Al- Haitham / University of Baghdad / Iraq
drtaghreed2@gmail.com

Al- Samarrai, Taha H.

PhD. in Microbiology / Dept. of Medical Laboratory Sciences / College of Applied Sciences / University of Samarra / Iraq
tahaalsamarrai@gmail.com

Al- Saqur, Ihsan M.

Professor of Parasitology/ Faculty of Sciences / University of Baghdad / Iraq
drihsanalsagur@yahoo.com

Al- Shamaony, Loai

Professor of Biochemistry / Faculty of Pharmacy / Misr University for Sciences and Technology / Egypt
loaialshamaony@yahoo.com

Al- Shebani, Abdullah S.

PhD in Dairy Sciences and Technology / Food Sciences Dept./ Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq
Agrifood43@yahoo.com

Alwachi, Sabah N.

Professor of Physiology / Biology Dept./ College of Sciences/ University of Baghdad / Iraq
sabahalwachi@yahoo.com

Khamas, Wael

Professor of Anatomy and Histology / College of Veterinary Medicine / Western University of Health Sciences / Poma -California/ USA
wael_khamas@yahoo.com

Lafi, Shehab A.

Professor of Medical Microbiology / College of Medicine / Al- Anbar University / Iraq
shehab_6555@ymail.com

Editorial Executive Director

Pharmacist. Nansi Elian

Amman- Jordan
ijst.jordan@yahoo.com

FORWARD

Dear Colleagues,

Today, I write you about how our journal is moving to the new volume as we are now at the end of year 2016, eleven years without stop, despite the challenges we faced, and despite all constraints that our beloved Arab countries have while they are looking for more development achievements. What I want to say, is that the only weapon, as well as the tool to proceed to the gate of development is science and how we can use and adopt all the ways that make our cultures, our thoughts and our talents and research efforts to be converted into practices to improve life for us and for the coming generations and let the other parts of the world listen to us very appreciately.

For all what we achieved, I would like to present my deepest thanking and great recognitions for all people and institutes who faithfully gave IJST their concerns, their cares, and their patiences to keep it as one of the leading journals in Arab and international worlds. With you all, IJST is now here, and will continue as long as we breath, as we believe on our goal, and as we have the power from God to be with you.

As 2016 is about to move to the end, the Editor-in- chief, would like to take this opportunity to thank you all and wish you a prosperous 2017.

IJST was a fruitful effort issued by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology – ICAST, which tries to take part in both globalization and revolution in information and communication technologies, because S&T development becoming not only the key elements of economic growth and industrial competitiveness, but also essential for improving the social development, the quality of life and global environment. ICAST took then a decision to establish a scientific alliance with TSTC (Tharwa for scientific Training & Consultations) and this alliance comes to support the efforts towards publishing IJST.

Today, we announce a new issue of our journal, that is the fourth issue from the eleven volume of IJST, December , 2016.

Finally, I hope that all significant figures of sciences whom joined the editorial board, the researchers, and the readers of our journal will keep IJST between their eyes and contribute in continuing its journey, with their remarks, valuable recommendations and their researching outcomes.

Thanks a lot for all who support IJST.

Editor-in-Chief

IJST

Abdul Jabbar Al- Shammari

The Referees for this Issue

** The referees and advisory group below are listed according to alphabetical order, with deep appreciation for all.*

Prof. Abdul- Jabbar N. Al- Shammari

Dept. of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Prof. Abdulbari A. Al- Faris

College of Veterinary Medicine ,University of Basra. Iraq

Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shebani

Dept. of food sciences, Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq

Dr. Abdul-Wahab R. Hamad

Al-Zarqa University College. Jordan

Dr. Ahmed A. Al- Darraji

Colege of Dentistry, University of Wassit. Iraq

Dr. Atheer A.R. Al- Douri

College of Veterinary Medicine, University of Baghdad. Iraq

Dr. Hala Al Daghistani

Dept. of Medical Laboratory Sciences , College of Sciences , Al- Balqa' Applied University. Jordan

Prof. Harith F. Al- Mathkhouri

College of Sciences, University of Baghdad. Iraq

Prof. Hazim J. Al- Darraji

Animal Resources Dept., College of Agriculture , University of Baghdad . Iraq

Dr. Ibraheem N. Al- Tarawneh

Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Prof. Jamal A. Abbas

Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq

Dr. Loay Rahman

Dept. of Chemistry, Howard University, Washington DC. 20060 USA.

Prof. Mahmoud M. Othman Matar

College of Medicine, Al- Najah National University. Palestine

Prof. Mjid A. Al- Attar

Turunto / Canda.

Dr. Moayyad Al- Khataybeh

Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Prof. Najim A. Al- Jashami

Dept. of Physics, College of Sciences , University of Kufa. Iraq

Dr. Shaima B. Al- Bardwil

University of Sharjah. United Arab Emirates

Prof. Taha H. Al- Samarrai

College of Sciences, University of Samarra. Iraq

Prof. Waleed Al- Murrani

University of Plymouth , United Kingdom

Prof. Ziad M. Abood

Dept. of Physics, College of Education , Al-Mustansiriah University. Iraq.

TABLE OF CONTENTS

** Articles in this issue are listed below according to field specialties order, starting by English section and followed by Arabic section.*

(I) ENGLISH SECTION

BIOLOGY

Ethyl alcohol induced pathological changes in male reproductive system of albino rats 7- 11

Genan A. Al- Bairuty, Hanady S. Al-shmgani & Mohammed N. Taha

BIOTECHNOLOGY

Expression of the relation between serological and tumor markers with estrogen receptor of breast cancer in Iraqi women 12 -16

Qabas I. Abdul Majeed, Ali S. Jabbar & Mohialdeen Y. Majid

CHEMISTRY

Novel spectrophotometric method for determination of the 1,4- dioxane in cosmetics available in the Iraqi market 17-21

Khalaf. F. A. Alsamarrai, Abdul-Hamid M. Hamoudi & Hala S. Ahmed

DENTISTRY

Dental caries in relation to nutritional status among institutionalized and non-institutionalized orphans in Baghdad city 22-27

Aseel M. Abdul Majeed Al-Bermani & Zainab A. A. Al-Dahan

Evaluation of osseous changes associated with clinically diagnosed group II temporomandibular disorders using cone beam computed tomography

Wafaa J. Hussein, Jamal N. Ahmed & Zainab H. Al-Ghurabi 28-32

Oral health status in prediabetes in relation to Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in Iraqi subjects 33-37

Hussein A. Saleh & Rajaa H. Aljubouri

ENGINEERING

Effect of additives' ratios on workability and strength of self-compacting concrete 38-44

Abdulmir Atalla, Hanadi A. Lateef & Aws A. Ali

MICROBIOLOGY

Antibiotic susceptibility pattern and plasmid profiling of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Baghdad hospitals 45-51

Aidaa H. Ibrahim, Munira CH. Ismael, Amin A. Sabbar, Saja F. Hameed & Ghuroob D. Dhamad

Contamination of baby creams and lotions with objectionable and non-objectionable microorganisms in Jordanian markets 52-57

Ghaida F. Al- Gabiri & Abdul Jabbar N. Al- Shammari

Culture independent method for identification of *Pseudomonas fluorescens* directly from milk using Polymerase Chain Reaction 58-61

Ansam K. Mohammed, Asma H. Abdalla & Nahi Y. Yaseen

Continue>>>> English Section

>>>> MICROBIOLOGY

Evaluation of the biological activity of human, camel and cow milk against pathogenic bacteria and yeast isolates 62-68

Nada H. A. L. Al-Mudallal

Isolation, identification and optimization of protease producing bacteria isolated from soil in Soran city 69-73

Abduljaleel H. Mohammed, Ashwaq Y. Noori & Afrah T. Khalaf

Novel semi-synthetic media for isolation of aerobic actinomycetes 74-79

Ashwaq Y. Noori, Huda S. Khuder & Abduljaleel H. Mohammed

PHYSIOLOGY

A Study on physiological and hematological parameters in mice *in vivo* following exposure to *Aspergillus fumigatus* 80-84

Nagham H. Ali & Anmar S. Hussein

VIROLOGY

Comparison between Western blotting and six commercial kits used for detection of Cytomegalovirus IgM 85-90

Faiza L. Tuama, Atheer AR. Al-Douri, Faisal G. Nasser, Deena M. Ahmed, Mysoon Anwar Hussian & Aliaa H. Lafi

Seropositive of cytomegalovirus in myocardial infraction patients in Baghdad 91-96

Maha F. Al-melan

ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)**علوم الحياة**

- 105-98 التأثيرات التطورية السمية لكلوتامات أحادي الصوديوم على النمو والتركيب النسيجي لعنسة العين في مواليد الفأر الأبيض السويسري *Mus musculus*
ماجدة نوري إبراهيم، سميرة عبد الحسين عبد الله
- 113-106 تسجيل جديد للنوع (Copepoda: Calanoida) *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) ودراسة تشخيصية وحياتية له، وتسجيل جديد للطفيلي عليه (Protozoa: Ciliophora) (As, 1991)
ميسلون لفقة الدوري
- 120-114 حساسية يرقات الذباب المعدني *Chrysomya megacephala* (Fabricius) للفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill تحت ظروف المختبر
نوال صادق مهدي
- 125-121 السمية الحادة لمبيد الاعشاب 2,4-D على سمكة البعوض *Gambusia affinis*
رنا عبد الفتاح كمال، عادل حسين طالب

علوم الدواجن

- 132-126 تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف للعليقة في الأداء الإنتاجي وبعض الصفات الفسلجية لفروج اللحم
لمى خالد بندر، فراس مزاحم حسين، إياد شهاب أحمد العبيدي

العلوم الزراعية

- 136-133 تقدير متبقيات المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين في نماذج من العسل المفروز من بعض محافظات العراق
كاميلا ورد شاهر، محمد مروان حميد
- دراسة تحليلية لبعض العوامل المؤثرة على مستوى اتجاهات العاملين الزراعيين نحو العمل الإرشادي الزراعي
في مديرية زراعة كربلاء
أمل عفتان الراوي

هندسة بيئية

- 157-142 الطحالب في بعدها الحضري: استعراض وتحليل لأهم تطبيقات الطحالب الحضرية ومحاولة الاستفادة منها في تحسين الأداء البيئي للمدينة العراقية
هالة حسين موسى

ENGLISH SECTION

Ethyl alcohol induced pathological changes in male reproductive system of albino rats

Genan A. Al- Bairuty, Hanady S. Al-shmgani and Mohammed N. Taha

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Sciences –Ibn Al-Haitham / University of Baghdad / Republic of Iraq

E- mail: galbairuty@yahoo.com

ABSTRACT

Exposure to ethanol results in decline of testosterone levels, elevates oxidative stress and decreases semen parameters. The present study was designed to investigate the histological structure of testes and epididymes (head and tail) of albino rats treated with different concentrations (20%, 30%, 40%) of ethyl alcohol for 30 days. The results indicated that alcohol produced histopathological changes in the tissues of testes and epididymis (head and tail), which included degeneration, necrosis and decline in the sperm number in lumen of seminiferous tubules in testis and lifting epithelium from the basement membrane with damage of some epithelial cell, as well as the lowest thickness of epithelial cell in the head and tail of epididymis tubules. Thus, consumption of alcohol for one month caused histopathological changes in male reproductive system of the albino rats that cause decrease of the sexual activity of these animals.

Keywords: Ethanol, Testis, Epididymis, Histology, Rats, alcohol

الملخص باللغة العربية

يؤدي التعرض إلى الكحول الإيثيلي (الإيثانول) إلى تراجع في مستويات هرمون التستوستيرون وارتفاع في الجهد الأوكسجيني وانخفاض في معايير السائل المنوي. لذا تم تصميم الدراسة الحالية للتحري عن التركيب النسيجي للخصية والبربخ (الرأس والذيل) في الجرذان المعاملة بتركيز مختلفة (20%، 30%، 40%) من الكحول الإيثيلي ولمدة 30 يوما. أشارت النتائج إلى أن الكحول ينتج تغيرات مرضية نسيجية في أنسجة الخصى والبرابخ (الرأس و الذيل) والتي تضمنت تحطم وتخر وانخفاض أعداد النطف في تجويف النبيبات المنوية للخصى، وانفصال الظهارة عن الغشاء القاعدي، مع تضرر بعض الخلايا الظهارية، فضلا عن انخفاض في سمك الخلايا الظهارية في رؤوس وذيول الأنابيب البربخية. وهكذا، فإن استهلاك الكحول لمدة شهر واحد تسبب بحدوث تغيرات مرضية نسيجية في الجهاز التكاثري الذكري للجرذ الأبيض والتي أسفرت عن انخفاض النشاط الجنسي في هذه الحيوانات.

INTRODUCTION

Alcohol was identified to be among the most widely harmed drug which can affected male sexual functional and behavior in both animals and human (1). Alcohol harm has been observed as one of the factors that associated with reduced in semen production and sperm character (2, 3). The consumption of either chronic or acute alcohol has been reported to cause fertility disturbances such as low sperm count and motility, impaired serum/plasma testosterone level, testicular atrophy and irregularity in the diameter of the seminiferous tubules in human men and laboratory animals (4-9). Dosumu *et al.* reported reduction in the seminiferous tubule diameter and decrease testicular weight in rats after orally administration of 7 ml/kg ethanol (1). Lipid peroxidation has been reported as one of the consequences of ethanol alterations in reproductive system of rats orally demonstrated ethanol (2 g/kg, 25% v/v) for 63 days (9). Alteration in sperm morphology, motility and count as well as histological changes in some reproductive organs were observed in ethanol treated rats (1, 7, 9). Little is known about the histopathological alteration in male reproductive organs following administration of ethanol.

Therefore, this study aimed to determine the effects of different concentrations of ethanol on the histostructure of rats' testes and epididymis head and tail.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals: twenty adult Wister albino male rats (*Rattus norvegicus*) weighting 350-400 gm. Animals were housed in plastic cages in the animal laboratory of biological department in education of pure sciences/ Ibn Al-Haitham under controlled environmental conditions (12L:12D light cycles; 24°C± temperature). Water and food were given *ad libitum*. Twenty male rats were divided into four groups, five rats each.

Administration of ethanol: All rats were administrated ethanol orally by oral cannula for 30 days. The control group orally administrated with distilled water, where the ethanol treated group subdivided into three groups orally administration with 5 ml of ethanol concentrations (20%, 30%, and 40%, continually), ethanol concentrations were prepared according to Luna (10). At the end of the experimental period, animals were sacrificed by cervical dislocation under light either anesthesia.

Histopathological study: Testes and epididymes (head and tail) were removed and fixed in bouin's fluid for histopathological study. Samples were prepared according to Bancroft and Stevens (11). Briefly, samples were passed through ascending series of ethanol concentrations, cleared in xylene and embedded in paraffin, sectioned at 7 µm and stained with Haematoxylin and Eosin Harrison (H&E) to observe the structure of testes and

epididymis parts (head and tail). Then, the slides were examined at magnifications of 400 X (testis and epididymis head) and 200 X (epididymis tail) under optical microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Histological observation on the testes

Light microscopy examination of the seminiferous tubules in the testes of the control rats showed normal structural features with normal stratified seminiferous epithelium which showing series of spermatogenic cells and spermatozoa within lumen (figure 1A). The testes sections of rat treated with 20%, 30% and 40% of ethanol showed injuries that includes lifting epithelium from the basement membrane, the occasional area of necrosis and degeneration of some seminiferous tubule cells (figures 1 B, C, and D). Decline the sperm number in lumen was observed in rats treated with 30% and 40% of ethanol. These results are constant with previous study that exhibited deterioration and appearance of vacuoles in seminiferous tubules in rats after exposure to 3 g/kg, 40% v/v of ethanol for 8 weeks (12), and decline in the diameter of the seminiferous tubules with the presence of degenerative germ cells in rats treated with alcohol (13). On the other hand, Oliva *et al.* (14) had been reported no morphological changes in the testicular tissue after treatment with ethanol. Histopathological injuries in testes that observed in the present study suggested to be caused by ether direct effect of alcohol on spermatocells or lipid cell membrane, as well as the level of hormones such as: testosterone (TT), Luteinizing hormone (LH) and Follicular stimulating hormone (FSH) (15). Maneesh *et al.* (16) found that oral ethanol administration in rats for four weeks caused decline in testicular weight and increase oxidative stress in the testes. Taha and Al-Bairuty (17) found that the gastric administration of 5 ml from each 30% and 40% of ethanol over 30 days caused decrease in the weight of testes, testes and tunica albuginae, epididymis parts (head, body, tail), seminal vesicles and prostate. A decrease in testosterone levels was observed in the male rats treated orally with 40% v/v ethanol for 8 weeks (12). Oremosu and Akang (18) showed that acute and chronic administration of alcohol in male rats caused reduce of TT levels, increase in oxidative stress and decrease in semen parameters.

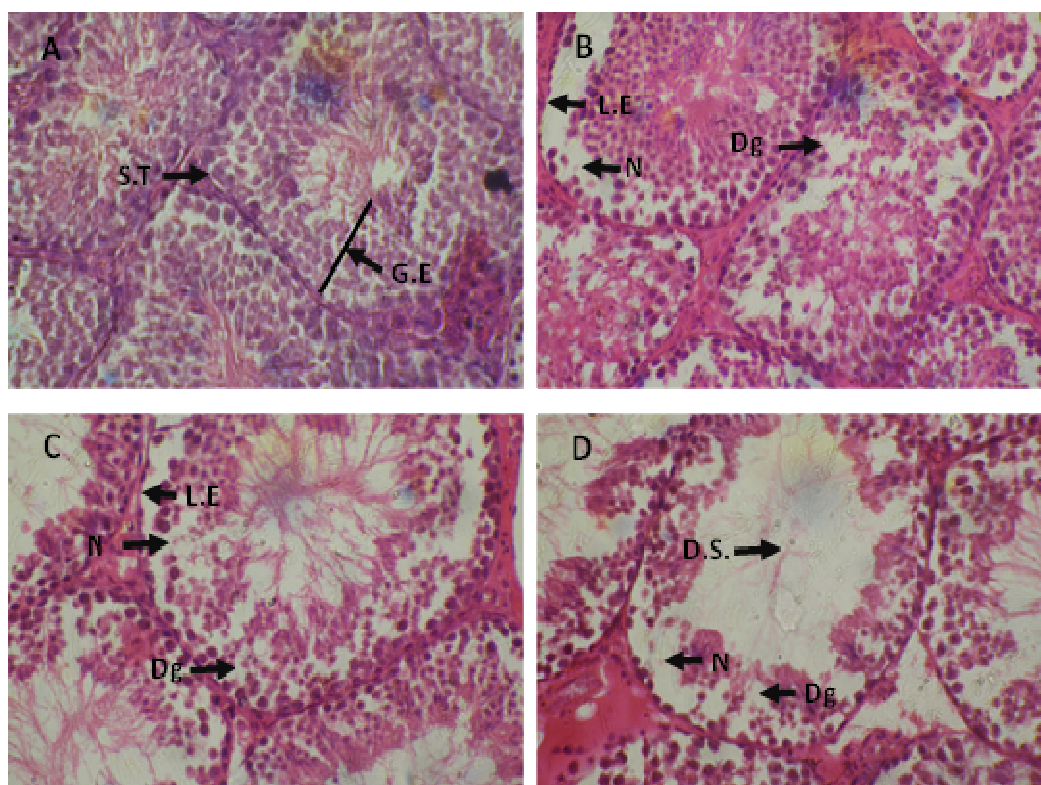


Figure (1): Transvers section of seminiferous tubules in rat testes of (A) Control, (B) treated with 20% of ethanol, (C) treated with 30% of ethanol, (D) treated with 40% of ethanol. Control group showing regular seminiferous tubules (S.T) with normal germinal epithelium (G.E). All treated groups showed some lesion include: Lifting epithelium (L.E.), necrosis (N.) and degeneration (Dg) of seminiferous tubule cells. Decline the sperm number in lumen (D.S). Stained with H&E, sectioned 400 X.

Histological observation on the epididymis

The epididymis has an important role in male reproduction and it has been recognized that spermatozoa are produced in the germinal epithelia of the seminiferous tubules in testes and are transported to the epididymis for onward passage maturation and storage of spermatozoa (19, 20). The transvers section of epididymis in head and tail parts of control groups showed regular epididymis tubules with normal structure of epithelium as well as normal cell height (figures 2A and 3A). All ethanol concentration (20%, 30% and 40%) caused lesion in the head and tail of epididymis which include lifting epithelium from the basement membrane, occasional pyknotic nuclei, the lowest epithelial cell height, enlargement of interstitial space and abnormal shape of nuclei with appearance of vacuole in epididymal lumen and degeneration of some epithelial cell (figures 2 and 3 B, C, D). The lesions that observed in the head and tail of epididymis could occur due to suppress TT production by the leydig cell that will adversely impact on the epididymis and cause lesion. Oliva *et al.* (14) found that rats treated with ethanol exhibit decrease in daily sperm production, testis and epididymis sperm quantity and mobility. Additionally, Srikanth *et al.* (21) described a reduction in sperm number in the head and tail of rat epididymis that received ethanol (3 g/kg, 25 % v/v)

for 30 days and they suggested that occur due to the reduction of testosterone.

In general, this study had described the pathological changes in testis and epididymis head, as well as epididymis tail after administration of different concentrations of ethyl alcohol. Previously published studies investigated the subject with single concentration of alcohol. In addition, few studies covered this subject (1, 3, 5, 13- 15). The histological alterations in some organs of male reproductive system observed in the present study suggested pathological changes and fertility reduction along with long-term alcohol exposure.

Results of this study investigated the effects of different concentrations of ethanol alcohol on reproductive system, and need further studies to determine its effects on complete process from infertility through abortion, aneuploidy, structural natal anomaly, disturbed fetal growth, death of perinatal, and delay the development of natal.

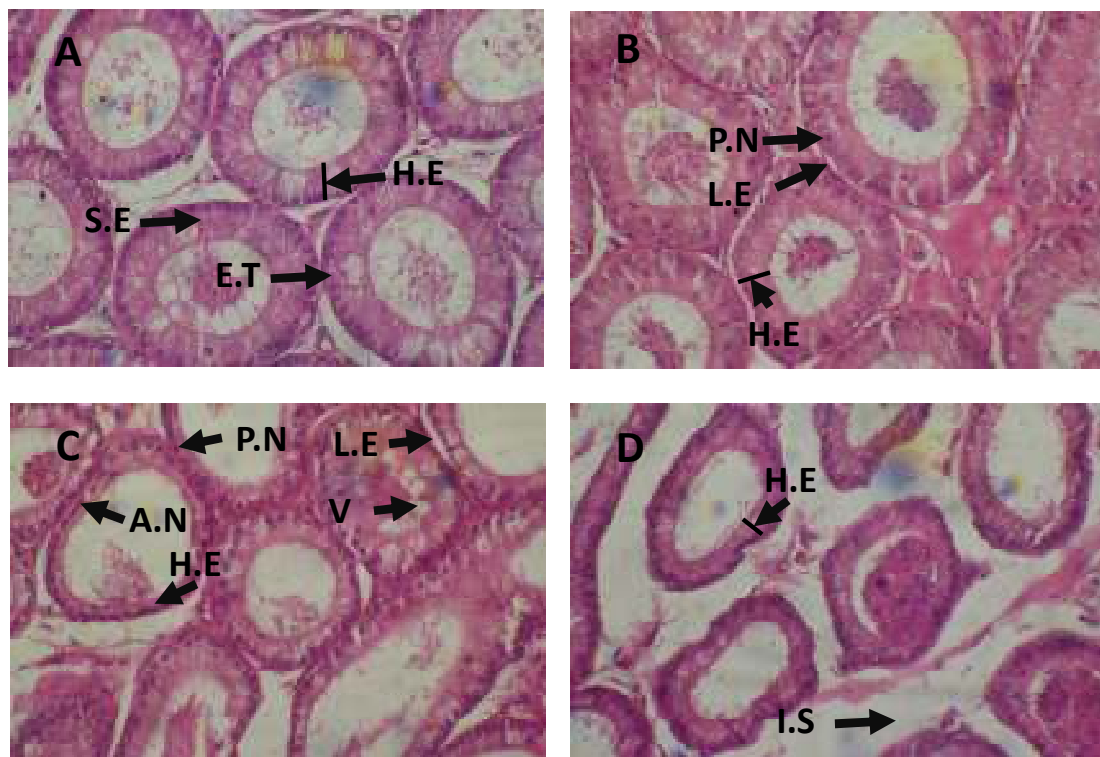


Figure (2): Transvers section of epididymal head in rat of (A) Control, (B) treated with 20% of ethanol, (C) treated with 30% of ethanol, (D) treated with 40% of ethanol. Control group showing regular epididymis tubules (E.T) with normal structure of epithelium (S.E) and normal cell height. All treated groups showed some lesion include: Lifting epithelium (L.E.), Pyknotic nuclei (P.N), the lowest epithelial cell high, enlargement of interstitial space and abnormal shape of nuclei (A.N) with appearance of vacuole in epididymal lumen. Stained with H&E, sectioned 400X.

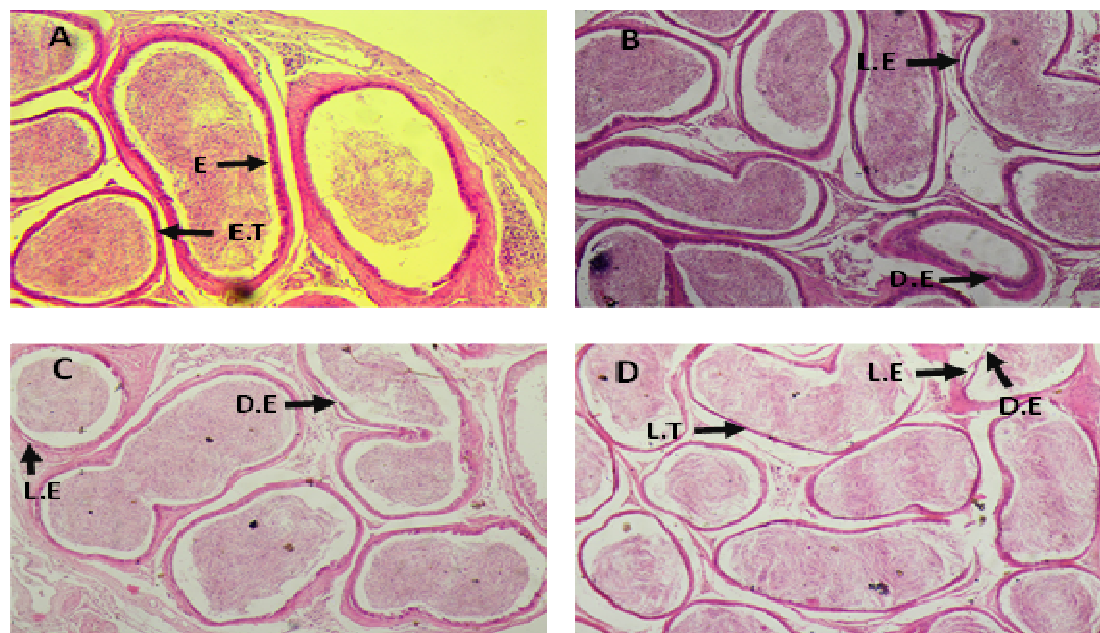


Figure (3): Transvers section of epididymal tail in rat of (A) Control, (B) treated with 20% of ethanol, (C) treated with 30% of ethanol, (D) treated with 40% of ethanol. Control group showing regular epididymis tubules (E.T) with normal structure of lining epithelium (E) and normal cell height. All treated groups showed some lesion include: Lifting epithelium (L.E.), damaged of some epithelial cells (D.E), the lowest thickness of epithelial cell (L.T). Stained with H&E, sectioned 200X.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mr. Nadear A. Fazaa, Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad for his assistance during the design of this experiment.

REFERENCES

1. Dosumu OO.; Osinubi AAA. and Duru FIO. (2014). Alcohol induced testicular damage: Can abstinence equal recovery? Middle East Fert. Soc. J. 19: 221–228.
2. Abel EL. (1980). A review of alcohol's effects on sex and reproduction. Drug and Alcohol Depend. 5:321–332.
3. Talabi AR.; Sarchesmeh AA.; Khalili MA. and Tabibreyad N. (2011). Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol. 45(4): 403–409.
4. Van Thiel DH.; Gavalier JS.; Eagon PK.; Chiao YB.; Cobb CF. and Lester R. (1980). Alcohol and sexual function. Pharmacol. Biochem. Behav. 13(1):125–129.
5. Adler RA. (1992). Clinically important effects of alcohol on endocrine function. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 74: 957–960.
6. Maneesh M.; Dutta S.; Chakrabarti A. and Vasudevan DM. (2006). Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma TT and antioxidants in males. Ind. J. Physiol. Pharmacol. 50(3):291–296.
7. Martinez M.; Macera S.; de Assis GF.; Pinheiro PF.; Almeida CC.; Tirapelli LF.; Martins OA.; Mello-Júnior W.; Padovani CR. and Martinez FE. (2009). Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of Calomys callosus. Tiss. Cell. 41:199–205.
8. Dosumu OO.; Duru FIO.; Osinubi AA.; Oremosu AA. and Noronha CC. (2010). Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. Agri. Biol. J. North Am. 1(6):1126–1132.
9. Siervo GEM.; Vieira HR.; Ogo FM.; Fernandez CDB.; Gonçalves GD.; Mesquita SFP.; Anselmo-Franci JA.; Cecchini R.; Guarnier F A. and Fernandes GSA. (2015). Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. Toxicol. 330:1–8.
10. Luna LG. (1968). Manual of histological staining methods of the forces institute of pathology. 3rd ed. McGraw. Hillbook, New York. P.: 2258.
11. Bancroft JD. and Stevens A. (1982). Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. Churchill Living Stone, London. P.: 624.
12. Uygur R.; Yagmurca M.; Alkoc OA.; Genc A.; Songur A.; Uçok K. and Ozen OA. (2013). Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. Androl. 1–14.
13. El-Sokkary GH. (2001). Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. Neuro-Endocrinol. Lett. 22:93–99.
14. Oliva SU.; Messias AG.; Silva DA.; Pereira OC.; Gerardin DC. and Kempinas WG. (2006). Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. Reprod. Toxicol. 22 (4): 599–605.
15. Emanuele MA. and Emanuele NV. (1998). Alcohol's effects on male reproduction. Alcohol Health Res. World. 22(3): 195–201.
16. Maneesh M.; Jayalekshmi H.; Dutta S.; Chakrabarti A. and Vasudevan DM. (2005). Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis- an experimental study in rats. Ind. J. Clin. Biochem. 20(2): 62–67.
17. Taha MN. and Al-Bairuty GA. (2004). The effect of different concentrations of ethyl alcohol on the weight of some organs in reproductive system in rats. Ibn Al-Haitham J. Pure. Appl. Sci. 17(3): 1–9.
18. Oremosu AA. and Akang EN. (2015). Impact of alcohol on male reproductive hormones, oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. Middle East Fert. Soc. J. 20: 114–118.
19. Hinton BT. and Palladino MA. (1995). Epididymal epithelium: Its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. Microscop. Res. Techn. 30: 67–81.
20. Franca LR. and Cardoso FM. (1998). Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. Tiss. Cell. 30(5): 573–582.
21. Srikanth V.; Malini T.; Arunakaran J.; Govindarajulu P. and Balasubramanian K. (1999). Effects of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. J. Pharmacol. Experim. Therap. 288: 509–515.

Expression of the relation between serological and tumor markers with estrogen receptor of breast cancer in Iraqi women

Qabas I. Abdul Majeed, Ali S. Jabbar and Mohialdeen Y. Majid

Dept. of Nuclear research and applications / Ministry of Sciences and Technology / Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ali0331975@gmail.com

ABSTRACT

Cancer is a term for diseases in which abnormal cells divide without control and can invade other tissues. Cancer that forms in tissues of breast, usually the ducts (tubes that carry milk) and lobules is known as breast cancer. A malignant tumor can be removed and classified for tumor grade and the degree of cell differentiation. The term "differentiated" describes the extent to which cancer cells are similar in appearance and function to healthy cells of the same tissue type.

The present study aimed to express the disease clinically in several biochemical parameters that were measured in sera of Iraqi patients and healthy groups included tumor marker (CA15.3 and CEA). In addition, age, body mass index, and groups with Estrogen Receptor (ER) were presented in this part of the study.

Blood samples were collected from Zaid Private Laboratory in Baghdad –Falasteen Street. Patients' samples from Al-Amal Hospital-Baghdad were with an age range from (28-71 years). Levels of CA15-3 and CEA were determined by (enzyme-linked immune sorbent assay)- technique (ELISA). The method is depended on a solid phase by using "Sandwiched \ method" as described in the leaflet of their kits (Bio check –USA).

The results indicated that there was a highly significant increase in CEA and CA15-3 levels ($P < 0.0001$) in sera of breast cancer patients groups as compared with that of the control group.

The study concluded that both ER groups (positive and negative) had decreased CEA and increased CA15-3 levels.

Keywords: Breast Cancer , Receptor , CA15.3

الملخص باللغة العربية

السرطان هو انقسام الخلايا بصورة متعددة وغير مسيطر عليه ، وينتقل إلى الأنسجة الأخرى . وبعد سرطان الثدي الأكثر انتشاراً، وتعرف الأبقانية الحاملة للحليب عادة بسرطان الثدي. يمكن أن تزال الأورام الخبيثة والمصنفة حسب الدرجة والمرحلة للورم . تتشابه الخلايا السرطانية بالصفات الوظيفية للخلايا السليمة وبنفس النسيج . في هذا البحث، تم اختبار الأمراض السريرية اعتماداً على بعض الفحوصات البيوكيميائية لمصنوع المرضى العراقيين والمجاميع السليمة التي تحوي على علامات الورم (CA15.3 and CEA) مع مؤشر كتلة الجسم ومستقبل الإستروجين الحساس للعينة المشمولة بالدراسة.

INTRODUCTION

Cancer is expressed as cells of control –signal transduction without regulation, also loss of normally controlled cell growth. Tumor development occurs in stages. A malignant tumor can be removed and classified for tumor grade and the degree of cell differentiation. Cancer is a term for diseases in which abnormal cells divide without control and can invade other tissues (1). Cancer that forms in tissues of breast, usually the ducts (tubes that carry milk) and lobules (glands that produce milk) known as breast cancer. The term "differentiated" describes the extent to which cancer cells are similar in appearance and function to healthy cells of the same tissue type. The degree of differentiation often relates to the clinical behavior of the particular tumor. The exact causes of breast cancer are not known. However, studies show that the risk of breast cancer creases as a woman gets older (2). The breast is a modified gland covered by skin and subcutaneous tissue. The morphological and functional unit of the organ is the single gland, a complex branching structure that is composed of two major parts: Terminal duct lobular unit, and the large duct system (3). Breast cancer is a heterogeneous, most frequent disease in women. Breast cancers can be currently defined by their pattern of expression for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human (epidermal growth factor) receptor -2 (Her2/neu) (4). Female breast cancer is the second leading cause of cancer-related deaths, it is the second leading cause of cancer –related deaths in women in world between the age of 20 and 59 (5), while male breast cancer is rare (6). Cancer is a systemic disease in that cancer cells may start to be disseminated into blood and lymphatic systems even in early stages or when the tumor size is still small (7). Active angiogenesis may occur in breast tumor nodules as small as 2 mm in diameter (8). Early diagnosis of the cancer has the benefit of receiving a wider range of therapeutic options, leading to more successful treatment (9). The most important prognostic tumor markers for diagnosis of breast cancer that were used to assess the prognosis are Carcinoembryonic antigen (CEA) and cancer antigens (CA15-3, CA27, CA29, and CA549) (10).

PATIENTS AND METHODS

The present study was carried out on (100) Iraqi women having breast cancer with mean age (28-71 years) females, distributed into two groups according to estrogen receptor (ER) for samples patients breast cancer : (50) with group I (ER +ve) and (n=50) with group II (ER – ve). The control group includes (40) Iraqi healthy women with matched age. For characterization the disease clinically several biochemical parameters included in this part of section were measured in sera of breast cancer patients and healthy groups included tumor marker (CA15.3 and CEA. In addition, age,

body mass index, and groups with ER were presented in this part of the study.

Blood Samples: The control group was selected from 40 apparently healthy females who were either in their menopausal or in their premenopausal age to emphasize the possibility of menstrual irregularity. Blood samples were collected from Zaid Private Laboratory in Baghdad –Falasteen street. The patients from Al-Amal Hospital-Baghdad were with an age range from (28-71 years). All patients were distributed into two groups according to the immunohistochemical reactivity of ER obtained in their histopathological reports. The ER positive patients were 50 (50%) in group I and ER negative patients were 50 (50%) in group II. About (5.0 ml) of blood were collected from each of healthy donors and the patients, blood samples were centrifuged at (1500xg) for 10 mins. After blood coagulation, serum was separated into three eppendorf tubes per sample and frozen at -20 °C until being used. The samples were not thawed and refrozen before using.

The body mass index (BMI) is a measure of someone's weight in relation to their height. BMI is equal to a person's weight divided by their height square. It is calculated as below:

$$\text{BMI} = (\text{Weight in kilograms} / \text{Height in meters}^2)$$

The greater a person's weight is for a given height the higher their BMI will be. The BMI is used to screen persons for weight categories that may lead to health problems (11). Table (1) illustrates the indication for each value of BMI.

Table (1): The BMI categories (11)

Groups	BMI
Under Weight	< 19.0
Normal	20-24
Over Weight	25-30
Obesity	>30

Determination of levels of Serum CA15-3 and CEA:

Levels of CA15-3 and CEA were determined by ELISA-technique. The method is depended on a solid phase by using "Sandwiched method" as described in the leaflet of their kits (Bio check –USA).

Determination of Serum CA15-3: The CA15-3 was measured by using enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA test), which is based on the principle of a solid phase ELISA. The assay system utilizes a monoclonal antibody, directed against a distinct antigenic determinant on the intact CA15-3 molecule, for the solid phase immobilization (on the microtiter wells).

Reagents Materials provided with the kit: The method is depended on a solid phase by using "Sandwiched method" as described in the leaflet of their kits (Bio check –USA).

Calculations: The average absorbance values (A_{450}) for each set of standards, control, and samples were calculated. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained for each standard against its concentration in U/ml. Using the mean absorbance value for each sample, the corresponding concentration of CA15-3 in U/ml was determined from the standard curve (figure 1). The CA15-3 concentrations were read for unknown samples and control from the standard curve plotted.

References Values: Less than 30 U/ml.

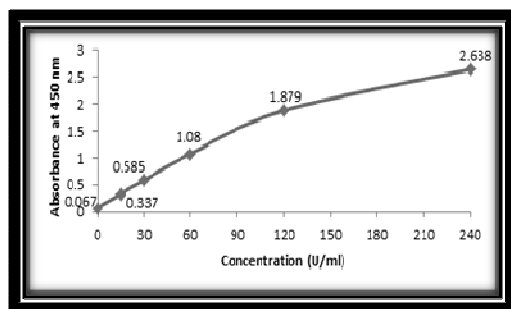


Figure (1): Standard curve of CA15-3

Determination of Serum CEA: This CEA -ELISA test was based on the principle of a solid phase. The assay system utilizes a monoclonal antibody directed against a distinct antigenic determinant on the intact CEA molecule was used solid phase immobilization (on the microtiter wells). A goat anti-CEA antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) is in the antibody-enzyme conjugate solution.

Reagents:

Materials provided with the kit: Antibody-coated microtiter plate with 96 wells, CEA standards (containing 0, 3, 12, 30, 60, and 120 ng/ml CEA), enzyme conjugate reagent, TMB reagent, stop solution (1N HCl).

Procedure: Standard, specimens, and control were dispensed (50 μ l) into appropriate wells. Enzyme conjugate reagent was dispensed (100 μ l) of to each well. Wells thoroughly were mixed for 30 seconds. It is very important to have a complete mixing in this setup. The microtiter plate was incubated at room temperature (18-25 $^{\circ}$ C) for 60 min. The incubation mixture was removed by emptying plate content into a waste container. The microtiter plate was rinsed and emptied 5 times with distilled or deionized water. The wells were stroke sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual water droplets. Substrate reagent was dispensed (100 μ l) of into each well. Gently were mixed for 10 seconds. The microtiter plate was incubated at room temperature for 20 min. The reaction was stopped by adding (100 μ l) of stop solution to each well Gently, wells were mixed for 30 seconds. It is important to make sure that all the blue color changes to yellow color completely. The optical density was read of at 450 nm with a microtiter plate reader within 15 mins.

Calculations: The average absorbance values (A_{450}) for each set of reference standards, control, and samples were calculated. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained for each reference standard against its concentration in ng/ml. Using the mean absorbance value for each sample, the corresponding concentration of CEA in ng/ml was determined from the standard curve (figure 2).

References Values: <2.5 ng/ml

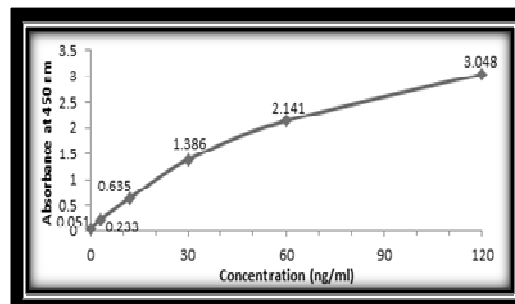


Figure (2): Standard curve of CEA

Statistical analysis: All data were analyzed using the statistical analysis was done using IBM SPSS (statistical package for social science) statistics for windows , version 20,0 (Armonk. NY2IBM corp.released 2010). the mean \pm SD were also computed for the comparison of results in clinical biochemistry for breast cancer in the sera of Iraqi women.

RESULTS

The samples (100 samples) were distributed into two groups (I,II) depending on the receptors ER (positive and negative), patients' ages and tumor Marker (CA15.3 and CEA). Table (2) illustrated the results of tumor markers levels for patients and control groups. The results indicated that there was a highly significant increase in CEA and CA15-3 levels ($P < 0.0001$) in sera of all patients groups as compared with that of the control group. Serum markers in breast cancer are helpful for clinicians in providing more effective management of the disease.

Table (2): Mean \pm SD For CA15-3 and CEA for control and two patients groups

Group	CA15.3			CEA		
	Mean \pm SD (U/ml)	S.E	P value	Mean \pm SD (ng/ml)	S.E	P value
Control (n=40)	12.6 \pm 1.0	0.39	-	2.5 \pm 0.4	0.06	-
ER (+ve)	26 \pm 16.1	2.28		1.86 \pm 1.4	0.2	
ER (-ve)	26.2 \pm 15.1	2.1		2.7 \pm 1.89	0.27	

p =probability , SD=standard deviation ,SE=standard error ,ER(+ve)n=50 ER(-ve)n=50 , ng/ml=nano gram/millileter

Elevation CA15.3 is not a reliable index in the diagnosis of breast cancer since normal serum levels can also be found in women with breast cancer. However, CA15.3 seems to be a reliable prognostic predictor for monitoring disease progression (12).

As shown in table (2), mean levels of CA15.3 had increased with groups ER beginning from 26 for group I and 26.2 for group II. In general, higher levels of CA 15.3 are correlated with a larger tumor burden and a more advanced disease. The serum levels of CA 15.3 increase as cancer develops. In metastatic breast cancer, the highest levels of CA 15.3 are often seen when the cancer has spread to the bones and /or to the liver (13). On the other hand, and as shown in table (2), mean levels of CEA had increased with groups ER beginning from 1.86 for group I and 2.7 for group II. BMI and age parameters also included in this study. Figure (3) shows the percentage of patient with breast cancer distributed in groups according to BMI values. The BMI was measured for breast cancer patients with stages as in figure (3). Also figure (4) shows that patients in this analysis were at age ranged from 28 years to 71 years. Most patients aged range (40-50) years, (57.1%) of them were had stage III, then (45.8%) at stage II and (35.3%) had stage I.

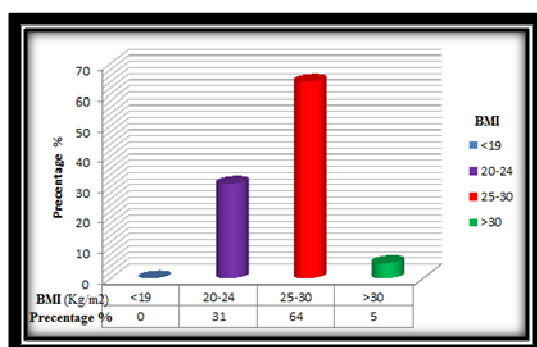


Figure (3): Distribution of the Iraqi patients with breast cancer according to their BMI

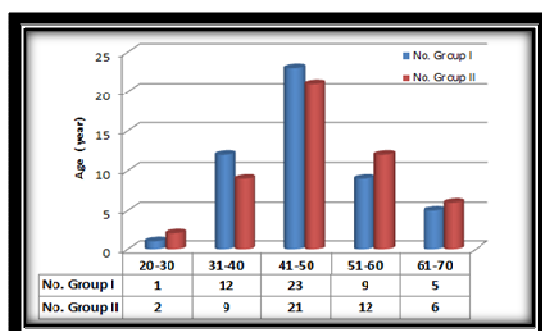


Figure (4): Distribution of the patients according to their age and groups of ER

DISCUSSION

The results reveal that most patients with breast cancer had overweight at age (41-50) years with stage II. Both ER (positive and negative) had decreased CEA and increased CA15.3 level. The serum levels of CA 15.3 increase as cancer develops. In metastatic breast cancer, the highest levels of CA 15.3 are often seen when the cancer has spread to the bones and /or to the liver (13),

while Al-Jarallah *et al.* (14) reported that median concentrations of CA15.3 or CEA tended to increase depending on the site of metastasis in the other hand Al-Hasnawi was studied Her2/neu groups with tumor marker (CA15.3 and CEA) for patients of breast cancer in Iraq (2). From the results it can be concluded that circulating levels of CA15.3 can be elevated in patients with cancer and that serial determinations of CA15.3 may be useful in the post-surgical follow-up of breast cancer patients when specific types of benign disease that may cause increase of this antigen are excluded (15). In general, higher levels of CEA are correlated with a larger tumor burden and a more advanced disease. The serum levels of CEA increase as cancer develops. In metastatic breast cancer, the highest levels of CEA are often seen when the cancer has spread to the bones and /or to the liver (13).

The Body Mass Index (BMI) and age ranges: The BMI is a measurement that is associated with the body fat. It predicts the development of healthy problems related to excess weight. According to World Health Organization (WHO) international classification, BMI equal or less than 19 (Kg/m²) classified as underweight, between 20-24 (Kg/m²) indicated a person of normal weight, 25-29 (Kg/m²) is overweight, while equal or more than 30 is obese (11). Figure (3) showed the percentage of patient with breast cancer distributed in groups according to BMI values.

The BMI was measured for breast cancer patients with stages as in figure (3).

REFERENCES

- Lodish H.; Arnold BS.; Lawrence Z.; Paul M.; David B. and James ED. (2000). Molecular Cell Biology. 4th ed. W. H. Freeman and Co.
- Al-Hasnawi I. (2015). Synthesis and evaluation of nanogold bioconjugated with Trastuzumab as a drug for human breast cancer cell line. Ph.D. Thesis. College of Science, Al-Mustansiriyah University.
- Rosai J. (1989). Surgical pathology. Volume II. 7th ed. Chapter 20. P.:1193.
- Leong AS. and Zhuang Z. (2011). The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. Pathobiol. 78:99-114.
- Herman A.; Mazur W.; Heinonen SM. and Stumpf K. (2002). Estrogens and breast cancer. J. Biochem. 20 (2):527-529.
- Cardoso F.; Hrbek N. and Senkus E. (2012). Locally recurrent or metastatic breast cancer ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annal. Oncol. 23:11-19.
- Pankaj G R.; Suet M C.; Vivien N.; Brendan MS.; Umeh H. *et al.* (2014). Risk stratification of patients with early breast cancer. Clin. Breast Cancer. 14(1): 68-73.
- Roy V. and Edith AP. (2009). Biologic therapy of breast cancer: focus on co-inhibition of endocrine and angiogenesis pathways. Breast Cancer Res. Treat. 116:31-38.
- Kathryn JR.; Shari G.; Rulla MT.; Schapira L. and Partridge AH. (2014). Breast cancer presentation and

diagnostic delays in young women. *Cancer*. 120(1):20-25.

10. Dalamaga M.; Sotiropoulos G.; Karmaniolas K.; Pelekanos N.; Papadavid E. *et al.* (2013). Serum resistin: A biomarker of breast cancer in postmenopausal women? Association with clinicopathological characteristics, tumor markers, inflammatory and metabolic parameters. *Clin. Biochem*. 46: 584–590.

11. Livingstone C. (2008). *Clinical biochemistry*. 4th ed. Elsevier. p.:132.

12. Ahmad TY. and Ali WK. (2007). Some biochemical parameters in breast cancer. *Raf. J. Sci*. 18(2):46-57.

13. Lee JS.; Park S.; Park JM.; Cho JH.; Kim SI. and Park BW. (2012). Elevated levels of preoperative CA15-3 and CEA serum levels have independently poor prognostic significance in breast cancer. *Annal. Oncol*. 00: 1–7.

14. Al-Jarallah MA.; Behbehani AE.; El-Nass SA.; Temim L.; Ebraheem AK. and Ali MA. (1993). Serum CA15.3 and CEA patterns in postsurgical follow-up, and in monitoring clinical course of metastatic cancer in patients with breast carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol*. 19:74-79.

15. Colomer R.; Ruibal A. and Salvador L. (1989). Circulating tumor marker levels in advanced breast carcinoma correlate with the extent of metastatic disease. *Cancer*. 64(8): 1674-1681.

Novel spectrophotometric method for determination of the 1,4-dioxane in cosmetics available in the Iraqi market

Khalaf F.A. Alsamarrai (1) , Abdul-Hamid M. Hamoudi (2) and Hala S. Ahmed (1)

(1) Dept. of Chemistry (2) Dept. of Biology / College of Education / University of Samarra / Republic of Iraq

E-mail: alfarisalsamarrai2013@gmail.com

ABSTRACT

A Novel, sensitive and simple Spectrophotometric method was used for determination of 1,4-dioxane in 51 samples of cosmetics (shampoos, conditioners, hair creams and skin creams) available in the Iraqi market in the city of Samarra by using isopropanol as a solvent at the maximum absorbance at 196 nm. The calibration curve was linear in the range of (0.4-2.5) ppm. Recovery percentage Rec % was from (98-101%). The value of relative standard deviation RSD % was between (0.171-0.543 %). Detection limit and quantification limit of the method were (0.004) ppm and (0.0132) ppm respectively. The value of molar absorptivity coefficient was (3.7389×10^4) L.mol⁻¹.cm⁻¹, and the Sandell index was 0.00236 mg.cm⁻². The method was successfully applied to determine of 1,4-dioxane concentration in pure solutions and in some cosmetics, which ranged (9.060-52.524) ppm.

Keywords: 1,4-dioxane, Isopropanol, novel spectrophotometric method.

الملخص باللغة العربية

تم استخدام طريقة مبتكرة وحساسة للكشف عن وتقدير وجود مركب 1,4-dioxane في 51 عينة من مستحضرات التجميل (الشامبو، البلم، كريم الشعر، وكريم البشرة) والمتوافرة في الأسواق المحلية في مدينة سامراء في العراق. وقد أثبتت الطريقة نجاحها في الكشف عن المركب في بعض العينات.

INTRODUCTION

1,4-dioxane is a colorless liquid organic compound with a pleasant smell like a faint smell of diethyl ether, easily mixed with water (1). 1,4-dioxane is often called dioxane simply because the isomers 1,2 and 1,3 of dioxane are rare (2). It is used as a solvent, in textile processing, printing processes, the preparation of detergents, in products, cosmetics, additives to processed foods, detergents and shampoos (3,4). It is a potential carcinogenic substance to humans (2). Adverse health effects, resulting from human exposure to 1,4-dioxane, include kidney and liver damage and nose irritation in case of a short-term exposure.

It is a safe additive in children's cosmetics, if its rate reaches less than 1.5-12 ppm and 2-23 ppm for adults formulations (5).

In a survey of 1,4-dioxane in cosmetics, which was conducted on 81 samples in Taiwan using GC-MS technique, results showed that seven samples (8.6%) exceeded the allowable limits set by the Ministry of Health in China (6). Through a study of blood samples in male goats observed a significant decrease in protein levels after exposure for 1,4-dioxane (7). When it exists in groundwater by concentrations greater than 60 mg, it leads to toxic effects on the roots of trees when such groundwater is used for plants watering (8).

Several methods for estimating 1,4-dioxane were used such as gas chromatography (GC) (9), High Performance Liquid Chromatography [HPLC] (10) and Gas Chromatography - Mass spectroscopy (GC / MS) or High Performance Liquid Chromatography- Mass spectroscopy [HPLC/MS] in cosmetics (11).

The literature survey showed no spectrophotometric method for analysis of 1,4-dioxane either in cosmetics or others, therefore this study aims to innovate spectrophotometric method to determine 1,4-dioxane in some cosmetics, which includes several types of shampoos, conditioners, hair creams and skin creams prevalent in Iraqi market.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: All of the chemicals used were of analytical reagent grade. 1,4 dioxane (99%) was supplied by Sigma, and isopropanol (99%) by Sharloo.

Apparatus: A UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu 1700 UV Japan), electronic balance (Sartorius model AZ-214 Germany), pH- meter (Inolab Model 7110 Germany) and bath (ultrasound LDZ 4-2dhu US).

Samples' Collection: Fifty one (51) commercial products (shampoos, conditioners, skin creams and hair creams) from different origins were collected from the market of Samarra city, Iraq.

Samples' preparation:

1.Shampoos and conditioners: A 0.05 grams of each sample was put in Erlenmeyer flask of 100 ml, add 1 ml of isopropanol and then completed the volume with distilled water.

2.Creams: The cream product (0.5 g) was accurately weighed into a 100-ml Erlenmeyer flask, 1 ml of isopropanol was added, heated to 40° C in ultrasonic bath for 20 minutes, filtrated in a 100 ml volumetric flask and completed the volume to the mark with distilled water.

Evaluation of the method:

Standard additions method: Standard additions method involves adding equal volumes of the same solution in a set of volumetric flasks of the same volume. Then, increasing volume of the standard substance 1,4- dioxane is added to all the volumetric flasks except the first one which is completed with distilled water.

After that, the instrument response is measured for all the diluted solutions at the wavelength 196nm.

The accuracy and precision of the standard additions method were tested through recovery percentage Rec% and relative standard deviation RSD% of the samples. These results were compared with those of the direct method.

RESULTS AND DISCUSSION

Choosing the optimum solvent: Many solvents (methanol, dichloromethane, isonitrile and isopropanol) were tested to dissolve the samples. The best one was isopropanol.

Absorption Spectrum: Absorption spectrum was studied by conducting a survey of the compound 1,4- dioxane wavelengths from 190 to 400 nm.

It gave the highest peak at a wavelength 196 nm, as shown in figure (1).

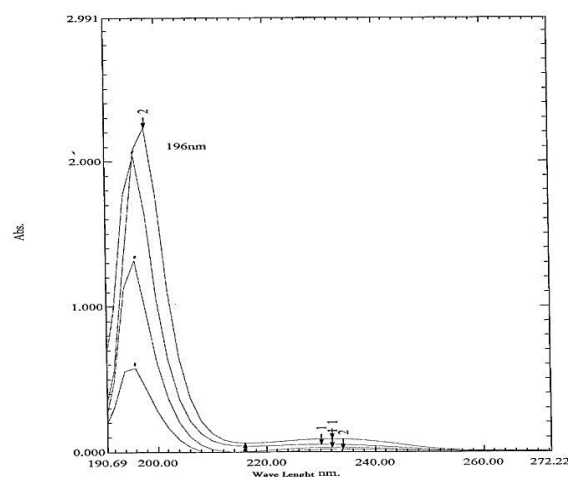


Figure (1): The absorption spectrum of 1,4- dioxane

Construction of calibration curve: Calibration curve was constructed for the concentrations chain (0.2-3.0) ppm. The method linearity lay between 0.4 and 2.5 ppm, correlation coefficient was $r^2=0.9996$. The molar absorptivity was 3.789×10^4 L/mol.cm, and Sandell index was 0.00236 mg./cm². The accuracy and precision of the method was tried, and it was found that the method was good and accurate as recovery percentage ranged from 98.163% to 101.249% and relative standard deviation values ranged between 0.171% and 0.543%, as shown in figure (2) and table (1).

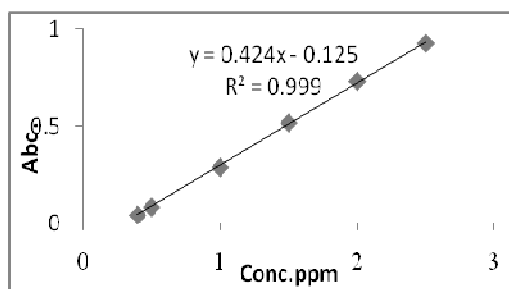


Figure (2): Calibration curve for 1, 4- Dioxane

Table (1): Accuracy and precession of the method

No.	concentration ppm		RSD%*	Rec%
	taken	found		
1	0.4	0.401	0.352	100.250
2	0.5	0.499	0.183	99.800
3	1	0.982	0.543	98.200
4	1.5	1.519	0.305	101.267
5	2	2.020	0.216	101.000
6	2.5	2.480	0.171	99.200

*n=5

Assay of 1,4-dioxane: The concentration of 1,4-dioxane was calculated from the straight line equation obtained from the standard curve ($y=0.4243x-0.1253$). Results showed that 1,4-dioxane was not detected in the samples (2,4,5,7,9,10,15,16, 22,25, 26, 27,34, 42.46).

The concentration of 1,4-dioxane in the samples (1,20,21,30,38, 43,44, 47, 50,51) were higher than the allowable limits, ranged from 24.667 ppm to 52.524 ppm. The rest of the 26 samples of were within the allowable limit and least concentration was in sample No. (18) (9.069 ppm).

The acid function (pH) for all samples was also measured. The percentage for volatile and non-volatile materials of shampoos, hair conditioners and fatty substances and thermal stability of creams were measured too. Results are exhibited in tables (2 and 3).

It is noticed that hydrogen number (HP) for all samples was within the allowable limits, according to Iraqi standard specifications, with the exception of the sample No. (3), which slightly decreased below the lowest limit, while the sample (34) was slightly above the upper limit (14). Standard allowable rate of acidity ranges from 5 to 9 in creams (12) and from 2.5 to 6 in hair conditioners for pH, which is 5-9 in creams, 2.5-6 in hair conditioners. As for shampoos, it ranges from 4.7 to 7 (14).

The minimum percentage of fat in the creams is 15%, according to the Iraqi standard specifications (12). As for the volatile and non-volatile materials, all samples were within the allowable limits, as it didn't exceed more 95% and 2%, respectively (14).

Table (2): 1, 4- dioxane content, pH and the percentage of fat for creams available in local markets

No.	Samples	Dioxane content ppm	pH	The percentage of fats%
1	Arab Girl cream	9.07	7.00	35
2	Ideal Cream	-	6.50	46
3	Top Shirley cream	9.06	3.60	25
4	Cinema cream	-	7.50	49
5	Fair & Lovely cream	-	7.52	17
6	Shirley cream	21.18	7.00	28
7	Flormar cream	-	5.00	21
8	Rose cream	16.37	3.61	43
9	Century beauty cream	-	7.00	32
10	Waterproof cinema cream	-	7.80	33
11	Mekyach cream	9.16	7.40	39
12	Crystal cream	10.95	7.30	26
13	Loreal cream	11.34	2.60	15
14	Cream BB	12.22	6.50	20
15	Pearl cream	-	8.50	23
16	Squash Mask Mask	-	5.00	16
17	Soft cream	13.167	7.50	15
18	Hand Lifting cream	9.07	7.90	22
19	Paris Cream	10.34	6.98	20
20	Nuday cream	24.67	7.00	25
21	Butter cream Cocoa	36.03	8.15	15
22	Johnson cream	-	6.5	20
23	Hair Treatment cream	10.01	3.52	22
24	Imaj cream Hair	14.53	6.66	27
25	Parachute cream Hair	-	7.20	19
26	Vatika Hair cream	-	4.40	15
27	Pantene cream Hair	-	4.64	15

Note: All cream samples were thermal stable

Table (3):1,4- Dioxane content, pH, volatile and non-volatile materials percentage for shampoos and conditioners

No.	Sample	Origin	Conc. 1,4 – Dioxane ppm	pH	volatile materials %	non-volatile %
28	Nada Hair Conditioner	Iraq	20.51	4.13	95.94	-
29	Dongba Hair Conditioner	China	10.01	6.39	89.70	-
30	Keratin Hair Conditioner	Brazil	41.58	3.66	69.20	-
31	Acacia Hair Conditioner	Iraq	15.66	5.53	55.00	-
32	Amalfi Baby shampoo	Spain	17.03	6.46	76.60	2.00
33	Nunu Baby shampoo	Saudi	11.16	6.8	76.60	1.00
34	Johnson Baby shampoo	UAE	-	7.14	84.60	2.00
35	Vatika shampoo	UAE	19.81	6.65	54.80	1.90
36	Happy shampoo	Turkey	19.52	8.00	76.00	1.30
37	Pert shampoo	Saudi	13.68	5.77	55.64	1.50
38	Ipek shampoo	Turkey	23.44	5.90	62.19	2.00
39	Dove shampoo	Saudi	13.68	6.44	59.48	1.50
40	Sunsilk shampoo Violet	Egypt	17.83	5.4	67.80	1.80
41	Sunsilk shampoo Yellow	Egypt	14.29	5.45	58.98	1.90
42	Fax shampoo	Turkey	-	6.90	61.21	1.80
43	Honey Natural shampoo	Spain	27.30	6.99	70.62	0.40
44	Shampoo Garnier	India	50.40	5.26	43.49	0.90
45	Minoxidil shampoo	Syria	16.46	6.37	56.70	1.60
46	Head & Shoulders shampoo	Saudi	-	8.00	58.00	-
47	Dora- dyed hair	Turkey	34.47	6.38	62.40	-
48	Casanova shampoo	Saudi	22.02	7.39	76.40	2.00
49	shampoo Pantene Hair dyed	Saudi	22.82	6.00	77.76	1.90
50	Pantene shampoo Against loss	Saudi	23.86	6.48	79.00	1.80
51	Hokey Hair gel	Turkey	52.52	7.60	47.00	1.90

Note: The standard range allowed in children cosmetics is from 1.5-12ppm and 2-23ppm for adults (1)

In order to evaluate the obtained results, the multi-solutions standard additions method was applied to calculate its accuracy and precision for certain shampoos and creams samples used in this study, and to measure the absorptivity at 196 nm. Note that the obtained concentration of the sample is multiplied to ten times due to the dilution of the

sample solution to 100 ml. Accuracy and precision for standard additions curves were tested for each sample through calculating the recovery percentage REC% (98.161 – 103.370) and relative standard deviation RSD% (0.023 – 1.387%) for the sample in comparison with concentration derived from calibration curve as shown in table (4).

Table (4): Accuracy and precession of standard addition

No.	Sample	concentration ppm from calibration curve	concentration ppm from standard additions method	RSD%	Rec%
1	Top Shirley	0.453	0.455	0.91	100.44
2	Mekyach	0.46	0.44	0.64	103.37
3	Loreal	0.57	0.57	1.38	100.70
4	Dongba	0.50	0.51	1.16	102.11
5	Paris	0.52	0.51	0.02	98.16
6	Acacia	0.78	0.78	0.05	99.27
7	Nunu	0.56	0.57	0.30	102.49

Comparing of the method: The current method was compared with many other methods as in table (5). This comparison shows the current method preference to other methods through the L.O.D, L.O.Q and RSD%, and the most great preference. It

is the only spectrophotometric method to determine 1,4-dioxane whether in cosmetics or in others according to the literatures available in websites or in libraries.

Table (5): Comparing the current method with other methods

Method	Linearity ppm	Straight-line equation	R ²	L.O.D ppm	L.O.Q ppm	RSD %	Reference
current method	0.4-2.5	$y = 0.4243x - 0.1253$	0.9996	0.004	0.0132	0.171-0.543	
GC	10-500	-	-	-	-	2.7- 4.8	17
GC-Mass	-	$y = 0.8328x + 0.0057$	0.9944	1.600	-	7.5 %	16
GC-Mass	0.1-100	-	-	0.100	-	-	11
GC	1- 250	$y = 5046.9 x - 1.87e^{-4}$	0.9998	-	-	0.06 , 2.5%	9
HPLC	-	-	-	6.500	-	-	10
GC-Mass	3-150	-	0.995	0.06-0.51	-	3%	15

CONCLUSION

The method that was used is an easy and economical way to estimate 1,4- dioxane in cosmetics and features accurately and precision, where the value of the relative standard deviation were RSD% between (0.543% 0.171 -%) and recovery percentage Rec% between (98-101)% and the limit of detection (LOD) and limit of Quantification (LOQ) for the method were good compared to other approved methods where their values are (0.004, 0.0132)ppm respectively. The method can be used to estimate 1,4 Dioxane in the routine works and in quality control laboratories in factories of cosmetics.

REFERENCES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012) . Toxicological profile for 1,4 dioxane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Surprenant KS. (2000). dioxane in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. doi:10.1002/14356007.a08_545.
- Sack T. and Steele D. (1989). Indoor air pollution from household sources. Contract No 68-02-4252. US. EPA, Washington.
- Buffler PA. (1978). Mortality follow-up of workers exposed to 1,4-dioxane. J. Occup. Med. 20: 259.
- Lesage S.; Jackson RE.; Priddle MW. *et. al.* (1990). Occurrence and fate of organic solvent residues in anoxic groundwater at the Gloucester landfill. Canada. Environ. Sci. Technol. 24 (4): 559–566.
- Huang SC.; Huang SH. and Hung CP. (2012). Survey on 1,4-dioxane of marketed cosmetics cleansers in Taiwan area. Ann. Rept. Food Drug Res. 3:278-282.
- Neetu B. (2013). Protective effect of root extract of withania somnifera on 1,4-Dioxane and trichloroethyl eneinduced on changes on in-vitro goat haemic system. Int. J. Phytopharmacol. 4 (3):195-203.
- Heather S. (2013). 1,4-dioxane and the application of phytoremediation at North Carolina Hazardous Waste Groundwater Contaminated Sites. MSc. Thesis. North Carolina State University. USA.
- Mark PI. and Mathews AN. (1991). Gas chromatographic determination of 1,4-dioxane at the parts-per-million level in consumer shampoo products. J. Soc. Cosmet. Chem. 42: 97-104.
- Scalia S.; Guarneri M. and Menegatti E. (1990). Determination of 1,4-dioxane in cosmetic products by high-performance liquid chromatography. Analyst. 115(7):929-931.
- Deming S. (1996). Rapid quantitative determination of 1,4-dioxane in cosmetics by gas chromatography- mass spectrometry. J. Soc. Cosmet. Chem. 47: 177-184.
- Central Organization for Standardization and Quality Control. (1988). Iraqi Standard No. (1161).
- Central Organization for Standardization and Quality Control. (2011). Iraqi Standard No. (1124).
- Arab Industrial Development and Mining Organization. (2006). Standard Arabic No. (1564) Methods of test hair shampoo.
- Fuh CB. (2005). Impurity analysis of 1,4-dioxane in nonionic surfactants and cosmetics using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. 1071: 141–145.
- Mengyan Li. *et. al.* (2011). Rapid analysis of 1,4-dioxane in ground water by frozen micro-extraction with gas chromatography- mass spectrometry. Ground Water Monit. Remed. 31(4): 70–76.
- Black RE.; Hurley FJ. and Havery DC. (2001). Occurrence of 1,4-dioxane in cosmetic raw materials and finished cosmetic products. J. AOAC. Int. 84 (3):666-670.

Dental caries in relation to nutritional status among institutionalized and non-institutionalized orphans in Baghdad city

Aseel M. Abdul Majeed Al-Bermani and Zainab A. A. Al-Dahan

Dept. of Pedodontics and Preventive Dentistry / Collage of Dentistry /University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: aseel_albermani@yahoo.com

ABSTRACT

Tooth decay and malnutrition are public health issues, especially among socioeconomically disadvantaged groups, as orphans. The aim of this study was to assess the nutritional status of orphans and its impact on the dental health. Five-hundred (500) children aged 6-12 years old, 254 males and 246 females, comprised of institutionalized, non-institutionalized orphans and controls were participated in this study. Nutritional status was assessed by body mass index (BMI) according to criteria of WHO, (2007). Diagnosis and recording of dental caries were done according to criteria of WHO, (1987). Institutionalized orphans were found with low mean BMI, significantly differed from non-institutionalized orphans and highly significant compared with controls, while the non-institutionalized orphans were significantly differed from controls. The non-institutionalized orphans were in higher mean rank of dmfs significantly than both institutionalized orphans and controls, and higher significant increased DMFS than controls. According to BMI indicators of both orphan groups, it was found that thinness groups were associated with high caries experience, especially significant regarding ds, dmfs and MS means rank among non-institutionalized orphans. The obtained results concluded that nutritional status is a relative factor that may affect the dental health of children, and that non-institutionalized orphans were in higher caries experience than institutionalized orphans and controls. Thus, more attention and care are needed through dental care and educational programs.

Keywords: orphanage, body mass index (BMI), nutrition, DMFS/dmfs (decay, missing, filling surface)

المخلص باللغة العربية

يشكل كل من تسوس الأسنان وسوء التغذية قضية صحة عامة في حد ذاتهما، خصوصاً ضمن الفئات التي تعاني من وضع اجتماعي واقتصادي متردد كالأيتام. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الحالة الغذائية للأيتام، ومدى تأثيرها على صحة الأسنان. شملت عينة الدراسة خمسمائة (500) طفل تراوحت أعمارهم ما بين 6-12 سنة (254 ذكورا و 246 إناثا) من الأطفال الأيتام في المؤسسات والأيتام من غير المؤسسات والمجموعة الضابطة الذين هم تحت رعاية ذويهم في مدينة بغداد. تم تقييم الحالة الغذائية اعتماداً على مؤشر كتلة الجسم (BMI) وفقاً لمعايير منظمة الصحة العالمية الصادرة عام 2007. تم تشخيص وتسجيل تسوس الأسنان اعتماداً على معايير منظمة الصحة العالمية الصادرة عام 1987. أظهرت النتائج أن مؤشر كتلة الجسم لأيتام المؤسسات كان متدنياً بفارق معنوي قياساً للأيتام من غير المؤسسات و بفارق معنوي عال قياساً بالمجموعة الضابطة. بينما كان المؤشر لدى الأيتام من غير المؤسسات أقل بفارق معنوي نسبة إلى المجموعة الضابطة. كما أن الأيتام من غير المؤسسات أظهرت نسبة عالية بفارق معنوي لتسوس أسطح الأسنان اللبينية عن أيتام المؤسسات والمجموعة الضابطة وبفارق معنوي عال لتسوس أسطح الأسنان الدائمة عن المجموعة الضابطة. من ناحية أخرى، أظهرت مؤشرات كتلة الجسم لمجموعتي أيتام المؤسسات وغير المؤسسات أن المجموعات التي تعاني من النحافة ترتبط بارتفاع التسوس وخاصة بفارق معنوي متوسط في أسطح الأسنان الدائمة المفقودة بسبب التسوس (MS) وتسوس أسطح الأسنان اللبينية ds, dmfs ضمن مجموعات الأيتام الذين يعانون من النحافة من غير المؤسسات. وتستنتج الدراسة أن حالة التغذية هي عامل نسبي قد تؤثر على صحة الأسنان للأطفال عموماً. وأن الأيتام من غير المؤسسات لديهم مستويات عالية للإصابة بالتسوس مقارنة مع أيتام المؤسسات والمجموعة الضابطة، مما يستدعي ضرورة زيادة الاهتمام حول تقديم خدمات علاجية للأسنان مع برامج تثقيفية.

INTRODUCTION

An orphan is a child who has lost either one or both of parents due to death, abandonment or neglecting (1). Orphans are considered as socially disadvantaged groups (2). In Iraq, orphans are almost 4.5 millions due to violence and displacement happened after year 2003, and unfortunately, they are increasing every day (3). Orphans are either living with a family member or residing in orphanage (4).

Dental caries is a serious public health issue, especially among young children and adolescents causing pain, and if untreated may lead to tooth loss and costly management (5, 6), which in turn may cause malnutrition and other health problems (7, 8). Several Iraqi studies had reported that nutritional status may affect the dental health among children of different age groups and geographical locations (9-18).

The present study was carried out in Baghdad city as no previous study was found to describe the dental caries in relation to nutritional status of orphans living under institutionalized care compared to non-institutionalized orphans.

PATIENTS AND METHODS

The sample size comprised of 500 children aged 6 to 12 years, included institutionalized orphans (123 children; 57 girls and 66 boys), represented the first study group, non-institutionalized orphans living with their relatives, matching with age and gender with the institutionalized ones; (127 children; 66 girls and 61 boys) represented the second study group, and children matching with age and gender, living with their parents, examined in schools of same geographic area (250 children; 123 girls and 127 boys) represented the control group. Permission was obtained from the Ministry of Labor and Social Affairs and Baghdad educational institutions in order to meet subjects with no obligation. The purpose of the study was explained to the institutions and schools' authorities to ensure full cooperation, also special consents were distributed to parents to obtain permission for including their children in the study. Children without permission from their parents, with serious systemic diseases, wearing orthodontic appliances, and/or uncooperative were not examined.

Body Mass Index (BMI) reflected the nutritional status of the sample. It is a number calculated from child's weight and height named as anthropometric measurement (19). The heights of the participants were measured in centimeters, using an ordinary measuring tape installed vertically, while weights were assessed in kilograms using a mechanical scale. The BMI was calculated as the ratio of the subject's body weights (in kg) to the square of their heights (in meters), following the below formula:

$$\text{Bodyweight} / (\text{Height})^2 = \text{BMI (kg/m}^2\text{)}$$

BMI-for-age should be presented in Z-scores based on the WHO 2007 Growth Reference (GR) for children aged 5-19 years. Categories were defined: Severe thinness (BMI <-3SD), thinness (BMI \geq -3 SD & < -2 SD), acceptable weight (normal)

(BMI -2SD to +1SD), overweight (BMI >+1SD & \leq +2 SD) obesity (BMI >+2SD) (20).

Oral Examination was performed by a single examiner using mouth mirror and dental explorer for each child, caries experience was recorded according to WHO (1987) (21), decayed, missing, filled surfaces index (dmfs for primary and DMFS for permanent teeth). Statistical analyses were computer assisted using SPSS version 23 (Statistical Package for Social Sciences). The statistical tests used are: independent samples t-test, ANOVA, Bonferroni t-test, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant and P values that less than 0.001 were regarded as highly significant.

RESULTS

The majority of children were distributed according to the BMI under the category of acceptable weight. The mean \pm SE values of BMI for institutionalized orphans (-0.45 \pm 0.088) were significantly lower than non-institutionalized orphans (-0.03 \pm 0.11, $p=0.037$) and more significant lower than control (+0.41 \pm 0.093, $p<0.001$), while the mean \pm SE values of BMI for non-institutionalized orphans were significantly lower compared to control with $p=0.007$ (table 1).

Table (2) illustrates high significant differences regarding decayed surface (ds) among the groups, as the mean rank value of ds was significantly lower among the institutionalized orphans (213.2) compared to each of non-institutionalized orphans (276, $p<0.001$) and controls (255.9, $p=0.003$). However, no significant difference between non-institutionalized orphans and controls was observed. Considering missing surface (ms), there was no significant difference in mean rank among the three groups. Significant differences regarding filled surface (fs) among the groups ($p=0.015$) were found, with mean rank value of fs significantly higher among institutionalized orphans (269.8) compared to controls (240.1, $p=0.004$) and higher but without significant difference to non-institutionalized orphans (252.3). Higher mean rank value of fs was found among non-institutionalized orphans compared to controls, also without significant difference. Highly significant difference for dmfs among the groups ($p<0.001$). The non-institutionalized orphans were with dmfs mean rank (287.3) significantly higher compared to both institutionalized orphans (221.8, $p<0.001$) and controls (245.9, $p=0.006$), however there was no significant difference in mean rank dmfs between institutionalized orphans and controls.

Table (1): Difference in BMI for age Z score categories (mean± SE) among the groups

BMI for age Z score	Institutionalized Orphans	Non-institutionalized Orphans	Controls	p
	Mean± SE	Mean± SE	Mean± SE	
	-0.45±0.088**	-0.03± 0.11*	0.41±0.093	

* Significant $P < 0.05$, ** Highly Significant $P < 0.001$

Table (2): The difference in mean rank of caries experience ds, ms, fs and dmfs among the groups

Parameter	Institutionalized Orphans	Non-institutionalized Orphans	Controls	P
	Mean Rank	Mean Rank	Mean Rank	
ds	213.2	276**	255.9*	<0.001**
ms	243.8	259.2	249.4	0.3[NS]
fs	269.8*	252.3	240.1	0.015*
dmfs	221.8	287.3**	245.9	<0.001**

* Significant $P < 0.05$, ** Highly Significant $p < 0.001$

Table (3) showed the caries reflected by surface for permanent teeth among the three groups, the non-institutionalized orphans had mean rank value of Decayed Surface (DS) fraction (294.7) highly significant elevated compared to both of institutionalized orphans (234.4) and controls (236) with $p < 0.001$ for both, while there was no significant difference between institutionalized orphans and controls. Results showed that there was no significant difference among the groups in regard to Missing Surface (MS). For Filled Surface (FS) fraction, the mean rank value for institutionalized orphans was (286.1) highly significant increased compared to both non-institutionalized orphans (233.6) and controls (241.6) with $p < 0.001$ for both. However, there was no significant difference between non-institutionalized orphans and controls. The results showed no significant difference in DMFS mean rank value between institutionalized orphans (256.5) and each of non-institutionalized orphans (288.5), and controls (228.2). However, the DMFS mean rank value for non-institutionalized orphans was highly significant increased compared to controls with $p < 0.001$.

Table (4) demonstrates caries experience by surface in primary dentition according to BMI grades, the thinness group among institutionalized had high ds mean rank value with non significant positive linear correlation, however significant high mean rank was found among thinness group of non-institutionalized orphans (84.3, $p = 0.02$), with significant negative correlation ($r = -0.262$; $p = 0.003$). There was non significant negative linear correlation for ms mean rank among BMI groups of both institutionalized and non-institutionalized orphans. For the fs mean rank between BMI groups, there was no significant linear correlation: negative for institutionalized orphans, while positive for non-institutionalized orphans. The dmfs mean rank value, showed non-significant negative correlation among BMI groups of institutionalized orphans, while among thinness group of non-institutionalized orphans, significant high value (80.6, $p = 0.011$) with significant negative correlation with BMI ($r = -0.226$; $p = 0.011$) was found.

According to BMI grades, caries reflected by surface DMFS for permanent teeth, for institutionalized orphans, there was high mean rank DS in thinness group, with significant negative linear correlation ($r = -0.183$, $p = 0.043$), while acceptable weight group of non-institutionalized orphans was with high mean rank DS with non-significant negative linear correlation, as seen in table (5). In regard the MS mean rank, the acceptable weight among institutionalized orphans had high value with non-significant positive linear correlation with BMI, whereas the thinness group among non-institutionalized orphans had significant high value (70.9, $p = 0.04$) with non-significant negative linear correlation with BMI. In each of institutionalized and non-institutionalized orphans, there was non-significant positive linear correlation for FS among BMI grades. The thinness group of each the institutionalized and non-institutionalized orphans was with high non-significant DMFS mean rank value with non-significant negative linear correlation with BMI.

Table (3): The differences in mean rank of caries experience DS, MS, FS and DMFS among the groups

Parameter	Institutionalized Orphans	Non-institutionalized Orphans	Controls	P
	Mean Rank	Mean Rank	Mean Rank	
DS	234.4**	294.7**	236	<0.001**
MS	250	251.9	250	0.75[NS]
FS	286.1**	233.6	241.6	<0.001**
DMFS	256.5	288.5**	228.2	<0.001**

* Significant $P < 0.05$, ** Highly Significant $P < 0.001$

Table (4): caries experience ds, ms, fs and dmfs (mean rank) of institutionalized and non-institutionalized orphans by BMI

BMI groups	Institutionalized Orphans				Non institutionalized Orphans			
	ds	ms	fs	dmfs	ds	ms	fs	dmfs
	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank
Thinness	65	66.5	46.5	55.7	84.3	79.1	53.5	80.6
Acceptable	61.8	61.8	62.8	62.3	64.2	63.4	65.2	64.7
Overweight / obese	-	-	-	-	28	54.5	53.5	20.5
Difference	0.81 [NS]	0.52 [NS]	0.15 [NS]	0.64 [NS]	0.02*	0.11 [NS]	0.24 [NS]	0.011*
r, p	r=-0.01, p=0.92 [NS]	r=-0.122, p=0.18 [NS]	r=-0.055, p=0.54 [NS]	r=-0.082, p=0.37 [NS]	r=-0.262, p=0.003*	r=-0.149, p=0.09 [NS]	r=0.115, p=0.2 [NS]	r=-0.226, p=0.011*

* Significant $P < 0.05$

Table (5): caries experience DS, MS, FS and DMFS (mean rank) of institutionalized and non-institutionalized orphans by BMI

BMI groups	Institutionalized Orphans				Non institutionalized Orphans			
	DS	MS	FS	DMFS	DS	MS	FS	DMFS
	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank	Mean rank
Thinness	79.6	61.5	57	77.9	61.3	70.9	66.7	69.2
Acceptable	61.1	62	62.3	61.2	64.8	63.6	63.4	63.6
Overweight / Obese	-	-	-	-	51.3	63	72.6	64.3
Difference	0.16 [NS]	0.82 [NS]	0.66 [NS]	0.24 [NS]	0.69 [NS]	0.04*	0.46 [NS]	0.91 [NS]
r, p	r=-0.183, p=0.043*	r=0.153, p=0.09 [NS]	r=0.043, p=0.63 [NS]	r=-0.147, p=0.1 [NS]	r=-0.055, p=0.54 [NS]	r=-0.065, p=0.47 [NS]	r=0.124, p=0.17 [NS]	r=-0.025, p=0.78 [NS]

*Significant $P < 0.05$

DISCUSSION

The present study was conducted to reveal the dental health in relation to nutritional status, among institutionalized and non-institutionalized orphans because orphans represent a high risk group of disadvantaged children as they lack basic information, motivation, and supervision provided by parents, especially in the early stages of their lives. Moreover, they may be neglected or abused in the latter half of childhood by relatives and/or society (22). Therefore, the comparison with the general population cannot be justified.

Several Studies revealed that the dental health of institutionalized orphans could be different from other population groups (23-30).

The comparison of malnutrition of the present study with other studies is difficult because of using different criteria in classification of malnutrition; moreover, there is no study about the nutritional

status in relation to the dental health of orphans to compare with its results. The means of BMI-age of each institutionalized and non-institutionalized orphans were lower than that estimated by (31), for the age 7-12 years, but the mean BMI-age for controls in the present study at the same age range was comparable to what estimated by (31). However, high percentage of children in the three groups had acceptable weight especially the institutionalized orphans, and this finding comes in accordance with Al-Ani (17) for age 12 and Ahmed (31) for the age group 7-12 years. This is an indication of improvement in the nutritional status among Iraqi children in the current years.

In regard to ds mean rank, institutionalized orphans were more significant lower than controls in accordance to studies of (23) for age 4 and 5, (24), (29) and (30), and non-institutionalized orphans (with no significance difference between them). Institutionalized orphans had less DS than controls

with no significant difference between them, in contrast to Ahmed (24), but the non-institutionalized orphans were significantly higher than the two groups. The lower caries levels seen among institutionalized orphans is in agreement with Al-Malik and Holt (23), who explained that it may be partly attributable to the effectiveness of scheduled dietary control and regular oral hygiene measures.

