

IJST

INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

Vol. (7) No.(4)- DECEMBER 2012

<http://www.ijst-jo.com/volumes.html>

ISSN: 2305-9346

IJST International Journal for Sciences & Technology

International **J**ournal for **S**ciences and **T**echnology

المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا

Volume 7. No. 4/ December 2012 / 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

IJST contact Information:
P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan
Tel. +96265602285
E-mails: info@ijst-jo.com / info.icast@yahoo.com
URL: www.ijst-jo.com

EDITORIAL BOARD - 2012

Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.

(Editor-in- Chief)

Professor of Microbiology / Faculty of
Pharmacy / Al- Isra University / P.O. Box
2793. Amman 11953 Jordan
shammari@ijst-jo.com

Abbas, Jamal A.

Professor of Plant Ecophysiology /
College 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/ Baghdad University/ Iraq
hayder3almunshi@yahoo.com

Al – Banna , Anton S. A

Professor in Microbiology and Virology/
Faculty of Veterinary Medicine/ Baghdad
University / Iraq
albanaantoon@yahoo.com

Al- Dabbagh, Riadh H.

Professor of Engineering Hydrology/ UAE
riadhdabbagh@yahoo.com

Al- Douri, Atheer A. R

PhD in Microbiology/Faculty of
Veterinary Medicine/ Baghdad University/
Iraq
aaldouri96@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- Murrani, Waleed K.

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

Al- Saqur, Ihsan M.

Professor of Parasitology/ Faculty of
Sciences / Baghdad University/ 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./ College of
Agriculture / Kufa University / Iraq
Agrifood43@yahoo.com

Alwachi, Sabah N.

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

Daws, Kasim M.

Professor of Mechanical Engineering /
Faculty of Engineering / Baghdad
University / Iraq
kasim_daws@yahoo.com

Khamas, Wael

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

Mohammed, Ramadhan H.

PhD in Geology / College of Sciences /
Duhok University / Iraq
ramadhan56_2000@yahoo.com

Editorial Board Secretary

Deema Elian

info.icast@yahoo.com

FORWARD

With well- established ambitious steps on continuing success way, IJST is coming for you all today in its new volume, the seventh volume for year 2012.

Year after year, IJST proves its strength and faithful belief in developing our scientific communities among Arab World, especially in Iraq by giving an opportunity to all researchers to present their fruitful achievements in main vital fields to let all world knows that we are still the first leaders in civilized scientific life, despite all the unfortunate situations or constraints.

*It is my pleasure to welcome you and present you a new issue of our Journal, Volume 7, No. 4 (2012), the fourth issue of this year, with diversity of researches and elite experts of the Editorial Board and Advisory Group. The members of Editorial Board, the ICAST and TSTC teamwork and I hope you will find this collection of research articles useful and informative. IJST has owned a new ISSN registration number, that is: **2305-9346** instead of the previous one, as the first volumes in 2006 issued by Ibn alhaythum, any change in the title needs a new ISSN according to the International Standardization Organization, and this step had been taken for ensuring the high quality and standards of our journal for being internationally recognized.*

*The journal is one of the scientific contributions offered by **the International Centre for Advancement of Sciences and Technology** in cooperation with **Treasure Est. for Scientific Training and Consultations** to the science and technology community (Arab region with specific focus on Iraq and International).*

Finally, on behalf of the International centre, I would like to express my gratitude and appreciation to the efforts of the Editorial Board, Advisory group with their valuable efforts in evaluating papers and the Editorial Board Secretary for managing the scientific, design, technical and administrative aspects of the Journal and for preparing this issue for final printing and publishing.

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

Faculty of Pharmacy, Al- Isra University. Jordan

Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shaibany

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

Dr. Ahmed R. Abdullah

Biotechnology Research Center, Al-Nahrain University- Baghdad. Iraq

Dr. Akram O. Al- Mashaykhi

Dept. of IT & Computer Sciences, Amman Arab University for Graduate Studies. Jordan

Dr. Atheer A.R. Al- Douri

College of Veterinary Medicine, Baghdad University. Iraq

Prof. Bashar Al- Shreidah

National Centre for Agricultural Researches . Jordan

Dr. Dawood S. Al- Azzawi

College of Medicine, Diyala University . Iraq.

Prof. Hazim J. Al- Daraji

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

Dr. Hayder M. Abdul- Hameed

Environmental Engineering Dept., Faculty of Engineering, Baghdad University. Iraq

Dr. Harith F. Al- Mathkhouri

College of Sciences, Baghdad University. Iraq

Prof. Jamal A. Abbas

Faculty of Agriculture, Al- Kufa University. Iraq

Dr. Khalid Al- Azzawi

Faculty of Pharmacy, Al- Isra University. Jordan

Prof. Loai Q. Abdul- Rahman

Faculty of Pharmacy, Isra University. Jordan.

Prof. Mahmoud M. Othman Matar

College of Medicine, Al- Najah National University. Palestine

Dr. Mohammed A.M. Al- Hajaj

College of Sciences . Basra University. Iraq

Prof. Nazeera K.D. Hamdan

Statistics Dept. College of Sciences. Al- Kufa University. Ira

Prof. Taha Al- Samaraei

Crown Research Institutes, Palmerston North. New Zealand

Prof. Zaki G. Abdul- Ghani

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Amman Private University, Jordan

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:

AGRICULTURAL SCIENCES

- Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and zinc sulphate on fruits quality of fig cv. Aswad Diyala and percentage of cracking.5-10**
Abass M. S. Al- Hmadawi & Rokia M. H. Al - Numani

BIOLOGICAL SCIENCES

- Bayesian estimation of the scale parameter of the Gamma distribution using precautionary loss function.11-16**
Nadia H. Al- Noor
- Comparison study of maximum likelihood estimators of modified weibull distribution by using genetic algorithm and numerical technique.....17-24**
Fadhaa O. Sameer
- Synthesis, characterization and antibacterial activities of some metal (II) heterocyclic polyamine complexes with 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl) bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) ligand.....25-33**
Hilal M. Abdullah, Abdul Wahid M. Abdullah & Taghreed H. Al- Noor

CIVIL ENGINEERING

- The effect of styrene butadiene styrene on the properties of hot mixture asphalt34-42**
Adil N. Abid, Zainab A. Alqaisi & Khalid A. Mohammed

MEDICAL AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

- Correlation of some chronic complications of β -Thalassaemia major with Serum ferritin; A study of hundred Iraqi patients.43-52**
Tareq A. Saleh, Batoool A.G. Yassin & Ali M. Jawad
- Formulation and In- Vitro evaluation of ketotifen fumarate oral strips.53-63**
Ameera A. Radhi & Balkis A.Kamal

MICROBIOLOGY

- Immunizations of broiler chickens by using sonicate sporulated oocysts of *Eimeria tenella*....64-70**
Aws H. Muhammed, Haidar M. A. Al-Rubaie & Amer M. Abd
- Isolation of *salmonella* spp. from human urine in Iraqi patients.71-76**
Aseel M. Hamzah, Jenan M. Khalaf & Ibrahim A. Al- Zubaidy
- Production of bioflocculant from *Bacillus apiarius* and its ability to remove pollutants from the river water.....77-84**
Shamim N. Radhi, Alyaa R. Hussein & Sana'a Burhan alden

- The role of *Van A* gene in the resistance of *nuc*-gene positive vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with skin infections.85-93**
 Mushtak T.S. Al-Ouqaili , Shaymaa H.M. Al-Kubaisy & Narjis F.I. H. Al-Ani

(II) قسم الدراسات والبحوث العربية – ARABIC SECTION

الأحياء المجهرية

- 104-95.....التلوث الميكروبي ببكتريا السيدوموناس إيروجينوزا والفطريات لمياه كراسي الأسنان.
 عصام شاكر حمزة ، أمير خضير عباس، فرقد فرحان عبد الحميد، سهيلة غفوري علي، سندس علي جاسم ،
 ايمان عباس خلف ، عادل سعدي سلمان.
- 111-105.....عزل و توصيف عاثي الكولي فاج من الأجبان المحلية كدلائل للفيروسات المعوية.
 عصام شاكر حمزة ، أمير خضير عباس، فرقد فرحان عبد الحميد، ، هديل حسين عبد الأمير، سها عبد الحكيم علي

تكنولوجيا المعلومات

- 118-112.....مشكلة ترتيب تعاقب (تسلسل) الأعمال على مراكز الإنتاج / الخدمات وطرائق حلها.
 تيسير محمد رضا مقدادي ، كاسر نصر المنصور

العلوم الزراعية

- 126-119.....تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L – Carnitine إلى العليقة في الصفات النسيجية
 لخصي ذكور دجاج غينيا.
 وليد خالد الحياني، حازم جبار الدراجي.
- 134-127.....تأثير رش المحلول المغذي (Decson) وعدد الرشاشات في نمو وإزهار نبات الجربيرا
 (Gerbera Jamisoni).
 جمال احمد عباس، مشتاق طالب حمادي الزرفي ، رنا فيصل كريم
- 142-135تأثير عدة تراكيز ورشاشات المحلول المغذي Foilartal المتوازن في مؤشرات النمو والإزهار
 لنبات الببتونيا *Petunia hybride*.
 زينب حسن ثجيل

العلوم الطبية والصيدلانية

- 150-143.... دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للسرطان باستخدام خطوط الخلايا السرطانية نوع RD, AMGM
 سندس حميد أحمد، ناهي يوسف، محمد مؤيد، فرح داود.

Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and zinc sulphate on fruits quality of fig cv. Aswad Diyala and percentage of cracking

Abass M. S. Al- Hmadawi (1) & Rokia M. H. Al – Numani (2)

(1) College of Agriculture / Al- Kufa University (2) College of Education / Al- Kufa University - Iraq

ABSTRACT

An experiment was conducted on private orchard at Al- Abbasyia / Nijaf on 15/1/ at 2010 and 2011 respectively to investigate the effects of pruning (20 ,40 and 60)% and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate at conc. Of (100,150 and 200) mg/L and (2000 , 3000 and 4000) mg/L each ather 6 weeks before fruit harvest on the Total soluble solids, , total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , firmness , type of cracking and total cracking on ripe Fruits of Fig cv. Aswod DIALA . Results indicated that fruits of treated trees with pruning and spraying with Paclobutrazol and Zinc sulphate increased the Total soluble solids, , total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , firmness and reducing percentage of cracking and total cracking compared with control treatment . The treatment of pruning 60 % and Paclobutrazol 200 mg/L and Zinc sulphate 4000 mg/L was significantly increased the total soluble solids, total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , Firmness for the two growing seasons , respectively and , this treatment gave the lowest percentage of longitudinal , tertiary , quaternary , basal cracking's and total cracking for both seasons.

Key words: Pruning , paclobutrazol , Zinc sulphate , Fig.

الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة في بستان خاص في ناحية العباسية محافظة النجف الاشرف في 15 / 1 / 2010 و 2011 لدراسة تأثير التقليم بنسبة (20 , 40 و 60) % ورش الباكلوبيوترازول بتركيزات (100 , 150 و 200) ملغم/لتر وكبريتات الزنك بتركيزات (2000 , 3000 و 4000) ملغم/لتر قبل 6 أسابيع من جني الثمار في نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابة الثمار وأنواع التشقق والتشقق الكلي في ثمار أشجار التين صنف اسود دبالى عند النضج .

أظهرت النتائج ان ثمار الأشجار المقلمة والمرشوشة بالباكلوبيوترازول وكبريتات الزنك ازداد محتواها من نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابتها وقلت فيها نسبة التشقق الكلي وأنواع التشقق قياساً بمعاملة المقارنة . وكان لتقليم الأشجار بنسبة 60 % أورشها بالباكلوبيوترازول تركيز 200 ملغم/لتر أو كبريتات الزنك تركيز 4000 ملغم/لتر الدور المعنوي في زيادة نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابة الثمار لموسمي الدراسة على التوالي . وقد تميزت هذه المعاملات أيضاً بحصولها على اقل نسبة من التشقق الطولي والثلاثي والرابعي والقاعدي والكلي لكلا الموسمين .

INTRODUCTION

The genus *Ficus* includes species ranged from 600 to more than 1900, with most found in the tropics or subtropics and only a handful with fruits considered edible (1). The cultivated fig, *Ficus carica* L., (Moraceae), is clearly of greatest importance as a source of human food. The fig fruit has long been associated with horticulture in the Mediterranean region (2) and is considered to have been "first brought into cultivation in southern Arabia" (3). Wild or "nearly wild" figs are reported throughout much of the Middle East and Mediterranean region (4). The United States ranks sixth in the world's production, representing 4.6% of the total production (5). AL- Hamdawi (2009) showed that pruning treatments and branches removal treatments and their interactions on fig tree cv. Wazeri caused increase in total soluble solids, total sugar, vitamin C, percentage of carbohydrate, Firmness and a decrease in fruit cracking percentage compared to control treatment (6). AL- Uajjani (2011) noticed that, the pruning of fig trees cv. Aswad Dila at level (25 and 50)% reduced the proportion of fruit cracking and increased the total percentage of carbohydrate, total soluble solids, total sugar, vitamin C and firmness of fruits compared to control treatment (7). EL-Khawaga (2007) observed that pomegranate trees when applied at (50, 100 and 150) mg/liter paclobutrazol and Zinc sulphate (2000, 3000 and 4000) mg/L in late May and mid-July increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and reducing percentage of crackings compared with control treatment (8). Another study found that spraying grape tress cv. Des- Anizs with paclobutrazol at conc. of 1000 mg/L and summer pruning effectiveness in increasing fruit firmness and total carbohydrates percentage, total soluble solids, total sugar, vitamin C in fruits at ripening (9). Al – Hamdawi *et. al.* (2006) found that spraying fig tress cv. "Waziri" after one week from rest period of fruits with Zinc sulphate at conc. of 0.3% led to reduction in fruit cracking and increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and firmness at ripening (10). They also noticed that the spraying of Pactlobutrazol (PBZ) at concentration of (25, 50 and 75 ppm) on Fig trees c.v. Wazeri, when fruits of second crop at the depressed period on 25/5/for seasons 2001 and 2002 has reduced the proportion of fruit cracking to 12% compared to 16% in the fruits of control treatment (11). This was agreed with (12). Further studies (13-15) concluded that

Paclobutrazol treated in Roumi Red caused a reduction in the total soluble solids percentage, and total sugar contents but increased total acidity and vitamin C.

The spraying of Alar conc. of (500 and 1000 ppm) on pear trees in Egypt has reduced the total soluble solids and increased fruit Firmness (16).

The main objective of this investigation is to study of the effect of using pruning, paclobutrazol and zinc sulfate applied as foliar sprays after one week from rest period of fruits quality and cracking percentage during ripening of fig trees cv. Aswad Diyala.

MATERIALS AND METHODS

The current study was conducted in a private farm at Abbasiya / Najaf governorate/ Iraq for the 2010 and 2011 seasons on fig trees cv. Aswad Diyala, 48 trees at same size and growth were selected with 10 years old, that planted on (5 x 5 m). They watered every five days, and fertilized by Nitrogenous and phosphatic in two periods in March and May of each year at a rate of 500g. per tree, as well as by manure for the two years. The experiment included 10 treatments with three replicates. It is adopted according to Randomized Complete Block Design (RCBD), and the results were statistically analyzed according to LSD test at the probability level of 5% (17). The branches at age one year old were pruned at level of (20, 40 and 60)% on 15/1/2010 and 2011 and another trees spraying with paclobutrazol at conc. Of (100, 150 and 200) mg/L and zinc sulfate at conc. Of (2000, 3000 and 4000) mg/L at 15/5 for both seasons. Spraying was done early morning until wetness was full addendum. Tween 20 was added at conc. of 1cm³/L. as spreader material. The experiment involved the following ten treatments:

- 1- control treatment (not pruning and sprayed with tap water).
- 2- Pruning (P) the branches at aged one year old were pruned at level of 20%.
- 3- Pruning (P) the branches at aged one year old were pruned at level of 40%.
- 4- Pruning (P) the branches at aged one year old were pruned at level of 60%.
- 5- Paclobutrazol (PBZ) as foliar sprays at concentration of (100) mg/L.
- 6- Paclobutrazol (PBZ) as foliar sprays at concentration of (150) mg/L.
- 7- Paclobutrazol (PBZ) as foliar sprays at concentration of (200) mg/L.

8- Zinc sulphate (Zn) as foliar sprays at concentration of (2000) mg/L .

9- Zinc sulphate (Zn) as foliar sprays at concentration of (3000) mg/L .

10- Zinc sulphate (Zn) as foliar sprays at concentration of (4000) mg/L .

Ten normal fruits were taken at random on 10/ 7/ 2010 and 2011 from each tree for quality determination. The juice was extracted and the total soluble solids were determined by hand refractometer. Total and reducing sugar % and vitamin C mg /100 ml Juice according to (18) .Total carbohydrate in fruits determination according to(19) . Firmness was measured on two sides of each fruit with an Effegi penetrometer (Model NI , McCormick Fruit Tech ,Yakima ,WA) Fitted with an 11.1mm tip . The percentage of types of crackings (lengitudial , quaternary , basal) and total cracking were calculated during the months of 7 and 8 for both seasons.

4000 mg/L in both seasons. Treatment of PBZ 200 mg/L gave an excellent result which differed of the other treatments , that gave the highest percentages of total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate and vitamin C , they were (16.10 % , 19.45 % , 19.21% and 8.37 mg / 100 ml Juice) and (17.20 % , 21.35 % , 21.44 % and 8.78 mg / 100 ml Juice) mg / 100 ml Juice)in comparison with (15.30 % , 18.23 % , 15.50% and 7.72 mg / 100 ml Juice) and (16.22 % , 19.01 % , 16.41 % and 7.91 mg / 100 ml Juice) in control treatment for the two year of study, respectively . Increasing fruits from total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate , vitamin C which results through pruning spraying the Paclobutrazol and Zinc Sulphate due to the fact that this compound reduce vegetative growth and thus encourages the accumulation of carbohydrate materials in fruits leading to increased content of these materials (21).

RESULTS AND DISCUSSION

1- Effect of Pruning , Paclobutrazol and Zinc Sulphate on fruit firmness :

Results shown in tables (1 and 2) indicated that , pruning and spraying trees with Paclobutrazol and Zinc Sulphate led to a significant increase in fruit firmness which reached to the maximum values of (0.385 and 0.392 kg/cm²) with the treatment of PBZ 200 mg/L in comparison to the lowest values (0.3335 and 0.341 kg/cm²) in control treatment for both growing seasons respectively . The increase in firmness in fruits due to pruning and spraying trees PBZ and Zn because these treatments plays an important role in strengthening the cell walls through its role in enhancing pectin coherence which increases the thickness of cell walls , which makes it more strength and stiffness to resist pectin analysis enzymes (20).

2- Effect of Pruning , Paclobutrazol and Zinc Sulphate on Some Chemical Properties of Fruit:

Data in Tables (1 and 2) show that total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate , vitamin C , in fruits were increased insignificantly when trees pruned and received foliar paclobutrazol and zinc sulphate. The highest significance result were recorded with pruning the branches at aged one year old at level of 60 % , palobutrazol at 200 mg / L and Zinc sulphate at concentration of

Table (1) : Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig fruits cv. Aswad Diyala for season 2010 .

Treatments	% Total soluble sold	%Total sugar	% Total carbohydrate	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²
Control	15.30	18.23	15.50	7.72	0.335
P 20 %	15.61	18.71	16.28	7.87	0.352
P 40 %	15.75	18.75	17.09	7.98	0.359
P 60 %	15.83	19.35	18.05	8.09	0.365
PBZ 100 mg / L	15.54	18.76	17.45	7.90	0.361
PBZ 150 mg / L	15.78	18.88	18.33	8.20	0.380
PBZ 200 mg / L	16.10	19.45	19.21	8.37	0.385
Zn 2000 mg / L	15.55	18.87	16.55	7.84	0.350
Zn 3000 mg / L	15.80	18.80	17.70	7.95	0.349
Zn 4000 mg / L	15.98	19.13	18.91	8.03	0.378
L . S. D. 0.05	0.21	0.35	0.73	0.11	0.016

Table (2): Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig fruits cv. Asowd Diala for season 2011 .

Treatments	% Total soluble sold	%Total sugar	% Total carbohydrate	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²
Control	16.22	19.01	16.41	7.91	0.341
P 20 %	16.43	19.38	18.00	8.05	0.360
P 40 %	16.50	19.62	18.87	8.13	0.369
P 60 %	16.71	19.94	20.13	8.25	0.375
PBZ 100 mg / L	16.55	19.50	19.62	8.17	0.366
PBZ 150 mg / L	16.82	20.23	19.95	8.30	0.379
PBZ 200 mg / L	17.20	21.35	21.44	8.78	0.392
Zn 2000 mg / L	16.49	19.31	17.70	8.12	0.364
Zn 3000 mg / L	16.76	19.70	18.25	8.20	0.372
Zn 4000 mg / L	16.94	19.86	19.12	8.36	0.380
L . S. D. 0.05	0.17	0.28	1.21	0.12	0.013

3 - Effect of Pruning . Paclobutrazol and Zinc Sulphate on Type of crackings and total cracking percentage :

The data in Tables (3 and 4) showed that, pruning and foliar application with Paclobutrazol and Zinc Sulphate significantly reduced the percentage of cracking Fruits of Fig cv. Asowd Diala cultivars in both seasons compared to control treatment .The minimum splitting value were observed by using the highest percentage pruning 60% and the highest concentration of Palobutrazol and Zinc Sulphate (200 and 4000 mg/L respectively) and , the treatment of Paclobutrazol as foliar sprays at concentration at conc. of (200) mg/L gave the lowest percentage of longitudinal , tertiary , quaternary , basal cracking's and total cracking which were (3.36, 2.24, 1.59, 1.10 ,and 8.29) % and (3.42 , 2.75 , 1.78 , 1.50 and 9.45) for the both seasons respectively .There were also significant differences between studied treatments in reducing the percentage of cracking types . These results are in agreement with those obtained by (10,11) who observed that splitting fruits in fig c.v. Wazeri cultivar were reduced when trees by paclobutrazo and zinc sulphate were spraying . (6) confirmed that the Pruning led to a reduction in trees vegetative growth and there by increases total chlorophyll and transformation of manufactured absorbed materials , causing

firm fruit and makes it more resistant to cracking. Paclobutrazol may be decrease fruit cell division during the first stage of fruit growth and improve fruit cell enlargement during the following stage (8) .

Table (3) : Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on types of crackings and total cracking of fig fruits cv. Asowd Diala for season 2010 .