The thinness group of institutionalized orphans was found with high ds mean rank compared to acceptable weight. The same was found among non-institutionalized orphans, but with significant difference, with the lowest value associated with overweight/obese group. This can be explained by multiple reasons as lack of dental awareness, poor access to dental care, or delay exfoliation pattern of primary teeth among malnourished children (32), which lead to increase caries experience in primary teeth in comparison to their acceptable counterpart children, and lack of balanced diet, as defective or lower nutrient intake among malnourished children, increases caries susceptibility through changing in tooth formation (13, 33).

Caries experience for permanent dentitions was found high among thinness group compared to acceptable weight group of institutionalized orphans with significant weak inverse relation to BMI, because most of them related to low economically background, thus making them at high risk for dental caries (34). Whereas among the non-institutionalized orphans, DS was found high among acceptable weight group more than the thinness and overweight/obese group, which represent the lowest with no significant difference among BMI groups. The lower DS among thinness children may be due to delay eruption of permanent teeth (35). Whereas low caries in overweight/obese may be due to high intake of foods of caries-protective properties as high-fat products (36). As some had received donations, or may be the time for being orphan affects this because of neglecting.

Among institutionalized orphans, the fs/FS in both primary and permanent dentition were the major component of dmfs/DMFS, then ms/MS ranked second, which mean that treatment was directed toward restoration more than extraction of teeth due to presence of dental clinic with sufficient supply and instruments in each orphanage, this in contrast to the study of (24) may be because of sanction at that time affecting dental services and supplies, or due to lack of satisfactory oral hygiene practices and dental services as shown in other studies of different countries (26-28, 30). Moreover, the orphanage staffs and caregivers were in need for continuous oral health education to raise their dental knowledge.

The non-institutionalized orphans, the ds/DS in both primary and permanent dentition were the major component of dmfs/DMFS, which mean that minimum dental services those children had. Secondly ranked, ms/MS, which indicated that if treatment was present, it was directed toward extraction rather than preserving deciduous and permanent teeth. The cause may be due to most of them avoid dental visits because of barriers imposed by expensive dental services, fear, or concern about being judged by dentists for their poor oral condition. Moreover, a lot of them had untreated decay as they eligible for public dental care (37) and social welfare, compared to institutionalized

orphans who had specific dental clinic offered free dental services for them.

The control children resembled non-institutionalized orphans regarding dmfs components ranking, but different record was found for permanent dentition: the MS was the major component of DMFS, followed by FS and DS was the last. This may be explained by low dental knowledge about teeth importance among parents and seeking treatment in case of pain only.

These results reflected the need for regular dental preventive and care programs to prevent initiation and progression of dental caries and preserve teeth. Moreover, there is a need for continuous oral health educational programs which must be enhanced through schools and public health centers.

REFERENCES

1. Park K. (2015). Park's textbook of preventive and social medicine. 23rd ed.
2. Damle SG. (2009). Textbook of pediatric dentistry. 3rd ed. New Delhi.
3. Hussain H. (2016). Conflict in Iraq, human costs, morbidities and civilian suffering. Third ISA Forum of Sociology (July 10-14, 2016). Isaconf.
4. Al-Alak MM.; Abdul Hameed SM.; Bader SS.; Huwail MJ. and Ash H. (2012). Iraq multiple indicator cluster survey-2011. Preliminary report, April.
5. World Health Organization (WHO). (2013). Oral health surveys: basic methods – 5th ed.
6. Scottish Dental Clinical Effectiveness Program (SDCEP). (2010). Prevention and management of dental caries in children. Dental Clinical Guidance. April.
7. Bagramian RA.; Garcia-Godoy F. and Volpe AR. (2009). The global increase in dental caries: A pending public health crisis. Am. J. Dent. 22(1): 3-8.
8. Welbury R. and Cairns A. (2013). Pediatric dentistry I. In: Master Dentistry. Volume 2: Restorative Dentistry, Pediatric Dentistry and orthodontics. 3rd ed. Elsevier Ltd. Pp.: 193-225.
9. Diab BS. (2003). Nutritional status in relation to oral health condition among 6-10 years primary school children in the middle region of Iraq. PhD. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
10. Droosh MK. (2007). Protein-energy malnutrition in relation to oral health condition among 6 and 9 year old primary school children in Sulaimania city in Iraq. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
11. Al-Saadi A. (2008). Oral health condition and salivary constituents (zinc, copper, calcium, iron and total protein) among the selected overweight primary school children. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
12. Almaas JO. (2009). The Effect of intelligence quotient and nutritional status on oral health condition and salivary elements among 6 years old school children in Baghdad/Iraq. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
13. Hasan ZS. (2010). The Effect of nutritional status on dental health, salivary physicochemical characteristics and odontometric measurements among five years old kindergarten children and fifteen years old students. Ph. D Thesis. University of Baghdad.

14. Al-Ghalebi SN. (2011). Oral health status and treatment needs in relation to nutritional status among 9-10 year-old school children in Nassirya city/Iraq. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
15. Radhi NJ. (2012). Salivary vitamins and total proteins, in relation to caries experience and gingival health, according to nutritional status of a group of five-year old children. J. Baghdad Coll. Dent. 24(3): 129-136.
16. Al-Sadam N. (2013). Oral health status in relation to nutritional and social status in Kerbal'a Governorate for primary school students aged 12 years old. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
17. Al-Ani N. (2013). Oral health status, treatment needs and dental anomalies in relation to nutritional status among 12 year-old School Children in Heet city/Al-Anbar governorate/ Iraq. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
18. Chalooob EK. and Qasim AA. (2013). Nutritional status in relation to oral health status among patients attending dental hospital. J. Baghdad Coll. Dent. 25(Special Is): 114-119.
19. Trowbridge FL. (1988). Evaluating nutritional status of infant and children. In: Clinical nutrition. 2nd ed. The CV Mosby Comp. St Louis. Washington DC Toronto. Pp.: 119-136.
20. Wang Y. and Chen HJ. (2012). Use of percentiles and z-scores in anthropometry. In: Handbook of anthropometry. Springer New York. Pp.: 29-48.
21. World Health Organization (WHO). (1987). Oral health survey, basic methods. 3rd ed. Geneva, Switzerland.
22. Shanbhog R.; Raju V. and Nandlal B. (2014). Correlation of oral health status of socially handicapped children with their oral health knowledge, attitude, and practices from India. J. Nat. Sci. Biol. Med. 5(1): 101-107.
23. Al-Malik M. and Holt RD. (2000). The prevalence of caries and of tooth tissue loss in a group of children living in a social welfare institute in Jeddah, Saudi Arabia. Int. Dent. J. 50(5): 289-292.
24. Ahmed ZS. (2002). Oral health status and treatment needs among institutionalized children and adolescents in comparison to school children and adolescents in Iraq. MSc. Thesis. Department of preventive dentistry, University of Baghdad.
25. Camacho GA.; Camacho E.; Rodríguez RA.; Guillé ADJ.; Juárez HM.; Pérez MG. and del Pilar Pérez-Martínez M. (2009). Predisposing factors for dental caries in girls at an orphanage of Mexico. Acta. Pediatr. 30(2):71-76.
26. Khare V.; Koshy A.; Rani P.; Srilatha S.; Kapse SC. and Agrawal A. (2012). Prevalence of dental caries and treatment needs among the orphan children and adolescents of Udaipur district, Rajasthan, India. J. Contemp. Dent. Pract. 13(2):182-187.
27. Gu S.; Lin J.; Wang M.; Qian W.; Wu Y.; Zhu X. and Wu Y. (2014). Oral health status of 4-17-year-old orphan children and adolescents of Chongqing. Hua xi kou qiang yi xue za zhi= Huaxi kouqiang yixue zazhi. West China J. Stomatol. 32(4): 378.
28. Sharma A.; Gaur A.; Pareek S.; Raja V.; Sanadhya S. and Sharma A. (2014). Oral health status and treatment needs among orphanage children of Jaipur City. Sch. J. App. Med. Sci. 2(5D):1776-1780.
29. Al-Maweri SA.; Al-Soneidar WA. and Halboub ES. (2014). Oral lesions and dental status among institutionalized orphans in Yemen: a matched case-control study. Contemp. Clin. Dent. 5(1): 81-84.
30. Gunawardane SR.; Angamma HM.; Palanage NN.; Bannaheka BM.; Fonseka MC. and Bandara JJ. (2015). Oral health status and treatment needs among institutionalized children in the central province of Sri Lanka. Sri Lanka Dent. J. 45(03): 85-93.
31. Ahmed HS. (2015). Time of emergence of permanent teeth and impact of nutritional status among 4-15 years old children and teenagers in Basrah city /Iraq. MSc. Thesis. College of Dentistry, University of Baghdad.
32. Sheetal A.; Hiremath VK.; Patil AG.; Sajjanetty S. and Kumar SR. (2013). Malnutrition and its oral outcome – A review. J. Clin. Diagn. Res. 7(1):178-180.
33. Mallonee L.; Boyd L. and Stegeman C. (2014). Position of the academy of nutrition and dietetics on oral health and nutrition. Practice paper of the academy of nutrition and dietetics: oral health and nutrition. J. Acad. Nutr. Diet. 114 (6): 958–1060.
34. Dean J.; Avery D. and McDonald R. (2011). Dentistry for the child and adolescent. 9th ed. Mosby, Elsevier, China.
35. Alvarez JO. and Navia JM. (1989). Nutritional status, tooth eruption and dental caries. A review. Am. J. Clin. Nut. 49(3):417-426.
36. Nizal AE. and Papas AS. (1989). Nutrition in clinical dentistry. 3rd ed. W.B. Saunders Company.
37. Ramraj C.; Azarpazhooh A.; Dempster L.; Ravaghi V. and Quiñonez C. (2012). Dental treatment needs in the Canadian population: analysis of a nationwide cross-sectional survey. BMC. Oral Health. 12(1):46.

Evaluation of osseous changes associated with clinically diagnosed group II temporomandibular disorders using cone beam computed tomography

Wafaa J. Hussein, Jamal N. Ahmed and Zainab H. Al-Ghurabi

Dept. of Oral Diagnosis / College of Dentistry / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: aaldouri96@yahoo.com

ABSTRACT

Clicking is a common complain of patients suffering from Temporomandibular Joint Disorders TMD. It is considered the early sign of internal derangement. The aim of the study was to evaluate the osseous changes (flattening, osteophytes, Ely's cysts and surface irregularity) in patients categorized as group II (who have reproducible click on excursion with either opening or closing click) according to Research Diagnostic Criteria (RDC) by using Cone Beam Computed Tomography (CBCT).

Ninty- one (91) Iraqi participants (46 study, 45 control) were enrolled in this study. Those with internal derangement were included in the study and were examined according to Research Diagnostic Criteria (RDC) for TMDs group II disc displacements, the control group were patients taking radiographs for other purposes like implants, orthodontic treatments or surgery. Then osseous abnormalities were assessed using CBCT.

There were statistically significant difference between the joints osseous changes of the TMD and non-TMD groups ($P < 0.05$). The most frequent change observed was surface irregularity (73%) followed by flattening (61%) of the condyles, osteophytes were observed in (50%) and the Ely's cyst was found in (20%).

The study demonstrated that osseous changes of the condyles of TMJs with group II disc displacement were higher than the changes in the non-TMD group. CBCT is the imaging modality of choice for diagnosis of TMD and helpful in categorizing patients with TMD.

Keywords: Computed Tomography, Temporomandibular Disorder, Flattening, Osteophytes, Ely's cyst

الملخص باللغة العربية

يشكو معظم المرضى من حالة فرقة المفصل الذين يعانون من الاضطراب الصدغي، ويعتبر العلامة المبكرة للاضطراب الداخلي للمفصل. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم التغيرات العظمية للمفصل الصدغي الفكي (تسطح العظم، النابتة العظمية، أكياس تحت الغضروف وعدم انتظام سطح المفصل) في مرضى المجموعة الثانية لإزاحة المفصل (الذين لديهم فرقة ناتجة أثناء السيوح التي تكون فرقة إما مع فتح أو غلق الفم) وفقاً لمعايير التشخيص البحثية باستخدام التصوير المقطعي المخروطي ودراسة مدى ارتباط هذه التغيرات مع العلامات والأعراض السريرية.

شارك 91 مريضاً في هذا البحث (46 لمجموعة الدراسة و45 لمجموعة المقارنة). شكلت الدراسة المرضى الذين يعانون من فرقة المفصل، وتم إجراء الفحوصات وفقاً لمعايير التشخيص البحثية للاضطراب الصدغي (ضمن المجموعة الثانية للاضطراب الداخلي للمفصل). تم تقييم التشوهات العظمية باستخدام التصوير المقطعي المخروطي. تمت المقارنة مع مرضى كانوا يأخذون صور شعاعية لأغراض أخرى كزرع الأسنان، تقويم الأسنان أو الجراحة.

لوحظ وجود فرق معنوي كبير بين التغيرات العظمية لمجموعة الدراسة وبين مجموعة المقارنة، كان عدم انتظام سطح المفصل أكثر التغيرات العظمية حدوثاً (73%) متبوعاً بتسطح عظم لقمة الفك السفلي (61%)، وقد لوحظت النابتات العظمية في (50%) ووجود الأكياس تحت الغضروف في (20%).

أوضحت الدراسة بأن عاملي العمر والجنس لم يكن لهما تأثير على التغيرات العظمية بين مجموعة الاضطراب الصدغي ومجموعة المقارنة. وقد كانت التغيرات العظمية لعظم لقمة الفك السفلي للمرضى الذين يعانون من الاضطراب الداخلي للمفصل أعلى من مجموعة الذين لا يعانون منه. لذلك يعتبر التصوير المقطعي المخروطي وسيلة تصويرية ممتازة للكشف عن التغيرات العظمية في المرضى الذين لديهم فرقة الفك أو مصنفون من المجموعة الثانية وفقاً لمعايير التشخيص البحثية.

INTRODUCTION

Temporomandibular joint TMJ is a fascinating, complex and unique joint among other joints of human body. The condyle rotates within the glenoid fossa and translates anteriorly along the articular eminence which gives maximal incisal opening of the mandible. Because of these properties, the TMJ is described as "ginglymodiarthroidial" joint (1,2). Temporomandibular Disorders (TMD) is a communal term which embraces a number of clinical problems involving masticatory musculature, osseous and ligamentous elements of TMJ, characterized by pain, headache, mouth opening limitation, locking of the joint, clicking and crepitation. These clinical signs and symptoms are transitory in most conditions and therefore treatment is not urged. Still in about 5% of cases, these disorders can cause powerful pain and osseous degeneration which explains the need for accurate diagnosis earlier than outset of progressive degenerative changes (3-5).

A variety of radiographically visible morphological changes of the mandibular condyle have shown to occur in patients with TMD. A close relationship have been reported between TMJ Internal Derangement (ID) and osseous changes of the condyle such as flattening, osteophytes, surface irregularities and subcortical cysts (6,7).

Cone Beam Computed Tomography (CBCT) provides multiplanar and three dimensional 3D images and considerably lower radiation dose and quick scan, compared with multislice computed tomography (CT). CBCT allows accurate analysis of TMJ morphology without superimposition and distortion because of its capability to produce (1:1) reconstructed image (8,9).

The main objective in this study was to evaluate the osseous changes of the TMJ in a sample of Iraqi patients with TMD considered group II according to Research Diagnostic Criteria RDC using CBCT (4).

PATIENTS AND METHODS

The study design: A prospective study was performed on total subject of (91) Iraqi participants who were (18) years and above in age, they were referred to the Specialized Health Center in Al-Sadder city in Baghdad/ Iraq for Cone Beam Computed Tomography (CBCT) imaging, from December 2015 till July 2016. All subjects were informed well about the study and were signed a written consent form.

Study group composed of (46) patients, they were (31) female and (15) male. The diagnosis of this group is based on the clinical features of internal derangement and categorized as group II according to RDC.

The control group composed of (45) non-TMD patients, they have attended the clinic seeking CBCT imaging for purposes other than TMD like implants, orthodontic treatment or surgery. They

had no pain, limitation of movement or impaired function of their TMJ, and no joint sounds. Patients have developmental defects, fractured condyle or previous surgical treatments were excluded.

Evaluation was done using Kodak 9500 3D system machine for TMD patients and compared with the non-TMD patients records, with parameters of CBCT device were 90 kV, 10 mA, exposure time 10.80 seconds and resolution of 300 voxel. The patient was prepared according to the manufacturer's recommendations of the CBCT machine.

The right and left condyle was examined from the medial pole to the lateral pole of each joint and this was done in three planes the coronal, the sagittal and the axial looking for the following osseous changes in the head of the condyle: flattening: loss of the smooth convexity of the head of the condyles (figure 1), osteophyte: marginal local outgrowth of bone raised from a mineralized joint surface (figure 2), Ely's cyst or subcortical cyst: rounded radiolucency that located below the cortical plate or appear deep in trabecular area (figure 3) condylar surface irregularity: any irregularity in the surface of the condyle were examined thoroughly in coronal, sagittal and axial views (figure 4).

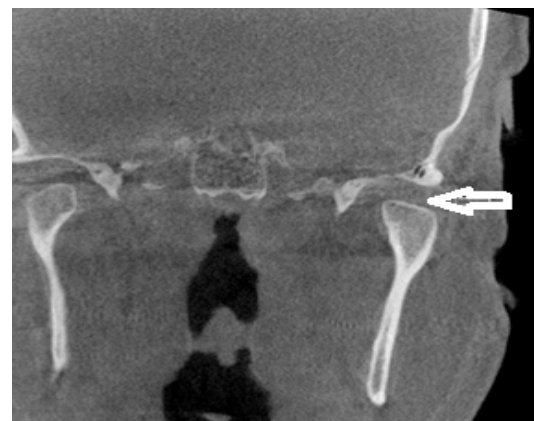


Figure (1): Flattening shown on CBCT (arrow); coronal view

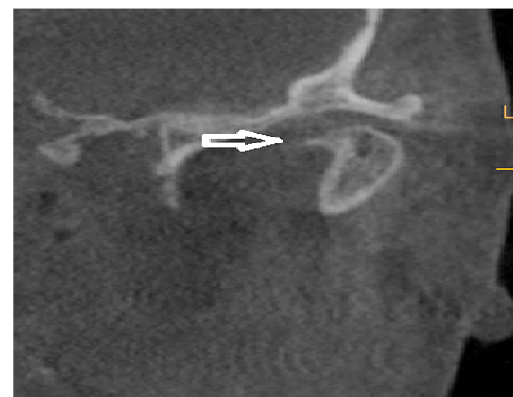


Figure (2): Osteophyte shown on CBCT (arrow); coronal view

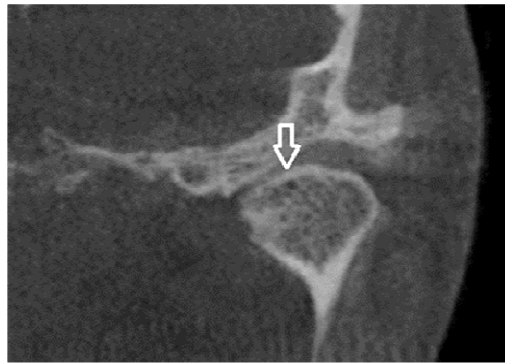


Figure (3): Ely's cyst shown on CBCT(arrow); coronal view



Figure (4): condylar surface irregularity shown on CBCT (arrows); A: coronal view, B: axial view

Statistical Analysis: Data were transformed into statistical package for social sciences version 22 (SPSS v.22). Chi-square test for independence variables, t-test for two independent samples. Findings with P value less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

This study was done on a total of (91) participants (182 joints). The subjects were selected as group II according to the RDC for TMDs. They were classified into TMD (46 subjects) as study group and non-TMDs (45 subjects) as control group. The mean age of the case group was (34.8 ± 13.0) years while the mean age of the control group was (34.1 ± 15.3) years. The study samples were (15) males (32.6%) and (31) females (67.4%) while control group contained (21) males (46.7%) and (24) females (53.3%). Age did not vary significantly in its mean between the two study groups ($P > 0.05$),

also there was no significant association between gender and TMD status ($P > 0.05$) (table 1).

Table (1): Age and gender distribution in TMD and non-TMD groups

variables	Categories	Study Group				P value
		TMD		Non-TMD		
		N=46	100%	N=45	100%	
Gender	Male	15	32.6%	21	46.7%	0.170
	Female	31	67.4%	24	53.3%	
Age (y)	Mean± SD	34.8±13.0		34.1±15.3		0.834

N: Total

Assessment of the CBCT of joints of TMD patients and non-TMD patients showed a statistically significant difference between all the osseous changes of the condyles of TMJ in the group II disc displacement and the changes of the TMJ in the non-TMD group ($P < 0.05$).

The most frequent change observed was irregularity of the condyle seen in (64) joints (73%), while it was seen in (20) joints (22%) of non-TMD group.

Flattening of articular surface was observed in (53) joints (61%) in TMD group and was in (27) joints (30%) of non-TMD group. Osteophytes were observed in (44) joints (50%) in TMD group, and

found in (8) joints (9%) in non-TMD group. The Ely's cyst was found in (17) joints (20%) in TMD group, and in (0) joints (0%) in non-TMD group (table 2).

Table (2): Comparison between TMD joints and non-TMD joints regarding the osseous changes

Variables	TMD joints 87 joints	Non-TMD joints 90 joints	P value
Surface Irregularity	64 (73%)	20 (22%)	<0.001
Flattening	53 (61%)	27 (30%)	<0.001
Osteophyte	44 (50%)	8 (9%)	<0.001
Ely's cyst	17 (20%)	0 (0%)	<0.001

DISCUSSION

The anatomical and functional properties of the TMJ make it unique and complicated among the human body joints. The structure of the TMJ is adapted by the condylar remodeling which is a physiologic action to maintain the function of the joint. It is established on an interaction between the mechanical forces beard by the TMJ and the adaptive quantities of the condyle. The elements of the TMJ keep their extent for remodeling after ceasing of growth and keep changing their structure and morphology. The irregularities in the mandibular condylar morphology increased with age. Older age patients are set to have more common and severe bone changes than younger age patients (4, 10, 11).

In this study, it was found that no significant difference in age and gender between study and control group, so we eliminated the effects of these two possible factors on the results of our study.

According to Campos *et al.* (12) the degenerative bone changes are more likely to appear on the condyle rather than the articular eminence. Also Hintze *et al.* (13) found high predominance of condylar bony changes in cases with internal derangements.

The degenerative bony changes which were assessed in this study were flattening, osteophyte, Ely's cyst (or subcortical cyst), irregularity of the condylar surface. According to Campos *et al.* (12) and Nah (4), the structural bony changes in internal derangement are identified by the development of osteophytes, subchondral cysts and irregularity or erosion of the condylar surface. These degenerative bony changes are represented as radiographic findings of osteoarthritis.

On comparing the joints of TMD and non-TMD group in this study, surface irregularity and flattening of the articular surface were the predominant findings with very high significant difference between the two groups ($P < 0.001$). Surface irregularity represent the initial stage of degenerative changes, which means the TMJ is sensitive and may have surface bony changes and also lead to changing on occlusion (5).

Flattening is the result of change in the shape of the condyle and articular eminence due to excessive forces, this is a physiologic process which is called remodeling that is essential to normal functional requirements (14). The osteophytes also had very high significant difference between TMD and non-TMD group. These results support the findings reported by Nah (15). Osteophytes develop in the progressive stage of degenerative changes in an attempt of the joint to adapt itself to do repairing and improve the overload of the occlusal forces, osteophytes mean an area of new formed cartilage (5).

In internal derangement, the TMJ may be asymptomatic but has arthritic changes which observed on radiograph, radio graphical findings representing degenerative disease may include the existence of Ely's cyst (15-17). TMJ remodeling and adaptation is often recognized even in the absence of symptoms and is treated as abnormal only when lead to signs and symptoms of pain or dysfunction, that explains the existence of bone changes in non-TMD patients (11, 14).

CONCLUSION

Age and gender factors had no effect on the osseous changes findings between TMD and non-TMD group. Group II disc displacement demonstrates higher osseous changes than in the non-TMD group. Surface irregularity followed by flattening were the most predominant osseous changes of the condyle that were found in this study. CBCT is the imaging modality of choice for diagnosis of TMD and it is helpful in categorizing patients with TMD.

REFERENCES

- Okeson JP. (1989). Management of temporomandibular disorders. St Louis. Mosby Company. Pp.:3-58.
- Shetty US.; Burde KN.; Naikmasur VG. and Sattur AP. (2014). Assessment of condylar changes in patients with temporomandibular joint pain using

- digital volumetric tomography. Radiol. Res. Pract. (Online).p.:8.
3. Roda RP.; Fernández JMD.; Bazán SH.; Soriano YJ.; Margaix M. and Sarrión G. (2008). A review of temporomandibular joint disease (TMJD). Part II: Clinical and radiological semiology. Morbidity processes. Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 13(2):102-109.
4. Nah KS. (2012). Condylar bony changes in patients with temporomandibular disorders: a CBCT study. Imag. Sci. Dentis. 42(4):249-253.
5. Honey OB.; Scarfe WC.; Hilgers MJ.; Klueber K.; Silveira AM.; Haskell BS. and Farman AG. (2007). Accuracy of cone-beam computed tomography imaging of the temporomandibular joint: comparisons with panoramic radiology and linear tomography. Am. J. Orthodont. Dentofac. Orthoped. 132(4):429-438.
6. Wiese M.; Svensson P.; Bakke M.; List T.; Hintze H.; Petersson A.; Knutsson K. and Wenzel A. (2008). Association between temporomandibular joint symptoms, signs, and clinical diagnosis using the RDC/TMD and radiographic findings in temporomandibular joint tomograms. J. Orofac. Pain. 22(3):239-251.
7. Moncada G.; Cortés D.; Millas P. and Marholz C. (2014). Relationship between disk position and degenerative bone changes in temporomandibular joints of young subjects with TMD. An MRI study. J. Clin. Pediat. Dentis. 38(3):269-276.
8. Larheim TA.; Abrahamsson AK.; Kristensen M. and Arvidsson LZ. (2014). Temporomandibular joint diagnostics using CBCT. Dentomaxillofac. Radiol. 44(1): 2014- 2035.
9. Ludlow JB. and Ivanovic M. (2008). Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endodontol. 6(1):106-114.
10. Takayama Y.; Miura E.; Yuasa M.; Kobayashi K. and Hosoi T. (2008). Comparison of occlusal condition and prevalence of bone change in the condyle of patients with and without temporomandibular disorders. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endodontol. 105(1):104-112.
11. Cevidanes LHS.; Hajati AK.; Paniagua B.; Lim PF.; Walker DG.; Falconet G.; Nackley AG. *et. al.* (2010). Quantification of condylar resorption in temporomandibular joint osteoarthritis. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endodontol. 110(1):110-117.
12. Campos MIG.; Campos PSF.; Cangussu MCT.; Guimarães RC. and Line SRP. (2008). Analysis of magnetic resonance imaging characteristics and pain in temporomandibular joints with and without degenerative changes of the condyle. Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. 37(6): 529-534.
13. Honey OB.; Scarfe WC.; Hilgers MJ.; Klueber K.; Silveira AM.; Haskell BS. and Farman, AG. (2007). Accuracy of cone-beam computed tomography imaging of the temporomandibular joint: comparisons with panoramic radiology and linear tomography. Am. J. Orthodont. Dentofac. Orthoped. 132(4):429-438.
14. Barghan S.; Tetradis S. and Mallya SM. (2012). Application of cone beam computed tomography for assessment of the temporomandibular joints. Austr. Dent. J. 57(S1):109-118.
15. Nah KS. (2012). Condylar bony changes in patients with temporomandibular disorders: a CBCT study. Imag. Sci. Dent. 42(4): 249-253.
16. Oliveira C.; Bernardo RT. and Capelozza ALA. (2009). Mandibular condyle morphology on panoramic radiographs of asymptomatic temporomandibular joints. Int. J. Dent. 8(3): 114-118.

Oral health status in prediabetes in relation to Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in Iraqi subjects

Hussein A. Saleh and Rajaa H. Aljubouri

Dept. of Oral Diagnosis / College of Dentistry / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: hussein_kazzaz@yahoo.com

ABSTRACT

Prediabetes, as hyperglycemia in between health and diabetes is relatively a new concept that derives its importance from the potential medical burden originating from development to frank diabetes. The accumulative effects that start on the microstructure of circulatory and nervous systems with no clear safe margin for plasma glucose make the search for the early changes in this intermediate zone worthy.

Interleukin 6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) draw attention as both acute phase response markers and key cytokines in gingivitis, periodontitis and diabetes. Aims of the study was to evaluate of oral health status in prediabetes and its correlation with salivary IL-6 and TNF- α .

Seventy two (72) subjects were divided equally into 2 groups of 36, into: case group if Fasting Plasma Glucose (FPG) =100-125mg/dl and control group if FPG<100mg/dl.

Oral health status was evaluated as Plaque index (PI), gingival index (GI) and Decay (D) missing (M) filled (F) tooth index (DMFT).

Prediabetes group expressed significantly higher PI, GI, D, M, DMFT, IL-6 and TNF- α . PI and GI showed positive correlation with IL-6 and TNF- α in both groups.

It can be concluded that oral health is negatively affected in prediabetes; an effect that could be mediated by IL-6 and TNF.

Keywords: Interleukin-6, Oral health status, Prediabetes, Tumor Necrosis Factor-alpha.

الملخص باللغة العربية

يعرف مصطلح "بؤادر السكري"، كمنطقة وسطى بين الإصابة بداء السكري من عدمها، وهو مفهوم طبي جديد نسبياً اكتسب أهمية كبرى في الآونة الأخيرة كونه مرحلة سابقة ومنبهة لداء السكري. وما يشكله من خطورة وكثرة العبء الطبي المحتمل المصاحب لتطوره إلى الإصابة الصريحة بداء السكري. في ظل غياب الحد الفاصل الواضح لتركيز الجلوكوز في بلازما الدم، الذي من الممكن القول إنه صحي وغير مؤذ تماماً لجسم الإنسان، ولكون الضرر الناتج من ارتفاع نسبة الجلوكوز في الدم هو ضرر تراكمي وذو إيقاع مزمن وبطيء يصيب البنية المجهرية للأوعية الدموية في جهاز الدوران، والأعصاب المحيطة للجهاز العصبي. لهذه الأسباب، تبدو دراسة التغيرات الأولية المصاحبة لارتفاع نسبة الجلوكوز لمرضى بؤادر السكري ذات أهمية.

من بين العديد من الواسمات البيولوجية المصاحبة للالتهابات والمناعة، تبرز أهمية الإنترلوكين-6 وعامل تنخر الورم ألفا، كونهما من الواسمات المهمة المصاحبة لداء السكري من جهة، ولالتهابات اللثة والتهابات دواعم السن من جهة أخرى.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم حالة الصحة القموية لمرضى بؤادر السكري وارتباطها مع نسبة الإنترلوكين 6 وعامل تنخر الورم ألفا اللعابي، ومقارنتها مع الأشخاص الأصحاء.

شارك في هذه الدراسة اثنان وسبعون (72) شخصاً تم تقسيمهم بالتساوي إلى مجموعتين ضمت كل منهما (36) شخصاً، ضمت المجموعة الأولى مرضى بؤادر السكري الذين كان تركيز الجلوكوز في الدم على الريق لديهم بين (100-125) ملي غرام /ديسي لتر، وضمت المجموعة الثانية أشخاصاً أصحاء كان تركيز الجلوكوز في الدم على الريق لديهم أقل من 100 ملي غرام /ديسي لتر. كما تم تقييم حالة الصحة القموية باستخدام مؤشر اللثة ومؤشر الترسبات ومؤشر النخر القلع والحشو للأسنان.

أظهرت النتائج أن مرضى بؤادر السكري لديهم ارتفاع في مؤشر اللثة ومؤشر الترسبات ومؤشر النخر القلع الحشو مقارنة بالأشخاص الأصحاء، ولديهم فقدان أسنان وتنخرات أكثر، كما كانت تراكيز الإنترلوكين 6 وعامل تنخر الورم ألفا اللعابي لدى مرضى بؤادر السكري أعلى من نظرائهم الأصحاء.

أظهر كل من مؤشر الترسبات ومؤشر اللثة ارتباطاً مع مستويات الإنترلوكين 6 وعامل تنخر الورم ألفا لدى مرضى بؤادر السكري والأشخاص الأصحاء.

يمكن استنتاج أن حالة الصحة القموية تتأثر سلباً في مرضى بؤادر السكري، وقد يلعب الإنترلوكين 6 وعامل تنخر الورم ألفا دوراً في هذا التأثير.

INTRODUCTION

About six decades ago, the term "prediabetes" was firstly introduced in the medical literatures, pointing to a totally different concept, when it was mentioned by Jackson (1) in 1952 in the British medical journal to describe women who delivered high weight births. On the succeeding years and after many debates and revisions, the most acceptable and representative apprehension is that prediabetes is defective glucose metabolism profile that can be recognized as either impaired fasting glucose (IFG) and/or impaired glucose tolerance (IGT) and/or impaired glycated hemoglobin A1c (HbA1c) (2,3). Many attributes can describe and evaluate oral health status, among which plaque index (PI), gingival index (GI) and decay missing filled tooth index (DMFT) were frequently employed in several very recent studies reflecting their validity, reliability and materiality (4,5).

The association between overt diabetes and disintegrated oral health is so intimate to the degree that periodontal and gingival problems were considered as the sixth complication of diabetes, and considering the relationship between them as bidirectional (6,7).

The spectrum of diabetes complications including its effect on the oral health is possibly initiated well before frank diabetes is diagnosed, in other words when the subject is "prediabetic", which is the main question of this study.

Oral health problems due to hyperglycemia are basically of immuno-inflammatory background (8), interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are both an acute phase response proteins and immunological key cytokines that are involved in both diabetes and oral diseases, a situation that makes it very reasonable to investigate their salivary levels (9,10). In a case control research design, this study evaluate the levels of those salivary biomarkers as well as the oral health status to find out the possible correlation.

SUBJECTS AND METHODS

The sample: Seventy two (72) Subjects who attended primary health care centers in Baghdad /Iraq between February and May 2016 were recruited for this study. Participation consent for all subjects was signed by patients themselves after being given a brief notes about the study.

They were divided into 2 groups:-

Study group: 36 prediabetic subjects of both gender (21 males and 15 females), 18 years and older with no signs, symptoms and negative history of any

systemic disease. Prediabetes were identified as IFG Fasting blood glucose =100-125 mg/dl (2).

Control group: 36 healthy subjects with normal fasting Glucose level, which is below 100 mg/dl. Gender and age matching with study group was performed in the section of candidates of this group. PI, GI and DMFT were assessed, the subject were asked to passively spit their saliva in a graduated plastic tube for 5 mins. to estimate the salivary flow rate (SFR) and for later immunological analysis of the biomarkers. Salivary levels of IL-6 and TNF- α were measured using enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) human kit specified for each one. Analysis was conducted according to the Manufacture's instruction.

Statistical analysis: Data were analyzed using SPSS (statistical package of social science) software version 22. Independent sample t test was performed to compare between case group and control group regarding all the parameters.

Pearson correlation coefficient was utilized to inspect any possible correlation between the variables in both case and control groups.

RESULTS

Parameters comparison

Prediabetes group subjects when compared to the control group showed significantly higher (P value <0.05) PI, GI, D, M, DMFT, IL6 and TNF- α .

While F and SFR were significantly higher (P value <0.05) in control group subjects as shown in table (1) and figure (1).

Table (1): Parameters comparison between case and control groups

Parameters	Control N=36	Case N=36	T- test	P Value
PI	1.37	1.84	-3.11	0.003*
GI	1.13	1.76	-4.28	0.000**
D	2.56	4.86	-4.41	0.000**
M	2.53	5.36	-3.79	0.000**
F	4.42	2.44	3.26	0.002*
DM FT	9.5	12.67	-3.53	0.001*
SFR (ml/min)	0.36	0.26	3.26	0.002*
IL-6 (pg/ml)	1.68	2.7	-8.59	0.000**
TNF- α (pg/ml)	11.53	15.96	-3.42	0.001*

*=significant (p value ≤ 0.05),

** =highly significant (p value <0.01)

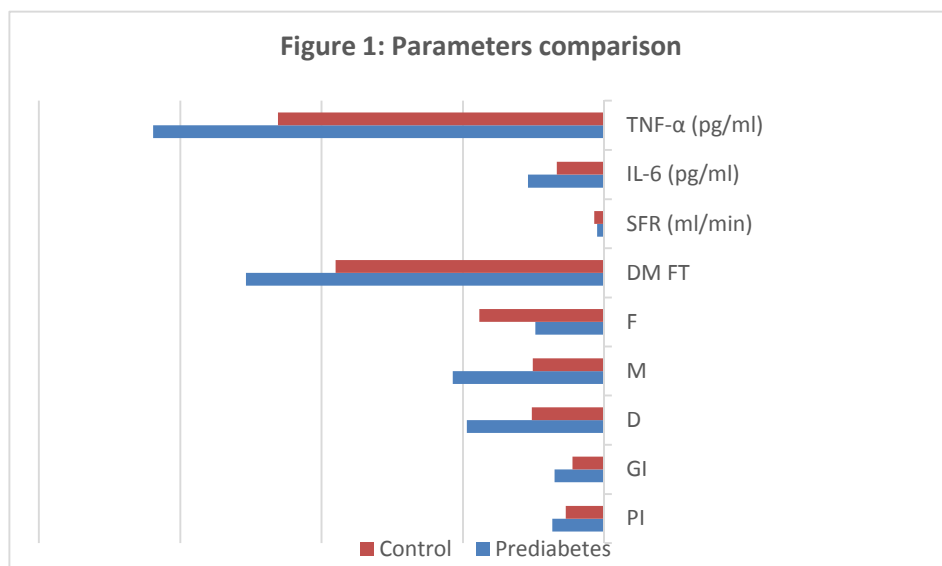


Figure (1): Parameters comparison

Correlation between oral health measures and IL-6 and TNF- α

PI and GI showed positive correlation with IL-6 and TNF- α in both case and control group as shown in table (2).

Table (2): Correlation between PI, GI and IL-6, TNF- α

		N	IL-6	TNF- α
PI	Case	36	$r = 0.707^{**}$ $P = 0.000$	$r = 0.734^{**}$ $P = 0.000$
	Control	36	$r = 0.771^{**}$ $P = 0.000$	$r = 0.766^{**}$ $P = 0.000$
GI	Case	36	$r = 0.550^{**}$ $P = 0.001$	$r = 0.477^{**}$ $P = 0.003$
	Control	36	$r = 0.811^{**}$ $P = 0.000$	$r = 0.738^{**}$ $P = 0.000$

** = highly significant (p value < 0.01)

DISCUSSION

Elevated PI, GI, D and M indices in prediabetes control can be translated into that gingival and periodontal health is largely compromised in relation to glycemic control, a claim that is supported by many researches like Javed *et al.* (11,12), Pischon *et al.* (13) and Rafatjou *et al.* (14). The drop or decline in the oral health status (as measured by the specified indices in our study) in case group can be attributed to the pathophysiology of prediabetes that greatly resembling that of type 2 diabetes but of less severity (15,16).

In prediabetes either insulin insufficient production or insulin resistance occur, this will lead to a state of prolonged elevated plasma glucose level above the normal values in accompany with the shortage in the

intracellular glucose levels due to the failure of glucose transportation.

This will make the cells to look for another available source of energy rather than glucose, which are proteins and lipids that will undergo a non-enzymatic glycation and oxidation that will provide the required energy but this process has a drawback that is the formation of what is called Advanced Glycation End products AGE that will be accumulated in plasma and tissues (17).

Cell surface binding site or receptor for AGE is called RAGE, which is present on many cells like mononuclear phagocyte, endothelial cells, fibroblast, lymphocyte and smooth muscle cells, the AGE_RAGE binding will induce an oxidant stress that will exaggerate the chronic inflammatory and immune responses to the periodontal pathogenic bacteria and upregulate the secretion of many inflammatory markers like TNF and IL-6 which are recognized as major cause of tissue destruction (18). AGE also may effect on wound healing potential of cells and bone repair capacity by reducing gene expression of collagen production and osteoblast differentiation, decreasing extracellular matrix production and inhibiting its growth factors, inducing apoptosis in fibroblast and osteoblasts (19).

The decrease in SFR which is also mentioned by Javed *et al.* (20) may have an important role in magnifying the destruction in the dental hard and soft tissues. This can be explained by defects in many protective function performed by saliva like cleaning, buffering, remineralization and even antibodies against pathological oral bacteria. As a result, augmented pathological attack will face a compromised defense system, which is translated by

increased decayed and missed teeth in case group (21,22).

This study showed a significant elevation in the levels of salivary IL-6 and TNF- α in case group than in control group. These results were in agreement with Player *et al.* (23), Javed *et al.* (20) and Lin *et al.* (24).

The elevation in the salivary levels of the two markers was attributed to the low grade systemic inflammation accompanied the obesity that characterized the case group that would cause increased production of the two markers from the adipocyte or other cells (25).

PI and GI correlations

In this study, PI and GI showed a significant correlation with the level of both IL-6 and TNF- α in case and control group.

Bacterially driven inflammatory response that begin at gingival crevice and advanced towards the periodontal ligaments that lead to deterioration in periodontium and finally bone loss due to the augmented immunoinflammatory body response to the specific bacterial insults is a brief summary for most common oral diseases which are periodontitis and gingivitis (26).

IL-6 and TNF- α play a key role in these above mentioned events among many other cytokines as they were detected in higher concentrations and percentages in gingival crevicular fluid, saliva, fibroblasts, endothelial cells and Polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in periodontitis and gingivitis when compared with healthy controls (27).

IL-6 and TNF were reported to contribute in bone and connective tissue degradation via matrix metalloproteinase (MMP) and osteoclasts activation and amplification of inflammatory cascade.

TNF is one of the primary cytokines detected in response to periodontal bacterial response and it was reported that it is secreted from adipocytes in obese people leading to its higher concentrations systemically and these elevated levels may be a predisposing factor that increase the risk for insulin resistance (28), so it is not surprising to find higher levels of these two markers in our case group when compared with control group.

CONCLUSION

Oral health is negatively affected in prediabetes; an effect that could be mediated by IL-6 and TNF- α as elevated salivary concentrations were noticed.

REFERENCES

1. Jackson WP. (1952). Studies in pre-diabetes. *Brit. Med. J.* 272(4786):690.
2. Schöttker B.; Brenner H.; Koenig W.; Müller H. and Rothenbacher D. (2013). Prognostic association of HbA 1c and fasting plasma glucose with reduced

kidney function in subjects with and without diabetes mellitus. Results from a population-based cohort study from Germany. *Prevent. Med.* 57(5): 596-600.

3. Warren B.; Pankow JS.; Woodward M. and Selvin E. (2016). Abstract MP27: Comparative prognostic performance of different definitions of prediabetes in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circul.* 133(Suppl 1); AMP27-AMP27.

4. Chantaramanee A. and Samnieng P. (2016). Oral health status and impact on performance of professional soccer players. *J. Dentis. Indonesia.* 23(1):1-4.

5. Toiviainen A.; Jalasvuori H.; Lahti E.; Gursoy U.; Salminen S.; Fontana M.; Flannagan S.; Eckert G.; Kokaras A.; Paster B. and Söderling E. (2015). Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin. Oral. Investig.* 19(1):77-83.

6. Loe H. (1993). Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabet. Care.* 16(1):329-334.

7. Stanko P. and Izakovicova HL. (2014). Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 158(1):35-38.

8. Kulshreshtha R.; Biswas J.; Srinivasa TS. and Roy V. (2013). A review on immuno-inflammatory linkage between periodontitis and diabetes mellitus. *J. Ravishankar. Univ.* 24(26):19-25.

9. Janket SJ.; Jones JA.; Meurman JH.; Baird AE. and Van Dyke TE. (2008). Oral infection, hyperglycemia, and endothelial dysfunction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* 105(2):173-179.

10. Bergdahl M. and Bergdahl J. (2000). Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J. Dent. Res.* 79(9): 1652-1658.

11. Javed F.; Al-Askar M.; Al-Rasheed A.; Al-Hezaimi K.; Babay N. and Galindo-Moreno P. (2012). Comparison of self-perceived oral health, periodontal inflammatory conditions and socioeconomic status in individuals with and without prediabetes. *Ame. J. Med. Sci.* 344(2):100-104.

12. Javed F.; Samaranayake LP.; Al-Askar M. and Al-Hezaimi K. (2013). Periodontal disease in habitual cigarette smokers and nonsmokers with and without prediabetes. *Am. J. Med. Sci.* 345(2):94-98.

13. Pischon N.; Heng N.; Bernimoulin JP.; Kleber BM.; Willich SN. and Pischon T. (2007). Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J. Dent. Res.* 86(5):400-409.

14. Rafatjou R.; Razavi Z.; Tayebi S.; Khalili M. and Farhadian M. (2016). Dental health status and

- hygiene in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J. Res. Health Sci.* 16(3):122-126.
15. Grundy SM. (2012). Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59(7):635-643.
16. Player MS.; Diaz VA.; Mainous Iii AG.; Gregorie SH.; Knoll ME. and Everett CJ. (2011). Ethnic differences in the relationship of prediabetes with the presence of target-organ disease. *Diabet. Metabol.* 37(5):403-409.
17. Ramasamy R.; Vannucci SJ.; Du Yan SS.; Herold K.; Yan SF. and Schmidt AM. (2005). Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiol.* 15(7): 16R-28R.
18. Nassar H.; Kantarci A. and Van Dyke TE. (2007). Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol.* 43(1): 233-244.
19. Graves DT.; Liu R.; Alikhani M.; Al-Mashat H. and Trackman PC. (2006). Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis—impact on periodontal pathology. *J. Dent. Res.* 85(1):15-21.
20. Javed F.; Ahmed HB.; Mehmood A.; Saeed A.; Al-Hezaimi K. and Samaranayake LP. (2014). Association between glycemic status and oral Candida carriage in patients with prediabetes. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 117(1):53-58.
21. Zalewska A.; Waszkiewicz D N.; Szajda CSD. and Waszkiel ED. (2011). Impact of salivary flow and lysozyme content and output on the oral health of rheumatoid arthritis patients Wpływ przepływu, stężenia i „wyrzutu” lizozymu w ślinie na zdrowie jamy ustnej pacjentów reumatoidalnych. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 65:40-45.
22. de Almeida PD.; Gregio AM.; Machado MA.; De Lima AA. and Azevedo LR. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 9(3):72-80.
23. Player MS.; Diaz VA.; Mainous Iii AG.; Gregorie SH.; Knoll ME. and Everett CJ. (2011). Ethnic differences in the relationship of prediabetes with the presence of target-organ disease. *Diabet. Metabol.* 37(5):403-409.
24. Lin J.; Zhang M.; Song F.; Qin J.; Wang R.; Yao P.; Ying C.; Hu FB. and Liu L. (2009). Association between C-reactive protein and pre-diabetic status in a Chinese Han clinical population. *Diabet. Metabol. Rese. Rev.* 25(3):219-223.
25. Hajri T.; Tao H.; Wattacheril J.; Marks-Shulman P. and Abumrad NN. (2011). Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 300(2): 350-360.
26. Kornman KS. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J. Periodontol.* 79(8S):1560-1568.
27. Johannsen A.; Bjurshammar N. and Gustafsson A. (2010). The influence of academic stress on gingival inflammation. *Int. J. Dent. hyg.* 8(1):22-27.
28. Chopra A.; Lakhanpal M.; Gupta N.; Rao NC. and Vashisth S. (2013). Association between obesity and periodontal disease: A cross-sectional study. *Saudi J. Obes.* 1(2):71-76.

Effect of additives' ratios on workability and strength of self-compacting concrete

Abdulmir Atalla (1), Hanadi A. Lateef (2) and Aws A. Ali (3)

(1) College of Engineering / University of Basrah (2) Basrah Technical Institute / Southern Technical University (3) Practice Civil Engineer / Freelance / Basrah / Republic of Iraq

E-mail: hanadi_ridha@yahoo.com

ABSTRACT

Self-compacting concrete (SCC) is a new and an emerging technology in the construction industry. SCC is highly workable concrete that can flow through congested reinforced structural elements under its own weight without the need for vibration, and adequately fill voids without segregation or excessive bleeding. This type of concrete must have excellent flow ability and, at the same time, adequate segregation resistance independently of the casting method (pouring or pumping). In the present work, several proportions of the constituent materials of the Self-Compacting Concrete mix, which are the cement, sand, gravel, water, silica fume, and superplasticizer are attempted and tested. Three types of flow test are implemented to evaluate the workability of the fresh mixes while the compression test is used to measure the strength of the hardened concrete. It was found that adding silica fume contributes significantly in increasing the compressive strength and enhancing the self-leveling status of concrete. Also, it was found that self-compactability can be achieved by optimizing the plasticizing additive dose.

Keywords: self-compacting concrete, superplasticizer, cementitious materials, silica fume and workability

الملخص باللغة العربية

تعتبر الخرسانة الذاتية الرص تكنولوجيا حديثة في الصناعة الإنشائية، وهي خرسانة ذات قابلية تشغيل عالية للغاية، بحيث تستطيع الانسياب خلال الأعضاء الإنشائية الكثيفة التسليح تحت تأثير وزنها الذاتي دون الحاجة إلى استعمال الهزاز، وتملاً بدرجة كافية الفجوات دون حصول الانعزال أو النضح. يجب أن يكون لهذا النوع من الخرسانة قابلية تدفق ممتازة، وفي نفس الوقت، مقاومة انعزال كافية، بغض النظر عن طريقة الصب (السكب أو النضح). في هذا البحث، تم دراسة عدة نسب من المكونات الأساسية للخرسانة الذاتية الرص: الإسمنت، الرمل، الحصى، الماء، غبار السيليكا والملدنات. أجريت ثلاثة أنواع من فحوصات التدفق لتقييم قابلية التشغيل للخرسانة الطرية، بينما استخدم فحص الانضغاط لقياس مقاومة الخرسانة المتصلبة. وُجد بأن إضافة غبار السيليكا يسهم بشكل كبير في زيادة مقاومة الانضغاط وتحسين حالة الرص الذاتي للخرسانة. كذلك وُجد بأن قابلية الرص الذاتي يمكن أن تحقق بإضافة الجرعة المثلى للملدن.

INTRODUCTION

Self-compacting concrete (SCC) is a new type of concrete. It fills all sections of forms without mechanical vibration, and has reasonable flowability, homogeneity, resistance against segregation and mechanical strengths (1,2). The first completed prototype of self-compacting concrete was in 1988 using materials available on the market (3,4). Several articles dealing with the SCC were published round-world; in Western Europe, Canada, Sweden and Netherlands. SCC showed good performance in compressive strength test and could fulfill other construction needs because its production has taken into consideration the requirements in the structural design (5).

The SCC has now been taken up with enthusiasm throughout the world for both site and precast work (6). Self-compacting concrete has been described as "the most revolutionary development in concrete construction for several decades" (7-9). In this study, self-compacting concrete was produced by using specific super plasticizer available in markets widely.

METHODS AND EXPERIMENTS

Linear optimization mix. Proportion

The optimum mix design method is based on the rational mix design method of Okamura and Ozawa (3), but was modified by using the mathematical approach of linear optimization to produce an optimum mixture of water, powders and aggregate (10). The mix design procedure undergoes the following steps:

Step 1: A typical air content is chosen (1- 1.5 % for non-air-entrained).

Step 2: The coarse aggregate content is fixed (table 1).

Step 3: A binder composition is chosen using the guidelines in table (1) or from past experience.

Step 4: The maximum water/binder ratio is chosen to ensure that the following three conditions are satisfied:

1-The paste has sufficient plastic viscosity (before addition of superplasticizer to provide adequate segregation resistance. This is estimated by means of the specific gravity of the binder, retained water ratio and deformation coefficient.

2- The concrete has sufficient compressive strength.

3- The durability requirements were met.

The minimum value of water/binder ratio from 1, 2 and 3 was chosen.

Step 5: The volume of sand in the mortar was chosen.

Step 6: The paste content is calculated and adjusted if outside the limits (table 1).

Step 7: The water and binder contents were calculated with the water being a limiting factor and set before step 5 if greater than 200 kg/ m³.

Step 8: The superplasticizer dosage was then estimated from tests on the mortar component of the mix using the V-funnel test.

Step 9: The concrete mix was then made and tested for fresh concrete properties.

Table (1): Limiting mix proportions for successful self-compacting concrete (10)

	Maximum aggregate size 20 mm	Maximum aggregate size 20 mm
Coarse aggregate content (kg/m ³)	0.5*dry rodded unit wt	0.5-0.54*dry rodded unit wt
Max water content (kg/m ³)	200	
water/powder ratio by wt (w/p)	0.28-0.40	0.28-0.50
water/(powder+fine aggregate) ratio by wt	0.12-0.14	0.12-0.17
Paste volume	0.38-0.42	

Experimental investigation

The experimental work was carried out in the Materials laboratory of civil engineering department at University of Basra. The following steps were achieved in this phase.

1- Concrete mix design: Until now a days, there is no standard method for mix design of SCC and many academic institutions had begun to develop their own mix proportioning methods. The most important thing in laboratory trials is that they should be used to verify properties of the initial mix composition with respect to the specified characteristics and classes. If necessary, modifications to the mix composition should then be made.

Self- compactability can be largely affected by the characteristics of materials and the mix proportion. Linear Optimization Mix. Proportion for self-compacting concrete using a variety of materials is necessary. This method is modified on Rational Mix-Design Method (Okamura and Ozawa method) (3,4).

2- Concrete mix: Mixing procedure is important to obtain the required workability and homogeneity of the concrete mix. Concrete was mixed in drum laboratory mixer, with a capacity of 0.1m³. Before starting to mix, it is necessary to keep the mixer clean, moist and free from water. Based on Jin's work (11), the mixing procedure is shown in figure (1).

2- V-funnel test: The V-funnel test was developed in Japan. The equipment consists of a V-shaped funnel (figure 3). The funnel is filled with concrete and the time taken by it to flow through the apparatus measured. This test gives account of the filling capacity (flowability) (17). The inverted cone shape shows any possibility of the concrete to block is reflected in the result.

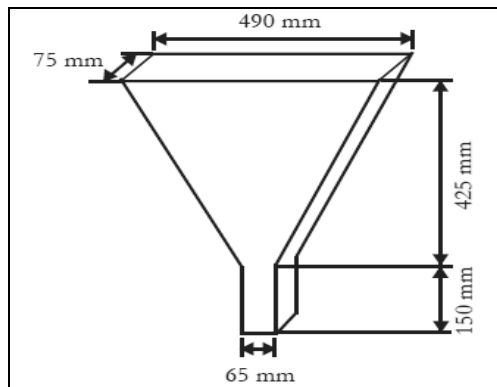


Figure (3): V-funnel (17)

3- L-box test: The L-box test method uses a test apparatus comprising a vertical section and a horizontal trough into which the concrete is allowed to flow on the release of a trap door, from the vertical section passing through reinforcing bars placed at the intersection of the two areas of the apparatus (figure 4). The concrete ends of the apparatus H₁ and H₂ measure the height of the concrete at both ends. The L-box test can give an indication as to the filling ability and passing ability (17).

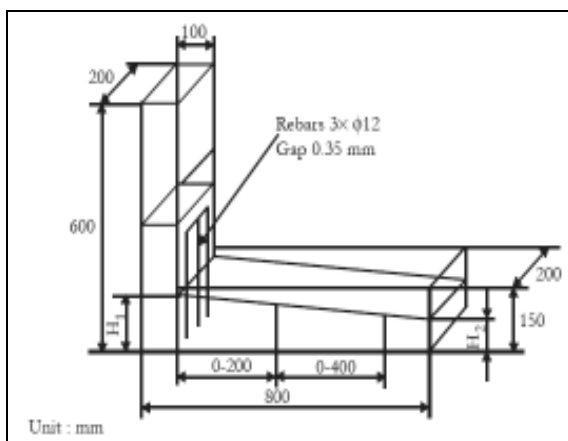


Figure (4): L-box test (17)

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, five trial mixes were attempted and tested both in fresh and hardened states of sulfate resistant cement. The proportions of these mixtures were listed in table (4).

In order to get SCC by using modified rational-mix design (Okawa and Ozawa) method, trial and error and adjustments to concrete ingredients have to be performed to achieve the required workability and strength requirements.

The trial mixes were prepared for five classes of materials to get SCC. There were SCC1, SCC2, SCC3 and SCC4 mixes with admixtures and one control SCC0 mix without any admixture to satisfy compressive strength. The control mix was designed for 28-days characteristic strength of 50 MPa. The effect of superplasticizer dosage on the concrete mix was investigated through mixes SCC1, SCC2 and SCC3 which have different proportions 0.7%, 0.8% and 1% respectively. The fourth mix SCC4 had the same ratio of admixture of SCC3 but with silica fume.

Tests of fresh self-compacting concrete

It is important to select appropriate test methods to qualify the performance of the concrete in the laboratory and later on to control the quality of the concrete at the plant. Basic requirements for self-compacting concrete are those in the fresh state: flowability, viscosity, passing (flow without blocking). These requirements were evaluated by some tests such as slump flow, V-funnel and L-box. The required tests of SCC were conducted on concrete in fresh state and the results of those tests are presented in table (5).

- SCC1 and SCC2 mix are not satisfy the requirements of EFNARC that required in table (3). On the other hand, mixes SCC3 and SCC4 fulfilled the requirements of slump flow and T₅₀.
- For the V-funnel test, all mixes were found to satisfy requirements EFNARC in table (3), except SCC1 mix.
- For L-box test, all mixes were found to satisfy the requirements EFNARC in table (3).
- This leads to the conclusion that both of SCC3 and SCC4 mixes were noted to satisfy all EFNARC requirements.

Table (4): Mixture proportions

Mix. No.	Cement Kg/m ³	Silica fume Kg/m ³	Coarse aggregate Kg/m ³	Fine Aggregate Kg/m ³	Water Kg/m ³	(HP-580)Kg/m ³	Tard B l/m ³
SCC0	490	-	920	755	205	-	-
SCC1	490	-	875	830	175	3.43	1
SCC2	490	-	925	805	165	3.92	1
SCC3	490	-	970	805	147	4.9	1
SCC4	450	30	970	805	147	4.8	.1

Table (5): Workability tests

Mix. No.	(Hp-580)%	Slump		V-funnel Sec.	L-box H ₂ /H ₁
		Slump flow mm	T ₅₀ Sec.		
SCC1	0.7%	600	9	15	0.82
SCC2	0.8%	620	7	12	0.88
SCC3	1%	700	5	10	0.92
SCC4	1%	720	4	9	0.98

Tests of hardened self-compacting concrete

The mixes were designed to give a compressive strength of 50 MPa at 28 days. The cube samples were tested in 7 days and 28 days for all mixes. The compressive strength test results are listed in table (6).

The mixtures that contain admixtures have compressive strength greater than control mixture, the strength increase with the decrease of w/c. ratio. The 28 days compressive strength of SCC1, SCC2 and SCC3 mixes were greater by 2.55%, 5.70 %, 9.43 % respectively, compared to SCC0 mix. The mix SCC4 gave the higher compressive strength of 61.63 MPa, because of the effect of silica fume. The high level of fineness and practically spherical shape of silica fume results in good cohesion and improved resistance to segregation. However, silica fume is also very effective in reducing or eliminating bleed and this can give rise to problems of rapid surface crusting.

The increase of CSH (Calcium Silicate Hydrate Gel) caused by adding silica will lead to the increase of the paste and hence increase the compressive strength. Also, the decrease of the production of Ca(OH)₂ will result in a reduction in the heat of hydration, which is an important aspect in mass concrete pouring.

Table (6): Compressive Strength MPa

Mix. No.	W/C	7 day	28 day.
SCC0	0.418%	35.12	50.9
SCC1	0.357%	37.69	52.2
SCC2	0.336%	43.30	53.8
SCC3	0.300%	44.50	55.7
SCC4	0.326	55.13	61.63

Physically, adding microsilica to concrete will decrease permeability, since silica fume is 100 times finer than cement, and therefore will fill the voids in the cement paste (18).

CONCLUSION

In this work, the effects of addition of superplasticizer doses and silica fume on self-compacting concrete sulfate resistant Portland cement were examined. The properties of fresh SCC are studied, such as slump flow, V-funnel and L-box in addition to the compressive strength of hardened cubes at two ages. The following findings were concluded from this study:

- 1- Adding silica fume contributed synergistically to increase compressive strength.
- 2- Adding silica fume results in good cohesion and improved resistance to segregation. Thus, produce an excellent concrete with enhanced flow and filing abilities.
- 3- With low w/c. ratio, and sufficient amount of cementitious materials, self-compactability could be achieved by optimizing the superplasticizer dose.

REFERENCES

1. Bakhtiyari S.; Allahverdi A. *et al.* (2011). Mix design, compressive strength and resistance to elevated temperature (500°C) of self-compacting concretes containing limestone and quartz fillers. *Int. J. Civil Eng.* 9(3):1101-1105.
2. Gaywala N. and Rajjiwala D. (2011). Self-compacting concrete: a concrete of next decade. *J. Eng. Res. Stud.* 2(5): 213-218.
3. Ouchi M. (2013). Self-compacting concrete. Department of infrastructure systems engineering,

Kochi University of Technology, Kochi, Japan. Pp.: 782-850.

4. Okamura H. and Ouchi M. (2003). Self-compacting concrete. *J. Adv. Concrete. Technol.* 1(1): 5-15.

5. Suchithra S. and Malathy R. (2014). Computational analysis of bending properties of self-compacting concrete reinforced with steel fibers. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 3(4):75-82.

6. Nécira B.; Guettala A. and Guettala S. (2015). Effect of the viscosity modifying agent and the different mineral additions on rheology and compressive strength of self-compacting concrete. *Asian. J. Civil. Eng. (BHRC)* 16(1): 111-126.

7. Grdić Z.; Despotović I. and Ćurčić G. (2008). Properties of self-compacting concrete with different types of additives. *Facta University, Series: Architect. Civil. Eng.* 6(2): 173 – 177.

8. Upadhyay H.; Shah P. and George E. (2011). Testing and mix design method of self-compacting concrete. *National Conference on Recent Trends in Engineering and Technology*, 13-14. B.V.M. Engineering College, V.V. Nagar, Gujarat, India.

9. EFNARC. (2005). Specification and guidelines for self-compacting concrete. P.: 31.

10. Neuman J. and Sang B. (2003). *Advanced concrete technology*. 1st ed. McGraw Hill. Washington, P.: 1109.

11. Jin J. (2002). Properties of mortar for self-compacting concrete. MSc. Thesis. University of London.

12. British Standard Institution (B.S.I) (1989). Method for determination of compressive strength of concrete cubes. 1881, Part 116.

13. Central Agency for Standarization and measurement. (1984). The Iraqi standard No. 5. Portland Cement.

14. Central Agency for Standarization and measurement. (1984). The Iraqi standard No. 45. The ruins of the natural resources used in concrete and construction.

15. Hassan AH. and Mahmud HB. (2013). Mixture proportioning of self-compacting concrete (SCC) containing fly ash, rice husk ash and blast furnace slag. *Elect. J. Struct. Eng.* 13(1): 67-74.

16. The European Guidelines for Self-Compacting Concrete; Specification, Production and Use. (2005).

17. Ouchi M. (2001). Self-compacting concrete: development, applications and key technologies. 26th Conference on Our World in Concrete & Structures: 27 - 28 August. Singapore.

18. ACI 234 R-06. (1993). Guide for the Use of Silica Fume in Concrete. Reported by ACI Committee 234. 2006. CSTR 41 Concrete Society; report of a Concrete Society Working Party, 9.6: 9.7. pp.: 36-37.

Antibiotic susceptibility pattern and plasmid profiling of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Baghdad hospitals

Aidaa H. Ibrahim (1), Munira CH. Ismael (2), Amin A. Sabbar (1), Saja F. Hameed (3) and Ghuroob D. Dhamad (4)

(1) Dept. of Microbiology / Collage of Veterinary Medicine / University of Baghdad (2) Tropical Biological Researches' Unit / University of Baghdad (3) Ibn Al – Haitham Teaching Hospital (4) Alkindy Teaching Hospital / Republic of Iraq

E-mail: aomahmed_2006@yahoo.com

ABSTRACT

Multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* had emerged in Iraq and seen mainly in nosocomial infections due to the selective pressure by over usage of antibiotics.

A total of 50 bacterial isolates of *P. aeruginosa* were obtained from 150 clinical wound samples in two tertiary hospitals in Baghdad city. Pure isolated bacteria were subjected to various morphology and biochemical tests. Bacterial isolates of *P. aeruginosa* were subjected to antibiotic susceptibility testing by using discs' diffusion and plasmid profiling. Fourteen different antibiotics discs were used to determine the antibiotics susceptibility. Plasmids were extracted by using commercial plasmid isolation kit (Promega company / USA), and run on 0.8% agarose gel to detected plasmid DNA.

The resistance pattern of the tested isolates were Amoxicillin 48(96%), Nalidixic acid 45(90%), Tetracycline 37(74%), Trimethoprim - sulfamethoxazol 32(64%), Imipenem 22 (44%), Mezlocillin 20(40%), Meropenem 15(30%), Levofloxacin 10 (20%), Gentamycin 12 (24%), Amikacin 10 (20%), Cefazidime 9(18%), Aztreonam 8(16%), Ciprofloxacin 6 (12%), and Piperacillin 2 (4%). The plasmid analyses revealed that there were detectable plasmid in 6 (37.5%) out of 16 multi -drug resistant (MDR) (*P. aeruginosa*) isolates. No detectable plasmid DNA were reported in 10 isolates, five isolates possessed single sized plasmid (550 - 800bp) and only one isolate was possessed double plasmids between (550-940 bp).

The present study clarified the dangerous of MDR *P. aeruginosa* and become a major concern and problem in our hospitals. Eradication and control strategies should be used to avoid and prevent the spreading of this threat. In addition, avoid over usage of any antibacterial agent to overcome the emergence of resistance. The combination of antibiotic susceptibility test with plasmid profiling may be the cheapest and effective method for tracing source of infection.

Keywords: *P. aeruginosa* , Multidrug resistant (MDR)

المخلص باللغة العربية

ظهرت البكتيريا الزائفة الزنجارية المتعددة المقاومة في العراق بصورة خاصة نتيجة الإصابات المكتسبة في المستشفيات، ويعزى ذلك للاستعمال المفرط للمضادات الحيوية.

تم الحصول على 50 عزلة لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من مجموع 150 نموذجاً، والتي أخذت من إصابات الجروح في اثنين من المستشفيات الحكومية في بغداد.

تم تشخيص العزلات النقية من خلال الصفات الظاهرية واستخدام الاختبارات البيوكيميائية. كما تمت دراسة مقاومة عزلات البكتيريا الزائفة الزنجارية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة انتشار الأقراص ضد 14 مضاداً حيوياً. كما تم تحديد الحامض النووي (DNA) للمحتوى البلازميدي لهذه العزلات عن طريق استخدام عدة استخلاص البلازميدات (Promega company / USA) والترجيل بهلام الأجاروز بنسبة 0.8 %.

أظهرت 48 عزلة (96%) مقاومة لمضاد الأموكسيسيلين، نالديكسك أسيد 45 عزلة (90%)، تتراسايكلين 37 عزلة (74%)، التريمثوبريم - سلفاميثوكسازول 32 عزلة (64%)، امبينيم 22 عزلة (44%)، ميزلوسيلين 20 عزلة (40%)، ميروبنيم 15 عزلة (30%)، ليفوفلوكساسين 10 عزلات (20%)، جنتاميسين 12 عزلة (24%)، اميكاسين 10 عزلات (20%)، سيفتازيديم 9 (18%)، ازتريونام 8 (16%)، سيبروفلوكساسين 6 (12%)، والبيبراسيلين 2 (4%). كما كشف تحليل البلازميد أن هناك 6 عزلات من مجموع 16 عزلة المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية قد أظهرت امتلاكها للبلازميد بشكل واضح و 10 عزلات لم تظهر امتلاكها للبلازميد.

INTRODUCTION

Multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* are particularly problematic because the organism exhibits intrinsic resistance to several antimicrobial class and able to acquire resistance to all effective antimicrobial drugs (1). The high frequency of multiple resistance among *P. aeruginosa* strains makes its eradication difficult, and mortality associated with *P. aeruginosa* infection is high compared to other bacteria (2). Infections caused by *P. aeruginosa* are frequently life – threatening and difficult to treat as exhibits intrinsically high resistance to many antimicrobials (3). MDR *P. aeruginosa* develops resistance by various mechanisms like multi-drug resistance efflux pumps, biofilm formation, production of β -lactamases and aminoglycoside modifying enzymes. The risk for acquiring MDR organisms may be related to the number of carriers in the same ward as well as to individual risk factors, such as patient characteristics and in-hospital events (invasive devices and antibiotic treatment) (4). A high rate of spread of resistant gene has been suspected as the cause of increased antibiotic resistance cases in it. Plasmid carry genes that could be spread by conjugation and transduction while the genome based resistant genes are also spread by replication (5). Plasmid profile analysis examines the total bacterial plasmid content, or subjects' plasmids to restriction endonucleases and separates the cleaved plasmid DNA by electrophoresis for analysis. This method is a powerful tool for following the spread of antibiotic resistance, because resistance is usually passed between bacteria on plasmids (6). The aim of the present study was to detect antibacterial resistant patterns of *P. aeruginosa* isolates obtained from clinical wound samples in Baghdad, against some of the commonly prescribed antibiotics and to detect the plasmid profile of multiple antibiotic resistant strains.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection: One hundred and fifty - two clinical wound swabs were collected from inpatients at Alkindy and Al- Yarmuk teaching hospitals in Baghdad city. Samples were collected between September 2015 to June 2016.

Cultural methods: Samples were cultured on the Blood agar and MacConkey agar plates and incubated at 37°C for 24 to 48 hour depending on the nature of the sample. The bacterial isolates were identified and characterized according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, a combination of colonial morphology, Gram stain characteristics and biochemical reactions such as oxidase and catalase tests, and were confirmed by inoculated them on the selective and differential media (citromid agar media) for identification of *P. aeruginosa*.

Antimicrobial sensitivity assay: Susceptibility and resistance pattern of *P. aeruginosa* isolates were performed by agar disc diffusion method on Mueller - Hinton agar as described by Kirby Bauer method (7) and recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (8). Fourteen antimicrobial agents were used to determine the susceptibility and resistant; namely: Amoxicillin (AML), Erythromycin (ERY), Nalidixic acid (NA), Cefazidime (CAZ), Ciprofloxacin (CIP), Aztreonam (ATM), Mezlocillin (MEZ) Imipenem (IPM), Trimethoprim-sulfamethoxazol (STX), Tetracycline (TET), Amikacin (AK), Gentamycin (GEN), Piperacillin (PIP), and Levofloxacin (LVX). The diameter of the zone of inhibition of each disc was measured and compared with zone diameter interpretative chart to determine the sensitivity of isolates to antibiotics (8,9). The multi resistant isolate that were resistant to more than one antibacterial were further investigated for plasmid DNA profiling.

Plasmid extraction and profiling:

Prepare Lysate - Plasmid was extracted according to the method described by commercial plasmid kit (Plasmid Miniprep Kit, Promega Co. USA) and according to the manufacture instruction: 600 μ l of each bacterial culture (grown in lauria broth) was added to a 1.5ml microcentrifuge tube, 100 μ l of cell lysis buffer (Blue) was added, and mixed by inverting the tube 6 times. Then, 350 μ l of cold (4-8°C) neutralization solution was added, mix thoroughly by inverting and centrifuged at maximum speed in a microcentrifuge (Eppendorf) for 3 mins. The supernatant of each tube was transfer (~900 μ l) to a PureYield™ Minicolumn without disturbing the cell debris pellet. The minicolumns were placed into a collection tubes, and centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 15 seconds. The follow-throughs were discarded and minicolumns were placed into the same collection tubes.

Wash - 200 μ l of endotoxin removal wash (ERB) were added to the minicolumn. Centrifuged at maximum speed in a microcentrifuge for 15 seconds then 400 μ l of column wash solution (CWC) added to the minicolumn, was centrifuged at maximum speed in a microcentrifuge for 30 seconds.

Elute - The minicolumns were transferred to a clean 1.5 ml microcentrifuge tubes, then 30 μ l of elution buffer was added directly to the minicolumn matrix. Each tube was kept to stand for 1 min. at room temperature and centrifuged for 15 seconds to elute the plasmid DNA. The microcentrifuge tubes were capped, and eluted plasmid DNA was stored at -20°C.

Agarose gel electrophoresis: Plasmid DNA was run on 0.8% agarose gel according to method described by Bikandi *et al.* (10). Briefly; 2 μ l of the loading dye was mixed with 10 μ l of the 1000 base pair molecular markers and transferred into the first well. 2 μ l of the loading dye was mixed with the

sample and it was transferred into the other wells. The gel was stained with ethidium bromide, and agarose gel electrophoresis was carried out on the plasmid DNA at 90 v for 60 minutes. UV Trans-illumination was used to visualization of bands harboring plasmid.

RESULTS

All *Pseudomonas aeruginosa* isolates were subjected and tested for susceptibility to 14 different

antimicrobial agents. Table (1) shows the antibiotic resistant and susceptibility patterns of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The resistance pattern of the tested isolates was amoxicillin 48(96%), nalidixic acid 45(90%), erythromycin (70%), tetracycline 37(74%), trimethoprim-sulfamethoxazol 32(64%), imipenem 22 (44%), mezlocillin 20(40%), levofloxacin 10 (20%), gentamycin 12 (24%), amikacin10 (20%), ceftazidime 9 (18%), aztreonam 8 (16%), ciprofloxacin 6 (12%), and piperacillin 2 (4%).

Table (1): Antibiotics susceptibility tests of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by disc diffusion method

Type of antibiotic	Conc. µg	R		S	
		No.	%	No.	%
Amoxicillin	25	48	96	2	4
Nalidixic acid	30	45	90	5	10
erythromycin	10	35	70	15	30
Aztreonam	30	8	16	42	84
Mezlocillin	75	20	40	30	60
Imipenem	10	22	44	28	56
Trimethoprim-sulfamethoxazol	125/23.7	32	64	18	36
Ciprofloxacin	5	6	12	44	88
Tetracycline	25	37	74	13	26
Amikacin	30	10	20	40	80
Gentamycin	10	12	24	38	76
Piperacillin	100	2	4	48	96
Levofloxacin	5	10	20	40	80
Ceftazidime	30	9	18	41	82

Antibacterial resistant profile of fifty *P. aeruginosa* isolates was revealed that sixteen isolates (31.25%) were resistant to (4,5,6,7,9,11,12) antibacterial agents respectively. The isolates P11, P41 were resistant for 9 antibacterial; P15 was resistant for 4 antibacterial; P18, P19 and P45 was resistant for 6 antibacterial; P17, P25 were resistant for 5

antibacterial; P33 was resistance to 10 antibacterial; P31, P35,39 was resistant for 11 antibacterial; P37 was resistant for 12 antibacterial; P5, P42, 47 were resistant for 7 antibacterial. Most of these isolates were give resistance to amoxicillin, nalidixic acid tetracycline, erythromycin, and Trimethoprim - sulfamethoxazol (table 2).

Table (2) : Antibacterial profile of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Isolates	Resistant pattern	No. of antibiotic resistant
P5	AMX, ERY, NA, TMP, IPM, TET, MEZ	7
P11	AMX, TET, CAZ, , GN	4
P15	AMX, NA, ERY,CAZ, TMP, TET, CIP, AK, LVX,	9
P17	AMX, NA, MEM, TIM, GN	5
P18	AMX, MEM, TIM, GN, TET, IPM	6
P19	AMX,CAZ,MEM, ATM,TIM, LVX	6
P25	AMX, NA, MEM,TIM, GN	5
P31	AMX, NA, CAZ,ERY, IPM, TIM, CIP,AK,GN,TET, ATM	11
P33	AMX, ATM, MEZ, IPM, TIM, CIP,AK,GN,TET, LVX	9
P35	AMX,NA,ERY, CAZ, IPM,TIM, LVX,CIP,TET,GN,AK	11
P37	AMX, NA, ERY,MEZ, IPM, TIM, LVX,CIP,GN, CAZ, AK, P	12
P39	AMX,ERY, NA,CAZ, IPM,TET, LVX,TIM,GN, AK, P	11
P41	AMX,ERY, NA,CAZ, TET,IPM,TIM, LVX,GN	9
P42	AMX, CAZ, MEZ,TIM, LVX,GN,IPM	7
P45	AMX,MEM,ATM, LVX,TET,IPM	6
P47	AMX, MEZ, NA,IPM, TIM,AK,TET	7

The plasmid analyses revealed that there was detectable plasmid in 6 (37.5%) out of 16 selected multi - drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Ten of the isolates possessed no plasmid, five isolates possessed single sized plasmid (550-800 bp). *Pseudomonas aeruginosa* isolates P15, P31

had plasmid size of 800 bp respectively. While Three *Pseudomonas aeruginosa* isolates P35, P39 , P41 had plasmid size of (550- 600-750 bp) respectively. Only one isolate P37 have two plasmids with size from (550-940) (figure 1).

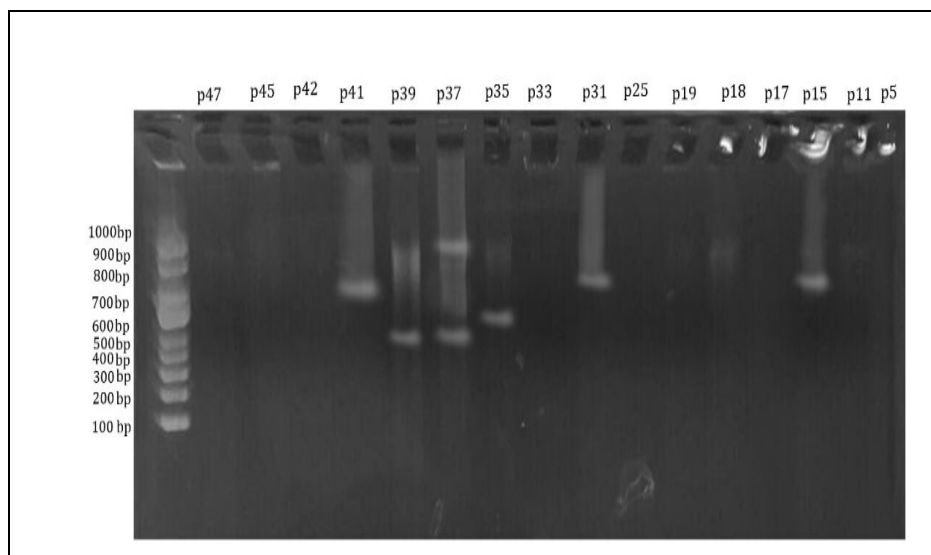


Figure (1): Agarose gel electrophoresis showing profiles of plasmid DNA of clinical wounds isolates of multi - drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Lane M, 100-1000bp ladder. Isolates 15 and 31 show plasmid bands at 800bp, while P35 show 600bp and P41 show 750bp. Only one isolates No. P37 show two plasmids at size (550- 950) bp respectively

DISCUSSION

Multi drug resistance (MDR) *P. aeruginosa* has been one of the major challenges faced by medical personnel and has caused significant hospital - associated outbreaks of infection (11,12). This study examined the **susceptibility** of 50 clinical wound isolates of *P.aeruginosa* and only sixteen MDR *P. aeruginosa* were subjected to plasmid profiling. Antibiotic sensitivity profile demonstrated that the multidrug resistance level to antibiotics has been increased in hospitals, but was still relatively low compared to other reports from other countries (13, 14). Increasing resistance to different anti-pseudomonal drugs particularly among hospital strains, has been reported world – wide (15) and this is a serious therapeutic problem in the management of disease due to these organisms. The overall incidence of antibiotic resistance of *P. aeruginosa* isolates was high in this study. *P. aeruginosa* has high resistance to amoxicillin 90%, nalidixic acid 90%, tetracycline 74%, erythromycin 70%, and trimethoprim - sulfamethoxazol 64% respectively. These results were different from previous local study that's carried by Mohammed *et al.* (16) their study suggested that all *P. aeruginosa* isolates exhibited fall resistance to amoxicillin 100% and tetracycline 100%. However, resistance of *P. aeruginosa* to amoxicillin and tetracycline is consistent with previous foreign reports that were

conducted in Nijeria (17). This study revealed that 90% of *P. aeruginosa* clinical wound isolates showing resistance to amoxicillin and 70% were resistance to tetracycline. According to Li *et al.* (18), *P. aeruginosa* is naturally resistance to β -lactams, including tetracycline, mainly because of the very low permeability of their cell wall. Such multi drug resistance has serious implications for the empiric therapy of infections caused by *P. aeruginosa*. Erythromycin which is traditionally used in this part of the world against wound infections had high resistance (70%) to *P. aeruginosa* clinical wounds isolates. The high resistance rates of *P. aeruginosa* to numerous antimicrobial agents (antibiotics) observed in this study might be due to indiscriminate and widespread or over usage of these antibiotics over many decades Baghdad hospitals. The resistance rate to Nalidixic acid was 90%, which compares favorably with study carried out in Pakistan (92%) by Zaman *et al.* (19) and in Nijeria (92.3%) by Jonathan and Courage (20). The high resistance rates may have been due to spontaneous mutations in bacterial cells during treatment, thus making the target site inaccessible to nalidixic acid thereby resulting to increased resistance to the selective action of antibiotics (20). Roose *et al.* (21) stated that drug resistance in pathogens is a serious medical problem because of very fast turn over and spread of mutants strains, insusceptible of medical

treatment. One striking feature in this study was that 44% of *P. aeruginosa* isolates were found to be resistance to imipenem. The marked increase of resistant strains to imipenem agents was observed which corresponds with recent findings by others (22). This might be due to the variation in the usage of antibiotics in our hospitals. The overall evolution of antibiotic resistance can be attributed to various factors like spread of transposons or R- plasmids to various pathogens mainly because of the selective forces imposed by human due to the overuse of antibiotics. A review of the published research reveals over 40 known resistance gene to contain the nucleotide sequences associated with the site specific recombination site, these include gene encoding resistance to antiseptic, disinfectant and β – lactams (23). This result was differed from a previous local report carried out by Mohammed *et al.* (16) who suggested that the resistance of *P. aeruginosa* to imipenem was 22 %. However, Anil and Shahid (24) reported that all *P. aeruginosa* isolates (100%) were susceptible to Imipenem, but other studies had shown varying degrees of resistance to imipenem in recent years (15,25,26). Bacterial isolates of *P. aeruginosa* exhibited low level of resistance but show high level of susceptibility against amikacin (10%) and ciprofloxacin (6%). Proved to be the most effective drugs for routine use among the *P. aeruginosa* strains tested in recent study. A previous study reported by Anil and Shahid (24) showed that (17.25%) isolates were resistant to amikacin followed by ciprofloxacin (27.59), this result was corroborated by data reported by Koirala *et al.* (27), that (18.6%) isolates showed resistance to amikacin followed by ciprofloxacin (29.7%). Jonathan and Uwabor (20) showed that there was slight reduction in the sensitivity level of ciprofloxacin (69.2%), but Gad *et al.* (1) showed high resistance rate of ciprofloxacin (43.6%). Resistance of ciprofloxacin in Latin America was (26.8%) 35 (28), while in Europe were (10-32%) (29,30). These striking differences in the response of the organism to ciprofloxacin and amikacin may result from differences in patients individual immunity and previous exposure to related types of antibiotic. High susceptibility activities against *P. aeruginosa* also were recorded in antibiotics such as ceftazidime (91%), levofloxacin (90%), gentamycin (88%), aztreonam (84%), and mezlocillin (60%) respectively. This results is consistent with a research carried out by Akingbade 2012 that reported the sensitivity of ceftazidime, Levofloxacin, and gentamycin, were (80,69.1,73.6%) respectively. Van Eldere (31) reported ceftazidime and gentamycin as good antibiotics against *P. aeruginosa*. The most important feature in this study was only (2%) of isolates that were found to be resistant to the piperacillin, relatively low piperaciline resistance (11.5%) had been reported in - patients isolates of *P. aeruginosa* in a report from Saudi Arabia (32). However, this result varied from that obtained by

Anil and Shahid (24), who reported that (55.17%) isolates were resistant to piperacillin. The intermediate to low resistance that observed in our results may also be chromosomally encoded or can possibly be on transposon, which might jump on to a plasmid that can be spread to different species and genera. The relationship between certain plasmid and resistance to some antibiotics has been reported previously (33). In the present study and by using plasmid profiling analyses, it was revealed that six (37.5%) MDR *P. aeruginosa* isolates had detectable plasmid while 10 (62.5%) had no plasmid bands. All the isolates that had plasmids were resistant to amoxicillin, erythromycin, tetracycline, and nalidixic acid. The sizes of plasmids among *P. aeruginosa* ranged from (550-940 bp). This coincides with that reported by Nikbin *et al.* in Iran detected plasmids in 39% of MDR *P. aeruginosa* isolates (34). But elevated rate (47.4%) had been reported by Mahmoud *et al.* in Egypt (35). Plasmid mediated resistance to various antimicrobial agents have been demonstrated by various workers (36-38).

CONCLUSION

The present study can suggest that nationwide policy concerted strategies should be made for minimize the inappropriate use of antibiotics and prevent the emergence of drug resistance, also for diagnostic efficiency of hospital microbiologist as well as treatment should be based on current laboratory susceptibility test results. Encouraging good hygienic measures could help crucial possible transmission of MDR *P. aeruginosa* infections within and outside the hospital environment. Also it suggests that plasmids should be characterized in all MDR *P. aeruginosa* strains.

REFERENCES

1. Gad GF.; El-Domany RA.; Zaki S. and Ashour HM. (2007). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: Prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. J. Antimicrob. Chemother. 60: 1010-1017.
2. Glupczynski Y.; Delmee M.; Goossens H. and Struelens MJ. (2001). Distribution and prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in intensive care units (ICU) in Belgian hospitals between 1996 and 1999. J. Acta. Clin. Belg. 56:297-306.
3. Pool K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever - present adversary. J. Hosp. Infect. 73:338-344.
4. Caemeli YN.; Eliopoulos GM. and Samore MH. (2002). Antecedent treatment with different antibiotic agents. Emerg. Infect. Dis. 8: 802-807.
5. Livermore DM. (2004). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas*

- vaeruginosa*: Our worst nightmare? CID. Antimicrob. Resist. 34: 634-664.
6. Ogle JW.; Janda JM.; Woods DE. and Vasil ML. (1987). Characterization and use of a DNA probe as an epidemiologic marker for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis. 155: 119-126.
 7. Bauer AW.; Kirby WM.; Sherris JC. and Truck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
 8. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12.PA, USA.
 9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard -Third edition, CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne Pennsylvania, USA, 28:1-99.
 10. Bikandy J.; San MR.; Rementeria J. and Garaizar J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR AFLP-PCR and endonuclease restriction. Bioinformatic. 20: 798-799.
 11. Bukholm G.; Tannas T.; Kjelsberg AB. and Smith – Erichsen N. (2002). An outbreak of multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased risk of patient death in an intensive care unit. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 23:441-446.
 12. Pena C.; Dominguez MA.; Pujol M.; Verdager R.; Gudiol F. and Ariza J. (2003). An outbreak of carbapenem – resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a urology ward. Clin. Microbiol. Infect. 9:938-943.
 13. Yimaz A.; Cobian AY.; Yelz Y.; Tamverdi C.; Yidrim TT.; Erturan ZZ.; Dunipnar BB. and Bozdogan BB. (2011). Investigation of plasmid mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. Microbiol. Bull. 45: 602-608.
 14. Daini OA. and Charles - Onyeaghalala CG. (2012). Plasmid- mediated aminoglycoside resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Global Adv. Res. J. Microbiol.1: 052-056.
 15. Arora D.; Jindal N.; Kumar R. and Romit M. (2011). Emerging antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Pharm. Sci. 3(2):74-82.
 16. Al- Marjani MF.; Khalil MA.; Jzar ZH. and Hassan ZN. (2010). Detection of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-1 metall- β lactamase in some Baghdad hospitals. Tikrit J. Pure. Sci. 15 (1): 1662-1813.
 17. Akinade OA.; Balogun SA.; Ojo DA.; Afolabi RO.; Motayo BO.; Okerentugba PO. and Okonko IO. (2012). Plasmid profile analysis of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in south west, Nigeria. J. World. Appl. Sci. 20(6): 775-766.
 18. Li XZ.; Livermore DM. and Nikaido H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin. Antimicrob. Agents. Chemother. 38(8): 1732-1741.
 19. Zaman R.; Inam M. and Ahmed B. (2013). Sensitivity pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to quinolones. J. Rawal. Med. 38(3): 244-248.
 20. Isibor JO. and Uwabor C. (2015). Antibiotic susceptibility pattern and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from some hospital patients in Benin city, Nigeria. NY. Sci. J. 8 (7): 96-103.
 21. Roos V.; Schembri MA.; Ulett GC. and Klemm P. (2006). Asymptomatic bacteriuria *Echerichia coli* colist strain 83972 carriers mutations in the locus and is unable to express F1C fimbriae. Microbiol. 152:1799-1806.
 22. Akiyoshi TK.; Intentsu O.; Toyoko I. and Sachiko G. (2005). An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple - drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Chemother. 11(2): 64.
 23. Lee B.; Haagensen J.; Ciofu O.; Andersen AJ.; and Molins JB. (2005). Heterogeneity of biofilms formed by non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 43(10): 5247-5255.
 24. Anil CH. and Shahid RM. (2013). Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates at a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. Asian J. Pharm. Clin. Reas. 6 (3):1126-1132.
 25. Mohanasoundaram KM. (2011). The antibiotic resistance pattern in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital: 2008-2010 (A 3 year study). J. Clin. Diagn. Res. 5(3):491-494.
 26. Al-Kabsi AM.; Yusof MYBM. and Sekaran SD. (2011). Antimicrobial resistance pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the University of Malaya Medical Center, Malaysia. Afr. J. Microbiol. Res. 5(29):5266-5272.
 27. Koirala P.; Bhatta DR.; Ghimire P.; Pokhrel BM. and Devkota U. (2010). Bacteriological profile of tracheal aspirates of the patients attending a neuro-hospital of Nepal. Int. J. Life. Sci. 4:60- 65.
 28. Jonas RN. (2001). Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. Chest. 119: 397s-404s.
 29. Bouza E.; Garcia-Gorrote F.; Cercenado E.; Marin M. and Diaz MS. (1999). *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. The Spanish *Pseudomonas aeruginosa* study group. Antimicrob. Agent. Chemother. 43: 981-982.
 30. Bonfiglio G.; Carciotto VG.; Russo S.; Stefani GC.; Debbia SE. and Nicoletti G. (1998). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. J. Antimicrob. Chemother. 41: 307-310.
 31. Van EJ. (2003). Multi-centre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in

nosocomial infections. J. Antimicrob. Chemother. 51: 347-352.

32. Al-Tawfiq A. (2007). Occurrence and antimicrobial resistance pattern of inpatient and outpatient isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Saudi Arabian hospital: 1998-2003. Int. J Infect. Dis .11:109-114.

33. Ferguson D.; Cahillo J. and Quilty B. (2007). Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from two Irish hospitals. J. Med. Bio. Sci. 1:1.

34. Nikbin VS.; Abdi-Ali A.; Feizabadi MM. and Gharavi S. (2007). Pulsed field gel electrophoresis and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. Indian. J. Med. Res. (126):146-151.

35. Mahmoud AB.; Zahran WA.; Hindawi GR.; Labib AZ. and Galal R. (2013). Prevalence of multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in Egypt, with special reference to typing methods. J. Virol. Microbiol. 10-13.

36. Shahid M. and Malik A. (2004). Plasmid mediated Amikacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. India. Med. Microb. 22:181-184.

37. Daini OA.; Effiong MJ. and Ogbolu OD. (2008). Quinolones resistance and R - plasmids of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* species. J. Sudan. Med. Sci.3:139-146.

38. Yimaz A.; Cobian AY. Yelz Y.; Tamverdi C.; Yidrim TT.; Erturan ZZ.; Dunipnar BB. and Bozdogan BB. (2011). Investigation of plasmid - mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. J. Microbiol. Bull. 45:602-608.

Contamination of baby creams and lotions with objectionable and non-objectionable microorganisms in Jordanian markets

Ghaidaa F. Al- Jaber (1) and Abdul Jabbar N. Al-Shammari (2)

(1) Al Kindi Hospital / Al Rasafa Health office / Ministry of Health- Baghdad / Republic of Iraq (2) Dept. of Medical Laboratory Sciences / Faculty of Science / Al Balqa' Applied University / Al Salt / Jordan

E-mail: shammari.icastjo@yahoo.com

ABSTRACT

Baby cream and lotions can be subjected to contamination by pathogenic microorganisms and create hazards effects on babies' skins and their general health. This study was conducted to determine the microbial limits in some branded commercial baby skin care products (lotions and creams) and the antimicrobial effectiveness of preservatives in these products found in the Jordanian markets. Thirty commercially brands of baby care products (creams and lotions) were randomly purchased from the pharmacies and supermarkets in Amman, Jordan. Two methods were used to determine the microbial load of the samples. Total Aerobic Mesophilic Count (TAMC) was used to exclude bacteria and Total Yeast Mold Count (TYMC) was used to exclude yeast and mold. Colony forming unit (CFU/g) was determined, in order to obtained the total viable count (TVC) in both media. Microbial isolates recovered from samples were identified using microscopic, biochemical tests and diagnostic kits for identification of microorganisms. The Preservative capacity was evaluated by antimicrobial effectiveness test. Four baby cream and lotion samples were selected, two were found loaded with microorganisms and the other two were sterile. All tubes challenged with *S.aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E.coli* and *Aspergillus* spp. At the end of 28 days, the log reduction was estimated.

Out of 30 baby cream and lotion samples, twelve samples were loaded with microorganisms, the total microbial count of baby cream and lotions tested were higher than recommended limits (100-400 CFU/g of products), which was in excess of the acceptable bottom line for bacteria in non-sterile topical products. Bacteria isolated were identified as: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Yeast and mold species were also detected, namely: *penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Rhodotorula*. Antimicrobial effectiveness results showed that the preservative in contaminated samples disable to inhibits microbial growth as compared with non-contaminated samples. The present study concluded that the presence of microbial contamination above the microbial limits in these products are very risky.

Keywords: Total Yeast Mold Count (TYMC), Total Aerobic Mesophilic Count (TAMC), lotions and creams.

الملخص باللغة العربية

يهدف البحث الحالي إلى تحديد ومقارنة مستويات وأنواع التلوث الميكروبي في بعض أنواع المنتجات التجارية الخاصة بالعناية ببشرة الأطفال (المرطبات والكريمات) وتأثير المواد الحافظة المضادة للميكروبات في هذه المنتجات الموجودة في الأسواق الأردنية. تم جمع ثلاثين نوعاً من منتجات العناية ببشرة الأطفال (الكريمات والمرطبات) والتي تم شراؤها بشكل عشوائي من صيدليات ومحال تجارية في عمان، الأردن. استعملت طريقتين للاستدلال على التلوث الجرثومي وهما طريقة العد الكلي للبكتيريا الهوائية لغرض عزل البكتيريا، وطريقة العد الكلي للفطريات في الغرام أو الميليتر الواحد. تم تسجيل وجود تلوث جرثومي بالرغم من وجود مواد حافظة في الكريمات والمرطبات والتي المفترض أن تمنع النمو الجرثومي. تم فحص كفاءة المواد الحافظة باستخدام طريقة كفاءة المواد الحافظة لمنع النمو الجرثومي باستخدام عزلات قياسية مثل: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Rhodotorula*.

نستنتج من ذلك أن المواد الحافظة المستعملة في منتجات العناية ببشرة الطفل لم تكن لديها الإمكانيات الكافية للحد من النمو والتكاثر الميكروبي في هذه المنتجات.

INTRODUCTION

Baby skin is delicate and sensitive and its functions is to maintain body fluids in homeostasis status in order to protect skin (1). Acidity of baby skin is another important factor that affects the functional capacity of skin (2), because there is close relationship between skin flora and surface pH. According to Atherton and Rook (3) "it is clear that nothing should be applied to the skin of any baby without careful consideration of the potential hazards". Washing baby skin with alkaline soaps will regenerate the skin pH and thus should not be used and instead using of neutral or slight acidic pH soaps more helpful for baby skin (4). As the present study concerned about the microbial contamination of the topical baby care products, the important issue related to this problem was the contamination of baby creams and lotions with objectionable microorganisms. objectionable microorganisms defined as those organisms that are capable of producing diseases if they are presented in any pharmaceutical product (5). Pharmaceutical products are routinely investigated for presence of hazardous microorganisms that may affect the health or may be fetal for user. Non-sterilized pharmaceutical products, which contain high quantity of water are subjected to contamination by various microorganisms. Cream and lotion containing water, oil, carbohydrates and protein regard as good environment for growth of objectionable microorganisms (6). The isolation of microbes from non-sterile pharmaceutical products had been known for many years (7-11). Commercial baby creams and lotions are not expected to be completely sterile; however, they must be free from objectionable microbes and the total number of aerobic microbes per gram must be low (12). water-in-oil emulsions are less susceptible because the continuous oil phase acts as a barrier to the penetration of microorganisms into the water phase and also impede the spread of growth through the system (13). On the other hand, microbial contamination may spoil products or reduce the intended quality. These statements make it necessary to carry out routine tests to excluding microbes of such products, in order to ensure their quality and the safety for customers to use. The aim of the present study was to investigate the occurrence of harmful microorganism's in baby creams and lotions in Jordan markets.

MATERIALS AND METHODS

Sample collections: A total of 30 samples of baby creams and lotions were purchased randomly from different shops and pharmacies in Amman, Jordan. Most of these products were manufactured in Jordanian Drug companies, while the rest were imported from abroad companies. Nineteen cream samples (symbolized by C) and 11 lotions sample (symbolized by L) were investigated. The sizes of

cream samples were 110, 200 and 250 ml in volume, some of these samples were packaged in tubes or jars. The closure type of tubes is flip cap and screw, while the jars closed by container closure. Further information's about the patch number, manufacture date and expired date were reported.

Sample Preparation: Samples were prepared under septic techniques using sterile materials according to USP chapters 61 and 62 guidelines to determine the microbial load (13-15). One g of the content for each sample was added to the stock solution (0.25% of tween 80 and 4 ml of ringer solution) was completed to 10 ml to make 1:10 dilution. Prepared test tubes were incubated in water bath at 40 °C for 5 mins. to dissolve the contents.

Culturing of samples: 0.1 ml of sample was streaked on the surface of TSA (Trypticase Soy Agar) and SDA (Sabouraud dextrose agar) media in duplicate. TSA media plates were used for isolation of aerobic bacteria. Plates were incubated at 35 °C for 3-5 days, while SDA media plates were used for isolation of mold and yeast, and the plates were incubated at 25 °C for 5-7 days (14). The presence of bacteria, mold and yeast were judged by observing the colonies on inoculated plates. Bacterial isolates were identified by microscopic and biochemical reactions (15), mold and yeast isolates were identified by clonal morphology, sexual stage appears by microscopic appearance after slide mount by 20% KOH and Lacto-phenol cotton blue stain (5). Staphylococcus, enterobacteria and yeast species were confirmed by Remel Rapid kits (Remel RapID™ system).

Anti- microbial Effectiveness Test: Indicators microorganisms include, *Escherichia coli* (ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538) and *Asperigillus spp.* were cultured on suitable media, colonies were washed with 10 ml of normal saline, washing fluid were collected in sterile tubes, sufficient amount of normal saline was added to achieve the total count about 1×10^6 CFU/mL with aid of MacFarland tubes (5,14,15). Cream and lotions prepared in Ringer solution as mentioned above were inoculated with 0.1ml of indicator microorganisms, as shown in figure (1). Inoculated test tubes are incubated at 25 °C. Test tubes were sampled at the appropriate intervals days. Any visual changes observed in appearance of tested samples were recorded at these intervals. Serial dilution count procedure was used to determine the viable count of indicator organisms. Results interpreted as log reduction from initial count at 14 days, should not less than 2.0 log, and no increase from 14-28 days for bacterial species; while no increase from initial calculated count at 14-28 for yeast and mold species. Log reduction was calculated according to following equation:

Log reduction = log value of inoculum – log value of survivors

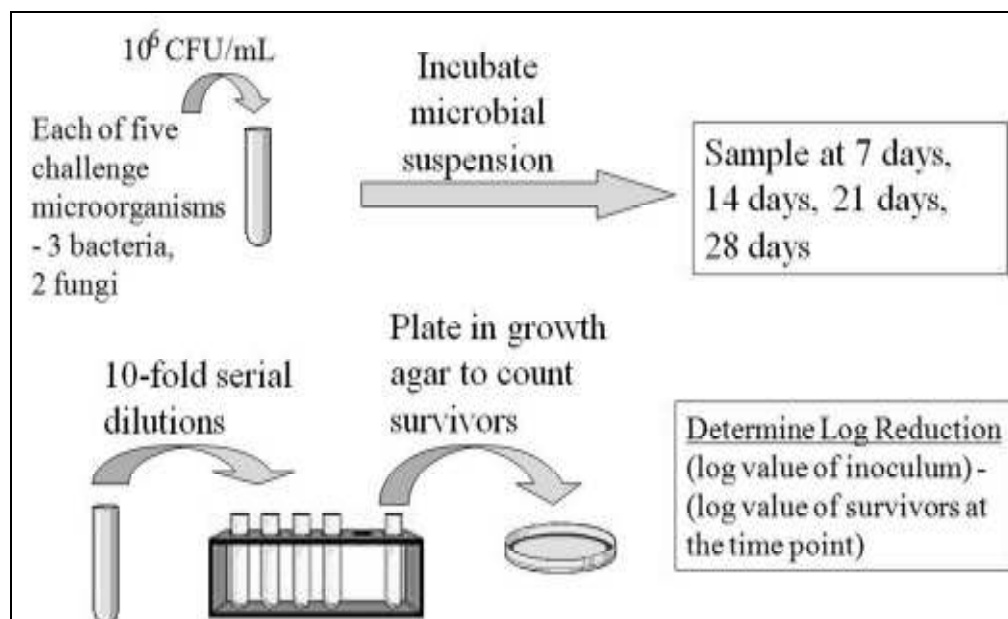


Figure (1): Steps of antimicrobial effectiveness test

RESULTS

Total viable count of microorganisms in tested baby creams and lotions

Out of 30 baby cream and lotion samples were collected from different pharmacies and supermarkets in Amman, Jordan, twelve samples showed microbial contamination (table 1).

Table (1): Number of samples contaminated by microorganisms

Type of sample	Sample size	No. of contaminated samples	CFU/ml or g
Cream	19	7	100 -400 cfu/g
Lotion	11	5	100 -400 cfu/g
Total	30	12	

Identification of microorganisms

The twelve contaminated samples were bioburden by: *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, *E. coli* and mold namely *penicillium*, *mucor*, *asperigillus*, *fusarium*, *cladosporium* and yeast (*Rhodotorula rubra*) as judged by morphological and biochemical reaction (table 2).

Table (2): Kinds of microorganisms isolated from baby cream and lotions

Microorganism isolated	No. of samples		Mean CFU/ml or g
	Cream	Lotion	
<i>S.aureus</i>	1	-	100 cfu/g
<i>S.epidermis</i>	1	-	200cfu/g
<i>B.subtilis</i>	1	1	200 cfu/g
<i>E.coli</i>	-	1	100 cfu/g
<i>Asperigillus</i>	-	1	100 cfu/g
<i>Fusarium</i>	-	1	100 cfu/g
<i>penicillium</i>	1	-	100 cfu/g
<i>mucor</i>	1	-	100 cfu/g
<i>Cladosporium</i>	1	3	400 cfu/g
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	-	100 cfu/g

Bacterial isolates and yeast were further confirmed by Remel Kits (One system plus) and showed that the cream samples were contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and yeast, while lotions contaminated with *E.coli* and mold (table 3).

Table (3): Confirmation of diagnosis by kits

Sample no.	Microbe	Results by kit
C5	Yeast form Gram positive oval	<i>Rhodotorula rubra</i>
L29	Gram negative bacilli	<i>E.coli</i>
C2	Gram positive cocci	<i>Staph.epidermis</i>
C2	Gram positive cocci	<i>Staph.epidermis</i>
C23	Gram positive cocci	<i>Staph.aureus</i>
C25	Gram positive cocci	<i>Staph.epidermis</i>

Anti- microbial effectiveness test

Table (4) showed the results of antimicrobial effectiveness for samples of cream and lotions which contain microorganism or absent. The challenge test against *E.coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* species show no reduction in

number count of challenge strain compared with regular reduction in samples free from contamination, while in *Pseudomonas* specie's both samples which were bioburden or not were reduced. The efficiency of preservative in samples C13 L27 was efficient, since the total number of indicator strains were reduced after 7 and 14 days.

Table (4): Efficacy of preservative as antimicrobial in the cream and lotions used in the study

Sample no.	Contamination	Inoculums	7 days	14 days	28 days
<i>E.coli</i>					
C2	+	106	NR	NR	NR
C13	-	106	4	2	0
L29	+	106	NR	NR	NR
L27	-	106	4	2	0
<i>Staph. aureus</i>					
C2	+	106	NR	NR	NR
C13	-	106	3	2	1
L29	+	106	NR	NR	NR
L27	-	106	3	2	1
<i>Pseudo.</i>					
C2	+	106	NR	NR	NR
C13	-	106	NR	NR	NR
L29	+	106	NR	NR	NR
L27	-	106	1	1	1
<i>Aspargillus</i>					
C2	+	106	1	NR	NR
C13	-	106	4	2	0
L29	+	106	1	NR	NR
L27	-	106	3	2	1

*NR: no reduction, += contamination, -=No contamination

DISCUSSION

Creams and lotions used as topical products regard as non-sterile pharmaceutical products. Since these products were not sterile, it's may contains low level of microbial load and easily to be contaminated, since it contains water and other nutritional materials.

The hypothesis of this study was to investigate the possible contamination of different brands of baby cream and lotion sold in Jordanian markets. On other hand, since these products were non-sterile, but contained chemical preservatives capable to inhibit microbial contamination during manufacturing and/or immediate post production.

The significance of the present study was that it deals with the babies cream and lotions, which not explored by others, especially in Arab countries. Secondly; the susceptibility of babies to microbial risk with products supposed to smoothing and protected them. The product brands tested in this study represented Jordanian and foreign made cream and lotions.

The total microbial count of baby creams and lotions tested in this study were higher than recommended limits (100-400 CFU/g of products), which was in excess of the acceptable bottom line for bacteria in non-sterile topical products (5,13). Several studies carried on developing and developed countries were alike (7-9). This finding was very

risky, since these products were used for babies with delicate skin and poor immunity. Antherton and Rook, mentioned that nothing should be applied to skin of any baby without careful consideration of the potential hazards (16).

The microorganisms detected in this study, shows pathogenic and none-pathogenic organisms. One bacterium must be absences in these products as recommended by pharmacopeias, was *S.aureus*. This organism causes several health problems ranging from skin infection to pneumonia (17). The other staphylococci detected was *S.epidermidis*, which been detected in thousands of Aveeno Baby Calming Comfort Lotion(Johnson & Johnson), It had been produced by an unnamed manufacturer in Canada, after a sample contained too much bacteria (18). The bacteria were identified as coagulase-negative Staphylococci, which naturally occurs in the environment. It can lead to health problems such as central nervous system or urinary tract infections. Strains are resistant to antibiotics (19). *E.coli* was mentioned to be absences from pharmaceutical products other than cream and lotions, because the contamination by *E.coli* came from contaminated water used in manufacturing of these products (18-20). This is not means, that other detected microorganisms were not significant. Pharmaceutical drugs regards spoiled if there is high level of opportunistic and low level of pathogenic microorganisms (5).

The preservatives employed in most tubes used in this study, did not possess adequate to brought about acceptable low level of microbial contamination as demanded by regulatory bodies. There is a pressing need to ensure the microbiological wholesomeness of such products. Although *Enterobacteria* were generally absent from the creams, the frequent isolation of *Staphylococcus aureus*, *mucor* and *Aspergillus* were of some concern because of the pathogenic potential of these organisms. Such products can adversely affect health status of consumers as well as the stability profiles of the products (21). If the tested products had an acceptable range for the preservative, and it was intended to be within the range during shelf-life of the product, no microbial contamination must be detected, then the AET was passed (i.e., cross the range of preservative that is expected to be found in the product). This is normally done as part of the product's stability program. Recently manufactured lots, which we would expect to contain the upper range of preservative, would be subject to the AET. Then, at least the final stability testing point, where we would expect the level of preservative to be at its lowest within the acceptable range, would be tested. This will demonstrate that the AET will pass cross the acceptable range of preservative levels. But unfortunately, that was not true, same batch with similar preservative and nearly same expired dates were contaminated with microorganisms.

Sodium benzoate combine with citric acid were used in one lotion preparation in this study, it was efficient. Benzoic acid is used in many topical and

oral formulations in its sodium salt form or in combination with other preservatives. A limitation of its use is the pH of the formulation, because the nonionized acid is the active substance is recommended for formulations having a pH less than 4.0. This is perfect, since the infant skin is the "acid mantle" or the functional capacity of the skin to form a surface pH of less than 5. There is close association between the skin surface pH and its microbial flora, because an increased skin pH from acidic to neutral can cause a transient increase in the total number of skin bacteria and a shift in the species present (22), hence it is important to maintain this acid mantle on the baby's skin.

Parabens was another example of preservative which used widely in lotion and cream, and was found in tested samples in this study. The methyl, ethyl, propyl, and butyl esters of p-hydroxybenzoic acid are widely used in combination (usually methyl and propyl) with one another in liquid, emulsion, cream, and lotion formulations. The antimicrobial effectiveness of these chemicals is greater against Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria. Parabens are odorless and do not cause product discoloration. Their different solubility levels enable the formulator to protect effectively both the aqueous and oil phases of a formulation when the right combination of the esters is used (5). Samples C5, L16, C21, C25 and L29 contain different dervatives of parabens, but were contaminated with yeast, fungi and *S.epidermidis* respectively; in contrast with non-contaminating samples contains the same derivatives (L8, C11, C12, C13, L17 and C25).

The preservative in samples C4 and L10 were EDTA, C4 contaminated with fungi while L10 was free from fungi or bacteria. Both samples nearly expired. The effect of EDTA in chelating ions of magnesium (Mg^{++}) and calcium (Ca^{++}) in the outer membrane of Gram-negative bacteria. Although most antimicrobials can effectively intervene with the reproductive process of vegetative cells, few chemicals are sporicides. Sporulation is a complex process, and chemical agents able to affect the viability of spores are inhibitory at only certain stages in the overall life cycle of the spore former. Organisms that are injured but not killed by antimicrobials may be able to repair the cell damage and, when the opportunity is given, the microbes may proliferate and adversely affect the microbial quality and safety of the product (5).

The outcome of this study revealed that even well known drug company manufacturing baby cream and lotions may be suffered from microbial contamination, but the worse part that these products demonstrated to babies with poor immunity and soft skin tissue. Contamination with *Klebsiella pneumoniae* or *clostridium tetani* was fatal to babies (8,22). Four babies died from *Clostridium tetani* infections attributed to use of a talcum powder contaminated with this organism (8,23). The current study and other studies from

teams reported that the baby cream and lotions, manufactured in Jordan or foreign pharmaceutical companies, were contaminated with pathogenic and non-pathogenic microorganism, this require to apply Rapid Alert System (RAPEX), that used by The European Commission (EC) has an early warning system for safety management (rapex) (24). The results in this study will argue the Jordanian FDA to intense their work as authorized organization for quality control for all pharmaceutical products. This study pointed that for wise reasons, it is important to guide parents toward choosing free microbial contaminated baby cream and lotions, as well as to give the manufacturing organizations the awareness of such products when they are manufacturing.

REFERENCES

1. Hoeger PH. and Enzmann CC. (2002). Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Ped. Dermatol.* 19(3): 256–262.
2. Evans NJ. and Rutter N. (1986). Development of the epidermis in the newborn. *Biol. Neonate* 49(2): 74-80.
3. Rim JH.; Jo SJ.; Park JY.; Park BD. and Youn JI. (2005). Electrical measurement of moisturizing effect on skin hydration and barrier function in psoriasis patients. *Clin. Exp. Dermatol.* 30(4): 409-413.
4. Chamlin SL.; Kao J.; and Frieden IJ. (2002). Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47(2): 198-208.
5. Clontz L. (2009). Microbial limit and bioburden tests: Validation approaches and Global requirements. 2nd ed. CRC press Fl. USA.
6. Leranoz S.(2005). Current trends in cosmetic microbiology. *Int. Microbiol.* 8(2):120-129.
7. Baird RM. (1982). Bacteriological contamination of products used for the skin care in babies. *Int. J. Cosmet. Sci.* 6:85–90.
8. Okore VA. (1992). Study of the microbiological purity of some body creams and lotions marketed in Nigeria. *African. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 22:166-171.
9. Hugbo PG.; Onyekweli AO.; Igwe I. (2003). Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetics. *Trop. J. Pharm. Res.* 2:229-234.
10. Behravan J.; Bazzar F. and Malaekheh P. (2009). Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *Int. J. Dermatol.* 44:482–485.
11. Shaqra Q. and Al-Groom R. (2012). Microbiologically quality of hair and skin care cosmetics manufactured in Jordan. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 69: 69-72.
12. Geis P. (2012). Cosmetics Preservatives and Microbial Resistance. *Microbiology in quality control laboratories.* Washington DC.
13. Jager M. (1995). Sorbic Acid—the gentle alternative for preservation. *Preserve Tech Conference Proceedings.* pp:39–50.
14. USP31-NF26, Chapters <51>, Antimicrobial Effectiveness Testing and <61>, Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Test.
15. Casey WM.; Heath J.; Goodwin J. and Hughes K. (2001). An alternative methodology for the general test. Chapter Microbial Limit Test <61>. Pharmacopeial Forum.
16. Sutton S. (2009). Pharmaceutical quality control microbiology: a guide book to the basic.
17. Dhar S. (2007). Newborn skin care revisited. *Indian J. Dermatol.* 52: 1-4.
18. Dhar S. (2007). Newborn skin care revisited. *Indian J. Dermatol.* 52: 1-4.
18. Jimenez L. (2007). Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* 61:383–399.
19. WHO. (2003). Application of Hazard Analysis and Critical Control Point Methodology to Pharmaceuticals. In WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-Seventh report. Geneva.
20. Siegert W. (2005). Microbiological quality management for the production of cosmetics and toiletries. *Cosm. Sci. Tech.* 143:189-195.
21. Kabara JJ. (2006). Hurdle technology for cosmetic and drug preservation. *Cosmetic and Drug Microbiol. Informa Healthcare, New York, NY:* pp:163–183.
22. Yosipovitch G.; Maayan-Metzger A.; Merlob P. and Sirota L.(2000). Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatric.* 106(11): 105–108.
23. Wallhausser KH. (1978). Microbiological quality control of skin care preparations. *Cosmet. Toilet.* 93: 42-48.
24. Neza E. and Centini M. (2016). Microbiologically contaminated and over-preserved cosmetic products according to Rapex 2008-2014. *Cosmetic.* 3(1): 12-19.

Culture independent method for identification of *Pseudomonas fluorescens* directly from milk using Polymerase Chain Reaction

Ansam K. Mohammed (1), Asma H. Abdalla (1) and Nahi Y. Yaseen (2)

(1) College of Veterinary Medicine / University of Baghdad (2) Iraqi Centre for Cancer and Genetic Research / Republic of Iraq

E-mail: ansamkhalid196@yahoo.com

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens is a common and major opportunistic human and animal pathogen. *Pseudomonas fluorescens* is one of the major bacterial pathogens which cause serious clinical infection and food poisoning cases that is also an emerging concern in veterinary medicine and animal agriculture. Fast and accurate methods were needed for identifying these bacteria. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used in this study without any inhibitor, primers were designed for amplification of the 16SrRNA spacer regions of *P. fluorescens*.

Milk samples were collected from 27 lactating cows, 18 cows with previous history of *P. fluorescens* and others 9 were free infection (control). Genomic DNA were extracted from milk samples, after centrifugation and re suspended in 300 ml of 0.1 mM Tris-HCl, 0.1 EDTA.

Three pairs specific PCR primers were used, the amplified product indicated by three major bands (approx. 100-150 bp, 200-300 bp and 780 bp in size). This study concluded that PCR methods can be used instead of the conventional methods which depend upon isolation and culturing of bacteria.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, EDTA, Polymerase Chain Reaction (PCR)

الملخص باللغة العربية

تعد *Pseudomonas. Fluorescens* الأكثر شيوعاً وخطورة من بين الممرضات الانتهازية التي تصيب الإنسان والحيوان، إذ تسبب الجروح، التهاب الحروق، التهاب المجاري البولية، والعديد من الإصابات الأخرى. تم استعمال التفاعل التضاعفي المنكرر لسلسلة DNA أو RNA (Polymerase chain reaction) المعتمدة على استخدام بادئات متخصصة للنوع وذلك لتشخيص بكتيريا *P. fluorescens* من الحليب. ولتحقيق هذا الهدف تم استخلاص DNA من العزلات النقية لهذه السلالات من البكتيريا وبعد ذلك تم تطبيق DNA باستخدام بادئات متخصصة قسم منها تستهدف جزء من الجينات الرايبوسومات والتي يطلق عليه 16s والتي تكون متخصصة لبكتيريا *P. fluorescens*. أظهرت النتائج حتماً تضاعفة وبالحجم المتوقع وهو (780,300.100) زوجاً قاعدياً عند استخدام كل بادئ على حدة. تم التأكد من تخصص تلك البادئات لبكتيريا *P. fluorescens* وذلك بظهور نفس الحزمة عند استعمال DNA المعزولة من السلالة النقية للبكتيريا وعدم ظهور تلك النتيجة عند تطبيقها على أنواع بكتيرية أخرى.

INTRODUCTION

Pseudomonas is genetically well equipped to survive food processing technology and host defense stage. Therefore *P. fluorescens* is one of the major bacterial pathogens which cause serious clinical infection and food poisoning cases that is also an emerging concern in veterinary medicine and animal agriculture (1). *Pseudomonas fluorescens* are capable of producing heat stable lipases and proteases, which are responsible for spoilage of milk with characteristic bitterness, rancidity, fruity flavor, casein breakdown, and response due to production of slime and coagulation of proteins (2).

An increasing number of people are consuming raw unpasteurized milk. Development of pre-and post-harvest control measures to effectively reduce contamination is critical to the control of pathogens in raw milk. One sure way to prevent raw milk-associated food borne illness is for consumers refrain from drinking raw milk and from consuming dairy products manufactured using raw milk (3). Molecular techniques have allowed the precise and rapid identification and typing of bacterial strains, providing new ways to check for their presence and monitor their development (4). Recently, molecular methods, such as PCR have been used successfully for the identification of mastitis pathogens (5). One of the most widely applied approaches deals with the use of 16S rRNA and its encoding genes as target molecules.

The purpose of the study was an attempt to diagnose *Pseudomonas fluorescens* intramammary natural infections by the PCR analysis.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Milk samples were collected from 20 of 18 lactating cows with history of mastitis caused by *P. fluorescens*, and 7 quarter of 9 lactating healthy cows.

Cultivation of bacteria: The milk sample were serially diluted 10³ and 10⁴ and plated on to blood agar, 1-2 colonies were collected from blood agar plates, and re suspended in 300 ml of 50 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA buffer, pH 8.0. Solution were incubated at 100°C for 15 min and then at 37°C for 30 min with 80 mg/ml final concentration of lysostaphin, and subsequently treated with proteinase K 100 mg/ml for 10 min at 55°C. The reaction was ceased by inactivated proteinase K 100 by heating at 95°C for 15 min (all the reagents from Sigma – Aldrich Co.).

Detection of *P. fluorescens* from milk samples directly: One milliliter of milk was centrifuged at 13 600 x g for 5 min. The cream was removed by using sterile cotton swab, supernatant was discarded and the pellet was re suspended in 1.0 ml of PBS, vortexed and centrifuged at 13 600 x g for 1 min.

The last procedure was repeated for 5 times, then the pellet was re suspended in 300 ml of 0.1 mM Tris-HCL, 0.1 EDTA and same steps mentioned above were applied.

To select the optimal volume of genomic DNA 1 ml in the first series and 0.5, 0.25 ml of this suspension in the second series of the examination were used as a template for PCR amplification (6). To determine DNA concentration an aliquot 20 ml of DNA sample was added to 80 ml of TE buffer mixed thoroughly then optical density (O.D) was measured using a spectrophotometer at wave length of 260 nm. O.D= 1 at 260nm corresponds to approximately 50 mg/ml for double-stranded DNA (7).

Primers: Oligonucleotide primers used for amplifying the 16S rRNA, outlined in table (1). These primers were described by (8).

Table (1): The primers used in this study

Primers	Sequences	Molecular weight	References
16S1(sense)F	5'-TGAAGTCGTAACAAGGTAGC-3'	770 bp	13
16S2(antisense)R	5'-ATCGCCTCTGACTGCCAAGG-3'	770 bp	13
P1F	5'-GGTGTGCTGCGTGATCCG-3'	100 bp	14
P2R	5'-GATACAAGTATACGAATAGAGCC-3'	100 bp	14
P01F	5'-CGGCGAATGTCGTCTTCACAG-3'	200 bp	18
P02R	5'-GCATTCCATTGTGATGATGGTG-3'	200 bp	18

RESULTS AND DISCUSSION

DNA extraction

The full amount of DNA was obtained in this study as shown in (figure 1). The purity was also found good, ranging between 1.6-1.7. This reflected that the method was successful and gave amplifiable DNA for PCR experiment without inhibitor for these kinds of reactions. Database searches for 16S rRNA similarities revealed sequences related to *Pseudomonas* that derived from cultures originally identified by others as belonging to different genera. *Pseudomonas* classification has attracted much attention in the recent past, and extensive reclassification has been performed (11). The *Pseudomonas* -PCR protocol may offer a rapid diagnostic tool for genus identification, which was strongly supported by its experimentally confirmed selectivity and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns obtained for *P. fluorescens* (Figure 1 and table 1).

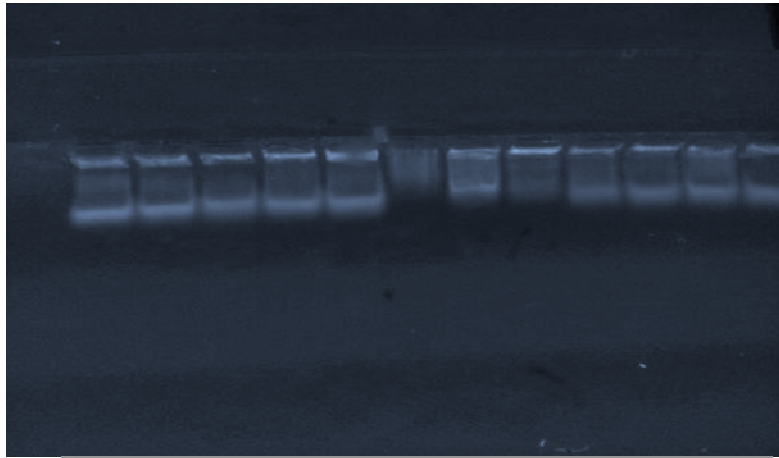


Figure (1): Extracted DNA from the milk electrophoresis on 1% agarose (70 vol/ 90 min) to check purity and integrity, Lane 1 was standard molecular weight marker 50Ug /ml and lanes 2-7 represent the DNA extracted from samples of milk

Application of PCR

PCR methods seems to be very good. most of these studies have been conducted by skilled research personnel under carefully controlled conditions. The major objective of this study was to develop a rapid and reliable method for the detection of *P. flourescens* from milk, using PCR assay. both genus and species level is chiefly dependent upon the designing of the primers targeted against specific genes. The three set of primers produce three

amplified bands in an expected size 100-150 bp ,200-300 bp ,and 700 bp in size for each primer respectively and figure (2) represents the PCR result of one set of primers, were shown to be specific for *P. flourescens* genome , no PCR product was obtained when genomic DNA for other bacteria. This is explain the highly specify of primers and accuracy of PCR observed similar results without enrichment step, such result was also reported by (12).

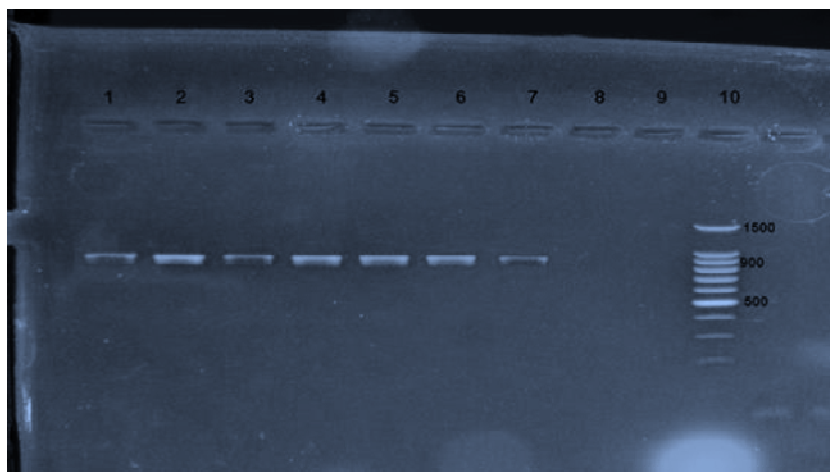


Figure (2): PCR product electrophoresis on agarose gel 1.5%(1 h /70 vol) Lane 10 : 100 bp DNA marker; Lane 8 and 9 : Negative control; Lane 1-7: PCR product of *P.aeruginosa*780 bp.

The 16SrRNA gene is used for phylogenetic studies (13) as it is highly conserved between different species of bacteria and Achaea (14). In addition to

highly conserved primer binding sites, 16S rRNA gene sequences contain hyper variable regions that can provide species-specific signature sequences

useful for bacterial identification (15). As a result, 16S rRNA gene sequencing has become prevalent in medical microbiology as a rapid and cheap alternative to phenotypic methods of *P. fluorescens* identification (16). Although it was originally used to identify *P. fluorescens*, 16S sequencing was subsequently found to be capable of reclassifying *P. fluorescens* into completely new species, or even genera. It has also been used to describe new species that have never been successfully cultured (17). We have designed 16S rRNA-based PCR assays that provide rapid, simple, and reliable identification of *P. fluorescens* and its differentiation from other phylogenetically closely related *Pseudomonas* species. Molecular methods for detection of specific gene sequences for monitoring bacterial species population densities and copy numbers of functional genes are advancing rapidly. Results of this research demonstrate that it will be necessary to empirically test many of the sequences that have been identified in the laboratory. The 16S rRNA gene can be compared not only among all bacteria but also with the 16S rRNA gene of archaeobacteria and the 18S rRNA gene of eukaryotes (18). Application of other specific PCR for identification techniques such as *recA* gene was recommended.

REFERENCES

1. Bacteriological Analytical Manual (BAM)(2014). Chapter 23: *Pseudomonas*. U.S Food and Drug Administration (FDA).
2. Beena AK.; Ranjini AR. and Riya TG. (2011). Isolation of Psychrotropic multiple drug resistant *Pseudomonas* from Pasteurized milk. Vet. World. 4(8):349-352.
3. Somsiri T. and Soontornvit S. (2002). Bacterial diseases of cultured tiger frog (*Rana tigrina*). In C.R. Lavilla-Pitogo and E.R. Cruz-Lacierda (eds.), Diseases in Asian Aquaculture IV, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
4. Schleifer KH.; Ehermann M.; Beimfohr C.; Brockmann E.; Ludwig W. and Amann R. (1995). Application of molecular methods for the identification of lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 5:1081-1094.
5. Widmer F.; Seidler RJ.; Gillevet PM.; Watrud LS. and Giovanni GD. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu stricto) in environment samples. Appl. Environ. Microbiol. 64:2545-2553.
6. Lister PD.; Wolter DJ. and Hanson ND. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. 22(4):582-610.
7. Sambrook J.; MacCallum P. and Russell D.(2000). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed.
8. Sawada H.; Takeuchi T. and Matsuda I. (1997). Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. 63:282-288.
9. Widmer F.; Seidler RJ.; Gillevet PM.; Watrud LS. and Giovanni GD. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu stricto) in environment samples. Appl. Environ. Microbiol. 64:2545-2553.
10. Pereira F.; Carneiro J.; Matthiesen R.; vanAsch B.; Pinto N.; Gusmao L. and Amorim A. (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. Nucl. Acid. Res. 38(22): e203–e203.
11. Weisburg WG.; Barns SM.; Pelletier DA. and Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173 (2): 697–703.
12. Thammanoon JT.; Puttinaowarat S. and Somsiri T. (2005). Detection and identification of *Pseudomonas* spp. by polymerase chain reaction-reverse cross-blot hybridization (PCR-RCBH) with 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer probes. In P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V, pp. 447-456. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
13. Coenye T. and Vandamme P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. FEMS Microbiol. Lett. 228(1):45–49.
14. Welsh J. and McClelland M. (1993). Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR, p. 595– 602. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
15. Puttinaowarat S.; Thompson KD.; Kolk A. and Adams A. (2002). Identification of mycobacterium spp. isolated from snakehead, *Channa striata* (Fowler), and Siamese fighting fish, *Betta splendens* (Regan), using polymerase chain reaction-reverse cross blot hybridization (PCRRCBH). J. Fish. Dis. 25:35-243.
16. Schmidt TM. and Relman DA. (1994). Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. Methods. Enzymol. 235: 205–222.
17. Berg DE.; Akopyants NS. and Kersulyte D. (1994). Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. Methods Mol. Cell. Biol. 5:13–24.
18. Clarridge I. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 17(4): 840–862.

Evaluation of the biological activity of human, camel and cow milk against pathogenic bacteria and yeast isolates

Nada H. A. L. Al-Mudallal

Dept. of Clinical Microbiology / College of Medicine / Al-Iraqia University / Republic of Iraq

E-mail: nada_alnudallal@yahoo.com

ABSTRACT

In order to study the effects of women, camel and cow milks on microorganisms, this study was conducted. Twenty-six isolates representative Gram negative, positive pathogenic bacteria and yeasts belong to the genera (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida* and *Cryptococcus*) were used as indicator lawn to determine the antimicrobial activity of milk as judged by agar diffusion method. Results shows that all milk types used in this experiment were capable of inhibited the microbial strain mention above. Camel milk showed superior activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* with LSD values of 6.091*, 6.448 * and 5.609 * respectively. Human milk active against *E. coli* 3, *Klebsiella spp.* and *Candida tropicalis* with LSD values of 6.448*, 6.205* and 7.413* respectively. Cow milk shows lowest effects with LSD value of 5.709 against *Candida albicans*. This study concluded that camel milk and human's milk represents the most effective types of milk against the gram positive and negative pathogenic bacteria and yeast isolates.

Keywords: LSD values, gram positive and negative pathogenic bacteria and yeast isolates

الملخص باللغة العربية

صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثير حليب النساء والجمال والابقار على الجراثيم. أخذت عشرون عزلة تشمل بكتيريا موجبة وسالبة لصبغة كرام وفطريات مثل:

Pseudomonas, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida* and *Cryptococcus*

استعملت هذه الجراثيم كدليل لمعرفة التأثير المضاد للجريمة في عينات الحليب المختلفة باستعمال طريقة الانتشار في الاكار وقياس منطقة منع النمو بالمليمتر. وأوضحت النتائج بان عينات الحليب المجموعة من النساء والجمال والابقار لها فعاليات متفاوتة، فحليب الجمال كان اكثر تأثيرا على البكتيريا *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* من بقية الأنواع بعد حساب عامل ال سي دي، ومن جهة

أخرى فان حليب النساء اعطى فعالية مضادة ضد جراثيم *E. coli*, *Klebsiella spp.* and *Candida tropicalis* في حين أظهر حليب الابقار فعالية قليلة ضد الجراثيم المستعملة في هذه الدراسة، عليه استخلصت هذه الدراسة ان حليب الجمال والنساء هما الأفضل في تثبيط الجراثيم.

INTRODUCTION

Milk is an established and healthy food source of energy, protein, vitamins and minerals, and has a highest quality source of well-balanced nutrients. Milk from different species contains several antimicrobial factors which exert both specific and nonspecific bacteriostatic and bactericidal activity (1). These factors are transferred from the mother to the neonate and contribute to the protection against infectious diseases (2). In practical, Milk is rich in proteins that are classically grouped into two main classes (i) major milk proteins including caseins and the whey proteins and (ii) minor milk proteins including lysozyme, lactoferrins, lactoperoxidase and immunoglobulins. Although the constituents represent only a minor fraction of milk protein, they have highest immune stimulation potential when consumed in human diet (3-6). These proteins are present in the milk of cows, ewes, goat, buffalos, pigs, camel and human (7-9) but their concentration fluctuates depending on species, health status of animal and stage of lactation. Cow's milk has high lactoperoxidase, but low lactoferrin and lysozyme, while human milk has high lactoferrin and lysozyme but low lactoperoxidase. Camel's milk contains all essential nutrients as cow's milk and also has some components that are different from those in cow's milk as well as their values. Insulin, vitamin C, niacin and some fatty acid are higher in camel's milk (10). She camel's milk has a good biological value due to higher content of antimicrobial factors such as lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, immunoglobulins G, Peptidoglycan recognition protein PGRP, N-acetyl-glucosaminidase (NAGase) (7, 11- 13). Camel milk's lactoferrin has very high levels of bactericidal and bacterio static properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria (14) more than cow and human lactoferrin. The action is similar against viruses; in this case, for example, it prevents the penetration of hepatitis C virus in leukocytes (15, 16). The addition of milks, specially human milk but also from other animals – such as cow, giraffe, mule, buffalo, alpaca, and camel – lowers the bacterial resistance to antibiotics, through an immunomodulatory action, but also because they act as glycodecoys for blocking bacterial lectin attachment to cell receptors (17, 18)

Camel and human milk also has a unique property in that it includes the presence of Lactic acid bacteria (LAB). The *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacteria* that isolated from human milk have antimicrobial activity against *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* (19, 20). Laref and Guessas (21) found that *Lactobacillus* spp. bacteria, which isolated from camel milk have the ability to inhibit the germination of *Candida* and completely inhibited the mycelium growth of *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Pencillium* spp.,

Fusarium roseum, *Stemphylium* spp. Dheeb *et al.*, (22) determined the inhibitory effects of human, camel and cow's milk against some pathogenic fungi in Iraq and confirmed that there is a positive relationship between the concentrations of milk proteins of these species and the inhibitory growth rate of milk against fungi and found that human milk has a stronger inhibitory effect than camel or cow milk.

Many studies were done concerning the inhibitory effect of camel and human milk or camel and cow milk on pathogenic bacteria or fungi. Very rare studies determined the inhibitory effects of camel, human and cow's milk together on the gram negative and positive bacteria and yeast. In this study, using the diffusion method and determined the inhibitory effects of human, camel and cow's milk on twenty six different isolated species of gram negative and positive pathogenic bacteria and yeast belong to the genera (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida* and *Cryptococcus*) is pursued and discussed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial and yeast isolates: Twenty six different gram positive and negative pathogenic bacteria and yeast isolates belong to the genera (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida* and *Cryptococcus*) were isolated from different sources and characterized as shown in table (1).

As shown in table (1), standard strains *E. coli* PBR 322(1) and (2), *E. coli* standard and *Aeromonas hydrophila* standard were kindly gifted by the post-graduated students, in Department of Biotechnology/ College of Science/ Al-Nahrain University-Baghdad. The yeast isolates were isolated and characterized by Dr. Batool Dheeb in Department of Biotechnology/ College of Science/ Baghdad-University, and kindly gifted by her.

Table (1): The clinical bacterial and yeast isolates and their sources of isolations

Strain no.	Bacteria and yeast spp.	Gram stain	Sources of Isolation
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	-	Urinary tract infection
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	-	Urinary tract infection
3	<i>E. coli</i> (1)	-	Urinary tract infection
4	<i>E. coli</i> (2)	-	Stool
5	<i>E. coli</i> (3)	-	Stool
6	<i>E. coli</i> PBR22 (1)	-	Standard (Amp) and(Tet) resistant strain contain plasmid
7	<i>E. coli</i> PBR22 (2)	-	Standard (Amp) and(Tet) resistant strain contain plasmid
8	<i>E. coli</i> standard	-	Standard strain
9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Standard strain
10	<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	Respiratory tract infection
11	<i>Klebsiella</i> spp.	-	Respiratory tract infection
12	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Urinary tract infection
13	<i>Salmonella</i> spp.	-	Blood
14	<i>Serratia</i> spp.	-	Respiratory tract infection
15	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	+	Blood
16	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	+	Dermal infection
17	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	+	Urinary tract infection
18	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	Blood
19	<i>Candida albicans</i> (1)	Yeast	Aspergillus infections
20	<i>Candida albicans</i> (2)	Yeast	Aspergillus infections
21	<i>Candida tropicalis</i> (1)	Yeast	Respiratory tract infection
22	<i>Candida tropicalis</i> (2)	Yeast	Respiratory tract infection
23	<i>Candida cruzii</i>	Yeast	Respiratory tract infection
24	<i>Candida kefyr</i>	Yeast	Respiratory tract infection
25	<i>Candida sojae</i>	Yeast	Respiratory tract infection
26	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Yeast	Respiratory tract infection

Milk samples: Samples of human milk were obtained from lactating women two months after labor (lactation after colostrum with a breast pump). Fresh camel's and raw cow's milk samples were collected from apparently healthy animals also after two months after labor bred in the living stock station at the College of Veterinary Medicine, Baghdad University, Baghdad. The milk samples were placed in sterile containers and transported to the laboratory in a cool box. Human, camel and cow's milk samples were passed separately through Millipore filter (0.22 mm) (Bio-Rad) before determining their anti-bacterial and yeast activity.

Evaluation of anti-microbial activity of milk: The effects of human, camel and cow's milk on the growth of bacteria and yeast isolates were determined by the diffusion method on a solid media following the method described by Silva *et al.*, (23). Briefly, brain heart infusion broth stock cultures bacteria and yeast were spreaded on the surfaces of brain heart infusion agar plates. Then (100 μ l) of each type of milk was pipetted into prepared holes on the same agar plates and incubated for (24-48 hrs.) at 37°C. This procedure was repeated in triplicate for each milk sample. The inhibition zone rates were calculated by measuring

the means of diameters of clearance zone areas in (mm) for the triplicate repeats of each milk sample after incubation with bacteria and yeast isolates.

Statistical analysis: The Statistical Analysis System-SAS (24) was used to determine the effect of resource of milk and bacterial and yeast species in Inhibition zone rate (mm). Least significant difference-LSD test was used to compare the significance between means of obtained result.

RESULTS AND DISCUSSION

The inhibitory effects of human, camel and cow's milk for each of different bacteria and yeast species were determined as described previously. The results shown in table (2) and figure (1) indicate that all three types of milk were capable of inhibiting the growth of the twenty six isolates of pathogenic bacteria and yeast with different inhibition zone rates. For the gram negative bacteria, the genus *Pseudomonas*, human milk gave the highest zone rate of 29 mm with *pseudomonas aeruginosa* 2 that was isolated from urinary tract infection patient, while camel and cow's milk gave 10 mm and 12 mm respectively with LSD value of 7.327*. For the genus *Escherichia* isolated species and standard strains, the highest zone inhibition rate of 30mm

was recorded with *E. coli* 3 that isolated from patient's stool after treated with human and camel's milk while cow's milk gave 12 mm inhibition zone rate with LSD value of 6.448*. For the genus *Klebsiella*, *Klebsiella spp.* that isolated from respiratory tract infections, human milk recorded a highest inhibition zone rate of 30mm followed by 20mm and 10mm for camel and cow's milk respectively, LSD value of 6.205* was recorded for the three types of milk. For the genus *Aeromonas* standard strains, *Proteus*, *Salmonella* and *Serratia* that were isolated from urinary tract infection, blood and respiratory tract infections respectively, the highest zone inhibition rate of 25mm was estimated with camel milk on *Salmonella spp.* followed by 22mm and 14mm for human and cow's milk respectively with LSD value of 4.724*.

For the gram positive bacteria, genus *Staphylococcus*, the highest zone inhibition rate of 33mm was recorded with *Staphylococcus aureus* 2 that isolated from dermal infection after treated with camel milk, human and cow's milk capable to give

14mm and 11mm inhibition zone rate respectively and LSD value was recorded to be 6.091*. For the genus *Streptococcus* and the isolate *Streptococcus pyogenes* that isolated from blood, camel milk gave a highest inhibition zone rate of 22mm followed by 20mm and 12mm for each human and cow's milk with LSD value of 4.791*. For the yeast isolates particularly for the genus *Candida* and *Cryptococcus*, human milk was determined to give the highest zone inhibition rate of 30mm on *Candida tropicalis* 2 that was isolated from respiratory tract infection while camel and cow's milk were recorded inhibition zone rates of 25mm and 9mm respectively, LSD value of 7.413* was determined for the three types of milk. Camel's milk also recorded a highest zone inhibition rate 26mm on *Candida albicans* 1 followed by human and cow's milk respectively with LSD value of 5.609*. The total LSD values for human, camel and cow's milk for all the twenty six bacteria and yeast isolates were recorded to be 9.273*, 8.269* and 9.584* respectively.

Table (2): The inhibition zone rates (mm) for different bacterial and yeast isolates caused by different milk specimens, using the diffusion method in brain heart infusion agar medium

Strain no.	Bacterial and yeast isolates	Human milk	Camel milk	Cow milk	LSD Value
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	10	10	7	4.385 NS
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	29	10	12	7.327 *
3	<i>E. coli</i> (1)	20	12	7	6.982 *
4	<i>E. coli</i> (2)	28	26	6	7.316 *
5	<i>E. coli</i> (3)	30	30	12	6.448 *
6	<i>E. coli</i> PBR 322 (1)	15	10	10	4.572 *
7	<i>E. coli</i> PBR 322 (2)	12	19	3	4.893 *
8	<i>E. coli</i> standard	15	12	10	4.269 *
9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7	8	3	3.500 *
10	<i>Klebsiella pneumonia</i>	20	12	13	4.873 *
11	<i>Klebsiella spp.</i>	30	20	10	6.205 *
12	<i>Proteus mirabilis</i>	6	9	3	4.613 *
13	<i>Salmonella spp.</i>	22	25	14	4.724 *
14	<i>Serratia spp.</i>	19	22	10	5.774 *
15	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	20	15	2	6.217 *
16	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	14	33	11	6.091 *
17	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	19	25	9	4.742 *
18	<i>Streptococcus pyogenes</i>	20	22	12	4.791 *
19	<i>Candida albicans</i> (1)	25	26	7	5.609 *
20	<i>Candida albicans</i> (2)	22	17	15	5.709 *
21	<i>Candida tropicalis</i> (1)	30	25	9	7.413 *
22	<i>Candida tropicalis</i> (2)	19	12	10	4.616 *
23	<i>Candida cruzii</i>	14	17	14	4.883 NS
24	<i>Candida kefyr</i>	19	12	11	5.628 *
25	<i>Candida sojae</i>	22	19	13	5.829 *
26	<i>Cryptococcus neoformans</i>	12	10	2	4.861 *
LSD Value		9.273 *	8.269 *	9.584 *	---

* Significant ($P \leq 0.05$), NS: Non-significant

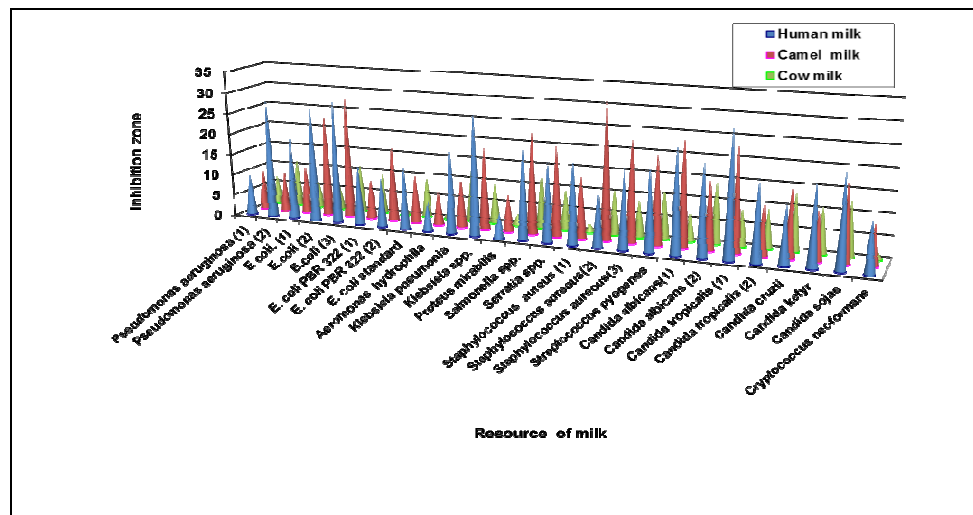


Figure (1): The inhibition zone rate (mm) of different bacterial and yeast isolates grown on brain heart infusion agar media treated with human, camel and cow's milk

The results showed that human and camel milk represent the most effective type of milk against the gram negative pathogenic bacteria compared to cow's milk which was ranked second. For the gram positive pathogenic bacteria, the most effective type of milk against them was recorded to be camel milk followed by human and cow's milk respectively. For the yeast isolates, human milk represents the most effective type of milk followed by camel and cow's milk respectively. According to these overall inhibitory effects on the studied bacterial species and yeasts our result agree with those of Goldman (25) and Pelligrini *et al.*, (26) who found that human breast milk have a strong inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Candida albicans*. Benkerroum *et al.* (27), found that camel milk and cow's milk have a bacteriostatic effect against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 078:K80. Dheeb *et al.* (22) confirmed that there is a positive relationship between the concentrations of human, camel and cow's milk and the inhibitory growth rate of milk against some pathogenic fungi in Iraq and founded that human milk has a stronger inhibitory effect than camel and cow milk which were ranked second and third respectively.

The qualitative results in the present study may be indicative of the effects of some of the constituents of the different types of milk as inhibitors of bacterial and yeasts species growth. Lonnerdal (3) determined the presence of a multitude of proteins especially in human milk such as SIgA, lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase, hepatocorrin and α -lactoalbumin have inhibitory activity against pathogenic bacteria, viruses and fungi. Some of these proteins are likely to act independently,

whereas others may act synergistically. The positive health effects of milk proteins can be presented as antioxidative, antimicrobial, antihypertensive, immunomodulatory and anti-thrombotic (28). Kleesen *et al.* (29) proved that the bacterial flora of breast fed infants is different from that of formula-fed infants; breast fed infants have fewer potentially pathogenic bacteria such as *E. coli*, *Bacteriodes*, *Compylobacter* and *Streptococci* but more *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Gyorgy (30), found that the antimicrobial components in human milk inhibit the growth of pathogenic bacteria; it is also likely that some substances stimulate the growth of beneficial bacteria, so they have prebiotic bacterial activity. This was originally called the bifidus factor, which can limit the growth of several pathogens by decreasing intestinal pH.

El-Agamy *et al.* (11) and Kappeler *et al.* (31) indicated that milk is capable to protect against microbial contaminations by natural inhibitory system including the lactoperoxidase/ thiocyanate/ hydrogen peroxide (LP) system, lactoferrins, lysozyme, immunoglobulins and free fatty acid. Cow's milk inhibited the metabolic activity of *E. coli* through the presence of both xanthine oxidase (xo) activity and the presence of nitrite, implying that xo-generated nitric oxide functions as an antibacterial agent (32). The concentrations and activity of each of these microbial system substances depend on animal species, stage of lactation and health status (13). Shamsia (33) determined the antimicrobial factors of both camel and human's milk and concluded that camel milk is richer in immunoglobulin (1.54mg/ml) than human milk (1.14mg/ml). However, contents of lactoferrin and lysozyme were very low (0.24mg/ml) and (0.06mg/ml) respectively as compared with human milk which contains (1.95mg/ml) lactoferrin and (0.65mg/ml) lysozyme. Camel milk contained more

fat, protein, specially casein and ash contents but lower whey protein and lactose contents than human milk. Casein and whey protein contents in human milk make it very nutritious for the new born baby. El-Agamy and Nawar (13) determined the level of immunoglobulin-G in camel milk is (1.64mg/ml) compared to 0.67 and 0.86mg/ml for cow and human milk respectively. While the content of lactoferrin in camel milk 0.22mg/ml is significantly higher than that in cow's milk and very low compared with that of human milk (34). Sisecioglu *et al.* (9) explained that the Lactoperoxidase (LPO) system of bovine milk exhibits inhibition property against *Citrobacterfreundii*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Candida albicans* and *Candida krusei*. Wakabayashi *et al.* (35), Kruzel *et al.* (36) and Legrand *et al.* (37), showed that lactoferrin is an essential element of non-specific innate immunity in human and other mammals (the concentration of lactoferrin in cow's milk is lower than it is in human's milk). Conesa *et al.* (14) revealed that camel milk's lactoferrin has very high levels of bactericidal and bacteriostatic properties against (Gram-positive and Gram-negative bacteria) more than cow and human lactoferrin. Cardoso *et al.* (38) explained the ability of camel's milk to protect the mice that inoculated with *Salmonella enterica* bacteria, in addition to lactoferrin and Immunoglobulin-G, other substances present in camel milk could be responsible for the protection of the mice, such as lysozyme, lactoperoxidase, vitamin C (present in large amounts) and carbohydrates through their proven immunomodulatory action (39- 41).

CONCLUSION

The present study confirmed that there is a strong relationship between the concentrations of the milk proteins that present in human, camel and cow's milk and the inhibitory effects against bacteria and yeast isolates and due to the highest zone inhibition rates, camel milk and human's milk represents the most effective types of milk against the gram positive and negative pathogenic bacteria and yeast isolates followed by cow's milk which ranked second in its inhibitory activity.

Acknowledgements

The author is gratefully acknowledged the efforts of Dr. Ala Sharif Abbas, Department of Medical Lab. Techs., Al-Maamoon University College Baghdad; for his critical points and revision of the original manuscript.

REFERENCES

1. Van Hooijdonk AC.; Kussendrager KD. and Steijns JM. (2000). *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrums involved in non-specific defense. Br. J. Nutr. 84:S127- S134.
2. Abolghait SK.; Garbaj AM. and Moawad AA. (2011). Raw cow's milk relatively inhibits quorum sensing activity of *Cromobacterium violaceum* in comparison to raw she-camel's milk. Open Vet. J. 1:35-38.
3. Lonnerdal BO. (2003). Nutritional and physiological significance of human milk proteins. Am. J. Clin. Nutr. 77(suppl): 1537s-1543s.
4. Severin S. and Wenshui X. (2005). Milk biological active components as nutraceuticals: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45 :(7-8):645-656.
5. Leon-Sicaire N.; Lopez-Soto F.; Reyes-Lopez M.; Godinez-Vargaz D.; Ordaz-Pichardo C. and Garaza MOL. (2006). Amoebicidal activity of milk, Apo-lactoferrin sIgA and lysozyme. Clin. Med. Res. 4(2):106-113.
6. Ambroziak A. and Cichosz G. (2014). Immune stimulative potency of milk proteins. Pol. Merkur. Lekarski. 36(212):133-136.
7. Wernery U. (2003). New observations on camels and their milk. Dar Al-Fajr Publications. Abu Dhabi, United Arab Emirates. Pp:41-42.
8. Seifu E.; Buys EM. and Donkin E. (2005). Significance of the peroxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. Trnds. Food Sci. 16:137.
9. Sisecioglu M.; Kirecci E.; Cankaya M.; Ozdemir H.; Gulcin I. and Atasever A. (2010). The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. African J. Pharm. Pharmacol. 4(9):671-677.
10. Wernery U. (2007). Camel milk-new observations. Pro. Int. Camel. Conf. pp.:200-204.
11. El-Agamy EI.; Ruppanner R.; Ismail A.; Champanne CP. and Assaf R. (1992). Antimicrobial and antiviral activity of camel protective protein. J. Dairy Res. 59:169-175.
12. El-Agamy EI.; Abou-shloue ZI. and Abdul-Kader YI. (1998). Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. Alex. J. Agric. Res. 43(2):57-70.
13. El-Agamy EI. and Nawar M. (2000). Nutritive and immunological values of camel milk: A comparative study with milk of other species. In: Proc. 2nd International Camelid Conference: Agrocons. Camelid Farm, Almaty, Kazakhstan 8-12 September.
14. Conesa C.; Sanchez L. and Rota C. *et al.* (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. 150:131-139.
15. Baker EN. and Baker HM. (2005). Molecular structure binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol. Life Sci. 65:2531-2539.

16. Redwan RM. and Tabll A. (2007). Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *J. Immunoass. Immunochem.* 28:267-277.
17. Salami M.; Moosavi MO.; Vahedi AA. and Ehsani MR. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *J. Agri. Food Chem.* 58:3297-3302.
18. Zinger-Yosovich KD.; Iluz D.; Sudakevitz D. and Gilboa-Garber N. (2010). Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* lectins by diverse mammalian milk. *J. Dairy Sci.* 93:473-482.
19. Rosario SC.; Cid MD.; Cruz CM.; Faustino VMD. and Tuazon AO. (2005). *In vitro* study on the antimicrobial activity of probiotic milk against common pediatric community acquired respiratory pathogens. *PIDSP J.* 9(2):25-29.
20. Diba FS.; Hossain KM.; Azim MA. and Moinul H. (2013). Isolation characterization and determination of antimicrobial properties of Lactic acid bacteria from human milk. *Jordan J. Biol. Sci.* 6(2):111-116.
21. Laref N. and Guessas B. (2013). Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innov. Roman. Food Biotechnol.* 13:80-88.
22. Dheeb BI.; Al-Mudallal NH.; Salman ZA.; Ali M.; Nouri MA.; Hussain HT. and Abdulredha SS. (2015). The inhibitory effects of human, camel and cow's milk against some pathogenic fungi in Iraq. *Jordan J. Biol. Sci.* 8(2): 89-93.
23. Silva M.; Jacobus NV.; Deneke C. and Gorbach SL. (1987). Antimicrobial substances from a human *Lactobacillus* strains. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 31(8):1231-1233.
24. SAS. (2012). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9. 1. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
25. Goldman AS. (1993). The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory, and immunomodulating properties. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12:664-672.
26. Pelligrini A.; Thomas U.; Bramaz N.; Hunziker P. and Von Fellenberg R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:439-448.
27. Benkerroum N.; Mekkaoui M.; Bennani N. and Hidane K. (2004). Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Dairy Tech.* 57 (1):39-43.
28. FitzGerald RJ. and Meisel H. (2000). Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nut.* 84: 33-37.
29. Kleesen B.; Bunke H.; Tovar K.; Noack J. and Sawatzki G. (1995). Influence of two infant formulas and human milk on the development of the fecal flora in newborn infants. *Acta. Paediatr.* 84:1347-1356.
30. György P. (1971). The uniqueness of human milk. *Biochemical aspects.* *Am. J. Clin. Nutr.* 24:970-975.
31. Kappeler S.; Farah Z. and Puhon Z. (1999). Alternative splicing of lactoferrin mRNA from lactating mammary gland of the camel (*Camelus dromedarius*). *J. Dairy Sci.* 82: 2084-2093.
32. Hancock JT.; Salisbury V.; Ovejero-Boglione MC.; Cherry R.; Hoare C.; Eisenthal R. and Harrison R. (2002). Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 46 (10):3308-3310.
33. Shamsia SM. (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *Int. J. Genetic. Molec. Biol.* 1(2):052-058.
34. El-Agamy EI.; Abou-Shloue ZI. and Abdel-Kader YI. (1997). A comparative study of milk proteins from different species. II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships. Third Alexandria Conference on Food Science and Technology, Alexandria, Egypt. 1-3 March.
35. Wakabayashi H.; Yamauchi K. and Takase M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16:1241-1251.
36. Kruzel ML.; Actor JK.; Boldogh I. and Zimecki M. (2007). Lactoferrin in health and disease. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 61:261-267.
37. Legrand D.; Pierce E.; Carpentier M.; Mariller C. and Mazurier J. ((2008). Structure and function of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606 (94):163.
38. Cardoso RA.; Ponte M. and Leite V. (2013). Protective action of camel milk in mice inoculated with *Salmonella enterica*. *IMAJ.* 15: 5-8.
39. Duhaiman AS. (1988). Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 91: 793-796.
40. Farah Z.; Rettenmaier R. and Atkins D. (1992). Vitamin content of camel milk. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 62: 30-33.
41. Vos AP.; M'Rabet L.; Stahl B.; Boehm G. and Garssen J. (2007). Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied non digestible carbohydrates. *Crit. Rev. Immunol.* 27: 97-140.

Isolation, identification and optimization of protease producing bacteria isolated from soil in Soran city

Abduljaleel H. Mohammed (1), Ashwaq Y. Noori (1) and Afrah T. Khalaf (2)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences / Soran University / Erbil (2) Dept. of Biology / College of Education / University of Samarra / Republic of Iraq

E-mail: abduljaleelhasan@gmail.com

ABSTRACT

In many different fields, bacterial alkaline protease is of big importance, one of them is the field of industry. Fourteen proteolytic isolates were obtained. The isolates were subjected to different values of temperatures, salinity, and pH. Under normal conditions, all isolates were able to produce protease. Under experimental conditions of pH and temperatures, only 7 isolates were able to produce protease. In addition, the isolates were subjected to experimental conditions of salinity and temperatures, thus, only 3 isolates showed an ability to produce protease. In general, *Bacillus carboniphilus*, *B. cereus*, *B. pumilus*, and *Kocuria kristinae* showed highest ability to produce protease at different physicochemical conditions, promising a good source of industrial production.

Keywords: Isolation, identification, protease producing bacteria, soil, Soran City.

الملخص باللغة العربية

يعتبر إنزيم البروتياز ذا أهمية كبيرة في مجالات مختلفة ومنها المجال الصناعي. تم الحصول على 14 عزلة بكتيرية محللة للبروتين. تم تعريض العزلات لقيم مختلفة من درجات الحرارة، الملوحة والأس الهيدروجيني. تحت القيم الطبيعية من هذه العوامل، فإن جميع العزلات تمكنت من إنتاج البروتياز، أما تحت الظروف التجريبية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني و درجات الحرارة، فإن 7 عزلات فقط تمكنت من إنتاج البروتياز، في حين أن 3 عزلات فقط تمكن من إنتاج البروتياز عند تعريضها لظروف تجريبية لقيم الملوحة ودرجات الحرارة. وبشكل عام فإن *Bacillus carboniphilus*، *B. cereus*، *B. pumilus* و *Kocuriakristinae* قد أظهرت قدرة عالية على إنتاج البروتياز في ظروف فيزيائية وكيميائية مختلفة، مما يجعلها واعدة في مجال الإنتاج الصناعي.

INTRODUCTION

Proteases include a group of enzymes responsible for the hydrolytic process of the protein molecules into smaller peptide chains and free amino acids. They are common in all living organisms as they are essential for cell growth and differentiation (1). Protease -a well-known enzyme- is of big importance in industry since involving in many applications such as: food, agricultural industries, leather, pharmaceutical, silk, detergents, and proteinaceous waste bioremediation. This wide variation in both physiological and biotechnological properties attracts more attention to this unique kind of enzymes (2). Protease is one of three groups of enzymes that represents about 65% of the total production of all groups (3). Proteases are extracted from microbes, plants, and animal sources as well. Microorganisms have the advantages of easy, cheap, and fast growing, so they always have been a sound choice to produce the enzyme. In addition, proteases produced by microorganisms are favored among other origins because microbial proteases showed all the traits required for biotechnological applications like rapid broad biochemical diversity, culture in small space and extreme feasibility to produce different enzymes for different chemical processes (4- 6). At the same time, the share of microorganisms within the total amount of production is more than 40% (7).

Fungi known to be able of producing protease in commercial quantities are many species belong to the genus *Aspergillus* such as: *Aspergillus flavus*, *A. muller*, *A. niger* in addition to *Penicillium griseofulvum* (4), while those belong to the bacterial group are many species of the genus *Bacillus* such as: *Bacillus licheniformis*, *B. firmus*, *B. alcalo*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* (8, 9).

The industrial production of protease starts with the step of screening of probable protease producing microbial strains followed by selecting the best candidate microorganism. It is of an industrial importance to select microorganisms with capability of producing protease in vast range of physico-chemical conditions, then strains of wide tolerance will be grown in optimal conditions for optimal yield of protease (10). The activity and stability of desired proteolytic enzyme in extreme conditions of salinity, acidity, and temperature is the key stone in selecting the suitable enzyme for commercial production (11). Most of protease production steps are happened under extreme conditions, so it would be very helpful to produce enzymes under wide range of salinity and temperature (12).

The *Bacillus* genus is one of the most important genera due to its ability to produce protease in large quantities in spite of the vast variation in physical and chemical conditions (13). This study was conducted to determine the ability of bacterial strains isolated from Soran city soil that produce protease under different conditions of salinity, pH, and temperature.

MATERIALS AND METHODS

Source of samples: Samples were collected from different areas in Soran city (north of Erbil, Kurdistan province). The proteolytic bacterial cultures were isolated from various protein enriched soil samples (from area near to slaughter house and other places).

Sampling: The samples were collected aseptically from top soil to the depth of 5 cm by using a sterile spatula in sterile plastic containers. Later, samples were allowed to dry at room temperature.

Isolation, and identification of bacteria: All samples were serially diluted (6 decimal dilutions) by using sterile distilled water and the highest three dilutions were cultured on nutrient agar plates. After incubation at 37 °C, discrete colonies were cultured again on skimmed milk agar. The hydrolytic zones noticed after 24 hrs. of incubation, were considered as a sign of presence of protease producing bacteria (14). All protease producing isolates were cultured and purified on nutrient agar. A suspension of each isolate was prepared and compared with McFarland 0.5 turbidity to be loaded into VITEK® 2 SYSTEM for identification.

Optimizing of physicochemical factors: The effect of different values of temperature, salinity, and pH on protease produced by the isolates was determined. The optimization was of two branches, the first one tested the effect of both acidity and temperature, while the other part of the experiment studied the effect of both salinity and temperature.

1-Isolates under combination of different pH and temperature values:

The fourteen isolates were tested under a combination of different values of pH (9-12) simultaneously with four temperatures (40, 50, 55, and 65 °C).

2- Isolates under combination of different salinity and temperature values:

Isolates were tested under a combination of different values of salinity (6, 8, and 10%) simultaneously with 4 temperatures (40, 50, 55, and 65 °C).

RESULTS

Identification of strains

Fourteen different isolates were identified, seven strains were belong to the genus *Bacillus*, four strains were belong to the genus *Staphylococcus*, other strains were *Aerococcus viridians*, *Kocuria kristinae*, and a Gram negative bacillus strain.

Protease production under standard conditions

Isolated bacterial strains were screened for the ability of protease production. Strains that form a clear zone around the colony were considered as

protease forming strains. After identification, strains were cultured on traditional medium (Skim milk agar) under standard conditions (pH 7, 37 °C and 5% of NaCl concentration). The isolated strains showed different results of hydrolysis, ranged from 7 mm to 35 mm, all isolates showed convergent clear zones (20- 35mm) but two exceptions, *Bacillus licheniformis* 10 mm and *Bacillus pumilus* 7 mm (table 1).

Table (1): Diameter of clear zone for isolated strains grown on skim milk agar under standard conditions

Name of strain	Diameter of clear zone (mm)
<i>Aerococcus viridians</i>	35
<i>Bacillus carboniphilus</i>	20
<i>Bacillus cereus</i>	35
<i>Bacillus coagulans</i>	35
<i>Bacillus licheniformis</i>	10
<i>Bacillus mycoides</i>	30
<i>Bacillus pumilus</i>	7
<i>Bacillus smithi</i>	30
Gram negative bacillus	20
<i>Kocuria kristinae</i>	35
<i>Staphylococcus carnosus</i>	35
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	35
<i>Staphylococcus sciuri</i>	30
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	35

Protease production under different values of pH and temperature

Only 7 isolates out of total 14 isolates were able to produce protease under given values of pH and temperature. Bacterial isolates showed different responses of protease production. With the existence of three exceptions: *Bacillus cereus*, *Bacillus smithi*, and *Kocuria kristinae*, it was clear that the production of protease was affected by the high temperature, especially at 65 °C and less effect with 55 °C. Temperature of 40 and 50 °C were suitable for moderate production of protease; all isolates gave a moderate production with at least 3 values of pH. Most of isolates gave high responses with pH 9 and temperature of 40 and 50 °C. *Bacillus carboniphilus* showed a high response (marked with +++) with pH 12 and temperature of 50 °C. *Kocuria kristinae* showed the best response due to the high tolerance of temperature represented in high production at three values (40, 50, 55 °C) as shown in table (2).

Protease production under different salinity and temperature

Under relatively high salinity and given temperatures, only three isolates were able to produce protease. The production was limited to 50 and 55 °C, and one strains (*Bacillus pumilus*) showed highest production in pH 10 and temperature of 50 °C. The Gram negative bacillus strain showed a moderate response at 50 °C only, but with all given values of salinity (table 3).

Table (2): Production of protease against a combination of pH and temperature

Strain	pH	Temperature (°C)			
		40	50	55	65
<i>Bacillus carboniphilus</i>	9	++	++	++	-
	10	++	++	++	-
	11	++	++	++	-
	12	-	+++	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	9	+++	+++	++	++
	10	++	++	++	++
	11	++	++	++	-
	12	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	9	++	++	-	-
	10	++	++	-	-
	11	++	++	-	-
	12	-	++	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	9	+++	++	++	-
	10	++	++	++	-
	11	++	++	++	-
	12	++	++	-	-
<i>Bacillus smithi</i>	9	++	++	++	++
	10	++	++	++	++
	11	++	++	-	-
	12	-	-	-	-
<i>Kocuria kristinae</i>	9	+++	+++	+++	++
	10	++	++	++	++
	11	++	++	++	-
	12	-	-	-	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	9	++	++	-	-
	10	++	++	-	-
	11	++	++	-	-
	12	++	++	-	-

Table (3): Production of protease against a combination of salinity and temperature

Strain	Salinity (%)	Temperature (°C)			
		40	50	55	65
<i>Bacillus pumilus</i>	6	-	++	++	-
	8	-	++	++	-
	10	-	+++	++	-
Gram negative bacillus	6	-	++	-	-
	8	-	++	-	-
	10	-	++	-	-
<i>Kocuria kristinae</i>	6	-	++	++	-
	8	-	++	++	-
	10	-	++	++	-

DISCUSSION

Fourteen strains were isolated from the soil, showed very close dimensions of clear zone (20 – 35mm), in other word, the ability to produce protease was approximately equal among these isolates. Two strains (*Bacillus licheniformis* and *B. pumilus*) showed lower ability (10 mm and 7 mm respectively). The close responses of different strains may be due to the moderate conditions of the natural environment.

Under a range of 9 – 12 pH and 4 values of temperature (40, 50, 55, and 65), only 7 isolates were able to produce protease while others (7 isolates) failed to give such result, the reason behind that might probably due to the genetic factors. The highest production of all isolates was limited in pH 9, this result was similar to that found by Swamy *et al.* (15) and Kumar *et al.* (9), and this may due to the adaptation of isolates with the low alkalinity of the soil resulting from continuous leaching of soil by rain. The best result was achieved by *B. Kocuria kristinae* which was able to produce high quantities of protease in three temperatures 40, 50, and 55 °C while it failed to produce protease in 65 °C. This result was agreed with that found by Bizuye *et al.* (16) and Abdel Nasser *et al.* (17). *Bacillus cereus* also produced high quantities but in short range of temperature (40 and 50 °C only). *Bacillus carboniphilus* and *B. pumilus* showed high production at temperature of 50 and 40 respectively. Other isolates gave moderate results in different values of temperatures.