Treatments	(%) Longitudinal cracking	(%) Tertiary cracking	(%) Quaternary cracking	(%) Basal cracking	(%) ¹ Total cracking
Control	6.80	4.95	3.40	2.60	17.75
P 20 %	5.70	4.13	3.15	2.43	15.41
P 40 %	6.50	4.39	2.75	1.22	14.86
P 60 %	5.87	3.46	1.32	1.55	14.30
PBZ 100 mg / L	5.55	4.20	2.60	1.17	13.52
PBZ 150 mg / L	4.17	3.95	2.45	1.28	11.85
PBZ 200 mg / L	3.36	2.24	1.59	1.10	8.29
Zn 2000 mg / L	6.42	4.61	3.00	2.35	16.20
Zn 3000 mg / L	6.11	4.40	2.85	1.97	15.33
Zn 4000 mg / L	4.86	3.87	1.76	1.23	11.72
L . S. D. 0.05	0.29	0.37	0.20	0.15	1.18

Table (4) : Effect of pruning and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on types of crackings and total cracking of fig fruits cv. Aswad Diala for season 2011 .

Treatments	(%) Longitudinal cracking	(%) Tertiary cracking	(%) Quaternary cracking	(%) Basal cracking	(%) Total cracking
Control	7.38	5.31	3.85	2.76	19.21
P 20 %	6.80	5.03	3.61	1.60	16.50
P 40 %	6.25	4.80	3.45	2.37	16.87
P 60 %	5.74	3.95	2.70	2.12	14.51
PBZ 100 mg / L	6.00	4.91	2.68	2.00	15.77
PBZ 150 mg / L	4.50	3.80	2.45	2.16	12.91
PBZ 200 mg / L	3.42	2.75	1.78	1.50	9.45
Zn 2000 mg / L	6.75	3.61	2.22	2.25	14.83
Zn 3000 mg / L	5.85	3.10	2.68	1.99	13.62
Zn 4000 mg / L	4.22	2.87	2.76	1.60	11.41
L . S. D. 0.05	0.55	0.25	0.17	0.31	1.74

CONCLUSION

It could be concluded from this experiment that , pruning and spraying trees with Paclobutrazol and Zinc Sulphate companied increase the Total soluble solids , total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , Firmness and reducing percentage of type of crackings and total crackings compared with control treatment . And these treatments led to reduce in the percentage of longitudinal cracking , trilateral , quadrilateral , basal and total with significant differences between treatments for both growing seasons .

REFERENCES

1. Condit LJ. (1969). Ficus: The exotic species. University of California, Division of Agricultural Sciences. Berkeley, CA.126.
2. Zohary D. and Spiegel-Roy P. (1975). Beginnings of fruit growing in the old world. Sci. 187:319-327.
3. Storey WB. (1975). Figs, p. 568-588. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). Advances in fruit breeding. Purdue University Press. West Lafayette, IN.
4. Stover E., Aradhya M, Ferguson L, and Crisosto C. (2007). The fig: Overview of an ancient fruit. Hort.Sci. 42:1083–1087.
5. Food and Agriculture Organization. (2007). Data archives. FAOSTAT. 24 Nov. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/408/DesktopDefault.aspx>>.
6. AL- Hamdawi A M .(2009) . Effect of shorting pruning and branch removal on some vegetative growth and its yield and quality of fig tree cv. Wazeri (*Ficus carica* L.). J . Qadisiah . 4(14) :61 -69 .
7. AL- Uajjani Z A . (2011). Effect of Pruning and spraying of some of regulators on growth and yield of fig trees (*Ficus carica* L .) c . v . Aswad Diala . PhD.Thesis . Dep. Hort. Agric. Colle. Univ.of Kufa .Iraq .
8. EL-Khawaga A S. (2007) . Reduction in Fruit Cracking in Manfaluty Pomegranate Following a Foliar Application with Paclobutrazol and Zinc Sulphate . J. Appl. Sci. Res. 3(9): 837-840
9. Abdalla H K . (2009) . Effect of Paclobutrazol spraying and summer pruning on growth and yield of the grape (Visit vinifera L.) , c.v Des- Aniz . Ph. D. Thesis . Dep. Hort. Agric. Colle. Univ.of Kufa .Iraq .

10. AL – Hamdawi AM. , Al – Khaffaf AA. and Al – Attabi AA. (2006) . Effect of some nutrient spraying on vegetative and fruiting growth of fig CV. Wazeri . J. Babylon Univ . 1(3) : 439 – 446 .
11. AL -Hamdawi A M. ; Al - Khaffaf AA. and AL-Truffi Z Sh M. (2004). Effect of Spraying with NAA and PBZ on vegetative and fruiting characteristics of figtrees . J. Babylon. 9(3):485-492.
12. Byers R E. ; Carbough DH, and Presley NC. (1990). Stayman Fruit cracking as affected by surfactants , plant growth regulators and other chemicals . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 (3) : 405 – 411 .
13. Abdel-Ghany AA. (1995). Effect of paclobutrazol, Uniconazol and shoot topping on growth and fruiting of “Thompson Seedless” grapevines PhD. Thesis. Faculty of Agric., Cairo Univ.
14. Sayed EA. (1993). The effect of paclobutrazol on bud Behaviour, yield and fruit quality of “Roomi Red” Grapevines fac of Agric., Minia univ. first conference for Horticultural crops, 19-21 Oct.
15. Wassel AM., Ahmed FF, El-Sayed EM, and Ahmed AK. (1993) . Effect of paclobutrazol on “Roomy Red” Grapevines (visit vinifera L.) 1- The effect on bud behavior and vegetative growth fac. Of Agric. Minia univ. First conference for horticultural cops, 19-21 Oct.
16. Abo- Zaid AN. (2000) . Plant Hormones and Application Agricultural . Arabic home for publishing . Cairo .123-129.
17. AL- Rawi KM. and Khalf Allah AM.(2000) . Design and Analysis of Agricultural Experiments . College of Agric. Univ. Mosel . Iraq.
18. Association official Agricultural chemists. (A.O.A.C.) (1985).Official Methods of Analysis. 14 th Ed. Published by A.O.A. C . Washington, D.C., U.S.A.
19. Joslyn AM. (1970). Methods in food analysis, physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2nd Ed., Academic Press. New York. London.
20. Jundi H M .(2003) . Physiology of tree fruits . Arabic home for publishing .Cairo .
21. Ferguson L.; Michailides TJ, and Shorey HH. (1999). The California Fig Industry.Univ. California. U.S.A.

Bayesian Estimation of the Scale Parameter of the Gamma Distribution Using Precautionary Loss Function.

Nadia H. Al-Noor

Dept. of Mathematics / College of Sciences / AL- Mustansiriyah University - Iraq

E-mail: nadialnoor@yahoo.com

ABSTRACT

The current paper considers the estimation of the scale parameter of two parameter Gamma distribution with known shape. Moment, Maximum likelihood and Bayesian estimations are discussed. Bayes estimator is obtained using Jeffrey's prior and extension Jeffrey's prior under precautionary loss function. Mean squared error (MSE) and mean absolute error (MAE) of the estimators are calculated in small, moderate and large samples using simulated data sets. It is observed that the Bayes estimation under extension of Jeffery prior is the best estimator when the values of extension of Jeffery are 2, 1, 0.8 and the Bayes estimation under Jeffery prior is better than Bayes estimation under extension of Jeffery prior when the values of extension of Jeffery are 0.4, 4.

Keywords: Gamma distribution; Moment estimation, Maximum likelihood estimation; Bayesian estimation; Precautionary loss function; Mean square error; Mean absolute error.

الملخص باللغة العربية

اهتم البحث الحالي بتقدير معلمة القياس لتوزيع كاما ذي المعلمتين عند معرفة معلمة الشكل. تم مناقشة مقدرات العزوم ، الامكان الاعظم ومقدرات بيز المبنية على توزيعات جيفري وجيفري الموسع كتوزيعات اولية تحت دالة الخسارة الوقائية. تم احتساب متوسط مربعات الخطأ ومتوسط الخطأ المطلق للبيانات المولدة باعتماد المحاكاة لعينات صغيرة، متوسطة وكبيرة. لوحظ ان اداء مقدر بيز باعتماد جيفري الموسع كتوزيع اولي هو الافضل عند قيمة التوسع (2، 1، 0.8) ، وكان اداء مقدر بيز باعتماد جيفري كتوزيع اولي افضل من اعتماد جيفري الموسع عند قيمة التوسع (0.4، 4) .

INTRODUCTION

Gamma distribution has many applications, including modeling ranges for normal populations, meteorological precipitation processes, and wait times.

The gamma distribution is a right-skewed distribution with a shape parameter α and a scale parameter β . The probability density function of the gamma distribution is as follows:

$$f(x|\alpha, \beta) = \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} x^{\alpha-1} e^{-\beta x} ; x > 0; \alpha, \beta > 0 \quad (1)$$

Where $\Gamma(\alpha)$ is a value of the standard mathematical function called the gamma function and is defined by:

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^\infty x^{\alpha-1} e^{-x} dx$$

The shape parameter (α) essentially determines the level of positive skew (Figure 1, Left). The scale parameter (β) determines the spread of values, stretching or squeezing the distribution when large or small, respectively (Figure 1, Right).

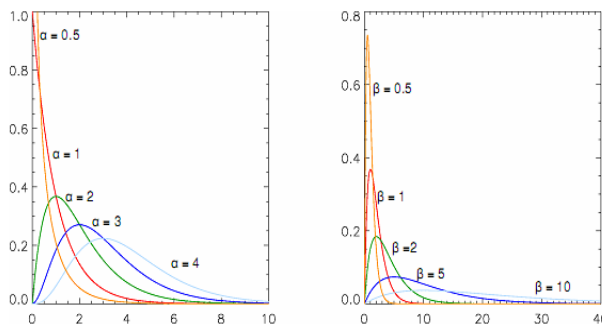


Figure (1): Gamma distribution with a different values of α when scale $\beta=1$ (left) and for different values of β when $\alpha=2$ (right).

The method of moments and method of maximum likelihood are a traditional methods used by statisticians to estimate the parameters of an assumed parametric model. The likelihood function represents a fundamental concept in statistical inference, and indicates how likely a particular population is to produce an observed sample. In Bayesian approach, a prior

distribution for the parameter is considered and then the posterior distribution is obtained by conditioning on the data and after that the inference is done based on the posterior.

Although there is a vast literature available on estimation of the gamma parameters using the frequency approach, not much work has been done on the Bayesian inference of the gamma parameter(s) [1]. Damsleth (1975) first showed theoretically that there exist conjugate priors for the gamma parameters [2]. Miller (1980) also used the same conjugate priors and showed that the Bayes estimates can be obtained only through numerical integration [3]. Tsionas (2001) considered the four-parameter gamma distribution and computed the Bayes estimates for a specific non-informative prior using the Gibbs sampling procedure [4]. Son and Oh (2006) computed the Bayes estimates of the unknown parameters using the Gibbs sampling procedure, under the vague priors, and compared their performances with the maximum likelihood estimators and the modified moment estimators [5]. Apolloni and Bassis (2009) proposed an interesting method in estimating the parameters of a two-parameter gamma distribution, based on a completely different approach [6]. The performances of the estimators proposed by Apolloni and Bassis are very similar to the corresponding Bayes estimators proposed by Son and Oh [1]. Pradhan and Kundu (2011) performed a Monte Carlo simulations study to compare the performances of the Bayes estimates of two-parameter gamma distribution under squared error loss function using Lindley's approximation and using Gibbs sampling procedures with the classical estimators [1]. Norstrom (1996) introduced an asymmetric loss known as the Precautionary loss function and also he presented a general class of Precautionary loss function with quadratic loss function as a special case [7]. This loss function has been used by several authors, Pandey and

Rao (2006) derived Bayes estimators of the scale parameter of generalized gamma distribution by taking quasi, inverted gamma and uniform prior distributions using precautionary loss function [8]. Yarmohammadi and Pazira (2010) studied the classical maximum likelihood and Bayesian estimations on the generalized exponential distribution using precautionary loss [9]. Gholizadeh et al. (2011) reached to that Bayes approach under precautionary loss function is best estimator for estimating the shape parameter of the Kumaraswamy distribution comparing with squared error and general entropy loss functions [10]. In the current study, we compare the performance of the moment, maximum likelihood and Bayesian estimators for the scale parameter of the gamma distribution, with the assumption that the shape parameter is known. The Bayes estimators are obtained depend upon precautionary loss function using two different prior distributions (Jeffrey, Extension Jeffrey). Comparisons are made between these estimators using Monte-Carlo simulation study.

METHODS

1. Moments Estimation:

The method of moments is used for estimating the parameters of a distribution from a sample. The idea is as follows.

If the number of parameters to be estimated equals k , we pose the k first moments of the distribution (whose expression depends on unknown parameters) equal the corresponding empirical moments, that is, to the estimators of the moments of order k calculated on the sample. We should solve the system of k equations with k unknown variables [11]. According to the method of moments, the scale parameter of the gamma distribution, β , estimated by the form:

$$\hat{\beta}_{Mo} = \frac{\bar{x}}{s^2} \quad (2)$$

Where \bar{x} and s^2 are the mean and variance of sample respectively.

2. Maximum Likelihood Estimation:

The term maximum likelihood refers to a method of estimating parameters of a population from a random sample. It is applied when we know the general form of distribution of the population but when one or more parameters of this distribution are unknown. The method consists in choosing an estimator of unknown parameters whose values maximize the probability of obtaining the observed sample [11]. Let us consider a random sample $\underline{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ of size n from the gamma distribution. Then the likelihood function for the given sample observations is:

$$L(\alpha, \beta | \underline{x}) = \prod_{i=1}^n f(x_i | \alpha, \beta) \\ = \frac{\beta^{n\alpha}}{(\Gamma(\alpha))^n} \prod_{i=1}^n x_i^{\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} \quad (3)$$

From which we calculate the log-likelihood function:

$$l(\alpha, \beta | \underline{x}) = n\alpha \ln \beta - n \ln \Gamma(\alpha) \\ + (\alpha - 1) \sum_{i=1}^n \ln(x_i) - \beta \sum_{i=1}^n x_i$$

Finding the maximum with respect to β by taking the derivative and setting it equal to zero yields the maximum likelihood Estimator of the β parameter, denoted by $\hat{\beta}_{ML}$:

$$\hat{\beta}_{ML} = \frac{n\alpha}{\sum_{i=1}^n x_i} = \frac{\alpha}{\bar{x}} \quad (4)$$

3. Bayesian Estimation:

We provide the Bayes estimation of the scale parameter β based on precautionary loss function under two different prior distributions:

- Jeffrey Prior Information: $g(\beta) \propto \frac{1}{\beta}$ (5)
- Extension of Jeffrey Prior Information:

$$g(\beta) \propto \frac{n}{\beta^{2c}} \quad ; \quad c > 0 \quad (6)$$

The precautionary loss function expressed as [7]:

$$L(\hat{\beta}, \beta) = \frac{(\hat{\beta} - \beta)^2}{\hat{\beta}} \quad (7)$$

The Bayes estimator under this asymmetric loss function is denoted by $\hat{\beta}_P$ and may be obtained by solving the following equation [7]:

$$\hat{\beta}_P^2 = E(\beta^2 | \underline{x})$$

3.1 Jeffrey Prior Information:

Combining the prior distribution (5) and the likelihood function (3), the posterior density of the scale parameter β is derived as:

$$\pi(\beta | \underline{x})_J = \frac{\frac{\beta^{n\alpha}}{(\Gamma(\alpha))^n} \prod_{i=1}^n x_i^{\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} \frac{1}{\beta}}{\int_0^\infty \frac{\beta^{n\alpha}}{(\Gamma(\alpha))^n} \prod_{i=1}^n x_i^{\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} \frac{1}{\beta} d\beta}$$

After letting $y = \beta \sum_{i=1}^n x_i$ and substituting, the posterior distribution becomes:

$$\pi(\beta | \underline{x})_J = \frac{\beta^{n\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} (\sum_{i=1}^n x_i)^{n\alpha}}{\Gamma(n\alpha)} \quad (8)$$

Now, for the posterior (8) and precautionary loss function (7), the Bayes estimator of β come out as:

$$\begin{aligned} \hat{\beta}_{PJ}^2 &= E(\beta^2 | \underline{x}) = \int_0^\infty \beta^2 \pi(\beta | \underline{x})_J d\beta \\ &= \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^{n\alpha}}{\Gamma(n\alpha)} \int_0^\infty \beta^{n\alpha+1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} d\beta \end{aligned}$$

On substituting and simplification, we get $\hat{\beta}_{PJ}$ as form:

$$\hat{\beta}_{PJ} = \frac{\sqrt{n\alpha(n\alpha + 1)}}{\sum_{i=1}^n x_i} \quad (9)$$

3.2 Extension of Jeffrey Prior Information:

Combining the prior distribution (6) and the likelihood function (3), the posterior density of the scale parameter β is derived as:

$$\pi(\beta | \underline{x})_E = \frac{\frac{\beta^{n\alpha}}{(\Gamma(\alpha))^n} \prod_{i=1}^n x_i^{\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} \frac{n}{\beta^{2c}}}{\int_0^\infty \frac{\beta^{n\alpha}}{(\Gamma(\alpha))^n} \prod_{i=1}^n x_i^{\alpha-1} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} \frac{n}{\beta^{2c}} d\beta}$$

After letting $y = \beta \sum_{i=1}^n x_i$ and substituting, the posterior distribution becomes:

$$\pi(\beta | \underline{x})_E = \frac{\beta^{n\alpha-2c} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} (\sum_{i=1}^n x_i)^{n\alpha-2c+1}}{\Gamma(n\alpha - 2c + 1)} \quad (10)$$

Now, for the posterior (10) and precautionary loss function (7), the Bayes estimator of β come out as:

$$\begin{aligned} \hat{\beta}_{PE}^2 &= E(\beta^2 | \underline{x}) = \int_0^\infty \beta^2 \pi(\beta | \underline{x})_E d\beta \\ &= \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^{n\alpha-2c+1}}{\Gamma(n\alpha - 2c + 1)} \int_0^\infty \beta^{n\alpha-2c+2} e^{-\beta \sum_{i=1}^n x_i} d\beta \end{aligned}$$

On substituting and simplification, we get $\hat{\beta}_{PE}$ as form:

$$\hat{\beta}_{PE} = \frac{\sqrt{(n\alpha - 2c + 1)(n\alpha - 2c + 2)}}{\sum_{i=1}^n x_i} \quad (11)$$

Simulation Study and Results

In order to compare the performance of the moments, maximum likelihood and Bayes estimators with precautionary loss function under different prior distributions, we generated $R = 3000$ random samples of sizes ($n = 5, 15, 25, 50, 100$) from gamma distribution with the true value of $\alpha = 2$, and the scale parameter β , we considered $\beta = 0.5, 2, 4$. We have taken $c = 0.4, 0.8, 1, 2, 4$. After the parameter was estimated, mean squared error (MSE) and mean absolute error (MAE) were computed to compare the methods of estimation, where :

$$\begin{aligned} MSE(\beta) &= \frac{\sum_{i=1}^R (\hat{\beta}_i - \beta)^2}{R} \\ MAE(\beta) &= \frac{\sum_{i=1}^R |\hat{\beta}_i - \beta|}{R} \end{aligned}$$

We used QBasic programming language for written the simulation program. The results of the simulation study are summarized in the tables 1, 2 and 3.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Tables 1, 2 and 3 show that the MSE and MAD for PE (i.e. Bayes estimation based on precautionary loss function under Extension of Jeffery Prior distribution) with $c=2$ is minimum and hence it is admissible for all n . It is also clear from the tables 1, 2 and 3 that, each of the Bayes estimators (i.e., PJ and PE) has smaller MSE and MAD than the classical estimators (i.e., moment estimator (MO) and maximum likelihood estimator (ML)) except for the PE only with $c=4$, $n=5$ where ML is better further that the performance of PJ is better than PE when $c=0.4$, 4 for all the value of β and n . Further, we note that, the MSE and MAD of the Bayes estimators of β decreases as n increases which is similar to moment estimator. Also, from the tables 1, 2 and 3, when we compare between the classical estimators, we note that the performance of ML is better than MO when sample sizes are equal or less than 25.

Finally, from the results, we conclude that the mean square error (MSE) and the mean absolute error (MAD) give the same conclusion about the performance of estimators. The Bayes estimation has approximately results in general. The extension of Jeffery prior is the best estimator when the value of extension of Jeffery is 2, 1, 0.8 and the Jeffery prior is better than extension of Jeffery prior when the value of extension of Jeffery is 0.4, 4. On the other hand, the maximum likelihood estimator is still better than extension of Jeffery prior just when the value of extension of Jeffery is 4 and $n=5$. The moment estimator is better than maximum likelihood estimator when sample sizes are equal or greater than 50.

REFERENCES

1. Pradhan, B. and Kundu, D. (2011). Bayes estimation and prediction of the two-parameter gamma distribution. *J. Statis. Comput. and Simul.* 81(9):1187–1198.
2. Damsleth, E. (1975). Conjugate classes for gamma distribution. *Scand. J. Stat.* 2: 80–84.
3. Miller, R.B. (1980). Bayesian analysis of the two-parameter gamma distribution. *Technomet.* 22: 65–69.
4. Tsionas, E.G. (2001). Exact inference in four-parameter generalized gamma distribution. *Commun. Stat. Th. Meth.* 30: 747–756.
5. Son, Y.S. and Oh, M. (2006). Bayes estimation of the two-parameter gamma distribution. *Commun. Stat. Simul. Comput.* 35: 285–293.
6. Apolloni, B. and Bassis, S. (2009). Algorithmic inference of two-parameter gamma distribution. *Commun. Stat. Simul. Comput.* 38: 1950–1968.
7. Norstrom, J.G. (1996). The use of precautionary loss function in risk analysis. *IEEE Trans. on Reliab.* 45(3): 400–403.
8. Pandey, H. and Rao, A. K. (2006). Bayesian estimation of scale parameter of generalized gamma distribution using precautionary loss function. *Ind. J. Appl. Stat.* 10: 21–27.
9. Yarmohammadi, M. and Pazira, H., (2010). Classical and Bayesian estimation on the generalized exponential distribution using censored data. *Int. J. Math. Anal.* 4(29): 1417–1431.
10. Gholizadeh, R.; Shirazi, A.M. and Mosalmanzadeh, S. (2011). Classical and Bayesian estimations on the Kumaraswamy distribution using grouped and un-grouped data under difference loss function. *J. Appl. Sci.* 11(12): 2154–2162.
11. Dodge, Yadolah (2008). *The Concise Encyclopedia of Statistics*. Springer Science & Business Media, LLC.

Table 1: MSE and MAE of estimated parameter of Gamma distribution with $\alpha=2$, $\beta=0.5$

n	Criteria	$\hat{\beta}_{MO}$	$\hat{\beta}_{ML}$	$\hat{\beta}_{PJ}$	$\hat{\beta}_{PE}$				
					c=0.4	c=0.8	c=1	c=2	c=4
5	MSE	5.7450	0.03068	0.02618	0.02757	0.02267	0.02088	0.01845	0.04638
	MAE	0.84324	0.15847	0.11544	0.11806	0.10915	0.10646	0.10106	0.20278
15	MSE	0.13080	0.02808	0.00687	0.00701	0.00650	0.00632	0.00600	0.00857
	MAE	0.23701	0.15944	0.06376	0.06425	0.06255	0.06197	0.06124	0.07873
25	MSE	0.04651	0.02808	0.00372	0.00377	0.00360	0.00354	0.00347	0.00443
	MAE	0.16682	0.16279	0.04729	0.04751	0.04680	0.04660	0.04617	0.05564
50	MSE	0.01921	0.02767	0.00178	0.00179	0.00175	0.00173	0.00170	0.00191
	MAE	0.10356	0.16402	0.03346	0.03356	0.03320	0.03307	0.03296	0.03549
100	MSE	0.00808	0.02780	0.00082	0.00083	0.00082	0.00081	0.00081	0.00087
	MAE	0.06965	0.16565	0.02282	0.02286	0.02274	0.02270	0.02268	0.02359

Table 2: MSE and MAE of estimated parameter of Gamma distribution with $\alpha=2$, $\beta=2$

n	Criteria	$\hat{\beta}_{MO}$	$\hat{\beta}_{ML}$	$\hat{\beta}_{PJ}$	$\hat{\beta}_{PE}$				
					c=0.4	c=0.8	c=1	c=2	c=4
5	MSE	91.9200	0.49095	0.41902	0.44124	0.36285	0.33413	0.29534	0.74221
	MAE	3.37290	0.63391	0.46179	0.47227	0.43660	0.42585	0.42427	0.81113
15	MSE	2.09290	0.44928	0.10996	0.11223	0.10414	0.10112	0.09615	0.13713
	MAE	0.94806	0.63777	0.25507	0.25702	0.25021	0.24791	0.24698	0.31493
25	MSE	0.74428	0.44937	0.05958	0.06032	0.05773	0.05678	0.05562	0.07101
	MAE	0.66731	0.65117	0.18919	0.19004	0.18922	0.18892	0.18871	0.22256
50	MSE	0.30741	0.44283	0.02852	0.02873	0.02800	0.02773	0.02722	0.03058
	MAE	0.41425	0.65609	0.13384	0.13425	0.13283	0.13230	0.13187	0.14196
100	MSE	0.12929	0.44489	0.01321	0.01325	0.01310	0.01304	0.01297	0.01391
	MAE	0.27863	0.66263	0.09131	0.09145	0.09099	0.09082	0.09074	0.09437

Table 3: MSE and MAE of estimated parameter of Gamma distribution with $\alpha=2$, $\beta=4$

n	Criteria	$\hat{\beta}_{MO}$	$\hat{\beta}_{ML}$	$\hat{\beta}_{PJ}$	$\hat{\beta}_{PE}$				
					c=0.4	c=0.8	c=1	c=2	c=4
5	MSE	367.68	1.9638	1.6760	1.7649	1.4514	1.3365	1.18139	2.9688
	MAE	6.7459	1.2678	0.92359	0.94454	0.87320	0.85171	0.84854	1.6222
15	MSE	8.3716	1.7971	0.43984	0.44895	0.41659	0.40448	0.38463	0.54852
	MAE	1.8961	1.2755	0.51015	0.51405	0.50042	0.49883	0.49796	0.62986
25	MSE	2.9771	1.7974	0.23834	0.24128	0.23092	0.22715	0.22251	0.28407
	MAE	1.3546	1.3023	0.37838	0.38008	0.37444	0.37885	0.37743	0.44513
50	MSE	1.2296	1.7713	0.11411	0.11493	0.11203	0.11093	0.10891	0.12235
	MAE	0.8285	1.3121	0.26769	0.26851	0.26567	0.26461	0.26375	0.28392
100	MSE	0.5171	1.7795	0.05280	0.05302	0.05240	0.05217	0.05190	0.05567
	MAE	0.5572	1.3252	0.18263	0.18290	0.18198	0.18165	0.18148	0.18874

Note: n : sample size; MSE: Mean Squared Errors; MAE: Mean Absolute Errors; $\hat{\beta}_{MO}$: Moment Estimator; $\hat{\beta}_{ML}$: Maximum Likelihood Estimator; $\hat{\beta}_{PJ}$: Bayes estimation based on precautionary loss function under Jeffrey Prior distribution; $\hat{\beta}_{PE}$: Bayes estimation based on precautionary loss function under Extension of Jeffrey Prior distribution; c: value of extension of Jeffery.

Comparison study of maximum likelihood estimators of modified weibull distribution by using genetic algorithm and numerical technique.

Fadhaa O. Sameer

Tropical Biological Research unit/College of Sciences / Baghdad University- Iraq

E –mail: fadhaasha@yahoo.com

ABSTRACT

Estimation of the three parameters of Modified Weibull Distribution was considered by using maximum likelihood method . Two methods were used to maximum likelihood function genetic algorithm method and numerical method .The simulation study show that the genetic algorithm method was the best according to the time of conduct and maximum value of likelihood function.

Key words: Genetic algorithm, maximum likelihood estimates, Modified Weibull distribution.

الملخص باللغة العربية

تم تقدير معالم توزيع ويبل المعمم بثلاث معلمات بطريقة الإمكان الأعظم باستخدام طريقتين في تعظيم دالة الإمكان الأعظم هما طريقة الخوارزمية الجينية وطريقة نيوتن التكرارية، وكانت طريقة الخوارزمية الجينية أفضل من الطريقة التكرارية حسب تجارب المحاكاة المطبقة من حيث السرعة وأعظم قيمة لدالة الإمكان الأعظم.

INTRODUCTION

Sarhan and Zaindin (1) introduced a new three-parameter distribution called modified Weibull distribution and they denoted as $MWD(\alpha, \beta, \gamma)$. The MWD generalizes exponential, Rayleigh, linear failure rate or Weibull distribution and these distributions are using in analyzing lifetime data (2,3). This distribution has decreasing or un model PDF (1) and can have increasing (starting from the value of α), decreasing and constant hazard functions. The cumulative distribution function of the $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$ takes the following form:

$$F(x; \alpha; \beta; \gamma) = 1 - e^{-\alpha x - \beta x^\gamma}; x > 0; \dots\dots\dots(1)$$

Where $\gamma > 0$, $\alpha, \beta \geq 0$ such that $\alpha + \beta > 0$. Here α is a scale parameter, while β and γ are shape parameters.

The $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$ (1) generalizes the following distributions:

- (1) The linear failure rate distribution LFRD($\alpha; \beta$) by Setting $\gamma = 2$.
- (2) Weibull distribution WD($\beta; \gamma$) by setting $\alpha = 0$.
- (3) Exponential distribution RD(β) by setting $\alpha = 0; \gamma = 2$.
- (4) Rayleigh distribution ED(α) by setting $\beta = 0$.

The probability distribution function of $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$ is:

$$f(x; \alpha; \beta; \gamma) = (\alpha + \beta \gamma x^{\gamma-1}) e^{-\alpha x - \beta x^\gamma}; x > 0 \dots\dots(2)$$

and the hazard function[1] of $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$ is:

$$h(x; \alpha; \beta; \gamma) = (\alpha + \beta \gamma x^{\gamma-1}); x > 0 \dots\dots\dots(3)$$

One can easily verify from (3) that:

- (1) The hazard function is constant when $\gamma = 1$.
- (2) When $\gamma < 1$, the hazard function is decreasing.
- (3) The hazard function will be increasing if $\gamma > 1$.

Sarhan and Zaindin (2009) studied various properties of MWD (1). They also studied the maximum likelihood estimator(MLE) for the three parameters involved in the distribution .In this study , maximum likelihood estimator (MLE) for the three parameters was considered based on numerical method such as Newton method and genetic algorithm . The purpose of the GA was to create a method of parameter estimation which eliminates biased starting estimates and convergence to local maxima.

METHODS AND APPLICATIONS

1. Parameter estimations:

The maximum likelihood estimates were derived of the unknown parameters $\alpha; \beta$ and γ of $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$ based on a complete sample. Let a simple random sample was X_1, X_2, \dots, X_n from $MWD(\alpha; \beta; \gamma)$. The likelihood function of this sample was:

$$L = \prod_{i=1}^n f(x_i, \alpha, \beta, \gamma) \dots\dots\dots(4)$$

Substituting from eq.(4) into eq.(5) and take The log-likelihood function getting

$$L = \sum_{i=1}^n \ln(\alpha + \beta \gamma x_i^{\gamma-1}) - \alpha \sum_{i=1}^n x_i - \beta \sum_{i=1}^n x_i^\gamma \dots\dots(5)$$

We used two method to found the estimations of the parameters $(\alpha; \beta; \gamma)$ that maximize the equation (5) which represented by :

1.1 classical technique:

This method represented by derived the equation (5) with respect to parameters $(\alpha; \beta; \gamma)$ respectively and then equal the derivatives to zero to get the three likelihood equations:

$$\sum_{i=1}^n \frac{1}{\alpha + \beta \gamma x_i^{\gamma-1}} - \sum_{i=1}^n x_i = 0 \quad \dots (6)$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{1}{\alpha + \beta \gamma x_i^{\gamma-1}} - \sum_{i=1}^n x_i^{\gamma-1} = 0 \dots \dots (7)$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{x_i^{\gamma-1} (1 + \gamma \ln(x_i))}{\alpha + \beta \gamma x_i^{\gamma-1}} - \sum_{i=1}^n x_i^{\gamma-1} \ln(x_i) = 0 \dots (8)$$

To find out maximum likelihood estimators of parameters (α ; β ; γ), System of non linear equations was solved using Newton Method(4). the main problem with the Newton- algorithm was the selection process for the initial parameter values. The selection of the initial parameter values was critical, because of the inability of the Newton-algorithm (NA) to avoid convergence to local optima. If the initial starting estimate was biased, or inaccurate in the representation of the range of data (samples) was analyzed, the MLE method will center on a local maximum, and not the 'true' value. This is a critical factor when applying the parameter estimates to reliability data(5).

1.2 Genetic Algorithm:

In 1975, Holland introduced an optimization procedure that mimic the metaphor of natural biological evolution (the evolution of the living beings) which was described by Charles Darwin (6). This method known as the Genetic Algorithms (GA) (7). Genetic Algorithm was direct, parallel, stochastic method for global search and optimization; and it is a part of the group of Evolutionary Algorithms (EA) (8). Genetic Algorithm (GA) began with a large list of randomly generated individuals, representing possible solutions of the problem and these individuals called chromosomes(9). The chromosome in a computer algorithm was an array of genes. Each chromosome has an associated function called fitness function. Genes are the basic building blocks of a genetic algorithm. A gene is a binary encoding of a parameter (10). The population which is able to reproduce best fitness function are known as parents. This process leads to the evolution of populations of individuals that are better suited to their environment than the individuals that they were created from, just as in natural adaptation. Individuals, or current approximations, are encoded as strings,

chromosomes, composed over some alphabet(s), so that the genotypes (chromosome values) are uniquely mapped onto the decision variable (phenotypic) domain (11). The most commonly used representation in GA is the binary alphabet {0, 1} although other representations can be used, e.g. ternary, integer, real-valued etc. For example, a problem with two variables, x_1 and x_2 , may be mapped onto the chromosome structure in the following way:

$$\begin{array}{c|c} 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ \hline x_1 & & & & & & & & & & & & & x_2 & & & & & & & & & & & & & \end{array}$$

where x_1 is encoded with 10 bits and x_2 with 15 bits, possibly reflecting the level of accuracy or range of the individual decision variables. GA operate on a population of potential solutions applying the principle of survival of the fittest to produce (hopefully) better and better approximations to a solution. Then the GA goes into the production phase where the parents are chosen by means of a selection process (12). The selected parents reproduce using the genetic algorithm operator called crossover. The recombination operator is used to exchange genetic information between pairs, or larger groups, of individuals. The simplest recombination operator is that of single-point crossover(13). Consider the two parent binary strings:

P1 = 1 0 0 1 0 1 1 0, and

P2 = 1 0 1 1 1 0 0 0.

If an integer position, i , is selected uniformly at random between 1 and the string length, l , minus one [1, $l-1$], and the genetic information exchanged between the individuals about this point, then two new offspring strings are produced. The two offspring below are produced when the crossover point $i = 5$ is selected,

O₂ = 1 0 1 1 1 1 1 0.

O₁ = 1 0 0 1 0 0 0 0, and

This crossover operation is not necessarily performed on all strings in the population. Instead, it is applied with a probability P_c when the pairs are chosen for breeding. A further genetic operator, called mutation, is then applied to the new chromosomes, again with a set probability, P_m . Mutation causes the individual genetic representation to be changed according to some probabilistic rule. In the binary string representation, mutation will cause a single bit to change its state, $0 \rightarrow 1$ or $1 \rightarrow 0$. So, for example, mutating the fourth bit of O₁ leads to the new string,

O_{1m} = 1 0 0 0 0 0 0 0.

Mutation is generally considered to be a background operator that ensures that the probability of searching a particular subspace of the problem space is never zero (14). When the new generation is complete, the process of crossover is stopped. This has the effect of tending to inhibit the possibility of converging to a local optimum, rather than the global optimum.

After recombination and mutation, the individual strings are then, if necessary, decoded, the objective function evaluated, a fitness value assigned to each individual and individuals selected for mating according to their fitness, and so the process continues through subsequent generations. In this way, the average performance of individuals in a population is expected to increase, as good individuals are preserved and bred with one another and the less fit individuals die out. The GA is terminated when some criteria are satisfied, e.g. a certain number of generations, a mean deviation in the population, or when a particular point in the search space is encountered(15).

1.2.1 Population Representation and Initialization:

GAs operate on a number of potential solutions, called a population, consisting of some encoding of the parameter set simultaneously. Typically, a population is composed of between 30 and 100 individuals, although, a variant called the micro GA uses very small populations, ~10 individuals, with a restrictive reproduction and replacement strategy in an attempt to reach real-time execution (12). The most commonly used representation of chromosomes in the GA is that of the single-level binary string. Here, each decision variable in the parameter set is encoded as a binary string and these are concatenated to form a chromosome. The use of Gray coding has been advocated as a method of overcoming the hidden representational bias in conventional binary representation as the Hamming distance between adjacent values is constant (8).

1.2.2 The Objective and Fitness Functions:

The objective function is used to provide a measure of how individuals have performed in the problem domain. In the case of a maximization problem, the most fit individuals will have the highest numerical value of the associated objective function[16]. This raw

measure of fitness is usually only used as an intermediate stage in determining the relative performance of individuals in a GA. The individual fitness, $F(xi)$, of each individual is computed as the individual's raw performance, $f(xi)$, relative to the whole population, i.e.,

$$F(xi) = f(xi) / \sum_{i=1}^N f(xi) \dots\dots\dots(9)$$

Where N is the population size and xi is the phenotypic value of individual i . Whilst this fitness assignment ensures that each individual has a probability of reproducing according to its relative fitness, it fails to account for negative objective function values.

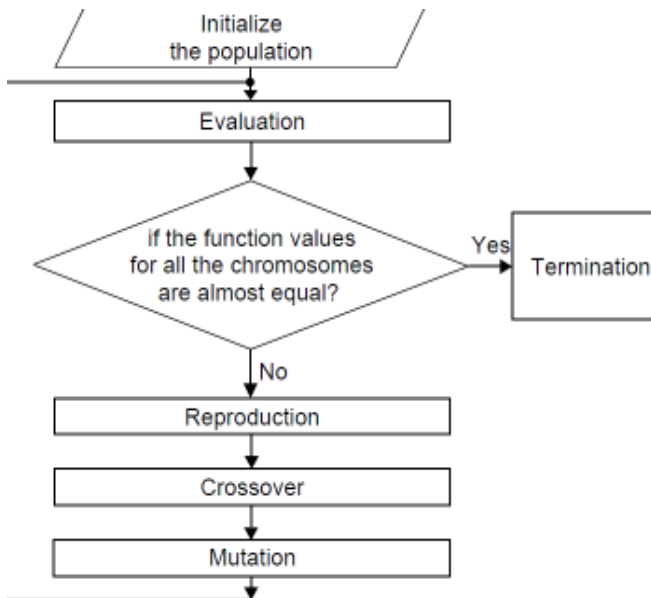
1.2.3 Methods of selection:

There are many different techniques in which a genetic algorithm can use to select the individuals to be copied over into the next generation, but listed below are some of the most common methods. Some of these methods are mutually exclusive, but others can be and often are used in combination(15).

- *Elitist selection:* The most fit members of each generation are guaranteed to be selected. (Most GA do not use pure elitism, but instead use a modified form where the single best, or a few of the best, individuals from each generation are copied into the next generation just in case nothing better turns up) (16).
- *Fitness-proportionate selection:* More fit individuals are more likely, but not certain, to be selected (16).
- *Roulette-wheel selection:* A form of fitness-proportionate selection in which the chance of an individual's being selected is proportional to the amount by which its fitness is greater or less than its competitors' fitness. (Conceptually, this can be represented as a game of roulette - each individual gets a slice of the wheel, but more fit ones get larger slices than less fit ones. The wheel is then spun, and whichever individual "owns" the section on which it lands each time is chosen) (15).

1.2.4 Termination of the GA:

Because the GA is a stochastic search method, it is difficult to formally specify convergence criteria. As the fitness of a population may remain static for a number of generations before a superior individual is found, the application of conventional termination criteria becomes problematic. A common practice is to terminate the GA after a prespecified number of generations and then test the quality of the best members of the population against the problem definition (15). If no acceptable solutions are found, the GA may be restarted or a fresh search initiated. the following flowchart (18) represents main ingredients of GA :



Figure(1): flowchart of genetic algorithm

GA versus Traditional Methods:

From the above discussion, it can be seen that the GA differs substantially from more traditional search and optimization methods. The four most significant differences are:

- GA search a population of points in parallel, not a single point.
- GA do not require derivative information or other auxiliary knowledge; only the objective function and corresponding fitness levels influence the directions of search.
- GA use probabilistic transition rules, not deterministic ones.

- GA work on an encoding of the parameter set rather than the parameter set itself (except in where real-valued individuals are used).

It is important to note that the GA provides a number of potential solutions to a given problem and the choice of final solution is left to the user. In cases where a particular problem does not have one individual solution, for example a family of Pareto-optimal solutions, as is the case in multi-objective optimization and scheduling problems, then the GA is potentially useful for identifying these alternative solutions simultaneously (16).

APPLICATION

1. Simulation Study:

Numerical study was considered to conduct a computer simulation based on MWD. A samples from the population of MWD wear generated ,the algorithm to generate samples from MWD and to estimate the parameters of MWD was:

Step1: Generate a random variable has uniform distribution $U(0,1)$.

Let a random variable $X = F^{-1}(U)$ has distribution function $F(X)$, the CDF(cumulative distribution function) of X .

$$F(x; \alpha, \beta, \gamma) = 1 - e^{-(\alpha x + \beta x^\gamma)}, \text{ let } U = F(X)$$

$$\text{Then } (\alpha x + \beta x^\gamma) = -\ln(1-u) \dots \dots \dots (10)$$

which can be solved numerically by using Newton –Raphson method and take initial value X_0 using

$$X_1 = (-\beta / \alpha) X_0^\gamma - (1 / \alpha) * \ln(1-U)$$

Step 2: Input numbers of iteration N

Step 3: Take initial value of $t = (\alpha, \beta, \gamma)$ such $t_0 = (\alpha_0, \beta_0, \gamma_0)$.

Step 5: Caculat $F(t_0), J(t_0)$ and $J^{-1}(t_0)$; (where J was Jacobean)

Step 4: Set $k=1$

Step 6: Solve non liner system $y_0 = -J^{-1}(t_0) * F(t_0)$ by using Newton method (18), (17).

Step 7: Find a new x_1 by set $t_1 = t_0 + y_0$

Step 8: If $\|t_1 - t_0\| \leq \epsilon$ then t_1 are the best approximation

Otherwise $k=k+1$

Find a new t_1 by set $t_0 = t_1$

Step 9: End

2. Algorithm of Genetic:

Step1: Pick the initial values $x_0 = [x_{01} \ x_{02} \ x_{03}] = [\alpha_0 \ \beta_0 \ \gamma_0]$, the lower bound $l = [l_1 \ l_2 \ l_3]$, the upper bound $u = [u_1 \ u_2 \ u_3]$ of (α, β, γ) the population size N_p , the vector $N_b = [N_{b1} \ N_{b2} \ N_{b3}]$ consisting of the numbers of bits assigned for the

representation of each variable x_i , the probability of crossover P_c , the probability of mutation P_m , the learning rate $\eta (0 < \eta \leq 1)$, to be made small/large for slow/fast learning), and the maximum number of iterations $k_{\max} > 0$. Note that the dimensions of x_0 , u , and l are all the same as $(N=3)$, which is the dimension of the variable x to be found and the population size N_p can not be greater than 2^{N_b} in order to avoid duplicated chromosomes and should be an even integer for constituting the mating pool in the crossover stage(18).

Step 2: Random Generation of Initial Population(17) and construct in a random way the initial population array X_1 that consists of N_p states (in the admissible region bounded by u and l) including the initial state x_0 , by setting:

$$X_1(1) = X_0 \text{ and } X_1(k) = l + \text{rand} \cdot (u - l) \text{ for } k = 2 : N_p$$

where rand is a random vector of the same dimension ($N=3$) as X_0 , u , and l . Then, encode each number of this population array into a binary string by:

$$P_1(n, 1 + \sum_{i=1}^{m-1} N_{bi} : \sum_{i=1}^m N_{bi}) = (2^{N_{bm}} - 1) * (X_1(n, m) - l(m) / (u(m) - l(m))) \dots \dots (11)$$

for $n = 1 : N_p$ and $m = 1 : N$ ($N=3$), so that the whole population array becomes a pool array, each row of which was a chromosome

represented by a binary string of $\sum_{i=1}^N N_{bi}$.