Under a combination of different values of salinity and temperatures, only three isolates were able to produce protease. Two of the three isolates were able to make protease under different values of salinity in addition of effect of temperature; this result, clearly indicates a good ability to tolerate temperature in addition of high salinity, while the third isolate (the Gram negative bacilli) was able to produce protease under different conditions of salinity with one value of temperature, this result was related with results found by Bizuye *et al.* (16). In general, all the three isolates failed to produce protease in temperature of 40 and 65 °C, the reason behind that may due to the osmotic pressure resulted

from the relative high concentration of salt which inhibit the metabolic processes in the bacterial cell.

Acknowledgements

This work was supported by the Department of Biology/College of Science, University of Soran /Kurdistan/Iraq.

REFERENCES

- Deng A.; Wu J.; Zhang Y. and Zhang G. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. Bioresour. Technol. 101: 7100-7116.
- Rao MB.; Aparna TM.; Mohini GS. and Vasanti DV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635.
- Gaur R.; Tiwari S. and Sharma A. (2014). Isolation and characterization of thermos tolerant alkaline serine protease of *Bacillus* sp. Am. J. Food. Technol. 9(5): 246-256.
- Checkirb D.; Tahar A. and Cochet N. (2009). Acid protease production by isolated species of *Penicillium* sp. Eur. J. Sci. Res. 25: 469-477.
- Patel PR. (1985). Enzyme isolation and purification. In: Biotechnology: Applications and research. Technomic Publishing Co. Inc. USA. Pp.:534-564.
- Rao MB.; Tanksale AM.; Ghatge MS. and Deshpande VV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635.
- Mabrouk SS.; Hashem AM.; El-Shayeb NMA. and Ismail AMS. (1999). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC. Bioresour. Technol. 69: 155-159.
- Kamoun AS.; Haddar A.; Ali NEH. and Basma FG. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiol. Res. 163(3): 299-306.
- Kumar MDJ.; Venkatachalam P.; Govindarajan N. and Balakumaran MD. (2012). Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp.

MPTK 712 Isolated from Dairy Sludge. Global Veter. 8(5): 433-439.

10. Hadder A.; Agrebi R.; Bougatef A. and Himidet N. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. Bioresour Technol. 100(13):3366–3373.

11. Kuddus M. and Ramteke PW. (2009). Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications. Canad. J. Microbiol. 55(11): 1294-1300.

12. Singhal P.; Nigam VK. and Vidyarthi AS. (2012). Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. Int. J. Adv. Biotechnol. Res. 3(3):653-669.

13. Bayoumi RA.; Louboudy SS.; Sidkey NM. and Abd-El-Rahman MA. (2007). Production, purification, and characterization of thermostable alkaline protease under solid state fermentation conditions for application in Bio-detergent technology. Egypt. J. Biotechnol. 25: 111-129.

14. Sanchez-Porro C.; Martin S.; Mellado E. and Ventosa A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol. 94: 295-300.

15. Swamy MK.; Sudipta KM.; Rohit KC. and Purushotham B. (2014). Isolation, screening and optimization of factors effecting protease production from *Comomon askerstersii* KSM7. Sphinxsai. 6(2): 858-867.

16. Bizuye A.; Sago A.; Admasu G. and Getachew H. (2014). Isolation, optimization and characterization of protease producing bacteria from soil and water in Gondar town, North West Ethiopia. Int. J. Bacteriol. Virol. Immunol. 1(3): 020-024.

17. Abdelnasser SSB.; Nefisa MAE. and Sohair SM. (2007). Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian soda lake. J. Appl. Sci. Res. 3(11):1363-1368.

Novel semi-synthetic media for isolation of aerobic actinomycetes

Ashwaq Y. Noori (1) , Huda S. Khuder (2) and Abduljaleel H. Mohammed (1)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences/ Soran University – Erbil (2) Dept. of Microbiology / College of Pharmacy/ University of Tikrit / Republic of Iraq

E-mail: abduljaleelhasan@gmail.com

ABSTRACT

Four semi-synthetic media, Soran F, Soran L, Soran M and Soran FLM, were manually prepared using water sprouts extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), Lentil (*Lens culinaris*), Mung bean (*Vigna radiata*) and equal volumes of these extracts respectively, as sources of carbon, nitrogen and minerals. These extracts were intentionally sterilized in autoclave under 121 °C, 15 psi to denaturize proteins, amino acids and other sensitive nutrients for preparing nutritionally poor media but highly supplied with a variety of minerals enhancing isolation of aerobic actinomycetes. Sterilized extract was separately added to a base medium consists of 1.2 % agar and 0.8 % NaCl. These media were inoculated with one diluted soil sample to detect the selectivity for aerobic actinomycetes. After incubation under 37 °C for 4 -7 days, the four media showed different numbers of isolates as following: 8, 14, 9 and 12 respectively, for the media mentioned above comparing with 2 isolates for nutrient agar. No fungal growth were noticed after 30 days This result indicates high selectivity of both Soran M and Soran F media, which can be increased by adding specific antibacterial antibiotics.

Keywords: Semi-synthetic Media, Sprouts, Aerobic Actinomycetes, Soran Media

الملخص باللغة العربية

تم تحضير أربعة أوساط زرعية سميت سوران F، سوران L، سوران M و سوران FLM والتي تكونت من 50% من مستخلصات مستنبات الحلبة (*Trigonella foenum-graecum*)، العدس (*Lens culinaris*)، فول الماش (*Vigna radiata*)، وبأحجام متساوية لكل منها على التوالي، كمصادر للكربون والنيتروجين والمعادن. تم تعقيم تلك المستخلصات باستخدام جهاز المؤعدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوندا\ انج² لتحطيم البروتينات والأحماض الأمينية والمغذيات الحساسة للحرارة من أجل تحضير أوساط غذائية فقيرة غذائياً، وفي نفس الوقت غنية بالمعادن التي تشجع عزل مجموعة البكتيريا الخيطية. أضيف كل مستخلص بشكل مستقل بالنسبة للأوساط الثلاثة الأولى وبأحجام متساوية من المستخلصات الثلاثة بالنسبة للوسط الرابع إلى وسط أساس مضاعف التركيز يتألف من 0.8 % كلوريد الصوديوم و 1.2 % من مادة الأكار المصلية. لقت هذه الأوساط بمستخلص التربة المخفف لتحديد انتقائية الأوساط المحضرة في عزل البكتيريا الخيطية. أظهرت الأوساط بعد الحضان بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 4-7 يوم قدرتها على عزل أنواع مختلفة من العزلات، وكانت أعداد العزلات كما يأتي: 8، 14، 9 و 12 للأوساط المذكورة أعلاه على التوالي، بالمقارنة مع عزلتين فقط تم عزلهما على وسط الأكار المغذي. لم يلاحظ أي نمو فطري على هذه الأوساط حتى عند تخزينها في الثلاجة لأكثر من 30 يوماً. تشير النتائج إلى انتقائية عالية لوسط سوران M وسوران F، ويمكن زيادة هذه الانتقائية بإضافة مضادات حيوية نوعية لمنع نمو أنواع البكتيريا الأخرى.

INTRODUCTION

The study of microorganisms requires techniques for isolating cells from natural sources and growing them in the laboratory on synthetic media. Thus, development of synthetic culture media and culture techniques has played important roles in the advancement of this field. Media are used for isolate and identify bacteria, reveal their metabolic properties, and allow long-term storage of pure cultures. Media can be classified as simple, complex (or semisynthetic) and synthetic (1). While most of the nutritional components are constant across various media, some bacteria need extra nutrients. Those bacteria that are able to grow with minimal requirements are said to be non-fastidious and those that require extra nutrients are said to be fastidious. Addition of extra nutrients to basal medium makes them enriched media that used to grow nutritionally exacting (fastidious) bacteria (2). Actinomycetes are typically Gram positive, filamentous, some of them are partially acid-fast or branched bacteria (3). It is distinguished from other bacteria by their morphology and slow growth. Actinomycetes are of universal occurrence in nature and are widely distributed in natural and man-made environments. Aerobic actinomycetes are industrially important group have the ability to produce large numbers of biologically active compounds which have important applications like antibiotics, herbicides, pesticides and enzymes (4,5). Most of members belonging to this group can grow on nutritionally poor environments while some of them are fastidious, which need special amino acids for their growth and metabolism (6). In spite of their simple nutritional requirements, they are difficult to directly isolate from their environmental sources in traditional media because they slowly grow that other microbial flora readily grow and overcome them (7). Actinomycetes culture media contain source of carbon, nitrogen and variety of minerals (8). Sprouts are shoots of germinated seeds. They are excellent sources of protein, vitamins, and minerals. The most common types of seeds used for sprouting are alfalfa, mung bean, soybean, lentil, cabbage, radish, and rye seeds. Sprouts have so many valuable attributes: living sprouts are quality food of high bio-photons, which provide a high bio-energetic value, to energize cell and help the entire organism function, and prevent and repair defects. Bio-genic living foods offer the strongest support for the regeneration of cells. Sprouts are a powerful source of antioxidants in the form of the vitamins, minerals and enzymes, which assist in protecting from free radical damage. Raw foods contain oxygen, and sprouts have an abundance of this element. Sprouts provide full of living enzymes, a vital life-force, a good source of protein and essential fatty acids which perform many vital functions. The aim of the present study was to manually prepare media highly enriched with a variety of

minerals enhancing cultivation of aerobic actinomycetes. These media have low content of carbon and nitrogen to prevent flourishing of other rapidly growing microbes (9).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of sprouts: Seeds of fenugreek, mung bean and lentil taken from local markets, were separately put in a glass jar and soaked with water and covered with gauze at room temperature. Seeds were soaked in water for 8-10 hours, washed 2-3 times on next 12 hours and finally stored under darkness for additional 12 hours as described by Shipard (10).

Preparation of sprout extract: One hundred grams of each sprout type were mixed with 200 ml of distilled water by blender for 2 mins. Only fenugreek extract was diluted twice because it was so thick. The extracts were pre-filtered using gauze to get rid of big particles and centrifuged (Thermo Scientific, Germany) for 10 mins. at (8500 rpm), then re-filtered twice with 0.33 mm and 0.15 mm filter papers (11).

Preparation of media: Four types of media, named Soran F, Soran L, Soran M and Soran FLM, were prepared from 50 % of fenugreek, lentil, mung bean and equal volumes of these sprouts extracts respectively, which separately added to a double strength base medium consists of 0.8 % NaCl and 1.2 % agar-agar. The pH of each extract and base medium was adjusted to 7.2 ± 0.2 and then sterilized in autoclave (121 °C, 15 psi) for 20 minutes. Sterilized extracts were mixed with various basal media and used in experiments. Another four media were prepared using same extracts, sterilized with Millipore filter disks (0.22 μ m) added to an autoclaved double strength base agar.

Sampling and culturing: A sample of soil was collected in a clean container from Soran city, in the North of Erbil/ Iraq. One gram of the sample was suspended in 9 ml of normal saline (0.85 % NaCl, w/v) and serially six times diluted using decimal dilutions and cultured using spread-plate method (12). 0.1 ml inoculum from three highest dilutions (10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6}) were spread into surface of each type media already prepared. After incubation at 37 °C for 4 -7 days, all pure cultures were incubated under conditions mentioned above. Those isolates were activated by culturing on nutrient broth and incubated at 37 °C for 18 hours. One loopful from each one was subcultured on Soran media and reincubated under the same typical conditions for their growth.

Screening of Actinomycetes isolates: Colonies grown on each type of media were characterized by macroscopic and microscopic according to Bergey's manual of determinative bacteriology (12). Isolates

with different morphologies have been sub-cultured on nutrient, blood and chocolate agar plates to show their morphological characteristics. Isolates with different Gram stained smears were prepared from purified cultures. The total numbers of colonies grown on each medium type were calculated and the percentage of actinomycetes was determined.

Identification of other isolates: Each isolate identified as Gram-positive cocci, coccobacilli and non-spore forming bacilli were suspended in normal saline (0.45 % NaCl, w/v), adjusted to 0.5 McFarland tube using turbidity meter and identified using BIOMERIEUX VITIK® 2 SYSTEM (France) in Ashti hospital. The isolates were loaded to the GP cards for identification and loaded to the instrument for 10 hrs. (13).

Screening of antibacterial activity: The antibacterial activity of each sterilized extract used in preparation of Soran media was detected against these isolates of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* by agar diffusion method (14).

RESULTS

Harvesting sprouts

Three types of sprouts (Fenugreek, Lentil and mung bean) were prepared and had been ready after 34-36 hours. After specified time, each sprout type showed different lengths of germination tube ranged from 2-5 mm.

Screening of isolated bacteria

The bacterial isolates from dilution of 10^{-4} showed good growth on each of Soran F medium, Soran L medium, Soran M medium and Soran FLM medium after 4 days of incubation under 37 °C. The numbers of bacterial isolates have increased on each medium after 7 days of incubation to 203, 347, 76, and 130 colonies, respectively. Some of colonies were somewhat large and others were very small on the 4th day of incubation. The smallest colonies have enlarged after 7-14 days and their colors have changed. When compared with isolates grown on nutrient agar under the same conditions, there was heavy growth difficult to count. Only seven types of bacteria from dilution 10^{-5} were counted on nutrient agar. These included 1, 2, 2 and 2 of gram-positive staphylococci, spore forming bacilli, actinomycetes and gram-negative bacilli, respectively. All media prepared of extracts sterilized with Millipore filters were heavily contaminated under refrigeration temperature before culturing.

The selectivity of Soran media

The total number of different actinomycetes isolates comparing with total number of isolated bacteria on each culture medium was counted in table (1). Actinomycetes isolates were picked according to the microscopic characteristics of cocci, coccobacilli and filamentous cells with the morphology of colony together. The result showed that Soran M medium and Soran F medium have high isolation capability for actinomycetes than other types. Number of isolates were 9 and 8 respectively. Other two types of Soran L medium and Soran FLM medium showed moderate ability of isolation but when compared with nutrient agar they were much better.

Table (1): numbers of total and actinomycetes isolates

Type of media	Total number from dilution 10^{-4}	Total number of isolates	Number of actinomycetes isolates
Soran F medium	203	9	8
Soran L medium	347	21	14
Soran M medium	76	10	9
Soran FLM medium	130	16	12
Nutrient agar	11*	7	2

*Total number of bacterial isolates on nutrient agar cultured with inoculum from 10^{-5}

A few number of isolates were slowly grown on the four media under study, required approximately 14 - 21 days. These isolates couldn't grow on traditional media like nutrient agar, blood and chocolate agar as shown in table (2). The slowly grown colonies were very small, less than 1 mm in diameter, colored white, yellow and red with round edges. They showed gram-positive irregular cocci clusters and diphtheroids. Those have highly flourished on Soran L medium and Soran M medium rather than other media.

Although the extracts of sprouts showed no antibacterial activity against any of pathogenic isolates, all isolates of pathogenic bacteria couldn't grow on most of Soran Media. Only *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* showed weak growth on Soran L and Soran FLM media.

Table (2): numbers of isolates couldn't grow on traditional media

Media	Nutrient agar	Blood and chocolate agar
Soran F medium	2	1
Soran L medium	10	1
Soran M medium	3	2
Soran FLM medium	2	2

Actinomycetes grown on Soran media

All types of Soran media under study which have been manually prepared showed somewhat high selectivity for isolation of wide numbers of actinomycetes after 4, 7, 10 and more days of

incubation under 37 °C. After identification of non-filamentous isolates using VITIK® 2 SYSTEM the microscopic examination showed different microscopic shapes ranged from irregular diplo or staphylococci, coccobacilli in addition to diphtheroids and rudimentary branched to long filaments as shown in figure (1).

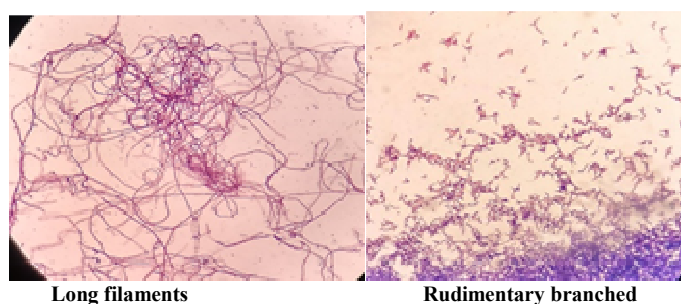


Figure (1): Microscopic appearance of Actinomycetes isolates

The isolates of actinomycetes which have showed filamentous appearance were slowly grown on traditional media and showed wide differences in colony morphologies. These included: mucoid or dried yellow, orange, brown, grey-white and tan pigmented wrinkled with cottony top, chalky, waxy heaped, dried broken, star shape, flower shape, empty sac like, broken eggs like colonies, whitey pink, yellow, orange, and smooth colonies with entire edges.

Gram positive bacteria other than actinomycetes

Other non-actinomycetes gram positive isolates showed good growth on Soran media. The identification of these isolate using VITIK® 2 SYSTEM showed that one isolate was *Granulicatella elegans* that grown on both Soran F medium and Soran FLM medium, two isolates of staphylococci and four isolates of spore-forming bacilli were grown on Soran L medium, one isolate of *Lueconostoc mesenteroides* subspecies *cremoris* was grown on Soran M medium and also four isolates of spore-forming bacilli were grown on Soran FLM medium.

Non -filamentous actinomycetes

One isolate of *Erysipelothrix rhusiopathiae* was isolated on Soran FLM medium. One isolate of

kocuria rosea and *Rhodococcus equi* was isolated on all of Soran media which showed small orange round colonies and whitey pink colonies respectively, when purified on chocolate agar and blood agar. One isolate of *Kytococcus sedentarius* was isolated on both Soran L and Soran M media.

DISCUSSION

When microbial ecologists seek to isolate new bacteria from the environment, they must expertise with many nutrients and growth conditions to culture the newly isolated bacteria in the laboratory. It is often very difficult to replicate bacterial growth conditions in the laboratory (2). Among the soil organisms, actinomycetes as a group of bacteria that are widely distributed and are known to play a very important role in the degradation of organic matter and have the ability to produce a variety of industrially important compounds (15). This group is difficult to be cultivated on traditional media because of their slow growth rate and long generation time even under typical conditions. For this reason, attempts are going on to find new techniques and methods for isolation of this group of bacteria. It should be emphasized that a selective medium for the isolation of actinomycetes does not have to be one on which their growth is luxuriant. It is enough that they grow while bacteria and fungi do

not. It is known that actinomycetes can survive and grow to some extent on very small amounts of nutrients which may be found as impurities in some of the non-nutrient substances such as agar and water agar (5). This explained why the most number of bacteria grown on Soran media were belonging to this group. This was first because the constituting extracts of sprouts were intentionally autoclaved to destroy all carbon and nitrogen sources that may enhance the growth of other microbes. For example, those fungi and true bacteria have readily heavily grown on nutrient agar and overcome actinomycetes isolates. Second, a variety of mineral salts added to selective media support the metabolism of actinomycetes and increase the selectivity. Sprouts have excellent array of minerals necessary for actinomycetes activities and those minerals are heat standing. Analysis had shown the following increases in some ions in mung bean seeds when sprouted: calcium up 34 %, iron up 40 %, phosphorous is up 56 %, potassium up 80%, and sodium 690 % (6). These increases are approximately similar in fenugreek that explained why Soran M and Soran F media showed the highest selectivity. In Soran L medium highest number and wide diversity in microbial content might be belong to much more concentrations of some ions in lentil sprouts which enhance flourishing of wide numbers of microbes as we have gotten. Ions like Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Sodium, Zinc, Copper and Manganese are of double or triple concentrations in lentil than in other two sprouts (16). Although the diversity in microbial content had been noticed in Soran L medium, it was limited to a few staphylococcal strains and more spore forming bacilli. This limitation may be because of the presence of boron in lentil sprouts that inhibited the growth of other bacteria. A recent study had been carried out by Sayin and his co-workers (17) showed that boron and boron compounds have antibacterial effects on several clinical bacterial stains. Also, they found that *Staphylococcus aureus* was the most resistant to these compounds while *Pseudomonas aeruginosa* exhibited a tolerance in some degrees. It is well known that the genus *Bacillus* has big numbers of species living in the soil that can tolerate high concentration of boron (18,19).

As it has been already mentioned in the current text, sprouts are highly enriched with living enzymes predigesting the protein into their constituent amino acids, highly supplied with vitamins and green chlorophyll pigment. Highly enriched media which have been prepared with millipore sterilized extracts explained why those were highly sensitive to contamination with high number of psychrophilic and mesophilic bacteria before culturing. As for fungi which are more abundant in soil, no growth on the four media was noticed, even after more than 30 days of preservation in refrigerator. The reason behind that might be the absence of monosaccharides necessary for their growth (20).

Acknowledgment

We would like to express our deepest appreciation to Department of Biology/ College of Science/ University of Soran for their infinite help. A special gratitude we give to staff of Ashti public hospital for their wonderful assistance.

REFERENCES

1. Abdon DK. and Paulene MR. (2015). Media preparation. University of the Philippines Baguio. Biol. 120: 1-8.
2. Tortura G.; Funke B. and Case C. (2010). Microbiology, An introduction. Benjamin Cummings. 10th ed. Pp.: 164-166.
3. UK Standards for Microbiology Investigations. (2015). Identification of Aerobic Actinomycetes. Public Health England. 10 (2):1-29.
4. Patil SR. (2014). Isolation and Screening of Antibiotic Producing Actinomycetes from Soils in Gulbarga City. Sci Park Res J. 35 (1): 2321-2345.
5. Bizuye A.; Moges F. and Andualem B. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar Town, North West Ethiopia. Asian. Pac. J. Trop. Dis. 3(5): 375-381.
6. Tara DG.; Chringma S.; Vishwanath PA. and Binod L. (2009). Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal J. Sci. Technol. 10:173-182.
7. El-Nakeeb MA. and Lechevalier HA. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. J. Appl. Microbiol. 11:75-77.
8. Odey MO.; Iwara IA.; Udiba UU. and Johnson JT. (2012). Preparation of plant extracts from indigenous medicinal plants. Int. J. Sci. Technol. 12 (1): 65-69.
9. Anat B.; Yuval H.; Erez D. and Daniel K. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. BMC. Syst. Biol. 7:27.
10. Shipard I. (2005). How can I grow and use sprouts as living food. 2nd. Ed. David Stewart, Australia. Pp.: 64-66.
11. Harley JP. and Prescott LM. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology 5th ed. The McGraw-Hill companies. P.: 94.
12. Holt JG. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore. P.: 787.
13. Pincus DH. (2003). Microbial Identification Using The Biomerieux Vitik[®] 2 System. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. bioMerieux, Inc. Hazelwood. MO.USA. Pp.:1-32.
14. Bauer AW.; Kirby WMM.; Sherris JC. and Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 36:493-496.
15. Kalyani ALT.; Savani RKM. and Annapurana J. (2012). Isolation and characterization of antibiotic

- producing actinomycetes from marine soil samples. Int. J. Curr. Pharm. Res. 4 (2):109-112.
16. Aysel K. and Sedef N. (1991). Nutritive value of germinated mung beans and lentils. J. Consumer. Stud. Home Econom. 15: 357-366.
17. Sayin Z.; Ucan US. and Sakmanoglu A. (2016). Antibacterial and antibiofilm effects of Boron on different bacteria. Biol. Trace Elem. Res. 173(1):241-246.
18. Ahmed I.; Yokota A. and Fujiwara T. (2007). A Novel highly Boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov. isolated from soil that requires Boron for its growth. Extremophil. 11(2):217-224.
19. Raja CE1. and Omine K. (2012). Characterization of Boron resistant and accumulating bacteria *Lysinibacillus fusiformis* M1, *Bacillus cereus* M2, *Bacillus cereus* M3, *Bacillus pumilus* M4 isolated from former mining site. Hokkaido, Japan. J. Environ. Sci. Health. Toxic. Hazard. Subs. Environ. Eng. 47(10):1341-1349.
20. Jens LS. and Henriette G.(2013). Influence of carbohydrates on secondary metabolism in *Fusarium avenaceum*. Toxin. 5:1655-1663.

A Study on physiological and hematological parameters in mice *in vivo* following exposure to *Aspergillus fumigatus*

Nagham H. Ali (1) and Anmar S. Hussein (2)

(1) College of Dentistry / University of Tikrit (2) College of Medicine / University of Faluja / Republic of Iraq

E-mail: aloosh2280@yahoo.com

ABSTRACT

The present study was carried out to determine the effect of *Aspergillus fumigatus* on liver function in albino mice. A significant increase ($P \leq 0.05$) was shown in Alkaline phosphatase ALP, Aspartate Aminotransferase AST(GOT) and Alanine Aminotransferase ALT (GPT) levels in mice treated with spore suspension of *A.fumigatus* comparing to control animals. On the other hand, when kidney function was studied an increase in blood urea and serum creatinine levels in treated mice was shown. This increment correlated with the dose of spore suspension exposure time in comparison with control group.

The effect of *A. fumigatus* on hematological parameters clearly demonstrated a decrease in hemoglobin concentration (Hb), Packed Cell Volume (PCV), White Blood Cells(WBCs) and differential count of WBCs.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; Biochemical parameters, COBAS INTEGRA

الملخص باللغة العربية

استهدفت هذه الدراسة التأثيرات على وظائف كبد الفئران من نوع الابينو بعد تعرضها الى فطر اسبريجلس فيوميكيتس. أظهرت النتائج ارتفاع معنوي على احتمال اقل من (0.05) في انزيمات الفوسفات القاعدي واسبارتيت ايمونوتراس فيرريز وكذلك الانيلين ايمونوتراس فيرريز القاعدي في الفئران التي تعرضت لسبورات الاسبريجلس فيوميكيتس مقارنة مع الفئران التي لم تتعرض للفطر. من ناحية أخرى أظهرت نتائج وظائف الكلى زيادة في اليوريا والكرياتينين بالفئران التي تعرضت للفطر مقارنة بالتي لم تتعرض. وجد ان هناك علاقة بين الجرعة ووقت التعرض بين المجموعة المعالجة ومجموعة السيطرة، كما أوضحت الدراسة بان هناك نقص في الهموكلوبيلين والخلايا المضغوطة وعدد كريات الدم البيضاء وكذلك أنواع الخلايا لهذه الكريات.

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus known as *filamentous fungus* belong to class Eurotiomycetes (1) is globally ubiquitous and a cosmopolitan (2). Colonies of *A. fumigatus* shows typical blue-green surface pigmentation with a suede-like surface consisting of a dense felt of conidiophores (2). Serum alkaline phosphatase (ALP) activity and urea nitrogen were examined After infecting the mice by inoculation with *A.fumigatus* spores Results showed an increase within seven days (3) This is due to the release of enzymes to the serum and increasing serum enzymes activities that was clearly found in animals with nasal aspergillosis. One of the extrolites associated with conidiospores, such as gliotoxin has effects in the initial lung infection process (4). In most cases in an aging infected lactating alpaca In infected camels with *A.fumigatus*, [reached 83.2 ± 36.6 IU/L (normal value 64.16 ± 8.13 IU/L)] (5). Haematological examination of *A.fumigatus* spores inoculated goats with Intravenous (I/V) inoculation revealed significant decrease of haemoglobin concentration (6). In dogs infected with *A.fumigatus* spores, haemoglobin(Hb), haematocrit(Htc) and albumin values decreased, haematuria was observed

in all dogs, and protein urea in some within seven days (4). Administred camels with GT for 3 consecutive days resulted in significantly difference from the control by a decrease in the concentration of blood albumin and α -globulin (7). The present study was designed to investigate some biochemical changes in mice as compared with control after exposure to *Aspergillus fumigatus*.

MATERIALS AND METHODS

Laboratory animals: A total number of 20 male Albino mice of ages (6–8) weeks old which were obtained from the (National Center of Researches and Drugs Monitor in Baghdad) were adapted for two weeks in Biotechnology Research Center/ Al Nahrain University before starting experiment by rearing in separated, cleaned and disinfected cages, they were fed on commercial assorted pellets and tap water.

Experimental design: Twenty Albino mice were randomly divided into 8 groups and treated as in figure (1).

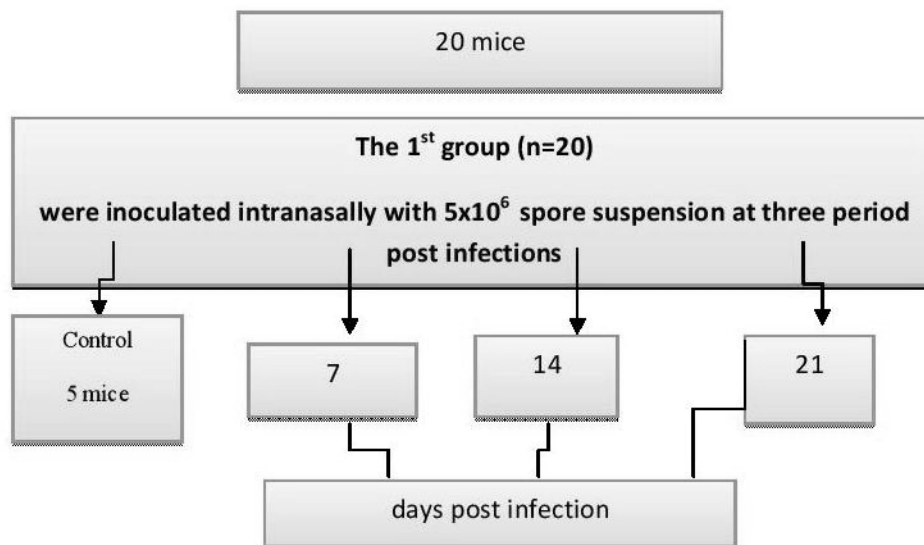


Figure (1): Experimental design of Physiological and Hematological parameters study

The 1st group (n=20) were inoculated intranasally with 5×10^6 conidia in 20 μ l of PBS-0.01% Tween 20 (8). Five mice per group were sacrificed after 7, 14 and 21 days post infection. Control group mice were immunosuppressed with hydrocortisone and inoculated intranasally with 20 μ l PBS-0.01% Tween 20 (9).

Blood Collection: Mice were anesthetized with chloroform following 7, 14 and 21 days after

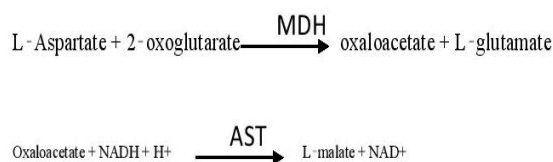
exposure and 1 ml of blood was directly drawn from the tail vein using 1 ml syringe (triplicate animals). Blood was divided into two tubes (0.5 ml for each tube). An EDTA coated tube (anticoagulant) was used for hematological analysis, and the other tube was left for about 30 minutes, and then centrifuged at 800 g for 10 minutes. Serum was transferred to 1 ml Eppendorf tube using micropipette, and then kept according to (10) in deep freezer -30 until biochemical and immunological analyses were improved.

Physiological tests: Liver functions (Alkaline phosphatase ALP, Aspartate Aminotransferase AST (GOT) and Alanine Aminotransferase ALT (GPT) and renal functions (serum creatinine and Urea) were assayed on an automated biochemical analyser COBAS INTEGRA® 400 plus in hematology laboratory of Ministry of Health/ central laboratory by using kits provided from Bioneer Company.

Liver function tests:

A) Aspartate Aminotransferase AST (GOT) - Pyridoxal phosphate activated:

Test principle: Method was according to the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)(if36549g),



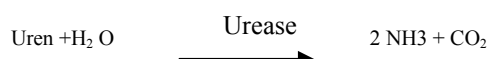
The rate of the NADH oxidation is directly proportional to the catalytic AST activity. It is determined by measuring the decrease in absorbance at 340 nm. (9).

B) Alanine Aminotransferase ALT(GPT) - Pyridoxal Phosphate Activated: Method was demonstrated according to the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) (10). The rate of the NADH oxidation is directly proportional to the catalytic ALT activity. It is determined by measuring the decrease in absorbance at 340 nm. (9).

C) Alkaline phosphatase determination (ALP): It was determined by measuring the increase in absorbance at 409 nm (9).

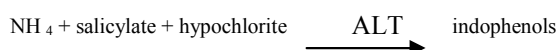
Renal functions

A) Blood urea: In enzymatic colorimetric test, urease cleaves Uren to form Ammonia and carbondioxide.



In an alkaline media, the ammonium ions react with salicylate and hypochlorite to form green colored indophenols (2, 2- dicarboxylindophenol).

The reaction was catalyzed by sodium nitroprusside.



B) Creatinine:

Test principle: This kinetic colorimetric assay is based on the Jaffé method. In alkaline solution, creatinine forms a yellow-red complex with picrate. The rate of dye formation is proportional to the creatinine concentration in the specimen.



Hematological tests: Hb, PCV, WBCs and differential count of WBCs were determined using the fully automated ABX Pentra DX 120+ Analyser in central laboratory/ Ministry of Health.

Hematological parameters : haemoglobin concentration hb), packed cell volume, white blood cells WBCs and differentiated count of wbc were determined by that whole blood was immediately analyzed for complete blood picture, that were : Hb, PCV, WBCs and diff. count of WBCs using the fully automated ABX Pentra DX 120+ Analyser in central laboratory/ Ministry of Health.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of *Aspergillus fumigatus* on physiological parameters in mice

Liver functions : The effect of *A. fumigatus* in liver functions including (Alkaline phosphatase ALP, Aspartate Aminotransferase AST(GOT) and Alanine Aminotransferase ALT (GPT)) in albino mice were studied. Results indicated that all the three enzymes were significantly higher ($P \leq 0.05$) (table 1), in mice treated with *A.fumigatus* comparing to control animals. The results showed high elevation in enzymes levels with the increasing of time. These results were in agreement with many previous studies applied on *A.fumigatus* spores infected animals, serum ALP activity was increased in infected dogs within 7 days (3), while Muntz, (1999) found prominent increasing in AST activity in most cases of an aging infected lactating alpaca (*Lama pacos*) with the same mold. This enzyme AST was also elevated in infected camels with *A.fumigatus* from 64.16 ± 8.13 IU/L (normal value) to 83.2 ± 36.6 IU/L (5). The increase of liver enzymes strongly in serum depend on the degree of damage in and alteration in organ tissues, the more elevation in serum enzymes activities the more decline in tissues enzymes activities this is due to release of enzymes to the serum and that clearly found in animal with nasal aspergillosis such as mouce one of the extra metabolites which associated with conidiospores, such as *A.fumigatus* has effects on liver enzymes (6).

Table (1): Effect of gliotoxin on biochemical parameters (Liver functions) in BALB/c mice

Liver Functions	Treatment groups			
	C	7 days	14 days	21 days
Serum Alkaline phosphatase (ALP) IU/ml	50.6±0.88	54.12±1.2	64.1±0.88	90.33±1.45
Serum AST(GOT) IU/ml	188.67±1.63	250.878±0.6	255.08±1.46	278±1.56
Serum ALT(GPT) IU/ml	65.9±0.99	71.55±1.45	79.9±0.88	82.80±1.76

Each value expressed as Mean ± Standard Error (S.E) of three replicates

C = Control (mice without treatment). * = Significant ($P \leq 0.05$)

Kidney functions : It was found that there was an increase in blood urea and serum creatinine levels in treated mice (table 2) . This increase was related to spore suspension dose and exposure time which explains the variations between treated and control animals. A prominent decrease in kidney creatinine

kinase activity was shown in mice infected with *A. fumigatus* conidia (6). High values of blood urea and creatinine seem to be the result of kidney damage and renal dysfunction obtained under the effect of mycotoxins.

Table (2): Effect of *A.fumigatus* on Biochemical parameters (Renal functions) in mice

Groups	Treatment groups	
	Blood Urea (mg/dl)	Serum Creatinine(mg/dl)
C	12.9±0.64	0.22±0.01
7 days	14.20±0.70	0.45±0.17
14 days	15.04±0.68	0.87±0.01
21 days	19.33±1.59	0.92±0.01

Each value expressed as Mean ± Standard Error (S.E) of three replicates

C = Control (mice without treatment).

* = Significant ($P \leq 0.05$).

Effect of *A.fumigatus* on hematological parameters in mice

The estimated value of Hb and PCV seem to have decreased after 7, 14, 21 days of exposure to *A.fumigatus*. ; whereas, an increase in total WBCs and differential count of WBCs was recorded as compared with control.

These results were in agreement with other studies on infected animals with *A.fumigatus* such as (10) who revealed a significant decrease of hemoglobin concentration in experimental goats infected with *A.fumigatus* spores (Intravenously) and (4) who found that haemoglobin (Hb) and haematocrit (Htc) values decreased within seven days in infected dogs inoculated with *A.fumigatus* spores.

A.fumigatus was known to reduce blood proteins after intravenous administration to camels for 3 days associated with a significant decrease of blood albumin from 3.55±0.21 to 2.4 ±0.15 g/dl and α -globulin from 0.92± 0.07 to 0.7±0.05 g/dl as compared to control (10).

The total count of WBCs number showed increased by increasing the concentration of dose and the period of exposure time as shown in table 3, that the total leukocytes count were increased. These results referred to the acute effect of *A.fumigatus* and its secondary metabolites in blood, the increasing of

total leukocytes means high inflammatory and immune response with these healthy mice.

In vitro using of secondary metabolite of *A.fumigatus* caused increasing in the percentage of lymphocyte growth inhibition for sample GT treatment to 87.45% (11). The biological activity of *A.fumigatus* mycotoxin is dependent on the presence of a strained disulfide bond which can react with accessible cysteine residues on proteins (12, 13).

REFERENCES

1. O'Gorman CM.; Fuller HT. and Dyer PS. (2008). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 457 (7228): 471- 475.
2. Al Hizab F.(2014). *Aspergillus fumigatus* infection among Dromedary camels in Saudi Arabia. Adv. Anim. Vet. Sci. 2 (4): 218-221.
3. Bakker AJ. and Mücke M. (2007). Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin. Chem. Lab. Med.45(9):1240-1243.
4. Cam U.; Atasever A.; Uyanik F. and Psou KS.(2003). Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in dogs and treatment with itraconazole. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27: 1147-1158.

5. Ellis D.; Davis S.; Alexiou H.; Handke R. and Bartley R.(2007). Description Of Medical Fungi. 2nd ed. The National Library Of Australia Cataloguing - In Publication Entry: University Of Adelaide.Australia.
6. Hurne AM.; Chai CLL. and Waring P. (2000). Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by reversible formation of an internal disulfide bond induced by the fungal toxin gliotoxin. J. Biol. Chem. 275: 25202-25206.
7. Joo YD.; Kang CW.; An BK.; Ahn JS. and Borutova R.(2013). Effects of ochratoxin a and preventive action of a mycotoxin-deactivation product in broiler chickens . Vet. Ir. Zootechn. Vet. Med. Zoot. T. 61 (83):179-183.
8. Lieberman MA. and Marks AD. (2008). Basic medical biochemistry : clinical approach. Lippincott Williams and Wilkins. 3rd. ed. P.:1024.
9. Mandal PC. and Gupta PP. (1993). Experimental *aspergillosis* in goats: clinical, haematological and mycological studies. Zentralbl. Veterinarmed. B. 40(4):283-286 .
10. Nouri MA. (2014). Study toxicity effects of Gliotoxin produced by *Aspergillus fumigatus* using solid state fermentation. MSc. Thesis. College of Science. University of Baghdad. Iraq.
11. Shafiq SA. and Al-Joofy AK. (2010). Histopathological and enzymatic study on the effect of *Aspergillus fumigatus* in mice. J. Fac. Med. Baghdad. 52(4): 480-483.
12. Shathele MS. (2011). Fungal Mycotoxin (Gliotoxin) immunomodulating effects on one-humped camel(*Camelus dromedarius*) in Al-Ahsa, Saudi Arabia. Asian. J. Anim. Sci. 10: 23-39.
13. Tietz NW. (1995). Clinical guide to laboratory tests. 3rd. ed. Pp.:622-625.

Comparison between Western blotting and six commercial kits used for detection of Cytomegalovirus IgM

Faiza L. Tuama (1), Atheer AR. Al-Douri (2), Faisal G. Nasser (1), Deena M. Ahmed (1), Mysoon Anwar Hussian (1) and Aliaa H. Lafi (1)

(1) Dept. of virology / General Viral Infections Lab. / Central Public Health Laboratory/ Ministry of Health, Baghdad (2) College of Veterinary Medicine / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: aaldouri96@yahoo.com

ABSTRACT

Western blotting (immunoblotting) with proteins separated from purified human cytomegalovirus (HCMV) particles (viral WB) has repeatedly been shown to be a reliable and sensitive method for detecting HCMV specific immunoglobulin-M(IgM). The aim of the present work was to determine whether IgM detected by viral WB correlates with virological diagnosis better than conventional enzyme immunoassay (EIA).

Two hundred and fifty serum samples were obtained from congenital children for the presence of human cytomegalovirus (HCMV)-specific IgM with five different commercially available EIA kits, VIDAS and Western blotting (WB) test. The CMV antigens were used in the diagnostic IgM western blot are novel recombinant fusion proteins of established immunogenic polypeptides of CMV structural and non-structural proteins.

The results obtained indicated that the WB test combines high specificity (91.4%) with high sensitivity (97.2%), characteristics that, in combination, have not been obtained with any of the other tests (ELISA kits, one of which has been proved to be sensitive but nonspecific and the other of which was found to be specific but not sensitive). Therefore WB can be used as a serological test for the detection of infection with CMV, and unlike an ELISA, allows for the detection of specific antibodies.

Keywords : Western blotting (immunoblotting), enzyme immunoassay (EIA), CMV, ELISA.

الملخص باللغة العربية

لقد أثبتت الدراسات أن طريقة الفحص المناعية (western immune-blotting) مع البروتينات التي تم فصلها بنقاء من جزيئات الفيروس المضخم للخلايا البشرية (HCMV) والتي تسمى Viral-WB وتكرر العمل هي وسيلة يمكن الاعتماد عليها نظراً لحساسيتها للكشف عن الجلوبولين المناعي المحدد للفيروس المضخم للخلايا (HCMV-IgM). هدف هذه الدراسة إلى تحديد الطريقة الأفضل للكشف عن الجلوبولين المناعي بواسطة Viral-WB وارتباطها بالتشخيص الفيروسي ومقارنتها بطريقة الإليزا التقليدية (EIA).

تم فحص مئتين وخمسين نموذجاً من أطفال مشوهين خلقياً للكشف عن وجود الجلوبولين المناعي المحدد للفيروس المضخم للخلايا (HCMV-IgM) بخمسة عدد تشخيصية (EIA) متوفرة تجارياً إضافة لعدة الفحص (VIDAS). ثم تم فحصها بطريقة غرب المنشاف (WB) Western blotting (test).

مستضدات الفيروس المضخم للخلايا المستخدمة في عدة التشخيصية غرب المنشاف للجلوبولين المناعي (WB-CMV-IgM) هي البروتينات المثلى والموتلفة مختبرياً والمكونة من متعدد الببتيد المناعي وتتألف من البروتينات الهيكلية والغير هيكلية للفيروس المضخم للخلايا. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن اختبار WB يجمع بين خصوصية عالية (91.4 %) مع حساسية عالية (97.2 %)، وبمقارنة هذه الخصائص التي حصلنا عليها مع جميع الفحوصات، لم نحصل على مثل هذه النتائج مع أي من الاختبارات الأخرى (عدد الإليزا : أحدها أظهرت ذات حساسية عالية ولكن ذات خصوصية واطنة وعدد أخرى أظهرت العكس تماماً). ولهذا طريقة WB يمكن أن تستخدم بمثابة اختبار مصلي للكشف عن الإصابة بفيروس CMV ، و خلافاً للإليزا ، الذي يسمح فقط للكشف عن الأجسام المضادة.

INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (HCMV) is responsible for severe and often life-threatening infections in immune-compromised patients, such as transplant recipients and patients with AIDS. Furthermore, it may cause severe sequel in newborns after prenatal transmission. Intrauterine primary infections are second only to Down's syndrome as a known cause of mental retardation. Less severe complications are the results of secondary infections (1-5).

Diagnosis of HCMV infection can be obtained by direct demonstration of the virus or virus components in pathological materials or indirectly through serology (6,7). Diagnosis of primary HCMV infection is accomplished exclusively by serological methods i.e., demonstration of the appearance of antibodies to HCMV in a previously sero-negative subject. In the absence of sero-conversion, diagnosis can be made by testing serum samples for the presence of HCMV-specific immunoglobulin M (IgM). HCMV-specific IgM is a sensitive and specific indicator of primary HCMV infection in immune-competent subjects (8,9).

Immunoglobulin M (IgM) to human cytomegalovirus (HCMV) can be detected by a variety of different procedures, but detection has been hampered by technical problems causing inter-assay variability. The most widely used procedure for IgM detection is enzyme immunoassay (EIA) (9-11). Many different assays for HCMV IgM are commercially available, but poor agreement has been found among the results obtained by testing different kits (12,13). HCMV-IgM can be detected by a variety of different procedures, enzyme immunoassay (EIA) being the most widely used. Many different

HCMV IgM EIAs are commercially available for detection of serum IgM. Unfortunately, poor agreement has been found among the results obtained with different kits when the same population of sera was tested (12,14). Western blots (immune-blot) (WBs), which contain proteins from purified viral particles (viral WBs) have been shown to be a reliable and sensitive method of detecting HCMV-specific IgM (1,6,14). However, virological diagnosis, i.e., the direct demonstration of the presence of the virus or viral components (mainly the viral genome and viral antigens) in pathological materials, continues to be the reference procedure for the determination of an active HCMV infection (6,16,17).

The present study aimed to know how well the results obtained with this WB, which is in agreement with very well with virological test results, would agree with the results obtained from a consensus of different HCMV IgM tests. In the present work, a comparison of the WB with six commercially available kits for the detection of HCMV specific IgM were achieved.

MATERIALS AND METHODS

Specimen: A total of 250 serum samples were obtained from symptomatic babies in the age group under one year exhibiting different congenital anomalies. Serum samples were sent to Central public health laboratories from other Baghdad hospital laboratories for diagnosis and confirmation of the presence of HCMV-specific IgM. Samples were stored frozen at -20°C until tested.

Serology: The evaluation of anti-HCMV IgM was carried out in parallel with conventional EIA (conv-EIA) (13,19), and viral western blot (WB) (17). For conv-EIA, the anti-HCMV/IgM kit (Viracell/Granada/Spain) was used. The assay was performed as suggested by the manufacturer, and results for the plates were determined with a micro EIA automatic reader (Human, Germany).

HCMV serologic testing was done by following methods. (i) the convEIA was done with the following commercial kits: CMV IgM ELISA (Viracell/ Granada/Spain), CMV-IgM EIA test (Biorex diagnostics/Antrim/United Kingdom), EIA CMV IgM (Foresight/ San Diego/ USA), EIA CMV-IgM (Bio Check/ Foster city/ USA), CMV IgM ELISA (Adaltis S.r.l, Milano/ Italy), ELIFA CMV IgM (BIOMERIEUX SA/ LYON, France), All tests were performed and the results were interpreted as suggested by the manufacturers. (ii) For the WB was done with CMV IgM Blot 3.0 (MP Diagnostics/ St Ingbert/ Germany), the nitrocellulose strips are incorporated with three separated bound CMV antigenic proteins which are genetically engineered. As check for serum addition and procedural accuracy, an anti-human IgM control is included in the strips. The CMV antigen bands are polypeptide 38(p38) (43kd), polypeptide 52 (p52)[kilo Dalton 38 (38kd)], and p150 (22kd) , these are novel recombinant fusion proteins of established immunogenic polypeptides of CMV structural and non-structural proteins. The original polypeptides pp 38 and pp150 are structural proteins whereas pp52 is a major non-structural DNA-binding protein known to have a high specificity for IgM reactivity in patients with primary CMV infection. The test was performed and the results were interpreted as suggested by the manufacturers. Individual nitrocellulose strips were incubated with diluted serum and plasma controls. As a check for serum addition and procedural accuracy , an anti-human IgM control is included in the strip. Specific antibodies to CMV, if present in the specimens, will bind to the CMV proteins on the strips. The strips were then washed by remove the unbound materials. Antibodies that bind specifically to the CMV proteins can be visualized using a series of reaction with goat anti-human IgM conjugate with alkaline phosphatase and the substrate, BCIP/NBT. Then, the viral WB was interpreted as. A serum specimen was considered positive by WB if an antibody reaction was observed with one or more viral proteins with a molecular mass of 150, 52, or 38

kDa. A serum specimen was considered negative by WB if no anti-body reaction was observed or if an antibody reaction was observed only with proteins with molecular masses other than 150 or 38 kDa.

RESULTS

Some representative examples of the reactivity of human sera from congenital children's with the WB are shown in figure (1). The samples in lanes 2 to 6 were positive for HCMV-specific IgM, as at least one reactive band was presented in the viral section and the recombinant section of the blot. The samples in lanes 7 were negative for HCMV-

specific IgM, as no bands were presented in either section of the blot.

Out of 250 serum samples tested by six different EIA kits, only 98 (39.2%) gave identical (positive or negative) results with all of the kits. These serum samples were classified and sent to the laboratory for confirmation, as positive or negative for HCMV specific IgM based on the concordance of results from at least six or more kits. Serum samples with a concordance of results from fewer than six kits were classified as indeterminate. Based on concordance of results from at least four of the six kits, 160 (64%) serum samples were judged positive and 35 (14%) were defined as negative. fifty-five serum samples (22%) giving less than four concordances were defined as IgM indeterminate.

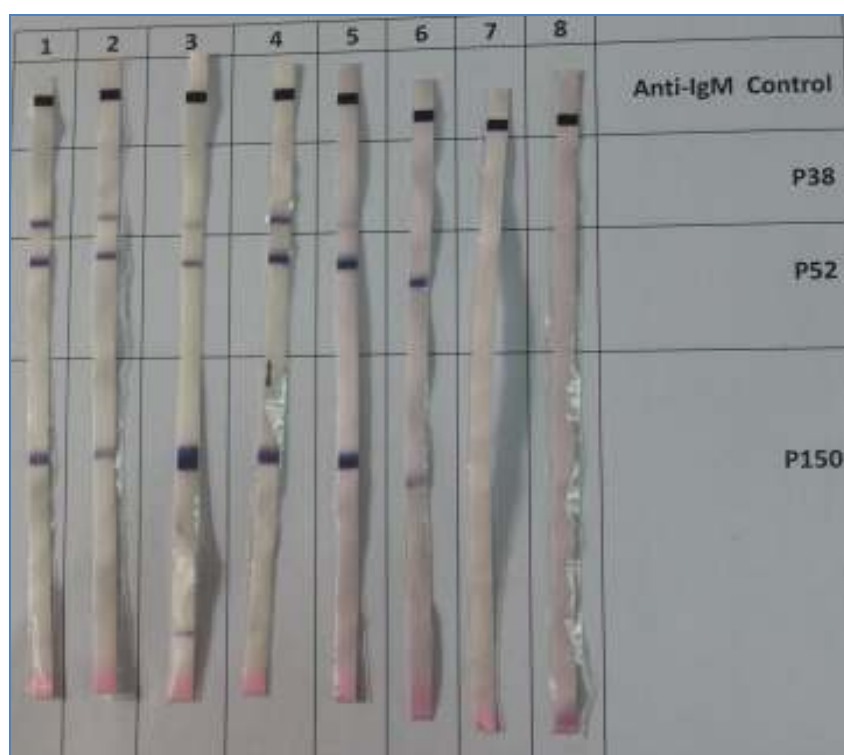


Figure (1): Representative examples of serum reactivity with the WB. Values on the right are molecular weights (10^3) of viral (vp) or recombinant (rp) proteins. Lane 1 is the Positive control and Lane 8 is the Negative control, Lanes 2 to 6 contained IgM-positive sera and lane 7 contained IgM-negative sera from congenital children

Table (1) summarizes the sensitivity, specificity, and overall agreement, as well as false-positive and negative result rates, for each kit determined on the basis of the agreement among at least six kits. Sensitivity ranged from 92.5 to 86.8%, specificity ranged from 86.3 to 60.2%, and overall agreement ranged from 75.2 to 69.2%. These results were in agreement with previous data, demonstrating the detection of HCMV-specific IgM in samples from pregnant women (12).

All of these sera were then tested by WB. the results obtained are shown in table (2). Out of 160 serum

samples that were judged IgM positive by at least four different assays, 127 were positive by the WB. Furthermore, of 35 serum samples that were defined as negative because at least five assays found them negative, the WB detected two positives. Of 55 serum samples that were considered EIA indeterminate, the WB found 35 positive, 15 negative, and 5 indeterminate.

Table (1): Comparison of the results obtained with six EIA kits for detection of HCMV IgM

Assay ^a	Total no. of result		No. of true result		No. of false result		SNC ^b	SPE ^c	Overall agreement(%) ^d
	positive	Negative	positive	Negative	positive	Negative			
1	160	90	110	77	50	13	92.5	60.2	74.8
2	143	107	97	90	46	17	89.4	66.2	74.8
3	145	105	98	75	47	20	87.9	61.5	69.2
4	145	105	100	83	45	22	86.8	64.8	73.2
5	144	106	95	90	41	16	90	64.7	74
6	148	102	100	88	48	14	91.4	86.3	75.2
Total	885	615	600	503	277	102			

a: 1, CMV IgM ELISA (Viracell, Granada, Spain); 2, CMV-IgM ELA test (Biorex diagnostics, Antrim, United Kingdom); 3, EIA CMV IgM (Foresight, San Diego, USA); 4, EIA CMV-IgM (BioCheck, Foster city, USA); 5, CMV IgM ELISA (AdaltisS.r.l, Milano, Italy); 6, ELIFA CMV IgM (BIOMERIEUX SA, LYON, France)

b: SNC, sensitivity. $SNC = \frac{\text{true positives}}{\text{true positives} + \text{false negatives}} \times 100$.

c: SPE, specificity. $SPE = \frac{\text{true negatives}}{\text{true negatives} + \text{false positives}} \times 100$.

d: Overall agreement $= \frac{\text{true positives} + \text{true negatives}}{\text{total number tested}} \times 100$

Table (2): Results obtained by testing 250 serum samples with the WB

No. of positive concordances	ELISA score	No. of samples	No. of WB results		
			Positive	Indeterminate	Negative
6	Positive	71	69	2	0
5	Positive	43	28	10	5
4	Positive	46	30	14	2
Total		160	127	26	7
3	Indeterminate	30	20	2	8
2	Indeterminate	25	15	3	7
Total		55	35	5	15
1	Negative	8	1	1	6
0	Negative	27	1	0	26
Total		35	2	1	32

From these results, the sensitivity and specificity of the WB tests were calculated relative to the consensus. The sensitivity and specificity of the WB were 97.2 and 91.4% respectively. Therefore, the WB combines high sensitivity with high specificity, characteristics that are mutually exclusive with the other commercially available tests. Furthermore, the results obtained with the WB agreed with the results of the consensus of six commercially available HCMV IgM assays.

DISCUSSION

The present study was conducted to compare six commercially available kits used in detection of HCMV, one of which has been proved to be sensitive but nonspecific and the others were found to be specific but not sensitive (table 1). Results obtained were similar to another study conducted in Italy (19), testing sera from pregnant women, and found sensitivity ranged from 30.5 to 88.6%, specificity ranged from 54.4 to 100%, and overall agreement ranged from 56.4 to 76.2%. The study observed that only 98 (39.2%) gave identical (positive or negative) results with all of the kits. These findings were in accordance with other studies from USA and Italy (8,10,17). Another

study conducted by Lazzarotto *et al.* (12) found that 37(36.6%) gave identical (positive or negative) results with all of the kits after tested for (HCMV)-specific IgM with nine commercially kits.

The second part of our study consisted of using the WB in combination with a consensus of the six commercially available ELISAs in searching for CMV-specific IgM in sera from patients whose clinical conditions were known. In a congenital cytomegalovirus, the western blot detected three cases (8.6%) while with ELISAs, were with misdiagnosis. The sensitivity of the WB with respect to the consensus of six ELISAs was 97.2% and the specificity is 91.4%. Therefore, WB combines high sensitivity with high specificity characteristics that are mutually exclusive with the other commercially available tests.

In this study a comparison of the WB with six commercially available kits for the detection of HCMV specific IgM. CMV IgM western blot was achieved test for detection of CMV-specific IgM, which contain structural viral proteins purified from viral particles and recombinant structural and nonstructural proteins obtained by molecular biology known to have a high specificity for CMV reactivity in patient with primary CMV infection, therefore WB can be used as a serological test for the detection of infection with CMV, and unlike an

ELISA, allows for the detection of specific antibodies (6,20).

Although detection of the virus in pathological material should always be considered the “gold standard” for identification of acute HCMV infection, there are several reasons for inability to detect the virus. For example, intermittent virus shedding, virus elimination by a different route, improper storage of pathological material, etc. Therefore, a serological gold standard will be important (7,9,17).

CONCLUSION

The WB test can be used as a benchmark for the performance of HCMV IgM serological assays for the detection of infection with CMV and hence as a useful tool for the development of more reliable immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM. Furthermore, our results indicated that WB might be useful in several cases as most WB-false-positive sera are easily recognized as reacting exclusively with polypeptides 150. The unique reactivity to pp 150 is not being among the WB profiles of WB-true-positive sera. Nevertheless, 12.8% of sera remained CMV-IgM-indeterminate. This result is combined with the good correlation of the WB to virologic test results, and established the WB as a benchmark for performance of HCMV IgM serological assays.

A large-scale screening of patients who are also monitored virologically is necessary to determine whether the WB can be considered a reference standard for HCMV IgM serologic tests.

REFERENCES

1. Basson J.; Tardy JC. and Aymard M. (1989). Pattern of anti-cytomegalovirus IgM antibodies determined by immunoblotting. A study of kidney graft recipients developing a primary or recurrent CMV infection. *Arch. Virol.* 108:259–270.
2. Boland GJ.; deGast GC.; Hene´ RJ.; Jambroes G.; Donckerwolcke R. and Mudde GC. (1990). Early detection of active cytomegalovirus (CMV) infection after heart and kidney transplantation by testing for immediate early antigenemia and influence of cellular immunity on the occurrence of CMV infection. *J. Clin. Microbiol.* 28:2069–2075.
3. Dolan J.; Briggs JD. and Clements GB. (1989). Antibodies to cytomegalovirus in renal allograft recipients: correlation with isolation of virus. *J. Clin. Pathol.* 42:1070–1077.
4. Faiza LT.; Atheer AA.; Faisal GN.; Deena M.; Gassam A.; Mysoon A. and Nehad S. (2013). Congenital cytomegalovirus infection in symptomatic infant in Baghdad and surrounding area. *J. Sci. Technol. (IJST).* 8(2):80-85.
5. Jiwa NM.; Gemert GW.; Raap AK.; Van der Rijjke FM.; Mulder A.; Lens P F.; Salimans MMM.; Zwaan FE.; Dorp WV. and der Ploeg MV. (1989). Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplant.* 48:72-76.
6. Landini MP. and Ripalti A. (1982). A DNA-nicking activity associated with the nucleocapsid of human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 78:351–356.
7. Marsano L.; Perrillo RP.; Flye MW.; Hanto DW.; Spitzer ED.; Thomas JR.; Murray PR.; Windus DW.; Brunt EM. and Storch GA. (1990). Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 161:161-165.
8. Nielsen CM.; Hansen K.; Andersen HMK.; Gerstoft J. and Vestergaard BF. (1987). An enzyme labelled nuclear antigen immunoassay for detection of cytomegalovirus IgM antibodies in human serum: specific and nonspecific reactions. *J. Med. Virol.* 22:67–76.
9. Stagno S.; Tinker MK.; Elrod C.; Fucillo D.; Cloud G. and O’Beirne AJ. (1985). Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 21:930–935.
10. McMahon CA.; Dock NL.; Lentz EB.; Forbes BA.; Reinitz ER. and Lamberson HV. (1989). Detection of cytomegalovirus-specific IgM in renal transplant recipients. *J. Clin. Lab. Anal.* 3:350–354.
11. Vornhagen R.; Hinderer W.; Sonnebor HH.; Bein G.; Matter L.; Jahn G. and Plachter B. (1995). The DNA-binding protein pUL57 of human cytomegalovirus is a major target antigen for the immunoglobulin M antibody response during acute infection. *J. Clin. Microbiol.* 33:1927–1930.
12. Lazzarotto T.; Dalla Casa B.; Campisi B. and Landini MP. (1992). Enzyme linked immune-adsorbent assay for the detection of cytomegalovirus-IgM: comparison between eight commercial kits, immunofluorescence and immunoblotting. *J. Clin. Lab. Anal.* 6:216–218.
13. Vornhagen R.; Plachter B.; Hinderer W.; Van Zanten J.; Matter L.; Schmidt C. A.; Sonneborg HH.; Matter L. and Jahn G. (1994). Early sero-diagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 32:981–986.
14. Maine GT.; Lazzarotto T.; Chovan LE.; Flanders R. and Landini MP. (1996). The DNA-binding protein pUL57 of human cytomegalovirus: comparison of specific immunoglobulin M (IgM) reactivity with IgM reactivity to other major target antigens. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 3:358–360.
15. Gold D.; Ashley R.; Handsfield HH.; Verdon M.; Leach L.; Mills J.; Drew L. and Corey L. (1988). Immunoblot analysis of the humoral immune response in primary cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 157:319–325.
16. Chee MS.; Bankie AT.; Beck S.; Bohni R.; Brown CM.; Cerny T.; Horsnell TC.; Hutchinson

- A.; Kouzarides T. and Martinetti JA. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD 169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154:125–169.
17. Lazzarotto T.; Maine GT.; Dal Monte P.; Ripalti A. and Landini MP. (1997). A novel Western blot test containing both viral and recombinant proteins for anticytomegalovirus immunoglobulin M detection. *J. Clin. Microbiol.* 35:393–397.
18. van Loon NM.; Hessen FWA.; van der Logt JTM. and van der Veen J. (1981). Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labeled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 13:416–422.
19. Lazzarotto T.; Maine GT.; Dal Monte P.; Frush H.; Shi K. and Landini MP. (1996). Detection of serum immunoglobulin M to human cytomegalovirus by Western blotting correlates better with virological data than detection by conventional enzyme immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:597–600.
20. Landini MP.; Lazzarotto T.; Maine GT.; Ripalti A. and Flanders R. (1995). Recombinant mono- and poly-antigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 33:2535–2542.

Seropositive of cytomegalovirus in myocardial infraction patients in Baghdad

Maha F. Al-melan

Dept. of Basic Sciences / College of Dentistry / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ijst.jordan@yahoo.com

ABSTRACT

This study was conducted to find a possible association between *Cytomegalovirus* and Acute Myocardial Infarction (AMI) in conjunction with risk factors. A total of 200 sera were collected from 100 patients' diagnosed as AMI and similar number of healthy control whose age and sex were matched. The prevalence of *anti-Cytomegalovirus* IgG and IgA antibodies were performed using enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA). Measuring of C-reactive protein (CRP) by qualitative and semi quantitative method and lipid profile were estimated by enzymatic methods.

The seroprevalence of IgG anti- *Cytomegalovirus* antibodies were detected in 95% of patients compared to 91% in control, which was statistically non- significant ($p=0.268$). No significant difference was found in the prevalence of IgA Anti- *Cytomegalovirus* infection as compared to control group. C-reactive protein was positive in almost all cases of AMI, and negative in control group. Statistical analysis detected no difference in the level of CRP in AMI patients seropositive to *Cytomegalovirus*.

The results revealed that there was a highly significant association between seropositive to *Cytomegalovirus* in AMI patients with age.

Keywords : NDV, Chicken, Pigeon, Sequence

المخلص باللغة العربية

تأتي هذه الدراسة كمحاولة لإيجاد العلاقة بين الفيروس المضخم للخلايا مع احتشاء العضلة القلبية وارتباطها مع عوامل الضراوة. ولتحقيق هدف الدراسة، تم جمع عينات من مصل الدم من 100 مريض مشخص بإصابته باحتشاء العضلة القلبية، مقارنة مع نفس العدد من أشخاص أصحاء الذين كانوا مماثلين للمجموعة المرضية من حيث العمر والجنس.

تمت دراسة انتشار الأجسام المضادة نوعي IgG ، IgA باستخدام (EliSA)، وقياس CRP بواسطة طرق نوعية و شبه كمية وتقييم الدهون بالطرق الإنزيمية.

لوحظ الانتشار المصلي للأجسام المضادة IgG للفيروس المضخم للخلايا في 95% من المرضى مقارنة مع 91% من الأشخاص الأصحاء ، وهذه النسبة لم تكن ملحوظة إحصائياً $p=0.268$.

كما لم يلاحظ فرق بانتشار الأجسام المضادة نوع IgA بين المصابين بالفيروس المضخم للخلايا مقارنة مع مجموعة الأصحاء. أظهرت النتائج أن CRP كان إيجابياً في أغلب المصابين باحتشاء العضلة القلبية، بينما كان سلبياً في مجموعة الضبط. وقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود اختلاف بمسئوى CRP بين الإيجابية المصلية للفيروس المضخم للخلايا.

وبهذا تستنتج الدراسة بأن هناك علاقة قوية بين الإيجابية المصلية مع الفيروس المضخم للخلايا وعامل العمر.

INTRODUCTION

Cardiac and cerebral vessel diseases are the main causes of death in developing countries by pathogenesis of atherosclerosis (1).

The most common risk factors for atherosclerosis process which cause coronary heart diseases (CHD) include diabetes, dyslipidemia, hypertension and smoking (2). Along with the known risk factors of Coronary Artery Disease (CAD), certain bacterial and viral infections as present suspicious risk factors (3). Recent studies on Myocardial infarction, have shown direct and indirect biological or biochemical effects of *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* and *Cytomegalvirus* (CMV) on atherosclerosis process (4- 6). *Cytomegalvirus* is a member of the family *herpesviridae* *complet*. CMV particles have diameters of 120-200 nm and consist of a core containing double strands linear DNA, icosahedral capsid and a surrounding envelope. Many genetically variants of CMV are circulating in human population. CMV is very species specific and cell type specific (7,8).

The infectious theory of atherosclerosis was suggested by several scientists in past. Both antigens and nucleic acids sequences of CMV were detected in smooth muscle cell from carotid artery plaques and polymerase chain reactions demonstrated CMV DNA in arterial samples from patients with atherosclerosis (9,10). The aim of study was to correlate the risk factor of cytomegalovirus to acute myocardial infarction in Iraqi patients visiting specialist hospital in Baghdad.

MATERIALS AND METHODS

Patients' group: A total sample of 100 patients with AMI who admitted to the coronary care unit of IBIN Nafis Hospital for Thoracic and Cardiovascular and Surgery in Baghdad, included (68 male and 32 female). Ages of patients were ranged between (33-75) years. All patients were confirmed diagnosed to be AMI by history and ECG changes.

Control group: This group included one hundred persons from Central Public Health Laboratory and Blood Bank. Their age and sex were matched the patients' group.

Sample collection: (10) ml of venous blood were aspirated from patients who were admitted to Coronary Care Unit and from control group after 12 hrs fasting. Each blood sample was centrifuged for 10 min X 3000 rpm; Serum was dispensed into several 0.5ml aliquot. All sera were immediately frozen at - 20 C° till use.

ELISA assay: All sera of patients and control groups were investigated to detect IgG and IgA antibodies to CMV using Kits of enzyme immunoassay (Labsystems Filanda).

Qualitative and semiquantitative determination of CRP: CRP was determined by enzymatic method described by (11).

Lipid profile determination: Cholesterol, triglycerides, HDL and LDL were determined by kits (Biomerieux, France).

Statistical analysis: SPSS program was used. Analysis of qualitative data was assessed by using X²Chi square test and analysis of quantitative data was assessed by using t-test and ANOVA (analysis of variance). level of less than 0.05 was considered as the acceptable level of significant. The strength of association between risk factors studied was measured by Odd Ratio (OR).

RESULTS

The seroprevalence of *Cytomegalovirus* specific IgG antibodies were detected to be positive in 95 (95%) patients with AMI compared with 91 (91%) in the control group. Statistically no significant difference was noticed between the two groups (P= 0.268). The mean of optical density measured at 450 nm was 1.510 (\pm 0.224) and 1.458 (\pm 0.243) in patients and control groups respectively (p=0.122) (figure 1).

Seroprevalence of CMV specific IgA antibodies were observed to be positive in 85 (85%) among patients with AMI compared with seropositivity 81 (81%) of control group. Statistically no significant difference was demonstrated between the two groups (p= 0.128). Mean of optical density 1.431 (\pm 0.296) in patients group while in control group it was 1.366 (\pm 0.305) which is not significant (p=0.128).

Figure (2a) shows the distribution of seropositivity of CMV according to sex and age. A significant effect of age was noticed on the seropositivity (P= 0.005), while no significant effect of sex was noticed.

At the young age group below 50 years only males were related to have AMI and they were seropositive for CMV the presence of male positive cases constitutes the majority at age group (50-54) year reaching 15 (15.7%), 14(15.3%) in patients and control groups respectively. Females constitute the major percentage at age interval between (60-64) year reaching 11 (11.5%), 11(12.5) in patients and control groups respectively (figure 2a and 2b).

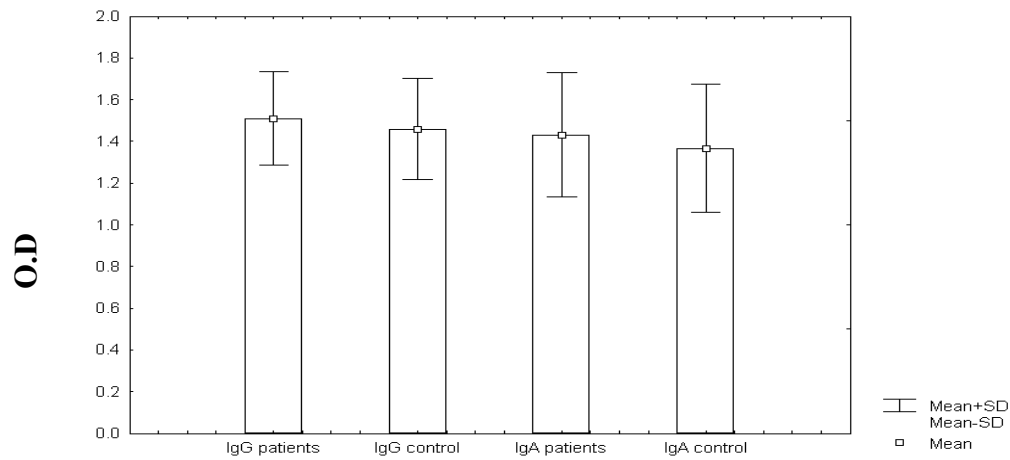


Figure (1): Seropositivity of CMV specific IgG and IgA antibodies in patients and control groups. O.D Optical Density.

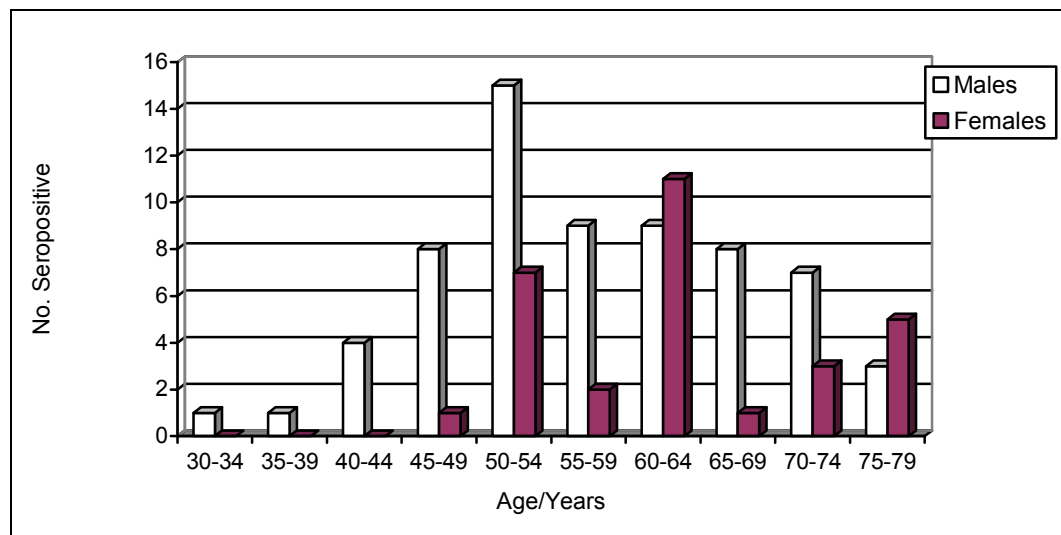


Figure (2a): Distribution of seropositivity of CMV by age and sex in patients group.

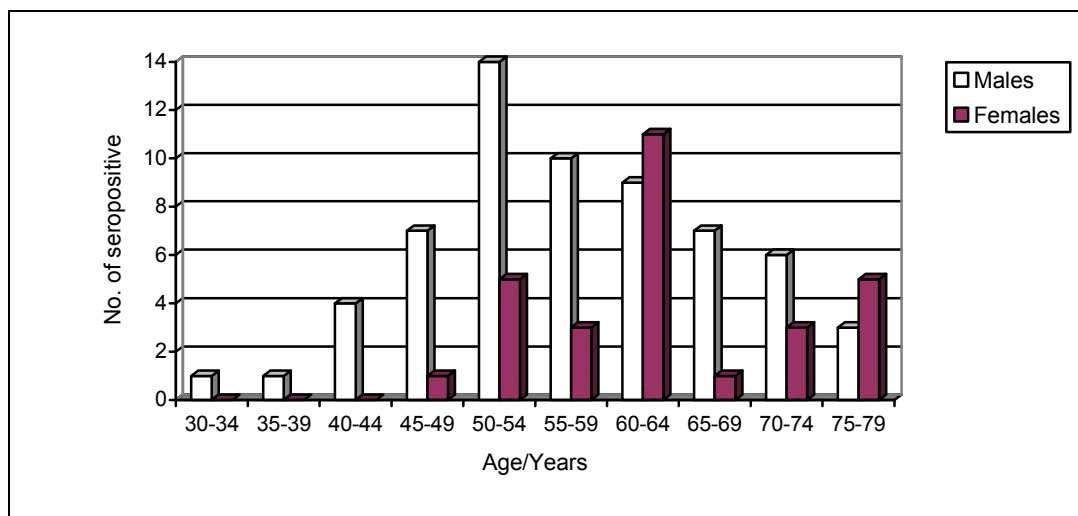


Figure (2b): Distribution of seropositivity of CMV by age and sex in control group.

Table (1) shows the association of CMV seropositivity with risk factors according to the followings:

sex: The prevalence of IgG seropositive to CMV was detected in 60 male and in 30 female. These numbers gave an odd ratio 1.4 and indicated that there is weak association with sex, but is statistically not significant ($P=0.69$).

age: Patients with AMI and seropositivity to CMV in age < 55 years were observed in 37 (38.9%) while in age ≥ 55 years were observed in 58 (61%). The ratio between these age groups and seropositivity is 0.95, which is statistically not significant ($P=0.962$).

Lipid profile:

1-cholesterol: Thirty-seven (38.9%) of patients had a high level of cholesterol and 58 (61%) of seropositive patients were negative. This gave an odd ratio 0.95, which is associated with seropositive and statistically not significant ($P=0.962$).

2- High Density Lipoprotein (HDL): The numbers of seropositive patients with low level of HDL were 46(48.4%). While patients that have high level of HDL were 49 (51.5%). The ratio of discordant pairs gave an odd ratio 0.6 which is statistically not significant ($P=0.614$).

3- Low Density Lipoprotein (LDL): Thirty-six (37.8%) of seropositive patients had a high level of LDL while 59(62.2%) had low level of LDL. This gave an odd ratio 0.91, which is associated with seropositivity, but statistically not significant ($P=0.925$).

4-Triglyceride (male): Thirty-four (52.3%) of seropositive male patients had a high level of triglyceride. Seropositivity were detected in 31 (47.6%) in male patients with low level of triglyceride. This gave an odd ratio 2.1 There is an association with CMV but it's statistically not significant ($p=0.520$).

5- Triglyceride (female): Seventeen (56.6%) of seropositive patients had a high level of triglyceride while 13 (47.6%) had low level of triglyceride. This gave an odd ratio 1.30, which is statistical interval.

Table (1): Association of Cytomegalovirus seropositivity and risk factors in acute myocardial infarction

Prevalence and categories	CMV prevalence No. (%) [*]	Seropositivity univariate OR	P value
Sex Male Female	65 (68.4%) 30 (31.5%)	1.4	$P = 0.69$
Age < 55 ≥ 55	37 (38.9%) 58 (61%)	0.95	$P = 0.962$
Lipid profile 1. Cholesterol 2. HDL 3. LDL 4. Triglyceride(male) 5. Triglyceride(female)	37 (38.9%) 46 (48.4%) 36 (37.8%) 34 (52.3%) 17 (56.6%)	0.95 0.6 0.91 2.19 1.30	$P = 0.962$ $P = 0.614$ $P = 0.925$ $P = 0.520$ $P = \text{Interval}$

^{*}Percentage is out of the total seropositivity ($n=95$)

Almost all cases with AMI were positive for CRP detected by latex agglutination test which is capable of giving positive reading when the levels of CRP exceed 6mg/l.

Figure (3) shows that the majority of patients with AMI had CRP level ranging from 48mg/L(34 patients) to 96 mg/L (35 patients). The mean level of CRP in AMI patients was $33.6(\pm 18.974)$.

The Mean level of CRP in AMI patients was $33.7(\pm 19.67)$ in patients who are seropositive for CMV. Statistical analysis shows no significant different in the level of CRP between CMV seropositivities patients with AMI and those who are seronegative ($P=0.37$).

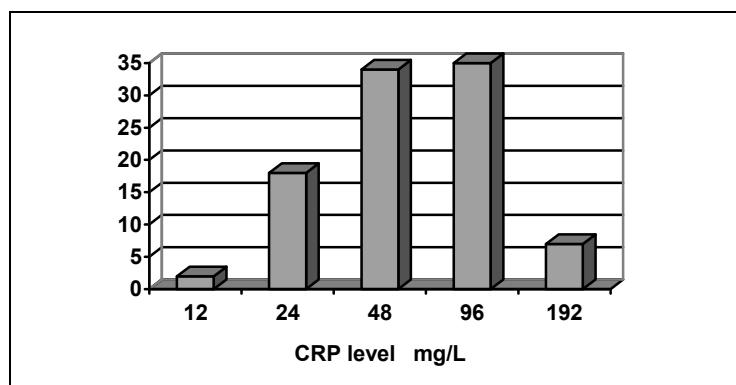


Figure (3): Levels of CRP in patients with AMI.

DISCUSSION

The relation between CMV infection and atherosclerosis was studied by many authors. Different designs were conducted. Histopathological studies had compared the presence of CMV antigen and or nucleic acid in the diseased vessels and in healthy endothelial cells.

Serological studies had focused on the possible difference in the sero-prevalence between patients and healthy persons with controversial results, and if its possible to detect any difference in the seroprevalence in developed countries, where the prevalence of IgG anti-CMV antibodies ranges between 50-70% in the population (11,12), such studies appeared to be inconclusive in developing countries, where the seroprevalence may reach up to 100%, unless unexpected difference in the seroprevalence emerge between patients with coronary heart disease and healthy people.

In the present study, 95% of patients with AMI were seropositive for IgG CMV antibodies compared with 91% in the control group. The difference was statistically not significant. The seroprevalence of IgA CMV antibodies were demonstrated to be positive in 85% of patients with AMI while 81% of control group were positive.

The results in this studies is comparable to other study done in Baghdad by Al-Saffar (13) who found no significant difference in seropositive of IgG antibodies in AMI patients and control groups using ELISA method. He found 98% of patient and control groups were positive.

Previous study in seroepidemiology of CMV infection among healthy Iraqi population found that the prevalence of IgG specific antibodies to CMV were 95% in all age groups and in different socioeconomic status (14).

The obtained results from the present study were in agreement with a study done in abroad where they estimated IgG antibodies against CMV by ELISA to be 84% in ischaemic heart disease and 83% in controls group (15,16). In another study, it was found that the prevalence of IgG antibodies were 84% to CMV among German control group (17),

while (18,19) found that the seropositivity of IgG CMV antibodies were to be (76%) using ELISA.

The results demonstrated that there was no association between seropositivity of CMV and AMI which is comparable to Ossewaarde *et al.*, (20), while another study found weak association (21).

Other workers studied the role of human CMV in atherosclerosis which occur when recently injured blood vessel wall containing smooth muscle cells (SMC), with monocytes being attracted to the site of vascular injury. Subsets of each cell type are depicted as containing latently infected CMV. After vessels injury, CMV is reactivated and expresses its immediate - early genes. The reactivated virus residing in monocytes may infect neighboring SMCs, through multiple cellular mechanisms, including inactivation of P53, the viral protein increase neointimal SMC accumulation (11).

The results revealed that there was no association between CMV infection and other risk factors such as age, sex, and lipid profile.

Our study showed that plasma concentration of C-reactive protein, assayed at the time of hospital admission, could predict the risk of long term ischemic events in patients with a first acute myocardial infraction.

In our study we found that (71.8%) of patients had a high level of CRP exceed 12 mg/L this may be due to an alternative, but not necessarily exclusive explanation for increased CRP level in active CAD myocardial inflammation. It is possible that myocardium repeatedly made ischemic may itself incite an inflammatory response (22). The link between CRP with seropositive to CMV was not detected which supports other studies (19).

REFERENCES

1. Liyod MD.; Adams RJ.; Brown TM.; Carnethon M. and Dais F. (2010). Heart disease and stroke statistics: 2010 up to date. A report from American Heart Association. Circul. 121(7):46-215.

2. Onat A.; Sari I. and Hergenc H. (2007). Predictors of abdominal obesity and high susceptibility of cardio metabolic risk to its increments among Turkish women: a prospective population- based study. *Metabol.* 56(3) :348-356.
3. McDonald K.; Rector TS.; Braunlin EA.; Kubo SH. and Oliver MT. (1989). Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with Cytomegalovirus infection. *Am. J. Cardiol.* 64(5):359-362.
4. Pol ML. (2002). Infections and coronary heart diseases. *Halawa.* 13(73):58-61.
5. Wierzbicki WB. and Haqmeier KO. (2000). *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumonia* and Cytomegalovirus :Chronic infections and coronary heart disease. *Pharmacother.* 20(1):52-63.
6. Xenaki E.; Hassoulas J.; Apostolak S.; Sourvnas G. and Spandidos DA. (2009). Detection of cytomegalovirus in atherosclerotic plaques and nonatherosclerotic arteries. *Angiology.* 60(4):504-508.
7. Brooks A.; Giladi M.; Weinberg M.; Kaplan G.; Pasterrack H.; Laniada S. and Miller H. (1998). High anti –cytomegalovirus IgG antibody titer is associated with coronary heart disease and may predict post coronary balloon angioplasty restenosis. *Am. J. Cardio.* 81:866-868.
8. Bate SL.; Dollard SC. and Cannon MJ. (2010). Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin. Infect. Dis.* 50(11):1439-1447.
9. O Donell CJ. and Levy D. (2000). Weighing the evidence for infection as a risk factor coronary heart disease. *Curr. Cardiol. Rep.* 4:280-287.
10. Epstein SE.; Speir E.; Zhou YF.; Guetta E.; Leon M. and Finkel T. (1996). The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. *Lancet.* 348:S13-S17.
11. Agha WH.; Peter WF.; Martin GL.; Jane CE.; Eric LM. and Philip AW.(2002). The association of seropositivity to *Helicobacter pylori* , *Chlamydia pneumoniae* and Cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40(8):1408-1413.
12. Al-Saffar AA.(2000). Anti-cytomegalovirus IgG antibody titer in patients with myocardial infarction. A Thesis for Iraqi commission for medical specialization in MEDICINE, Baghdad. College of Medicine ,University of Baghdad.
13. Mukhlis FA.; Al-omer LS. and Ayoub NS.(1996). Viral infection in immunocompromised patients. *J. fac. Med. Baghdad .* 38:341-347.
14. Strachan DP.; Carrington D.; Mendall MA.; Ballam L. and Morris J. *et al.*(1999). Relation of *Chlamydia pneumoniae* serology to mortality and incidence of ischaemic hear disease over 13 years in the caerphilly prospective heart disease study. *BMJ.* 318: 1035-1040.
15. Merlin E.; Luzi K.; Suardi E.; Barassi A. and Cerrone M. (2012). T-cell phenotypes apoptosis and inflammation in HIV + patients on virologically effective cART with early atherosclerosis. *PLOS one.* 7(9):e46073.
16. Siscovick DS.; Schwartz SM.; Grayston JT. *et al.*(2000). *Chlamydia pneumoniae*, herpes simplex virus type 1, and *Cytomegalovirus* and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults. *Circul.*102: 23-35.
17. Carlesson J.; Miketics H.; Mueller KH.; Brom J.; Ross R.; Essen RV. and Tebbe U.(1997). Previous *Cytomegalovirus* or *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of restenosis after percutaneous trans luminal coronary anyioplasty. *Lancet.* 350:12-25.
18. Choussat R.; Montalesco G.; Collet J.; Jardal C.; Anki A.; Fillet A.; Thomas D.; Raymond J.; Bastard J.; Probinski G.; Orfila J.; Agut H. and Thomas D.(2000). Effect of prior exposure to *Chlamydia pneumoniae* , *Helicobacter pylori* , or *Cytomegalovirus* on the prognosis of patients with unstable angina pectori or Non Q wave acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 86:379-384.
19. Ossewaarred JM.; Feskence EJ.; Deveris A.; Vallinga CE. and Kromhout D.(1998). *Chlamydia pneumoniae* is a risk factor for coronary heart disease in symptom -free elderly men, but *Helicobacter pylori* and *Cytomegalovirus* are not. *Epidemiol. Infect.* 120:93-99.
20. Gottlieb S.(2002). Greater exposure to viruses increase risk of heart disease. *BMJ .* 324: 133.
21. Berk BC.; Weintraub WS. and Alexander RW.(1990). Elevation of C-reactive protein in active coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 65:168-172.
22. Stowell JD.; Forlin-Passoni D.; Radford K.; Bate SL.; Dollard SC. *et. al.* (2014). Cytomegalovirus survival and transferability and the effectiveness of common hand-washing agents against cytomegalovirus on live human hands. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(2): 455-461.