Step 3: For $k = 1$ to k_{\max} , do the following:

1. Decode each number in the pool into a (decimal) number by

$$X_k(n, m) = \text{decimal representation of } P_k(n, 1 + \sum_{i=1}^{m-1} N_{bi} : \sum_{i=1}^m N_{bi}) \text{ with } N_{bm} \text{ bits} = P_k(n, \cdot) * (u(m) - l(m)) / (2^{N_{bm}} - 1) + l(m) \dots \dots (12)$$

for $n = 1 : N_p$ and $m = 1 : N$

and evaluate the value $f(n)$ of function for every row $X_k(n, m)$ corresponding to each chromosome and find the maximum $f_{\max} = f(n_b)$ corresponding to $X_k(n_b, :) = x(n_b)$.

2. If $f_{\max} = f(n_b) > f(x_0)$ then set $f_0 = f(n_b)$ and $x_0 = x(n_b)$.

3. Convert the function values into the values of fitness by

$$f_1(n) = \max_{n=1}^{N_b} \{f(n)\} - f(n) \dots \dots \dots (13)$$

which is nonnegative $\square n = 1 : N_p$ and is large for a good chromosome.

4. If $\max_{n=1}^{N_b} \{f_1(n)\} \approx 0$, then terminate this procedure, declaring x_0 as the best. Otherwise, in order to make more chromosomes around the best point $x(n_b)$ in the next generation, use the reproduction rule

$$x(n) = x(n) + \eta * ((f_1(n_b) - f_1(n)) / f_1(n_b)) * (x(n_b) - x(n)) \dots (14)$$

to get a new population X_{k+1} with $X_{k+1}(n, :) = x(n)$ and encode it to reconstruct a new pool array P_{k+1} by Eq. (11).

5. Shuffle the row indices of the pool array for random mating of the chromosomes.

6. With the crossover probability P_c , exchange the tail part starting from some random bit of the numbers in two randomly paired chromosomes (rows of P_{k+1}) with each other's to get a new pool array P_{k+1} .

7. With the mutation probability P_m , reverse a random bit of each number represented by chromosomes (rows of P_{k+1}) to make a new pool array P_{k+1} (18).

The application of genetic algorithm and Newton algorithm to find the Optimal Parameters Estimation of modified Weibull distribution were conducted in the MATLAB programming environment Version 7.9(2009a).

RESULTS

Simulation study illustrate the mathematical finding of Newton method estimation and the number of replication 1000 .the first case takes as parameter values $\alpha = 2, \beta = 1.8$ and $\gamma = 2$,the second case takes as parameter values $\alpha = 2, \beta = 1.8$ and $\gamma = 4$ with sizes 30,50,80 and 100 .The ML function values wear found and the results represented in tables 1, 2.

Table(1): Parameters estimation and maximum likelihood values of two methods
When($\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$).

Sample size	True values	Method	Parameters estimates			ML values	Best method
			$\hat{\alpha}$	$\hat{\beta}$	$\hat{\gamma}$		
30	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$	NA	1.8014	1.8091	1.8981	75.994	
		GA	1.8022	1.8024	1.8985	84.6133	*
50	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$	NA	1.8006	1.8065	1.9883	61.2011	
		GA	2.0050	1.8001	1.8521	121.0831	*
80	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$	NA	1.8093	1.8998	1.9773	112.9811	
		GA	1.9512	1.7420	2.0480	250.3772	*
100	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$	NA	1.8002	1.9577	1.8998	117.9668	
		GA	1.9636	1.9210	1.9260	499.6570	*

Table(2): Parameters estimation and maximum likelihood values of two methods.
When($\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$)

Sample size	True values	Method	Parameters estimates			ML values	Best method
			$\hat{\alpha}$	$\hat{\beta}$	$\hat{\gamma}$		
30	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$	NA	1.8016	1.4710	1.8983	33.3592	
		GA	2.0911	1.9055	2.6440	350.637	*
50	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$	NA	1.8004	1.2251	1.8998	46.4315	
		GA	1.4630	1.8771	3.0211	479.9010	*
80	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$	NA	1.8001	1.8993	1.8997	61.6395	
		GA	1.8770	1.5001	3.9830	503.6610	*
100	$\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$	NA	1.9733	2.4021	3.3320	229.1456	
		GA	1.9830	1.9001	3.8320	612.9901	*

CONCLUSIONS

The GA used in this research for parameter estimation, was developed specifically for modified Weibull distributed. The GA has the attribute of being able to search multiple points simultaneously to obtain an optimal parameter estimate. But existing methods employ techniques that often introduce bias into the initial starting estimate, which is then carried through the iterative procedure to produce a skewed estimate of the optimal parameter value. The multiple search function in the GA reduces the probability of using a biased starting estimate. The results show that the GA maximized ML function more than NA for two cases:

($\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=2$) and ($\alpha=2,\beta=1.8,\gamma=4$) at samples sizes (30,50,80,100). The time of conduction GA to estimate the parameters that maximized ML function of the modified Weibull distribution was smaller than the time of NA. The results also show that the mutation method and crossover method ($P_m=0.8, P_c=0.5$) of reproduction in GA wear

more important for obtaining unbiased estimates and to get optimization solution (parameters estimation) and the number of iterations (200 times) to get on accurate and efficient estimations of parameters.

REFERENCES

1. Sarhan AM., and Zaindin M. (2009). Modified Weibull distribution. Appl. Sci. 11: 123-136.
2. Lawless JF. (2003). Statistical Models and Methods for Lifetime Data, John Wiley and Sons, New York. 8-20.
3. Bain LG. (1974). Analysis for the Linear Failure-Rate Life-Testing Distribution, IT Technom. 16(4): 551-559.
4. Zhang Z. (2007). Huafei Sun and Fengwei Zhong Information geometry of the power inverse Gaussian distribution. Appl. Sci. 9:194-203.
5. Aarset H. (1987). how to identify bathtub hazard rate. IEEE Trans. Rel. 36(1): 106-108.

6. Holland J. (1975). *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. The University of Michigan Press. Ann Arbor.
7. Goldberg DE. (1994). Genetic and Evolutionary Algorithms Come of Age. *Commun. ACM*. 37(3): 113-119.
8. Goldberg DE. (1989). *Genetic Algorithms in Search: Optimization and Machine Learning*. Addison Wesley Publishing Company.
9. Krishnakumar K., and Goldberg DE. (1992). Control System Optimization Using Genetic Algorithms. *J. Guid. Cont Dyn*. 15(3): 735-740.
10. Bergman A., and Feldman M. (1992). Recombination dynamics and the fitness landscape. *Physica D*. 56: 57-67.
11. Varsek A, Urbacic T, and Filipic B. (1993). Genetic Algorithms in Controller Design and Tuning. *IEEE Trans. Sys. Man and Cyber*. 23(5): 1330-1339.
12. Holstien RB. (1971). *Artificial Genetic Adaptation in Computer Control Systems*, PhD Thesis. Department of Computer and Communication Sciences, University of Michigan. Ann Arbor.
13. Koza JR, Rice JP, and Rough J G. (1992). Evolution of food foraging strategies for the Caribbean Anolis lizard using genetic programming. *Adapt. Behav*. 1(2):47-74.
14. Booker L. (1987). Improving search in genetic algorithms. In *Genetic Algorithms Simulated Annealing*, L. Davis (Ed.), Morgan Kaufmann Publishers : 61-73.
15. Wright AH. (1991). Genetic Algorithms for Real Parameter Optimization: In *Foundations of Genetic Algorithms*, J. E. Rawlins (Ed.), Morgan Kaufmann: 205-218.
16. Andrey P. (2005). *Genetic Algorithms for Optimization*. User Manual.
17. Burden RL., and Fairs JD. (2001). *Numerical Analysis*, 7th ed., Brooks/ Cole Thomson, Pacific Grove, CA.
18. Yang C. and Chung A. (2005). *Applied Numerical Methods Using MATLAB*, and Morris Copyright and John Wiley & Sons: 338-343.

Synthesis, characterization and Antibacterial activities of some metal (II) heterocyclic polyamine complexes with 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl) bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) ligand.

Hilal M. Abdullah, Abdul Wahid M. Abdullah & Taghreed H. Al- Noor

Chemistry Dept / College of Education-Ibn -AL-Haithem/ Baghdad university –Iraq

E –mail: drtaghreed@yahoo.com

ABSTRACT

A new heterocyclic polyamine compound as ligand(L) (6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl) bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) has been synthesized through a reaction of urea with compound (Dimethyl3,3'-(1,4phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate) (1) in strong alkaline solution at low temperature which has been prepared from a reaction of 1,4- phenylenediamine with methyl acetoacetate in (1:2) mole ratio.

The prepared ligand was characterized by (FT IR,UV–Vis) , ^1H NMR spectra , and melting point.

The ligand was reacted with some metal ions under reflux in ethanol with

(1 metal :1 ligand) mole ratio which gave complexes of the general formula:

$[\text{M}(\text{L})_2]\text{Cl}_2$, $\text{M} = \text{Mn}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ and $\text{Hg}(\text{II})$, $\text{L} = \text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$.

Products were found to be solid crystalline complexes, which have been characterized through the following techniques:

Molar conductivity .Spectroscopic Method [FTIR and UV-Vis], additional measurement magnetic susceptibility, Chloride content and Program [Chem. office–CS. Chem.–3D pro 2006]was used.

Our research includes studying the bio–activity of the complexes . The magnetic moment coupled with the electronic spectra suggested an octahedral geometry for all the complexes .

Key words: heterocyclic compound , polyamine complexes , Antibacterial activities , spectral studies.

الملخص باللغة العربية

تم تحضير المركب متعدد الامين الغير متجانس الحلقة

(L)= (6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl) bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol)

كليكاند من تفاعل Dimethyl3,3'-(1,4phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate (1) مع اليوريا وبدرجة حرارة منخفضة والنتائج من خلال تفاعل 4-ثنائي امين الفينيل مع مثيل اسيتو اسيتيت بنسبة مولية (1:2), تم تشخيص الليكاند بمطيافيات (FT IR,UV–Vis) , ^1H NMR)

كما تم مفاعلة محلول الليكاند المحضر في الايثانول مع محلول الايونات الفلزية بنفس المذيب بنسبة مولية تحت التصعيد لتعطي معقدات بالصيغة العامة (1 فلز :1 ليكاند)

$[\text{M}(\text{L})_2]\text{Cl}_2$, $\text{M} = \text{Mn}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ and $\text{Hg}(\text{II})$,
 $\text{L} = \text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$

المعقدات المحضرة بلورات صلبة درست من النواحي الآتية: الاستقرار الحرارية، التوصيلية الكهربائية المولارية، الذوبانية، تقدير النسبة المئوية للأيون الفلز في المعقدات بواسطة مطيافية الامتصاص الذري، الدراسات الطيفية: وتضمنت أطيف الأشعة تحت الحمراء، الأشعة فوق البنفسجية– المرئية، الخواص المغناطيسية ومحتوى الكلور) مع استعمال البرنامج . (Chem Office– Cs. chem– 3D pro 2006) في رسم اشكال المعقدات. كما تم دراسة الفعالية البيولوجية للمعقدات ., قيم العزوم المغناطيسية والأطيف الالكترونية لجميع المعقدات دلت على أن جميع المعقدات لها بنية ثماني السطوح.

INTRODUCTION

The transformations of organic compounds belong to one of the following two broad categories: carbon-carbon bond-forming reactions and redox processes. Over the years, remarkable progress has been achieved in design and applications of novel metal-based complexes in oxidation chemistry(1). The oxidation of aromatic amines in human erythrocytes is very useful for producing phenoxazine compounds via the intervention of human oxyhaemoglobin. One of the main objectives has been the elucidation of the oxidation product of the aromatic amines, which has been shown to be a phenoxazine (2,3). Synthetic methodologies for the preparation of aziridines include: (1) nitrene addition to olefins (4), (2) carbene (5) and ylid (6) addition to imines; and (3) cyclization of 1,2-aminoalcohols, 1,2-aminoaldehydes, and 1,2-azidoalcohols (7). Olefin aziridination reactions are typically accomplished via metal-mediated transfer of a nitrene fragment to the olefin (8). These metal-catalyzed reactions originate from Mansuy's study on the Fe-porphyrin and Mn-porphyrin complexes (9).

Among a wide variety of nitrogen heterocycles that have been explored for developing pharmaceutically important molecules, the quinazoline have played an important role in medicinal chemistry and subsequently have emerged as a pharmacophore (10).

In the present work, we have synthesized the 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl)) bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) ligand (L). Then, its new M= Mn (II), Fe (II), Co(II), Ni(II), Cu (II) and Hg(II) complexes were synthesized by reaction of (L) and MCl_2 salts. The complexes were formulated on the basis of analytical, spectral and magnetic data.

MATERIALS AND METHODS

1. Chemical and Instrumentals:

All chemicals used were of reagent grade and were used without further purification. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeCl_2 \cdot 9H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $HgCl_2$ were supplied by (Fluka) chemical. DMF, THF and Ethanol, from Merck (pure) and used without further purification.

b -UV-Vis spectra were recorded on a (Shimadzu UV- 160A) Ultra Violet-Visible Spectrophotometer. IR- spectra were taken on a (Shimadzu, FTI R- 8400S) Fourier Transform Infrared Spectrophotometer ($4000-400$ cm^{-1}) with samples prepared as KBr discs. 1H NMR spectra of intermediate material(1) and ligand(L) using $DMSO-d_6$ solvent were scanned on (EOL Ltd) Model. Delta2-NMR-400MHz, while metal contents of the complexes were determined by atomic absorption(A.A) technique using a Shimadzu AA 680G atomic absorption spectrophotometer.. Conductivities were measured for $10^{-3}M$ of complexes in DMF at $25^\circ C$ using (Philips PW- Digital Conduct meter). Magnetic measurements were recorded on a Bruker BM6 instrument at $298^\circ K$ following the Faraday's method. In addition melting points were obtained using (Stuart Melting Point Apparatus). The proposed molecular structure of the complexes were drawing by using chem. office program, 3DX (2006).

2. Preparation of the ligand(L) and its complexes:

2.1 Preparation of intermediate material(1) (11):

Intermediate material (Dimethyl3,3'-(1,4phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate)

(1) was Prepared according to the general method shown in figure (1).

(90%) The Product was collected by filtration, and recrystallized from benzene.

The melting point of the product found to be ($182^\circ C$)

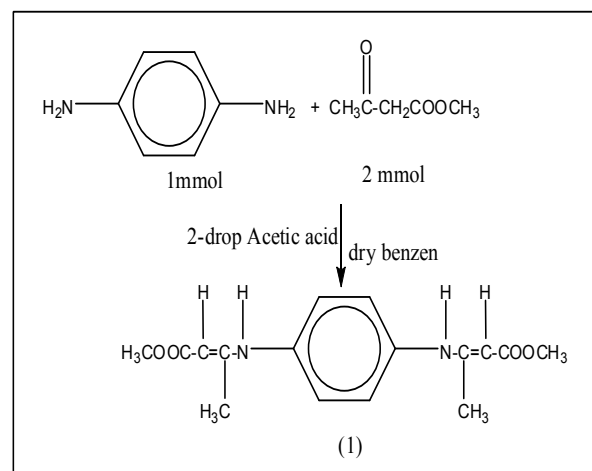


Figure (1):Schematic representation Preparation of the intermediate material(1) Dimethyl3,3'-(1,4phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate

NMR Spectra. ^1H NMR spectra of intermediate material(1) exhibits a singlet at δ $\sigma=10.30\text{ppm}$ due to amino group protons and $\sigma=7.69\text{ppm}$ due to the aromatic ring protons., $\sigma=4.69\text{ppm}$

due to CH_3 attached (carbon atom number (4) and at $\sigma=3.67\text{ppm}$ due to (6H)ester(CH_3).Figure. (2).

Selected IR data (KBr): ν 3255cm^{-1} (NH), ν 2978cm^{-1} aliphatic (CH) , ν 1600cm^{-1} - 1512cm^{-1} C=C(Ar) , ν 1253cm^{-1} (C=O)ester group ,strong band ν 1157cm^{-1} (C-N) ν 1658cm^{-1} olefin(C=C) (13,14). Figure (3).

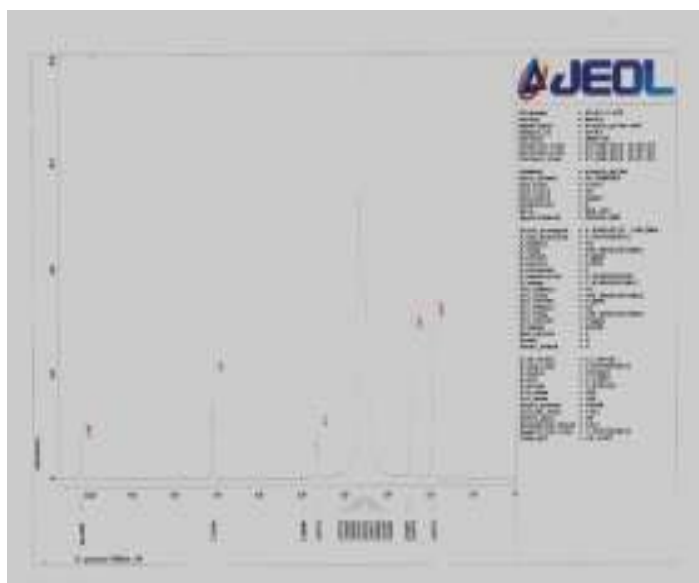


Figure (2). ^1H NMR spectrum of Dimethyl 3,3'-(1,4-phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate (1)

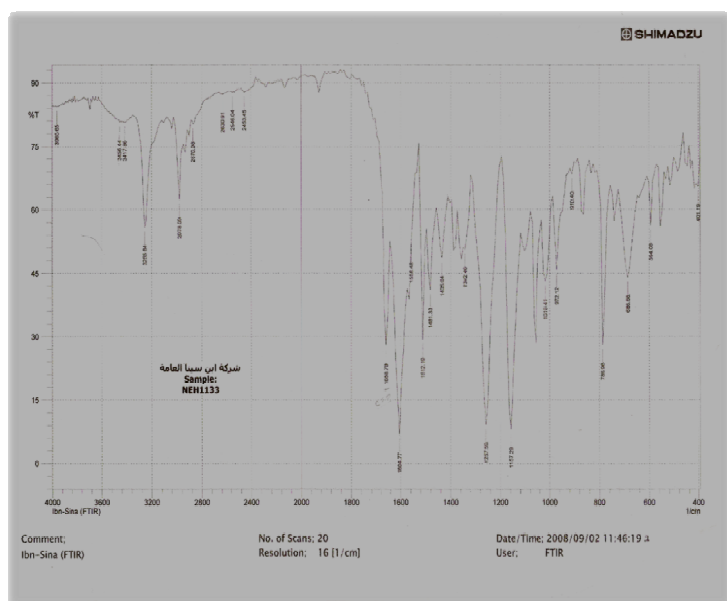


Figure (3) FTIR spectrum of Dimethyl 3,3'-(1,4-phenylenebis(azanediyl))dibut-2-enoate(1)

2. Preparation of ligand (L) (11):

the ligand(L) 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl))bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) was Prepared according to figure (4).

NMR Spectra: ^1H NMR spectra of (L) exhibits a singlet at δ $\sigma=10.30\text{ppm}$ due to (NH_2) group protons , and $\sigma=7.69\text{ppm}$ due to the aromatic ring protons., $\sigma=10.22\text{ppm}$ for proton above nitrogen atom ,and $\sigma=4.65\text{ppm}$. Figure. (5)

(H) for proton(OH)group. Figure.(6).

selected IR data (K Br) ν 3271.2cm^{-1} (OH), ν 3271.2cm^{-1} (N-H), ν 1512cm^{-1} - 1600cm^{-1} (C=C)(Ar)

ν 1161cm^{-1} (C-O-C), ν 1481cm^{-1} (NH_2) , ν 1235cm^{-1} (C-N) , ν 1661cm^{-1} (C=N [11-13]. Figure. (7)

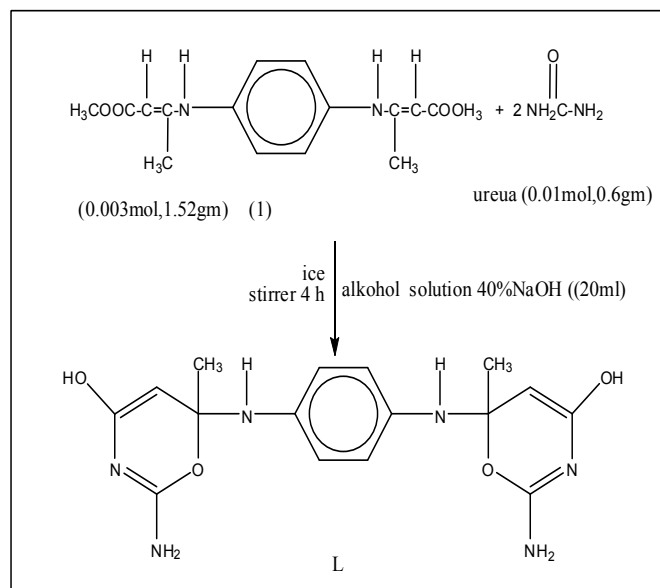


Figure (4): Schematic representation Preparation of the ligand (L) 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediyl))bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol)

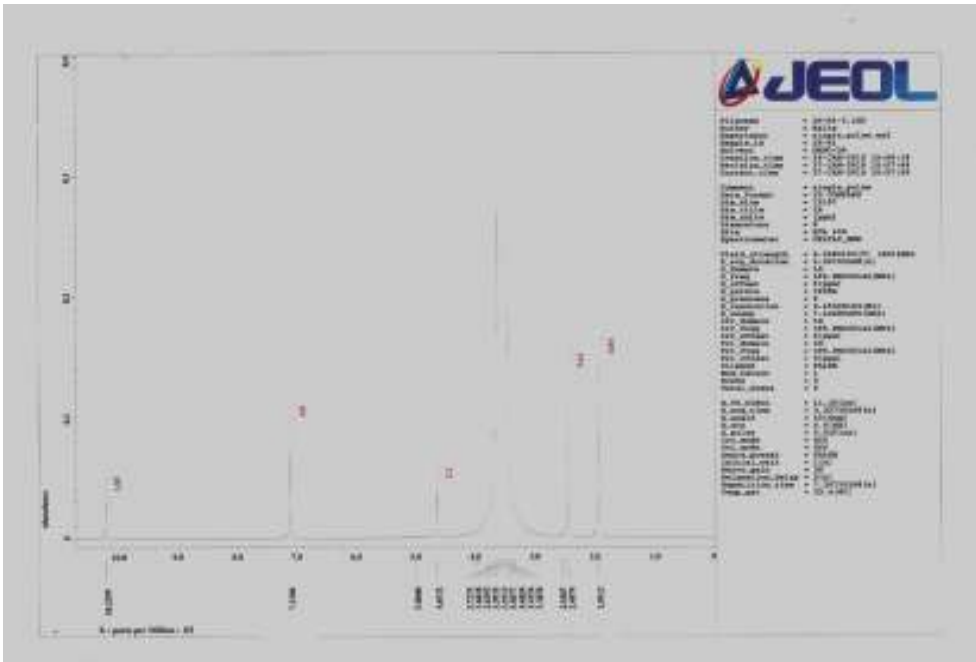


Figure (5) ^1H NMR spectrum of 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediy))bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol)(L)

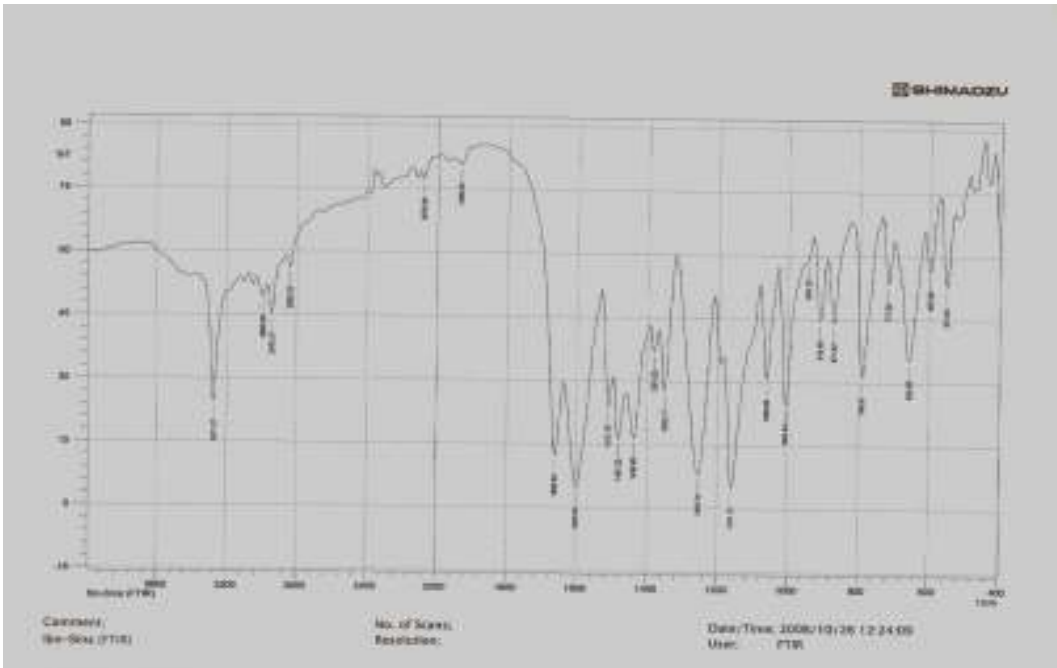


Figure (6) FTIR spectrum of 6,6'-(1,4-phenylenebis(azanediy))bis(2-amino-6-methyl-6H-1,3-oxazin-4-ol) (L)

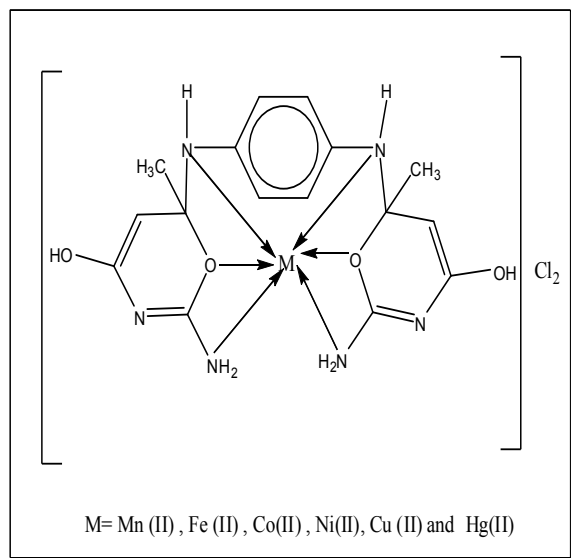


Figure (7): Suggested structure of the octahedral M(II) complex of the ligand, (L).

3 Synthesis of the Complexes:

All complexes were prepared by dissolving 0.39g, 0.098 g, 0.118 g, 0.118 g, and 0.085 g, 0.271g (1mmole) of $\text{FeCl}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and HgCl_2 respectively in (20 ml) THF in a 100 ml round-bottom flask. A solution of (1mmol of L) in (20 ml) ethanol were added simultaneously to a solution of $\text{MCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) in (20 ml) THF in the stoichiometric ratio (1:1)(M:L). The above solution was heated for 60 minute. The mixture was refluxed for 2 hrs. The reaction mixture was then further stirred for 2 hrs at room temperature. The product formed was filtered off, washed with aqueous ethanol (1:1) and dried in air, and analyzed employing standard method. Decomposition temp: $>300^\circ\text{C}$,

4. Preparation of Microorganism suspension (15):

A) The micro-organism suspension was prepared by taking 2–4 colonies from all the studied micro-organism. Then it was inserted in the physiological solution in 0.85% concentration and was compared with Macferr land tube number 0.5 which is equal to 1.5×10^8 cell/mm. It is used for Petri dish preparation for the examination of biological activity against the under studied chemical compound.

B) Inhibition Activity Selection for the complexes in studied Micro-organism.

The agar well diffusion method was used to see the effect of under studied chemical complexes on the micro-organism growth. This is done by using 20–25 ml from Nutrient agar medium for each Petri dish. The dish was incubated in incubator for 24 hours at (37°C) to make sure that no contamination would occur in the dish.

The dish was wetted in 10 milliliters of micro-organism which was prepared as mentioned in the previous paragraph which include 1.5×10^8 cell/mm. Distributed evenly on the Nutrient Agar medium surface by using spreader. Bore was made on the cultured medium surface by using cork borer. The chemical complexes were made as 100 ml per bore and left the central bore containing only DMF. The dishes were left for 1/2 hour in refrigerator at 4°C (12). The dishes were incubated at (37°C) for 24 hours. The biological activity for the complexes was defined by measuring the diameter of the inhibition area surrounding each bore in millimeters.

RESULTS AND DISCUSSION

The Physical properties listed in (Table -1). Some the complexes are colored, non-hygroscopic, and appears as powders with high melting points. They are not soluble in water. All complexes dissolved in dimethyl formamide (DMF) solvent.

The complexes were analyzed for their metal by atomic absorption measurements and chloride contents were determined by standard

methods (16). (Table-1) for all complexes gave approximated values for theoretical values. The observed molar conductance (Table 1) values measured in DMF in 10⁻³M solution lie in the (133-164 $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ range,

indicating their electrolytic nature with (1: 2). (17)

Table (1) The physical properties of the compounds

Compound	Yield %	M. wt	Color	Mp °c (de)	*M.C $\mu\text{S.cm}^{-1}$ in DMF	Metal%	
						theory	Exp
M			Pale –yellow	182	-	-	-
L= C ₁₆ H ₂₀ N ₆ O ₄	75	360.4	Yellow	>300(de)	-	-	-
[MnL]Cl ₂	79	486.21	Pink	(de)200	138	11.30	
[FeL]Cl ₂	85	487.12	Dark red	(de)260	149	11.46	
[CoL]Cl ₂	75	490.21	Dark green	(de)300 >	164	12.02	
[NiL]Cl ₂	85	489.97	Red	(de)300 >	164	11.98	
[CuL]Cl ₂	80	494.82	Green	(de)250	133	12.84	
[HgL]Cl ₂	70	631.86	yellow	(de)260	143	31.75	

M.C = Molar Conductivity, L= C₁₆H₂₀N₆O₄, de = decomposition

Magnetic Susceptibility:

The magnetic moments obtained at room temperature for the complexes of Cu(II), Ni(II), and Co(II) are listed (Table 1). Cu(II) complex exhibits magnetic moment 1.98 B.M. which is less than the normal value¹⁷ (1.84-2.20 B.M.). The lowered magnetic moment value observed for Cu(II) complex under present study is due to distorted octahedral geometry (15). The Co(II) complex shows magnetic moment of 4.86 B.M. the spin free octahedral complex of Co(II) are reported to exhibit magnetic moment in the range of 4.46-5.53 B.M.¹⁹. Hence observed magnetic moment for the Co(II) complex under study indicates it has an octahedral configuration. The Ni(II) complex shows magnetic moment of 2.90 B.M. The magnetic moment of octahedral Ni(II) complex are reported to exhibit magnetic moment in the range of 2.80 – 3.40 B.M.²⁰ including spin orbital coupling contribution from 3A_{2g} and higher 3T_{2g} states. Hence the observed magnetic moment for the Ni(II) complex suggest that it may have octahedral geometry (14,18,19).

Fourier-transform infrared spectra_and mode of coordination :

As shown in Table 2, the IR absorption frequencies were different for free (L) and M(II) complexes with different functional groups. In the IR spectrum of ligand, the characteristic peaks are at 3271-2993 cm^{-1} , which are assigned to $\nu(\text{N-H})$ and $\nu(-\text{NH}_2)$ and 1161 cm^{-1} that is assigned to the $\nu(\text{C-O-C})$ group and shows strong band in the 1661 cm^{-1} due to $(-\text{C}=\text{N}-)$ (17,18). Some new bands of weak intensity observed in the regions around $\nu(684-570) \text{ cm}^{-1}$ and $\nu(489-526) \text{ cm}^{-1}$ may be ascribed to the $\nu(\text{M-N})$ and $\nu(\text{M-O})$ vibrations respectively. It may be noted that these vibration bands are absent in the infrared spectra of ligand (19,20-24).

Electronic spectra :

The UV-Visible Spectroscopy and Magnetic measurements shown in Table (3). The electronic spectral data of the free ligand (L) absorption bands appears at 31250 cm^{-1} due to $n \rightarrow \pi^*$ transition.

The Co(II) complex (dark green) of the electronic absorption bands appears at 34965 cm^{-1} Ligand field, 24271 cm^{-1} , 13054 cm^{-1} , and 10775 cm^{-1} , due to $4T_{1g}(F) \rightarrow 4A_{2g}$, $4T_{1g}(F) \rightarrow 4A_{2g}(P)$ and $4T_{1g}(F) \rightarrow 4A_{2g}(F)$ transition, respectively, in an octahedral environment.

The electronic spectra of complexes 1, show multiple bands, which are assigned to $2E_g \rightarrow 2T_{2g}$ and CT transition characteristics of the d^9 system. Hence, a distorted octahedral geometry was proposed for the copper complexes (23-25).

The electronic spectra of the nickel(II) complexes exhibited three typical absorption bands at 10270, 19055 and 27085 cm^{-1} , corresponding to the transitions $3A_{1g} \rightarrow 3T_{2g}(V_1)$, $3A_{1g} \rightarrow 3T_{1g}(F)(V_2)$, and $3A_{1g} \rightarrow 3E_g(F)(V_3)$, respectively, characteristic for their octahedral environment. Also, the values of the magnetic moment (2.95) may be taken as additional evidence for their octahedral structure (21-24).

On the basis of the above observations, it is tentatively suggested that all of the complexes show an octahedral geometry in which the ligand act as sixdentates. Figure (7) These possibly accommodate themselves around the metal atom in such a way that a stable chelate ring is formed giving in turn, stability to the formed metal complexes. (23-25)

Finally, the diamagnetic Hg (II) show absorption band at 350 nm (28571 cm^{-1}) for the ligand metal charge transfer MLCT as the electronic configuration of these complexes confirmed the absence of any d-d transition and this confirms the presence of an octahedral geometry in the Hg (II) complex.

Biological evaluation:

The newly synthesized metal complexes were screened *in vitro* for their antibacterial activity against bacteria: *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The antibacterial activity results revealed that the complexes shown weak to good activity. Table (4).

Table (2) :- Data from the Infrared Spectra for the Free Lingand and its Metal Complexes (cm^{-1}).

Compound	OH, N-H	NH ₂	C=N	(C=C) arom	C-N	C-O-C	(Ar-CH)	M-N	M-O
M	3255	1481	1658 s	1512-1600	1235	1161m	3022	-	
L	3271	2993	1661 m	1512-1600	1235	1161	-	-	-
[MnL]Cl ₂	3423	2959	1654 s	1560s	1240	1116m		623s	489 m
[FeL]Cl ₂	3383vs	2958	1635 m	1558m	1205w	1112m	-	650m	503 m
[CoL]Cl ₂	3376vs	2964s	1628 s	1560s	1240	1159m	3025	659m	526 m
[NiL]Cl ₂	3442	2958	1629 s	1558m	1205w	1159m	3024	684w	507 s
[CuL]Cl ₂	3356s	2958	1624 s	1579-1624	1276vs	1159m	3032s	570w	495m
[HgL]Cl ₂	3373 s	2956	1647 s	1525-1498	1274	1180m	3035	623 s	515

Table (3): The Electronic Spectra for the Free Ligand and its Complexes in (10^{-3}M) in DMF

Complexes		λ_{nm}	$\nu'(\text{cm}^{-1})$	Assignments	μ_{eff} (BM) (temp. K)	
	(Ligand)	320	31250	$n \rightarrow \pi^*$	-	
1	[MnL]Cl ₂	301	33222	Ligand field	4.90	octahedral
		417	23980	${}^6\text{A}_{1\text{g}} \rightarrow {}^4\text{T}_{2\text{g}}$ (G)		
		827	12091	${}^6\text{A}_{1\text{g}} \rightarrow {}^4\text{T}_{1\text{g}}$ (G)		
2	[FeL]Cl ₂	309	32362	Ligand field	4.90	octahedral
		388	25773	C.T		
		799	12515	${}^5\text{T}_{2\text{g}} \rightarrow {}^5\text{E}_{2\text{g}}$		
3	[CoL]Cl ₂	286	34965	Ligand field	4.86	octahedral
		412	24271	${}^4\text{T}_{1\text{g}}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{A}_{2\text{g}}(\text{P})$		
		766	13054	${}^4\text{T}_{1\text{g}}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{A}_{2\text{g}}(\text{F})$		
		928	10775	$\rightarrow {}^4\text{T}_{1\text{g}}(\text{P})$		
4	[NiL]Cl ₂	369	27085	${}^3\text{A}_{\text{Eg}} \rightarrow {}^3\text{T}_{2\text{g}}$	2.90	octahedral
		524	19055	${}^3\text{A}_{\text{Eg}} \rightarrow {}^3\text{T}_{1\text{g}}(\text{F})$		
		928	10775	${}^3\text{A}_{2\text{g}} \rightarrow {}^3\text{T}_{\text{Eg}}(\text{F})$		
5	[CuL]Cl ₂	263	38008	CT	2.01	distorted octahedral
		600	16666	$2\text{Eg} \rightarrow 2\text{T}_{2\text{g}}$		
6	[HgL]Cl ₂	350	28571	C.T	Diamag	octahedral

C.T= Charge transfer

Table (4): Antimicrobial activity of the ligands and metal complexes Against *Staphylococcus aureus* (+ve) and (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*) (-ve)

Complexes	Inhibition Zone (mm)		
	<i>Salmonella typhi</i> (-ve)	<i>Escherichia coli</i> (-ve)	<i>Staphylococcus aureus</i> (+ve)
DMF	-	-	+
[MnL]Cl ₂	+	+	++
[FeL]Cl ₂	+	+	+
[CoL]Cl ₂	++	+	++
[NiL]Cl ₂	+	++	+
[CuL]Cl ₂	+	++	+++
[HgL]Cl ₂	+	+++	++

(0-6)mm =- (Non active)

(6-9)mm =+ (Slightly active)

(9-12)mm=++ (Moderately active)

(12-17)mm=+++ (Highly active)

REFERENCES

1. Caiazza A, Dalili S, Picard C, Sasaki M, Tung S, and Andrei KY. (2004). New methods for the synthesis of heterocyclic compounds. *Pure Appl. Chem.* 76(3): 603–613.
2. Zaki AB, El-Sheikh MY, Evans J, and El-Safty SE. (2000). Characteristic mechanisms of the homogeneous and heterogeneous oxidation of aromatic amines with transition metal oxalate complexes. *Polyhedron* 19:1317–1328.
3. Torii S. and Tanaka H. (2001). In *Organic Electrochemistry*. 4th ed. Chap. 14, Marcel Dekker, New York.
4. Zhang Y, Zhenjie L, Desai A, and William D W. (2008). Mapping the Active Site in a Chemzyme: Diversity in the N-Substituent in the Catalytic Asymmetric Aziridination of Imines. *Org. Lett.* 10(23):5429-5432.
5. McGarrigle EM, Eddie L, and Myers O. (2007). Chalcogenides as Organocatalysts. *Chem. Rev.* 107: 5841–5883.
6. Scott H K., and Aggarwal VK. (2011). Highly Enantioselective Synthesis of Tertiary Boronic Esters and their Stereospecific Conversion to other Functional Groups and Quaternary Stereocenters. *Chem. Eur. J.* 17: 13124-13132.
7. Padwa A. and Murphree SS. (2000). In *Progress in Heterocyclic Chemistry*. 14. Chap. 4, Elsevier Science, Oxford.
8. David AE, Scott JM, and Lectka T. (1999). Chiral Bis(oxazoline)copper(II) Complexes as Lewis Acid Catalysts for the Enantioselective Diels-Alder Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 7559-7573.
9. Nishimura M, Minakata S, Thongchant S, Ilhyong R, and Komatsu M. (2000). Selective aziridination of conjugated dienes with a nitridomanganese complex: a new route to alkenylaziridines, *Tetrahed. Lett.* 41: 7089-7092.
10. Siddappa K, Reddy T, Mallikarjun K and Reddy CV. (2008). Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies of 3-[(2-Hydroxyquinolin-3-ylmethylene)-amino]-2-phenyl-3H-quinazolin-4-one and its Metal(II) Complexes. *J. Chem.* 5(1): 155-162.
11. Abdullah HM. (2011). Synthesis And Characterization of new Derivatives of Dimethyl 3,3/[1,4-Phenylene Bis (Azanediyl)] Dibut-2-Enoate and study Their Biological Activity. *J. college basic edu.* 17: 882-888.
12. Pavia DL., Lampman GM, and Kriz GS. (2001). *Introduction to Spectroscopy*. 3rd ed. Thomson Learning, Inc. Victoria.
13. Nakamoto K. (1986). *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley and Sons. New York, USA.
14. Mashaly MM., Ismail TM., El-Maraghy SB., and Habib HA. (2004). Heteronuclear complexes of oxorhenium(V) with Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II) and UO₂(VI) and their biological activities. *J. Coordin. Chem.* 57(13): 1099–1123.
15. Melnick J. and Delbrgs A. (2007). *Medical Microbiology*. McGraw Hill-USA.
16. Vogel A I. (1962). *A Text Book Quantitative Inorganic Analysis*. 3rd Ed. ELBS and Langman's Green and Co. Ltd., London.
17. Geary WJ. (1971). The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* 7(1): 81–122.
18. Silverstein RM., and Webster FX. (1998). *Spectrometric Identification of org. Compds.*, John Wiley, New York. 6: 217-248.
19. Shriver DW., and Atkins PW. (2006). *Inorganic Chemistry*. 4th Ed, Freeman, New York.
20. Socrates G. (1980). *Infrared Characteristic Group Frequencies*. 1st Ed J. Wiley and Sons. New York.: 87.
21. Cotton F A and Wilkinson G (1967). *Advanced Inorganic Chemistry*. 2nd Ed. Wiley Eastern, New York.
22. Sarika V., Sarita S. and Poonam R. (2012). Synthesis and spectroscopic studies of mixed ligand complexes of transition and inner transition metals with a substituted benzimidazole derivative and RNA bases. *J. Chem. Pharmaceut. Res.* 4(1): 693-699.
23. Al-Noor TH, Abdul-Hadi T., and Daham BM. (2012). Synthesis and Characterization of metal complexes with ligands containing a hetero (N) atom and (hydroxyl or carboxyl) group. *Int. J. Sci. Technol.* 7(2): 22-32.
24. Lever ABP. (1984). *Inorganic Spectroscopy*. 2nd (Elsevier Science Publisher, Amsterdam).
25. Karipcin F and Kabalcilar E. (2007). Spectroscopic and Thermal Studies on Solid complexes of 4-(2-pyridylazo) resorcinol with Some Transition Metals. *Acta. Chim. Slov.* 54:242-247.

The effect of styrene butadiene styrene on the properties of hot mixture asphalt.

Adil N. Abid (1), Zainab A. Alqaisi (2) & Khalid A. Mohammed (3)

College of engineering / Al- Anbar University (1), (3) Al- Mustansiriya University (2)- Iraq

ABSTRACT

The main objective of this research study is to investigate the potential use of styrene butadiene styrene(SBS) as modifiers in hot mix asphalt paving mixtures. The research uses five percentages of polymer modified asphalt (SBS) content (0%, 1%, 3%, 5%, and 7%) by weight of Baiji bitumen (40/50) penetration grade were used . The polymer modified mixes were designed in accordance with Marshall Test. Optimum asphalt content was obtained by Marshall method and used in all the modified mixes. The results indicated that the use of polymer modification(SBS) improved the properties of HMA through the increase of Marshall Stiffness, indirect tensile strength and decrease of temperature susceptibility of mixtures. It also increased the flexibility properties of the mixtures and this appeared from reducing the permeate deformation as compared with that of unmodified mixtures, The results showed that the percentage of 3% SBS was the optimum percent to be used for the modification of asphalt cement properties to enhance the pavement performance with the minimum modification cost .