قسم الدراسات والبحوث العربية

ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION

التأثيرات التطورية السمية لكلوتامات أحادي الصوديوم على النمو والتركيب النسيجي لعدسة العين في مواليد

الفأر الأبيض السويسري *Mus musculus*

ماجدة نوري إبراهيم (1)، سميرة عبد الحسين عبد الله (2)

(1) قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كركوك (2) كلية الطب / جامعة تكريت / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: ibrahimmajeda@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير الجرعات المختلفة من كلوتامات أحادي الصوديوم (MSG) على إحداث التغيرات المرضية النسيجية في عدسة عين مواليد الفئران للأعمار 7-15-21-30-60 يوماً. جرعت الفئران الحوامل من نوع *Mus musculus* فموياً بمحلول يحتوي على (MSG) وبتركيز 2-4-8 غم/كغم من وزن الجسم ابتداءً من اليوم 17 من الحمل. أظهرت الفحوصات المجهرية عدم وجود تغيرات نسيجية في العدسة لمجموعة اليوم السابع، بتركيز 2 غم/كغم، بينما في تركيز 4 غم/كغم لوحظ سواد العدسة وتفكك الألياف المركزية، ونخر وتكثف في الألياف العدسية عند تركيز 8 غم/كغم. أما في مجموعة يوم 15، لم تظهر تغيرات نسيجية في تركيز 2 غم/كغم بينما في تركيز 4 غم ظهر تكثف محفظة العدسة ونخر وتغجي الألياف العدسية. وفي تركيز 8 غم/كغم ظهر نخر في الألياف ونحافة في المحفظة. أما في مجموعة يوم 21 وفي تركيز 2 غم/كغم، ظهر نخر في الألياف وتكثف في محفظة العدسة، كما ظهر نخر في مكونات العدسة في تركيز 4 غم/كغم، بينما في تركيز 8 غم/كغم ظهر سواد العدسة ونخر في الألياف. وفي مجموعة يوم 30، لوحظ نخر وعدم انتظام محيط العدسة ونحافة المحفظة عند تركيز 2 غم/كغم، بينما في تركيز 4 غم/كغم، ظهر انتفاخ وتخلخل في بعض الألياف، وظهور العدسة بشكل بيضوي، وفرط تنسج الخلايا الظهارية. أما في تركيز 8 غم/كغم، ظهر نخر في الألياف وتكثف في المحفظة. وفي مجموعة يوم 60 وبتركيز 2 غم/كغم، ظهر فرط تنسج في الخلايا الظهارية. بينما لوحظ تسمك المحفظة ونخر في بعض الألياف العدسية في تركيز 4 غم/كغم. أما في مجموعة 8 غم/كغم، ظهرت العدسة بشكل غير منتظم مع نخر في بعض أجزائها.

الكلمات المفتاحية: كلوتامات أحادي الصوديوم، عدسة العين، المضافات الغذائية.

The toxic developmental effects of monosodium glutamate on the growth and histological structure of the eye lens in the offspring albino Swiss mouse *Mus musculus*

Majida N. Ibrahim (1) and Sameera A.H. Abdullah(2)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences / University of Kirkuk (2) College of Medicine / University of Tikrit / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present research was aimed to study the effect of different doses of a Monosodium Glutamate (MSG) to cause histopathological changes in the offspring lens for the ages 7, 15, 21, 30, and 60 days. The mothers, type *Mus musculus* mice has been orally administrated from 17th day of pregnancy by different concentrations (2, 4, and 8 g/Kg/ body weight) of MSG using stomach tube. Microscopic examination showed no histological changes in the lens for a seventh day in a concentration of 2 g / kg, but the dissociation of the central fibers, necrosis and condensation in the lens fibers was observed in the concentration of 8 g / kg. In the group of 15 days, no histological changes observed in the concentration of 2 g / kg, but in the concentration of 4 g, these changes observed; condensation lens capsule and necrosis and vaculation lens fibers. While in the concentration of 8 g / kg; necrosis fibers and thinner capsule was observed. Either in a group on 21 and in the concentration of 2 g / kg appeared necrosis in fibers and condensation lens capsule Necrosis appeared in the lens components in the concentration of 4 g / kg, while in the concentration of 8 g / kg appeared the cataract lens and necrosis in fibers. In the group of 30 was observed necrosis and irregular lens circumference and thinner capsule at a concentration of 2 g / kg, while in the concentration of 4 g / kg, swelling and rarefaction some fibers and the appearance of the lens is oval and hyperplasia in the epithelial cells, either in the concentration of 8 g / kg appeared necrosis in fibers and condensation of capsule. In the group Day 60 at a concentration of 2 g / kg appeared hyperplasia in the epithelial cells. Whereas was observed thickening of capsule and necrosis in some fibers lens in the concentration of 4 g / kg, while in Group 8 g / kg lens appeared irregularly with necrosis in some of their parts.

المقدمة

Vaginal plug (20-22). تم عزل الإناث الحوامل التي امتلكت السداة المهبليّة بأقفاص منفصلة مع تدوين تاريخ التزاوج، واعتبر يوم التزاوج هو اليوم صفر من الحمل، واليوم الذي يليه هو اليوم الأول من الحمل (23، 24). استخدمت في هذه الدراسة مادة كلوتامات أحادي الصوديوم Monosodium Glutamate (MSG)، ويسمى أيضاً UMI أو AJI.NO.MOTO أو E-621 وهي بهيئة بلورات بيضاء اللون صغيرة معبئة في أكياس بلاستيكية تزن الواحدة منها 100 غرام تم الحصول عليها من الأسواق المحلية في مدينة كركوك، مصنعة من قبل شركة PT AJINOMOTO INDONESIA المرخصة من شركة AJINOMOTO CO., INC., TOKYO, JAPAN. حضرت الجرع المختلفة من مادة كلوتامات أحادي الصوديوم بتركيز 2-4 غم/كغم من وزن الجسم. أعطيت الجرعة للفئران الحوامل ابتداء من اليوم السابع عشر من الحمل إلى ما بعد الولادة إلى التمثيل في اليوم الحادي والعشرون (25) عن طريق الفم باستخدام أنبوبة المعدة المعدنية Gavage. تم قتل الدروس (الفئران الرضع) بعد تخديرها بالكوروفورم وقطعت رؤوس الدروس بعمر سبعة أيام من منطقة العنق بواسطة مقص حاد، ثم تم قطع منطقة العين من الأمام والخلف بشكل مثلث واستخرجها وتثبيتها. أما الدروس بعمر 15، 21، 30، 60 يوماً، فقد قلعت عيونها بواسطة الملقط، ووضعت في المثبت. تم تثبيت عيون الدروس مباشرة بعد التشريح لمجاميع السيطرة والمعاملة في مثبت الفورمالين الملقط (المعادل) Neutral Formalin ولمدة تتراوح بين 24-48 ساعة، ثم مررت النماذج بسلسلة تصاعديّة التركيز من الكحول الإيثيلي واستخدم الزايلين Xylene لغرض الترويق، ثم طمرت بشمع البارافين. قطعت العينات إلى مقاطع متسلسلة بسك 5µm. استخدم ملون هيماتوكسيلين- هاريس والأويسين اعتماداً على (26، 27). تم تلوين المقاطع النسيجية وفق طريقة (28)، واستخدم DPX لغرض الإرساء. فحصت المقاطع المجهرية باستخدام المجهر الضوئي المركب نوع Japan Olympus، والتقطت صور فوتوغرافية للمقاطع النسيجية الملائمة باستخدام نفس المجهر المزود بكاميرا نوع Futur WinJoe.

النتائج

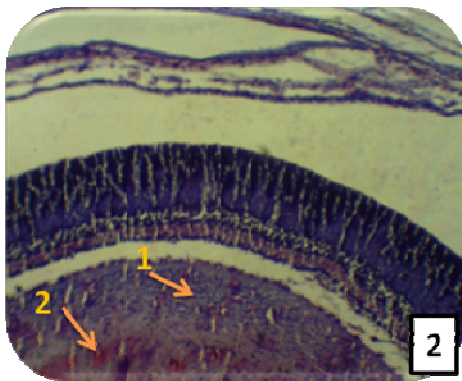
يوضح الشكل رقم (1) تأثير MSG على معدل قطر العدسة (LT) Lens thickness، حيث كان الانخفاض في قطرها معنوياً ($P < 0.01$) في اليوم السابع في التركيزين 4 غم و 8 غم. أما في اليومين الخامس عشر والحادي والعشرين، فكان الانخفاض بين الجرعة غير معنوي مقارنة مع السيطرة. وفي اليوم الثلاثين اختلفت الجرعتين 4 غم و 8 غم معنوياً عن السيطرة. بينما في اليوم الستين، اختلف التركيزان 2 غم و 4 غم معنوياً عن التركيز 8 غم وعن السيطرة. وهذه النتيجة جاءت مقارنة للنتيجة التي توصل إليها (29)، حيث لوحظ في الفئران المعاملة بملح MSG تراجع واضح في نمو العدسة والتي تحاط بمجموعة من الأوعية الدموية بعد الولادة بواسطة الشريان الزجاجي Hyaloids artery (فرع من شريان الشبكية المركزية)، وهي نتيجة غير مباشرة لتلف الشبكية. ففي تلك الدراسة، تم إعطاء 5 ملغم/غم من وزن الجسم من MSG في كل يوم بعد الولادة لخمس مرات للفئران، وعند فحص الفئران بعد ستة أشهر من الولادة ظهر تضيق ملحوظ في أوعية الشبكية.

كلوتامات أحادي الصوديوم Monosodium (MSG) glutamate هو ملح الصوديوم البيلوري لحامض الكلوتاميك $COONa [COOH(CH_2)_2 CH NH_2]$ وهو من الأحماض الأمينية غير الأساسية والأكثر وفرة في الطبيعة، وموجود في معظم الأطعمة التي تحتوي على البروتين (1-3). يعتبر المكون الرئيسي للعديد من البروتينات والبيبتيدات الموجودة في معظم الأنسجة والأعضاء، التي يتم إنتاجها في الجسم، ويلعب دوراً أساسياً في عملية الأيض (4-6). تحتوي جميع الأطعمة تقريباً على الكلوتامات، فهي المكون الرئيسي في العديد من المنتجات الغذائية الغنية بالبروتين سواء بحالته الحرة أو المرتبطة بالبيبتيدات والبروتينات. إذ تتواجد في المنتجات الحيوانية مثل اللحوم، الأسماك، الحليب والأجبان، وفي النباتات مثل الفطر والطماطم (7، 8). وتشير البحوث بأن كلوتامات أحادي الصوديوم له تأثير سمي واسع على مختلف أعضاء الجسم في الإنسان وحيوانات التجارب (9). وقد أظهرت دراسة أجريت لمعرفة تأثير MSG على جردان حديثي الولادة بعد تجريب أمهاتها بتركيز مختلفة ابتداء من يوم الولادة إلى اليوم الحادي والعشرين حصول انخفاض في نمط نمو الجردان الصغار وزيادة في الوزن مقارنة مع مجموعة السيطرة بعد ثلاثة أسابيع (10). إن تحفيز السمية الناجمة عن معاملة حديثي الولادة بكلوتامات أحادي الصوديوم ينتج تأثيراً مرضياً في جسم البالغ، والذي يمكن أن يكون بسبب التغيرات في نفاذية حاجز الدم-الدماغ أو بالعكس (11). لقد أشار العديد من الباحثين إلى أن السمية العصبية للكلوتامات تتميز باعتمادها على الوقت والجرعة لإحداث الضرر بالعديد من مكونات الخلية مؤدية إلى موتها (12، 13). تمتد التأثيرات السمية للكلوتامات أحادي الصوديوم لتؤثر على الجهاز البصري. فهو يؤثر على العدسة lens (14)، الشبكية Retina (15)، والعصب البصري Optic nerve (16). يؤثر كلوتامات أحادي الصوديوم على الأداء البصري في الجردان، وهذا قد يعكس ضعف وظائف الأعضاء البصرية والدماغ (17). وقد وجدت دراسة (14) أن إعطاء كلوتامات أحادي الصوديوم لجرذان بجرعة 5 ملغم/غم من وزن الجسم تحت الجلد في اليوم التاسع والعاشر بعد الولادة أدى إلى تغيرات في شفافية وحجم العدسات في الجردان، ويزداد حدوث الساد (اعتام العدسة أو المياه البيضاء) Cataract مع تقدم العمر، حيث يصل إلى أكثر من 75% في الشهر الرابع من العمر. تم تشخيص كريات مورغاني Morgagni's globules (وهي كريات دقيقة معتمة تتكون من تخثر السوائل بين العدسة والمحفظة) نسيجاً في المنطقة المعتمة من قشرة العدسة الخلفية، ولوحظ تغيرات تنكسية في ظهارة العدسة في الساد الناضج. وقد لوحظت نفس النتيجة في جنين الدجاج من قبل (18). إضافة إلى أن التأثير قد يمتد إلى الساد محدثاً تدميراً كلياً للعدسات (19).

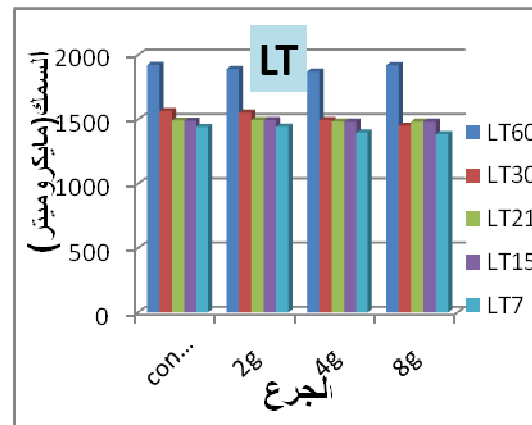
بناءً على ما تقدم، يأتي هذا البحث لدراسة وتقييم التأثيرات التطورية السمية لملح MSG بجرع 2، 4، 8 غم/كغم من وزن الجسم يومياً على عدسة صغار الفئران الرضع، ودراسة التغيرات المرضية النسيجية فيها في الأيام 7، 15، 21، 30 و 60 والجرعة أمهاتها ابتداء من اليوم السابع عشر من الحمل وحتى اليوم الحادي والعشرين بعد الولادة (يوم الفطام).

المواد وطرق العمل

استخدمت في هذه الدراسة الفئران البيض (المهق) السويسرية المنتمية إلى إحدى سلالات فأر البيت الشائع *Mus musculus* Blab/c لإجراء التجارب، وقد تم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية في بغداد. نقلت الفئران إلى غرفة تم إعدادها خصيصاً لتربية الفئران مزودة بساحية هواء تعمل 24 ساعة/اليوم، وذلك لضمان تبدل الهواء على نحو مستمر، ومحرار جوي Thermometer لمراقبة درجة حرارة الغرفة، التي كانت ضمن معدل 25±°، ودورة ضوئية بمعدل 12 ساعة ضوء، و 12 ساعة ظلام يومياً. وأعطيت الحيوانات العليقة الخاصة بتغذية الفئران. تم اختيار فئران بعمر (10-14) أسبوعاً لكلا الجنسين، ومعدل أوزانها 25 غم. وضعت الإناث المهيئة للإخصاب مع الذكور بمعدل اثنين من الإناث مع ذكر واحد في كل قفص خلال ساعات الليل، وتم التأكد من حصول التزاوج في صباح اليوم التالي بملاحظة السداة المهبليّة



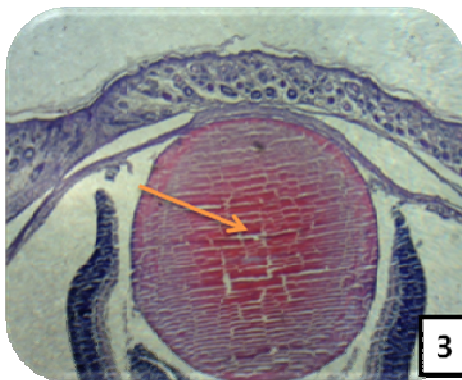
صورة رقم (2): مقطع عرضي في عين درص عمر 7 أيام. الأم مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ فرط تنسج في ظهارة العدسة (1) وزيادة في حامضية بعض مناطق العدسة (2) (ملون H&E. X100).



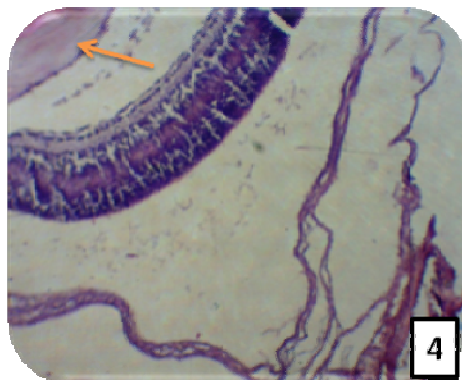
شكل رقم (1): تأثير الجرعة المختلفة من MSG في معدل سمك العدسة (LT) مقارنة مع السيطرة.

أما التغيرات النسيجية المرضية في العدسة، فقد أظهرت المقاطع النسيجية التغيرات التالية:

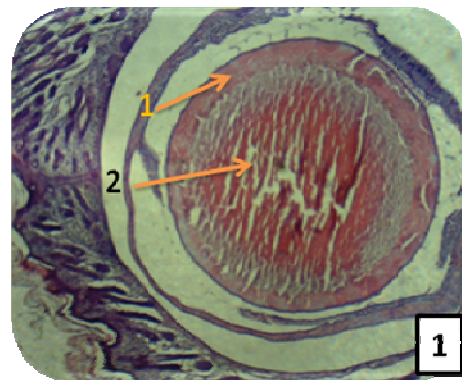
1- مجموعات اليوم السابع بعد الولادة: لم يلاحظ تغيرات نسيجية في مجموعة تركيز 2 غم/كغم من وزن الجسم في العدسة. أما في تركيز 4 غم/كغم، فقد ظهر في هذه المجموعة حدوث ساد العدسة Cataract في المنطقة المحيطة، وتفكك Dissociation في الألياف المركزية للعدسة (صورة رقم 1). وتشير هذه النتائج إلى أن إعطاء MSG يمكن أن يكون عاملاً مسبباً في تشكيل إعتام عدسة العين (الساد) في الفئران النامية، وهذا يتفق مع دراسة (14)، كما ظهر فرط تنسج Hyperplasia في ظهارة العدسة وزيادة في حامضية بعض مناطق العدسة (صورة رقم 2). أما في تركيز 8 غم/كغم، فقد ظهر تكثف Condensation ونخر Necrosis في ألياف العدسة (صورة رقم 3، 4). وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي توصل إليها (30)، من أن MSG يسبب نخر الخلايا العصبية في الأنوية المقوسة تحت المهاد للجردان حديثة الولادة.



صورة رقم (3): مقطع عرضي في عين درص عمر 7 أيام. الأم مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ تكثف في ألياف العدسة المركزية (السهم) (ملون H&E. X100).

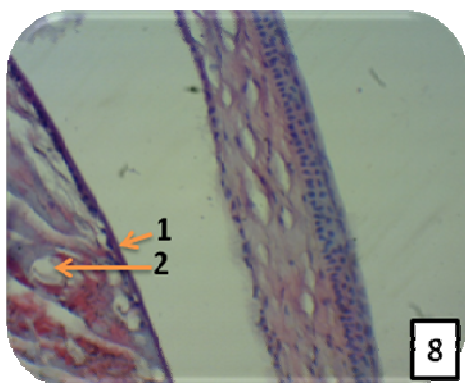


صورة رقم (4): مقطع عرضي في عين درص عمر 7 أيام. الأم مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ النخر في ألياف العدسة (السهم) (ملون H&E. X100).

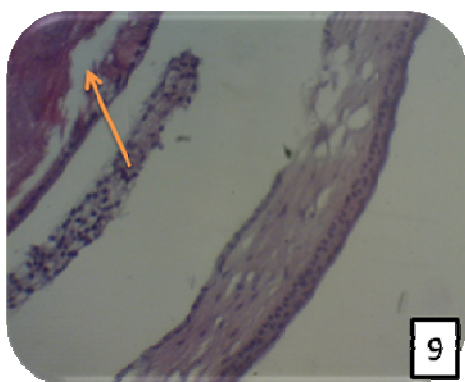


صورة رقم (1): مقطع عرضي في عين درص عمر 7 أيام. الأم مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ حدوث ساد العدسة في المنطقة المحيطة (1) وتفكك الألياف المركزية للعدسة (2) (ملون H&E. X40).

3- مجموعات اليوم الحادي والعشرين بعد الولادة: تظهر النتائج في تركيز 2غم/كغم تكثف محفظة العدسة ونخرا في الألياف العدسية المحيطة (صورة رقم 8). بينما في تركيز 4غم/كغم لوحظ نخر في مكونات العدسة (صورة رقم 9). أما في تركيز 8غم/كغم، فقد بينت المقاطع النسجية وجود تغيرات مرضية كبيرة، إذ لوحظ وجود ساد العدسة ونخر في الألياف المركزية للعدسة (صورة رقم 10). وقد جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما توصل إليه (14)، بأن حالات إعتام عدسة العين تزداد مع تقدم العمر عند استعمال MSG، ولأحظ أيضاً تغيرات تنكسية في ظهارة العدسة في الساد الناضج، بالإضافة إلى تفكك ألياف العدسة ونخر بعضها ونحافة بعضها الآخر (صورة رقم 11). لوحظ في نموذج آخر فرط تنسج في ظهارة العدسة مع استسقاء Edema ونخر في بعض الألياف العدسية (صورة رقم 12) وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكرته دراسة (11)، من أن MSG هو محفز السمية الأكثر استخداماً لوصف العملية وتحسين فهم الطرق التي تربط هذه العملية بعدة حالات مرضية للجهاز العصبي المركزي، وأن تحفيز السمية الناجمة عن علاج حديثي الولادة بملح MSG ينتج تأثيراً مرضياً في جسم البالغ، والذي يمكن أن يكون بسبب التغيرات في نفاذية حاجز الدم - الدماغ أو بالعكس.

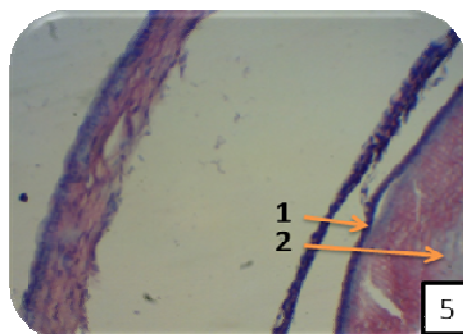


صورة رقم (8): مقطع عرضي في عين درص عمر 21 يوماً. الأم جرعة بمقدار 2غم/كغم/يوم. لوحظ تكثف محفظة العدسة (1) ونخر في الألياف العدسية المحيطة (2) (ملون H&E .X200).

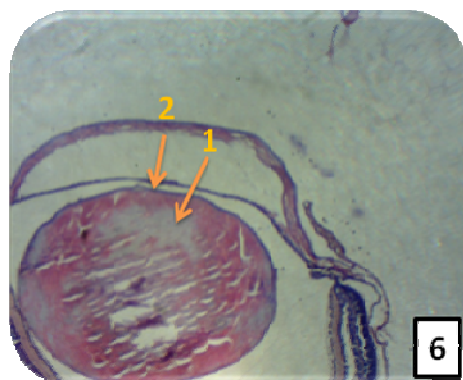


صورة رقم (9): مقطع عرضي في عين درص عمر 21 يوماً. الأم جرعة بمقدار 4غم/كغم/يوم. لوحظ نخر في مكونات العدسة (السهم) (ملون H&E .X200).

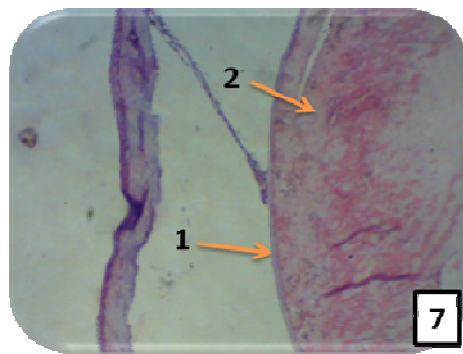
2- مجموعات اليوم الخامس عشر بعد الولادة: لم تظهر تغيرات في تركيز 2غم/كغم. أما في تركيز 4غم/كغم أسفرت التغيرات النسجية عن تكثف محفظة العدسة وتنفج في الألياف العدسية (صورة رقم 5). وظهرت العدسة إهليلجية الشكل مع وجود نخر في بعض ألياف العدسة وتكثف محفظتها (صورة رقم 6). وقد جاءت هذه النتيجة مقاربة للنتيجة التي توصل إليها (14)، بأن حجم ووزن العدسة أصغر بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. في مجموعة 8غم/كغم أوضحت الفحوصات المجهرية نحافة محفظة العدسة ونخرا في الألياف العدسية المحيطة (صورة رقم 7). وتتفق هذه النتيجة تتفق مع نتائج دراساتي (31، 32)، في أن معاملة صغار حديثي الولادة MSG تسبب موت الخلايا العصبية في مناطق معينة من الجهاز العصبي المركزي مثل النواة المقوسة arcuate nucleus، وخلف المخيخ postrema والشبكية.



صورة رقم (5): مقطع عرضي في عين درص عمر 15 يوماً. الأم جرعة بمقدار 4غم/كغم/يوم. تكثف محفظة العدسة (1) وتنفج في الألياف العدسية (2) (ملون H&E .X200).

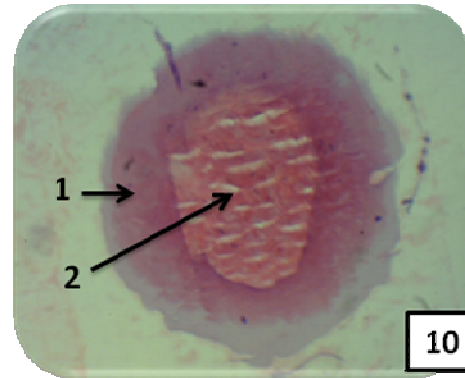


صورة رقم (6): مقطع عرضي في عين درص عمر 15 يوماً. الأم جرعة بمقدار 4غم/كغم/يوم. لوحظ شكل العدسة الإهليلجي ونخر في بعض أليافها (1) وتكثف المحفظة (2) (ملون H&E .X40).

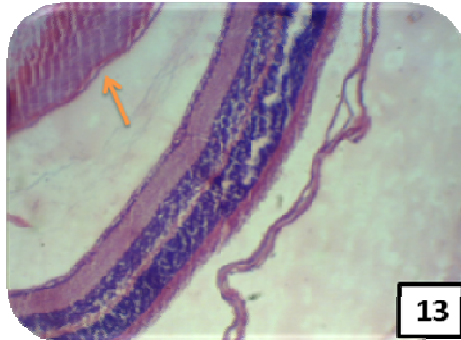


صورة رقم (7): مقطع عرضي في عين درص عمر 15 يوماً. الأم جرعة بمقدار 8غم/كغم/يوم. لوحظ نحافة محفظة العدسة (1) ونخر في الألياف العدسية المحيطة (2) (ملون H&E .X100).

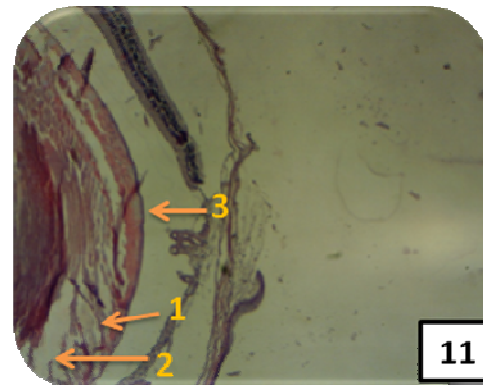
بيضاوي مشوه ، وفراط تنسج للخلايا الظهارية للعدسة، مع تكثف المحفظة ونخر في بعض الألياف العصبية (صورة رقم 16) . وهذا يتفق مع ما لاحظته كل من (30، 35)، من أن استخدام MSG يسبب نخرًا في الخلايا العصبية في الأنوية المقوسة لتحت المهاد عند الجرعات العالية لجرذان حديثي الولادة. غير أن تأثيرات MSG واسعة، ولا تقتصر على منطقة تحت المهاد. من ناحية أخرى، أظهرت مجموعة 8 غم/كغم تكثفا في محفظة العدسة مع نخر في أليافها (صورة رقم 17). وهذه النتيجة تتفق مع نتائج دراسة (16)، حيث وجد بأن الحقن اليومي للقوارض بكميات أحادي الصوديوم المثيرة للسمية العصبية خلال فترة ما بعد الولادة تستحث إصابات الشبكية و تنكس العصب البصري.



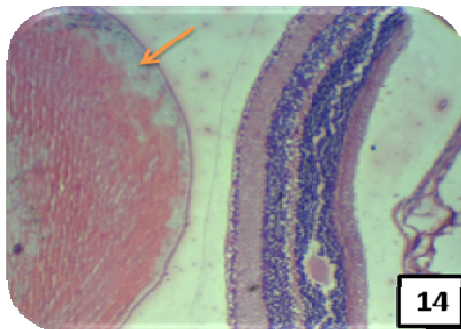
صورة رقم (10): مقطع عرضي في عدسة عين درص عمر 21 يوماً. الام مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ ظهور ساد العدسة (1) ونخر في الألياف المركزية (2) (ملون H&E. X200).



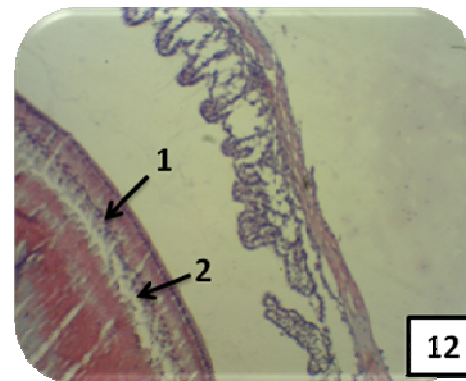
صورة رقم (13): مقطع عرضي في عين فأر عمر 30 يوماً. الام مجرعة بمقدار 2 غم/كغم/يوم. لوحظ نحافة محفظة العدسة وعدم انتظام محيطها (السهم) (ملون H&E. X200).



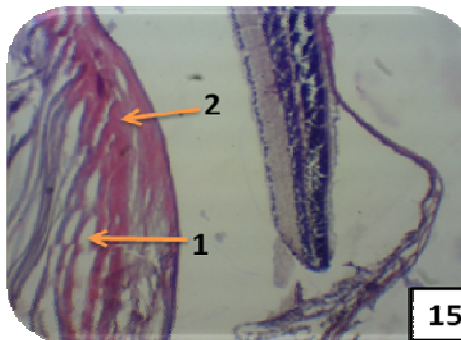
صورة رقم (11): مقطع عرضي في عين درص عمر 21 يوماً. الام مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ تفكك ألياف العدسة (1) ونخر بعضها (2) ونحافة بعضها الآخر (3) (ملون H&E. X200).



صورة رقم (14): مقطع عرضي في عين فأر عمر 30 يوماً. الام مجرعة بمقدار 2 غم/كغم/يوم. لوحظ النخر في محيط العدسة (السهم) (ملون H&E. X100).

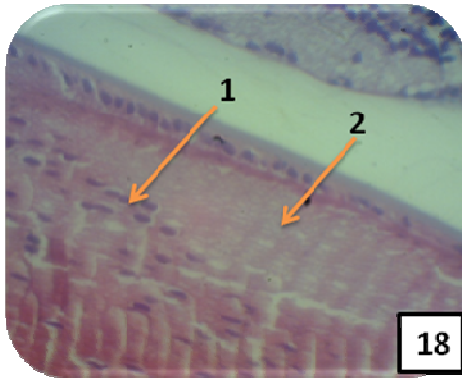


صورة رقم (12): مقطع عرضي في عين درص عمر 21 يوماً. الام مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ فرط تنسج في ظهارة العدسة (1) مع استسقاء ونخر في بعض الألياف (2) (ملون H&E. X100).

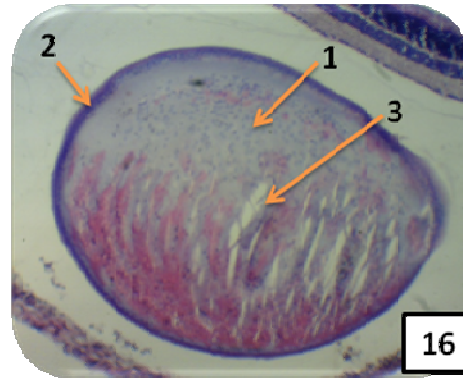


صورة رقم (15): مقطع عرضي في عين فأر عمر 30 يوماً. الام مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ تداخل الألياف العصبية (1) وانتفاخ بعضها ، ووجود منطقة نخر زجاجي في جزء منها (2) (ملون H&E. X100).

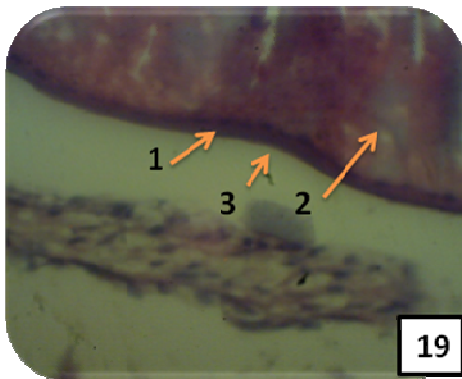
4- مجموعات اليوم الثلاثين بعد الولادة: ظهر في تركيز 2 غم/كغم من وزن الجسم نحافة محفظة العدسة وعدم انتظام محيطها (صورة رقم 13)، ونخر في محيط العدسة. وقد اتفقت هذه النتيجة مع دراستي (33، 34)، في أن معالجة القوارض حديثي الولادة بملح MSG تنتج متلازمة تتميز بتلف الخلايا العصبية للجهاز العصبي المركزي والغدد الصماء (صورة رقم 14). أما في تركيز 4 غم/كغم ، فقد سبب تخرلاً Rarefaction في ألياف العدسة وانتفاخ بعضها وظهور منطقة نخر زجاجي Hyaline necrosis في جزء منها (صورة رقم 15)، كما تسبب في ظهور العدسة بشكل



صورة رقم (18): مقطع عرضي في عينة فأر عمر 60 يوماً. الأم مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ فرط تنسج في ظهارة العدسة (1) وعدم وضوح في الألياف العدسية المحيطة (2) (ملون H&E. X400).



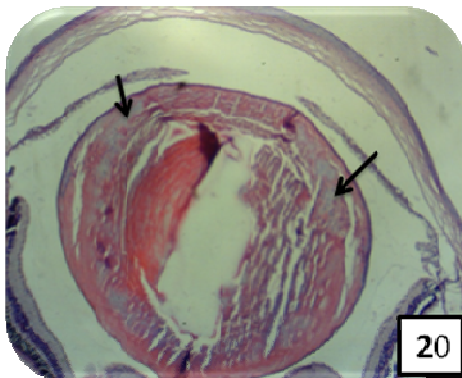
صورة رقم (16): مقطع عرضي في عينة فأر عمر 30 يوماً. الأم مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ ظهور العدسة بشكل بيضاوي وفرط تنسج للخلايا الظهارية للعدسة (1)، تكثف المحفظة (2) ونخر بعض الألياف العدسية (3) (ملون H&E. X40).



صورة رقم (19): مقطع عرضي في عينة فأر عمر 60 يوماً. الأم مجرعة بمقدار 4 غم/كغم/يوم. لوحظ تسمك محفظة العدسة (1) ونخر في بعض الألياف العدسية (2) وعدم انتظام محيط العدسة (3) (ملون H&E. X400).



صورة رقم (17): مقطع عرضي في عينة فأر عمر 30 يوماً. الأم مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. وتكثف محفظة العدسة (1) مع نخر في أليافها (2) (ملون H&E. X100).



صورة رقم (20): مقطع عرضي في عينة فأر عمر 60 يوماً. الأم مجرعة بمقدار 8 غم/كغم/يوم. لوحظ ظهور العدسة بشكل غير منتظم مع نخر في بعض أجزائها (الأسهم) (ملون H&E. X40).

5- مجموعات اليوم الستين بعد الولادة: ظهر في تركيز 2 غم/كغم فرط تنسج الخلايا الظهارية وعدم وضوح في الألياف العدسية المحيطة (صورة رقم 18). أما في تركيز 4 غم/كغم، فقد لوحظ تسمك المحفظة ونخر في بعض الألياف العدسية وعدم انتظام محيط العدسة (صورة رقم 19). وجاءت هذه النتيجة مشابهة لما توصلت إليه دراسة (36)، من أن الدماغ الغير الناضج يكون أكثر حساسية بمقدار أربع مرات للتأثيرات السامة للأحماض الأمينية المحفزة للسمية من الدماغ الناضج. مما يعني أن إصابة المواد المحفزة للسمية ذات أهمية خاصة من مرحلة الجنين إلى مرحلة المراهقة. وهذه النتيجة تتفق أيضاً مع ما ذكره (37)، بأن التعرض المفرط للصرار الحديثي الولادة لملح MSG قد يؤدي إلى التحفيز الزائد وموت الخلايا العصبية خلال النمو. بينما في تركيز 8 غم/كغم، ظهرت العدسة بشكل غير منتظم مع نخر في بعض أجزائها (صورة رقم 20). وهذه النتيجة كانت مقاربة لما لاحظته (29) في دراسته من أن MSG يسبب تراجع نمو العدسة نتيجة لتلف الشبكية الناجم عن تضيق الأوعية الدموية.

- functional consequences on the circadian system. *J. Comp. Neurol.* 338:67–82.
17. Praputpittaya C. and Willilak A. (2003). Visual performance in Monosodium glutamate-treated rats. *Nutr. Neurosci.* 6(5): 301-307.
 18. Grant WM. (1986). *Toxicology of the eye*. 3rd. Baltimore: Springfield, IL: Charles C. Thomas Publisher. P.: 461.
 19. Abd-Allah MM. (2011). Effect of monosodium glutamate on postnatal development of lateral geniculate body and visual cortex in albino rats. Ph.D Thesis. University of Assiut. P.:186.
 20. Rugh R. (1964). *Vertebrate embryology. the dynamic of development*. Chapter 6: The Mouse: Harcourt, Brace and World, INC. New York. Pp.:237- 303.
 21. Rugh R. (1968). *The mouse, its reproduction and development*. Burgess Publishing Co. P.:430.
 22. Ozeki H. and Shirai S. (1998). Developmental eye abnormalities in mouse fetuses induced by retinoic acid. *Japan. J. Ophthalmol.* 42(3): 162-167.
 23. Padmanabhan R.; Singh G. and Singh S. (1981). Malformations of the eye resulting from maternal hypervitaminosis A during gestation in the rat. *Acta. Anatom.* 110(4): 291-298.
 24. Biernacki B.; Wfodarezyk B. and Minta M. (2000). Effect of sodium valporate on rat embryo development in vitro. *Bull. Vet. Int.* 44 : 201-205.
 25. Kohn DF. and Barthold SP. (1984). *Biology and diseases of rats in: Fox JG, editor. Labrotory animal medicine*. Academic Press: Inc.(London) Ltd; Pp.: 95-97.
 26. Carleton MA.; Drury RS.; Wallington EA. and Gameron SR. (1967). *Histological techniques*. Oxford University Press. P.:432.
 27. Luna IG. (1968). *Manual of histological staining methods of the forces institute of pathology*. 3th ed. McGraw-Hill Book, New York. Pp.:5- 35.
 28. Humason GL. (1979). *Animal tissue technique*. 4th ed. W.H. Freeman and company. USA. P.: 569.
 29. Cohen AI. (1967). An electron microscopic study of the modification by monosodium glutamate of the retinas of normal and 'Rodless' mice. *Am. J. Anatom.* 120: 319-356.
 30. Pelaez B.; Blazquez JL.; Pastor FE.; Sanchez A. and Amat P. (1999). Lectin histochemistry and ultrastructure of microglial response to monosodium glutamate-mediated neurotoxicity in the arcuate nucleus. *Histol. Histopathol.* 14(1): 165-174.
 31. Olney JW.; Ho OL. and Rhee V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acid on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14:61-76.
 32. Schelman WR.; Andres RD.; Sipe KJ.; Kang E. and Weyhenmeyer JA. (2004). Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Mol. Brain Res.* 128:160–169.
 33. Tóth L.; Karcasu S.; Feledi J. and Kreutzberg GW. (1987). Neurotoxicity of monosodium-L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta. Neuropathol.* 75:16-22.
 34. Sun YM.; Hsu HK.; Lue SI. and Peng MT. (1991). Sex-specific impairment in sexual and ingestive behaviors of monosodium glutamate-treated rats. *Physiol. Behav.* 50:873-880.
 1. Rankin I. (2010). *Monosodium glutamate: an assessment of health implications in human and animal studies*. Senior research thesis. Wofford College, South Carolina. USA. P.:54.
 2. Kingsley OA.; Jacks TW.; Amaza DS.; Tarfa M.; Peters AT. and Otong ES. (2013). The effect of monosodium glutamate (MSG) on the gross weight of the heart of albino rats. *Sch. J. App. Med. Sci.* 1(2):44-47.
 3. Young VR. and Ajami A. (2000). Glutamate: an amino acid of particular distinction. *J. Nutr.* 30(4S):892S-901S.
 4. Filer LJ. and Stegink LD. (1994). Report of the proceedings of the glutamate work shop. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34(2):159- 174.
 5. Ninomiya K. (1998). Natural occurrence. *Food. Rev. Int.* 14 (3): 177-211.
 6. Fernstrom JD. (2000). Pituitary hormone secretion on normal male humans: acute responses to a larges oral dose of monosodium glutamate. *J. Nutr.* 130: 1053s-1057s.
 7. IFIC (1994). Review of monosodium glutamate, examining the myths. Pp.: 1-12.
 8. Tawfik MS. and Al-Badr N. (2012). Adverse effects of monosodium glutamate on liver and kidney functions in adult rats and potential protective effect of vitamins C and E. *Food. Nutr. Sci.* 3: 651-659.
 9. Strong FC. (2000). Why do some dietary migraine patients claim they get headaches from placebos?. *Clin. Experim. Aller.* 30: 739-743.
 10. Diemen V. and Trindade MRM. (2010). Effect of the oral administration of monosodium glutamate during pregnancy and breast-feeding in the offspring of pregnant Wistar rats. *Acta. Cir. Bras.* 25 (1): 37-42.
 11. Gudino-Cabrera G.; Urena-Guerrero ME.; Rivera Cervantes MC.; Alfredo I.; Feria-Velasco AI. and Beas-Zarate C. (2014). Excitotoxicity triggered by neonatal monosodium glutamate treatment and blood-brain barrier function. *Arch. Med. Res.* 45: 653 – 659.
 12. Goldsmith PC. (2000). Neuroglial responses to elevated glutamate in the medial basal hypothalamus of the infant mouse. *J. Nutr.* 130: 1032s -1038s.
 13. Atlante A.; Calissano P.; Bobba A.; Giannattasio S.; Marra E. and Passarella S. (2001). Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 497: 1-5.
 14. Kawamura M.; Azuma N. and Kohsaka S. (1989). Morphological studies on cataract and small lens formation in neonatal rats treated with monosodium -L-glutamate. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 93(5):562-568.
 15. Swelim HH. (2004). Brain lesions induced by monosodium (MSG) in adult and neonatal mice. *Egypt. J. Histol.* 27(1):197-215.
 16. Chambille I. and Serviere J. (1993). Neurotoxic effects of neonatal injections of monosodium L-glutamate (L-MSG) on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster: anatomical and

35. Abe M.; Saito M. and Shimazu T. (1990). Neuropeptide-Y in specific hypothalamic nuclei of rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Brain Res. Bull.* 24: 289–291.
36. Sundaram RS.; Gowtham I. and Nayak BS. (2012). The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 1 5(2):1-7.
37. Yu L.; Zhang Y.; Ma R.; Bao L.; Fang J. and Yu T. (2006). Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Euro. Neuropsychopharmacol.* 16:170–177.

تسجيل جديد للنوع (Copepoda: Calanoida) *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) ودراسة تشخيصية وحياتية له، وتسجيل جديد للطفيلي عليه *Trichodina diaptomi* (Bosson and Van As, 1991) (Protozoa: Ciliophora)

ميسلون لفقة الدوري

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: maysaloonaldoori@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

تم تسجيل جديد للنوع *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) من صنف Copepoda ومن الرتبة Calanoida في العراق لأول مرة، وتمت متابعته لثلاثة أشهر في بحيرة جزيرة بغداد السياحية في بغداد، وشخصت الذكور والإناث، ثم تمت دراسة العوامل الحياتية له فوجد أنه يمكن أن ينمو ويتكاثر طيلة السنة، أي بدرجات حرارية مختلفة رغم إمكانية زيادة نشاطه أو نقصانه، ولكنه لا يختفي ولا يسبب. وقد وجد أنه ذو تغذية متنوعة، فهو من مرشح سلبي إلى مقترس انتقائي. تمت دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة °C (31,25,15) وسلوكية التكاثر. وجد أنه يمكن أن يقاوم كثيراً من الظروف المختلفة، كالتلوث ونقص الغذاء وحامضية المياه، إذ يمكنه تخزين الغذاء على شكل دهون، خاصة إناث هذا النوع في بعض أجزاء الجسم. وقد وجدت في نهاية اللامس الأول للأنتنى بلون وردي، كما وقد وجد على جسمه نوع من الطفيليات هي *Trichodina diaptomi* (Bosson and Van As, 1991) وهي أيضاً تسجيل لأول مرة في العراق. وقد تم تشخيصها والتعرف عليها وهي طفيليات خارجية من الهدبيات Ciliophora.

الكلمات المفتاحية: *Eudiaptomus gracilis*، الهدبيات، المجذافيات، الطفيليات

First record of *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) (Copepoda: Calanoida): an identification and a biological study, and first record of parasite *Trichodina diaptomi* Bosson and Van As, 1991 (Protozoa: Ciliophora)

Maysaloon L. Al-Doori

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Sciences (Ibn- Al- Haitham) / University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present study had succeeded in recording first of *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) (Copepoda: Calanoida) in Iraq. It was studied for three months at Baghdad Tourist Island. Males and females were identified and then some biological factors were studied. It was found that it could be grown and reproduced in whole year depending on varying temperature degrees. Its feeding behaviors are varied from filter feeding to selective carnivorous. It also resists many different circumstances pollution. The females of the species can store fats in some parts of the body such as first antenna.

The study found a parasite on the body of *E. gracilis* and when identified, it was found that it is first record in Iraq, and its name is *Trichodina diaptomi* (Bosson and Van As, 1991). It is ectoparasite from class: Ciliophora feeding on bacteria.

المقدمة

تغيير الغذاء عليه بدءاً من الابتدائيات (Ciliophora: Paramecium)، ثم يرقات المجذافيات (Nauplii)، وبعدها الدواليات (Rotifera: Keratella). وتم تكرار العملية لعدد 25 فرداً من هذا النوع *E. gracilis* لتسجيل الملاحظات حول سلوكية التغذية.

5- سلوكية التزاوج: وضعت 5 إناث و 5 ذكور من *E. gracilis* ناضجة جنسياً في طبق بترى مع ماء البحيرة المصفى، وتمت متابعة سلوكية التزاوج.

6- عزلت عينات مصابة بنوع من الطفيليات، وتم تشخيصها وفقاً للنوع بواسطة المجهر المركب Olympus compound بالاعتماد على كل من (10، 11). وتم تصويرها وقياس قطرها ومتابعة حركتها وهي حية.

7- ملاحظة ظهور لون وردي للقطع السبعة أو الثمانية الأخيرة للامس الأول للإناث فقط، وتم حساب النسبة المئوية لهذه الإناث نسبة إلى المجموع الكلي للإناث التي جمعت من البحيرة.

النتائج

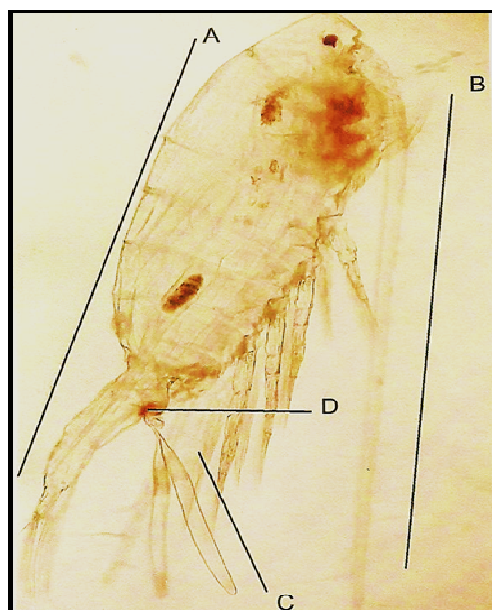
تراوحت درجة الحرارة خلال مدة الدراسة في البحيرة بين (31.8-22) °C والأس الهيدروجيني pH (8.1-8.4). أما نسبة الملوحة فكانت (778-810). وتراوحت الشفافية بين (95-110) cm.

أولاً: الصفات التشخيصية للنوع

Eudiaptomus gracilis (G. O. Sars, 1863)

كان النوع ذا لون أبيض، يبلغ طول جسم الذكر الكلي (من بداية الرأس إلى نهاية القطعة الذنبية) 505 µm، أما الأنثى فبلغ طولها 717 µm.

1- المنطقة الرأسية الصدرية Cephalothorax: لها عين واحدة سوداء واضحة في مقدمة المنطقة، زوجي اللوامس الأول (A1) مكون من 25 قطعة في الأنثى يكونان متشابهين ويصلان إلى نهاية القطعة الذنبية تقريباً، ويبلغ معدل طولها 707 µm (شكل رقم 1)، ويملكان شوكة واضحة في القطعة 14 (شكل رقم 2). أما لامسي الذكر الأولين فالأيسر LA1 مشابه للامسي الأنثوي، بينما الأيمن RA1 فهو مرفقي عند القطعة (19-20) (شكل رقم 3)، والقطعة الثانية قبل الأخيرة في نهايته الحرة القطعة رقم 23 تكون طويلة وتمتلك بروزاً غضروفياً منحني إلى الخارج ومسند (شكل رقم 4).



شكل رقم (1): صورة لأنثى *E. gracilis*: الطول الكلي A=717 µm وطول اللامس الأول B=720 µm وطول المحفظة المنوية C=188 µm والفتحة التناسلية D 4x.

تلعب الهائمات الحيوانية دوراً بيئياً كبيراً بسبب تفاعلها مع محيطها المائي، وتعد المجذافيات Copepods واحدة من أهم مجموعات الهائمات لما لها من دور في الحفاظ على المسطحات المائية (1)، وهي تتأثر كذلك بكثير من العوامل البيئية مثل درجة الحرارة وقيمة الأس الهيدروجيني pH، وعمق المياه، والمحتوى الغازي لها ونسبة المعادن ونسبة التلوث والأساس الجيولوجي إضافة إلى العوامل الإحيائية كالنفاذ والافتراس (2). ويعد النوع *Eudiaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863) من المجذافيات الناجحة بيئياً، فهو يتواجد في أكثر من نوع من أنواع المسطحات المائية (3)، وهو من أكثر الأنواع شيوعاً في أوروبا، ويعود نجاحه إلى قابليته في التغلب على الظروف البيئية المختلفة، ونجاح تفاعله مع الأنواع المحلية (4). وقد وجد أنه يستطيع أن ينمو ويتكاثر في البحيرات الصغيرة، وقليلة التغذية وحتى في البحيرات ذات الفيضانات (5).

المواد وطرق العمل

العمل الحقلية: جمعت العينات من بحيرة جزيرة بغداد الصناعية خلال الأشهر أيار وحزيران وتموز للعام 2016، بواسطة شبكة الهائمات ذات فتحات 35 µm، وأدخلت في مياه البحيرة إلى القاع، وتركزت لمدة 30 ثانية لتستقر الأحياء. ثم رفعت عمودياً من القاع إلى السطح، وجمعت الأحياء وبعده تكرارات (6). وضع جزء من الأحياء في محلول مكون من (كحول 70% + جليسر 20%) (7) لغرض التشخيص، والجزء الآخر من الأحياء وضعت في قنار زجاجية كبيرة الحجم سعة (1 لتر) ذات فتحة عريضة لغرض تربيتها في المختبر، وإجراء الدراسات الحياتية عليها. تم قياس درجة الحرارة باستخدام المحرار الزئبقي، وقياس الأس الهيدروجيني pH والملوحة Cond. باستخدام pH-meter وقياس الشفافية بواسطة قرص ساكي.

العمل المختبري:

المجموعة الأولى: بعد ترك العينات في محلول الكحول لمدة 24 ساعة، وباستخدام المجهر المركب (Olympus-Eudiaptomus gracilis) تم تشخيص النوع (8، 9)، وأجريت القياسات بواسطة Ocular micrometric، وعلى قوة تكبير 40x. ولقياس الطول الكلي أو أطوال أجزاء جسم الحيوان المختلفة، تم فحص 45 ذكراً و 45 أنثى، و 10 أنثى حامل و 10 إناث حاملة للمحفظة المنوية Spermatophore. وأخذت الصور من المجهر المركب بعد عزل أجزاء جسم الحيوان باستخدام إبرة دقيقة جداً.

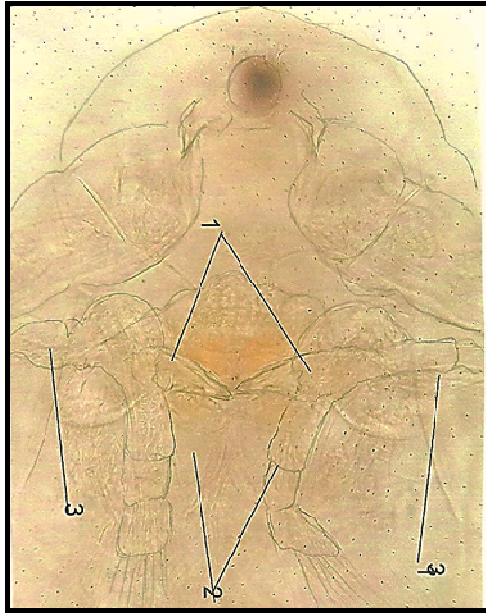
المجموعة الثانية: تمت في المختبر عملية تربية النوع *E. gracilis* بعد عزل أنثى حامل من العينة الرئيسية، وبعد فقس بيوضها، تمت متابعة الصغار حتى كبرت وتزاوجت، وتكونت مزرعة متكاملة منها في مياه نفس البحيرة بعد تصفيتها بواسطة شبكة الهائمات النباتية لضمان تنقية هذه المياه بشكل جيد. وأجريت عليها الاختبارات التالية:

1- تأثير درجات الحرارة المختلفة على نموه وتكاثره: تم عزل 30 دورقاً سعة 500 ml من ماء البحيرة بعد تصفيته، ثم وضعت 5 ذكور و 5 إناث من النوع في كل دورق منها، ووضعت كل 10 دورق بدرجات حرارية مختلفة وكالتالي (15، 25، 31). وتمت مراقبة الحيوانات في جميع الدورق على مدار اليوم، لدراسة تأثير اختلاف درجات الحرارة على كل من (الطول الكلي أي نمو الذكور والإناث، عدد البيوض للإناث الحوامل، مدة فقس البيوض، المدة بين حضنة وأخرى، والمدة من فقس البيضة إلى نضج الحيوان).

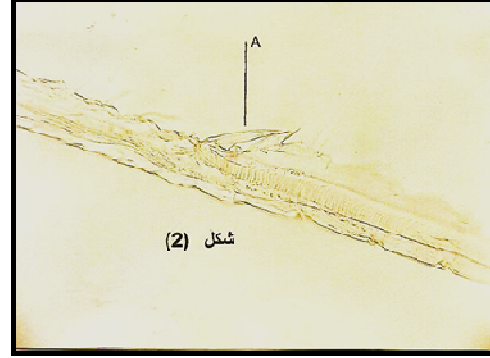
2- تأثير نقص الأوكسجين: وضعت 10 حيوانات (*E. gracilis*) في 3 دورق سعة 50 ml وتم قياس الأوكسجين المذاب O₂ والمتطلب الحيوي للأوكسجين المذاب BOD، ثم متابعة تأثير نقص الأوكسجين على الأحياء الموجودة (إذ إنها تركت دون إضافة الأوكسجين للماء). وبعد مرور 48 ساعة تم قياس نسبة O₂ والمتطلب الحيوي للأوكسجين BOD.

3- دراسة سلوكية التغذية: وضع حيوان (*E. gracilis*) على شريحة مجهر خاصة تحوي حفرة صغيرة (شريحة القطرة)، ووضع فيها ماء البحيرة بعد تصفيته لمتابعة سلوك التغذية لهذا النوع، وقد تم

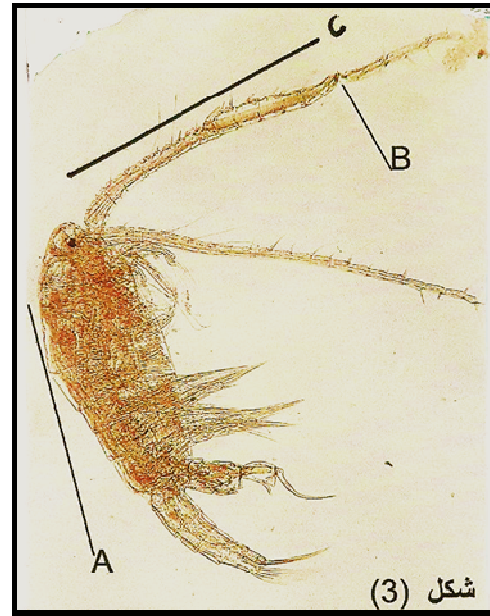
وكالتالي: $P1=2, 3, 3, 4, 3, 2$ (شكل رقم 6)، أما القدم الخامس $P5$ ، فهي متميزة وتختلف بين الذكور والإناث، فالرجل الخامسة اليمنى للذكور $R.P5$ متكونة من قطعتين قاعديتين في الأولى يوجد تركيب حلقي ذو شوكة صغيرة في نهايته، والقطعة الثانية يبرز فيها جزء خارجي يسمى *Exopodite* ويرمز له $R.exo.P5$ ، ويتكون من قطعتين، الثانية تحمل بروزاً أصعباً غضروفياً منحنيًا إلى الخارج، يخرج من منتصف القطعة تقريباً، وفي قمته تحمل مخلباً كبيراً نحيفاً منحنيًا إلى الداخل، أما الجزء الداخلي منها فيرمز له $R.endo.P5$ ويتكون من قطعة واحدة إسطوانية تحمل في نهايتها شوكة صغيرة أمامية (شكل رقم 7)، أما الرجل الخامسة اليسرى $L.P5$ فتتكون من قطعتين قاعديتين يتصل بالثانية الجزئين الخارجي والداخلي، يسمى الداخلي $L.endo.P5$ ويتكون من قطعة واحدة تبرز فيها شوكة جانبية إلى الأمام وشعيرات دقيقة. أما الجزء الخارجي منه فيرمز له $L.exo.P5$ متكون من قطعتين، الثانية ذات نهاية مستدقة وتحمل شوكة جانبية تتجه إلى الخارج وتحمل شعيرات دقيقة في نهايتها، وتحمل القطعة الثانية منها شعيرات واضحة (شكل رقم 8). الرجل الخامسة من الأنثى $P5$: تتشابه الرجل الخامسة اليمنى مع اليسرى وهي تتكون من قطعتين قاعديتين: الأولى يبرز منها تركيب غضروفي، والثانية يخرج منها الجزئين الخارجي والداخلي، ويرمز لها $exo.P5$ و $endo.P5$. يتكون الداخلي من قطعة إسطوانية تحمل شعيرات دقيقة في قمته، وعلى الجانبين شوكتين صغيرتين غير متناظرتين تتجهان إلى الأمام. والجزء الخارجي $exo.P5$ يتكون من قطعتين، الثانية أكبر من الأولى، وهي ذات نهاية مستدقة تخرج من قاعدتها شوكتين أو ثلاث، واحدة منها طويلة تقريباً بطول القطعة الثانية، والأخرى قصيرة (شكل رقم 9). تنتهي المنطقة الصدرية من الأسفل بتركيب غضروفي على الجانبين يسمى بالأجنحة *Wings* وهما بشكل عام غير متناظرين، إذ يكون أحدهما ذا نهاية مستديرة وفيها شوكة أو اثنتين شفافتين، أما الآخر فيكون تقريباً مستدقاً ويمتد أطول من الأول، ويحوي شوكة أيضاً (شكل رقم 10).



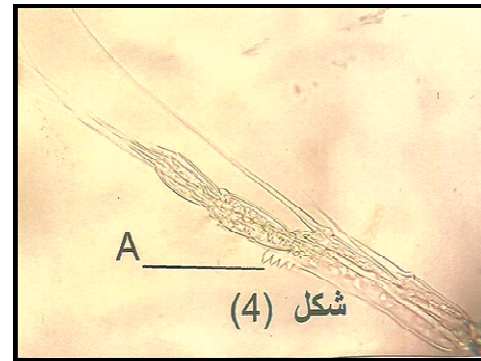
شكل رقم (5): أزواج الفكوك الثلاثة 40x.



شكل رقم (2): الشوكة المميزة للنوع في القطعة 14 من اللامس الأول 40x.

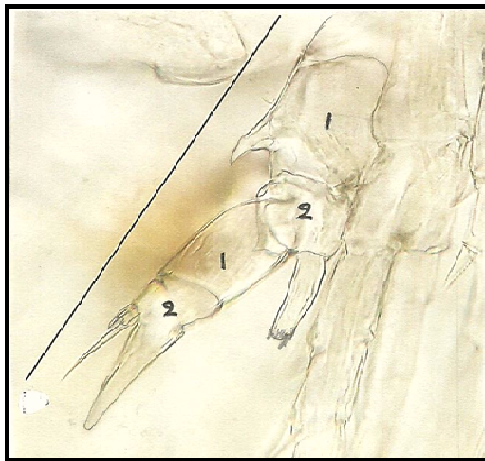


شكل رقم (3): طول الذكر $A=505\mu m$ و B المرفق بين القطعتين $4x$ ، $C=480\mu m$, 20-19.

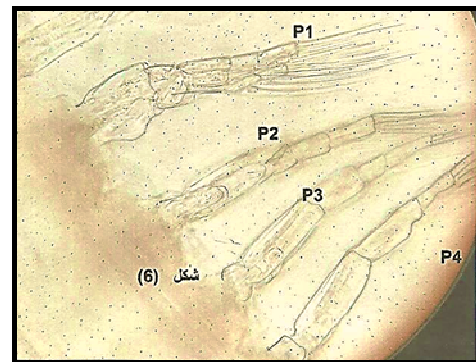


شكل رقم (4): الجزء الغضروفي المسنن A في القطعة الثانية قبل الأخيرة للامس الأول للذكر 40x.

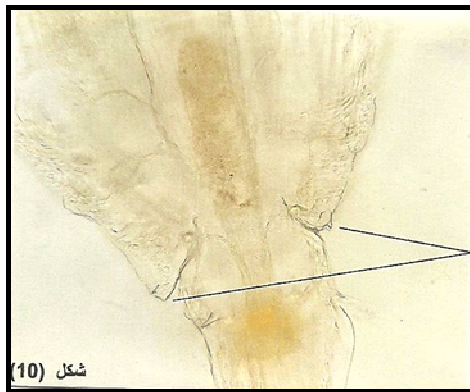
2- المنطقة الصدرية *Thorax*: يوجد فيها زوج من الفكوك، وزوجين من الفكوك المساعدة (شكل رقم 5)، وأربعة أزواج من الأرجل المجذافية P تكون على رجل متكونة من قطعة قاعدية وجزئين هما خارجي يسمى *Exopodite* وداخلي يسمى *Endopodite*. تتكون الأقدام الداخلية من عدد من القطع



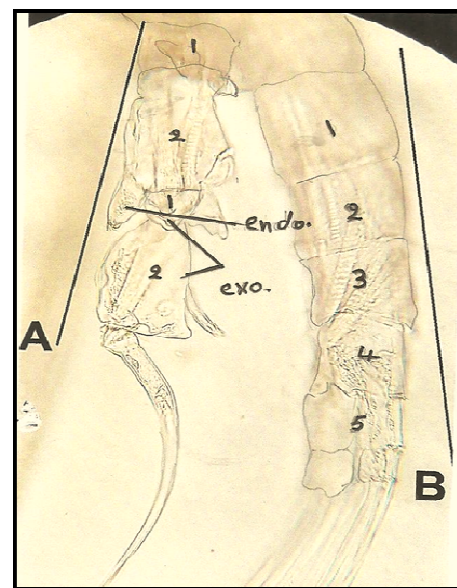
شكل رقم (9): الرجل الخامسة لانتثى بطول $125\mu\text{m}$ ، $40\times$.



شكل رقم (6): الأرجل الأربعة و أطوالها، $P1=92\mu\text{m}$, $P2=88\mu\text{m}$, $P3=90\mu\text{m}$, $P4=92\mu\text{m}$ $10\times$.

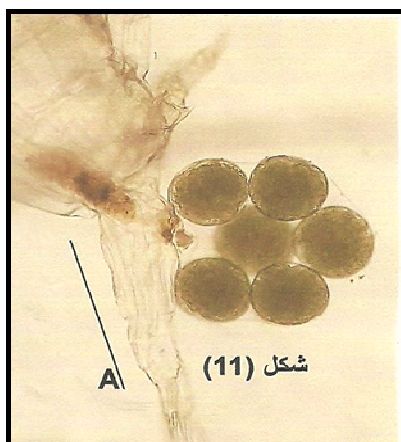


شكل رقم (10): الجناحان في نهاية المنطقة الصدرية $40\times$.

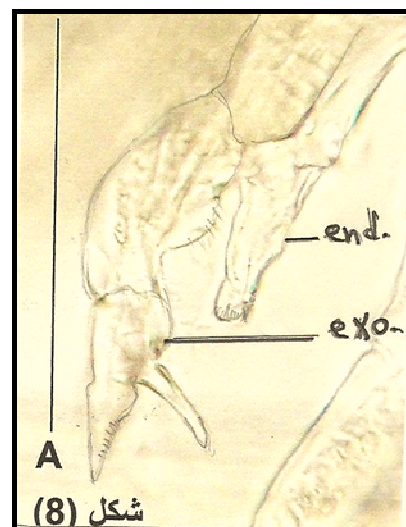


شكل رقم (7): الرجل الخامسة اليمنى للذكر بطول $A=118\mu\text{m}$ والمنطقة البطنية $B=204\mu\text{m}$ $40\times$.

3- منطقة البطن **Abdomen**: في الأنثى تتكون البطن من ثلاث قطع، الأولى كبيرة وواضحة وتحمل الفتحة التناسلية (وكيس البيض في حالة وجوده) والثانية صغيرة، أما الثالثة فتحمل الزوائد الذنبية (شكل رقم 11). بالنسبة لبطن الذكر، فيكون من خمس قطع تحمل الخامسة الزوائد الذنبية (شكل رقم 7)، ويبلغ عدد الأهداب النهائية **Terminal seta** في نهاية الزوائد الذنبية لهذا النوع خمسة زوائد هذبية (شكل رقم 12).



شكل رقم (11): موقع وشكل كيس البيض وطول المنطقة البطنية $A=125\mu\text{m}$ $10\times$.



شكل رقم (8): الرجل الخامسة للذكر بطول $38\mu\text{m}$ $40\times$.



شكل رقم (13): أماكن تجمع الدم بسبب نقص الأوكسجين 4x.



شكل رقم (12): الزوائد الخمسة للمنطقة الذنبية 10x.

ثانياً: حياتية النوع

3- سلوكية التغذية: عند متابعة سلوكية التغذية لمجموعة من أفراد هذا النوع، تبين بأنها تغذية ترشيحية سلبية. ولكن تحول نشاطها إلى افتراسي عندما وجدت مجموعة من اليرقات الصغيرة للمجذافات، ولوحظ أنها تفتقر بشكل انتقائي، فهي تتجنب اليرقات الكبيرة وتلتقط اليرقات الصغيرة، كذلك افترست الدواليبات، وبدأت فيها من اضيق جزء وهو أقدامها. وقد لوحظ أنها أحياناً تخسر فريستها.

4- سلوكية التزاوج: وجد أن الذكر الناضج جنسياً عند التقائه بالأنثى الناضجة أيضاً يبدأ أولاً بالدوران حولها مرة واحدة، ثم يستوعبها بواسطة اللامس المرفقي. وقد استغرقت العملية 2.5 دقيقة ثم وضع الذكر التركيب المسمى بالمحفظة المنوية Spermatophore على القطعة التناسلية بعد أن حدد موقعه (شكل رقم 1). وقد ظهر هذا التركيب على القطعة التناسلية للأنثى بعد مرور 1.5 دقيقة من الالتقاء، ثم انفصل الزوجان بعد ذلك بحوالي دقيقة واحدة.

5- حيوانات النوع المصابة بالطفيلي: وجدت مجموعة من حيوانات النوع *E. gracilis* وقد أصيبت بنوع من الطفيليات الهدبية *Ciliophora*. وقد تم تشخيص هذا النوع وهو *Trichodina* (Bosson and Van As, 1991) ، وهو أول تسجيل له في العراق. هذه الكائنات ذات شكل قرصي بقطر $35.3 \mu m$ من المظهر السطحي محاطة بأهداب قصيرة وكثيفة ومن المظهر الجانبي تظهر محدبة من السطح العلوي، ومقعرة قليلاً من السطح السفلي، ويوجد فيها من السطح العلوي فم خلوي محاط بالأهداب يمكن غلقه وفتحه ولكن موقعه ثابت، كما أنها تحوي تراكيب خاصة بهذا النوع بشكل حلقة في منتصف الجسم تحيط بالفم الخلوي تسمى Denticles يبلغ عددها (19-20) (شكل رقم 14). وهي تعيش على نوع *E. gracilis* بشكل منفرد أو جماعي (شكل رقم 15) وتتحرك على جسمه ذهاباً وإياباً. وقد لوحظ تركها لجسم الحيوان المصاب بعد موته.

1- تأثير درجات الحرارة المختلفة على نموه وتكاثره: عند درجات الحرارة $15^{\circ}C$ ، $25^{\circ}C$ ، $31^{\circ}C$ كانت أطوال الذكور $503 \mu m$ ، $500 \mu m$ ، $505 \mu m$ على التوالي، والإناث وجدت $712 \mu m$ ، $702 \mu m$ ، $717 \mu m$ أيضاً على التوالي. وكان معدل عدد البيوض في كيس البيض (9، 10، 12) بيضة للأنثى الواحدة، أما مدة فقس البيوض فكانت (60، 48، 72) ساعة، وعن المدة بين حضنه وأخرى (9، 7، 6.5) يوم وعند حساب معدل عدد الأيام التي يستغرقها الحيوان منذ فقس البيضة حتى النضج فهي (17، 10، 14) يوماً. (جدول رقم 1). وعند التحليل الإحصائي للنتائج وجد أن العلاقة غير معنوية بين درجات الحرارة وعدد الذكور والإناث وبينها وبين مدة فقس البيوض والمدة من فقس البيوض إلى النضج ومعنوية بين درجات الحرارة والمدة بين حضنه وأخرى وبين عدد البيوض في الكيس الواحد.

جدول رقم (1): العلاقة بين درجات الحرارة وبعض مراحل النمو للنوع *E. gracilis*

العوامل المقاسة	درجات الحرارة		
	15°C	25°C	31°C
الطول الكلي للإناث μm	712	702	717
الطول الكلي للذكور μm	503	500	505
عدد البيوض في الكيس الواحد/بيضة	12	10	9
مدة فقس البيوض/ساعة	72	48	60
المدة بين حضنه وأخرى/يوم	6.5	7	9
المدة من فقس البيوض إلى النضج/يوم	14	10	17

2- تأثير نقص الأوكسجين: كانت نتيجة قياس الأوكسجين المذاب والمتطلب الحيوي في بداية التجربة هي (8.79، 1.95) ملغم/لتر على التوالي. وبعد مرور 48 ساعة، كانت القياسات (4.32، 0.31) ملغم/لتر، ووجدت الأحياء منها قد ظهر عليها بقع حمراء في منطقة الصدر والقطع الثلاث عشر الأولى من زوج من اللوامس الأولية (شكل رقم 13).

المناقشة

من المعروف أن المياه العراقية في نهري دجلة والفرات ذات طبيعة قاعدية ولها قابلية توصيلية عالية (12)، ولكن في المسطح المائي (بحيرة جزيرة بغداد السياحية) كان الأس الهيدروجيني pH حامضياً، وقد يكون ذلك بسبب النسبة العالية للهائمات النباتية التي وجدت في البحيرة والتي تؤدي إلى زيادة نسبة البناء الضوئي، خصوصاً وأن الشفافية كانت مرتفعة (ضوء الشمس يصل إلى قاع البحيرة تقريباً)، فهذا أدى إلى زيادة استهلاك CO_2 وبالتالي رفع الأس الهيدروجيني، كما قد يكون بسبب زيادة تركيز النترات مثل مركبات الأمونيا (13).

وجد النوع *E. gracilis* بنسبة عالية خاصة في قاع البحيرة، فهو يتواجد نهراً في الأسفل ويصعد ليلاً إلى الأعلى، أي أن له هجرة يهارية- ليلية (14)، كما أن له القابلية على الانتشار في بيئات مختلفة، لمقاومته الظروف البيئية القاسية، فهو يتحمل القاعدية والحامضية والنسب العالية من نترات الأمونيوم (15). وهو الوحيد من نوعه الذي يتحمل الحامضية لمدة طويلة (16)، بالإضافة إلى نموه السريع وتكاثره على طول مدة السنة (17)، كما أن له القابلية على تكوين سلالات جديدة لكي يستطيع مقاومة الظروف الصعبة (18) فقد يكون هذا النوع المشخص تحت النوع Sub-Species جديداً، لوجود بعض الاختلافات الدقيقة عن النوع الأصلي فهو مثلاً يمتلك في اللامس المرفقي للذكر تركيب إصبعي في القطعة 23، ولكنه مسنن. وهذا الاختلاف وجد بينه وبين النوع المسجل غير المسنن في تركيا (19).

بين الجدول رقم (1) أن الدرجة الحرارية المثلى لنموه هي $24^{\circ}C$ ينمو خلالها إلى البالغات وهذا ما أيدته دراسة (20). وقد وجد أن هذا النوع ينمو ويتكاثر وتصل البالغات إلى النضج في جميع درجات الحرارة قيد التجربة، مع أنه قد يختلف في معدل عدد الأحياء التي تصل إلى البلوغ باختلاف درجات الحرارة. والتحليل الاحصائي يدعم هذه النتيجة.

وجد أن نقص الأوكسجين في المياه التي ينمو فيها الحيوان يؤدي إلى رفع نسبة الهيموجلوبين في جسمها للتعويض عن هذا النقص ولذلك يظهر على جسمها لون الدم الأحمر (لون الهيموجلوبين) بشكل بقع حمراء في منطقة الصدر واللوامس إلى منتصفها (21، 22). من الناحية الغذائية، امتلاك هذا النوع تقنية واسعة للبحث عن الغذاء، يعود ذلك إلى السرعة المتزامنة لحركة أجزاء الفم. وهذا ما أيدته دراسة (23)، وهو يتحول من طريقة غذاء ترشيح سلبى إلى مفترس نشط بالرغم من الاختلاف الكبير بين العمليتين، وقد وجد أنه يتغذى على الدواليبات مثل *Keratella* وهذا ما جاء به (24)، كما أكدت دراسة (25) على تغذيته على الطحالب والابديانبات ويرقات المجذافيات والدواليبات، وهو يستطيع التقريب بين دقائق الغذاء، وهذا ما يجعله يقوم كثيراً من ظروف الغذاء المتغيرة (26).

من الناحية التكاثرية، وجد أن سلوكية التكاثر في النتائج تتطابق مع ما أشارت إليه دراسة (27). وأكدت دراسة (2) أنه يكون بيوضاً حتى خلال الشتاء، كما وجد أن هذا النوع لا يدخل في فترة سبات (29).

تم تسجيل الطفيلي نوع *Trichodina diaptome* لأول مرة في العراق وقد وجد على جسم الحيوان وهو طفيلي خارجي Ectoparasite (30) وهي تتغذى على البكتريا التي على جسم الحيوان في المياه العذبة وقد وجد أنها تسبب أذى فيزيائي أي أنها لا تسبب له أي مرض ظاهر (31)، ولكن وجودها على جسمه بأعداد كبيرة تعمل على زيادة وزنه وقد لوحظ التأثير على حركته ونشاطه الغذائي وقد يؤدي إلى موته (32)، ووجود هذه الطفيليات دليل على أن مياه البحيرة فقيرة التغذية وذات نسبة سكانية عالية (33).

إن وجود اللون الوردي على نهاية اللامس الأول لحوالي 20% من الإناث المجموعة من البحيرة قد يكون سببه أن الانثى تقوم بخزن الدهون واستخدامها في حالة قلة الغذاء بدل أن تنسبت (حيث وجد أن هذا النوع لا يسبت) وهذا ما أيدته نتائج دراسة (34). كما أن هذا النوع يخزن الدهون بشكل Triacylglycerol أو استرات الشمع ذات الألوان، ويستخدمها كمصدر للطاقة الأولية خلال فترة نقص الغذاء (35). وهذا سبب ظهور اللون الوردي على لامسيه.

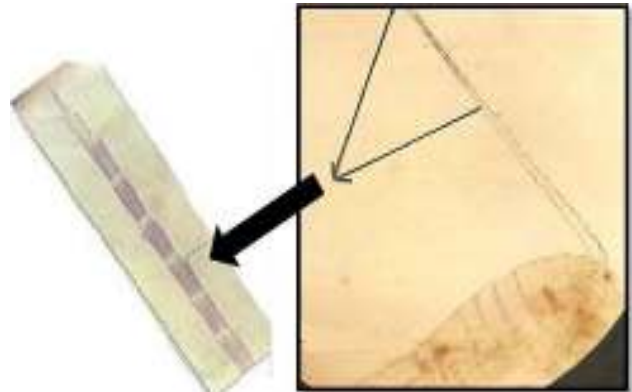


شكل رقم (14): لمظهر سطحي للطفيلي *Trichodina diaptomi* وقطرها 35.3 . x40



شكل رقم (15): انتشار الطفيلي A على *E. gracilis* المصاب 4x.

6- ملاحظة إضافية: لوحظ أن بعض الإناث فقط تصطبغ القطع السبعة أو الثمانية الأخيرة فيها بلون وردي، حيث وجدت بنسبة 20% تقريباً من مجموع الإناث التي جمعت من البحيرة (شكل رقم 16).



شكل رقم (16): مكان تجمع الدهون في اللامس الأول للأنثى بشكل لون وردي 40x

on oligotrophic Fennos Candia lake. J. Limnol. 69(2): 311-332.

17. Jamieson CD. (2005). Coexistence of two similar Copepoda species, *Eudaptomus gracilis* and *E. graciloides*: the role of deferential predator avoidance. Hydrobiol. 542: 191-202.
18. Gerl KA.; Panosso R. and Lurling M. (2011). Consequences of acclimation to microcystis on the selective feeding behaviour of the Calanoid: Copepod, *Eudiamtomus gracilis*. J. Limnol. 56: 2103-2114.
19. Bozkurt A. and Akin S. (2012). First record of *Eudaptomus gracilis* (G. O. Sars, 1863). Copepoda: Diaptomidae in inland waters of Turkey. Turk. J. Zool. 36(4): 503-511.
20. Lee HW.; Ban S. and Lkeda T. (2003). Effect of temperature on development of, nauplii and copepodites stages of two species of copepods, *Cyclops vicinus* Uljanin and *Eudaptomus gracilis* Sars. Oecol. 16: 355-367.
21. Stankovic I.; Mihaljeric Z. and Kerovec M. (2011). Crustacean plankton community (Crustacea: Copepoda and Cladocera) in gypsum karst lake and their relation to abiotic parameters. J. Hydrobiol. 666: 145-153.
22. Kasprzak P.; Reese C.; Koschel R.; Schulz M. and Mathes LHJ. (2005). Habitate characteristics of *Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887) (Copepoda: Calanoids) the role of lake depth, temperature, oxygen, concentration and light intensity. Hydrobiol. 90(3): 292-309.
23. Brandll Z. (2005). Fresh water copepods and rotifera. Predators and their prey. Hydrobiol. 546: 475-489.
24. Reissig MB.; Modenutti E.; Balseiro Q. (2004). The role of the predaceous copepod *Parabroteas sarsi* in the pelagic food web of large deep Andean lake. Hydrobiol. 524: 67-77.
25. Bruno E.; Borg CM. and Kiorboe T. (2012). Prey detection and prey capture in Copepod Nauplii. J. Zoopl. 7(10):1-8.
26. Rangel LM.; Ger KA.; Silva LHS.; Coralina MS.; Faassen EJ. and Lurling M. (2016). Toxicity orerrioles morphology on cylindrospermopsis raciborskii *Eudaptomus gracilis*. Mibrob. Ecol. 71: 835-844.
27. Berger I. and Maier G. (2001). The mating and reproductive biology of the fresh water plankton calanoid copepoda *Eudaptomus gracilis* fresh water. Biol. 46(6): 787-794.
28. Zeller M.; Jimene Z.; Melero R. and Santer B. (2004). Diapause in the Calanoid fresh water copepod *Eudaptomus gracilis*. J. Plankton. Res. 26:1379-1388.
29. Seeben H.; Straile D. and Hoegg R. (2007). Population dynamic of fresh water Calanoid, Copepoda: Complex responses to changes in trophic status and climate variability. Limno. Oceanogr. 52(6): 2364-2372.
30. Kumar A.; Bandyopadhyay PK.; Gong Y. and Bhowmik B. (2012). Occurrence of Trichodinid Ciliophorans (Ciliophora: Peritrichida) in the fresh water fishes of the river churni with description of *Trichodina glossogobae* sp. nov. West Bengal. India. J. Parasit. Dis. 36(1): 34-43.