الملخص باللغة العربية

إن الهدف الرئيسي من هذه الدراسة لمعرفة إمكانية استخدام الستايرين بيوتادين ستايرين في تحسين الخلطات الإسفلتية الحارة . تم مزج الستايرين بيوتادين ستايرين بنسب مختلفة (صفر ، 1 ، 3 ، 5 ، 7) كنسبه مئوية من المحتوى الإسفلتي لتحضير النماذج الإسفلتية الجديدة ، ثم استخدمت طريقة المارشال في حساب نسبة الإسفلت المثالية للخلطة التصميمية الغير معاملة واستخدام هذه النسبة في تحضير الخلطات المطورة بمادة الستايرين بيوتادين ستايرين التي اجري عليها قياسات فحص المارشال وفحص مقاومة الشد الغير مباشرة وفحص الزحف، أظهرت نتائج الفحوصات تميز للخلطة الإسفلتية الكونكريتية المعاملة بالستايرين بيوتادين ستايرين حيث لوحظ زيادة في قيم ثباتية مارشال وتحسين خصائصه الأخرى ، بالإضافة إلى زيادة مقاومة الشد الغير مباشر وتكون أقل تأثيرا بالحرارة وتشير إلى انخفاض التشوهات الحاصلة في الطرق. النتائج تشير إلى أن نسبة 3% من الستايرين بيوتادين ستايرين هي الأكثر ملائمة لتحسين خواص الإسفلت والخلطات الإسفلتية بأقل كلفة.

INTRODUCTION

Iraqi roads structure have deteriorated rapidly due to increase in traffic volume, the low quality of pavement materials, hot and cold climatic, axle loading and tire pressure and insufficient degree of maintenance. To minimize the deterioration and enable the pavement to accommodate increasing traffic intensity and axle loads in varying climatic environments, high quality asphalt cement is required (1). The use of polymer modified binder in asphalt paving can be utilized as one of a solution to the pavement deterioration problem (2). Polymer modified asphalt binder (PMAB) are becoming more wide speared in road building to meet today's high traffic loading. Many efforts are directed towards modifying the asphalt or paving mixture properties to get superior performance and serviceability under local conditions and to economize the construction of pavement (3). The purposes of modification is also increase the viscosity at the high temperature, increase the flexibility and elasticity of binders at the low temperature, improve the adhesion to aggregates and many improve high thermo stability and aging resistance (4). In recent years, different kinds of polymers have been used to modify properties of asphalt mixtures, among them styrene butadiene styrene (SBS) is one of the most widely used which can extremely improve the mechanical properties of asphalt mixtures (5). SBS accounts for at least 65% of the global polymer modified asphalt binder market (6). The SBS had been used as a PMAB in this study.

Asphalt additive can be defined as a material added to the asphalt to improve the properties and performance of bitumen. An ideal modification of an asphalt binder should be able to rigidity, elasticity, brittleness, durability decrease the temperature susceptibility, control age hardening and must be compatible with any type of bitumen (7). Numerous researchers are working in this area to evolve the most suitable additive that can improve overall performance of bitumen (8,9).

Styrene-butadiene-styrene (SBS) is the most widely used polymer to modify asphalts (10). The styrene domains constitute the hard blocks and affect the high temperature properties of asphalt. The butadiene soft blocks are very flexible and affect the low temperature properties.

These inherent properties of rigidity and flexibility of asphalt because there is a semblance of rigid and flexible structure in the asphalt regardless of the temperature (11). SBS increases the viscosity of the asphalt by interaction which related to the size of the molecules and their molecular design. This statement was supported by Vonk and Valkering (1990) findings which obtained the viscosity of

modified asphalt increase with increasing SBS contents. Besides, different SBS concentrations (2.5, 5 and 7.5%) in three asphalt grades (60, 100 and 200 PEN) reveal the increase in softening point temperature but linearly decrease in penetration with increasing SBS concentration. Gordon (8) indicates when the polymer concentration and bitumen polymer compatibility allow a continuous polymer network to be established, modification is provided by a highly elastic network which increases the viscosity, stiffness and elastic response of the PMB, particularly at high service temperatures. However, ageing of the SBS PMBs tends to result in a reduction of the molecular size of the SBS copolymer with a decrease in the elastic response of the modified road bitumen(8). Awanti & others. found that the softening point and viscosity values are higher by for polymer-modified binder-SBS than those of asphalt cement, whereas the penetration value of the PMA SBS is lower than that of the asphalt cement(1). The Marshall stability and flow values of polymer modified asphalt concrete polymer modified asphalt mixture are higher than those of asphalt concrete (AC) mix at optimum binder content, the static indirect tensile strength values for PMAC mixtures are higher than those of AC mixtures at different temperatures, (1). Burak and Giray presented a laboratory study of modified bitumen containing styrene butadiene-styrene (SBS) copolymer (12). Polymer modified bitumen PMA samples have been produced by mixing a 50/70 penetration grade unmodified (base) bitumen with linear SBS copolymer at five different polymer contents. The effect of polymer addition on the short and long term aging characteristics of HMA have been evaluated by indirect tensile strength (ITS) test. The results indicated that polymer modification improved the conventional properties (penetration, softening point, etc.) and the mechanical properties (Marshall, ITS, etc.) of the base bitumen(12). This study was focus to identify the effect of polymer modified asphalt binder styrene butadiene styrene on the hot asphalt mixture:

- resistance to plastic flow (Marshall Stiffness)
- Permanent Deformation (Diametric tensile creep test)
- Indirect tensile strength and temperature susceptibility.

MATERIALS AND METHODS

1. Asphalt Cement:

One binder of asphalt cement was tested, from Baiji Refinery with a grade of (40-50) penetration. The physical properties of this type are illustrated in table (1).

Table (1): Physical Properties of Asphalt Cement.

Test	Unit	Baiji (40-50)
Penetration : 25°C	0.1 mm	46
Ductility :25°C	Centimeter	+100
Softening Point	°C	51.5
Flash Point	°C	285
Specific Gravity	---	1.035
Kinematic Viscosity	cst.	410

2. Additives:

Styrene butadiene styrene was used a polymer modified asphalt binder with specific gravity 0.94 in this research. Styrene butadiene styrene was added to binder at different percent (1%, 2%, 3% and 5%). The modified asphalts were prepared using a high shear mixer. Firstly, asphalt was heated until it became a fluid in an iron container, then upon reaching about 180 °C, a weighed amount of polymer was slowly added to the asphalt with different percent, and then the blend was sheared, the shearing temperature is 180 °C, the shearing rate is (500r/min), subsequently the blend was stirred by a mechanical stirrer at 180 °C for 1.5 hour to produce homogeneous mixtures. After that, the preparation has been finished.

3. Aggregate:

Nibae aggregate was utilized for producing the asphalt mixture in this study. With 100% crushed particles, brownish in color, quartzite mineral composition and angular faces. The physical properties of AL-Nibae aggregate are presented in Table (2). The aggregate gradation confirms to the Iraqi Standard specifications for Road and Bridge for 19 mm (3/4 inch) maximum size for surface course type III/A (SORB\R9, 2003). Figure (1) shows the aggregate gradation used in this research.

Table (2): Physical Properties of Al-Nibae Aggregate

Property	Coarse aggregate	Fine aggregate	specification
Bulk specific gravity	2.60	2.637	(ASTMC-127) And (ASTMC-128)
Apparent specific gravity	2.626	2.672	
%Water absorption	0.44	0.5	
Wear(Loss Angeles)	15.67	-	(ASTC-131)

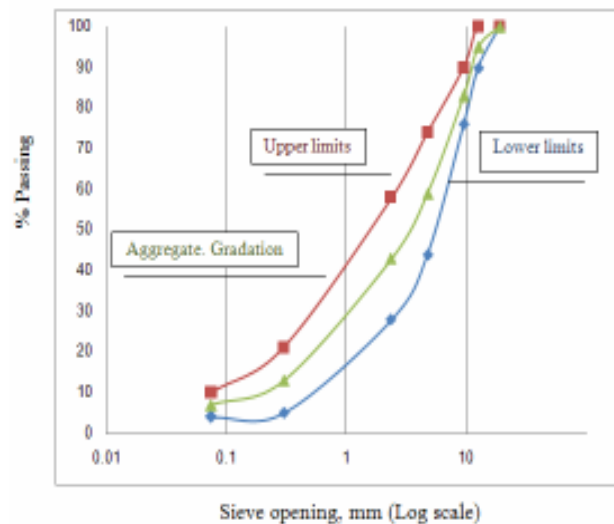


Figure (1): Specification limits and Selected Gradation of Aggregate Maximum size (19mm).

4. Mineral Filler:

The Sulphate resisting cement from Al-Qaem cement factory with specific gravity 3.14 was used as mineral filler in this study.

5. Hot Asphalt Concrete Mixture Tests:

To study the effect of PMAB (SBS) properties on the performance of HMA mixture, several tests were made to investigate how these properties would affect.

5.1. Preparation of Marshall Mixture:

The aggregate are first dried to constant weight at (110 °C), separated into the desired sizes and recombined with mineral filler in order to meet the required gradation for each specimen. The aggregate are then heated to temperature off (155 °C) before mixing with asphalt cement. The asphalt cement is heated to the temperature ,

which produce a kinematic viscosity of (170±20) centistokes up to (163 °C) as an upper limit. Then, asphalt cement is weighed to desired amount and added to the heated aggregates, and mixed thoroughly until all aggregate particles are coated with asphalt.

5.2. Resistance to Plastic Flow (Marshall Method):

This method covers the measurement of the resistance to plastic flow of cylindrical specimens of bituminous paving mixture loaded on the lateral surface by means of the Marshall apparatus according to (ASTM D-1559). The test specimens were compacted using one comparative effort, which is (75) blows/end. The bulk specific gravity density (ASTM D-2726), theoretical (maximum) specific gravity (ASTM D-2041) and percent air voids (ASTM D-3203) are determined for each specimen. Marshall stability and flow test are performed on each specimen according to the method described by (ASTM D-1559). The cylindrical specimen (2.5" (62.5 mm) height * 4" (101.6 mm) diameter) is compressed on lateral surface with a constant rate of (50.8 mm/min) until the maximum load is reached. The maximum load resistance and corresponding flow values are recorded. Three specimens for each combination are prepared and the average results are reported.

5.3. Indirect Tensile Strength:

The indirect tensile strength of the sample is calculated from the maximum load to failure. The specimens prepared in the same method described for Marshall method are also tested for indirect tensile strength according to (ASTM D-4123). The prepared specimens were cooled at temperature room for 24 hours, immersed in water bath at three different test temperatures (25°C, 40°C and 60 °C) for 30 minutes, then tested for indirect tensile strength at rate of 50.8 mm/min. (2 in./min) using Marshall compression machine until recording.

The ITS values were computed as follows:

$$ITS = 2000 P / \pi t D \quad \dots\dots\dots (3.8)$$

Where:

ITS = Indirect tensile strength, kPa

P = is the peak value of the applied vertical load (N),

t = is the mean thickness of the test specimen (mm) and

D = is the specimen diameter (mm).

The temperature susceptibility T.S. was calculated as:

$$T.S = (St_i - St_j) / (J - I) \quad \dots\dots\dots (3.9)$$

Where: St_i = tensile strength at (I °C)

St_j = tensile strength at (j °C)

5.4 Resistance to Permanent Deformation (Creep Test):

The diametric indirect tensile creep test has been used for testing asphalt mixture to determine the permanent deformation (rutting) potential and the stiffness of asphalt mixture by measuring the strain – time value.

The specimen was placed in water at test temperature of (25°C, 40°C) for 30 minutes before the test conducted. The strain (deformation) was recorded at a strain time of loading (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, and 60 minutes) and then the load was removed (unloading condition) and the recovered strain was recorded for the same periods of an hour. The test was conducted while the specimen was submerged in water bath maintained at the desired temperature (25°C, 40°C) with a static constant stress of (14.5 psi = 0.1 MPa). The vertical strain calculated from the measured deformation is determined as follows:-

$$\epsilon = \Delta H / H_o \text{ mm/mm}$$

where:-

ΔH = the total measured vertical deformation at a certain loading time,

H_o = the original diameter of the specimen.

The stiffness modulus of the mixture is calculated by:-

$$(S \text{ creep})_t = \sigma / \epsilon \text{ N/mm}^2$$

σ = stress of test (14.5 psi (0.1 Mpa))

RESULTS AND DISCUSSION

The Effect of SBS on Marshall Parameters:

Marshall Test was conducted for studying the properties of asphalt concrete mixtures. The polymer modified asphalt SBS was added to the optimum AC(5.1)% of mixture with different percents (0%, 1%, 3%, 5%, 7%) by weight of asphalt cement. Figure (2) shows the effect of SBS PMAB added to asphalt on the properties of asphalt concrete mixture. The results indicate that the increase of SBS content has a significant effect on HMA parameter by increasing bulk density and Marshall Stiffness and decreasing air voids and flow. Economically, it is preferable to use 3% of SBS, table (3) for its clear impact to improve the Marshall properties by increasing bulk density, stability and Marshall Stiffness and decrease flow with lower percent air void and it's suitability to the Iraqi Standard specifications (13).

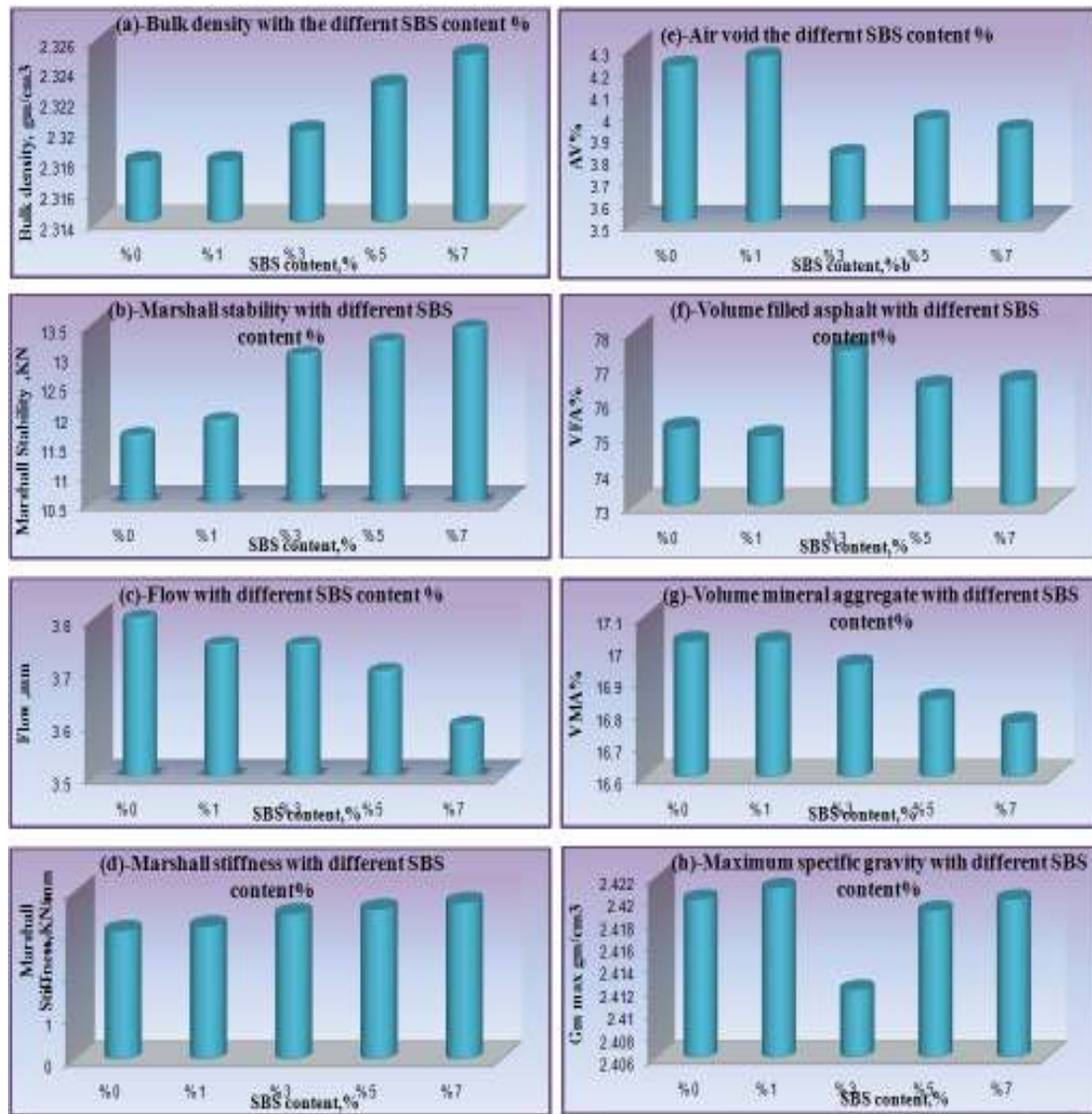


Figure (2): the effect of SBS content percentage of asphalt on the properties of asphalt concrete mixture.

Table(3): Marshall Method Test Results for Modified Asphalt Mixture

SBS %	Bulk Density gm/cm ³	Gm Max gm/cm ³	AV %	VMA %	VFA %	Stability KN	Flow mm	Stiffness KN/mm
0%	2.318	2.420	4.21	17.021	75.23	11.64	3.8	3.069
1%	2.318	2.421	4.25	17.021	75.00	11.89	3.75	3.171
3%	2.320	2.412	3.81	16.949	77.49	13.00	3.75	3.467
5%	2.323	2.419	3.96	16.842	76.43	13.22	3.7	3.573
7%	2.325	2.420	3.92	16.770	76.59	13.45	3.6	3.736

The effect of SBS on Indirect Tensile Strength Test:

The indirect tensile strength test (ITS) has been used to evaluate the mixture resistance to low temperature cracking. The ITS gives an indication about the strength of mixture due to adhesion between its components. Figure (3)

shows the effect of SBS PMAB added to asphalt on the properties of asphalt concrete mixture on the ITS values at different test temperatures (25°C and 60°C), the increase in SBS content has a great impact in increasing (ITS) values, due to increase of asphalt stiffness, which has a significant effect on the adhesion aggregate particles and finally the cohesion of the mixture.

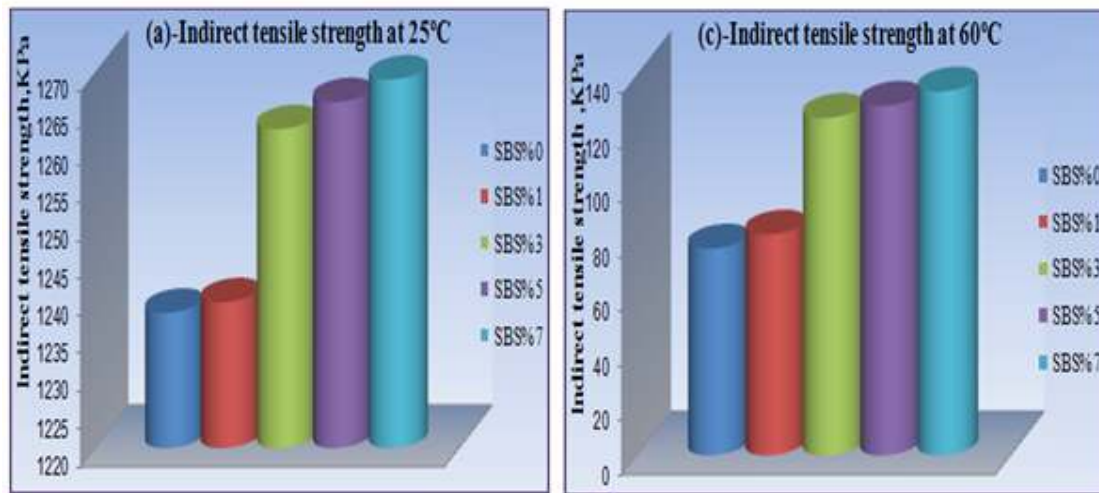


Figure (3): indirect tensile strengths of mixtures are tested at different temperatures (25°C and 60°C).

The use of SBS has a significant effect on TS values, figure (4) shows how the increase in SBS content decrease the TS of HMA. TS decrease with increase SBS content especially between (3%-7%).

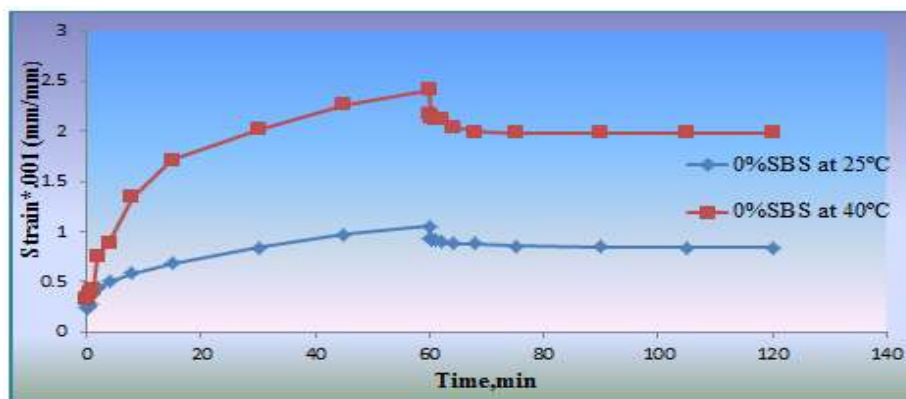
Resistance to Permanent Deformation (Creep Test):

Diametrical indirect tensile creep test has been used to evaluate the effect of SBS content on the permanent deformation tendency of HMA mixtures using different percent of SBS content of asphalt at two test temperatures

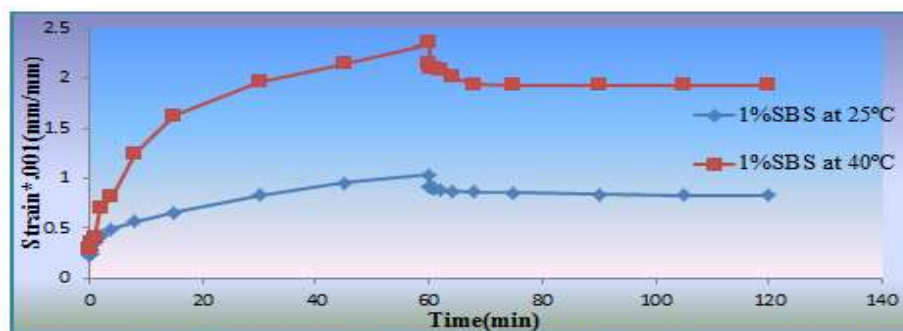
25oC and 40°C. Figure (5) shows the strain time relationship for asphalt mixtures with different SBS contents and at different test temperatures. Results indicate that immediate strain increases with temperature increase. In addition, results show that permanent strain increases with temperature increase. Also they show that the strain decrease with increase SBS content at the same temperature.