المصادر

1. Brandor GO. (2012). Distribution of some Calanoida (Crustacea: Copepoda) from the Yucation Peninsula, Belize and Guatemala. Rev. Bio. Trop. 60(1):187-202.
2. Samchyshyna LV. (2008). Ecological characteristic of Calanoids (Copepoda: Nalanoida) of the Inland waters of Ukraine. Vestnik. Zoologii. 42(2): 232-237.
3. Riccardi N. and Giussani G. (2007). The relevance of life history traits in the establishmeat of the invader *Eudaptomus gracilis* and the extinction of *Eudaptomus padanus* in lake Candia (North Italy). Evidence for competitive exclusion. Aquat. Ecol. 241: 243-254.
4. Gherardi F. (2007). Biological invasions in inland waters an over view. In: Gherardi, F(ed.). Biological mraders in inland waters: Profiles distribution, and threats, Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp.: 3-25.
5. Riccardi N. and Rossetti G. (2007). *Eudaptomus gracilis* in Iraq: how, where and why. J. Limnol. 66: 63-68.
6. Wiebe PH. and Benfield MG.(2003). From the Hensen net toword four-dimensional biological Oceanography. Prog. Oceanogr. 56:7-13.
7. Pennak RW. (1978). Fresh water invertebrate of United States. 2nd ed. John. Wiley and Sons. New York.
8. Throp JH. and Covich AP. (2010). Ecology and classification of North American fresh water invertebrate. 3rd ed. Academic press. New York. Oxford. P.: 1188.
9. Edmoondson WT. (1959). Fresh water biology. 2nd ed. New York-London. John Wiley and Sons. INC. P.:1248.
10. Basson L. and Van AJG. (2006). Trichodinidae and other Ciliophorans (Phylum: Ciliophora) in woo PTK fish diseases and disorders 2nd ed. Cab Int. pp: 154-182.
11. Briano MS.; Morles ES.; Ortiz AA. and Reyes-Flores M. (2011). Two species of *Mastigodaptomus* (Copepoda: Diaptomidae), hosts of the epibiotic ciliata *Trichodina diaptomi* (Peritricha) in North Am. J. Limnol. 70(2): 329-333.
12. الزرقي، صادق كاظم لفتة؛ محمد عبد العظيم كاظم، شهيد عبد الله إبراهيم. (2010). دراسة لبعض الصفات الفيزيائية والكيميائية لمياه نهر الكوفة. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية. 4 (18): 1411-1399.
13. الفتلاوي، حسين جميل جواد. (2005). دراسة لمنولوجية لنهر الفرات في الجزء الواقع بين سدة الهندية وناحية الكفل، العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.
14. Melero RJ.; Santer B. and Guerrero F. (2005). Embryonic and naupliar development of *Eudaptomus gracilis* and *E. graciloides* of different temperatures, comments on individual variability. J. Plankton. Res. 27(11): 1175-1187.
15. Czczuga B. and Kozłowska M. (2002). Fertility of *Eudaptomus*, *Bosmina* and *Daphnia* (Crustacea) representation in lakes of varied trophic states in the Suwalki district polish. J. Environ. Stud. 11(1): 23-31.
16. Waervagen SB. and Nilsson JP. (2010). Life histories and seasonal dynamic of common boreal pelagic Copepods (Crustacea: Copepoda) inhabiting

31. Depadua SB.; Martins ML. and Carraschi SP. (2012). *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae). A new parasite for piaractus mesopotamicus (Pisces: Characidae). Zootaxa. J. 3422: 62-68.
32. Dasilva WM.; Roche KF.; Devicent FS. and Delben AA. (2009). First record of the pritch *Trichodina diaptomi* Basson and VAN As, 1991. (Protozoan: Ciliophora) on a south America Calanoid *Notodiaptomus deitersi* (Poppe, 1890). (Crustacea: Copepoda). J. Eukaryot. Microbiol. 56: 385-387.
33. Collymore C.; White JR. and Lieggi C. (2013). *Trichodina xenopodus*, a ciliated protozoan in a laboratory-maintained *Xenopus laevis*. J. Comp. Med. 63(4): 310-312.
34. Barbara S.; Elke BS.; Carla C. and Nelson H. (2000). Life history variation in the coexisting fresh water Copepods *Eudiaptomus gracilis* and *E. graciloides*. Arch. Hydrobiol. 149(3): 441-458.
35. Nussbaumer J.; Arts MT.; Guschina IA. and Kainz M. (2014). Famin and feast in common fresh water calanoid, effects of diet and temperature on fatty acid dynamic of *Eudiaptomus gracilis*. Limno. Oceanogr. 59(3): 947-958.

حساسية يرقات الذباب المعدني *Chrysomya megacephala* (Fabricius) للفطر *Beauvaria bassiana* (Bals.) Vuill تحت ظروف المختبر

نوال صادق مهدي

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: nawalsadiq59@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

تم تقييم إمراضية عزلتين من الفطر *Beauvaria bassiana* ليرقات الذباب المعدني *Chrysomya megacephala* في المختبر. وتعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في تجربة تقييم إمراضية عزلة محلية من الفطر لهذا النوع من الذباب. تم استعمال طريقتين لمعاملة اليرقات بملق أبواغ الفطر، الأولى عن طريق رش اليرقات المباشر بثلاث تراكيز متسلسلة من أبواغ الفطر (10^6 و 10^7 و 10^8 بوغ/ مل)، والطريقة الثانية من خلال معاملة غذاء اليرقات بنفس التراكيز أعلاه. أظهرت النتائج فعالية العزلتين المحلية *B. bassiana* B والعزلة المستوردة *B. bassiana* I في هلاك وتشوه اليرقات. أوضحت النتائج أن معدل نسبة الهلاك التراكمي لليرقات المعاملة بتركيز 10^8 بطريقة الرش المباشر من العزلتين المحلية والمستوردة كان 90 و 63.33% على التوالي، أما عن طريق معاملة الغذاء كان معدل نسبة الهلاك التراكمي 100 و 70% على التوالي. ظهرت تشوهات مظهرية في اليرقات المعاملة تمثلت بانكماش الجسم وتلوونه بلون بني، مع ظهور النمو الفطري المتمثل بالأبواغ والهيفات فوق جثث اليرقات الميتة. إن نسبة الهلاك العالية لليرقات بطريقتي المعاملة تشير إلى حساسيتها اتجاه عزلتي الفطر وكفاءة هاتين العزلتين في السيطرة على هذا النوع من الذباب.

الكلمات المفتاحية: حساسية، *Chrysomya megacephala*، *Beauvaria bassiana*، يرقات.

Susceptibility of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) larvae (Diptera: Calliphoridae) to the fungus *Baeuvaria bassiana* (Bals.) Vuil. under laboratory conditions

Nawal S. Mahdi

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Sciences (Ibn- Al- Haitham) / University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Pathogenicity of two isolates of Entomopathogenic fungus *Beauvaria bassiana* against *Chrysomya megacephala* larvae were assessed in the laboratory. This was the first trial to evaluate the pathogenicity of a local isolate of this fungus against blow fly larvae in Iraq. Two bioassay methods were conducted: spraying the larvae directly and mixing its food by three serial concentrations of conidial suspensions (10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/ ml). Results showed that the two isolates *B. bassiana* B (Local isolate) and *B. bassiana* I (Imported isolate) were effective and caused mortality and malformation in the treated blow fly larvae. The results revealed that accumulative mortality percentage of the treated larvae by directly spraying by 10^8 conidia/ ml were 90 and 63.33 for *B. bassiana* B and I respectively. By mixing the larvae food the results were 100 and 70% different morphological malformation were depicted such as shrinking and coloration the larval body by brownish colour growth of fungus on insect cadaver. The high larval accumulative mortality percentages by the two treatment methods showed that this blow fly species was very sensitive against this fungus isolates. These isolates are promising agents for controlling this insect.

المقدمة

نمت كلتا العزلتين على وسط Potato Dextrose Agar (بعد إضافة المضاد الحيوي الكلورامفينيكول) في أطباق بتري وحضنت بدرجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 14-7 يوماً.

تحضير تراكيز المعلق الفطري: تم تحضير ثلاث تراكيز من معلق كلا العزلتين (I & B) 10^6 ، 10^7 ، 10^8 بوغ/مل باستعمال الماء المقطر المعقم المضاف إليه مادة Tween-20 بتركيز 0.01% لغرض دراسة تأثير هذه التراكيز في يرقات الطور الثاني للذبابة المعدني نوع *Ch. Megacephala*.

التجارب الحيوية: تم تعرض يرقات الطور الثاني ليرقات الذباب المعدني للتراكيز أعلاه 10^6 ، 10^7 ، 10^8 بوغ/مل من كلا عزلتي الفطر (I & B) بطريقة الرش المباشر، تضمنت الطريقة نقل 10 يرقات من مستعمرة التربية إلى وعاء بلاستيكي نبيذ (قطر قاعدته 4.5 سم و ارتفاعه 3.5 سم) تم رش اليرقات بحوالي 2 مل من أحد تراكيز معلق الفطر للعزلة I من مسافة 10-15 سم باستعمال مرشة يدوية معقمة، بعدها نقلت اليرقات إلى وعاء آخر يحتوي 10 غم من لحم البقر المفروم الخالي من الدهن (والذي يمثل الوسط الغذائي الخاص بتغذية اليرقات) غطيت الأوعية البلاستيكية النبيذة بأغطية مثقبة لغرض دخول الهواء ومنه خروج اليرقات، تم عمل ثلاث مكررات لكل تركيز. أجريت معاملة السيطرة وذلك برش اليرقات بتركيز 0.01% من Tween-20 في الماء المقطر. تركت أوعية التجربة والسيطرة في حاضنة كهربائية بدرجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ورطوبة $80 \pm 5\%$ وفترة إضاءة 12 ساعة، أعيدت التجربة أعلاه للتراكيز الأخرى وللعزلة الثانية.

تم متابعة اليرقات يومياً لتسجيل عدد اليرقات الميتة والمشوهة وذلك لحساب نسب الهلاك اليومي والتراكمي ونسب البقاء والتشوهات ونسب خروج البالغات، وتم تصوير اليرقات والبالغات المشوهة بوساطة مجهر تشريح مزود بكاميرا (18).

تمت دراسة تأثير معلق عزلتي الفطر *B. bassiana* I & B في يرقات الطور الثاني لذبابة *Ch. megacephala* أيضاً بطريقة معاملة غذاء اليرقات بالتراكيز الأنفة الذكر وتتلخص الطريقة بمعاملة 10 غم من غذاء اليرقات (لحم البقر المفروم) بحوالي 2 ملم من تركيز 10^6 بوغ/مل وخلطه جيداً في وعاء بلاستيكي نبيذ، بعدها تم نقل 10 يرقات من مستعمرة التربية إلى الغذاء وتم تغطية الوعاء بغطاء مثقب، تم عمل ثلاث مكررات تمثل معاملة السيطرة وذلك بإضافة 2 مل من تركيز 0.01% من مادة Tween-20 مع الماء المقطر المعقم. وضعت أواني التجربة في حاضنة كهربائية بدرجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ورطوبة $80 \pm 5\%$ وإضاءة 12 ساعة. تم متابعة أوعية التجربة يومياً لتسجيل عدد الهلاكات والتشوهات وخروج البالغات (18).

التحليل الإحصائي: تم تصحيح النسب المئوية للهلاكات استناداً إلى معادلة (1925) Abbott (19)، بعد ذلك استخدم برنامج SAS (2012) (20) لدراسة حساسية تراكيز الفطر في نسب هلاك اليرقات التراكمي والتشوهات وخروج البالغات وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD).

النتائج والمناقشة

يتميز الفطر *B. bassiana* بقدرته العالية في إحداث المرض وقتل عوائله المتمثلة بأنواع مختلفة من الحشرات، وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول رقم (1) أن رش يرقات الطور الثاني للذبابة المعدني نوع *Ch. megacephala* بتراكيز متسلسلة من أبواغ عزلتي الفطر (المستوردة والمحلية) أدى إلى حصول نسب هلاك تراكمية تراوحت بين 40.00-63.33 عند المعاملة بالتركيز 10^6 و 10^8 بوغ/مل على التوالي بالنسبة للعزلة المستوردة، ونسبة 45.00-90.00 عند المعاملة بالتركيزين أعلاه على التوالي من العزلة المحلية. مع وجود فروق معنوية بين العزلتين ويظهر من النتيجة أن العزلة المحلية تفوقت على العزلة المستوردة في إمراضيتها اتجاه يرقات الذباب مما يجعل هذه العزلة واعدة في استخدامها كوسيلة مكافحة حيوية، وقد تم تسجيل نسب تشوهات مظهرية عالية في اليرقات المعاملة بلغت أقصاها 66.67% و 83.33% عند المعاملة بتركيز 10^7 بوغ/مل من العزلتين

يمثل الذباب المعدني نوع *Chrysomya megacephala* (Blow fly) أحد أنواع عائلة Calliphoridae المرتبط بصحة الإنسان وحيواناته لكونها تعد أحد نواقل مسببات الأمراض (1). بسبب طبيعة هذه الحشرة في المعيشة والتكاثر على جثث الحيوانات والمواد العضوية المتحللة وفضلات الحيوانات والإنسان، فإنها تظهر بأعداد كبيرة حولها، كما يمكن مشاهدتها حول اللحم المكشوف في الأسواق والمجازر (2، 3)، ونتيجة لذلك، يعد هذا النوع من الأنواع المهمة طبياً الناقلة لمسببات الأمراض (كالرواشح والبكتيريا والابتدائيات الممرضة وبيوض بعض الديدان الخيطية) نقلاً ميكانيكياً (4-6)، فضلاً عن إحداثها لحالة التئويد في الجروح أو في بعض مناطق الجسم في الإنسان وحيواناته (7-9). كما تعد هذه الذبابة آفة اقتصادية تسبب تلف السمك الذي يتم تجفيفه تحت أشعة الشمس (10).

تصاب الحشرات بالعديد من الأحياء المجهرية المتواجدة في التربة بصورة طبيعية والتي قد تسبب لها أمراضاً يمكن أن تؤدي إلى حدوث نسب هلاك عالية جداً ضمن مجتمع الحشرة، تشمل هذه الأحياء غالباً البكتيريا والفطريات لذا استعملت مثل هذه الأحياء في القضاء على العديد من الآفات الحشرية لاسيما وأن أغلب هذه الأحياء ذات تأثير متخصص وطبيعية غير مؤثرة في البيئة وأمكن إنتاجها تجارياً كبديل عن المبيدات الكيميائية المضرّة بالبيئة (11). يعد الفطر *Beauveria bassiana* من الفطريات الشديدة الأمراضية للحشرات *Entomopathogenic fungi*، يمثل هذا الفطر أوائل الأنواع التي استعملت كمبيدات حيوانية، وقد عرف بأنه عامل سيطرة فعال اتجاه العديد من الآفات الحشرية، إذ يسبب مرض المسكردين الأبيض *White muscardine* (11). ويتميز هذا النوع بانتشاره العالمي إذ يتواجد بصورة طبيعية في التربة وعلى جثث الحشرات والنباتات المتفسخة نظراً لطبيعته المترمة، وله قابلية البقاء فعالاً ونشطاً في الطبيعة لمدة طويلة (12، 13).

تحدث إصابة الحشرة بهذا الفطر بعد تلامس والتصاق أبواغها بجدار جسمها وعند توفر الظروف الملائمة يتم إنبات واختراق هذه الأبواغ، ما يلبث أن تنمو هياضات الفطر ويغزو جميع أعضاء وأجهزة وتجوف جسم الحشرة، بعد حوالي 7-10 أيام ويصاحب هذه النمو إنتاج العديد من الانزيمات والسموم مثل الـ *Protease* والـ *Beauvericin* يتبع ذلك نمو خارجي للفطر يغطي جميع جسم الحشرة (14). حقق الفطر *B. bassiana* نجاحات ممتازة في مكافحة العديد من الآفات الحشرية تنتمي للرتب حشرية الأجنحة، غمدية الأجنحة وثنائية الأجنحة (15-17).

هدف البحث إلى دراسة حساسية أو تأثير عزلتين من فطر *B. bassiana* الأولى مستوردة والثانية محلية تم عزلها من التربة من أحد مناطق بغداد ولأول مرة في يرقات الذبابة المعدنية التابعة للنوع *Ch. megacephala* لكونها حشرة ذات أهمية طبية واقتصادية.

المواد وطرق العمل

جمع وتربية الحشرة: تم جمع مجموعة من يرقات الذباب المعدني (حوالي 25 يرقة) من قطعة لحم تركت في أحد مناطق بغداد إلى مختبر الحشرات المتقدم، قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم، جامعة بغداد. وضعت في إناء نبيذ مع 25 غم من لحم البقر المفروم الخالي من الدهن، وضع الإناء في وعاء أكبر يحوي نشارة خشب ناعمة معقمة. ترك الإناءين داخل قفص نو هيكل معدني مكعب الشكل (30×30×30 سم) مجهز بطبق بتري (قطره 9 سم) يحوي سكرأ ناعماً مضافاً إليه باورد الحليب الجاف (1:1) لغرض تغذية البالغات، جهز القفص كذلك بطبق بتري آخر يحوي قطناً مبللاً بالماء، تمت المراقبة لحين خروج البالغات، تم تأكيد التشخيص من قبل متحف ومركز بحوث التاريخ الطبيعي التابع لجامعة بغداد على أنها *Ch. megacephala* رُبيت الحشرة لثلاثة أجيال قبل إجراء معاملات التجربة.

تنمية مستعمرتي الفطر: استعملت عزلتين من فطر *B. bassiana* أحدها مستوردة من قبل مركز البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا، رمز لها *B. bassiana* I والعزلة الثانية تم عزلها من أحد مناطق بغداد ورمز لها *B. bassiana* B.

(2015) Narladkar *et al.* (17) ، حيث أشارت نتائج الدراسة إلى أن معاملة يرقات الذباب التابع لجنس *Culicoides* بمعلق *B. bassiana* أدى إلى هلاكها وتشوهها وظهور الغزل الفطري على البالغات الناتجة في يرقات معاملة.

المستوردة والمحلية على التوالي، وتمثلت هذه التشوهات بتجعد وانكماش اليرقات وتلونها بلون بني غامق وظهور النمو الفطري على جثث اليرقات (صورة رقم 1، 2) وعند متابعة اليرقات المعاملة غير الميتة لحين خروجها ظهرت البالغات بشكل مشوه، ذات أجنحة متقصفة ونمو الغزل الفطري فوقها (صورة رقم 3)، وماتت بعد خروجها بيوم واحد فقط. إن هذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه

جدول رقم (1): تأثير تراكيز متسلسلة من معلق ابواغ عزلتي *B. bassiana I* و *B. bassiana B* بطريقة الرش المباشر ليرقات الطور الثاني للذبابة *Ch. megacephala*

نوع العزلة	التركيز بوغ/ مل	الهلاك بعد 3 أيام	معدل نسبة الهلاك التراكمي	نسبة التشوهات	نسب الخروج
Mean ± S.E.					
<i>B. bassiana I</i>	10^6	0.00 ± 0.00^{Bbc}	40.00 ± 0.00^{AaC}	23.33 ± 8.82^{Aac}	60.00 ± 0.00^{AaC}
	10^7	0.00 ± 0.00^{Bbc}	63.33 ± 6.67^{AaC}	66.67 ± 8.82^{AaC}	36.67 ± 6.67^{AaC}
	10^8	0.00 ± 0.00^{Bbc}	63.33 ± 13.33^{AaC}	10.00 ± 0.00^{Aac}	36.67 ± 13.33^{AaC}
<i>B. bassiana B</i>	10^6	10.00 ± 5.77^{Aac}	45.00 ± 2.89^{Aac}	53.33 ± 8.82^{Aac}	55.00 ± 2.89^{AaC}
	10^7	0.00 ± 0.00^{Bbc}	30.00 ± 5.77^{Aac}	83.33 ± 3.33^{AaC}	70.00 ± 5.77^{AaC}
	10^8	0.00 ± 0.00^{Bbc}	90.00 ± 5.77^{AaC}	60.00 ± 11.55^{Aac}	10.00 ± 5.77^{Aac}
السيطرة	0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 3.33	0.00 ± 0.00	93.33 ± 3.33

a= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة.

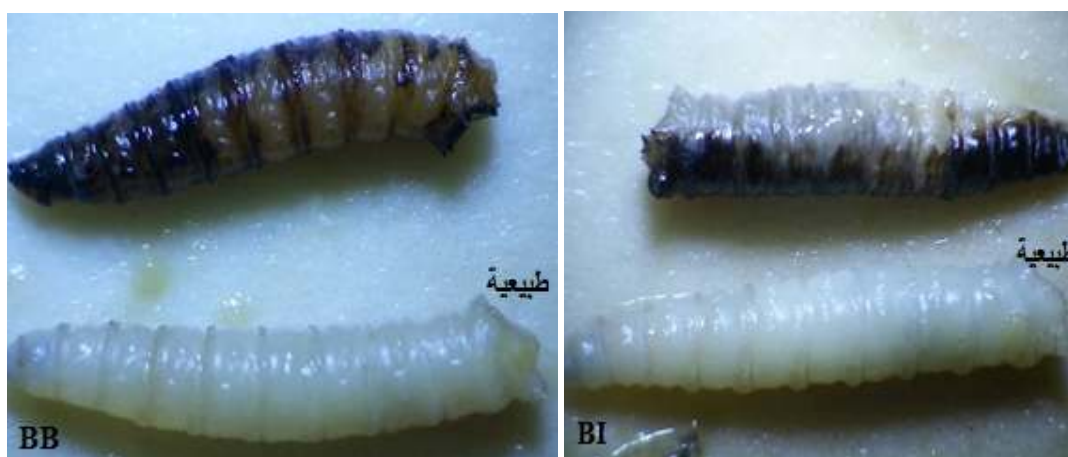
A= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بين نوعي العزلة والتراكيز.

b= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة.

B= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بين نوعي العزلة والتراكيز.

C= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بزيادة التركيز.

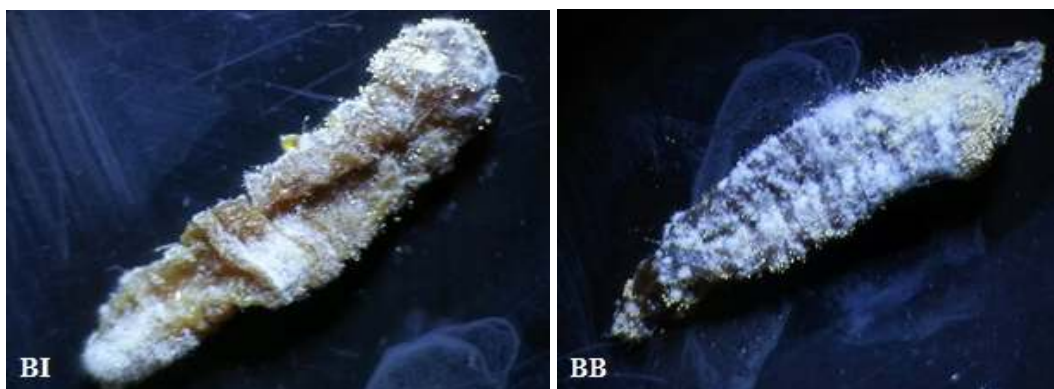
c= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بزيادة التركيز.



صورة رقم (1): يرقات الذباب *Ch. megacephala* الميتة المعاملة بمعلق فطر *B. bassiana*.

BB: يرقة معاملة بمعلق ابواغ العزلة المحلية

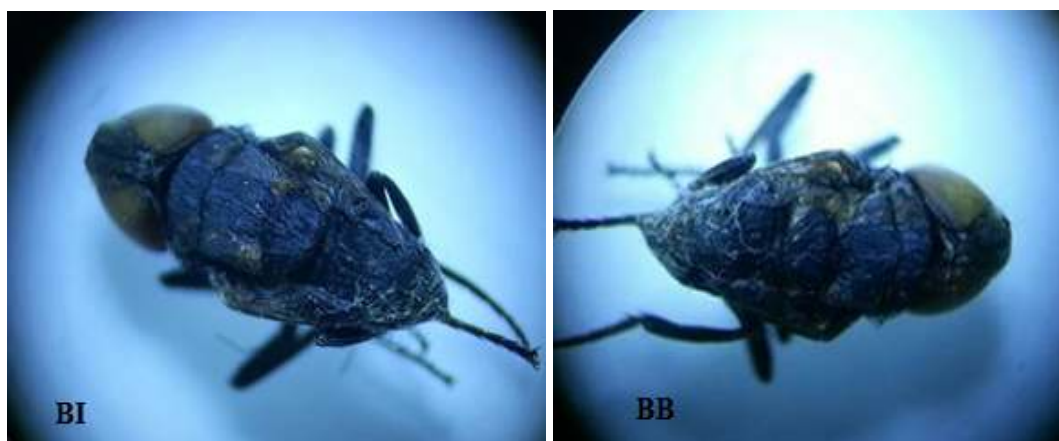
BI: يرقة معاملة بمعلق ابواغ العزلة المستوردة



صورة رقم (2): يرقات الذباب *Ch. megacephala* مصابة بالفطر *B. bassiana*.

BB: معاملة بالعزلة المحلية

BI: معاملة بالعزلة المستوردة



صورة رقم (3): بالغات الذباب *Ch. megacephala* مشوهة ومصابة بعزلة الفطر *B. bassiana*.

BB: معاملة بالعزلة المحلية

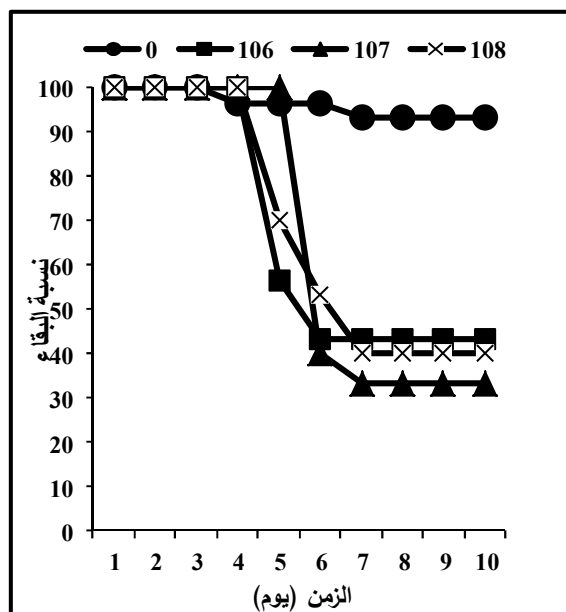
BI: معاملة بالعزلة المستوردة

حوالي 10% من المعاملة بتركيز 10^7 بوغ/ مل من معلق العزلة المحلية وأقل من 40% من معلق العزلة المستوردة لنفس التركيز. وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه صالح وآخرون (2010) (22)، من أن معاملة غذاء الأطوار اليرقية المبكرة للدودة القارضة *Agrotis oipisillia* بتركيز 10^7 بوغ/ مل من عزلة محلية من فطر *B. bassiana* أدى إلى تسجيل نسب هلاكات عالية جداً وصلت إلى تحت ظروف المختبر. وبهذا الصدد أيضاً، أشار Sharifard et al. (2011) (23) إلى أن معاملة غذاء يرقات الذباب المنزلي *Musca domestica* بتركيز 10^7 بوغ/ مل من معلق الفطر *B. bassiana* أدى إلى هلاكها بنسبة 98.4%، وكما تتفق نتائج دراستنا مع (17) إذ أشاروا إلى أن عدد يرقات الذباب *Culicoides* لا يتغير إلا بعد سبعة أيام من المعاملة بمعلق الفطر *B. bassiana*. وتتفق النتائج التي تم التوصل إليها كذلك مع Gobarry et al. (2014) (24) من أن معاملة غذاء يرقة الطور الثاني للدودة القارضة *Agrotis ipsilon* بتركيز 2×10^8 بوغ/ مل من معلق فطر *B. bassiana* أدى إلى هلاكها بعد سبعة أيام وظهور الغزل الفطري على جثث اليرقات الميتة بعد 10-13 يوم. إن نسب الهلاك العالية تعزى إلى نمو الفطر داخل القناة الهضمية للحشرة يصاحبه إفراز انزيمات وسموم تؤدي إلى هلاكها وتحلل أجسامها، إن من أهم هذه الانزيمات هو انزيم الـ Protease الذي يقوم بتحليل جزيئات البروتين المعقدة التي تدخل في بناء أنسجة جسم الحشرة، وكذلك انزيم Chitinase الذي يحلل مادة الكايتين التي تدخل في بطانة أجزاء من بعض أجهزة جسم الحشرة، وبعض السموم مثل Beauvercin يتبع ذلك نمو خارجي للهايفات (خارج جسم الحشرة

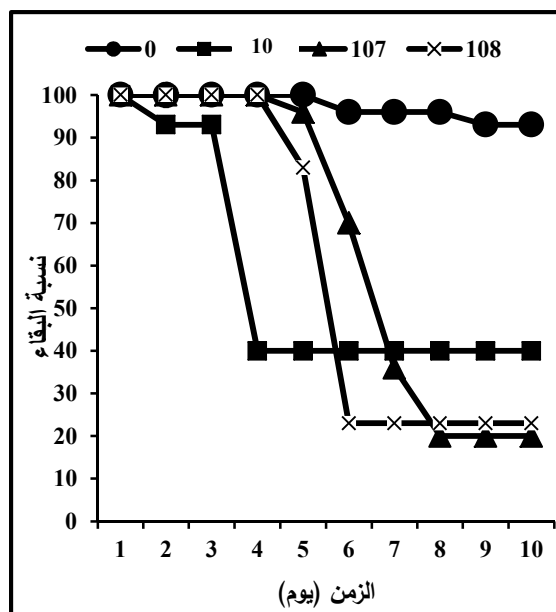
واختبر Mehinto et al. (2011) (15) سبعة عزلات للفطر *B. bassiana* وكانت فعالة في مكافحة يرقات ثاقبات براعم البقوليات *Maruca vitrata* وأن نسب الهلاك وصلت إلى 67.5% عند المعاملة بتركيز 10^8 بوغ/ مل من أحد تلك العزلات بعد 15 يوماً من المعاملة وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية. توضح النتائج في الشكل رقم (1) أن تقدم الإصابة بالفطر تؤدي إلى خفض نسب بقاء اليرقات المعاملة إلى حوالي 40% بعد الرش بتركيز 10^6 بوغ/ مل من العزلتين I & B، في حين يوضح الشكل رقم (2) أن نسبة بقاء اليرقات المعاملة أصبح صفراً أي موت جميع اليرقات المعاملة بتركيز 10^8 بوغ/ مل من معلق العزلة المحلية عند معاملة غذاء اليرقات بعد ثمانية أيام من المعاملة. إن هذه النتيجة تتفق مع نتائج دراسة (21)، حيث أوضحت أن رش حوريات الجراد *Uvarovistia zebra* بتركيز 1.5×10^8 بوغ/ مل من معلق الفطر *B. bassiana* يخفض نسبة بقائها إلى أقل من 20% بعد مرور 10 أيام من المعاملة. كما يوضح الجدول رقم (2) أن نتيجة معاملة غذاء يرقات الذباب المعدني بتركيز معلق أبواغ الفطر *B. bassiana* (العزلة I والعزلة B) أدى إلى حدوث نسب هلاكات تراكمية عالية وصلت إلى 100 و 53.33 عند المعاملة بتركيز 10^8 بوغ/ مل للعزلتين المحلية والمستوردة على التوالي، هذا بالتالي أدى إلى انخفاض نسبة خروج البالغات، وكذلك تم تسجيل تشوهات عالية تمثلت كذلك بتلون أجسام اليرقات الميتة وتحلل أجسامها، وقد سجلت فروق معنوية بين نسب الهلاك التراكمي ولعزلتي الفطر والتركيز فيما بينها. ويبين الشكل رقم (2) أن نسب بقاء اليرقات المتغذية على غذاء معاملة بمعلق عزلتي الفطر انخفض بشكل كبير جداً وصلت إلى

طبية واقتصادية وبذلك تشكل هاتين العزلتين عاملي مكافحة احيائية مهمة، وأن الاعتماد على العزلات المحلية يعد عاملاً فعالاً في الحد من انتشار الحشرات ونواقل الأمراض والتقليل من استعمال المبيدات الكيميائية المضرّة بالبيئة.

الميتة) الحاملة للعديد من الالبواغ التي تغطي جسمها بالكامل مشكلة مصدراً جديداً للعدوى. إن نتائج الدراسة تؤكد فاعلية العزلتين المحلية والمستوردة من السيطرة على حشرة *Ch. megacephala* وهي حشرة ذات أهمية



B. bassiana I



B. bassiana B

شكل رقم (1): بقاء يرقات ذبابة *Ch. megacephala* بعد رشها بمعلق عزلتي الفطر *B. bassiana* (I & B) بتركيزات مختلفة

جدول رقم (2): تأثير تراكيز متسلسلة من معلق ابواغ عزلتي *B. bassiana* I و *B. bassiana* B بطريقة معاملة غذاء يرقات الطور الثاني للذبابة *Ch. Megacephala*

نوع العزلة	التركيز بوغ/ مل	الهلاك بعد 3 ايام	معدل نسبة الهلاك التراكمي	نسبة التشوهات	نسب الخروج
Mean ± S.E.					
B. bassiana I	10^6	0 ± 0.00^{Bbc}	40 ± 0.00^{AaC}	23.33 ± 8.82^{Aac}	60 ± 0.00^{Aac}
	10^7	0 ± 0.00^{Bbc}	63.33 ± 6.67^{AaC}	10 ± 0.00^{Aac}	36.67 ± 6.67^{Aac}
	10^8	0 ± 0.00^{Bbc}	70.00 ± 0.00^{AaC}	13 ± 3.33^{AaC}	30 ± 0.00^{AaC}
B. bassiana B	10^6	0 ± 0.00^{Bbc}	65.17 ± 2.89^{Aac}	41.83 ± 9.22^{AaC}	34.83 ± 2.89^{Aac}
	10^7	0 ± 0.00^{Bbc}	93.5 ± 3.25^{AaC}	42.3 ± 2.20^{AaC}	7.25 ± 2.75^{Aac}
	10^8	0 ± 0.00^{Bbc}	100 ± 0.00^{AaC}	40 ± 11.55^{Aac}	*
السيطرة	0.0	0 ± 0.00	6.67 ± 3.33	0 ± 0.00	93.33 ± 3.33

a= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة.

A= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بين نوعي العزلة والتركيز.

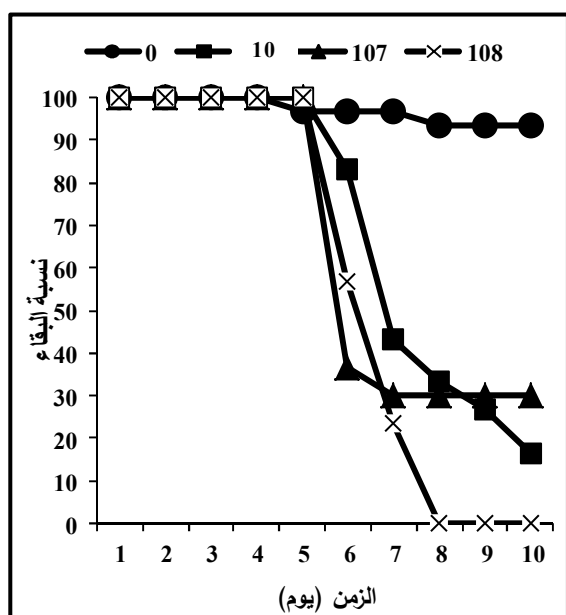
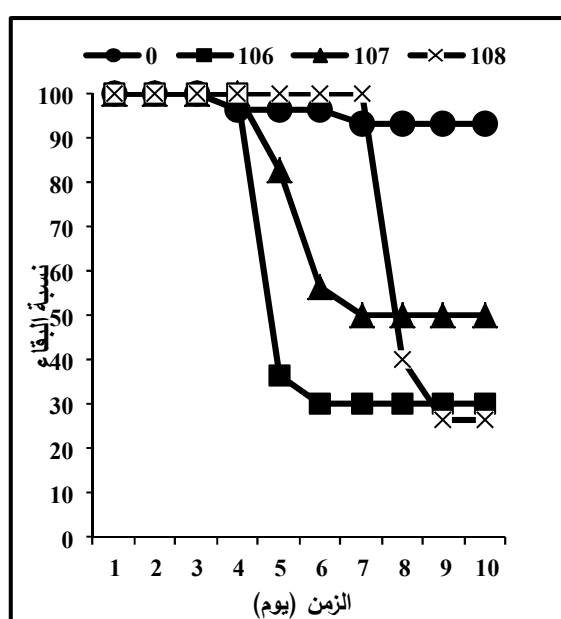
b= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة.

B= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بين نوعي العزلة والتركيز.

C= وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بزيادة التركيز.

c= عدم وجود فروق معنوية عند ($P < 0.05$) بزيادة التركيز.

* ماتت جميع اليرقات المعاملة.

*B. bassiana B**B. bassiana I*

شكل (2): بقاء يرقات ذبابة *Ch. megacephala* بعد معاملة الغذاء بمعلق عزلتي الفطر *B. bassiana* (I & B) بتركيزات مختلفة

المصادر

المزرعة ضمن محافظة واسط، العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة واسط. ص 82.

10. Esser JR. (1991). Biology of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and reduction of losses caused to the salted dried fish industry in South-East Asia. Bull. Entomol. 81: 33-41.

11. Kumari BR.; Vijayanharathi R.; Srinivas V. and Gopalakrishnan S. (2014). Microbes as interesting source of novel insecticides: A review. Afr. J. Biotechnol. 13(26): 2582-2592.

12. Fuxa JR. and Tanado X. (1987). Epizootiology of insect disease. J. Invert. Pathol. 84: 38-40.

13. Boucias DG. and Pendland JG. (1998). Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publisher. Boston, Dordrecht. London. P.: 537.

14. Bajwa WI. (2001). Insect pathogenic fungi (*Mycetozoa*). Integrated Plant Protection Center (IPPC). P.:10.

15. Mehinto JT.; Atachi P.; Kpindou OK D. and Tamo M. (2014). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on larvae of the legume pod borer *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) ARPN. J. Agri. Biol. Sci. 9(2): 55-64.

16. Zimmerman G. (2006). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its potential as biocontrol agent. Pest. Manag. Sci. 37: 375-379.

17. Narladkar BW.; Shivpuje PR. and Harke PC. (2015). Fungal biological control agents for integrated management of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) of livestock. Vet. World. 8(2): 156-163.

18. عبيد، وفاء برغشي، مهدي نوال صادق، حسام الدين عبد الله. (2013). فعالية فطر *Metarhizium anisopliae* في مكافحة الإحاثية للذبابة (Metchnikoff) Sorolsin

1. Marchiori CH. (2014). Species of Diptera of medical, sanitary and veterinary importance collected from buffalo and cattle dung in south Goiânia, Brazil. Int. J. Appl. Sci. Tech. 4(2): 54-57.

2. Zumpt F. (1965). Myiasis in man and animal in the old world. London, Butter Worths.

3. Green B. (1971). Flies and disease. Princeton University Press, Princeton, N.J. Pp.: 385-386.

4. Hadi FM. (2013). Isolation and identification of some intestinal parasites egg, cyst and oocysts from two species of Diptera: Calliphoridae in Baghdad. Ibn Al-Haitham J. Pure. Appl. Sci. 26(1): 64-74.

5. Sukontason KL.; Bunchoo M.; Khantawa B.; Piangjai S.; Rongsriyam Y. and Sukontason K. (2007). Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health. 38(1):38-44.

6. Carneiro JS.; Pires EM.; Nogueira R. M.; Shiomi HF.; Soares MA.; Oliveira M A. and Melo IS. (2014). Bacteria carried by *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) in Sinop, Mato Grosso, Brazil. Scient. Electr. Arch. 6: 18-22.

7. Lee HL. and Yong YK. (1991). Case report human aural myiasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health. 22(2): 274-275.

8. Baker EA.; Subramanian KN.; Jefferey J. and Oothuman P. (1984). Cutaneous myiasis in a burn case caused by *Chrysomya bezziana* Villeneuve, 1914 and *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1791) (Diptera: Calliphoridae). J. Malaysian Soc. Health. 4(1): 18-20.

9. الكوراني، أسماء فاضل عبد الرضا. (2016). دراسة مسحية وصفية لبعض يرقات الذباب المسبب للتدويد لبعض حيوانات

- المنزلية *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) مجلة تكريت للعلوم الصرفة. 18(5): 127-132.
19. Abbott WS. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
20. SAS. (2012). SAS/STAT users guide for personal computer release 6.12 SAS Institute. Inc. Cary, NC, USA.
21. Mohammadbeigi A. and Pork G. (2013). Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Meterhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tezzigonidae) via contact and ingestion. Int. J. Agri. Crop. Sci. 5(2): 138-146.
22. صالح، حمود مهدي؛ عبود، فاتن حمادة؛ موسى، منال خليل وسعيد، فالح حسن. (2010). تقويم كفاءة الفطرين *Beauveria bassiana* و *Verticillium lecanii* في مكافحة حشرة الدودة القارضة *Agrotis oipisillia*. مجلة كلية العلوم الجامعة. 13-6 : (2)2
23. Sharififard M.; Mossadegh MS.; Vazirianzadeh B. and Zarei Mahmoudabadi A. (2011). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Meterhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. to larvae and adult of house fly *Musca domestica* L. (Diptora: Muscidae). Asian. J. Biol. Sci. 4(2): 128-137.
24. Gabarty A.; Salem HM.; Foudab MA.; Abasb AA. and Ibrahimc AA. (2014). Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.). J. Rad. Res. Appl. Sci. 7(1): 95-100.
25. Pendland JC.; Hung SY. and Boucias DG. (1993). Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. J. Bacteriol. 175(18): 5962-5969.

السمية الحادة لمبيد الأعشاب 2,4-D على سمكة البعوض *Gambusia affinis*

رنا عبد الفتاح كمال (*)، عادل حسين طالب

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق
(*) طالبة برنامج الماجستير

البريد الإلكتروني: ranakamal_iraq@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

سعى البحث الحالي لدراسة التأثيرات السمية الحادة لمبيد الأعشاب 2,4-D في سمكة البعوض *Gambusia affinis*، استعملت في هذه الدراسة التراكيز (10,15,20,25,30,35,40,45,50,55) (mg/l) ولمدة 72 ساعة واستخدم كل من التركيز الوسطي القاتل LC50 والتغيرات السلوكية معياراً للتأثيرات السمية الحادة. أظهرت النتائج أن التركيز الوسطي القاتل LC50 لمبيد 2,4-D 32.5 mg/l، كما ظهر أيضاً بأن التغيرات السلوكية المتمثلة بالسباحة غير المنتظمة والهيجان وفقدان التوازن وزيادة حركة الغطاء الغلصمي وملامسة زجاج الحوض أنها تزداد بزيادة التراكيز.

الكلمات المفتاحية: سمك البعوض، 2,4-D

The acute toxicity of 2,4-D herbicide on *Gambusia affinis* (Mosquito fish)

Rana Abdulfattah Kamal (*) and Adel H. Talib

Dept. of Biology/ College of Sciences for Women / University of Baghdad / Republic of Iraq
(*) Master Degree Student

ABSTRACT

The present research aimed to study the acute effects of 2,4-D herbicide on mosquito fish (*Gambusia affinis*) using several concentrations for studying acute effects of the herbicide (10,15,20,25,30,35,40,45,50,55) (mg/l) for 72 hours, to determine the median lethal concentration (LC50) and the behavioral changes were used as a standard for those effects.

The value of LC50 for 2,4-D herbicide was (32.5) mg/l. The results show also that behavioral changes as erratic swimming, hyperactivity, loss of equilibrium, increased in gills operculum and touching aquarium glasses, were increased with increasing concentrations.

المقدمة

المواد وطرق العمل

الإعداد للتجربة: أجريت التجربة للمدة من شهر كانون الأول 2015 ولغاية شهر أيار 2016 من ضمنها أسبوعين لأقلمة الأسماك. واستعمل 22 حوضاً زجاجياً بأبعاد الأحواض (40x20x20) سم، وكانت سعة الماء في كل حوض 14 لتراً.

وضعت الأحواض الزجاجية على حوامل حديدية بارتفاع 100 سم وبعرض 100 سم وبطول 180 سم، تستند هذه الأحواض من الأسفل على طبقة من الفلين بسمك 10 سم لتخفيف أثر الصدمات على الأحواض الزجاجية. وضعت أغطية على الأحواض الزجاجية مصنوعة من مشبك بلاستيك محاط بإطار من الخشب لمنع قفز الأسماك خارج الأحواض أثناء مدة التجربة. جهزت الأحواض بمصدر أوكسجين مستمر بواسطة مضخات هواء مثبتة على ارتفاعات مناسبة من الأحواض الزجاجية تمتد منها أنابيب بلاستيكية مرنة إلى قعر الأحواض الزجاجية مربوطة بها حجرة صغيرة لتنقيتها قريبة من القعر، لتجهز ماء الأحواض بالأوكسجين. زودت الأحواض بالماء بواسطة مضخة ماء مربوطة مع خزان ماء سعة 500 لتر يبقى الماء فيه 48 ساعة قبل الاستعمال للتخلص من الكلور الموجود في الماء، ويتم تبديل الماء يدوياً بواسطة ماصة بلاستيكية وبطريقة السيفون، ويتم تنظيف الأحواض بواسطة ماصة ميكانيكية صينية الصنع Aquarium Battery Cleaner. تمت السيطرة على درجة حرارة الماء في الأحواض الزجاجية بواسطة أجهزة تدفئة صينية الصنع بقوة 50 واط عند الحاجة لإبقاء درجة حرارة الماء عند الدرجة المطلوبة أثناء انخفاض درجات الحرارة 25-22°م.

أسماك التجربة: جمعت أسماك البعوض *Gambusia affinis* من قنوات الجادرية، جامعة بغداد بواسطة شبكة للصيد وبقطر فتحة 2.5 ملم وبعدد 900 سمكة. استعملت منها 800 سمكة ووزن يتراوح بين (0.3-0.4) غم وبطول يتراوح بين (30-40) ملم.

أقلمة الأسماك: وضعت أسماك التجربة بعد جمعها في محلول ملحي بتركيز 1% لمدة ساعة لغرض تطهيرها من الطفيليات الخارجية إن وجدت والتي قد تؤثر في نتائج التجربة. ثم وزعت الأسماك بشكل عشوائي ومتساو على الأحواض. وزعت الأسماك بعد انتهاء مدة الأقلمة بمعدل 10 أسماك للحوض الواحد، مع مراعاة تقارب أوزان وأعمار الأسماك قدر الإمكان في جميع الوحدات التجريبية بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة. غذيت الأسماك بنسبة 0.5% من وزن الجسم الحي الرطب أثناء مدة التجربة مرتين. نظفت الأحواض يومياً قبل وبعد تقديم الغذاء للتخلص من الفضلات وبقياء الغذاء بواسطة ماصة ميكانيكية، وتم تبديل ماء الحوض على فترات منتظمة وبطريقة السيفون. تم وزن الأسماك كل أسبوعين بواسطة ميزان حساس وبنظام إضاءة 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام.

استعملت الرقائق الجافة flake food والمعروفة بالاسم التجاري Basic Flake والمتوفرة في الأسواق، والمكونة من:

- 1- بروتين 38%
- 2- دهن 3%
- 3- ألياف 5%

المحلول المخزون: حضر المحلول المخزون للمبيد بأخذ 100 مل من المبيد وأكمل الحجم إلى 900 مل بماء مقطر. واستخدم هذا المحلول لمرة واحدة، حيث يتم تحضيره آنياً لكل المعاملات لتلافي تحلل المبيد وأيضاً لحماية المحلول من الضوء ومن ارتفاع درجة الحرارة. استعملت هذه الطريقة لتحضير التراكيز المطلوبة بالاعتماد على المادة الفعالة في المبيد (15).

التغيرات السلوكية: وتشمل مراقبة وتسجيل الملاحظات التي طرأت وأدت إلى تغيير في سلوك الأسماك نتيجة التعرض الحاد للمبيد لمدة 72 ساعة، وتشمل: الحركة والسباحة وحركة الغلاصم والتنفس.

التركيز الوسطي القاتل LC50: تم قياس التركيز الوسطي القاتل للمبيد 2,4-D باستعمال 10 معاملات، كل معاملة تضم 10 أسماك وبثلاث مكررات لكل معاملة، وبتركييزات بلغت (10 و15 و20 و25 و30 و35 و40 و45 و50 و55) ملغم/لتر.

تعرف المبيدات بأنها مادة أو خليط من المواد تستخدم للسيطرة على الآفات الزراعية (حشرات أو أدغال) والتي تعد ضارة بكل أنواعها للإنسان والحيوان والنبات والتي تؤثر في بيئة وصحة المجتمع (1) وتوجد أنواع متعددة من المبيدات تختلف حسب طبيعة عملها أو الاستفادة منها، كمبيدات الحشرات Insecticide، ومبيدات الأعشاب الضارة (الأدغال) Herbicide، ومبيدات الفطريات Fungicide، ومبيدات القوارض Rodenticide، وغيرها من الأنواع الأخرى كمبيدات Nematicide، ومبيدات العناكب Acaricide (2).

إن مبيدات الأعشاب المعروفة عالمياً بقاتلة الأدغال weed killer تستعمل لقتل النباتات غير المرغوبة، ومن مبيدات الأعشاب ما هو انتقائي يقتل أهدافاً خاصة، بينما يترك المحصول المستهدف عادة بدون أضرار (3). وكذلك تقضي على الأمراض التي تصيب النباتات النافعة (4). ويصل ما نسبته 98% من مبيدات الحشرات المرشوشة وكذلك 95% من مبيدات الأعشاب إلى مسافات أبعد من المناطق المستهدفة (5).

مبيد الأعشاب 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid: الاسم الشائع له 2,4-D هو مبيد أعشاب جهازى يستعمل للسيطرة على الأعشاب الضارة ذات الأوراق العريضة (6). يعمل كممنظم نمو نباتي ثانوي مشابه في تأثيره للهرمون النباتي الطبيعي الأوكسين auxin وهذا ينتج عنه إفراط بالنمو ثم النفوق (7). إن المبيد 2,4-D يدخل البيئة أولاً عبر الاستعمالات الزراعية والتجارية، وكذلك المنزلية، حيث تمثل المصادر الرئيسة لتلوث البيئة. ويعتبر انتقال المبيدات من مناطق استعمالها إلى المياه السطحية والجوفية مشكلة شائعة. ومما يزيد من خطورة مبيد 2,4-D كونه عالي الذوبانية في الماء وضعيف الامتصاص بالتربة (8). تتعرض الأسماك والأحياء المائية للمبيدات بثلاث طرق (9)، وهي:

- 1- الامتصاص المباشر: بواسطة الجلد عن طريق السباحة في المياه الملوثة بالمبيدات.
- 2- التنفس: من خلال الدخول المباشر للمبيدات عن طريق الغلاصم أثناء التنفس.
- 3- الفم: بواسطة شرب المبيدات عن طريق المياه الملوثة بالمبيدات أو التغذية على الفرائس الملوثة بالمبيدات.

سمكة البعوض *Gambusia affinis*: هي من أسماك المياه العذبة المعروفة باسمها المحلي كمبوزيا أو سمكة البعوض الغربية Westren Mosquito Fish وذلك لتميزها عن سمكة البعوض الشرقية Estren Mosquito Fish. الموطن الأصلي لسمكة البعوض هي مصبات الأنهار على خليج المكسيك (10)، حيث أدخلت في القرن العشرين إلى العديد من الدول (11)، وكذلك لها انتشار واسع في الشرق الأوسط، وفي الدول النامية (12). وقد عثر عليها بمحافظتي السليمانية والبصرة في جمهورية العراق.

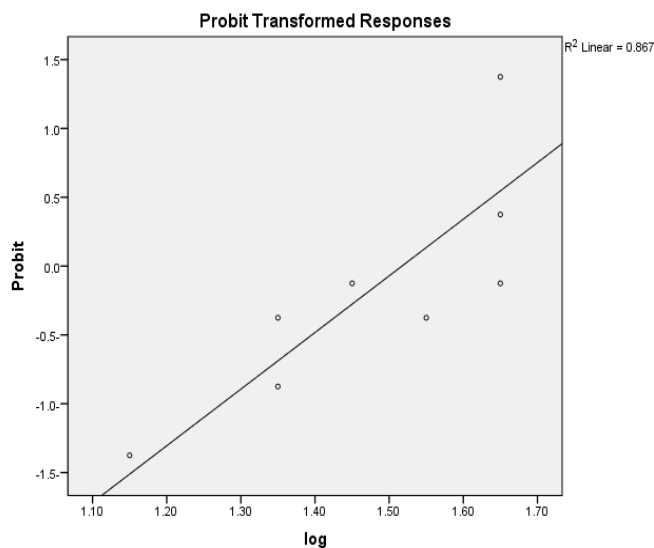
تفضل سمكة البعوض العيش في المياه الدافئة والضحلة وبطيئة الحركة، وذات نمو نباتي ومحتوى معدني عالٍ، ووفرة بالمغذيات. لذلك تنزاد أعداد الكمبوزيا في المياه العذبة. وتتواجد أيضاً في البرك والبحيرات والقنوات والجداول والأنهار والعيون (13).

تمتاز هذه السمكة بقدرتها على تحمل درجات الحرارة العالية التي قد تصل إلى 44-42°م، ويمكنها أيضاً العيش في مياه عالية الملوحة ونسبة الأوكسجين فيها منخفضة، وفي مياه الصرف الملوثة ببقع الزيوت وبعض بقايا الألبان. لهذا السبب تكون واسعة الانتشار في العالم لاسيما في منطقة خط الاستواء وتحت خط الاستواء (14). ولهذه الصفات المميزة لسمكة البعوض يفضل استخدامها في الكثير من البحوث.

نظراً للاستخدام الغير آمن والمفرط للمبيدات في البيئة العراقية، وقلة الدراسات حول تأثير مبيدات الأعشاب على الأسماك في العراق، تم إجراء هذا البحث من أجل الكشف عن التغيرات التي يحدثها مبيد الأعشاب 2,4-D على سمكة البعوض، والتي تم تحديدها بما يلي:

- 1- التغيرات السلوكية Behavioural changes الناتجة من تأثير المبيد 2,4-dichlorophenoxyacetic acid في سمكة البعوض *Gambusia affinis*.
- 2- تحديد التركيز الوسطي القاتل Median lethal concentration (LC50) للمبيد 2,4-D.

النتائج والمناقشة



شكل رقم (1): التركيز الوسطي القاتل LC50-72h لمبيد الأعشاب 2,4-D لمبيد الأعشاب 2,4-D في *Gambusia affinis*

إن زيادة سرعة حركة الغطاء الغلصمي لسمة البعوض مرتبطة بالاستجابة المفاجئة للسّمك لحدوث حالة الصدمة نتيجة التعرض للمواد الكيميائية (24). إن انخفاض سرعة حركة الغطاء الغلصمي المسجل بالتجربة يعود إلى تأثير المركز التنفسي في الدماغ أثناء التعرض للمبيدات، مما سبب فشلاً في وظيفة الجهاز التنفسي (25). سجلت نتائج الدراسة الحالية حصولاً لزيادة في إفراز المخاط على الخيوط الغلصمية ووسط الجسم، وهي استجابة طبيعية للأسماك، إذ يعمل المخاط كحاجز لتركيز المواد الضرورية والأساسية للأسماك من المحيط، ويعمل المخاط بنفس الوقت على التقليل من الإصابات والأذى الفيزيائي (26). وهذا يتفق مع دراسة (27). أظهرت نتائج دراسة (28) بأن سمية المبيد تؤدي إلى ظهور بعض التغيرات السلوكية في إناث أسماك البعوض عند تعرضها لتركيزات مختلفة من مبيد الأعشاب الكلافوسيت لمدة 28 يوماً، إذ لوحظ سباحة الأسماك بصورة عشوائية وبمختلف الاتجاهات وأن هذه الأفعال تزداد شدة بزيادة تركيز المبيد، وهي تتفق مع ما ذكره كل من (29) و(30)، وأن الحركة الدورانية التي قامت بها الأسماك المتأثرة وتحسن الجوانب يتفق مع دراسة (25).

أثبتت نتائج الدراسة الحالية سمية مبيد الأعشاب 2,4-D على أسماك البعوض، إذ تم اتباع طريقة التركيز الوسطي القاتل لقياس سمية المبيد ولمدة 72 ساعة، حيث بلغت قيمته 32.5 ملغم/لتر في سمية البعوض. وهذه النتيجة مقارنة بقيمة LC50 في دراسة تأثير مبيد 2,4-D على سمك (*Poecilia vivipara*) (31)، إذ بلغت قيمة LC50 (34.64) ملغم/لتر.

بينت عدة بحوث تباين سمية مبيد 2,4-D في أنواع الأسماك الأخرى، فقد بلغت قيمة LC50 لمبيد 2,4-D في إصبعيات سمك *Labeo rohita* 29.25 ملغم/لتر (32)، (33) عند تعرضه لمبيد 2,4-D لأسماك *Geophagus brasiliensis*، حيث بلغت قيمة LC50 28.28 ملغم/لتر.

إن هذا التباين في قيمة التركيز الوسطي القاتل للأسماك قد يعود إلى أسباب، منها:

1- تتأثر سمية المواد الكيميائية في الأحياء المائية بعمر وحجم وصحة الأنواع المعرضة وبالخصائص الفيزيائية والكيميائية للماء مثل درجة الحرارة والأس الهيدروجيني وكمية الأوكسجين الذائب بالماء ونوع وكمية النباتات المائية، أيضاً شكل المركبات الكيميائية السامة ومدة تعرضها (34).

التغيرات السلوكية للأسماك المعرضة لمبيد الأعشاب 2,4-D لمدة 72 ساعة: بينت النتائج أن سلوك السمك يضطرب بعد تعرضه إلى تركيزات مختلفة من مبيد الأعشاب 2,4-D، إذ أظهرت نتائج التجربة حدوث اضطرابات للأسماك حيث قامت بحركات غير طبيعية ولا إرادية متمثلة بالسباحة بسرعة وفي اتجاهات مختلفة وبصورة غير منتظمة، وقيام السمك بالقفز للأعلى والعودة للاستقرار بالحوض لفترات قصيرة ومن ثم معاودة القفز عدة مرات. كما لوحظ سباحة الأسماك قرب قاع الحوض وملامستها لزجاج الحوض بكثرة وانزعاجها في زوايا الحوض. ولوحظ في نهاية التجربة خمول السمك وتجمعه في زوايا الحوض وزيادة سرعة حركة الغطاء الغلصمي، ثم تناقص سرعة حركة الغطاء، مع زيادة التركيز. كما سجلت زيادة في إفراز المخاط على سطح جسم السمكة، وملاحظة سباحة السمك على ظهره وقلة توازنه، وقلة استجابته للمحفزات الخارجية. وكذلك شحوب لون السمك حتى أصبح فاتحاً جداً وباهتاً، وحدثت حالة احتقان واضح، وأصبح جسم السمكة مستقيماً وانصبت الزعانف الكثيفة لتعكس حالة الوفاة.

التركيز الوسطي القاتل LC50 لمبيد الأعشاب 2,4-D: بلغت قيمة التركيز الوسطي القاتل للأسماك المعرضة تعرضاً حاداً لمبيد الأعشاب 2,4-D ولمدة 72 ساعة، حيث تم حساب النسبة المئوية للوفيات لكل مجموعة من الأسماك المعرضة للتسمم الحاد للمبيد، وكما هو مبين في الجدول رقم (1). وباستخدام طريقة propite الإحصائية وبرنامج SPSS، تم تعيين التركيز الوسطي القاتل LC50 للمبيد كما في الشكل رقم (1). وقد بلغت قيمته 32.5 ملغم/لتر لنصف أعداد أسماك التجربة. أما قيمة التركيز القاتل LC100 لكل الأسماك، فقد بلغت 55 ملغم/لتر.

جدول رقم (1): سمية مبيد الأعشاب 2,4-D في أسماك البعوض وبتراكيز مختلفة خلال 72 ساعة

التركيز ملغم/لتر	لو غار تيم التركيز	العدد الكلي للأسماك	% للوفيات	وحدات الاحتمالية
0	0	10	0	0
10	1	10	0	0
15	1.17	10	10	3.72
20	1.30	10	10	3.72
25	1.39	10	20	4.16
30	1.47	10	30	4.48
35	1.54	10	40	4.75
40	1.60	10	50	5
45	1.65	10	80	5.84
50	1.69	10	90	6.28
55	1.74	10	100	7.33

إن السباحة بعصبية والارتعاشات وحدث التهييج المفاجئ للسمك المسجل بالتجربة يعود إلى تراكم Acetylcholin Esterse في التشابكات العصبية العضلية (16)، كما يعود فقدان التوازن الحاصل للسمك في التجربة إلى تثبيط عمل إنزيم brain cytochrom C oxidase في الدماغ الذي يسبب تلفاً في المناطق المسؤولة عن الحفاظ على التوازن في الدماغ (17). وهذا يتفق مع نتائج دراسة (18).

يعزى صعود السمك إلى سطح الماء للأعلى عند تعرضه للمبيد لحصوله على الأوكسجين من الجو (19)، وهذا يتفق مع دراسة (20).

إن تغيير لون السمك من الفضي وتحوله إلى لون باهت أو شاحب ربما يعود إلى تدهور وظيفة الغدة النخامية، وهذا يسبب انخفاضاً في عدد وحجم حامل الأصباغ chromatophore وما تحتويه من صبغة (21). وهذا يتفق مع دراسة (22) في التراكيز القاتلة وسمية بعض xenobiotics على الأحياء المائية. وكذلك اتفقت الدراسة الحالية مع دراسة (23) في التأثيرات المرضية والسمية لمبيد الأندوسلفان على سمك الكارب *Cyprinus carpio*.

15. العزاوي، أحمد جاسم محمد . (2010). تأثير مبيد Gramoxone و Cypermethrin في أسماك الكارب الاعتيادي وتراكمها عبر السلسلة الغذائية. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم ، جامعة بغداد ص 150.

16. Rao JV.; Begum G.; Pallela G.; Usman PK. and Rao RN.(2005). Changes in behavior and brain acetylcholine esterase activity in mosquito fish *Gambusia affinis* in relation to sub-lethal exposure of chlorpyrifos. Int. J. Environ. Res. Publ. Health. 2(3-4): 478-483.

17. David M.; Ramesh H.; Deshpande SP.; Chebbi SG. and Krishnamurthy G. (2007). Respiratory distress and behavioral changes induced by sodium cyanide in the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 18(2): 1-11.

18. Kolo RJ.; Yisa TA. and Esogban SA. (2009). Acute toxicity of Round up (Glyphosate) on Juvenile Tilapia. J. Appl. Agri. 18(1):11-25.

19. Rajasekaran G.; Kavitha M.; Sudha R. and Kannan K.(2009). Impact of temperature on behaviour and respiratory responses of catfish *Clarias gariepinus*. J. Ecobiol. 24(3): 263-268.

20. Al-Swee DZ. (2014). Study the acute and chronic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in two species of Carp fish. M.Sc. Thesis. College of Science. University of Baghdad. P.: 149.

21. Ram RN.; Singh IJ. and Singh DV.(2001). Carbofuran induced impairment in the hypothalamo hypophysial - gonadal complex in the teleost, *Channa punctatus* (Bloch). J. Environ. Biol. 22(3): 193-200.

22. Farah MA.; Ateeq B.; Ali MN.; Sabir R. and Ahmad W. (2004). Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. *Chemosph.* 55(2): 257-265.

23. الرديني ، عبدالمطلب جاسم ، كاظم ، محمد هلال (2012). التأثيرات الدمية والسلوكية العصبية لمبيد الاندوسلفان في أسماك الكارب *Cyprinus carpio*. رسالة ماجستير. جامعة بغداد.

24. Chindah AC.; Braide SA. and Oranye RO. (2004). Response of a common Niger Delta Wetland Catfish to changes in pH. Niger Delta. *Biologia.* (4): 56-65.

25. Lushchak OV.; Kubrak OI.; Storey JM.; Storey KB. and Lushchak VI. (2009). Low toxicherbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosph.* 76(7):932-937.

26. Tophonon SS.; Kruatrachue M.; Upatham ES.; Pokethitiyook P.; Sahaphong S. and Jaritkhua S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Poll.* 121:307-320.

27. Micah AD.(2015). Toxicity of the glyphosate round-up on fingerlings of heteroclaris (hybrid). MSc. Thesis. University of Zaria. Nigeria. P.:152.

28. الجواوي، سهى عبد الخالق عبد الستار. (2005). دراسة سمية مبيد الأدغال الكاليفوسيت في بعض النواحي الحياتية والتكاثرية لإناث أسماك البعوض. رسالة ماجستير. كلية التربية ابن الهيثم . جامعة بغداد. ص 94.

29. Shalwei F.; Hedayati A.; Kolangi H.; Jahanbakhshi A. and Baghfalaki M. (2012). Evaluation of the acute toxicity of cypermethrin and

2- إن سمية الأسماك واسعة التنوع وتعتمد على الشكل الكيميائي لمبيد 2,4-D، فالإستر هو الشكل الأشد سمية من الشكل الحامضي والشكل الأميني (35).

3- تنتج الأسماك عادة إنزيمات إزالة التسمم detoxifying enzymes عندما تتعرض للتسمم، ولكن من الممكن أن يكون ذلك صعباً في حالات التعرض الحاد بسبب قصر الوقت اللازم لاستحداث تلك الإنزيمات كوسيلة لزيادة المناعة ضد التأثيرات السامة.

إن عجز السمك عن إزالة التسمم وإفراز نواتج الأيض، بالإضافة إلى التلف المباشر بسبب تسمم الخلايا الجلدية للغلاصم وكذلك التسبب بتدمير الكبد أيضاً (36)، والاختناق (37) كل هذا يسبب الوفيات السريعة المسجلة في التسمم الحاد.

المصادر

1. Nordberg M. *et al.* (2009). Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). *Pure. Appl. Chem.* 81(5): 829-970.

2. WHO. (2006). Pesticides and their application: For the control of vectors and pests of public health importance. 6th ed.

3. Yamamoto H. and Nakamura K. (2003). Sampling sediment and water in rice paddy fields and adjacent water bodies. In: Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, Volumes 1 & 2, Lee, P.W.; Aizawa, H.; Barefoot, A.C. & Murphy J.J.(Eds.). Pp.: 892-907.

4. NCAP. (2003). Malathion. J. Pest. Reform. 23(4): 10-15.

5. Miller GT. (2004). Sustaining the Earth. 6th ed. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9. Pp.:211-216.

6. United State Department of Agriculture(U.S.D.A.). (2006). 2,4-D Human health and ecological risk assessment. Forest service, agricultural handbook No.1(633):1-72.

7. Benli AÇK.; Sarikaya R.; Sepici-Dincel A.; Selvi M.; Sahin D. and Erkoç F. (2007). Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88:296-299.

8. Carlile B.(2006). Pesticide Selectivity. Health and the Environment. P.: 328.

9. Helfrich LA. (2009). Pesticides and aquatic animals: A guide to reducing impacts on aquatic systems.

10. Wheeler A.(1984). The world encyclopedia of fishes. Macdonald Co., London.

11. Koya Y.; Fujita A.; Niki F.; Ishikara E. and Miyama H. (2003). Sex differentiation and pubertal development of gonad in the viviparous mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 20:1231-1242.

12. Al-Haefedh YS. (2007). An eco-biological study of the mosquito fish, *Gambusia affinis* from the eastern province of Saudi Arabia. *Saudi. J. Biol. Sci.* 14(1):115-122.

13. Wydoski RS. and Whitney RR. (2003). Inland fishes of Washington. American Fisheries Society.

14. (WHO) World Health Organization (2003). Use of fish for mosquito control. Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo. Webb J.B. 1996. Mosquito fish (*Gambusia affinis* & *G. holbrooki*).

its effect on behavioral responses of *Caspian roach* (*Rutilus rutilus caspicus*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Global Vet. 9(2):215-219.

30. Wooten G. (1999). Herbicide spraying on okanogan national forest: Letter , to agencies, requesting. A review of serious problems caused by improper action. Available at: www.gwooten@methow.com

31. Vigário AF. and Sabóia-Morais SM. (2014). Effects of the 2, 4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. Pesq. Vet. Brasil. 34(6):523-528.

32. Arivu I.; Muniyan M.; Muthulingam M.; Parthiban P.; Ambedkar G. and Kamalkanth S. (2015). Toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on freshwater fingerlings *Labeo Rohita* (Hamilton). World J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 4:1173-1190.

33. Barbieri E. (2009). Effect of 2, 4-D herbicide (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824)(*Osteichthyes, Cichlidae*). Ecotoxicol. 18(1):55-60.

34. EPA. (2000). Pesticide Fact Sheet. Herbicide Profile 9/88. Available from www.epa.gov

35. National Pesticide Information Center. (2008). 2,4-D.Technical Fact Sheet. Available at: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>

36. Omoregie E.; Ofojekwu PC. and Amali EI. (1998). Effects of sublethal concentrations of formalin on weight gain in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). Asian. Fish. Soc. (10): 323-327.

37. Duffus JH. (1980). Environmental toxicity. London, U.K: Edward Arnord Publ. Ltd. Pp.: 21-103.

تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف للعليقة في الأداء الإنتاجي وبعض الصفات الفسلجية لفروج اللحم

لمى خالد بندر (1)، فراس مزاحم حسين (2)، إياد شهاب أحمد العبيدي (1)

(1) قسم الإنتاج الحيواني / كلية الزراعة / جامعة بغداد (2) دائرة البحوث الزراعية / وزارة الزراعة / بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: lumaalbender@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف للعلف في تحسين الصفات الإنتاجية وبعض الصفات الفسلجية لفروج اللحم. استخدم في التجربة (300) فرخ فروج لحم بعمر يوم واحد سلالة Ross 308 وبمعدل وزن 46 غم. وزعت الأفراخ عشوائياً على 4 معاملات تجريبية، 90 فرخ/معاملة/3 مكررات للمعاملة 25/ طير لكل مكرر. شملت المعاملات إضافة حليب الكفير المجفف والمحمل على كسبة فول الصويا وفيها التراكمز الآتية: المعاملة الأولى السيطرة (T_1) من دون أي إضافات، T_2 ، T_3 ، T_4 اضيف لها حليب الكفير المجفف مع المادة الحاملة الى العلف بالتراكيز 0.1، 0.2، 0.3% على التوالي. وقد بينت نتائج الدراسة ما يأتي، تفوقت معنويًا ($P \leq 0.05$) في المعاملات (T_4 ، T_3) في معدل وزن الجسم عند عمر 3 و 5 أسابيع، والزيادة الوزنية، وخلال فترات التجربة المختلفة. وحصل انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في معدل استهلاك العلف لطيور المعاملة (T_4) وحصل للفترة (0-3) و (0-5) أسبوع مقارنة مع المعاملات الأخرى. ولوحظ تحسن معنوي ($P \leq 0.05$) في معامل التحويل الغذائي للمعاملة (T_4) وخلال فترات التربية المختلفة. أظهرت النتائج ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في نسبة التصافي للمعاملات التي اضيف لها حليب الكفير مقارنة مع معاملة السيطرة و ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في الوزن النسبي لقطعة الصدر للمعاملتين (T_4 ، T_3). وحصل انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في تركيز الكوليسترول لبلالزما طيور المعاملة (T_4) مقارنة بمعاملة السيطرة وظهر انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في تركيز LDL للمعاملتين (T_4 ، T_3)، ولوحظ وجود ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في الاعداد اللوغاريتمية لبكتريا العصيات اللبنية لمعاملات إضافة حليب الكفير المجفف (T_4 ، T_3)، كما لوحظ انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) بأعداد بكتريا القولون E.coli في معاملات الإضافة جميعا (T_4 ، T_3 ، T_2). مما تقدم، تستنتج الدراسة بأن إضافة حليب الكفير مع العلف لفروج اللحم قد أحدث تأثيراً إيجابياً في الأداء الإنتاجي وبعض الصفات الفسلجية.

الكلمات المفتاحية: حليب الكفير المجفف، فروج اللحم، العليقة.

Effect of supplementing different levels of Kefir milk to the diets on productive performance and some physiological traits of broiler

Luma Kh. Bander (1), Firas M. Alkhilani (2) and Ayad S.A. Alobaidy (1)

(1) Dept. of Animal Production / College of Agriculture / University of Baghdad (2) Agricultural Research Directorate / Ministry of Agriculture / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of adding different levels of dried kefir milk (DMK) to the broiler diet on productive performance and some physiological traits. Three hundred on day, unsexed ross308 chicks were used in this study with initial body weight of 46 g per chick. The chicks were randomly distributed in the four equal experimental treatments (90 chicks /treatment/3 replicate /25 chicks /replicate). Kefir milk was prepared as loaded on the soybean meal and added to diets, (T_1) control treatment without any addition, whereas the DMK was added to T_2 , T_3 and T_4 treatment diet as 0.1, 0.2 and 0.3 % respectively and the results showed the following: A significantly increasing ($P \leq 0.05$) in average of body weight of the T_3 and T_4 in age of 3,5 weeks also addition of kefir milk to diet (T_3 , T_4) led to significant increase in weight gain during different experiment period, A significantly decreasing ($P \leq 0.05$) in feed intake was noticed in T_4 during the period (0-3), (0-5) weeks. It has been noticed that kefir milk 0.3% addition (T_4) was significantly in proved feed conversion ratio. A significantly increasing ($P \leq 0.05$) in dressing percentage and breast cut in all DKM treatments was noticed. It has been observed that there was a significant decrease in cholesterol, LDL in kefir milk treatment. Highly significant ($P \leq 0.01$) logarithm number of intestinal lactobacilli was observed in (T_3 , T_4) other hand, greater ($P \leq 0.01$) logarithm number of E.coli was showed in T_1 compared with other groups. The results indicated that broiler basal diets supplementation with dried milk kefir enhanced broiler performance and some physiological traits.

المقدمة

جدول رقم (1): النسب المئوية والتركيب الكيميائي لعليقتي البادئ (21-1 يوما) والنهائي (22 – 35 يوما) خلال فترة التجربة

المادة	عليقة البادئ 1 – 21 يوم	عليقة العلف النهائي 22 – 35 يوم
	النسبة المئوية للمواد الغذائية %	النسبة المئوية للمواد الغذائية %
ذرة صفراء	30	39.93
حنطة	27	24
كسبة فول الصويا	32	25
مركز بروتين	5	5
دهن نباتي	3.5	4.4
داي كالسيوم فوسفات	0.7	0.9
حجر كلس	1.2	0.6
ملح طعام	0.1	0.1
مثيونين	0.25	0.07
لايسين	0.25	-
المجموع	100	100
التركيب الكيميائي		
البروتين الخام %	22	19.4
الطاقة الممتلئة كيلو سعرة/كغم	2981	3145
ميثيونين + سيستين	1.1	0.85
لايسين	1.4	1.04
كالسيوم	1.03	0.83
فسفور	0.47	0.49

تم تحضير حليب الكفير من وضع 10 غم من حبيبات الكفير لكل لتر من حليب الجاموس المبستر والخالي من الدهن، وتم تخميره لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة الغرفة وفي مكان مظلم. ثم خلط نصف كيلو من حليب الكفير المحضر مع كيلو غرام من كسبة فول الصويا ووضع في أطباق وأدخل في حاضنة وبدرجة حرارة 37 م لمدة 36 ساعة حتى يجف بشكل جيد.

يبين الجدول رقم (2) التركيب الكيميائي والقيم الغذائية للكفير المستخدم في التجربة والذي تم إحضاره من مدينة البصرة. شملت كل معاملة 3 مكررات في كل 25 طير. تم قياس الصفات الإنتاجية التي شملت كلا من معدلات أوزان الجسم، الزيادة الوزنية، استهلاك العلف، كفاءة التحويل الغذائي وخلال فترات التجربة (0-3)، (4-5) أسابيع من العمر وللفترة الكلية (0-5) أسابيع، وأيضاً نسبة التصافي والوزن النسبي لقطيعات الذبيحة. أما بالنسبة للصفات الفسلجية، فقد تم جمع نماذج الدم في نهاية التجربة (الأسبوع الخامس)، وذلك بأخذ 3 طيور من كل معاملة وبصورة عشوائية، وجمعت عينات الدم عن طريق ذبح الطيور ووضعها في أنابيب اختبار تحتوي على مانع تخثر (EDTA)، وذلك لقياس تراكيز الكوليسترول والكليبريدات الثلاثية وتركيز البروتينات الدهنية عالية ومنخفضة الكثافة في بلازما دم الطيور. وأخذت كمية من 1 غم من

نتيجة للتطور الكبير في صناعة الدواجن في العالم وسرعة معدلات النمو للسلاسل التجارية الحديثة لفروج اللحم، ظهرت مجموعة كبيرة متنوعة من مسببات الأمراض البكتيرية المقاومة بسبب الاستخدام العشوائي والمفرط للمضادات الحيوية، والتي استخدمت لعقود عديدة كإضافات غذائية لعلائق الطيور الداجنة (1) للحد من وتيرة الأمراض أو استخدامها كمنشطات للنمو وتحسين الأداء. وبالرغم من الآثار المضرة للتغذية بالمضادات الحيوية عن طريق تعديل البكتيريا المعوية، والمشاركة في هضم المواد الغذائية، إلا أنها تؤثر سلباً على صحة الحيوان والإنسان وإمكانية انتقال بكتيريا المقاومة من الحيوانات إلى البشر (2). لذلك بدأ الباحثون بإيجاد الحلول البديلة، وإدخال الوسائل الحديثة في تربية وتغذية الطيور الداجنة، وخاصة الطبيعية منها مثل استخدام المعززات الحيوية Probiotics، والتي تعمل على تعزيز الصفات الإنتاجية والفسلجية والمناخية للطيور الداجنة، وبالتالي الحصول على منتجات صالحة للأكل وأمنة (3،4). تبرز أهمية الأحياء المجهرية المستخدمة في المعززات الحيوية بقدرتها على الاستيطان على الخلايا الطلانية المبطن للفتحة الهضمية، وغلغ المستقبيلات على السطح المعوي، وبالشكل الذي يمنع وصول الميكروبات المرضية إليها وتسهيل إقصائها إلى خارج القناة الهضمية مع الفضلات (5). اتجهت الأنظار حديثاً إلى حليب الكفير الذي هو أحد أنواع المعززات الحيوية والناج من خلط حبيبات الكفير (مزرعة أحياء مجهرية مفيدة) مع الحليب (6،7). تتكون حبيبات الكفير من تجمع ميكروبين مكون من أنواع من بكتيريا حامض اللاكتيك، وبكتيريا حامض الخليك والخمائر (8). ويحوي على مواد رابطة بين مجاميع هذه الأحياء المجهرية تسمى الكيفيرات (Kefirum)، وهي عبارة عن سكريات متعددة تضم كميات متساوية من D-glucose و D-galactose (9). تكون حبيبات الكفير عادة مفصصة على شكل يشبه تركيب القرنيب وذات لون أبيض أو كريمي. الحبوب متوسطة الحجم وغير منتظمة في الطول، أو في الشكل ولها نسيج مخاطي ناعم الملمس وغروية الشكل (10)، وهو غني بالأحماض الأمينية والفيتامينات مثل B₂، A، D، K، B₁₂، والإنزيمات والمعادن وخاصة الكالسيوم والفسفور والمغنيسيوم، كما أنه يحتوي على العديد من مضادات الأكسدة، وله خصائص علاجية مختلفة (11)، كونه مضاداً لبعض أنواع البكتيريا والفطريات والفيروسات لاحتوائه على الأحياء المجهرية المفيدة التي يمكن أن تشكل خلال عملية التخمر. أظهرت بعض الدراسات الحديثة أن استخدام حليب الكفير مع ماء الشرب لفروج اللحم قد أعطى نتائجاً متميزة ومتفوقة معنوياً في الصفات الإنتاجية والنسجية والمناخية وصفات الذبيحة (12)، وذلك عند استخدام التراكيز (5،10،15،20 غم من حبيبات الكفير / لتر حليب أبقار)، وبعدها إضافة التراكيز المحضرة بكمية ثابتة إلى ماء الشرب (10 مل حليب كفير / لتر ماء). كما لاحظت دراسة جواد (13) حصول تفوق معنوي وإيجابي في الأداء الإنتاجي، والصفات النسجية والمناخية عند استخدامه لحليب الكفير، وبالنسب (0.2، 0.4، 0.6 حليب كفير مجفف مع المادة المحملة للعلف). تستهدف هذه الدراسة معرفة تأثير استخدام عدة مستويات من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في تحسين الأداء الإنتاجي، وبعض الصفات الفسيولوجية لفروج اللحم، وذلك لقلّة الدراسات في العالم حول إضافة حليب الكفير لعلف الطيور الداجنة.

المواد وطرق العمل

أجريت هذه الدراسة في محطة أبحاث الدواجن التابعة لدائرة البحوث الزراعية / وزارة الزراعة خلال الفترة من 2014/4/2 إلى 2014/5/6. استخدم في هذه التجربة 300 فرخ من نوع Ross بعمر يوم واحد، وبمعدل وزن 46 غم. تم تربية الأفراخ في قاعة مغلقة مكونة من 12 حجرة حيث وزعت الأفراخ عشوائياً على الحجر وبواقع 25 طيراً لكل حجرة وغذيت الطيور على عليقتين عليقة بادئ (21-1 يوماً). احتوت على نسبة بروتين 22%، وطاقة ممتلئة 2981 كيلو سعرة / كغم علف، وعليقة النهائي من 22 – 35 يوماً بنسبة بروتين 19% وطاقة ممتلئة 3145 كيلو سعرة / كغم علف (جدول رقم 1). تمت إضافة حليب الكفير المجفف مع المادة الحاملة والنسب 0.1، 0.2، 0.3 %، وجرت المقارنة مع معاملة السيطرة الخالية من أي إضافة (عليقة قياسية).

منطقة الصائم للطيور المذبوحة لإجراء العد البكتيري لبيكتيريا العصيات اللبنية وبيكتيريا القولون بحسب ما جاء في (14).

جدول رقم (2): التركيب الكيميائي والقيم الغذائية للكفير

المكونات %	100 غم	المعادن	100 غم	الفيتامينات	ملغم
الطاقة	65 كاليو سعرة	كالكسيوم	0.12	A	0.06
دهن %	3.5%	فسفور	0.10	كاروتين	0.02
بروتين %	3.3	مغنيسيوم	12	B1	0.04
لاكتوز %	4.0	بوتاسيوم	0.15	B2	0.17
الماء %	87.5	كلور	0.10	B6	0.05
Milk acid غم	0.8	صوديوم	0.05	B12	0.5
كحول اثيلي غم	0.9	موليبديوم	5.5	نياسين	0.09
حامض اللاكتيك	1	الحديد	0.05	C	1
كولسترول ملغم	13	نحاس	12	D	0.08
فوسفات ميكرو غرام	40	منغنيز	5	E	0.1
الاحماض الامينية الاساسية	غم	زنك	0.36		
تربتوفان	0.05				
فنيال الانين + تيروسين	0.35				
ليوسين	0.34				
ازوليوسين	0.21				
ثريونين	0.17				
مثنونين + سيسيتين	0.12				
لاسين	0.27				
فالين	0.22				

بنسبة 0.1% ، ، إذ بلغ معدل وزن الجسم لطيور هذه المعاملة (1944.30 غم) ، ولكنها اختلفت في هذا العمر (5 أسابيع) معنويا ($P \leq 0.05$) عن معاملة السيطرة ، والتي سجلت أدنى معدل لوزن الجسم والبالغ 1989.27 غم. ويشير نفس الجدول (3) إلى تأثير إضافة الكفير المجفف للعلف في معدل وزن الجسم خلال فترات تربية فروج اللحم الثلاثة (0-3، 3-5، 5-0) أسابيع، إذ لوحظ حصول تفوق معنوي ($P \leq 0.05$) لطيور المعاملتين T_4 ، T_3 خلال الفترة الأولى من عمر الطيور (0-3) أسبوع مقارنة بالمعاملتين الثانية ومعاملة السيطرة في حين حصل تفوق معنوي ($P \leq 0.05$) ملحوظ لمعاملات الكفير T_2 ، T_3 ، T_4 في معدل الزيادة الوزنية خلال الفترة الثانية (3-5 أسابيع) من عمر الطيور مقارنة بمعاملة السيطرة ، والتي سجلت أقل معدل وزيادة وزنية 9680.30 غم ، واستمر هذا التفوق المعنوي ($P \leq 0.05$) واضحا طيلة فترة التجربة (0-5) أسابيع، إذ تفوقت معنويا كل من المعاملة T_4 ، T_3 بمعدل زيادة وزنية 1911.53 و 1914.17 غم على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة ، ولم تختلف المعاملتان T_4 ، T_3 معنويا ($P \leq 0.05$) عن المعاملة T_2 ، إذ سجلت معدل زيادة وزنية 1898.30 غم ولكنها تفوقت معنويا ($P \leq 0.05$) عن معاملة السيطرة والتي بلغت فيها معدل الزيادة الوزنية 1843.60 غم خلال الفترة (5-0) أسبوع.

تم تحليل بيانات التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD باستعمال البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS) (15) ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود (16).

النتائج والمناقشة

يبين الجدول رقم (3) تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في معدل وزن الجسم الحي، إذ تفوقت معنويا ($P \leq 0.05$) معاملات الكفير (T_4 ، T_3) عند عمر ثلاثة أسابيع مقارنة مع المعاملة T_2 ومعاملة السيطرة T_1 . إذ بلغت الأوزان للمعاملتين الثالثة والرابعة 941.17 و 941.70 غم على التوالي، في حين سجلت المعاملة الثانية والسيطرة 916.57 و 920.97 غم على التوالي. أما عند عمر 5 أسابيع (عمر التسويق) فقد لوحظ استمرار الزيادة المعنوية ($P \leq 0.05$) في معدل وزن الجسم لطيور المعاملتين T_4 ، T_3 ، والتي سجلت 1958.53 و 1960.50 غم على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة T_1 ، ولكنها لم تختلف معنويا عن المعاملة الثانية، والتي أضيف إليها الكفير المجفف

جدول رقم (3): تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في معدل وزن الجسم الحي والزيادة الوزنية

المعاملات				الصفات المدروسة العمر(الأسابيع)
T ₄ الكفير المجفف 0.3%	T ₃ الكفير المجفف 0.2%	T ₂ الكفير المجفف 0.1%	T ₁ معاملة السيطرة	
معدل وزن الجسم (غم)				
941.70 ^A ±9.50	941.17 ^A ±37.65	916.57 ^B ±28.15	920.97 ^B ±35.27	3
1960.50 ^A ±47.49	1958.53 ^A ±61.19	1944.30 ^{AB} ±30.56	1889.27 ^C ±54.33	5
معدل الزيادة الوزنية (غم)				
895.37 ^A ±9.24	894.70 ^A ±32.16	870.57 ^B ±27.70	875.30 ^B ±33.28	3-0
1018.80 ^A ±41.36	1017.37 ^A ±26.75	1027.73 ^A ±19.09	968.30 ^B ±18.89	5-3
1914.17 ^A ±48.10	1911.53 ^A ±62.71	1898.30 ^{AB} ±30.85	1843.60 ^C ±51.73	5-0
*	*	*	*	مستوى المعنوية

*تشير الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($p < 0.05$)

تختلف معنويا عن معاملة السيطرة والمعاملة الثالث والتي سجلنا أعلى استهلاك للعلف 3523.30 و 3593.80 غم على التوالي. ويبين الجدول رقم (4) تأثير إضافة المستويات المختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في معاميل التحويل الغذائي (غم علف/غم زيادة وزنية) لطيور التجربة وخلال المراحل المختلفة للتربية إذ لوحظ تحسين معنوي ($P \leq 0.05$) في معمل التحويل الغذائي لطيور المعاملة T_4 خلال الفترة الأولى (3-0) أسبوع مقارنة بالمعاملة T_2 و T_3 والتي سجلنا أعلى معاميل تحويل غذائي في هذه الفترة (1.58 و 1.60) على التوالي لم تختلف معنويا عن معاملة السيطرة T_1 والتي أيضا لم تختلف معنويا عن المعاملة الرابعة والبالغة (1.41)، استمر هذا التحسن المعنوي ($P \leq 0.05$) في معاميل التحويل الغذائي للمعاملة T_4 والتي اضيف لها على نسبة من حليب الكفير المجفف 0.3% خلال الفترتين (3-0) و (5-0) أسبوع مقارنة مع معاملة السيطرة T_1 والمعاملة T_3 وهاتان المعاملتان لم تختلف معنويا ($P \leq 0.05$) عن المعاملة T_2 وهذه المعاملة لم تختلف معنويا عن المعاملة الرابعة أيضا، إذ لوحظ من خلال هذه الدراسة التحسن المعنوي ($P \leq 0.05$) لمعاميل التحويل الغذائي لطيور المعاملة T_4 والتي استخدم فيها المستوى العالي من حليب الكفير المجفف 0.3% طيلة فترة الدراسة.

جدول رقم (4): تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في معدل استهلاك العلف ومعاميل التحويل الغذائي خلال فترات التجربة المختلفة

الصفات المدروسة (العمر) (الأسابيع)	المعاملات			
	معاملة السيطرة T_1	الكفير المجفف 0.1 % T_2	الكفير المجفف 0.2 % T_3	الكفير المجفف 0.3 % T_4
معدل استهلاك العلف (غم)				
3-0	1312.27 ^{AB} ±47.01	1372.23 ^{AB} ±52.34	1421.00 ^A ±70.74	1264.43 ^B ±35.24
5 - 3	2210.40 ^A ±77.91	2058.90 ^B ±44.99	2172.80 ^A ±127.08	2114.70 ^{AB} ±127.27
5 - 0	3523.30 ^A ±96.68	3431.20 ^{AB} ±77.20	3593.80 ^A ±190.67	3379.10 ^B ±157.32
كفاءة التحويل الغذائي (غم / غم زيادة وزنية)				
3-0	1.5 ^{AB} ±0.08	1.58 ^A ±0.10	1.60 ^A ±0.14	1.41 ^B ±0.04
5 - 3	2.28 ^A ±0.04	2.00 ^{AB} ±0.08	2.14 ^A ±0.15	2.07 ^B ±0.05
5 - 0	1.91 ^A ±0.04	1.80 ^{AB} ±0.06	1.88 ^A ±0.15	1.76 ^B ±0.05

*تشير الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد الى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($p < 0.05$)

الغذائية وتحسن الوزن والزيادة الوزنية (18، 19). وقد يعود السبب إلى أن الأحياء المجهرية الموجودة في حليب الكفير تعمل على تثبيط وإقصاء البكتيريا المرضية، مما يتيح سيادة البكتيريا المفيدة على المرضية وتنافسها على غذائها ومواقع ارتباطها واستيطانها في القناة الهضمية، ومن ثم إزاحتها وطرحها للبكتيريا المرضية خارج الجسم (competitive exclusion) (20)، وبالتالي تحسن التوازن الطبيعي للفلورا المعوية بوقت مبكر في القناة الهضمية للطيور وزيادة سرعة امتصاص العناصر الغذائية، مما يعكس إيجابيا على معدل وزن الجسم والزيادة الوزنية (21).

لوحظ من خلال النتائج انخفاض استهلاك العلف من قبل طيور معاملات إضافة حليب الكفير المجفف وذلك بسبب تنوع الأحياء المجهرية المفيدة في حليب الكفير والتي تعد معززات حيوية وتقوم بإنتاج العديد من العناصر الغذائية الأساسية المهمة للنمو فضلا على إفراز بعض الإنزيمات مثل peptidase و proteinase وإنزيم الأميليز والتي تعمل على زيادة جاهزية العناصر الغذائية داخل القناة الهضمية للطيور، فضلا عن البروتينات والأحماض الأمينية والعضوية، مما يتيح انخفاض الحاجة الغذائية لطيور هذه المعاملات وخفض استهلاكها للعلف مقارنة بالسيطرة (22، 23). لوحظ تحسن في معاميل التحويل الغذائي لطيور المعاملات التي أضيف لها حليب الكفير، وقد يعزى السبب إلى أن إضافة الحليب قد أدت إلى زيادة كفاءة الهضم والامتصاص للعناصر الغذائية، والدور الذي يؤديه الحليب كمعزز حيوي فعال يعمل على زيادة أعداد الأحياء المجهرية المفيدة داخل القناة الهضمية والتي تقوم بتحسين القيمة الغذائية للعناصر الغذائية الموجودة في العليقة، من خلال ربطها بجدارها الخلوي، وبالتالي زيادة امتصاص العناصر الغذائية المهضومة، وزيادة نشاط ونمو الخلايا المعوية التي تقوم بامتصاص الغذاء

أما بالنسبة لمعدل استهلاك العلف للطيور خلال المراحل المختلفة للتجربة، فقد لوحظ من خلال الجدول رقم (4) ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة T_3 مقارنة بالمعاملة T_4 والتي سجلت أدنى استهلاك للعلف (1264.43 غم) خلال الفترة الأولى من التربية ولكنها لم تختلف معنويا عن المعاملة T_1 و T_2 وأيضا لم تختلف المعاملة T_3 معنويا في معدل استهلاك العلف عن المعاملتين الأولى والثانية خلال الفترة (3-0) أسبوع. أما الفترة الثانية من التربية (3-5) فقد لوحظ انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) واضح جدا في استهلاك العلف لطيور المعاملة T_2 والتي سجلت 2058.90 غم مقارنة بالمعاملتين T_1 و T_3 والبالغة 2210.40 و 2172.80 غم على التوالي ولكن هذه المعاملتين لم تختلف معنويا عن المعاملة T_4 والتي بلغ استهلاك العلف فيها 2114.70 غم والتي لم تختلف معنويا عن المعاملة T_2 خلال الفترة الثانية من التربية. ويلاحظ أيضا من خلال الجدول رقم (4) أن الانخفاض المعنوي ($P \leq 0.05$) لمعدل استهلاك العلف كان واضحا خلال الفترة الكلية للتربية (3-0) للمعاملة T_4 والتي اضيف إليها النسبة الأعلى من حليب الكفير المجفف 0.3 % إذ سجلت معدل استهلاك علف أقل 3379.10 غم مقارنة بمعاملة السيطرة T_3 ولكنها لم تختلف معنويا عن المعاملة الثانية والتي اضيف لها الكفير بنسبة 0.1 % وهذه المعاملة أيضا لم

يوضح الجدول رقم (5) تأثير إضافة حليب الكفير في نسبة التصافي والنسبة المئوية للقطاعات الرئيسية في الذبيحة في نهاية فترة التجربة وعند عمر 5 أسابيع، إذ لوحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في نسبة التصافي للمعاملات التي اضيف لها حليب الكفير T_2 و T_3 و T_4 ، حيث سجلت نسبة تصافي 71.85 و 72.98 و 73.23 % على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة والتي كانت نسبة التصافي فيها 71.34 % لكنها لم تختلف معنويا عن المعاملة T_2 والتي اضيف لها حليب الكفير بنسبة 0.1 % ولم تظهر فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين معاملات طيور التجربة في النسبة المئوية للوصلة الفخذية وعصا الطحال عند نهاية التجربة ولكن لوحظت الفروقات المعنوية واضحة في الوزن النسبي لقطعة الصدر بين طيور معاملات التجربة إذ ارتفع معنويا الوزن النسبي للصدر لطيور كل من المعاملتين T_3 و T_4 وبلغتا 37.83 و 38.51 % على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة T_1 والمعاملة T_2 واللذان سجلنا أقل وزن نسبي لقطعة الصدر (35.12 و 35.77 %) على التوالي. لوحظ من خلال النتائج تحسن معنوي في الأداء الإنتاجي للطيور التي اضيف لعلائقها الكفير المجفف، وكان هذا التحسن واضحا في المعاملات التي استخدم فيها حليب الكفير بالنسب الأعلى (0.2 و 0.3 %). قد يعود هذا التحسن في الأداء الإنتاجي المتمثل في الزيادة ومعدل وزن الجسم إلى حليب كفير المجفف الذي يعتبر معززا حيويا يحتوي على أكثر من 30 نوع من الأحياء المجهرية المفيدة (17)، وهذه الأحياء المجهرية سوف تزداد داخل القناة الهضمية وتؤدي إلى سيادة بكتيريا العصيات اللبنية (lactobacilli) والتي تتواجد بشكل كبير في المجمع الميكروبي لحليب الكفير وإنتاجها لحمض اللبنيك القاتل للبكتيريا المرضية وغذاء للخلايا المعوية، والذي يؤدي إلى زيادة طول الزغابات المعوية، وبالتالي زيادة معدل امتصاص العناصر

المجهريّة وفعاليّة عمله بالفعل التآزري للأحياء المجهريّة المفيدة، والتي تنتج الأحماض الأمينية المكون الرئيس للبروتينات في عضلات الجسم (27). وكنتيجة طبيعية تؤدي إلى زيادة نسبة التصافي (28)، والنسبة الوزنية لقطعة الصدر (1).

المهضوم عن طريق الزغابات الموجودة على سطحها (24، 25). إن إضافة الأحياء المجهريّة للعلف تعمل على تحسين معاملة التحويل الغذائي (26). وإن التحسن المعنوي الذي حصل في نسبة التصافي لطبوع معاملات الكفير مقارنة بالسيطرة قد يعود إلى دور الأحياء

جدول رقم (5): تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في نسبة التصافي و قطعات الذبيحة في نهاية التجربة

المعاملات	نسبة التصافي %	الوصلة الغذائية %	عصا الطيل %	قطعة الصدر %
T ₁ معاملة السيطرة	71.37 ^B ±0.99	12.77±1.22	13.27±0.52	35.12 ^B ±0.82
T ₂ الكفير المجفف 0.1 %	71.85 ^{AB} ±0.56	13.34±0.55	13.35±0.76	35.77 ^B ±0.54
T ₃ الكفير المجفف 0.2 %	72.98 ^A ±0.98	14.22±0.22	11.98±0.88	37.82 ^A ±0.94
T ₄ الكفير المجفف 0.3 %	73.23 ^A ±1.22	14.73±0.95	12.63±0.88	38.51 ^A ±0.86
مستوى المعنوية	*	NS	NS	*

*تشير الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($P < 0.05$) وتشير N.S. إلى عدم وجود فروق معنوية

وتركيزها HDL عند نهاية التجربة بعمر 34 يوما . وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة (29) من أن إضافة المعززات الحيوية – ومن بينها حليب الكفير - لعلائق فروج اللحم أدت إلى انخفاض معنوي في تركيز الكوليسترول. وقد يعزى ذلك إلى انخفاض امتصاص وتمثيل الكوليسترول في الجسم و زيادة نسبة الكوليسترول المتحلل والتقليل من إنتاج البروتينات الدهنية lipoproteins الحاملة للكوليسترول (30). وقد يعزى أيضا انخفاض الكوليسترول وتركيز LDL في بلازما دم الفروج إلى بكتيريا اللاكتيك الموجودة في الكفير، التي تسهم في زيادة حموضة الأمعاء مما يؤدي إلى زيادة تحلل الكوليسترول وانخفاض امتصاصه من الأمعاء وزيادة عمليات طرحه مع أملاح الصفراء إلى خارج الجسم مع البراز (31).

يوضح الجدول رقم (6) نتائج تأثير إضافة المستويات المختلفة من الكفير المجفف في صورة الدهن في بلازما دم فروج اللحم، إذ لوحظ حدوث انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في بلازما دم طيور المعاملة T₄ والتي أضيف حليب الكفير المجفف إلى علائقها بنسبة 0.3% مقارنة مع معاملة السيطرة، ولم تختلف معنويا ($P \leq 0.05$) عن معاملات الإضافة الأخرى (T₂ و T₃). كما لم تختلف هاتين المعاملتين معنويا عن معاملة السيطرة والتي سجلت أعلى تركيز للكوليسترول في بلازما دم الطيور، بلغ 147.71 ملغم/100مل بلازما. وظهر هذا الانخفاض في تركيز الكوليسترول بشكل ملحوظ ($P \leq 0.05$) وواضح في تركيز LDL في البلازما لطيور المعاملتين T₄, T₃ والتي أضيف إلى علائقها حليب الكفير وبالنسب 0.2 ، 0.3 % على التوالي مقارنة مع المعاملة T₂ والتي أضيف إليها بنسبة 0.1 % ومعاملة السيطرة . ولم تظهر أي فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) بين المعاملات الأربعة في الجلوسيريدات الثلاثية

جدول رقم (6): تأثير إضافة المستويات المختلفة من الكفير المجفف في تركيز الكوليسترول والجلوسيريدات الثلاثية والليپوبروتينات عالية ومنخفضة الكثافة في بلازما دم فروج اللحم

المعاملات	الكوليسترول	الجلوسيريدات الثلاثية	الليپوبروتين واطئ الكثافة (LDL)	الليپوبروتين عالي الكثافة (HDL)
				ملغم / 100 مل
T ₁ معاملة السيطرة	147.71 ^A ±7.61	90.51±11.12	44.04 ^A ±3.11	85.53±2.60
T ₂ الكفير المجفف 0.1 %	136.9 ^{AB} ±3.61	2088.62±10.	40.21 ^A ±3.56	78.96±3.23
T ₃ الكفير المجفف 0.2 %	131.5 ^{AB} ±3.21	10.53±87.93	29.29 ^B ±2.27	84.62±2.15
T ₄ الكفير المجفف 0.3 %	125.57 ^B ±5.73	13.22±82.22	25.87 ^B ±2.10	2.4783.25±
مستوى المعنوية	*	NS	*	NS

*تشير الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($P < 0.05$) وتشير N.S. إلى عدم وجود فروق معنوية

اللوغارتمية لبكتيريا العصيات اللبنية *Lactobacilli* وقلت الأعداد اللوغارتمية لبكتيريا القولونية، وهذا يثبت فعالية وكفاءة الأحياء المجهريّة المفيدة في حليب الكفير في إدامة التوازن الميكروبي لبينة الأمعاء من خلال سيطرة هذه البكتيريا مثل بكتيريا العصيات اللبنية على حساب البكتيريا الضارة من خلال الإقصاء التنافسي لبكتيريا القولون التي تشكل بكتيريا *E.coli* معظمها عن طريق خفض الأس الهيدروجيني لبينة الأمعاء، ليصبح الوسط حامضيا وغير ملائم لنمو البكتيريا المرضية وخلق المستقبلات بوجه البكتيريا المرضية وطرحها خارج الجسم (32). وهذه النتائج قد اتفقت مع ما وجدته كل من (33، 34)، من وجود ارتفاع معنوي في الأعداد اللوغارتمية للبكتيريا المفيدة مع انخفاض في أعداد بكتيريا القولون عند استخدام حليب الكفير والمعززات الحيوية في علائق فروج اللحم.

يوضح الجدول رقم (7) تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في الأعداد اللوغارتمية للمجموعة الميكروبي في البينة الداخلية للقناة الهضمية لفروج اللحم. فقد بينت النتائج وجود انخفاض معنوي ($P \leq 0.01$) لمعاملات إضافة الكفير T₂ و T₃ و T₄ في محتوى بكتيريا القولون *E.coli* مقارنة مع معاملة السيطرة، في حين هناك ارتفاع معنوي ($P \leq 0.01$) بالأعداد اللوغارتمية لبكتيريا العصيات اللبنية *Lactobacilli* بمعاملات الإضافة بحليب الكفير الثالثة والرابعة T₄, T₃ مقارنة بالمعاملة الثانية T₂ والتي أضيف لها الكفير بنسبة 0.1 % ومعاملة السيطرة T₁ إذ بلغت أعدادها 13.65 و 14.87 على التوالي بينما بلغت T₂ 10.77 ومعاملة السيطرة 9.53. ويلاحظ أنه كلما زادت نسبة إضافة الحليب الكفير المجفف إلى العلف زادت معها الأعداد

جدول رقم (7): تأثير إضافة مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف والمضاف للعلف في الأعداد اللوغارتمية للمجموعة الميكروبي في الأمعاء لفروج اللحم

المعاملات	<i>Lactobacilli</i>	<i>E.coli</i>
T ₁ معاملة السيطرة	9.53 ^B ±0.06	9.25 ^A ±0.21
T ₂ الكفير المجفف 0.1%	10.77 ^B ±0.05	7.32 ^B ±0.11
T ₃ الكفير المجفف 0.2%	13.65 ^A ±0.13	6.43 ^B ±0.08
T ₄ الكفير المجفف 0.3%	14.87 ^A ±0.09	6.08 ^B ±0.13
مستوى المعنوية	**	**

**تفسير الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($P \leq 0.01$)

نستنتج من خلال هذه الدراسة إمكانية استخدام حليب الكفير المجفف مع العلف كمعزز حيوي كونه خليطاً تآزرياً معقداً لأكثر من 30 نوعاً من الأحياء المجهرية المفيدة في تحسين الصفات الإنتاجية والفسلجية لفروج اللحم، وهو علاج فعال لمنع استعمار الأحياء المجهرية الضارة في بيئة الأمعاء لفروج اللحم، أي أن لحليب الكفير تأثيراً إيجابياً على جسم المضيف بسبب فوائده الصحية.

المصادر

14. Atlas RM.; Parks LC. and Brown AE. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mos By Year Book. Inc. St. Louis. Missouri. USA.
15. SAS . (2004). SAS User's Guide : Statistics Version. 6th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
16. Duncan BD. (1955). Multiple range and multiple F-test. Biometric.11:1-24.
17. Gamare V.; Kotade K.; Dolas R.; Dhamak K.; Somnaushi S.; Krant V.; Kam N.; Khades A. and Kashid V. (2011). The magic of kefir : a review. Pharmacol. 1:376-386.
18. Medrano M.; Racedo SM.; Rolny IS.; Abraham AG. and Perez PF. (2011). Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. J. Agri. Food Chem.10:5299-5304.
19. Toghyani M. and Tabeidian SA. (2011). Effect of probiotics and prebiotic growth promoter substitution and carcass traits of broiler chicks. Int. J. Food Eng. Biotechnol. 9:82-86.
20. Flint JF and Garner MR. (2009). Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. J. Appl. Poul. Res.18:367-378.
21. Haddadin MSY.; Abdulrahim M.; Hashlamoun EAR. and Robinson RK. (1996). The effect of *lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hens eggs. Poul. Sci.75:491-494.
22. Phillips M. (2001). The activity of amylase and trypsin like protease in gut contents at germ free and conventional chickens. Brit. Poul.24:115-121.
23. Rowghani E.; Arab M. and Akbarian A. (2007). Effect of probiotic and other feed additives on performance and immune response of broiler chicks. Int. J. Poul. Sci.6:261-265.
24. Yaman H.; Ulukanli Z.; Elmali M. and Unal Y. (2006). The effect of a fermented probiotic the kefir on intestinal flora of poultry domesticated geese (Anser Anser). Med.Vet. 157(7):379-386.
25. Rattray FP.; Hansen CH.; Denmark MJ. and Oconnell CH. (2011). Kefir. Hungerford, Brerksire.UK. Pp.:518-524.
26. ناجي، سعد عبد الحسين، القيسي، غالب علوان ، رسول، بشرى سعدي، الجنابي، حمود خلف. (2011). المعززات الحيوية في الحقول الحيوانية. الطبعة الأولى. جامعة بغداد.
27. القيسي، غالب علوان، العبيدي، ابتسام جواد، جعفر، ميسون روضان. (2007). مقارنة تأثير إضافة نوعين من المعززات الحيوية وتأثيرها في التحليل الكيميائي لكل من عضلة لحم الصدر والفخذ. مجلة علوم الدواجن العراقية. 2 (2): 76-66.
28. الحسيني، يحيى صباح. (2008). دراسة مقارنة لاستخدام البروبيوتك نوع *Lactobacillus acidophilus* والمضاد الحيوي الاوكسي تتراسايكلين كإضافات غذائية في علائق فروج اللحم في
1. Kabir S. and Lutful M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. Int.J.Moi.Sic.10:3531-3546.
2. Apata DF.(2011).The emergence of antibiotics resistance and utilization of probiotics for poultry production. Sci. J. 2:8-13.
3. Hertrampf JW. (2001). Alternative antibacterial performance promoters. Int.J.Poult.Sci.40:50-52.
4. Peric I.; Zikic D. and Lukic M. (2009). Application of alternative growth promoters in broiler production. Biotechnol. In Anim. Husband.25(5-6):378-397.
5. Ahen VM.; Fernadez F. and Hinton MH. (1997). Evalution of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on salmonella colonization in poultry. Brit. Poul. Sci. 38:485-488.
6. Ahmed Z.; Wang Y.; Ahmad A.; Khan St.; Nisa M.; Ahmed H. and Afreen A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.53:422-434.
7. Leits AM.; Migael MA.; Peixoto RS.; Rosado AS.; Silva JT. and Paschoalin VM. (2013). Microbiological technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Brazil. J. Microbiol. 44(2):341-349.
8. Tomislav P.; Sanja S.; Simun Z. and Dubravka AS. (2013). Micro biotic of kefir grains. Mljekarsto. 63:3-14.
9. Semith O. and Cagindi O. (2003). Kefir: a probiotic dairy- composition nutritional and therapeutic aspects. Pakistan J. Nutr. 2(2):54-58.
10. Farnworth ER. (2005). Kefir-complex probiotic. Food Sci. Technol. Bullet. : Functional Food.2:1-17.
11. Kesenkas H.; Yerlikaya O. and Ozer EA. (2013). Functional milk beverage : kefir. Arg. Food Indust. Hi.Tech.24:53-55.
12. النعيمي، علي ناظم زكي. (2015). تقييم إضافة مستويات مختلفة من حبيبات الكفير في الأداء الإنتاجي والصفات المناعية لفروج اللحم. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد.
13. جواد، إيهاب عبد الرزاق. (2015). تقييم استخدام مستويات مختلفة من حليب الكفير المجفف المضاف للعلف في تحسين الصفات الإنتاجية والمناعية والنسجية لفروج اللحم. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

بعض الصفات الإنتاجية والكيموحيوية المناعية. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.

29. Sena C.; Yaman H.; Ozcan A.; Kart A. and Karademir G. (2008). Effect of kefir as probiotic on serum cholesterol total lipid as partate amino transferse and alanine amino tansferse activities in broiler chicks. *Medycyna Wet.* 64(2):12-17.

30. Modaresi M.; Toghyani M. and Mousavi SK. (2009). Effect of milk and molasses kefir grains as probiotic on performance and serum biochemical parameters in broiler chicks. *Poult. Sci* 91:350.

31. Liong MT. and Shah NP. (2005). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of *Lactobacilli* Strains. *Int. Dairy. J.* 15:391-398.

32. المندلاوي، هشام عبد الستار. (2005). تقييم إضافة مستويات مختلفة من المعزز الحيوي المحلي في الأداء الإنتاجي والفسلجي والاستجابة المناعية لفروج اللحم. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

33. Zacconi C.; Scolari G.; Vescovo M. and Sarra PG. (2003). Competitive exclusion of campylobacter Jejnni by kefir fermented milk. *Annal. Microbiol.* 53:176-187.

34. Taklimi SM.; Lotfollahian H.; Shahny HA.; Mirzaei F. and Alinejad A. (2012). Study of efficacy of probiotic in broiler chickens. *Diet. Agri.* 3:5-8.

تقدير متبقيات المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين في نماذج من العسل المفروز من بعض محافظات العراق

كاميلا ورد شاهر، محمد مروان حميد (*)

كلية الزراعة / جامعة بغداد / جمهورية العراق
(*) طالب في برنامج الماجستير

البريد الإلكتروني: the.sizer24@gmail.com

الملخص باللغة العربية

جمعت 25 عينة عسل مفروز حديثاً من مناطق مختلفة لبعض محافظات المنطقة الوسطى من العراق (بغداد، بابل، ديالى، واسط وكربلاء)، فضلاً عن جمع 3 عينات من بدائل حبوب اللقاح (حبوب لقاح صيني، عجينة تركي، عجينة محلي) الموجودة في الأسواق المحلية. أجريت تجربة كشف وتقدير المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين (OTC) باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الورق Thin layer chromatography (TLC) في مختبر وقاية النبات في وزارة الزراعة. وأجريت تجربة الكشف عن وجود بقايا المضاد الحيوي باستخدام تقنية HPLC لبدائل حبوب اللقاح في قسم المستحضرات الصيدلانية، دائرة بحوث المواد في وزارة العلوم والتكنولوجيا. أظهرت النتائج وجود نسب لمتبقيات المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين في العسل المفروز للمحافظات المدروسة، باستثناء محافظة واسط، حيث كانت النسبة 0 %، وسجلت محافظة كربلاء أعلى نسبة للمتبقيات من المضاد الحيوي، إذ بلغت 0.54 % يليها محافظات (ديالى، بابل وبغداد) بنسبة (0.26, 0.50 0.30) % على التوالي. أما نتائج بدائل حبوب اللقاح فقد أظهر جهاز HPLC وجود متبقيات للمضاد الحيوي OTC في عينة العجينة المحلي وحبوب اللقاح الصيني وكانت (0.002, 0.001) ppm على التوالي.

الكلمات المفتاحية: العسل، حبوب اللقاح، الأوكسي تتراسيكلين.

Detection of oxytetracycline residues in honey samples sorted from some Iraqi governorates

Kameela W. Shaher and Mohammed M. Hameed (*)

College of Agriculture / University of Baghdad / Republic of Iraq
(*) Master Degree Student

ABSTRACT

A number of 25 samples of new honey were collected different apiaries from some central provinces of Iraq (Baghdad, Babil, Diyala, Wasit and Karbala) as well as a collection of three samples of protein foods Chinese pollen, turkey patty, local patty available in local markets were done. The present study aimed to detect and estimate the antibiotic oxytetracycline (OTC) oxy tetracycline residues in those samples by using thin layer Chromatography in the laboratory of plant protection \ Ministry of Agriculture. The detection of the antibiotic residues was conducted in the protein foods using HPLC technique in pharmaceutical materials department / Ministry of Science and Technology Research Department experience.

The results showed the presence of concentrations of residues of antibiotic oxytetracycline in honey sorted provinces studied with the exception of Wasit province, the rate was 0% and recorded the province of Karbala, the highest percentage of residues of the antibiotic, amounting to 0.54% followed by the province (of Diyala, Babil and Baghdad) by (0.26, 0.30, 0.51)%, respectively. The results of the detection of residues in the protein foods found in local markets, a Chinese pollen local food protein found traces of residues of the antibiotic oxytetracycline (0.002 0.001) ppm in a sample Chinese pollen local food respectively.

المقدمة

يعد نحل العسل *Apis mellifera L.* أحد الحشرات المهمة التي اهتمت بها أغلب الدول المتقدمة خصوصاً خلال الفترة الأخيرة من القرن العشرين، حيث تزايد الاهتمام بتربيتها ورعايتها وزيادة إنتاجها المتنوعة وذلك لأهميتها الكبيرة في مختلف المجالات الزراعية والصناعية والعلاجية (1). كما أن لنحل العسل علاقة وثيقة ومتبادلة بالنبات، فهو يزوده بالغذاء ويزيد النحل من إنتاجية المحاصيل من خلال عملية التلقيح لتكوين الثمار والحبوب لأشجار الفاكهة والمحاصيل الحقلية والنباتات العطرية (2، 3). وتتجلى أهمية النحل أيضاً في إنتاجه للعسل والغذاء الملكي وسم النحل والبروبوليس وجمعه لحبوب اللقاح. والعسل منتج طبيعي، إما أن يكون سائلاً أو نصف سائلاً، حيث يشكل الماء نسبة 15-20%، أما الجزء الآخر، يرى العلماء أنه يحتوي على نسبة عالية من السكريات والبروتينات والأحماض الأمينية والفيتامينات والأحماض العضوية ومواد مضادة للأكسدة (4). ورغم أن العسل منتج طبيعي وصحي، إلا أنه في الوقت الحالي يتم إنتاج العسل في ظروف سيئة نتيجة للتلوث البيئي بالعناصر الثقيلة والمواد المشعة. ومن الملوثات البيئية الأخرى المبيدات المستخدمة للسيطرة على الفاروا أو طارد النحل المستخدم عند حصاد العسل، والمبيدات الحشرية المستخدمة لعدة السنين الصغيرة، والمضادات الحيوية المستخدمة كعلاج لأمراض النحل (5، 6). وقد استخدمت المضادات الحيوية لمعالجة أمراض النحل. وأول مضاد حيوي استخدم هو صوديوم سلفاثيازول

و streptomycin ، sodium sulphathiazole و ستربتومايسين ، nitrofurans ، تتراسيكلين ، tetracycline ، ماکرو لیدات ، macrolides ، تایلوسین ، tylosin ، وارثر وميسين ، erythromycin (7)، وذلك كإجراء وقائي وعلاجي من أمراض النحل خصوصاً مرض تعفن الحضنة الأوروبي European foul Brood (EFB) *Melissococcus* المتسبب عن البكتيريا *plutonius* ومرض تعفن الحضنة الأمريكي (AFB) المتسبب عن البكتيريا *Paenibacillus larvae larvae*. وتأتي أهمية المرضين من إصابتها لطوائف نحل العسل في موسم فيض الرجيق وحبوب اللقاح، فهي تصيب اليرقات بعمر (18 - 24 ساعة) وتقل بتقدم العمر. وتظهر الحضنة المصابة مبكرة وغير مرتبة، كما تكون الأغذية غائرة وذات مظهر رطب ولونها بني داكن متقوية من الوسط، ويتغير لون اليرقة من البني إلى الغامق وتنبعث رائحة كريهة تشبه رائحة السمك أو الغراء (8، 9). كذلك تم استخدام التيرمايسين Terramycin لعلاج أمراض الحضنة الطباشيري (10). أما في العراق فإن الهدف من تربية النحل هو لإنتاج العسل، إذ يعتبر مورد دخل أساسياً للعديد من المشتغلين بهذه المهنة. وقد بلغ نسبة المشتغلين بتربية نحل العسل لغرض إنتاج العسل 38.06% (11). استخدم المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين المضاف إلى المحلول السكري لمعالجة مرض تعفن الحضنة الأوروبي عند أول ظهور له في المحافظات الشمالية (نينوى ودهوك وأربيل) (12). ومنذ ذلك الوقت استمرت عملية استخدام المضادات الحيوية لمعالجة أمراض النحل ومازالت تستخدم. ونظراً لعدم وجود دراسات في القطر حول بقايا المضادات الحيوية في العسل ومواد التغذية النصاعية، هدف البحث إلى إجراء مسح لبعض محافظات القطر للكشف عن وجود بقايا للمضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين في العسل المفروز وبدائل حبوب اللقاح المتوفرة في الأسواق المحلية.

المواد وطرق العمل

جمعت 25 عينة من العسل المفروز من مناحل مختلفة تستخدم المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين كإجراء وقائي وعلاجي ضد مرض تعفن الحضنة من المحافظات الوسطى (بغداد، بابل، كربلاء، واسط، ديالى). كما جمعت 3 عينات من بدائل حبوب اللقاح (حبوب لقاح صيني، عجينة تركي، عجينة محلي) الموجودة في الأسواق المحلية.

استخلاص العينات: استخلصت عينات العسل وفق الطريقة المذكورة في المصدر (13) بإذابة 5غم عسل في خليط من ماء مقطر وخلات الايثيل بنسبة 20-80 %، ثم رج المحلول لمدة 14 دقيقة لإتمام إذابته. وضعت عينة العسل المذابة في جهاز الطرد المركزي 10

الكشف الكمي للمضاد الحيوي باستخدام ورق TLC: بعد التأكد من وجود المضاد الحيوي في العينات المفحوصة تم التقدير الكمي المتبقي من المضاد الحيوي في العينة. اخذ 1 مل من الطبقة الراقية بواسطة micropipette وضيقت بشكل حزمة وبخط مستقيم على بعد مسافة 2 سم من حافة الورقة وعلى طول الورقة. بعد جفاف الورقة وضعت بالمحلول الخاص والمضطر سابقاً. تركت العينة لمدة ساعتين لحين وصول المحلول لأعلى مستوى بالورقة وترك العينة لتجف، حددت المنطقة الحامية على المضاد الحيوي والتي ظهرت بلون أصفر فاتح وقشطت السيليكا وضعت بخليط من الماء المقطر/خلات الايثيل بنسبة 20 - 80 % رشحت في قمع بخنر، جمع الراشح بعلبة بحجم 60 مل بعد قياس وزنها وترك ليصف وحسب وزن العلبة بعد الجفاف والفرق يمثل المضاد الحيوي المتبقي في العينة.

الكشف الكمي لمبتقيات المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين في بدائل حبوب اللقاح: وزن 5غم من بدائل حبوب اللقاح واذيبت بنسبة (3:7) استونيتريل : ماء مقطر و 1 مل من حامض HCL تركيزه 0.1 % ورج المحلول باستخدام جهاز Shaker بعد ذلك وضع المحلول في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق 3000 rpm/min اخذ الراشح وحقن في جهاز HPLC (15). حللت العينة باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي (HPLC) مجهز للكشف باستخدام عمود C18 ods (250*4.6 mm) μm size 5 تحت درجة حرارة 30 °C واستخدم (استونيتريل : ماء لا أيوني) (30:70) الذي يمثل الطور المتحرك وكان معدل التدفق 1.0 ml/min وتمت معايرة الجهاز على الطول الموجي 254 nm. ثم حقنت 20 μ L من العينة.

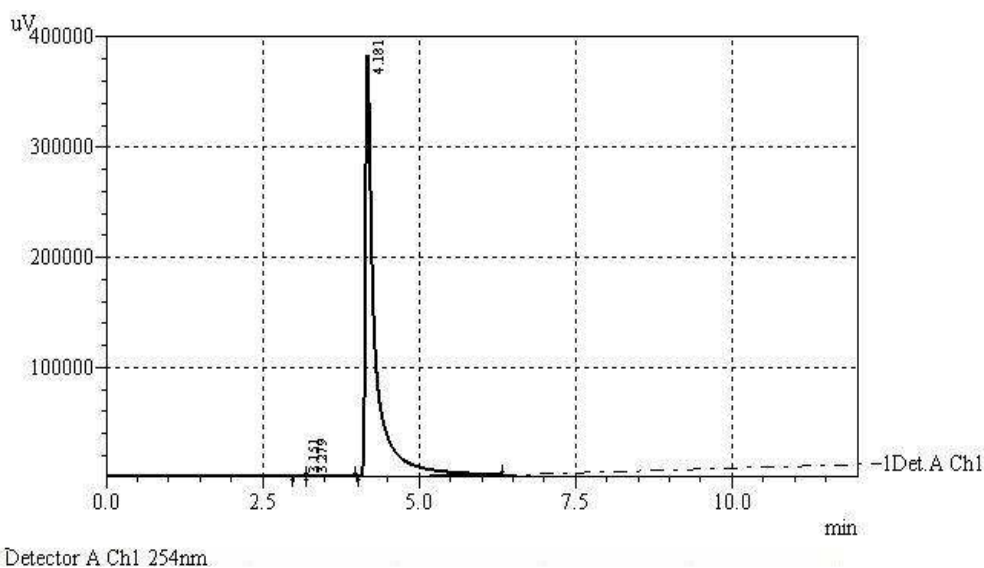
النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج جدول رقم (1) وجود نسب لمبتقيات المضاد الحيوي الأوكسي تتراسيكلين للمحافظات المدروسة باستثناء محافظة واسط سجلت 0 % اما محافظة كربلاء سجلت اعلى كمية للمبتقيات من المضاد الحيوي إذ بلغت 0.54 % تليها المحافظات (ديالى، الحلة، بغداد) بنسبة (0.51 ، 0.30 ، 0.26) % على التوالي وهذا الاختلاف في النسب يعود للنحال نفسه وطرق اضافته للمضاد الحيوي وكمية المضاد الحيوي المستخدمة وموعد استخدامه للمضاد الحيوي، نستنتج من هذا ان النحال مازال يستخدم المضاد الحيوي في وقاية ومعالجة الخلايا على الرغم انه قد منع استخدامه من قبل الاتحاد الاوربي والتي قد يكون لمبتقياتنا اثار جانبية على صحة المستهلك اذ تسبب فقر الدم اللاتنسجي لدى الانسان وكذلك تغيرات في الدم مثل كريات الدم البيض والخلايا اللمفية غير النمطية واحتقان الرئة وتأخر تخثر الدم وقد يلحق الضرر بالأجهزة الغنية بالكالسيوم مثل الأسنان والعظام ويسبب احبانا الجيوب الانفية (16). لم تسجل محافظة واسط لم تسجل اي وجود للمضاد الحيوي رغم استعمال النحالين المضاد الحيوي، وهذا يعود الى انه قد تكون الكمية المستخدمة قليلة جداً لا يمكن الكشف عنها او ان النحل قد استهلك المحلول السكري ولم يخزنه في العيون السداسية أو ان النحال قد استخدم المضاد الحيوي في فترة ما قبل موعد خزن النحل للعسل.

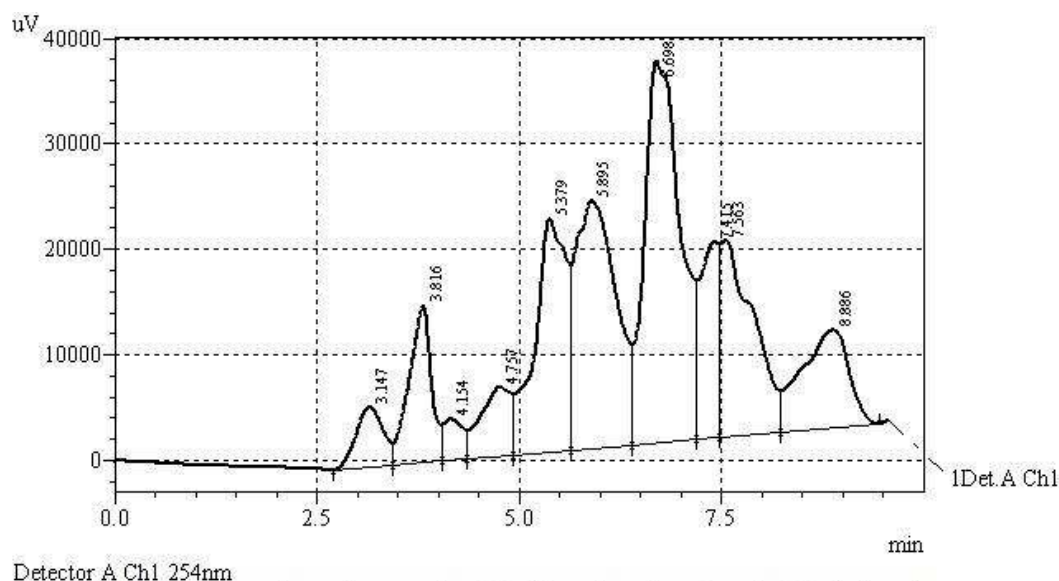
التحليل الكمي لبدائل حبوب اللقاح باستخدام تقنية HPLC:
أوضحت النتائج وجود متبقيات للمضاد الحيوي OTC في العينة المحلي وحبوب اللقاح الصيني إذ كانت (0.002, 0.001) ppm على التوالي. وقد أستدل على وجود المضاد الحيوي في العينات نتيجة مقارنة وقت احتجاز المحلول القياسي لـ OTC (4.181 min) (كما مبين في شكل (1) مع زمن احتجاز العينات (شكل رقم 2، 3). وقد أوضحت النتائج وجود متبقيات في هاتين المادتين الغذائية والموجودة في الاسواق المحلية علماً ان هذه العينات لم يكتب عليها وجود للمضادات وقد يكون السبب هو لمعرفة الجهات المصنعة ان استخدام المضاد ممنوع دولياً ومع هذا تستخدمه دون الاشارة اليه وهذا يتطلب فحص لمنتجات النحل المستوردة والموجودة في الاسواق المحلية. وبمقارنة النتيجة مع ما مسموح به دولياً وفق دستور الاتحاد الاوربي نجد ان العينات ضمن الحد المسموح به (17).

جدول رقم (1): النسبة المئوية للمتبقي من المضاد الحيوي الاوكسي تتراسيكلين في عينات العسل المفروز من بعض محافظات المنطقة الوسطى

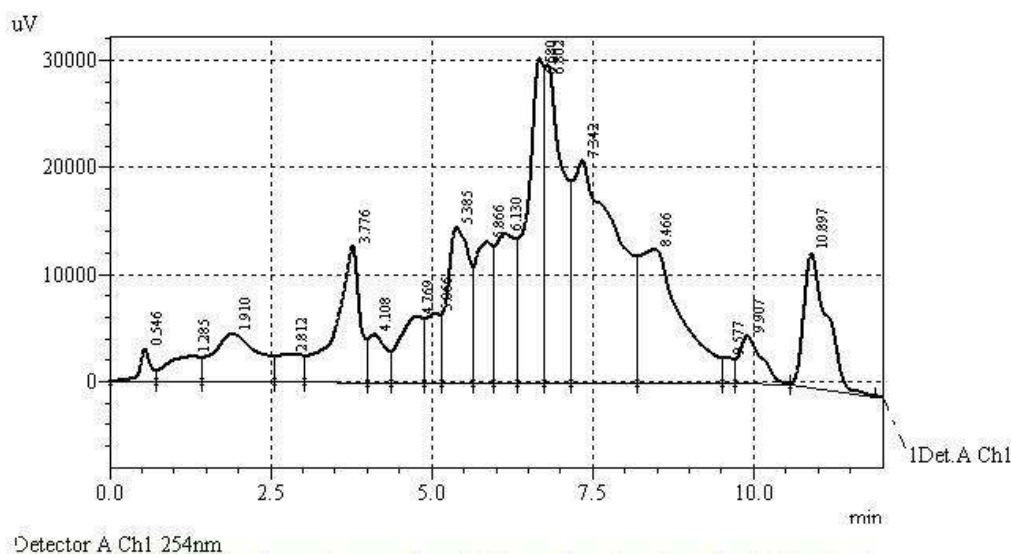
المحافظات	المعدلات
كربلاء	0.54 %
ديالى	0.51 %
حلة	0.30 %
بغداد	0.26 %
الكويت	0 %



شكل رقم (1): الوقت المعاد Retention time للمحلول القياسي للاوكسي تتراسيكلين (4.181) min تركيزه (0.1)ppm الطول الموجي 254nm.



شكل رقم (2): نتيجة تحليل الاغذية البروتينية الصناعية (عجينة محلي) الحاوي على الاوكسي تتراسيكلين والتي توافقت مع الوقت المعاد للمحلول القياسي (4.154) min وعلى الطول الموجي 254nm.



شكل رقم (3): نتيجة تحليل حبوب اللقاح الصيني والحاوي على الاوكسي تتراسيكلين الذي توافق مع الوقت المعاد للمحلل القياسي (4.108) min وعلى الطول الموجي 254 nm.

المصادر

11. شاهر ، كميلة ورد ، عمر خليل رمان .(2015). دراسة ميدانية لواقع تربية النحل في العراق . مجلة مصر الزراعية. 2(30): 53-43.
12. الناجي ، لؤي كريم، محيي الدين، محمد عمر . (1986). تشخيص مرض تعفن الحضنة الأوربي في نحل العسل في القطر العراقي . المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زنانكو). 139-150.
13. Tyczkowska K.; Voyksner RD. and Aronson AL. (1989). High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite. J. Chromatogr. 490(1):101-113.
14. Imdad UMZ.; Khaliqur R.; Arshad H. and Shafqatullah A. (2013). Detection and quantification of antibiotics residues in honey samples by chromatographic techniques. Middle-East J. Scient. Res. 14 (5): 683-687.
15. Veterinary and Agricultural products manufacturing.CO. LTD.VAPCO. Available at: www.vapco.net
16. Johnson S. and Nimisha J. (2010). Antibiotic Residues in honey .India, New Delhi. Available at: www.cseindia.org
17. Veterinary Drugs Residues in Food. Updated up to the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (2015). Codex Veterinary Drug Residue in Food Online Database.
1. Root AI. and Root ER. (2005). The ABC and XYZ of bee culture. Kessinger Publishing. USA. P.:740.
2. Clarence H.; Maryann CF. and Caron D. (2004). Beekeeping basics. The Pennsylvania State University. P.:102.
3. التميمي ، خالد أحمد ، خنيش، محمد سعيد . (2008). دراسة دور نحل العسل في تلقيح أزهار الكزبرة *Coriandrum sativum*. جمعية حضرموت التعاونية للنحالين - اليمن. كلية العلوم التطبيقية . جامعة حضرموت، اليمن.
4. Chen L.; Mehta A.; Berenbaum A.; Zangerl AR. and Engeseth NJ. (2000). Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. J. Agri. Food Chem. 48(10): 4997–5000.
5. Claudio P.; Sabatini AG. ; Girotti S.; Ghini S.; Medrzyck P.; Grillenzoni F.; Bortolott IL. ; Gattavecchia E. and Cell G. (2003). Honeybees and bee products as monitors of the environmental contamination. APIACTA.38:63-70.
6. Bogdanov S . (2006). Contaminants of bee products Apidol. 37(1): 1-18.
7. Alippi AM. ; Lopez AC.; Reynaldi FJ. ; Grrasso DH. and Aguilar OM. (2007). Evidence for plasmid mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. J. Vet. Microbiol. 125 (3-4):290-303.
8. Hornitzky MAZ. and Wilson SC. (1989). A system for the diagnosis of the major Bacterial brood of honeybees. J. Apicult. Res. 28(4):191-195.
9. Shimanuki H.; Knox DA.; Furgain B. Caron DA. and Willamis JL. (1993). Diseases and pests of honey bees. Chapter.25. Pp.: 1083-1090.
10. Diana M.; Menapace W. Wilson T. (1979). Feeding oxytetracycline as terramycin (R) does not aggravate chlkbrood infections Apidol. 10 (2):167-174.

دراسة تحليلية لبعض العوامل المؤثرة على مستوى اتجاهات العاملين الزراعيين نحو العمل الإرشادي الزراعي في مديرية زراعة كربلاء

أمل عفتان الراوي

كلية الزراعة / جامعة الأنبار / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

استهدف هذا البحث بصفة أساسية دراسة بعض العوامل المؤثرة على مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الإرشادي الزراعي بمديرية زراعة كربلاء. وقد اعتمد البحث على الاستبيان لاستيفاء بياناته من عينة عشوائية بلغت 84 من القائمين بالعمل الزراعي بنسبة تبلغ حوالي 51% من المبحوثين. وتركزت أهم النتائج فيما يلي:

- لقد تبين أن حوالي 75% من المبحوثين يتسمون بمستوى اتجاهات مرتفع نحو العمل الإرشادي الزراعي، في حين أن 4.8% منهم ذوي مستوى اتجاهات منخفض نحو العمل الإرشادي.
- لقد تبين وجود علاقة ارتباطية معنوية بين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الإرشادي الزراعي وبين المستوى التعليمي، عدد أفراد الأسرة، الانفتاح الثقافي لهم.
- تبين أن مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الإرشادي الزراعي كمتغير تابع والتسعة متغيرات السابقة كمتغيرات مستقلة – إن هذه المتغيرات مجتمعة يمكنها تفسير 22.1% من التباين في مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الإرشادي الزراعي.
- عند تحقيق الفرض البحثي فإنه يتم رفض الفرض الصفري جزئياً وقبول الفرض الأصلي بعد تعديله إلى " يتأثر مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي نحو العمل الإرشادي الزراعي كمتغير تابع بكل من المتغيرين المستقلين عدد أفراد الأسرة والانفتاح الثقافي ".

الكلمات المفتاحية: العمل الإرشادي الزراعي، مديرية زراعة كربلاء.

An analytical study of some factors affecting the attitudes of agricultural extention work in agricultural directorate of Karbala

Amal A. Z. Alrawi

Dept. of Agricultural Economics / College of Agriculture/ University of Anbar / Republic of Iraq

ABSTRACT

The main objective of this research was studying some factors affecting on attitudes towards Agric. Exten. Work among agric. Workers in Karbala. A mail questionnaire was used to collect data needed for this research from 82 of agricultural workers represents almost 51% from universe, the most important results are the following:

- About 75% of agricultural workers has a high level in their attitudes toward Agric. Extension work in the same time 4.8% of them has a low level of their attitudes.
- There is a significant relationship between the level of attitudes toward Agric. Extension work among interviewers and the following Factors: level of education, family size and the cosmopolitans.
- By using partial regression it revealed that 22.1% of variance among agricultural workers in their attitudes level towards agric. Extension work is affected by the nine factors related to the interviewers.

المقدمة والمشكلة البحثية

تلعب الموارد البشرية دورا هاما في أي مجتمع، وتترتب على الخصائص السكانية لذلك المجتمع أنواع العلاقات الإنسانية السائدة بكل ما بها من مركبات اجتماعية واقتصادية وتقنية . إن غاية مشروعات التنمية الاجتماعية والاقتصادية هي إحداث تغيير اجتماعي سواء كان هذا التغيير ماديا يسعى إلى رفع المستويات التكنولوجية والاقتصادية للمجتمع، أو معنويا يسعى إلى إحداث تغيير في اتجاهات الأفراد نحو مختلف القضايا، بحيث يصبحون أكثر استعدادا ومن ثم أكثر تجاوبا للمشاركة الفعالة في العمل الجماعي من أجل تحسين وتطوير مستويات الحياة في بيئاتهم المحلية، وبحيث يصبحون أكثر تقبلا لتغيير سلوكهم بالصورة المرجوة للمواطن الكفء والصالح (1). ومما لا ريب فيه أن العمل الإرشادي الزراعي يستطوع أن يسهم إسهاما فعالا في مجالات التنمية الاقتصادية والاجتماعية والريفية باعتباره عملا تعليميا غير رسمي يقوم به هيكل تنظيمي متكامل من المهنيين والقادة المحليين، مهنيين في ذلك بفلسفة عمل واضحة بهدف خدمة المزارعين وأسرهم وبيئتهم ، واستغلال إمكاناتهم المتاحة وجهودهم الذاتية، ومساعدتهم على توجيهها لرفع مستوياتهم الاقتصادية والاجتماعية وذلك من خلال إحداث تغييرات سلوكية مرغوبة في معارفهم ومهاراتهم واتجاهاتهم (2). ولذلك فإن للكادر الزراعي والإرشادي أدوارا متعددة بتعدد الأنشطة الزراعية الإرشادية التي يمارسها وينجزها، فمنها ما هو قائم بعملية التعليم أو تنظيم الجماعات المستهدفة، أو تخطيط البرامج التعليمية التدريبية استنادا لحاجات المزارعين، والقيام بعملية التنسيق بين لجان التخطيط المختلفة مع الكوادر البحثية، وتنشيط عملية الاتصال لإيصال المعلومات والرسائل الإرشادية إلى المزارعين. ويمكن تلخيص دور الكادر الزراعي والإرشادي بأنه نقطة استقطاب تعمل على إحداث التغييرات السلوكية التي سبق ذكرها وذلك لغرض تحسين المستوى المعيشي للسكان الريفيين وزيادة الانتاجية الزراعية النباتية والحيوانية وزيادة عائدات البلدان النامية من القطاع الزراعي ودفعها لعجلة التنمية الاقتصادية والاجتماعية إلى الأمام (3). وتتوقف مشاركة الكوادر أو القائمين بالعمل الزراعي في البرامج أو الأنشطة الزراعية والإرشادية على العديد من العوامل الشخصية وغير الشخصية. وتعتبر الاتجاهات من أهم العوامل الشخصية المؤثرة في سلوكهم تجاه المشاركة في مثل هذه الأنشطة والبرامج الزراعية والإرشادية والتي لا بد من إعطاء عظيم الاهتمام لها، حيث سيظل هذا الدور قاصرا ما لم تتسم اتجاهاتهم نحو العمل الإرشادي الزراعي بصفة عامة بالإيجابية، ومن ثم دراسة الظروف والعوامل والضغوط التي تدفعهم للسلبية تجاه العمل الزراعي والإرشادي للعمل على تلافيها والتغلب عليها (4). ولقد تعرض مفهوم الاتجاه Attitude للبحث والتقصي من جانب علماء النفس والاجتماع، ولذلك وضعت له العديد من التعريفات التي توضحه. فقد عرفه قاموس فيرتشيلد Fairchild بأنه رد فعل مكتسب أو متعلم يتكون نحو بعض الأشياء أو الأشخاص، ويوجه كل أنماط السلوك ويرتبط بمجموعة من القيم قد تكون ايجابية وقد تكون سلبية(5). كما يعرف الاتجاه على أنه موقف إرادي يقفه شخص أو فكرة أو جماعة، ويستند الاتجاه إلى عنصرين أساسيين هما الرغبة كوحدة وجدانية والافتناع كوحدة عقلية (6). كما ينظر إلى الاتجاه على أنه استعداد وجداني ثابت نسبيا يحدد شعور الفرد وسلوكه نحو موضوعات معينة، ويتضمن حكمها عليها بالقبول أو الرفض (7). كما يمكن النظر للاتجاه على أنه حالة تأهب واستعداد للسلوك حيال مواقف أو أشخاص أو موضوعات معينة تعتمد على جوانب وجدانية ومعرفية (8). هذا وترجع أهمية الاتجاهات إلى اعتبارها محركات وموجهات للسلوك كما أنها تحقق للفرد مجموعة من الأهداف، منها مساعدة الفرد على تصنيف علاقته بالأفراد أو المجتمع ككل. كما أنها تيسر على الفرد التعامل مع المواقف السيكلوجية على نمو منظم، كذلك تساعد الفرد على بلوغ أهداف محددة . إن عملية الاتصال الصحيحة تعد جوهر العمل الزراعي والإرشادي الناجح خاصة، وتطوير الريف وتنميته عامة. ذلك أن عملية تطوير الريف تعتمد على التنسيق والتعاون بين فئات رئيسة ثلاث هي العلماء أو الباحثون باعتبارهم مكتشفي المبتكرات والمنتجات التكنولوجية العصرية والعاملون على توسيع حدود المعرفة كل في نطاق تخصصه، والإداريون لكونهم القائمين على إدارة البرامج التنموية وتوفير الظروف التي تمكن العاملين فيها من القيام بمهامهم بجدارة وكفاءة، والمرشدون الزراعيون وغيرهم من القائمين بالعمل الزراعي باعتبارهم القائمين بعملية إيصال المكتشفات الجديدة الى جمهور

الأهداف البحثية

يستهدف هذا البحث بصفة رئيسية دراسة أثر بعض العوامل على اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي نحو العمل الإرشادي في مديرية زراعة كربلاء. وتتحصر وسائل تحقيق هذا الهدف الرئيس في الأهداف الفرعية التالية :

- 1- التعرف على بعض الخصال الشخصية والاقتصادية - الاجتماعية والاتصالية للقائمين بالعمل الزراعي المبحوثين .
- 2- التعرف على مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين نحو العمل الإرشادي الزراعي .
- 3- دراسة طبيعة العلاقة الارتباطية بين خصائص المبحوثين كمتغيرات مستقلة ومستوى اتجاهاتهم نحو العمل الإرشادي الزراعي كمتغير تابع .

طرق العمل والمنهجية

أولاً: المتغيرات البحثية : تتمثل المتغيرات في هذا البحث في بعض العوامل الشخصية والاقتصادية والاجتماعية والاتصالية للقائمين بالعمل الزراعي بمديرية زراعة كربلاء: اعمار المبحوثين، المستوى التعليمي، عدد سنوات الخبرة، النشأة، عدد أفراد الأسرة، التعرض للدورات التدريبية، الانفتاح الثقافي، تعدد المصادر المرجعية المعرفية الزراعية، المشاركة في البرامج الإرشادية الزراعية. بينما اعتبر مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الإرشادي الزراعي بمثابة المتغير التابع في هذه الدراسة .

ثانياً : الفروض البحثية: وفقا لأهداف البحث ، فإن هذه الدراسة تختبر الفرض البحثي التالي : يتأثر مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي نحو العمل الإرشادي الزراعي كمتغير تابع بكل من المتغيرات المستقلة التالية اعمار المبحوثين ، المستوى التعليمي ، عدد سنوات الخبرة ، النشأة ، عدد افراد الاسره ، التعرض للدورات التدريبية ، الانفتاح الثقافي ، تعدد المصادر المرجعية المعرفية الزراعية ، المشاركة في البرامج الارشادية الزراعية . ويتم اختيار هذا الفرض في صورته الصفرية التالية لاتوجد علاقة بين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي كمتغير تابع وكل من المتغيرات المستقلة التسعة السابقة .

ثالثاً : الشاملة والعينة : تنطوي شاملة هذا البحث على جميع القائمين بالعمل الزراعي بمديرية زراعة كربلاء من المهندسين والفنيين الزراعيين والبالغ عددهم 160 فردا وفقا لسجلات المديرية وقد اشتملت عينة البحث على 84 مبحوثا (بنسبة تبلغ 51,25%) موزعين عشوائيا على فروع الشعب الزراعي المختلف التابع لمديرية الزراعة في كربلاء وذلك وفقا لامكانيات هذه الشعب والمتمثلة في شعبة زراعة الهنديه، شعبة زراعة عون ، شعبة زراعة الجدول الغربي ، شعبة زراعة عين تمر ، الشعب الصحراوي، شعبة زراعة الخيرات ، شعبة زراعة الحسينية .

جدول رقم (1): توزيع المبحوثين وفقا لخصائصهم الشخصية والاقتصادية الاجتماعية والاتصالية الإرشادية

الخاصية	العدد (ن = 85)	%
الوظيفة الحالية		
فني زراعي	60	71.4
مهندس زراعي	21	25.0
مرشد زراعي	3	3.6
اعمار المبحوثين		
اقل من 35 سنة	47	56.0
35	28	33.3
45 فأكثر	9	10.7
المستوى التعليمي		
المتوسطة الاعدادية	2	2.4
الزراعية		
الثانوية الزراعية	58	69.0
فوق ثانوي واقل من جامعي	3	3.6
مؤهل جامعي	21	25.0
سنوات الخبرة		
اقل من 10 سنوات	14	16.7
10	34	40.4
15	33	39.3
20 فأكثر	3	3.6
النشأة		
حضرية	57	67.9
ريفية	27	32.1
حجم الأسرة		
اقل من 6 افراد	30	35.7
6	40	47.6
12 فأكثر	14	16.7
التعرض التدريبي		
منخفض (اقل من 9)	37	53.6
متوسط (9 -)	21	30.4
مرتفع (15 فأكثر)	11	16.0
الممارسة الفعلية للعمل الزراعي		
عمل اداري فقط	14	16.7
اعمال مكتبية فقط	15	17.9
اعمال مكتبية وتطبيقية في الحقل	62	73.8
في مزرعته الخاصة	12	14.3
تقديم مشورة لزراع اخرين	22	26.2
تقديم المشورة للشركات والهيئات الزراعية	2	2.4
الانفتاح الثقافي (قيمة رقمية)		
منخفض (اقل من 10)	9	10.7
متوسط (10 -)	49	58.3
مرتفع (18 فأكثر)	26	31.0
المشاركة في البرامج الارشادية (قيمة رقمية)		
منخفض (اقل من 2)	53	63.1
متوسط (2 -)	22	26.2
مرتفع (4 فأكثر)	9	10.7

رابعاً : اسلوب تجميع وتحليل البيانات : لقد تم استيفاء البيانات البحثية الميدانية من افراد عينة القائمين بالعمل الزراعي بمديرية زراعة كربلاء وذلك من عينة البحث عن طريق استبيان تم توزيعه عن طريق قسم الارشاد والخدمات الزراعية بمديرية زراعة كربلاء , واستخدمت النسبة المئوية والمتوسط الحسابي ومعامل الارتباط البسيط والتحليل الانحداري لاستكشاف العلاقة بين بعض خصائص المبحوثين وبين مستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي.

النتائج والمناقشة

أولاً : بعض الخصال الشخصية والاقتصادية الاجتماعية والاتصالية للقائمين بالعمل الزراعي المبحوثين : لقد تبين من جدول رقم (1) ان 71% من القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين يشغلون وظيفة فنيين زراعيين , وان 25% منهم يعملون كمهندسين زراعيين , وان اكثر من نصفهم (56%) تقل اعمارهم عن 35 عاما , 65% يحملون مؤهل الثانوية الزراعية , كما تبين ان 40% منهم لديهم خبره وظيفيه من 10 - 15 عاما , 68% ينتمون الى المناطق الحضرية , كذلك فان قرابة نصفهم 47,6% ينتمون بالكبر النسبي لحجم اسرهم (6 - 12 فرد) كما ان 35% منهم ذوي تعرض منخفض للدورات التدريبية الزراعية , كذلك فان قرابة ثلاثة ارباعهم (73,8%) يزاولون اعمالا مكتبية وتطبيقية في الحقول , وان حوالي 58% من المبحوثين ذوي مستوى انفتاحي حضاري متوسط , كما ان 63% منهم ذوي مشاركته منخفضة في وضع وتنفيذ البرامج الارشادية الزراعية . كذلك تمثلت اهم مصادر معلوماتهم الزراعية التي يرجعون اليها دائما في النشرات الارشادية الزراعية (8,48% منهم) تلثها خبره الشخصيه (40,4%) ثم الاداره الزراعيه بمناطقهم (20,2%) بينما ذكر 9,11% منهم فقط كلية الزراعة وكلية الطب البيطري , (جدول رقم 2) , وهذا يشير الى اهمية تفعيل دور الكلية الارشادي في المحافظة اعمالا لدورها التثويري والتوعوي سواء القائمين بالعمل الزراعي او الزراع المبحوثين انفسهم كذلك فقد اشار القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين الى ان اهداف الارشاد الزراعي الاساسيه تتمثل في ادخال الاساليب التكنولوجيه الزراعيه الحديثه (50%) العمل على زيادة الانتاج ورفع دخل المزارعين (5,34%) خدمة وتوعية وتغيير مفاهيم المزارعين للافضل (26,2%) , نقل نتائج البحوث الزراعيه للزراع (20,2%) , ادخال الاصناف المقاومه والاقتصادية من التقاوي (17,9%) (جدول رقم 3) .

ثانياً : مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي :لقد تم تحديد مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين نحو العمل الزراعي من خلال اتجاهاتهم نحو بعض جوانب العمل الارشادي الزراعي والتي تتمثل في دور الارشاد في نشر الافكار والاساليب الزراعيه العصريه , دور الاجتماعات والنشرات الارشادية , دور المرشد الزراعي في توعية الزراع لتحقيق الجداره الانتاجيه الزراعيه , التجديده في الاساليب والنمط الزراعي وغيرها من الجوانب التي تمس العمل الارشادي الزراعي. ولقد تم قياس ذلك معبرا عنه بقيم رقميه . ولقد اشارت النتائج الى ان مستوى اتجاهات القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي يعتبر مرتفعا لثلاثة ارباع المبحوثين (75%) . في حين تبين ان 4,8% من المبحوثين ذوي اتجاه منخفض نحو العمل الارشادي الزراعي (جدول رقم 4).

جدول رقم (2) : توزيع المبحوثين وفقا لمصادر معلوماتهم الزراعية

المصدر	دائما	%	احيانا	%	نادرا	%	لا يرجع اليها	%
النشرات الفنية	41	48.8	31	37.0	6	7.1	6	7.1
الخبره الشخصيه	34	40.4	26	31.0	8	9.5	16	19.1
الاداره الزراعيه	17	20.2	15	17.9	24	28.6	28	33.3
مراكز البحوث الزراعيه	15	17.9	22	26.2	21	25.0	26	30.9
الاجتماعات والندوات الارشاديه	15	17.9	19	22.6	26	30.9	24	28.6
المرشد الزراعي	14	16.7	14	16.7	39	26.2	17	20.2
الصحف اليوميه	14	16.7	23	27.4	26	30.9	21	25.0
المعاهد الزراعيه بالمنطقه	13	15.5	24	28.6	26	30.9	21	25.0
المعارض الزراعيه	12	14.3	33	39.3	20	23.8	19	22.6
كلية الزراعة وكلية الطب البيطري	10	11.9	23	27.4	32	38.1	19	22.6
البرامج التلفزيونيه	8	9.5	37	44.1	21	25.0	18	21.4
الوكالات الزراعيه	7	8.3	25	29.9	34	40.4	18	21.4
البرامج الاذاعيه	6	7.1	37	44.1	22	26.2	19	22.6
الاصدقاء والجيران	4	4.8	27	32.1	28	33.3	25	29.9
الجمعيه التعاونيه الزراعيه	1	1.2	8	9.5	42	50.0	33	39.3

جدول رقم (3): توزيع المبحوثين وفقا لرويتهم للاهداف التي يسعى اليها الارشاد الزراعي

الاهداف	العدد	%
ادخال الاساليب التكنولوجيه الزراعيه الحديثه	42	50.0
العمل على زياده الانتاج ورفع دخل المزارعين	29	34.5
خدمه وتوعيه وتغيير مفاهيم المزارعين للافضل	22	26.2
نقل نتائج البحوث الزراعيه للزراع	17	20.2
ادخال الاصناف المقاومه والاقتصاديه	15	17.9
المشاركه في حل مشاكل الزراع	11	13.1
تعريف المزارعين باساليب مكافحه الافات	10	11.9
حث المزارعين على اتباع الدوره الزراعيه	8	9.5
اقامه الحقول الارشاديه لتوعيه المزارعين	2	2.4
تعريف المزارعين باساليب استخدام الآلات والمحافظه عليها	2	2.4
تعريف المزارعين بالطرق المثلى للتسويق الزراعي	1	1.2
ايراز الشخصيات الخطايه	1	1.2

جدول رقم (4): توزيع المبحوثين وفقا لمستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي

مستوى الاتجاه (قيمة رقميه)	العدد	%
منخفض (اقل من 10)	4	4,8
متوسط (10 – 20)	17	20,2
مرتفع (20 فاكثر)	63	75,0
المجموع	84	100,0

المألوفا (0,01 , 0,05) وقد يرجع ذلك الى ان ايجابيه او سلبيه الاتجاه نحو العمل الارشادي الزراعي قد لا يرجع بالدرجه الاولى للتقدم الوظيفي وانما يرجع لعوامل او متغيرات اخرى مثل المستوى التعليمي كما تبين ذلك في هذا البحث .

4- **النشأه الريفيه أو الحضريه :** لقد بلغت قيمة معامل الارتباط البسيط بين النشأه (الريفيه / الحضريه) وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي – 0,166 وقد تبين عدم معنويه هذه العلاقه الارتباطيه على المستويات الاحتماليه المألوفه (0,01 , 0,05) وقد يرجع ذلك الى ان النشأه الريفيه كانت او حضريه لا تلعب دورا مؤثرا في هذا البحث في تحديد اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي وانما قد يرجع الى ممارسه او مشاركه المبحوثين في الانشطه الارشاديه الزراعيه مثلا .

5- **عدد افراد الاسره :** لقد بلغت قيمة معامل الارتباط البسيط بين مقدار اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي وبين السعه النفريه الاسريه او عدد افراد الاسره – 0,334 وهو رقم سالب يعكس قيام علاقه ارتباطيه عكسيه بين اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي وبين عدد افراد الاسره . وقد يرجع ذلك الى ان قلة عدد افراد الاسره وبمعنى اخر قلة الاعباء الاسريه تعطى الفرصه للمبحوثين للمشاركة في الانشطه الارشاديه المتنوعه مما يؤدي الى زياده ايجابيه اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي.

ثالثا : **طبيعه العلاقه بين خصائص المبحوثين ومستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي:**

العلاقه الارتباطيه : لقد اوضحت نتائج التحليل للارتباط البسيط (جدول رقم 5) بين تسعة متغيرات مستقلة تضمنها هذا البحث، وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي ما يلي :

1- **أعمار المبحوثين :** لقد بلغت قيمة الارتباط البسيط بين مقدار اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي وبين اعمارهم 0,022 وهو رقم موجب الا انه قد تبين عدم معنويه هذه العلاقه عند اي من المستويات الاحتماليه المألوفه (0,01 , 0,05) .

2- **المستوى التعليمي :** لقد بلغت قيمة الارتباط البسيط بين المستوى التعليمي للمبحوثين وبين مستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي 0,221 وهي قيمة تعكس قيام علاقه ارتباطيه معنويه بين المتغيرين على المستوى الاحتمالي 0,05 ويعد هذا شيئا بديهيا اذ ان ذوي المستوى التعليمي الزراعي المرتفع يعدون اكثر تفهما ووعيا وادراكا لطبيعه واهمية الدور الذي يلعبه الارشاد الزراعي في الارتقاء بالواقع الانتاجي الزراعي .

3- **عدد سنوات الخبرة الوظيفيه :** لقد تبين ان قيمة معامل الارتباط البسيط بين عدد سنوات خبره الوظيفيه للمبحوثين وبين مستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي قد بلغ – 0,077 وقد تبين عدم معنويه هذه العلاقه الارتباطيه على المستويات الاحتماليه

الزراعي المبحوثين ، وفي حالة توافر مثل هذه البرامج فإن محتواها واساليبها وادواتها وافكارها لم تكن في مستوى طموح المبحوثين مما انعكس سلبا على ايجابية اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي.

المصادر

1. Al-Gad I. (2010). Evolution in community development programs . The International Center for Education in The Core of Arab World, Lebanon. 6th ed. P.:23.
2. Al Zalaki MM (2002). Saw in and the forming. Community and The Arab Fish Kuwait. P.:104.
3. Sodad SHasan (2011). Psychological and social change theory. Dar Al- Fager, Baghdad . 1st ed. P.:74.
4. Omar A. (2006). Agriculture extension Cairo. P.:37.
5. Fairchild HP. (2003). Dictionary of Sociology and Related Sciences . Sittle Field & Adams CO. To- Tewa- N. Gersey. P.:23.
6. Othman A. (2009). Contemporary individual and community service. Dar Al- Nafaes, Jordan. P.:157.
7. Rageh AE. (2010). Assets of psychology. Egyptian Arab Bureau. Cairo. P.:81.
8. Jbrel SR. (2006). Study of university students attitudes towards religion. 7th International conference of statistic and research social and demographic. King Saud University. P.:11.
9. Kholi HZ. and Ahzali MF. (1986). Agriculture extension. Lebanon. P.:23.
10. Al-Adla A. (1972). Basics of agriculture extension. Dar New Publications. Alexandria. P.:23.
11. Taha AG. (2009). Agric extension between philosophy and application. Cairo P.: 64.
12. Saber MD. (2012). Changing culture and community development. Alzerai. Comm. Develop. Magaz. 13(2):29.

جدول رقم (5): معامل الارتباط البسيط بين بعض خصائص المبحوثين وبين مستوى اتجاهاتهم نحو العمل الارشادي الزراعي

الخصائص	قيمة معامل الارتباط
اعمار المبحوثين	0,022
المستوى التعليمي	0,221
عدد سنوات الخبرة	0,077-
النشأ	0,166-
عدد افراد الاسره	0,334-
التعرض للتدريبي	0,109-
الانفتاح الثقافي	0,219
تعدد المصادر المعرفيه	0,046
المشاركه في البرامج الارشاديه	0,026-

6- التعرض للتدريبي : لقد بلغت قيمة معامل الارتباط البسيط بين التعرض للدورات التدريبية والاستفادة منها وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي -0,109 وهي قيمة تعكس قيام علاقه عكسيه ولم تثبت معنويتها على المستوى الاحتمالي 0,05 وقد ترجع سلبية هذه العلاقه الى عدم تعرض كثير من المبحوثين لهذه الدورات التدريبية اثناء الخدمة الوظيفيه وفي نفس الوقت فان هذا قد يشير الى ان نوعيه ما يطرح من موضوعات في مثل هذه الدورات التدريبيه قد لا تقابل حاجات ورغبات واهتمامات ومشاكل ومطالب القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين ، اذ ان التدريب الزراعي او الارشادي يقصد به مساعدة القائمين بالعمل الزراعي الارشادي ليتغلبوا على ما قد يتعرض من صعاب ومشاكل في العمل كما انه وسيله للحصول على اكثر قدر من الكفايه والقدرة على نقل المعلومات والافكار الفنيه والممارسات الجديده من المستوى النظري الى المستوى التطبيقي (10).

7- الانفتاح الثقافي : ان الانفتاح الثقافي والاتصال المتنوع بالمجتمع يؤدي الى التغيير والتطوير والتعديل في معارف واتجاهات ومشاعر الافراد مما يكون له عظيم الاثر في التغير السلوكي للافراد بما ينعكس على حياة الفرد والمجتمع ككل من تطوير وتحسين الاداء (11). ويعرف الانفتاح الثقافي على انه مدى تاثير الفرد بعنصري الثقافه المادي والفكر (12) , وعند دراسة الانفتاح الثقافي للمبحوثين من خلال التعبير بقيم رقميه تعبر عن مدى الاطلاع على الصحف والمجلات والكتب الزراعيه والدينيه والكتب الثقافيه العامه كذلك مدى سماعهم او رؤيتهم للبرامج الاذاعيه المسموعه والمربيه , كذلك قياس مدى تعرضهم لها واستفادتهم منها . فقد تبين ان قيمة معامل الارتباط البسيط بين مقدار الانفتاح الثقافي وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي قد بلغ 0,219 وهو رقم موجب يعكس قيام علاقه ارتباطيه طرديه بين المتغيرين كما تبين معنويه هذه العلاقه عند المستوى الاحتمالي 0,05 ولعل هذا يعد منطقياً لان ارتفاع مستوى الانفتاح الثقافي يؤدي الى زياده المعارف وارتفاع المستوى الطموحي مما يدعم الاتجاهات الايجابيه نحو العمل الارشادي باعتباره منهجا يهدف الى تطوير المستويات الحياتيه وواقع المجتمع .

8- تعدد المصادر المرجعيه المعرفيه الزراعيه : لقد تبين ان قيمة معامل الارتباط البسيط بين متغير عدد المصادر المرجعيه المعرفيه الزراعيه ومدى الرجوع اليها وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي قد بلغ 0,046 وهي قيمة غير معنويه على المستوى الاحتمالي 0,05 وقد يرجع ذلك الى قلة المصادر المعرفيه الزراعيه المتاحه للمبحوثين او ان مستواها او محتواها لا يتوازي مع متطلبات واهتمامات القائمين بالعمل الزراعي المبحوثين . هذا على الرغم من معرفتنا ان الارشاد الزراعي يسلك سبلا تعليميه عديده من اجل تحقيق اهدافه وبلوغ غاياته , فهو يوجه رسالته الى جماهير كبيره تتباين تباينا واضحا في خصائصها ومستوياتها الاجتماعيه والاقتصاديه وفي اعمارها وفي ثقافتها , وفي قدرتها على الفهم والادراك , ولذا فمن الاهميه تفهم المصادر التي يستمد منها العاملون في الارشاد الزراعي معلوماتهم والتي تتمشى مع امكانياتهم وتتناسب مع تقاليدهم - (10) .

9- المشاركة في البرامج الارشاديه : لقد تبين ان قيمة معامل الارتباط البسيط بين مدى المشاركة في وضع البرامج الارشاديه وبين مستوى اتجاهات المبحوثين نحو العمل الارشادي الزراعي قد بلغ - 0,026 وهي قيمه غير معنويه على المستوى الاحتمالي 0,05 , وقد يرجع ذلك الى قلة الانشطه والبرامج الزراعيه الارشاديه بالمنطقه كما ان فرصه المشاركة ليست متاحه لجميع القائمين بالعمل

الطحالب في بعدها الحضري: استعراض وتحليل لأهم تطبيقات الطحالب الحضرية ومحاولة الاستفادة منها في تحسين الأداء البيئي للمدينة العراقية

هالة حسين موسى

قسم الشؤون الهندسية / رئاسة جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: hala.hussein.musa.76@gmail.com

الملخص باللغة العربية

إن الهدف النهائي المنشود من إعداد هذه الدراسة هو محاولة الاستفادة من التجارب العالمية في مجال البيئة والطاقة النظيفة وتطبيقاتها على المستوى الحضري، من خلال الاطلاع عن كثب على واحدة من أحدث التقنيات في هذا المجال، وهي تقنية خلية الوقود الحيوي الطحلبية، التي شاع استخدامها مؤخراً في إنتاج الطاقة الكهربائية والتعامل مع ما تنتجه هذه الخلية من كتلة حيوية طحلبية للاستفادة منها في مختلف الأغراض الصناعية والطبية والغذائية والزراعية، والتي يبرز من أهمها إنتاج الوقود الحيوي النظيف والصدى للبيئة. لم تقتصر أهمية خلية الوقود الحيوي الطحلبية عند هذا الحد، بل إنها تعدت ذلك من خلال إمكانياتها في التعامل مع المياه الرمادية ومعالجتها وإعادة إنتاج مياه نظيفة صالحة لأغراض ري المزروعات، ولمختلف الأغراض المنزلية، مما يساهم في تخفيف الضغط على مصادر المياه وعلى شبكات الصرف الصحي في المدينة، هذا بالإضافة إلى إمكانية تخزين المياه الفائضة عن الحاجة تحت الأرض، وإعادة استخدامها في فصل البرد لأغراض التدفئة. ولما كانت الطحالب هي أساس عمل هذه الخلية، كان لا بد من الاطلاع بداية على هذه الكائنات الحية، ومعرفة أهم أنواعها وأكثرها ملاءمة للاستخدام، وبالتالي التعرف على الفوائد البيئية والحياتية المتحصلة منها، من خلال متابعة أهم التطبيقات الحياتية التي اعتمدت على الطحالب كأساس في عملها، وصولاً إلى أهمها على المستوى الحضري والمعماري، والتي بنيت جميعها على مبدأ واحد، وهو التعامل مع الطحالب في وحدة زجاجية سميت بخلية الوقود الطحلبية، حيث يتم فيها عملية تكاثر الطحالب ونموها من خلال قيامها بعملية البناء الضوئي. تلك العملية التي تتطلب سحب غاز ثاني أكسيد الكربون من الجو، حيث تكمن هنا أهم فوائد الطحالب وهي تقليل النسبة المتزايدة من غاز ثاني أكسيد الكربون في الجو، وما ولدته من مشاكل تلوث بيئي واحتباس حراري، الأمر الذي جعل من مدننا اليوم بيئة غير صحية للعيش فيها. وهذه هي مسؤوليتنا جميعاً تجاه الأجيال القادمة التي تستحق العيش في بيئة حضرية نظيفة وصحية.

الكلمات المفتاحية: الطحالب، الوقود الحيوي، خلية الوقود الحيوي الطحلبية.

Algae in urban dimension: review and analysis of the most important urban algae applications to take the advantage for improving environmental performance of the Iraqi city

Hala H. Musa

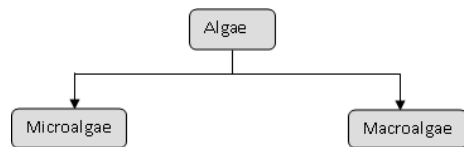
Dept. of Engineering Affairs/ Head of University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The main goal of the present study was to take advantage from the international experiences in the field of environment and clean energy and their applications at urban level, by studying one of the latest technologies in this field, which was "algae bio fuel cell" technology that is used in the production of electric energy and using the algae bio mass for various industrial, medical, food and agricultural purposes, one of them is clean biofuel and eco-friendly production. The importance of algae bio-fuel cell is not limited at this point, but it exceeds due to its ability in recycling gray water to a clean water, which can be used for the purpose of irrigation and for other domestic uses, so it consider a new source of water for the city that can reduce the pressure on the sanitary network of the city, in addition this water can be storage underground and re-use in the cold season for heating purposes.

The base element of bio fuel cell is algae, so the study focused on it by reviewing its types and the most benefit one to identify its life and environmental benefits, and that was by following up the most important life applications that relied on algae as a basis in their work down to the most important one on the urban and architectural level which was built on one principle, by putting algae in a glass unit called algae fuel cell, were algae growth by its photosynthesis process which take carbon dioxide gas from the air, and that was the most important benefit of algae which can reduce the increasing amount of carbon dioxide gas in the atmosphere and that was one of the reason of air pollution and heat retention which made our cities today a bad place to live in, and this is our responsibility towards future generations who deserve to live in a clean and healthy cities.