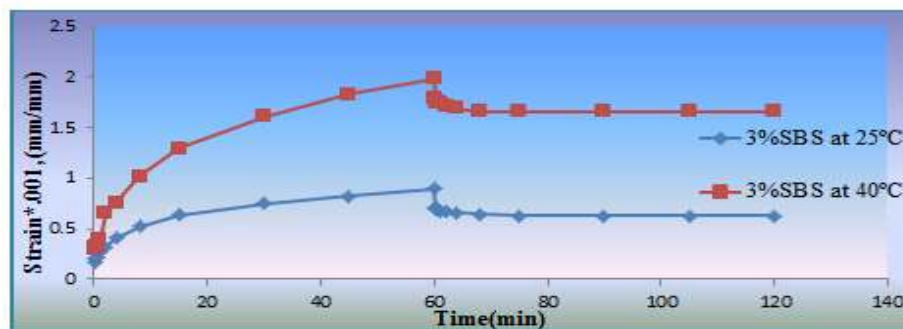
Figure (4): The effect of SBS content percent of asphalt on the TS values.



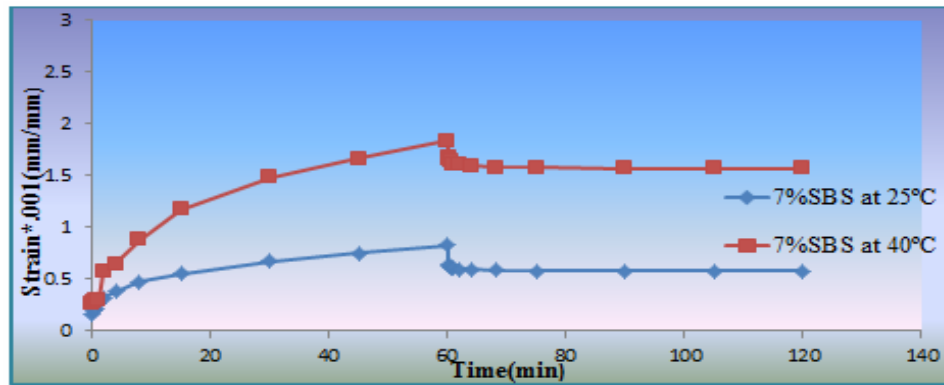
Figure(5) a-Effect of temperature variance on diametric creep test results of 0% SBS PMA mix.



Figure(5) b-Effect of temperature variance on diametric creep test results of 1% SBS PMA mix.



Figure(5) c- Effect of temperature variance on diametric creep test results of 3% SBS PMA mix.



Figure(5) e-Effect of temperature variance on diametric creep test results of 7% SBS PMA mix.

Effect of SBS Content on Diametric Creep Test Parameters for Asphalt Concrete Mixture:

Initial modulus and permanent stain variation with respect to SBS content for diametric creep test are shown in figures (6). At 25°C test

temperature, The stiffness modulus increase up to 5% SBS then it decreases with the increase of SBS content while permanent deformation decrease with increasing SBS. At 40°C, the stiffness modulus increases with SBS increase while permanent deformation decrease down to 5% SBS and then it increases. Figure (7).

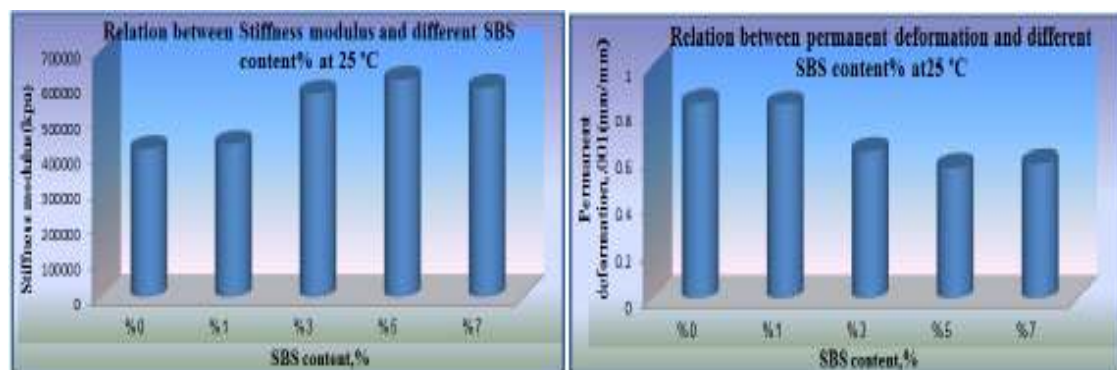


Figure (6): Effect of SBS content on diametric creep test parameter at (25°C) for asphalt mixture.

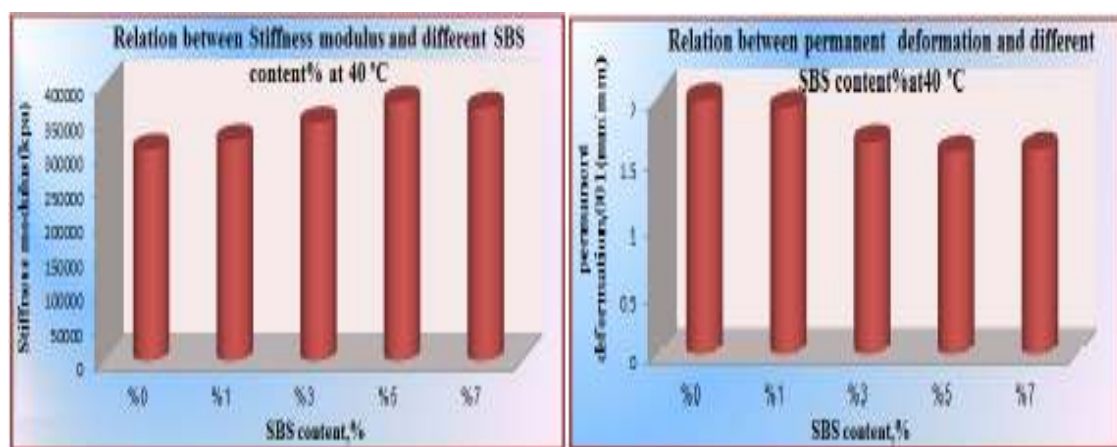


Figure (7): Effect of SBS content on diametric creep test parameter at (40°C) for asphalt mixture.

CONCLUSION

The SBS based additive improves the properties of hot asphalt mixture the improvement of these properties can be summarized as:

1-The results indicate that with the increase of SBS content, the bulk density increases and the air voids decreases. A higher stability, stiffness and VFA, lower Flow and VMA with this decrease. The lower percent of air void with SBS content 3% for asphalt concrete mixture is the optimum usage of SBS %content of asphalt. It Significantly improves the Marshall properties test such as a high stiffness values due to an acceptable stability and flow.

2-The percent of added SBS on asphalt has a great effect on the cohesion of the mixture which can be conducted by indirect tensile strength(ITS) test, results show the increase of ITS with the increase of SBS content% of asphalt.

3-A variation in temperature has a significant effect on the ITS values of the SBS PMAB which mixture shows a less effectiveness with temperature variation than to the base asphalt.

4-The Creep test gives an indication about the rut potential in pavement surface due to the increase in temperature. The rut depth (permanent deformation) and stiffness modulus varies according to the percent of PMAB SBS, the permanent deformation decreases with increasing SBS content until 5% SBS and then increases while the stiffness modulus increase up to 5% SBS then it decreases.

5-The percent of 3% SBS was the optimum percent to used for modifying asphalt cement properties to achieve the pavement performance and to minimize the modification cost.

RECOMMENDATION

Study the effect of modified asphalt mixtures SBS on the moisture susceptibility by ITS ratio and IRS.

REFERENCES

1. Awanti SS., Amarnath MS, And. Veeraragavan A.(2008). Laboratory Evaluation of SBS Modified Bituminous Paving Mix. J. Mat. Civil. Eng. 20(4):327-330.
2. Firoozifar S H, Alamdary Y A, and Farzaneh O .(2010). Investigation of Novel Methods to Improve the Storage Stability and Low Temperature Susceptivity of Polyethylene Modified Bitumen. Petrol. & Coal. 52(2):123-128.
3. Maccarrone S, Glynn H., and Knanaseelan G. (1995). Properties of Modified Binder and Relationship to Mix and Pavement Performance. Journal of the Association of Asphalt Paving Technol. 64:209-240.
4. Ertman L HJ, Wohlk CJ, And Hall-Andersen.B. (1988). Modified Bitumen. Proceeding of The Australian Road Research Board. 14(8) : 222-229.
5. Mokhtari A. , Behbahani H. and GhorteKolai A R (2011). .Effect of Commercial Wax and Typical Additives on Moisture Susceptibility of SMA Mixtures. J. appl. sci. 11(22):3708-3716.
6. Andre AA, Molenaar M FC., Van De V, Marco P, Ning L and Erik J S. (2011). SBS Polymer Modified Base Course Mixtures for Heavy Duty Pavements. Australian Asphalt Pavement Association:1-16.
7. Western Research Institute(2008) Texas A&M University, University of Wisconsin-Madison, University of Nevada-Reno, Advanced Asphalt Technologies. Asphalt Research Consortium. Research Plan for Year 2 of Federal Highway, 129-130.
8. Gordon DA. (2003). Rheological Properties of Styrene Butadiene Styrene Polymer Modified Road Bitumen's. Fuel. 82: 1709-1719.
9. LuXiaohu I U .(2001). Modification of Road Bitumen's with Thermoplastic Polymers. Polym. Test. 20: 77-86.
10. Santos M RF, Camargo M F, and Mathias L FL .(2008). Rheological Evaluation of Polymer Modified Asphalt Binders. Mat. Res. 11(3): 381-386.
11. Airey GD.(2004). Styrene Butadiene Styrene Polymer Modification of Road Bitumen's. J. Mat. Sci. 39: 951-959.
12. Burak S and Giray I.(2008). Analysis of Styrene Butadiene Styrene Polymer Modified Bitumen Using Fluorescent Microscopy and Conventional Test Methods. J. Hazard. Mat. 150:424-432.
13. Iraqi Standard Specifications for Roads and Bridges (2003). Section R9, Revised edition.
14. ASTM(1989). Annual Book of ASTM Standard, Section4:1989.

Correlation of some chronic complications of β -Thalassaemia major with Serum Ferritin: A study of hundred Iraqi patients.

Tareq A. Saleh (1), Batool A.G. Yassin (2) & Ali M. Jawad (3)

Ibn Sena Teaching Hospital, Haematology Unit (1) Dept. of Community Medicine/ College of Medicine/ Baghdad University – Iraq (2) (3)

E-mail: yassinbag@yahoo.com

ABSTRACT

β -thalassemia major patients are prone to various complications during their life as part of their disease and its treatment.

A cross sectional study was conducted to study some of the chronic complications of β -thalassemia major and their correlation with the level of serum ferritin. A convenient sample of 100 homozygous β -thalassemic patients attending Thalassaemia center in Ibn-Albaladi Pediatric Hospital in Baghdad, from February to December 2010 were evaluated by history, clinical examination and laboratory investigations and classified according to their serum ferritin level into two groups. Liver enzymes abnormalities, low serum calcium, fasting blood sugar and cardiac dysfunction were compared for the two groups

Median age of patients was 16 years, male to female ratio 0.7:1. Cardiac abnormalities were diagnosed in 12% of patients, more among patients with high S. ferritin, elevated serum transaminases enzymes were seen in 19% for SGOT, 6% for SGPT and in 57.5% for serum alkaline phosphatase. Six patients had high fasting blood sugar, hepatitis C antibodies were positive in 54%, hepatomegaly was found in 91%. High S. ferritin was positively correlated with serum transaminases level and negatively with serum calcium.

Most patients have S. ferritin $\geq 2500 \mu\text{g/l}$ which was correlated with Liver and cardiac dysfunctions. Infection with Hepatitis C virus was common.

Key words: β -Thalassaemia major, Serum Ferritin, Complications

الملخص باللغة العربية

مرضى التلاسيميا الكبرى نوع β عرضة للإصابة بمضاعفات مختلفة خلال حياتهم نتيجة المرض وعلاجه. أجريت دراسة مقطعية لدراسة بعض المضاعفات المزمنة لمرضى التلاسيميا الكبرى نوع β . شملت الدراسة عينة مكونة من مائة مريض مصابين بالتلاسيميا الكبرى نوع β متماثلة اللواقح اللذين راجعوا مركز التلاسيميا في مستشفى ابن البلدي للأطفال في بغداد للفترة من شباط الى كانون الاول 2010 حيث تم تقييمهم من ناحية التاريخ المرضي والفحص السريري وإجراء بعض الفحوصات المختبرية وتقسيمهم الى مجموعتين حسب مستوى الفيريتين في مصل الدم وتم مقارنة مستوى انزيمات الكبد ومستوى الكالسيوم في مصل الدم ومستوى الكلوكوز في الدم والتغيرات في عمل القلب بين هاتين المجموعتين.

كان متوسط عمر المرضى 16 عاماً، نسبة الذكور الى الاناث 0.7:1 وتم تشخيص خلل عمل القلب في 12% من المرضى وكان أكثر بين المرضى اللذين لديهم مستوى عال من الفيريتين في مصل الدم. شوهد ارتفاع مستوى انزيم الكبد SGOT في 19% و انزيم SGPT في 6% وانزيم الفوسفاتيز القلوي في 57.5%. كما لوحظ ان 6 من المرضى لديهم ارتفاع في مستوى الكلوكوز الصائم في الدم. و وجد ان 54% من المرضى لديهم اجسام مستضادة لفايروس التهاب الكبد نوع C و 91% من المرضى لديهم تضخم الكبد.

وجد ان ارتفاع مستوى الفيريتين في مصل الدم يرتبط ايجابيا بمستوى انزيمات الكبد في مصل الدم وعكسيا مع مستوى الكالسيوم في مصل الدم.

اظهرت الدراسة ان مستوى الفيريتين في مصل الدم كان عند معظم المرضى ≤ 2500 مايكروغرام /لتر ويرتبط مع خلل في عمل الكبد والقلب. كما ان العدوى بفايروس الكبد نوع C كان شائعاً بين المرضى.

INTRODUCTION

β -thalassemia is a group of recessively inherited disorders of hemoglobin synthesis characterized by reduced synthesis of the β -globin chain caused by a single gene disorder. The homozygous state results in severe anemia which needs regular blood transfusion (1). About 3% of the world's population, (150 million people), carry β -thalassemia genes, it affects a significant segment of the population in certain areas of the world High frequency in Africa, India, Southeast Asia, the Mediterranean area and in Europe they are particularly prevalent in inhabitants of Italy and Greece (2).

β -thalassemia syndromes are based on clinical severity. The most severe form is β -thalassemia major and is characterized by transfusion-dependent anemia. Patients with β -thalassaemia major have both ineffective erythropoiesis and a considerably shortened red cell life span (20 days or less), leading to severe anaemia. The disease usually presents in the first year of life, from the age of 3 months onwards (3).

Regular blood transfusions and iron chelation with desferrioxamine have changed the prognosis of the disease and dramatically extended the life expectancy of patients, transforming thalassemia from a rapidly fatal disease of childhood to a chronic illness compatible with a prolonged life (4). On the other hand, frequent blood transfusions leading to iron overload and the chronic nature of the disease have contributed to a whole new spectrum of complications in adolescents and young adults suffering from thalassemia major (5,6). Transfusion-dependent patients, in the absence of chelation therapy, develop progressive accumulation of iron, which is responsible for tissue damage and, eventually, death. The role of transfusion and chelation in improving survival of thalassemia patients has been reported (3,7,8,9).

Untreated transfusional iron overload is fatal in the second decade of life, usually as a result of cardiac complications. Importantly, however, at least five studies have shown an association between the control of serum ferritin and prognosis.

Cardiac abnormalities are a major feature of β -thalassaemia major (10,11). Cardiac malfunction, including heart failure and fatal arrhythmias, are frequent causes of death, and cardiac dilatation secondary to anemia is nearly universal. Transfusion usually corrects the latter abnormality, but may lead to cardiac hemosiderosis due to myocardial iron deposition. Cardiomegaly and left ventricular dysfunction ensue in the untreated child leading to end-stage cardiomyopathy (12,13).

Patients with β -thalassemia major receive chronic blood transfusions and have an increased prevalence of chronic Hepatitis C virus (HCV) infection (13). These patients frequently have increased hepatic iron concentrations and iron-induced liver damage, even when given optimal iron chelation therapy (14). Furthermore, iron overload and HCV infection have been shown to be independent risk factors for progression of liver fibrosis (15). Transaminase levels typically fluctuate between normal and slightly elevated values, with a good correlation being demonstrated between transaminase levels and viral load measured by quantitative polymerase chain reaction (16).

Glucose intolerance in adolescence, overt diabetes in later life and rarely diabetic ketoacidosis, are endocrine complications, mainly due to iron deposition in the pancreas. The postulated risk factors for abnormal glucose tolerance tests (GTT) in transfusion-dependent β -thalassemic patients are serum ferritin as well as hepatitis C infection (17). Cooley's original description of β -thalassemia major included marked bone deformities as a characteristic feature. There is a high prevalence of low bone mass in these patients (18,19).

Aims of the study:

1. To study the prevalence of some of the chronic complications of β -thalassaemia major.
2. To study the correlation of these complications with serum ferritin level.

PATIENTS AND METHODS

Study Design and setting:

A cross sectional study in which a convenient sample of (100) homozygous β -thalassemic patients (42 male & 58 female) who were diagnosed during childhood on the bases of severe anaemia associated with the characteristic profound microcytosis on blood smear in addition to typical haemoglobin (Hb) electrophoresis, attending Thalassemic Center in Ibn-Albaladi Pediatric Hospital in Baghdad, for blood transfusion and chelating agents namely desferrioxamine infusion were included. The study was performed from February–December 2010.

Methods:

The patients were clinically evaluated by:

Clinical history; the history was taken from patients themselves, from their parents and from the patient's records including: age of the patient, sex, time of diagnosis of thalassaemia, onset of blood transfusion, total number of units of blood transfused, time of first unit of blood received, and treatment with chelating agents.

Clinical examination

The patients were examined clinically focusing on the following points:

General examination for pallor, jaundice, skin manifestations and joints examination.

Abdominal examination; for splenic and liver size and Physical examination related to cardiac dysfunction including cardiac and chest examination.

Lab. Investigations

A list of biochemical investigations done for all studied thalassaemic patients includes the following:

1. Liver function tests: total serum bilirubin (direct & indirect) measured by direct reading spectrophotometry. Serum liver enzymes (SGPT&SGOT) which considered as abnormal when the level more than 2-folds the normal and serum Alkaline Phosphatase (abnormal level >85u/l) (excluding the patients whose ages<18year old).
2. Serum calcium, normal range (8.5-10.5mg/dl).
3. Serum ferritin level measured by ELISA, the normal value (40-340µg/L and 14-150µg/L) for male and female respectively and a cutoff point of 2500µg/l used to examine the relationships between complications and ferritin level.
4. Fasting blood sugar FBS (the patients considered diabetics when the level of FBS>126mg/dl).
5. Viral screen done by ELISA including; Hepatitis B (HBsAg), Hepatitis C (HCV antibody) and Human Immune deficiency Virus (Anti-HIV).

Electrocardiography (ECG);

A twelve leads ECG were performed for studied patients using the instrument SCHILLER- AT-1 /Swiss to show if there is:

1. Ventricular hypertrophy (voltage criteria),
2. Arrhythmias and conduction defects
3. ST & T wave changes.

Echocardiography (Echo);

To evaluate the cardiac function an echocardiographic examination done for all thalassaemic patients using the instrument (Voluson 530D Kretz/Austeria) with 3 & 3.5 MHZ probe. Cardiac chamber dimension were measured according to recommendations of the American Society of Echocardiography (ASE) by M-mode echocardiography (20). Impaired ventricular contractility (left ventricular systolic dysfunction) was defined by an ejection fraction (EF) <55% or fraction shortening (FS) <30%. Diastolic dysfunction of left ventricle was defined by the presence of the following parameters: Typical symptoms & signs of heart failure, normal left ventricular ejection fraction, and no valvular abnormalities on Echo (21).

Imaging studies:

- Abdominal ultrasonography done for studied thalassaemic patients to assess the splenic and hepatic enlargement.
- Chest radiography; another complementary measure to assess the cardiac silhouette and if there are features of congestive heart failure.

Statistical methods:

Statistical analysis was performed with Statistical Package for Social Sciences Version -16- (SPSS Inc. Chicago,IL,USA). Data were summarized using standard descriptive statistics, tabulation of categorical variables and scattered diagrams for correlation between two continuous variables. Chi - square test was used for testing association between categorical variables and student's t- test for testing significant differences between two independent means. Pearson's correlation coefficient was used to determine the relationship between two variables. P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

One hundred patients were included in the study, 42% males, 58% females, male to female ratio 0.7:1, their age ranged from 10-33 years with a mean of 17.17 ± 6.109 standard deviation (SD). Median age was 16 years (16, 17 for males and females respectively), although females were slightly older than males, the differences were statistically not significant (Table (1)).

Units of blood received by the patients ranged from 49 to 421 units with a mean of 159.4 ± 57.1 SD and a median of 153 units (152,153 for males and females respectively). The females received blood units (165.5 ± 55.4) more than the males (151 ± 59.01) but the differences were statistically not significant (Table (1)).

Regarding doses of chelating agent (desferrioxamine), table (1) showed that they ranged from 20-40 mg/kg body weight, with a mean of 32.35 ± 7.298 SD with a median of 30 mg/kg body weight and no statistically significant differences were found between males and females. Most of the patients had hepatomegaly (91%), while 26% of the patients were splenectomized (Table (1)).

The investigations revealed that serum ferritin (S. ferritin) was $\geq 2500\mu\text{g/l}$ in three quarters of the patients, 32 males and 43 females with no statistically significant difference, S. Ca^{++} was decreased in 17%, elevated F.B.S. were found in 6%, elevated SGOT in 19%, elevated SGPT in 6% and elevated S. Alkaline phosphatase in 57.5% of patients aged 18 years and more. Cardiac abnormalities were found in 12% of the patients, HBS Ag was positive in two patients and more than half (54 %) were infected with hepatitis C virus (Table 2).

According to S. ferritin level the patients were divided into two groups one with S. ferritin less than $2500\mu\text{g/l}$ and the other with S. ferritin $2500\mu\text{g/l}$ and more.