المقدمة



شكل رقم (1): أنواع الطحالب

وبشكل عام، فإن عالم الطحالب عالم كبير وواسع جداً، وما يهمنا كمختصين في مجال العمارة والتخطيط الحضري منها هي الأنواع الأكثر قدرة على النمو والتكاثر في ظروف بيئية صعبة. والجدول رقم (1) يبين أفضل أنواع الطحالب في عملية جمع غاز ثاني أكسيد الكربون في أكثر الأماكن تلوثاً وهي (يوكليد تراسيليس)، لما لها من قدرة على النمو في الأوساط الحامضية، إضافة إلى قابليتها على النمو في درجات الحرارة المعتدلة، وكفاءتها العالية في سحب غاز ثاني أكسيد الكربون للقيام بعملية البناء الضوئي، والتي تتجاوز نسبة 100% (4).

جدول رقم (1): أفضل أنواع الطحالب بيئياً (4)

نوع الطحلب	درجات الحرارة	كفاءة التقاط غاز CO2	المميزات
Chlorococcum sp.	15-27 درجة سيليزية	أكثر من 70 %	قابلية عالية في تثبيت غاز ثاني أكسيد الكربون
Chlorella sp.	15-45 درجة سيليزية	أكثر من 60 %	تتميز بالقدرة على النمو في درجات الحرارة المرتفعة
Euglena gracilis	23-27 درجة سيليزية	أكثر من 100 %	تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الأمينية المهمة في عملية الهضم لها القدرة على النمو جيداً في الأوساط عالية الحامضية

تمتلك الطحالب القدرة على إنتاج الطاقة الكهربائية ومعالجة مياه الصرف الصحي، وإعادة تدويرها واستخدامها للأغراض المنزلية من خلال إزالة البكتيريا القولونية بنسبة 99%، كما يمكن لها أن تزيل النيتروجين بنسبة 80-90% والفوسفور بين 70-90% والمعادن الثقيلة حتى 99% (5). وهذا عن طريق واحدة من أذكى التطبيقات في معالجة الطحالب، والمتمثلة بخلية الوقود الطحلبية، والتي سيتناولها البحث بشيء من التفصيل في المحور الثاني، كما أن الكتلة الحيوية الناتجة عن عملية المعالجة تلك لها استخدامات حياتية كثيرة. كل هذا جعل من الطحالب هدفاً للعديد من الأبحاث في مختلف المجالات الحياتية، ومنها:

- 1- الاستخدامات الطبية.
- 2- الاستخدامات الزراعية.
- 3- في مجالات الغذاء.
- 4- إنتاج الوقود الحيوي الصديق للبيئة.
- 5- توليد الطاقة الكهربائية.
- 6- الاستخدامات البيئية.

الطحالب والمدينة

يتناول هذا الجزء عدداً من المحاولات الحضرية والمعمارية وصولاً إلى وحدات أثاث اعتمدت الطحالب كأساس في تصميمها، وذلك للاستفادة من قابلية الطحالب على تحسين الأداء البيئي للمدينة ككل، وبالتالي توفير مكان أفضل للعيش، لكن تم التطرق بدايةً إلى مشكلة تلوث الهواء، والتي تعد أحد أهم المشاكل البيئية التي تعاني منها المدينة الحديثة، والتي يمكن أن تسهم الطحالب بشكل كبير في الحد منها.

يتناول البحث موضوعاً جديداً على الساحة المعمارية والحضرية، إلا أن له تطبيقات واسعة وكثيرة في مجالات علمية أخرى، حيث يتحدث عن الطحالب التي تتكاثر في المياه الآسنة والراكدة، والتي تبين أن لها فاعلية كبيرة جداً في تحسين الواقع البيئي المتردي للمدينة الحديثة، وذلك لقابليتها على تنقية الجو من غاز ثاني أكسيد الكربون المتزايد فيه من خلال قيامها بعملية البناء الضوئي التي تتطلب وكما هو معروف استخدام ثاني أكسيد الكربون لصنع الغذاء الكافي لها، هذا بالإضافة إلى إمكانية إنتاج الوقود الحيوي وتوليد الطاقة الكهربائية منها (1). لذا فقد سعى البحث للإجابة على التساؤلات التالية:

- ما علاقة الطحالب بالمدينة وعمارته وتحسين واقعها البيئي؟
- ما أهم المشاكل البيئية في المدينة العراقية التي تستطيع الطحالب حلها؟
كل ذلك سيتم الإجابة عليه من خلال هذا البحث الذي تم تصميمه في محورين رئيسيين:

1- المحور الأول: يتحدث أولاً عن الطحالب والتعريف بها وبأهم الاستخدامات الحياتية لها، ثم ثانياً التعرف على البعد الحضري للطحالب حيث سيتم التعرف على دور الطحالب في الحد من التلوث البيئي وبعدها سيستعرض البحث عدد من المشاريع الحضرية الطحلبية سواء كانت مشاريع تخطيط حضري كبرى أو تصاميم لوحدات طحلبية حضرية صغيرة.

2- المحور الثاني: سيستعرض البحث أولاً حالة دراسية لبنائية طحلبية منفذة فعلياً حيث سيتم تحليل المشروع والتعرف على تفاصيله المعمارية (الطحلبية) واستعراض للتأثيرات الأولية المرصودة لفترة ما بعد التشغيل. وأخيراً يتناول البحث، في الجزء الثاني من المحور الثاني، بالشرح المعزز بالإحصاءات أهم المشاكل التي تعاني منها المدينة العراقية وما ينسجم مع ما توفره المشاريع الطحلبية من حلول بيئية للتعرف على أهمية استخدام مشاريع من هذا النوع لتحسين الواقع البيئي المتردي للمدينة العراقية.

وفي النهاية يستعرض البحث مجموعة من الاستنتاجات العلمية التي تمثل خلاصة ما تم التوصل إليه، وينتهي أخيراً بمجموعة من التوصيات المهمة التي قد يساعد العمل بها على تحسين الواقع البيئي المتردي للمدينة العراقية.

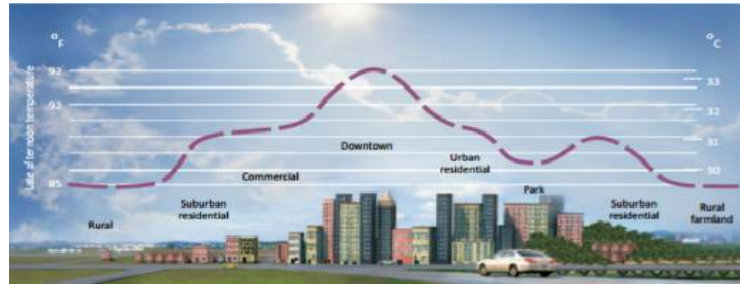
يمثل هذا البحث محاولة لفهم الأثر البيئي للطحالب على المدينة ومفرداتها البنائية، من خلال التحليل العلمي لهذا الموضوع لمعرفة حدودنا كمعماريين ومخططين حضريين في هذا المجال، ومدى إمكانية المتاحة لتطوير وتطبيق التقنيات الطحلبية في الحد من التلوث البيئي للمدينة الحديثة. وفي النهاية ما هو إلا مسعى للاستفادة من كل ما هو متاح للنهوض بالمدينة العراقية من الناحية البيئية.

المحور الأول: مفهوم الطحالب

ما هي الطحالب وما أنواعها؟

في هذا الجزء من المحور الأول سنتحدث عن "الطحالب"، وأهميتها للإنسان، وما هي فوائد وجود هذه الكائنات الحية، إذ تعدّ الطحالب من أكثر الكائنات النباتية أهمية على وجه الكرة الأرضية، والتي تستطيع التكيف مع درجات الحرارة المتفاوتة، كما أنّ الطحالب تحتوي على الفيتامينات والعناصر المعدنية، وهي تعتمد على أشعة الشمس والماء وثاني أكسيد الكربون في بناء أنسجتها. إن الطحالب هي كائنات حية، تستطيع صنع غذائها بنفسها كالنباتات، حيث إنها تمتلك صبغة الكلوروفيل، وبالتالي تقوم بعملية البناء الضوئي (1). تشمل كلمة الطحالب مجموعة كبيرة من الكائنات الحية؛ إذ تجاوزت 20000 ألف نوع، كما أنها منتشرة في جميع أنحاء العالم، وفي مختلف أنواع المياه، سواء كانت مياه عذبة أو مالحة أو حتى مياه الصرف الصحي. وهي تختلف من حيث الشكل والحجم واللون، فمن حيث الحجم يمكن تقسيم الطحالب إلى نوعين، وكما في الشكل رقم (1) حيث إن معظمها مجهرية وهي الطحالب وحيدة الخلية. إلا أن بعضها كبير جداً يصل طولها إلى 50 متراً (2). أما من حيث اللون، فللطحالب ألوان متعددة أهمها (3): الطحالب الخضراء - الطحالب الحمراء - الطحالب الخضراء المزرققة - الطحالب البنية - الطحالب الخضراء المصفرة - الطحالب الزرقاء الذهبية.

من الغلاف الجوي . ونظرا لأن هذه الإشعاعات الحرارية تكون موجاتها أطول من موجات الضوء المرئي، حيث يقع أغلبها في نطاق الأشعة تحت الحمراء ذات الموجات الطويلة، فإن هذه الإشعاعات لا تستطيع أن تمر في غاز ثاني أكسيد الكربون، بل تقوم جزيئات هذا الغاز بامتصاصها. ويترتب على ذلك أن غاز ثاني أكسيد الكربون الموجود في الهواء يقوم بحجز جزء من الطاقة الحرارية المنبعثة من سطح الأرض ويحتفظ بها في داخل الغلاف الجوي، مما يمنع تبديد حرارة الأرض في الفضاء. وبما أن درجة حرارة سطح الأرض هي محصلة لاتزان دقيق بمقدار ما يقع على هذا السطح من أشعة الشمس ومقدار ما ينعكس منها ويتشتت في الفضاء، فإن زيادة نسبة غاز ثاني أكسيد الكربون في الجو تؤدي إلى امتصاص كمية زائدة من الإشعاعات الحرارية المنعكسة من سطح الأرض والاحتفاظ بها، الأمر الذي يؤدي بالتالي إلى ارتفاع درجة حرارة الجو عن معدلها الطبيعي . وقد لا يؤدي ارتفاع درجة الحرارة ارتفاعا بسيطا إلى حدوث تغيرات ملموسة في باديء الأمر، لكن استمرار الزيادة في نسبة غاز ثاني أكسيد الكربون في الجو الناتجة من الزيادة المضطردة في إحراق الوقود سيؤدي على المدى الطويل إلى ارتفاع درجة حرارة طبقات الغلاف الجوي الملاصقة للأرض بشكل ملحوظ (13). لذلك يلاحظ أن درجات الحرارة في مراكز المدن المكتظة "حيث تقل نسبة المساحات الخضراء المستهلكة لهذا الغاز " تكون أعلى مما هي عليه في أطراف المدن والمناطق الزراعية التي ترتفع فيها نسبة المساحات الخضراء، وبالتالي زيادة في معدلات استهلاك غاز ثاني أكسيد الكربون (14) (شكل رقم 2).



شكل رقم (2): ظاهرة الجزر الحرارية في المدن (14)

المشاريع الحضرية: يتناول هذا الجزء بالسرد المقتضب عددا من المشاريع الحضرية التي تعد أحلاما وأعادة لمصممها في إمكانية استغلال الطحالب لتنقية هواء المدينة وإعادة تدوير المياه الرمادية، وبالتالي تقليل الضغط على شبكة مياه الصرف الصحي، إضافة إلى توليد الطاقة الكهربائية وإنتاج الوقود الحيوي النظيف والصدى للبيئة. وقد تم اختيار هذه المشاريع بعناية لما لها من علاقة بالمشاكل البيئية التي تعاني منها المدينة العراقية، وبالتالي إمكانية الاستفادة من أفكارها في تحسين أدائها البيئي.

1- مشروع البنى التحتية البيئية الطحلبية (شكل رقم 3): الموقع: تائبه، تايوان.

شرح عام للمشروع: يقترح هذا المشروع استراتيجية تعتمد على إيجاد نسيج مكاني ذي تسلسل ثلاثي الأبعاد، فشكل النقل التي تمثل أحد الأبعاد الثلاثة والتي تعتبر المصدر الرئيسي لغاز ثاني أكسيد الكربون توفر هذا الغاز للبعدين، الأفقي المتمثل بالزراعة المائية، والعمودي المتمثل بالأبراج الطحلبية، كما أن المياه الرمادية مع مياه الأمطار هي المصدر الرئيسي للمياه لهذين البعدين (16).

دواعي اختيار المشروع: السعي إلى إقامة مدن جديدة أو التوسعات الحضرية للمدن القائمة وفق بنى تحتية صديقة للبيئة يمكن لها استغلال مياه الأمطار والمياه الرمادية بطريقة أفضل.

أولا: أثر تلوث الهواء على بيئة المدينة: لمعرفة دور الطحالب في تحسين الواقع البيئي المتردي في المدينة الحديثة، لا بد من معرفة أهم المشاكل البيئية التي تعاني منها المدينة، حيث يمكن إجمالها بالتالي (12):

- 1- مشكلة تلوث الهواء.
- 2- مشكلة تلوث المياه.
- 3- مشكلة تصريف المياه الثقيلة.
- 4- مشكلة النفايات.

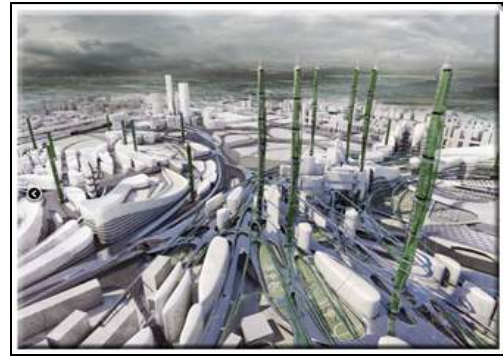
هذا بالإضافة إلى العديد من المشاكل الأخرى، كمسألة التلوث الصوتي والبصري والضوئي، وغيرها الكثير من المشاكل البيئية التي لا يتسع المجال لذكرها هنا، إلا أن ما يعنينا في هذا الصدد هو مشكلة تلوث الهواء التي باتت تشكل خطرا كبيرا على صحة سكان المدينة ومستقبلها، وكما هو معروف فإن أهم أسباب تلوث هواء المدينة هو الارتفاع المضطرد في نسبة غاز ثاني أكسيد الكربون في الجو نتيجة لعدة أسباب، الأمر الذي أدى إلى ارتفاع في معدلات درجات الحرارة في مراكز المدن، مما ترتب عليه اللجوء إلى أساليب تكييف مضررة بالبيئة تعمل بدورها على رفع درجة حرارة محيطها الحضري، مما يجعلنا ندور في حلقة مفرغة والخاسر الأكبر فيها هو الإنسان، ولكن يبقى السؤال هنا حول العلاقة بين ارتفاع نسبة هذا الغاز في الجو وبين ارتفاع درجات الحرارة. والجواب هو: إن غاز ثاني أكسيد الكربون شفاف تماما بالنسبة للضوء المرئي وكذلك بالنسبة للأشعة فوق البنفسجية، ولذلك يمر فيه ضوء الشمس بسهولة تامة ليصل إلى سطح الأرض. وعندما ترتفع درجة حرارة سطح الأرض وتحت وطأة أشعة الشمس ينبعث من هذا السطح بعض الإشعاعات الحرارية، ليمر خلال الطبقات الدنيا

وهذا بالضبط ما تسعى إليه التوجهات الحديثة في إدخال الطحالب في المدينة كعنصر حضري يعمل عمل النباتات، بل ويتفوق عليها، وذلك لأن واحدة من مميزات استخدام الطحالب هي بنيتها البسيطة، حيث إنها كائنات أحادية الخلية تتكاثر بسرعة (أسرع من النباتات بعشرة مرات)، مما يجعلها قادرة على إنتاج الكتلة الحيوية بسرعة، وبالتالي قدرة أكبر في سحب غاز ثاني أكسيد الكربون من الجو (15)، لذلك فقد كان لزاما على المخططين والمعماريين الاستفادة من هذه المميزات التي تحملها الطحالب، خاصة وأنها دخلت في تطبيقات حياتية أخرى عديدة كما أشرنا سابقا، فكان من الأجدر أن يكون للجانب التخطيطي والمعماري الدور الأكبر في هذا المجال، سيما وأن المدينة المعاصرة هي أكبر مصدر لغاز ثاني أكسيد الكربون في الجو. وبناء على ذلك، بذرت العديد من المحاولات التخطيطية والمعمارية الطحلبية والتي سيأتي البحث على استعراضها.

ثانيا: استعراض سريع لعدد من المشاريع الطحلبية: سيستعرض البحث هنا عددا من المشاريع التي اعتمدت على الطحالب كأساس في تصميمها، وذلك للاستفادة من مزايا الطحالب البيئية وقد كان بعضها عبارة عن مشاريع حضرية لمدن كاملة وبعضها مشاريع معمارية لوحدات بنائية طحلبية، فيما كان البعض الآخر عبارة عن عناصر حضرية طحلبية يمكن استعمالها كوححدات أثاث في اللاندسكيب الخاص بالمدينة، وأخيرا عدد من وحدات الأثاث الطحلبية التي يمكن أن تلعب دورا في تنقية الهواء داخل المبني وبالتالي تحسين الأداء البيئي له.



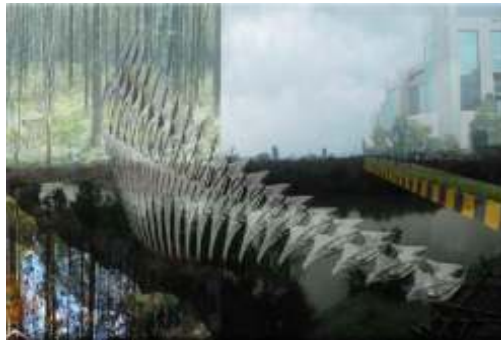
شكل رقم (5): مشروع معرض الطاقة الحيوية



شكل رقم (3): مشروع البنى التحتية البينية الطحلبية

4- مشروع الأهوار الحضرية (شكل رقم 6):

الموقع: مومباي ، الهند.
شرح عام للمشروع: هذا المشروع هو عبارة عن منطقة ربط حضرية بين النسيج الحضري لمدينة مومباي وبين الشبكة الإيكولوجية من الأهوار المحيطة بالمدينة من خلال إنشاء حاضنات طحلبية يمكن لها ان توفر الطاقة النظيفة التي تحتاجها المدينة (17).
دواعي اختيار المشروع: استغلال مناطق الأهوار في جنوب العراق لإنشاء منتجعات سياحية صديقة للبيئة بالاعتماد على الطحالب.



شكل رقم (6): مشروع الأهوار الحضرية

5- مشروع القرية الحضرية الطحلبية (شكل رقم 7):

الموقع: الصين.
شرح عام للمشروع: مقترح لمشروع قرية حضرية تتسع (20000) شخص في مدينة شنتشين المكتظة والتي يبلغ تعدادها 14 مليون نسمة ، حيث بني هذا المقترح على فكرة إعادة احياء نهر المدينة التاريخي المغمور منذ زمن ، ولكن هذه المرة سيكون عبارة عن مجرى من المياه الرمادية التي تعمل على تغذية وحدات الوقود الحيوي الطحلبية المنتشرة في المدينة حيث يتم إعادة تدويرها وإنتاج المياه النظيفة ليتم توزيعها على مختلف مرافق القرية الحضرية (17).

دواعي اختيار المشروع: اعتماد مبدأ إعادة التدوير للمياه الرمادية في إنتاج المياه النظيفة في مناطق التوسع الحضري للمدن وذلك لتخفيف الضغط على شبكة المجاري في المدينة وترشيد استهلاك المياه.

2- مشروع مزرعة الأعشاب البحرية (شكل رقم 4):

الموقع: برييتاني ، فرنسا.
شرح عام للمشروع: هذا المشروع عبارة عن مزرعة طحالب عائمة في نهر برييتاني في فرنسا حيث امتدت إليه يد الإنسان العابثة وغيرت من التوازن الطبيعي في المنطقة ، يقترح هذا المشروع إنشاء مبنى طحلي يحتوي على أنواع نادرة من الأعشاب البحرية والطحالب، حيث يعمل كمعرض ومركز أبحاث، مما يساعد على تنشيط الاقتصاد المحلي وإعادة الحياة إلى المنطقة (16).
دواعي اختيار المشروع: إعادة التوازن الإيكولوجي في مناطق ضفاف الأنهار خصوصا تلك التي طالها التخریب نتيجة سوء التعامل معها.



شكل رقم (4): مشروع مزرعة الأعشاب البحري.

3- مشروع معرض الطاقة الحيوية (شكل رقم 5):

الموقع: الصين.
شرح عام للمشروع: مشروع تطوير حضري لضفة نهر هانجيانغ ، وهي منطقة تمتاز بكونها تعمل على طاقة الفحم ما جعل الرماد المتطاير من عملية معالجة الفحم يغطي المدينة بنسبة 50% الأمر الذي أثر سلبا على نوعية الهواء والماء في المنطقة كلها ما استدعى التفكير بطاقة بديلة نظيفة تنتج من منطقة تنزه خضراء مفتوحة مع مجموعة من الأبنية الطحلبية وهي تساعد كذلك في تقليل نسبة غاز ثاني أكسيد الكربون في الجو (17).
دواعي اختيار المشروع: تنقية الهواء في مناطق ضفاف الأنهار خاصة تلك التي تقع بالقرب من مصافي النفط والمناطق الصناعية.

8- مشروع الطريق الأخضر (شكل رقم 10):

الموقع: تينيسي

شرح عام للمشروع: مشروع الطريق الأخضر هو مشروع يعتمد على الاستفادة من نواتج احتراق بنزين السيارات في تزويد أشجار الصنوبر والطحالب الممتدة على طول الطريق بغاز ثاني أكسيد الكربون ويهدف المشروع للوصول إلى ثلاثة أهداف رئيسية هي: موازنة انبعاثات الكربون في الغلاف الجوي، إعادة شحن المياه الجوفية في المنطقة من جريان المياه المعاد تدويرها من طحالب الطريق السريع وأخيرا توفير مصدر وقود حيوي يمكن استخدامه في محطات تعبئة السيارات على طول الطريق (17).

دواعي اختيار المشروع: توفير شبكة طرق سريعة خضراء في المدينة العراقية يمكن لها أن تقلل من حدة التلوث الذي تنتجه عوادم السيارات وكذلك استغلال نواتج الطحالب في إنتاج وقود حيوي صديق للبيئة يمكن توفيره للسيارات المارة ضمن محطات تعبئة وقود خاصة يتم تشييدها على هذه الطرق.



شكل رقم (10): مشروع الطريق الأخضر

9- مشروع برج الطاقة الحيوية (شكل رقم 11):

الموقع: زغرب، كرواتيا.

شرح عام للمشروع: مجموعة أبراج طحلبية في مدينة زغرب في كرواتيا صممت فوق محطات للوقود الحيوي وهي مؤلفة من 30 طابق فوق الأرض و 3 طوابق تحت مستوى سطح الأرض لتشكل ارتفاعا يبلغ حوالي 250 متر بواجهات عبارة عن مجموعة خلايا وقود حيوي طحلبية والأبراج تقع على مساحة أرض تبلغ 13400 متر مربع وهي عبارة عن مناطق حدائق ومواقف للسيارات (16).

دواعي اختيار المشروع: محاولة الاستفادة من مشاريع كهذه ونقل أفكارها إلى المدينة العراقية للاستفادة من كل المزايا البيئية التي توفرها الطحالب.



شكل رقم (11): مشروع برج الطاقة الحيوية

10- مشروع الجراب البيئي (شكل رقم 12):

الموقع: بوسطن، الولايات المتحدة الأمريكية.

شرح عام للمشروع: يتكون هذا المبنى من مجموعة من الكبسولات حيث تمثل كل واحدة منها مفاعلا حيويًا طحليًا مرتبطًا بهيكل انشائي مركزي يمثل شبكة من الحدائق العمودية لمجموعة من النباتات النادرة، للبناءية أذرع روبوتية تدار بالطاقة النظيفة تعمل على مناقلة الوحدات الكبسولية بما يتناسب مع كمية الإشعاع الشمسي على مدار اليوم وذلك لضمان حصول المفاعلات الحيوية على أكبر كمية



شكل رقم (7): مشروع القرية الحضرية الطحلبية

6- مشروع المزارع الطحلبية العائمة (شكل رقم 8):

الموقع: هونغ كونغ

شرح عام للمشروع: مشروع تطوير جانب الطريق السريع المحاذي لشاطئ البحر في مدينة هونغ كونغ والمقابل لمجمع دينيز السكني، حيث ترتفع نسبة غاز ثاني أكسيد الكربون بسبب عوادم السيارات واكتضاض المنطقة السكنية المجاورة ما استدعى اقتراح إنشاء منطقة خضراء مفتوحة على الشاطئ مع مساحات مائية من مزارع الطحالب يمكن لها أن تعمل على تنقية الجو وتوفير الطاقة اللازمة، إضافة إلى استخدام الماء الناتج لأغراض ري المزارع (17).

دواعي اختيار المشروع: السعي إلى تحسين الواقع البيئي لمناطق ضفاف الأنهار في المدن من خلال استغلالها في إنشاء مزارع طحلبية خاصة تلك التي تكون بالقرب من الشوارع والمناطق المكتظة.



شكل رقم (8): مشروع المزارع الطحلبية العائمة

7- مشروع القباب الطحلبية (شكل رقم 9):

الموقع: برشلونة، إسبانيا.

شرح عام للمشروع: مقترح تظليل ممر المشاة المطل على شاطئ البحر في مدينة برشلونة الإسبانية باستخدام قباب طحلبية ذات أشكال جيوديسية وبأنماط متكررة، تعمل هذه القباب إضافة إلى وظيفتها في توفير الظل على تنقية الهواء وتوفير ممر مشاة ذو هواء نقي وصحي (17).

دواعي اختيار المشروع: تظليل الأروقة وممرات المشاة في مناطق التنزه العامة في المدينة العراقية كالكورنيش مثلا من خلال الاستفادة من الطحالب لتنقية الهواء وذلك لتوفير هواء نقي وصحي للمارة.



شكل رقم (9): مشروع القباب الطحلبية

عناصر اللاندسكيب الطحلبية: إن هذه العناصر هي عبارة عن وحدات أثاث حضري يمكن توقيفها في أي مكان ضمن المحيط الحضري للمدينة كالساحات العامة والمتنزهات وفضاءات لعب الأطفال والتسوق، وما إلى ذلك بحيث يمكن لها أن تلعب الدور المنوط بها في التقليل من نسبة غاز ثاني أوكسيد الكربون في الجو.

1- مشروع المظلة الحضرية الطحلبية (شكل رقم 14):
شرح عام للمشروع: المظلات الحضرية الطحلبية هي أحد الحلول المقترحة في مناطق الأحياء السكنية أو مناطق التسوق القريبة منها حيث تتكون كل وحدة من مجموعة من الأنابيب الزجاجية المملوءة بالطحالب والتي تكون بهيئة مظلة تقترش نهاراً لتوفير الظلال في الطرق وتغلق ليلاً وتنتهي الوحدة الواحدة بخزان لحفظ الماء المعاد تدويره حيث يتم ربط كل مظلة بشبكة مياه الصرف الصحي للاستفادة منه كوسط لنمو الطحالب، ومن ثم يتم إعادة تدويره حتى يتمكن المارة من استخدامه. إن الفوائد من وجود مثل هذه المظلات في مناطق وحدة الجيرة كبيرة ومتعددة فهي مهمة لتوفير الظلال الكافية لحركة المشاة كما أنها تساعد على تنقية الجو وتوفير الهواء الصحي للمارة إضافة إلى فائدتها في توفير الوقود الحيوي والطاقة الكهربائية (17).

دواعي اختيار المشروع: إمكانية توفيرها بسهولة في مناطق وحدة الجيرة الحضرية ضمن ممرات التسوق أو الممشيات الخارجية لتوفير التظليل اللازم والاستفادة من كل المزايا التي توفرها.



شكل رقم (14): مشروع المظلة الطحلبية

2- مشروع مزارع الفطر الطحلبية (شكل رقم 15):

الموقع: الكونغو ، إفريقيا.

شرح عام للمشروع: هذا المشروع هو عبارة عن مزارع متنقلة للفطر يمكن توقيفها في أي مكان في العالم وخاصة في أماكن الكوارث والمدن الفقيرة حيث صمم المشروع بداية لمدينة كينشاسا في الكونغو في إفريقيا وقد تم اختيار زراعة الفطر لكونه نبات عالي الغلة وسهل الزراعة ويمكن تغذيته بالطحالب من خلال استخدامها كسماد إضافة إلى الاستفادة من الكتلة الحيوية الناتجة عنها في توفير الغذاء اللازم للسكان وإنتاج الطاقة النظيفة إضافة إلى توفير مصدر نظيف للمياه (17).

دواعي اختيار المشروع: لهذا المشروع خصوصية خاصة في التعامل مع الصرف الراهن والطارئ الذي يمر به العراق مع تزايد أعداد النازحين حيث يمكن الاستفادة من أفكار كهذه لتوفير مناطق استيطان مؤقتة لهذه الفئة واستخدامها لاحقاً كمحرك اقتصادي لإسكان ذوي الدخل المحدود.

من ضوء الشمس وبالتالي الحصول على أكبر قدر من التكاثر و أكبر إنتاج من الكتلة الحيوية الصلبة (16).

دواعي اختيار المشروع: محاولة الاستفادة من مشاريع كهذه ونقل أفكارها إلى المدينة العراقية للاستفادة من كل المزايا البيئية التي توفرها الطحالب.



شكل رقم (12): مشروع الجراب البيئي

11- مشروع البذرة (شكل رقم 13):

الموقع: سنغافورة.

شرح عام للمشروع: قامت الحكومة السنغافورية في العام 2010 بالتوجيه لتصميم "بلدة بنغالي الجديدة" كأول بلدة بيئية في البلاد بواقع (96000) وحدة سكنية تعتمد على مصادر الطاقة النظيفة مع نظام إدارة للنفايات والمياه الرمادية ، كما يقع على الجانب الآخر من البلدة جزيرة كوني التي سيتم فيها إنشاء متنزه صديق للبيئة يعتمد على مجموعة من عناصر اللاندسكيب الطحلبية التي تعمل على تنقية الهواء وتوليد الكهرباء والوقود الحيوي الكافي للبلدة وللمتنزه ومن عناصر اللاندسكيب هذه الفقاعات المائية الطحلبية والأشجار الطحلبية وغيرها من العناصر الجمالية التي تعتمد على الطحالب كأساس في تصميمها (17).

دواعي اختيار المشروع: التفكير جدياً باتجاه مشاريع حضرية صديقة للبيئة من خلال استحداث مدن جديدة يكون للطحالب فيها الدور الرئيسي والأهم في معالجة المياه الرمادية وتوليد الكهرباء وإنتاج الوقود الحيوي النظيف، خاصة وأن العراق غني بمصادر المياه التي تساعد على استزراع الطحالب فيها.



شكل رقم (13): مشروع البذرة

4-مشروع الحديقة الطحلبية (شكل رقم 17):**الموقع:** لندن، باريس، السويد

شرح عام للمشروع: هي مجموعة من الحدائق الطحلبية التي انتشرت في لندن وباريس والسويد والتي تشكل فيها الوحدات الحيوية الطحلبية على شكل اشجار يتدلى منها انابيب يمكن للزوار النفخ فيها لتزويد الطحالب بغاز ثاني اوكسيد الكربون .
ان حدائق كهذه يمكن توقيعه في اي مكان ضمن المحيط الحضري للمدينة للاستفادة من فوائد الطحالب المعروفة.
دواعي اختيار المشروع: ان عنصر أثاث حضري كهذا يمتاز بإمكانية توقيعه في مناطق الساحات العامة والمناطق المفتوحة وبكل سهولة.



شكل رقم (15): مشروع مزارع الفطر الطحلبية

3-مشروع المظلة الطحلبية (شكل رقم 16):**الموقع:** ميلانو، إيطاليا.

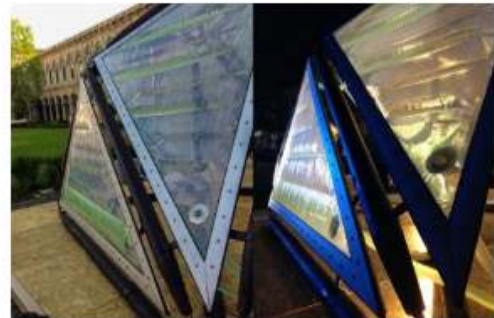
شرح عام للمشروع: المظلة الطحلبية كأحد الحلول الحضرية والتي يمكن توقيعه في اي مكان ضمن المحيط الحضري لتؤدي الغرض البيئي المنوط بها (18).
دواعي اختيار المشروع: ان عنصر أثاث حضريا كهذا يمتاز بإمكانية توقيعه في مناطق الساحات العامة والمناطق المفتوحة وبكل سهولة.



شكل رقم (17): مشروع الحديقة الطحلبية

5-مشروع الإضاءة الطحلبية (شكل رقم 18):

شرح عام للمشروع: وهو عبارة عن وحدة إضاءة طحلبية يمكن وضعها في الساحات والحدائق ومواقف السيارات حيث يوجد في الجزء العلوي لوحدة الإضاءة الطحلبية ، الفتحة الخارجية للأنبوب الحلزوني الطحليبي الزجاجي الداخلي ، و يغطي فوهة الانبوب الخارجية مرشح هوائي يساعد على تنظيف الهواء الداخل الى وحدة الإضاءة الطحلبية ما يساعد على دخول غاز ثاني أوكسيد الكربون إلى الطحالب لتقوم بدورها بعملية البناء الضوئي حيث تطرح الأوكسجين النقي الى الجو من خلال انبوب جانبي . الجزء الوسطي للوحدة يكون شفاف يسمح للطحالب المضيفة من توفير الإضاءة اللازمة للمحيط الحضري الموضوعة فيه (18).
دواعي اختيار المشروع: ان عنصر أثاث حضريا كهذا يمتاز بإمكانية توقيعه في مناطق الساحات العامة والمناطق المفتوحة وبكل سهولة.



شكل رقم (16): مشروع المظلة الطحلبية



شكل رقم (18): وحدة الإضاءة الطحلبية

- يبلغ ارتفاع الجناح الواحد 3 أمتار ونصف وقطره 6 أمتار و400 سم (شكل رقم 21، 22).
- يحتوي الجناح الواحد على 10 كراسي قابلة للدوران حول محورها وكذلك حول الجزء المركزي. (شكل رقم 23).

SIZES



شكل رقم (21): أبعاد الكابينة الطحلبية

BUSINESS PLAN



شكل رقم (22): الكابينة تعمل مجانا



شكل رقم (23): الكراسي الدوارة

- إن الطحالب الموجودة في الجزء المركزي من الجناح مع الأشخاص الجالسين يولدون تيارات هوائية داخلية بسبب عملية التبادل الغازي التي تجري بينهم (شكل رقم 24).
- الغلاف الخارجي للجناح عبارة عن مجموعة من الانابيب الطحلبية التي وبسبب الشكل الكتلي للجناح يمكن تستفاد من الطاقة الشمسية على مدار اليوم (شكل رقم 25+26).
- الجزء المركزي للجناح عبارة عن نافورة طحلبية يحيط بها سكة حديدية تتحرك عليها الكراسي المخصصة للجلوس وللجناح باب منزلق وغشاء خارجي مصنوع من مادة التيفلون (شكل رقم 27، 28).

6- مشروع المزارع الحضرية الطحلبية على الطرق السريعة (شكل رقم 19):

الموقع: ألمانيا.

شرح عام للمشروع: هي مجموعة من الانابيب الطحلبية التي يتم توقيعه على الطرق السريعة لتقليل التلوث البيئي الناتج من عوادم السيارات (20).

دواعي اختيار المشروع: إن عنصر اثاث حضريا كهذا يمتاز بإمكانية توقيعه في مناطق الساحات العامة والمناطق المفتوحة وبكل سهولة.



شكل رقم (19): مشروع المزارع الحضرية الطحلبية على الطرق السريعة

7- مشروع الكابينة الطحلبية (11):

الموقع: روسيا

شرح عام للمشروع:

- كلوريللا هي عبارة عن جناح للراحة يمكن له ان يوضع في المتنزهات والساحات العامة فهو قابل للنقل وله مزايا بيئية مهمة كونه مصمم على أساس طحلي صديق للبيئة (شكل رقم 20).

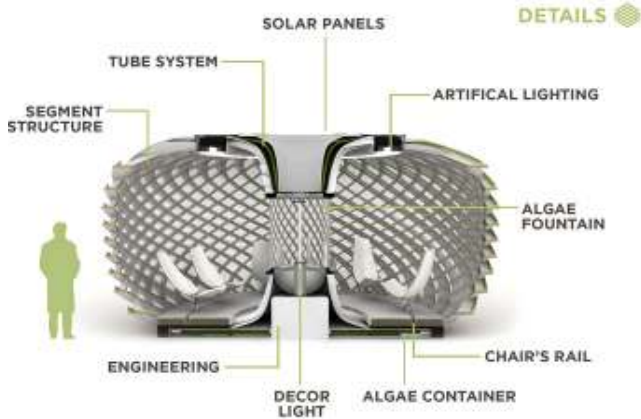
CHLORELLA



CHLORELLA



شكل رقم (20): منظور جوي للكابينة الطحلبية



شكل رقم (28): مقطع طولي في الوحدة الطحلبية



شكل رقم (24): مقطع طولي يظهر التيارات الهوائية التي تولدها عملية التبادل الغازي

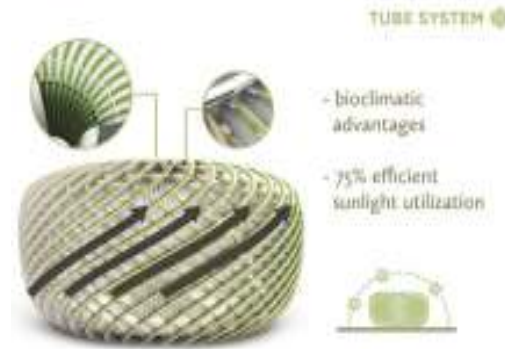
دواعي اختيار المشروع: إن عنصر أثاث حضرياً كهذا يمتاز بإمكانية توقيعه في مناطق الساحات العامة والمناطق المفتوحة وبكل سهولة.

الأثاث الحضري: هي قطع أثاث مصممة وفق تقنيات طحلبية تعمل على تنقية الهواء الداخلي للمبنى لجعله صحياً أكثر لشاغلي المبنى. ومنها ما يلي:

1- مشروع الإضاءة الطحلبية (شكل رقم 29):

الموقع وجهة التصميم: في فرنسا من قبل الباحثة الفرنسية بيبير جاليفا.

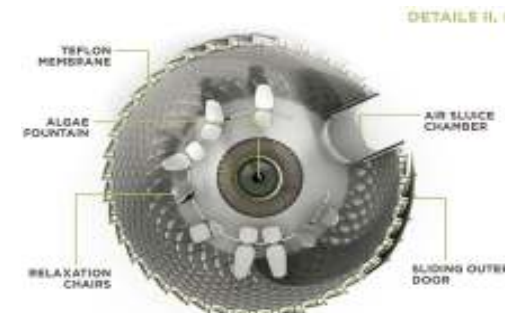
شرح عام للتصميم: النموذج عبارة عن حاوية مملوءة بالطحالب الخضراء المتوهجة، وقد تم تصميم المصباح بحيث يمكن تخزين الطاقة الناتجة عن عملية التمثيل الضوئي لاستخدامها لاحقاً، وبهذه الطريقة عندما تكون الإضاءة منخفضة، فإن الطحالب تنوهج دون الحاجة إلى أي مصدر طاقة خارجي. مصباح واحد يمكن أن يستوعب ما يقرب من نصف طن من الكربون من الجو في العام الواحد فقط، وهو ما يعادل مقدار ما تستهلكه 150 - 200 شجرة من الكربون (11). وتعرف الطحالب المستخدمة للإضاءة الطحلبية باسم دينوفلاجيليت، وهي موجودة في الطبيعة في البحار حيث إنها مسؤولة عن 70-90% عن التلألؤ البيولوجي في مياه البحر (10). لقد أثبتت الدراسات أن المباني تستهلك 39% من الطاقة الأولية في الولايات المتحدة، وأن حوالي 18% منها جاءت بسبب استخدام الإضاءة الاصطناعية وأن الحرارة الناتجة عن نظام الإضاءة هذا يمكن أن يستهلك ما يصل إلى 24% من إجمالي الأحمال الخاصة بالتبريد (9)، لذلك فإن استخدام الإضاءة الطحلبية يمكن له أن يحد من التأثير الحراري السلب للإضاءة التقليدية (جدول رقم 2). إن تعميم استخدام هذه المصابيح على مستوى المحيط الحضري يمكن له أن يساعد كثيراً على الحد من تلوث الهواء، خاصة وأنها أثبتت كفاءتها قياساً بأنواع الإضاءة التقليدية المعروفة.



شكل رقم (25): التصميم الخارجي للكابينة الطحلبية يجعلها معرضة للشمس على مدار اليوم



شكل رقم (26): تفصيل للباب المنزلق



شكل رقم (27): مقطع عرضي في الوحدة الطحلبية



شكل رقم (29): وحدة الإضاءة الطحلبية

جدول رقم (2): الإضاءة الطحلبية كفاءة أعلى وأحمال حرارية منخفضة (10)

Lamps	Spotlight photos	Relative spectral distribution	Color temperature	Efficiency	Lifetime (hours)
Incandescent lamps			Warm	Low 7-14 lm/w	1000
Tungsten halogen lamps			Warm	10-17 lm/w	2000
Fluorescent and compact fluorescent lamps			Warm white	High 50-70 lm/w	5000 - 10000
			Daylight white		
			Neutral white		
LEDs lamps			RGB	High 90-100 lm/w	100000
			Warm white conversion		
Diofluorides			Cold	High 100 lm/w no watts	Everlasting



شكل رقم (31): الستائر الطحلبية (11)

المحور الثاني

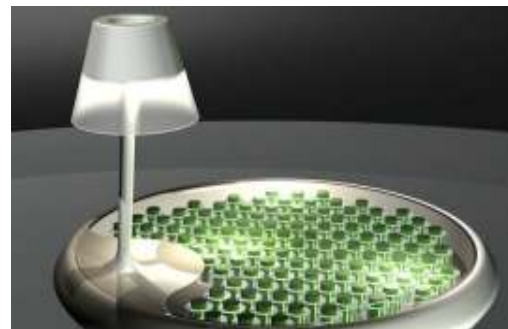
أولاً: الحالة الدراسية

بعد ان استعرض البحث في المحور الأول مجموعة من المشاريع الحضرية والمعمارية الطحلبية ، يتم تناول أحد المشاريع المنفذة فعلياً والموجودة على أرض الواقع بالتحليل العلمي، وذلك للوصول إلى فهم أعمق لآلية عمل خلية الوقود الطحلبية وكيفية توظيفها لتحسين الأداء البيئي للنباتية، وتوفير الراحة لسكانها ومدى كفاءة استخدام هذا النظام على المدى البعيد على المستوى الحضري للمدينة ككل. وقد وقع الاختيار على مشروع يمتاز بكونه المشروع الأول والوحيد عالمياً والذي تم إنشاؤه وإشغاله ومتابعة أدائه البيئي ولمدة عامين من قبل فريق بحثي متخصص تمكن من التوصل إلى نتائج مهمة فيما يتعلق بجدوى استخدام الطحالب كحل بيئي في المدينة.

2- الطاولة الطحلبية المتنقلة (11) (شكل رقم 30):

موقع وجهة التصميم: في بريطانيا من قبل فريق من الباحثين والمصممين من جامعة كامبردج.

شرح عام للتصميم: تتميز هذا الطاولة باحتوائها على وحدات طحلبية لها القدرة على توليد الطاقة الكهربائية اللازمة لتشغيل المصباح الكهربائي إضافة إلى احتوائها على مأخذ خاصة يمكن استخدامها لشحن الهاتف على سبيل المثال.



شكل رقم (30): نموذج الطاولة الطحلبية (11)

3-الستائر الطحلبية (11) (شكل رقم 31):

الموقع وجهة التصميم: في فرنسا في الاستوديو الفرنسي.

شرح عام للتصميم: هذه الستائر هي عبارة عن مجموعة من الانابيب الطحلبية المتدلية التي تشكل منظراً جميلاً والتي تساعد في نفس الوقت على تنقية الهواء في الفضاء الداخلي للغرفة إضافة إلى وظيفتها الرئيسية كستارة.



شكل رقم (33): الكاسرات الطحلبية عن قرب (22)

إن الواجهة الطحلبية لهذه البناية جمعت بين عمليات متنوعة من إنتاج الطاقة المتجددة إلى خلق نظام لدورة مستدامة مؤلفة من 1- التسخين 2- الطاقة الحرارية 3- الكتلة الحيوية ، لتشكل معا مصدرا للطاقة قابل للتخزين بأشكال متعددة هي 1- الحرارة 2- الكهرباء 3- الوقود الحيوي (23).

تحليل واجهة المبنى: تتألف الواجهة من 200 وحدة زجاجية مكونة من لوحين زجاجيين مربوطين بهيكل قوي والتي تم وضعها على الواجهتين الجنوبية الغربية والجنوبية الشرقية وهما الواجهتان الأكثر عرضة لأشعة الشمس على مدار ساعات النهار (15). إن كل تلك الوحدات الزجاجية مثبتة كهيكل ثانوي يمثل الغلاف الخارجي للمبنى، وتبلغ أبعاد الوحدة الزجاجية الواحدة 2.5 م طول و 0.7 م عرض وبسمك 0.78 بوصة (22) شكل رقم (34).



شكل رقم (34): مجموعة تفاصيل للهيكل المعدني الرابط للوحدة الطحلبية (23)

لقد تم تصنيع اللوح الزجاجي الخارجي كوحدة ضوئية زجاجية تساعد على نفاذية الضوء إلى الحاوية الداخلية التي يوجد فيها الطحالب، حيث تستخدم الضوء النافذ لإتمام عملية البناء الضوئي، ثم تقوم لاحقا بإنتاج الكتلة الحيوية بالاستفادة من ثاني أكسيد الكربون والنيتروجين والفوسفور والمواد الغذائية (23).

مبنى الطاقة في هامبورغ / ألمانيا BIQ – The Algae House by Splitterwerk

يعد هذا المبنى الأول عالميا بواجهته الطحلبية التي تعمل كمفاعل حيوي، وقد شيد في إطار المعرض العالمي للبناء في هامبورغ 2012-2013 كبيت ذكي، يجمع بين المواد الذكية والتقنية مع نمط حياة جديد (21) (شكل رقم 32). وقد تم اختياره كحالة دراسية كونه المبنى الوحيد في العالم الذي يعطي منظومة عمل متكاملة لخلية الوقود الطحلبية من خلال تكاملها مع خدمات المبنى المختلفة وكذلك مع خدمات البنى التحتية للمدينة ككل.



شكل رقم (32): الواجهة الخارجية لمبنى الطاقة في هامبورغ (21)

قاد المشروع شركة اروب بالتعاون مع الاستشاري الألماني SSE وقد صمم المبنى للمعرض من قبل شركة نمساوية تدعى (سبليترويرك للعمارة)، أما الكاسرات والتظليل، فقد تم تصنيعها في ألمانيا بواسطة شركة كولت الدولية. وقد فاز المبنى في العام 2014 بجائزة

Zumtobel Group Award 2014, organized by the architectural lighting multination (21).

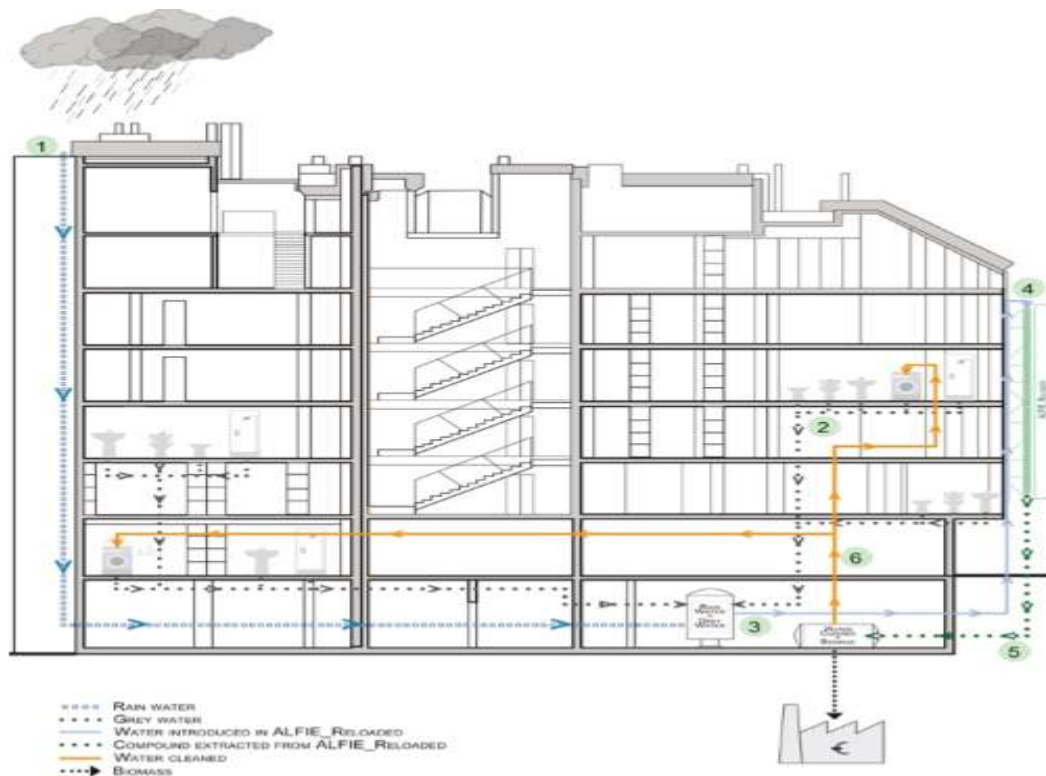
الوصف العام للمشروع: المشروع عبارة عن بناية سكنية متعددة الطوابق مؤلفة من 15 شقة توظف الطريقة النمطية لتوليد الطاقة والإضاءة والتظليل، فالناظر إلى المبنى عن قرب يستطيع ملاحظة الطحالب المتأرجحة وفقاعات الهواء التي يولدها غاز ثاني أكسيد الكربون والنيتروجين، إضافة إلى حركة الماء الدائمة مشكلة بذلك لوحة فنية متحركة على طول واجهة المبنى (شكل رقم 33) (22). في الأيام المشمسة تترك الطحالب لتتكاثر وذلك للاستفادة القصوى من ضوء الشمس اللازم لإتمام هذه العملية وكذلك لتوفير التظليل اللازم للمبنى، أما في الأيام قليلة الشمس فيتم حصاد الطحالب أولا بأول، وذلك للسماح بأشعة الشمس بالدخول إلى المبنى. إن نمو الطحالب يساعد على توفير التظليل اللازم لشاغلي المبنى، حيث إن الأداء الحراري للمبنى يتأثر بنسبة تتراوح بين 2%- 20% بأسلوب تغليف الواجهات (9). ويقول عن ذلك رئيس الباحثين في اروب " إن استخدام التفاعلات الكيميائية الحيوية للطحالب لتظليل المبنى لهو بالفعل حل مستدام ومبتكر"، ويقول أيضا "بالإضافة إلى الاستفادة من الطاقة البديلة وتوفير الظل في الأيام المشمسة الحارة، فإن استخدام الطحالب يخلق إطلالة مذهشة سيحبها المعمارون وشاغلو المبنى" (21).

للحفاظ على نسبة إنتاج مستقرة بحيث تكون أقل من 40 درجة مئوية، حيث يتم حفظ الحرارة المجمعة المتولدة في أماكن خاصة تحت الأرض والحفاظ عليها في خزانات معزولة بالاستفادة من نظام الطاقة الحرارية الأرضي (جيوثيرمال سيستم)، وذلك لاستعمالها عند الحاجة لأغراض تدفئة المبنى شتاء أو للأغراض المنزلية التي تتطلب استخدام الماء الساخن (15).

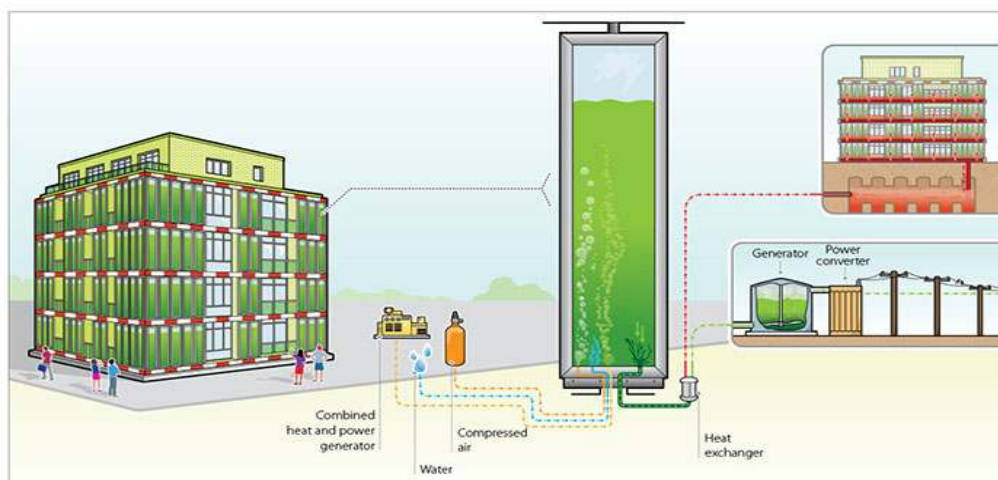
أما الطحالب الناتجة أو الكتلة الحيوية فيتم حصادها باستخدام اسطوانة عمودية ومن ثم نقلها الى أماكن خاصة للاستفادة منها لمختلف الأغراض العلمية والبحثية (شكل رقم 36). إن هذه الكتلة الحيوية قادرة على إنتاج غاز ثاني أكسيد الكربون وإنتاج الغاز الحيوي في خلية وقود في المنزل، حيث يمكنها أن تولد 4500 (hwK) سنوياً، كما أنها تستطيع أن تنتج (32 mw) من الحرارة في السنة. إذ يمكن استخدامها مباشرة في المبنى أو لتغذية شبكة الكهرباء في المدينة أو حتى تخزينها في خزانات حرارية عالية العزل تحت الأرض ليتم استخدامها عند الحاجة (23).

المفاعلات الحيوية الطحلبية: ترتبط الوحدات الطحلبية بحلقة مغلقة مع غرفة التصنيع حيث تقوم الطحالب بتحويل الضوء الى كتلة حيوية. تم إحضار تلك الطحالب المايكروية من نهر الألب القريب، وزرعها في الوحدات الزجاجية لتشكل الغلاف الحيوي للمبنى المواجه لأشعة الشمس اللازمة لإتمام عملية تكاثر الطحالب (15).

يتم في غرفة المصنع تغذية الطحالب بالكربون الناتج عن عمليات الاحتراق في العفنة المجاورة (شكل رقم 35) (5)، لينتج عن عمليات المعالجة الكتلة الحيوية والطاقة اللازمة لتشغيل المبنى حيث يتم السيطرة على المدخلات والمخرجات لغرفة المصنع في المبنى عن طريق "نظام إدارة الطاقة في المبنى" الذي يسيطر على تجهيز الطحالب بالغذاء واستحصال الكتلة الحيوية الناتجة عن معالجتها، وعن طريقها أيضاً يتم السيطرة على محتوى الطحالب في المصنع ومتوسط درجة الحرارة حيث إن مستوى الطيف الشمسي المطلوب لعملية نمو الطحالب يتراوح بين (400-700 nm)، إذ يعمل هذا الطيف على تسخين الماء الأمر الذي يتطلب إزالة هذه الحرارة



شكل رقم (35): مقطع طولي في البناية (9)



شكل رقم (36): الاسطوانة المستخدمة لحصاد الطحالب الناتجة

صيانة واكثر كفاءة في الانتاج ، حيث تتم صيانة الألواح من خلال حقنها من الاسفل بالهواء المضغوط ما يسبب ارتفاع فقاعات الهواء إلى الأعلى وتنظيفها، الأمر الذي يساعد على تحفيز امتصاص غاز ثاني أكسيد الكربون من قبل الطحالب.

ثانياً: أهم المشاكل البيئية في المدينة العراقية

تتعاين المدينة العراقية من العديد من المشاكل البيئية حالها كحال أي مدينة أخرى في العالم، إلا أن هناك مشاكل محددة هي التي سيأتي البحث على ذكرها وبما ينسجم مع ما توفره تقنية خلية الوقود الطحلبية من حلول بيئية في كل من:

- تنقية الهواء - إعادة تدوير المياه الرمادية - انتاج الطاقة الكهربائية - توفير الكتلة الحيوية اللازمة لإنتاج الوقود الحيوي الصديق للبيئة. ويمكن إجمال هذه المشاكل بما يلي:

1- مشكلة تلوث الهواء: تعاني المدينة العراقية من العديد من المشاكل البيئية، ولعل مشكلة تردي نوعية الهواء في المدينة هي أحد أكبر هذه المشاكل ، ويعزو التقرير السنوي للجهاز المركزي للإحصاء للعام 2009 (24) ذلك إلى انتشار مصادر حرق الوقود والعديد من الأنشطة الأخرى ، ويعتبر أن التردي الحقيقي في نوعية هواء المدن العراقية بدأ منذ العام 1991 بعد حرب الخليج، نتيجة احتراق المصافي والمستودعات النفطية، ومخازن المواد الكيماوية، إضافة إلى الحرائق والانفجارات واستعمال أنواع رديئة من الوقود المستخدم في وسائل النقل (3) . ويبين الشكل رقم (37) التزايد الكبير في أعداد السيارات وبالتالي ارتفاع نسبة الغازات الملوثة الصادرة عن عوادمها ، هذا بالإضافة إلى مصادر التلوث الأخرى كالمولدات الكهربائية المنتشرة في المدينة وغيرها.

النتائج الأولية: لقد خضع نظام إدارة الطاقة في المبنى إلى المراقبة المشددة على مدى عامين وقد كانت النتائج كالتالي (15) :

1- الانتاج المشترك للحرارة والكتلة الحيوية hwK 26.165 بحيث كانت الحرارة بمقدار hwK 21.626 الكتلة الحيوية بمقدار 4539 hwK في السنة .

2- استهلاك الكهرباء hwK 13.471.

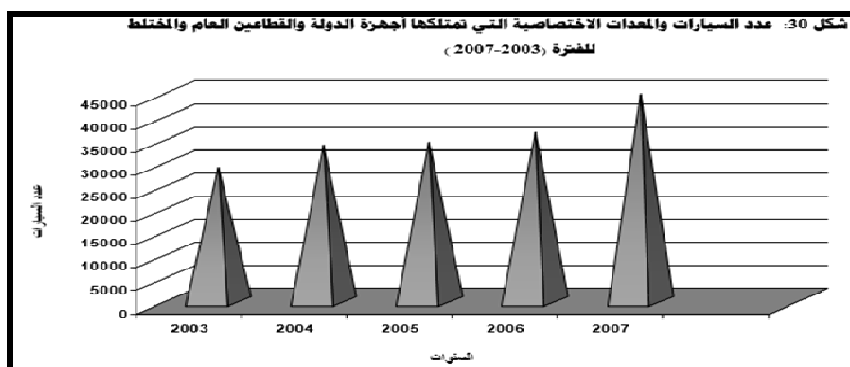
3- صافي الحرارة المكتسبة تساوي تقريباً 500 متر مربع من المساحة الأرضية المستخدمة في المنزل فكان المنزل قابلاً لتوفير الحرارة كل عام

4- معدل تحويل الطاقة الشمسية الى :

- حرارة 21% - كتلة حيوية 4%

وهو ما يعادل نصف المتوقع في مرحلة التصميم وهذا يعود الى ان بعض مجاري الهواء كانت مصممة بقطر غير كاف ، وهي المجاري التي تربط بين وحدات المفاعل الحيوي الضوئي ما تسبب بانسداد بعض القنوات الامر الذي يحد من ملا بعض اللوحات وبالتالي يقلل من انتاجية الكتلة الحيوية ، لقد تم الانتهاء من قياس التعديل التحديثي في نهاية سبتمبر 2015 ما مكن النظام من العمل وفق الطاقة التصميمية الموضوعة له .

5- تم حساب الكلف للمشروع وقد وجد انه مازال يعتبر اكثر كلفة قياساً بأبنية مماثلة تعتمد على الطاقة الشمسية او التقليدية . الا ان المفرح بالموضوع ان اسعار انشاء مثل هذه الابنية في نزول كون ان كل التطبيقات المنفذة اعتمدت المفاعلات الحيوية ذات الانابيب الزجاجية حيث ينتقل الماء والطحالب في انابيب زجاجية شفافة ومتعرجة وهو نوع مكلف ويحتاج الى صيانة مكثفة للنظام . اما المفاعل المسطح فهو اكثر قدرة على البقاء كونه اقل كلفة واسهل



شكل رقم (37): عدد السيارات والمعدات التي تمتلكها أجهزة الدولة والقطاعين العام والمختلط للفترة (2003-2009) (24)

4- مشكلة العجز في خدمة تصريف المياه الرمادية ومياه الأمطار:

تتعاين المدينة العراقية من عجز كبير في خدمة تصريف المياه الرمادية بلغت نسبته 20.4% مقابل عجز أكبر في خدمة تصريف مياه الأمطار بنسبة 26.9% (جدول رقم 5) (25) ، مما يعني أن حوالي ربع سكان العراق لا تتوفر لهم هذه الخدمة وهو ما أدى إلى زيادة الضغط على شبكات التصريف ، لذلك يتعين البدء بإيجاد بدائل وحلول جديدة وصديقة للبيئة لتخفيف الضغط على هذه الشبكات وتوفير خدمة أفضل لسكان المدن العراقية.

2- مشكلة شحة المياه في المدينة:

يعد نهر دجلة والفرات المورد المائي الرئيس في العراق وتتفاوت كمية المياه فيهما من سنة إلى أخرى تبعاً لتباين كميات المياه الواردة من خارج العراق أو كميات الثلوج والأمطار الساقطة . وتظهر الإحصاءات وجود عجز كبير في انتاج الماء الصافي في عموم العراق بلغت نسبته 20% (جدول رقم 3) (24). وعليه، لا بد من التفكير ببدائل بيئية أكثر أماناً للحفاظ على الثروة المائية من الهدر لضمان ديمومة هذه الثروة إلى الأجيال القادمة.

3- مشكلة العجز في تجهيز الطاقة الكهربائية:

تشير الإحصاءات عن وجود عجز كبير في تجهيز الطاقة الكهربائية في عموم العراق حيث بلغ نصيب الفرد من الطاقة الكهربائية المباعة في السنة الواحدة (1.42) ميغاواط ساعة / سنة (جدول رقم 4) (25).

إن هذا الأمر ليس بالمفاجئ، فانتشار المولدات الأهلية في المدن خير دليل على ذلك، الأمر الذي أضاف عبئاً بيئياً على بيئة المدينة العراقية وهو ما يحتاج إلى حلول بيئية حضرية ومعمارية مستدامة لتقليل الاعتماد على مصادر الطاقة الكهربائية التقليدية واللجوء إلى أساليب جديدة وصديقة للبيئة.

جدول رقم (3): نسبة العجز في الماء الصافي المنتج في المشاريع المائية في عموم العراق (24)

توزيع المياه المنتجة من المشاريع والمجمعات المائية العائدة للمديرية العامة للماء وأمانة بغداد والحاجة الكلية من الماء ونسبة العجز في الإنتاج حسب المحافظة لسنة 2009								
المحافظة	عدد المشاريع العاملة	كمية الماء المنتج (م ³ / يوم)	عدد المجمعات المائية العاملة	كمية الماء المنتج (م ³ / يوم)	مجموع الماء المنتج (م ³ / يوم)	عدد المستهلكين *	الحاجة الكلية من الماء (م ³ / يوم)	نسبة العجز في الإنتاج (م ³ / يوم)
نينوى	41	727591	75	97997	825588	2994979	988343	7 %
كربلاء	16	378476	203	243726	622201	934698	747758	22 %
فيلق	25	237043	147	141786	378829	1662386	518340	27 %
الأنبار	20	372418	155	177003	549421	1600188	576068	5 %
مطرب بغداد	10	226080	185	257347	483427	2097473	943863	48 %
أمانة بغداد	10	2358969	35	238200	2597169	5358376	3727925	23 %
بابل	18	245920	232	391741	637661	1765065	723677	13 %
كربلاء	7	242620	115	206730	449350	961638	480819	7 %
واسط	9	181100	202	247350	428450	1131790	509306	16 %
صلاح الدين	19	270200	158	194374	464574	1351150	499926	6 %
النجف	10	223960	116	232778	456738	1155087	485137	26 %
القادسية	13	198773	173	186771	385544	1046264	502207	6 %
المثنى	7	116110	37	60086	176196	658229	238647	17 %
ذي قار	18	109140	167	186208	295348	1718957	446929	32 %
ميسان	13	68600	178	285296	353896	867265	416287	13 %
البصرة	15	237000	200	567600	804600	1992029	882195	7 %
المندوجة	261	6194000	2375	3714992	9908992	27295574	12684427	20 %

جدول رقم (4): نصيب الفرد من الكهرباء المجهزة من الدولة (ميجاواط . ساعة / سنة) (25)

نصيب الفرد من الطاقة الكهربائية المباعة حسب المحافظة عدا إقليم كردستان لسنة 2014					
المديرية	المحافظة	إجمالي المبيعات (ميكاواط . ساعة)	عدد السكان	نصيب الفرد من الكهرباء (ميكاواط . ساعة/ سنة)	نصيب الفرد من الكهرباء المباعة (م. و. س) *
بغداد	بغداد	11,498,750	7,665,292	1.50	0.00017
	نينوى	657,853	3,524,348	0.19	0.00002
	كركوك	1,664,823	1,508,854	1.10	0.00013
	صلاح الدين	806,083	1,509,153	0.53	0.00006
	بابل	2,538,459	1,953,184	1.30	0.00015
الفرات الأوسط	كربلاء	2,023,048	1,181,182	1.76	0.00020
	النجف	2,328,935	1,389,549	1.68	0.00019
	القادسية	1,753,757	1,220,333	1.44	0.00016
	الأنبار	250,407	1,675,606	0.14	0.00002
	بغليش	1,841,008	1,548,493	1.19	0.00014
الفرات السفلي	واسط	1,989,633	1,503,137	1.53	0.00017
	السليمانية	9,415,251	2,744,758	3.43	0.00039
	ذي قار	3,500,004	1,979,561	1.77	0.00020
	ميسان	2,114,585	1,050,580	2.01	0.00023
	المثنى	1,640,710	770,476	2.13	0.00024
إجمالي		43,993,346	30,994,476	1.42	0.00016

جدول رقم (5) : النسبة المتوقعة للسكان المخدومين بشبكات المجارى وشبكات تصريف مياه الامطار (25)

النسبة المئوية للسكان المقيمين بالمباني التجارية (العامة والمشاركة) ونظام المعالجة المستقلة (سببها نالت) حسب المحافظة: عام 2014									
المحافظة	المجموع		التوزيع حسب السكان				عدد السكان		
	المجموع	النسبة المئوية للسكان المقيمين به	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	
المجموع	المجموع	النسبة المئوية للسكان المقيمين به	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	
المجموع	المجموع	النسبة المئوية للسكان المقيمين به	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	المجموع	
البحر	100.0	7.0	97.0	1.0	5,524,438	70,487	3,418,018	35,243	
بغداد	100.0	0.0	98.3	1.8	1,503,854	0	1,482,440	26,405	
بغداد	100.0	18.0	88.0	2.0	1,548,494	278,729	1,288,794	30,970	
بغداد	100.0	29.0	67.0	4.0	1,675,606	488,826	1,152,666	67,024	
بغداد	65.0	0.0	4.4	95.6	5,661,730	0	249,939	5,484,791	
بغداد	100.0	70.0	25.0	5.0	2,010,561	1,407,393	592,640	180,528	
بغداد	100.0	0.0	94.2	5.8	1,953,184	0	1,859,999	113,285	
بغداد	11.7	34.7	25.0	40.3	1,151,152	399,450	287,785	463,914	
بغداد	0.0	33.0	67.0	0.0	1,303,137	430,035	873,102	0	
بغداد	100.0	1.0	80.5	18.5	1,509,153	15,692	1,214,868	279,193	
بغداد	9.9	0.0	50.5	49.5	1,389,459	0	701,722	687,827	
بغداد	11.4	100.0	0.0	88.6	11.4	1,250,335	0	1,091,215	159,118
بغداد	3.0	0.0	88.0	12.0	770,476	0	678,019	92,457	
بغداد	8.4	11.5	72.0	16.5	1,979,591	227,650	1,425,284	326,628	
بغداد	71.6	5.0	23.4	71.6	1,050,580	82,529	245,836	782,215	
بغداد	48.3	100.0	5.0	46.7	483,274,758	137,338	1,281,502	1,325,718	
بغداد	70.4	11.3	66.9	31.8	30,904,475	3,504,527	17,644,631	9,485,317	

الكربون إلى الأوكسجين هي 1:1 فإن هذا يعني أن هذه البنية يمكن لها أن تسحب 350 كيلو لتر/ساعة من غاز ثاني أوكسيد الكربون من الجو (9). ويلخص الجدول رقم (7) إمكانات تخزين غاز ثاني أوكسيد الكربون التقديرية سنوياً لمبنى مكون من 42 طابقاً (9).

جدول رقم (7): إمكانات تخزين غاز ثاني أوكسيد الكربون التقديرية سنوياً لمبنى مكون من 42 طابقاً

Daily kgCO ₂ reduction from algae facades	Yearly kgCO ₂ reduction from a study building
1 kg	250 tons

8- تمتاز المباني الطحلبية بميزة مهمة جداً جاءت من قابلية الطحالب على النمو في أصعب الظروف والبيئات ، وهي ميزة إعادة تدوير المياه الرمادية المنتجة في المبنى حيث يتم استخدامها لنمو الطحالب وتوفير الغذاء اللازم لها ومن ثم الاستفادة من الماء الناتج عن عملية معالجتها وإعادة ضخه للمبنى لاستخدامه للأغراض المنزلية المختلفة أو إمكانية تخزينه في خزانات خاصة في باطن الأرض للاستفادة من الطاقة الجيوحرارية في تسخينه وإعادة استخدامه لأغراض التدفئة في فصل الشتاء.

وقد سعى الباحثون في مجال العمارة والتخطيط للاستفادة من هذه الميزة على المستوى الحضري فجاءت تطبيقات حضرية عديدة استثمرت هذه الميزة لأغراض مختلفة وكما تم الإشارة إليها سابقاً.

9- يمكن للمبنى الطحلي أن يحقق الاكتفاء الذاتي من الطاقة الكهربائية كما يمكن للمشاريع الحضرية الطحلبية الكبرى أن توفر الطاقة الكهربائية على مستوى واسع.

10- مازالت تقنية خلية الوقود الحيوي الطحلبية قيد التطوير وهي تحتاج إلى تظافر جهود جميع الاختصاصات للوصول بها إلى الكفاءة المرجوة منها على الصعيد البيئي والاقتصادي ، ونحن كمخططين ومعماريين لابد لنا من دور فاعل في تطوير هذه التقنية ومحاولة توظيفها في حل مشكلة التلوث البيئي من خلال زجها كحل بيئي ناجع لمشكلة التلوث وهذا لن يتم إلا من خلال الفهم العميق لهذه التقنية ودراساتها دراسة علمية وتحليلية وذلك بالرجوع إلى باقي الاختصاصات بمختلف الانظمة والمهارات التقنية بما في ذلك تقنيات الواجهات ، المحاكاة ، الهندسة الميكانيكية والهيكلية والكيميائية وانظمة التحكم اضافة الى العلوم الحياتية.

التوصيات

1- يوصي البحث بضرورة اعتماد تقنية المفاعل الحيوي الطحلي وادخالها على المباني القائمة وذلك بناء على توصيات المعهد الأمريكي للمهندسين الميكانيكيين الذي اوعز بفائدة اضافة دمج نظام المزارع الطحلبية مع المباني القائمة باعتبارها احد الاستراتيجيات المهمة للتعامل مع تغير المناخ ، وقد فاز فعلاً احد المشاريع المشاركة في مسابقة تصميم الجيل القادم 2011 الذي اقترح استخدام المفاعلات الحيوية الطحلبية كغشاء ثانوي لمبنى في ولاية لوس انجلس يعود إلى حقبة الستينات من القرن الماضي (26).

2- يمكن الاستفادة من تطبيقات المفاعل الحيوي الطحلي الحضري في تقليل نسبة التلوث في المدينة العراقية خاصة تلك التي يمكن توقيعتها في الساحات والمناطق المفتوحة هذا بالإضافة إلى فوائدها في إعادة تدوير المياه الرمادية من خلال ربطها بشبكة مياه الصرف الصحي ما يقلل الضغط على الشبكة ويوفر مصدر جديداً للمياه المستخدمة لأغراض ري الحدائق على سبيل المثال.

3- لما كانت احد المشاريع المعروضة في البحث هي لتطوير منطقة الاهوار في مدينة مومباي الهندية ولكون العراق غني بالاهوار التي تعتبر البيئة الأمثل لنمو الطحالب لذلك يوصي البحث باتخاذ خطوات جادة باتجاه تطوير مناطق الاهوار في جنوب العراق من خلال انشاء منتجعات سياحية صديقة للبيئة تعتمد طاقة الطحالب في تشغيلها لتكون محرك اقتصادي جديد يشجع نمو المنطقة بطريقة ايكولوجية لا تؤثر على النظام البيئي فيها ويعزز النشاط السياحي في مناطق الاهوار خاصة وانها دخلت مؤخراً في لائحة التراث العالمي لتصبح احد اهم المحميات الطبيعية في العالم.

4- يمكن الاستفادة من فكرة مشروع مزارع الفطر المتنقلة التي تم عرضها ، كأحد الحلول التي يمكن طرحها في اقامة مجمعات سكنية مؤقتة للنازحين والمهجرين الذين تزايدت اعدادهم في السنوات

الطحالب والمدينة العراقية

بناء على ما تقدم، وبعد التعرف على مدى خطورة الوضع البيئي الذي تعاني منه المدينة العراقية يمكن اعتبار خلية الوقود الطحلبية متمثلة بمختلف تطبيقاتها الحضرية والمعمارية حلاً بيئياً جديراً بالتفكير وبصورة جادة ، ومحاولة تطبيقه والعمل به في العراق صار امراً لا بد منه سواء كان ذلك من خلال انشاء مشاريع حضرية طحلبية عملاقة لمدن مستحدثة أو لتوسعات المدن القائمة أو حتى لأبنية طحلبية ضمن المحيط الحضري القائم أصلاً، أو من خلال اضافة عناصر لاندسكيب طحلبية في المناطق المفتوحة والساحات العامة للمدن وذلك لتلافي المشاكل البيئية التي باتت تثقل كاهل المدينة وساكنيها من خلال الاستفادة من الحلول البيئية التي توفرها خلية الوقود الطحلبية كونها قادرة على توفير الاكتفاء الذاتي من الطاقة الكهربائية وإعادة تدوير المياه الرمادية ومياه الأمطار ما يخفف الضغط على شبكات التصريف وبالتالي تقليل استهلاك المياه النظيفة هذا عدا دورها الاساسي في تنقية الهواء من غاز ثاني أوكسيد الكربون وتوفير نسبة أعلى من غاز الأوكسجين وهو ما سينعكس بالضرورة على رفع الكفاءة البيئية للمدينة العراقية وتقليل الضغط على الموارد البيئية ومنح الاجيال القادمة فرصة افضل للعيش.

الاستنتاجات

1-الطحالب كائنات حية دقيقة تمتاز بقدرتها على صنع غذائها بنفسها ما يجعلها قادرة على سحب غاز ثاني أوكسيد الكربون من الجو وهي تتفوق على النباتات الكبيرة بقابليتها السريعة على التكاثُر مما يجعلها قادرة على سحب كمية اكبر من ثاني أوكسيد الكربون وبالتالي قدرة أعلى على تنقية الجو وتنظيفه.

2-يمكن للطحالب أن تنمو في أصعب الظروف وعلى البرك والمياه الراكدة وهي بذلك لا تشكل ضغطاً على الاراضي الزراعية المخصصة لزراعة المحاصيل المنتجة بل على العكس من ذلك حيث يمكن الاستفادة منها كمصدر للأسمدة الحيوية التي يمكن ان تسهم في تعديل التربة وتحسين خواصها الغذائية كوسط فعال لنمو النباتات.

3- ان عملية معالجة الطحالب ينتج عنها كتلة حيوية غنية بالعناصر الغذائية من فيتامينات ومعادن ما عدها مصدراً مهماً للكثير من الاستخدامات على المستوى الطبي والغذائي والزراعي.

4-- يمكن للتعامل مع الكتلة الحيوية كيميائياً ان يساعد على توليد الوقود الحيوي النظيف والصديق للبيئة الذي يمكن استخدامه كمصدر وقود لأغراض التدفئة والتبريد وتشغيل السيارات والطائرات ومختلف وسائل النقل اضافة الى الاستخدامات الحياتية المختلفة التي تتطلب استخدام الوقود وقد تبين ان كمية الوقود السنوية المستحصلة من بناية مؤلفة من 42 طابق 1100 غالون وكما مبين في الجدول رقم (6)(9).

جدول رقم (6): كمية الوقود السنوية المستحصلة من بناية مؤلفة من 42 طابقاً

Daily yield of biofuel production from algae facades	Yearly yield of biofuel production from a study building
3g/ façade	1100 gallons

5- تعتبر الاضاءة الطحلبية أحد أهم التطبيقات الطحلبية التي يمكن لها أن تسهم في تقليل نسبة غاز ثاني أوكسيد الكربون في الجو اضافة إلى تفوقها على انماط الغضاءة التقليدية المشعة للحرارة والتي تعمل على زيادة الاحمال الحرارية على المبنى.

6-ازداد مؤخراً اهتمام المخططين والمعماريين بالطحالب كحل بيئي امثل يمكن له ان يحد من تفاقم حالة التلوث التي تعاني منها المدن الحديثة وقد انصبحت معظم المشاريع المعمارية على فكرة انشاء واجهه ثانوية موضوعه كهيكل ثانوي للمبنى وذلك للحصول على عدة فوائد كالتظليل والعزل الحراري والصوتي اضافة الى الهدف البيئي.

7- من خلال اجراء دراسة على لوح طحلي في مختبر بحوث البحرية في واشنطن تبين ان كمية انتاج الأوكسجين من لوح طحلي يحتوي على 6.2 لتر من الطحالب بلغت 4.5 لتر ، ما يعني ان انتاجية الأوكسجين لسطح سحاب مؤلفة من 5000 لوح طحلي ستبلغ 350 كيلو لتر/ساعة ، ولما كانت نسبة انتاج غاز ثاني أوكسيد

15. <http://www.ingenia.org.uk/Ingenia/Articles/976>
 16. <http://www.algaecompetition.com/algae-slideshows/algae-architecture/>
 17. [http://www. Algae industry magazine.com](http://www.Algaeindustry.com)
 18. <https://www.pinterest.com/pin/437693657511757606/>
 19. <http://www.fastcoexist.com/3033997/these-reinvented-urban-farms-grow-algae-not-kale>
 20.: <http://www.iflscience.com/environment/urban-algae-farm-gobbles-highway-air-pollution/>
 21. <http://www.dezeen.com/2013/04/15/arup-unveils-worldsfirst-algae-powered-building/>
 22. <http://www.aljarida.com/articles/1462258450061077700/>
 23. <http://syndebio.com/biq-algae-house-splitterwerk>

24. تقرير إحصاءات البيئة في العراق لسنة 2009
 25. تقرير إحصاءات البيئة في العراق لسنة 2014.
 26. Proksch G. (2013). Growing Sustainability - Integrating Algae Cultivation into the Built Environment. *Edinburgh Archit. Res. J.* 33(1): 101-112.

الآخيرة نتيجة للوضع الأمني المعروف الذي يمر به البلد مع إمكانية تحويل الفكرة بما يتلاءم مع طبيعة ومناخ العراق ، حيث يمكن الاستفادة من هذه المزارع لاحقاً في حال تحسن الوضع الأمني وانتهت أزمة النزوح من خلال إقامة مجمعات سكنية على أطراف المدن لذوي الدخل المحدود تكون فيها هذه المزارع الطحلبية أساساً ومحركاً اقتصادياً.

5- يوصي البحث بضرورة إقامة ورشات عمل مشتركة بين الباحثين في مجال الطحالب ومن مختلف الاختصاصات لضمان إيجاد المناخ المناسب لتبادل الخبرات والمعلومات ما يوسع دائرة البحث ويؤدي بالنهاية إلى تطوير ملاكات هندسية معمارية وتخطيطية مسلحة بأدوات علمية صحيحة ومبنية على أسس متينة لها القدرة على النهوض بالواقع البيئي المتردي للمدينة العراقية.

6- تشجيع الباحثين في مجال العمارة والتخطيط على التواصل والإطلاع المستمر على آخر المستجدات في تطبيقات الطحالب الحضرية ، عسى أن يكون هذا البحث نواة لبحوث مستقبلية في هذا المجال الحديث والجديد على الساحة المعمارية والحضرية في العالم.

المصادر

1. نجار، دعاء. (2016). أنواع الطحالب. مقالة متاحة على موقع <http://mawdoo3.com>
 2. الموقع الدولي الرسمي للمعلومات الساندة للصناعات الطحلبية: <http://www.oilgae.com/algae/algae.html>
 3. الموقع الرسمي لشركة (RCI) الاسترالية للصناعات الغذائية: <https://www.algae.info/Algaecomplete.aspx>
 4. Al Hammadi M.; Yassin K.; Alshamsi M.; Abdul Majeed A. and Marwan R. (2014). Modeling and simulation of bioreactors for CO2 removal from landfill gases. The American University of Sharjah/College of Engineering, Chemical Engineering Department.
 5. Valentina MARINO. and Michele BONINO.(2013). Algae façade integrated envelope, Department of Architecture and Design. Torino.
 6. Indira P. and Biswajit R. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass. Utiliz.* 3(4): 89–100.
 7. Brune DE.; Lundquist T. and Benemann J. (2013). Algae production and harvest for food, feed and biofuels. IAE Green House Gas R& D Program. Clemson University.
 8. Trentacoste E. (2013). The Place of Algae in Agriculture Where it is, Where it should be, How to get there . PhD Thesis. Institution of Oceanography ABO.
 9. Kyoung-Hee K. (2014). A Feasibility study of an algae façade system. University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, NC, USA.
 10. Cecilia A. et. al. (2013). Bioluminescent algae and possible implications in architectural design. 29th Conference, Sustainable Architecture for a Renewable Future. Munich, Germany 10-12 September.
 11. <http://inhabitat.com/the-top-10-most-innovative-algae-powered-designs/>
 12. Musa HH. (2016). Masdar.... The sustainable city: A scientific interpretation of the most important sustainability applications with an attempt for adoption to improve the environmental situation in Baghdad city. *Int. J. Sci. Technol. (IJST)*. 11(3): 122-144.
 13. اسلام ، احمد مدحت. (1990). التلوث مشكلة العصر. القاهرة.
 14. LBNL(Lawrence Berkeley National Laboratory) (2013) Heat Island Group .<http://heatisland.lbl.gov/>.

N.B The views expressed in this issue are of the authors and do not necessarily reflect the views of the Editorial Board or the policies of the International Centre.

Copyright © 2016 by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or copied in any form or by any means without prior written permission from the Editor-in-Chief of the Journal.