Table (1): Distribution of the study group by gender, age, blood units received dose of chelating agent and status of spleen and liver

Characteristics	Males N= 42	Females N= 58	Total N= 100
Age in years*			
Range	10 – 30	10 – 33	10 – 33
Mean \pm SD	16.5 ± 5.7	17.6 ± 6.4	17.2 ± 6.12
Median	16	17	16
Blood units received*			
Range	49 – 421	53 – 340	49 – 421
Mean \pm SD	151 ± 59.01	165.5 ± 55.4	159.4 ± 57.1
Median	152	153	153
Chelating dose (mg/kg)*			
Range	20-40	20-40	20-40
Mean \pm SD	31.667 ± 6.955	32.845 ± 7.557	32.35 ± 7.298
Median	30	30	30
Spleen Status:** No. (%)			
Normal	6 (14.3%)	6 (10.3%)	12 (12%)
Splenomegaly	26 (61.9%)	36 (62.1%)	62 (62%)
Splenectomized	10 (23.8%)	16 (27.6%)	26 (26%)
Liver Status:** No. (%)			
Normal	5 (11.9%)	4 (6.9%)	9 (9%)
Hepatomegaly	37 (88.1%)	54 (93.1%)	91 (91%)

* The differences was statistically not significant (Student's *t* test, $P > 0.05$)

**The association was statistically not significant (χ^2 test, $P > 0.05$)

Table (2): Distribution of the study group by their investigations results

Characteristics	Patients' results (N= 100) No. (%)
S. Ferritin (µg/l) < 2500	25 (25%)
≥ 2500	75 (75%)
S.Ca++ Normal	83 (83%)
Decreased	17 (17%)
F.B.S. Normal (<126mg/dl)	94 (94%)
Elevated(≥126mg/dl)	6 (6%)
S.GOT Normal	81 (81%)
Elevated	19 (19%)
S.GPT Normal	94 (94%)
Elevated	6 (6%)
S. Alkaline Phosphatase (for(40)patient aged≥18years)	
Normal	17 (42.5%)
Elevated	23 (57.5%)
Cardiac abnormalities	
Present	12 (12%)
Absent	88 (88%)
HBS Ag +ve Present	2 (2%)
Absent	98 (6%)
HCV Ab +ve Present	54 (54%)
Absent	46 (46%)

Table (3) showed that SGOT and SGPT were significantly higher among patients with S. ferritin ≥ 2500 . Serum Alkaline Phosphatase and cardiac abnormalities were higher among patients with S. ferritin ≥ 2500 than among those with S. ferritin < 2500 µg/l, whereas elevated FBS (≥ 126 mg/dl) was more among patients with S. ferritin < 2500 µg/l but these differences were statistically not significant.

Table (3): Distribution of the study group by serum ferritin (µg/l), liver enzymes, fasting blood sugar and cardiac abnormalities

Parameters	S. Ferritin < 2500 N=25		S. Ferritin ≥ 2500 N=75		Total		P Value
	No.	%	No.	%	No.	%	
S.GOT							
Normal	21	84	60	80	81	81	<0.005*
Elevated	4	16	15	20	19	19	
S.GPT							
Normal	25	100	69	92	94	94	<0.005**
Elevated	0	0	6	8	6	6	
S. Alkaline Phosphatase (for(40)patients aged≥18years)							
Normal	N=9 5	55.6	N=31 12	38.7	17	40	NS
Elevated	4	44.4	19	61.3	23	60	
F.B.S (mg/dl)							
< 126	23	92	71	94.7	94	94	NS
≥ 126 (DM)	2	8	4	5.3	6	6	
Cardiac abnormalities							
Present	2	8	10	13.3	12	12	NS
Absent	23	92	65	86.7	88	88	

* The association was statistically significant ($\chi^2= 33.3$, df=1, P<0.005)

** The association was statistically significant ($\chi^2= 74.2$, df=1, P<0.005)

On studying the correlation between different variables, figure (1) and (2) showed that S. ferritin has a significantly positive correlation with both SGOT and SGPT respectively. A non significant positive correlation was present between S. ferritin and S. Alkaline phosphatase (figure 3) and significant negative correlation was found between S. ferritin and S.Ca⁺⁺ (figure 4).

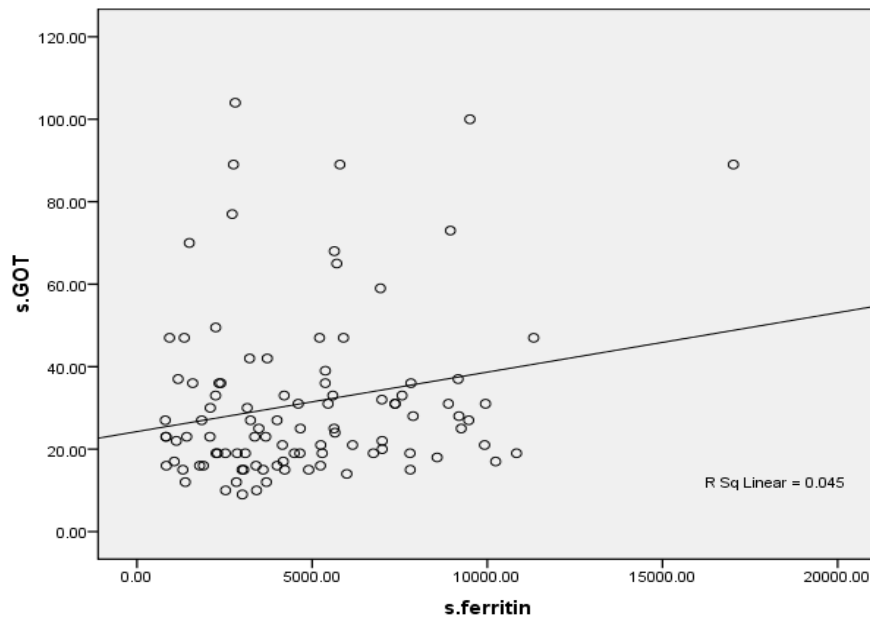


Figure (1): Correlation between S. ferritin (µg/l) level and SGOT*

* Correlation is significant at the 0.05 level (Correlation Coefficient = 0.213)

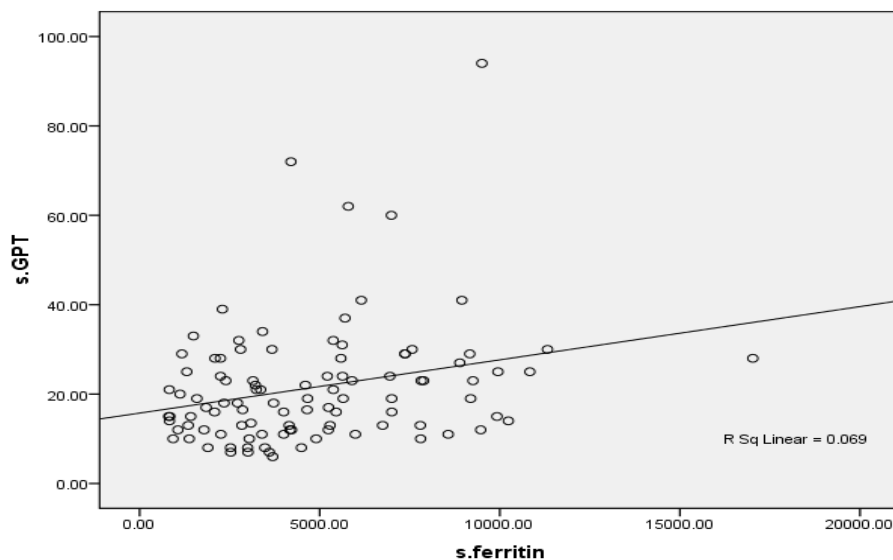


Figure (2): Correlation between S. ferritin (µg/l) level and SGPT*

* Correlation is significant at the 0.01 level (Correlation Coefficient = 0.265)

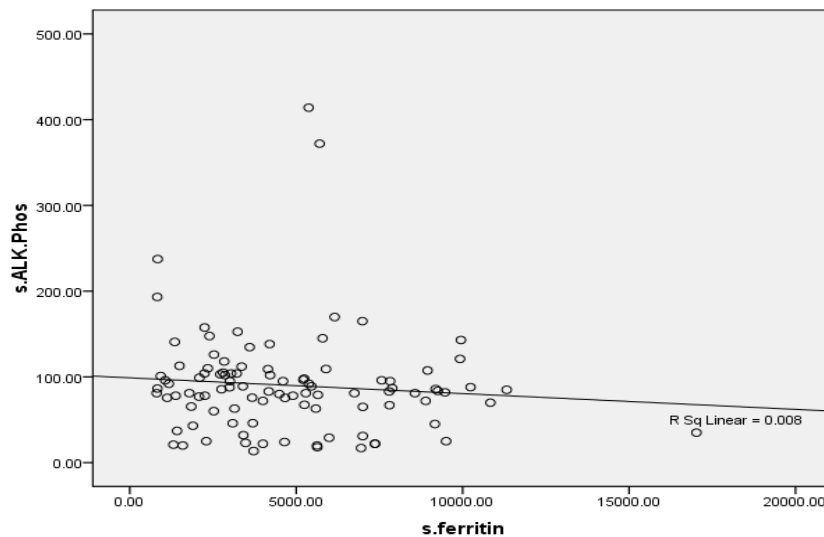


Figure (3): Correlation between S. ferritin ($\mu\text{g/l}$) level and S. Alkaline Phosphatase (among(40)patients aged ≥ 18 years)*

* Correlation is not significant at the 0.05 level (Correlation Coefficient= -0.118)

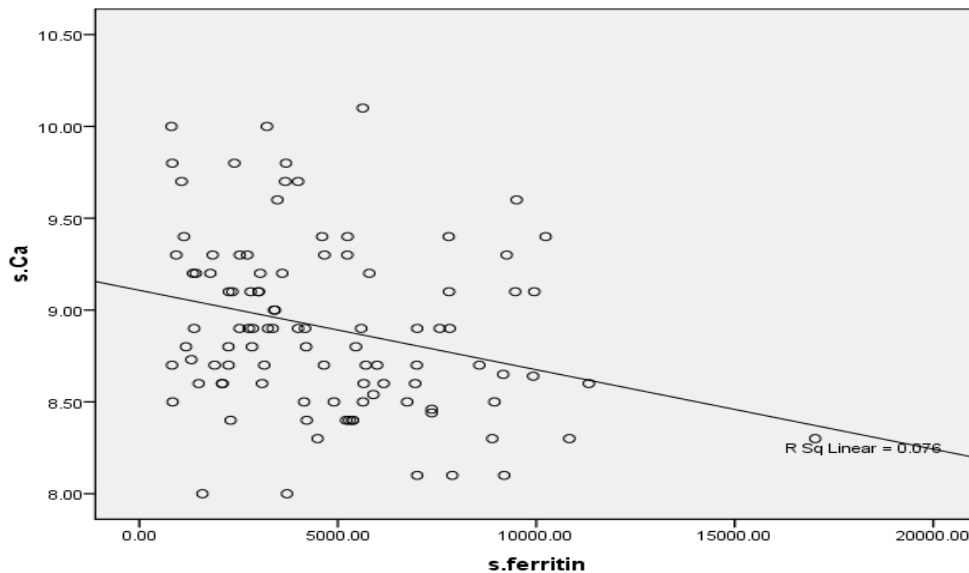


Figure (4): Correlation between S. ferritin ($\mu\text{g/l}$) level and S.Ca*

* Correlation is significant at the 0.01 level (Correlation Coefficient = - 0.286)

Considering infection with hepatitis C virus, patients with S. ferritin $\geq 2500\mu\text{g/l}$ were divided into two groups; one with positive HCV antibody and the second without HCV antibody. Although mean levels of liver enzymes, (SGOT and SGPT), were higher among the first group, yet the differences in means were statistically not significant, whereas the size of the liver (in cm) was significantly larger among the first group compared to the second group (table 4).

Table (4): Differences in mean SGOT, SGPT, and Liver size (in cm) between patient with S. ferritin ≥ 2500 ($\mu\text{g/l}$) and positive HCV, and negative HCV

Variables	S. Ferritin ≥ 2500 with HCV Ab positive N= 44	S. Ferritin ≥ 2500 with HCV Ab negative N= 31
SGOT		
Mean \pm SD	35.7 \pm 23.88	26.6 \pm 18.14
SGPT		
Mean \pm SD	23.2 \pm 14.26	20.9 \pm 15.99
Liver Size (in cm)*		
Mean \pm SD	4.05 \pm 2.52	2.9 \pm 1.78

* The difference was statistically significant (student's t test, $df=73$, $p < 0.05$)

DISCUSSION

Treatment of patients with β -thalassaemia major has improved dramatically during the past 40 years but the patients manifested cardiac, hepatic, endocrine, and metabolic disorder attributable to chronic hypoxia and iron over load (22).

The present study showed that the median age of β -thalassaemic patients was 16 years which is low in comparison to the result of a cross sectional study performed in the Registry of the National Institute of Health-sponsored Thalassaemia Clinical Research Network in North America, in which the median patient's age was 20 years (23).

The recommended treatment for β -thalassaemia major involves lifelong regular blood transfusion, usually administered every 2-5 weeks, to maintain the blood pre-transfusion Hb level more than 9-10.5g/dl. This transfusion regimen promotes normal growth, allows normal physical activities, adequately suppresses bone marrow activity in most patients and minimizes transfusional iron accumulation. A higher target pre-transfusion Hb level of 11-12g/dl may be appropriate for patients with heart disease and for those patients who do not achieve adequate suppression of bone marrow activity at lower Hb level. A careful record of transfused blood should be maintained for each patient, and with this information it's possible to calculate the annual blood requirement (24).

In thalassaemia major, desferrioxamine (DFO) treatment should start as soon as transfusions deposited enough iron to cause tissue damage,

this has not been formally determined, but current practice is to start after first 10-20 transfusions or when S. ferritin level rises above 1000 $\mu\text{g/l}$. If chelating therapy begins before 3 years of age, particularly careful monitoring of growth and bone development is advised, along with reduced DFO dosage. In general, average doses should not exceed 40mg/kg until growth has ceased. The standard dose is 20-40mg/kg for children and up to 50-60 mg/kg for adults, as an 8-12 hour subcutaneous infusion for a minimum of 6 nights a week. To achieve negative iron balance in patients with average transfusion requirements, a dose of 50mg/kg/day at least 5-days a week is required (25).

In current study, DFO subcutaneous infusion has been used in a dose of 20-40mg/kg/day with a median of 30 mg/kg body weight. Most patients had very high serum ferritin indicating inadequate chelation which can partly be explained by noncompliance.

Regarding cardiac complications in the present study the cardiac abnormalities were present in 12% of studied patients with a S.ferritin level of $\geq 2500\mu\text{g/l}$ in most of patients, this goes with observation of Olivieri (1994) (6), who identified a significantly lower risk of cardiac disease and death in at least 2/3 of cases where S. ferritin levels have been maintained below 2500 $\mu\text{g/l}$ over a period of decade or more.

Endocrine complications: include glucose intolerance in adolescence and overt diabetes in later life, mainly due to iron deposition in the pancreas⁽²⁶⁾. The postulated risk factors for abnormal glucose tolerance test (GTT) in transfusion-dependent B-thalassaemic patients are S. ferritin as well as hepatitis C infection (17). In the current study, diabetes mellitus was proved in six patients (3males and 3females) and was more among those with S. ferritin less than 2500 $\mu\text{g/l}$ this unexpected result may be due to the small number of patients found to have high fasting blood sugar which make statistical evaluation difficult, probably using glucose tolerance test may be more informative.

Regarding hepatic complications, liver disease has emerged as a major cause of mortality in patients with β -thalassemia major. In spite of its clinical relevance, thalassemia- associated liver damage has been insufficiently characterized. Liver disease in these patients can manifest as hepatomegaly, decreased albumin concentrations, increased aspartate and alanine transaminase activities.

Hepatitis C virus antibodies have been reported in 85% of multi-transfused Italian patients, 23% of patients in the United Kingdom, 35% in the United States, 34% in France, 35% in Pakistan and 21% in India (5). Any patient with persistently raised serum transaminases must be screened for HCV using PCR to

identify HCV-RNA. If this test is positive it is important to proceed to a liver biopsy to identify those patients who have histological changes of chronic active hepatitis (27).

In the current study, liver function test revealed an elevation of serum transaminase enzymes with a positive significant correlation with S. ferritin.

Considering infection with hepatitis C virus, it was found that 54% of studied patients were infected with HCV. Those with S. ferritin of $\geq 2500\mu\text{g/l}$ and hepatitis C positive antibodies had significantly larger size of the liver. The severity of chronic hepatitis C in patients with thalassaemia may be greater because of concomitant iron overload, other concurrent viral infections (HBV, HIV) and possible infection with mixed hepatitis C genotypes. It has been demonstrated that iron and HCV infection are independent but mutually reinforcing risk factors for the development of liver fibrosis and cirrhosis, with a reciprocal multiplicative effect. It appears therefore that patients with thalassaemia, particularly those with poor control of iron overload, face an increased risk of developing cirrhosis (24).

Many patients with B-thalassemia major require splenectomy. Splenomegaly due to period of under- transfusion with blood of inappropriately low Hb may be reversible. Before considering splenectomy in this situation, the patient should be placed on an adequate transfusion program for several months and then re-evaluated. It is generally advisable to delay splenectomy until patients are at least 5-years old because of increased risk of overwhelming sepsis below this age (24). In current study, it's found that 26 patients gave history of splenectomy, 62 with splenomegaly and the spleen was normal in only 12 patients.

Serum calcium had a significant negative correlation with serum ferritin which may reflect metabolic bone disease which is multifactorial due to iron deposition in the bones, parathyroid gland dysfunction, effect of treatment with desferrioxamine and vitamin D deficiency, this finding deserves further detailed evaluation in our patients (28).

CONCLUSION AND RECOMMENDATION

More than half of the studied patients were infected with Hepatitis C virus, cardiac complications were more common among patients with S. ferritin ≥ 2500 and diabetes mellitus was more among patients with S. ferritin $< 2500\mu\text{g/l}$.

Liver enzymes (SGOT and SGPT) showed significantly positive correlation with S. ferritin.

Improving blood screening for Hepatitis C virus that includes Nucleic acid Amplification testing technology (NAT) is important to control infection with hepatitis virus and oral chelating therapy (Deferiprone & Deferasirox) should be considered instead of parenteral therapy in thalassaemic centers to achieve a better compliance.

REFERENCES

1. Shamshirsaz AA, Bekheirnia MR, Kamgar M, Pourzahedgilani N, Bouzari N, Habibzadeh M. *et al.* (2003). Metabolic and endocrinologic complications in beta-thalassemia major: A multicenter study in Tehran. *BMC Endoc. Disord.* 3:23-34.
2. Pearson HA, Cohen AR, Giardina PJ, and Kazazian HH. (1996). The changing profile of homozygous beta thalassemia: demography, ethnicity, and age distribution of current North American patients and changes in two decades. *Pediatr.* 97(3):352-356.
3. Ehlers KH, Giardina PJ, Lesser ML, Engle MA, and Hilgartner MW. (1991). Prolonged survival in patients with β -thalassemia major treated with deferoxamine. *J Pediatr.* 118:540-545.
4. Khan FR. (2006). Thalassemia: Still a challenge. *Gomal J Medl Sci.* 4(2):47-48.
5. Borgne-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, *et al.* (2005). Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1054:40-47.
6. Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JC, Wayne AS, Liu PP, McGee A, *et al.* (1994). Survival in medically treated patients with homozygous beta thalassemia. *N Eng J Med.* 331:574-578.
7. Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti A, Di Palma A, Piga A, Melevendi C, *et al.* (1989). Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet.* 2:27-30.
8. Modell B, Letsky EA, Flynn DM, Peto R, and Weatherall DJ. (1982). Survival and desferrioxamine in thalassaemia major. *Br Med J;* 284:1081-1084.

9. Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, McLaren CE, Young NS, Tucker EE, *et al.* (1994). Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med.* 331:567-573
10. Kremastinos DT, Tsetsos GA, Tsiapras DP, Karavolias GK, Ladis VA and Kattamis CA. (2001). Heart failure in beta thalassemia: a 5-year follow-up study. *Am J Med.* 111:349.
11. Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT, and Zoumbos NC. (2005). Heart failure in beta-thalassemia syndromes: a decade of progress. *Am J Med.* 118:957.
12. Hahalis G, Manolis AS, Gerasimidou I, Alexopoulos D, sitafidis G, Kourakli A, *et al.* (2001). Right ventricular diastolic function in beta-thalassemia major: echocardiographic and clinical correlates. *Am Heart J.* 141:428.
13. Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, and Cohen AR. (2004). Complications of B-thalassemia major in North America. *Blood.* 104:34-39.
14. Prati D, Zanella A, Farma E, De Mattei C, Bosoni P, Zappa M, *et al.* (1998) A multicenter prospective study on the risk of acquiring liver disease in antihepatitis C virus negative patients affected from homozygous β -thalassemia. *Blood.* 92:3460-3464.
15. Angelucci E, Muretto P, Nicolucci A, Baronciani D, Erer B, Gaziev J, *et al.* (2002). Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood.* 100:17-21.
16. Telfer PT, Garson JA, Whitby K, Grant PR, Yardumian A, Hoffbrand AV, *et al.* (1997). Combination therapy with interferon alpha and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in thalassaemic patients. *Br J Haematol.* 98:850-855.
17. Suda K. (1985). Hemosiderin deposition in the pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 109:996-999.
18. Jensen CE, Tuck SM, Agnew JE, Koneru S, Morris RW, Yardumian A, *et al.* (1998) High prevalence of low bone mass in thalassaemia major. *B J Haemat.* 103:911-915.
19. Soliman A, El-Banna N, Abdel Fattah M, El-Zalabani MM, and Ansari BM. (1998) Bone mineral density in prepubertal children with α -thalassemia: correlation with growth and hormonal data. *Metabol.* 47:541-548.
20. Sahn DJ, Demaria A, Kisslo J. and Weyman A. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurement. *Circulation.* 58:1072-1083.
21. Aurigemma GP and Gaasch WH. (2004). Diastolic heart failure. *N Engl Med.* 351:1097-1103.
22. Stanley L and Schiller SL. (1994). Thalassaemia: Pathophysiology of red cell changes. *Ann. Rev. Med.* 45:211-218.
23. Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, and Cohen AR. (2004) Thalassemia Clinical Research Network Complications of {beta}-thalassemia major in North America. *Blood.* 104:34-39.
24. Cappellini MD, Cohen A., Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A, *et al.* (2007). Guidelines for the clinical management of Thalassaemia. 2nd edition. Thalassaemia International Federation, Nicosia, Cyprus.
25. Cappellini MD., Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, *et al.* (2006). A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once daily oral iron chelator in patients with beta-thalassemia. *Blood.* 107, 3455-3462.
26. Chern JPC, Lin KH, Lu MY, Lin DT, Lin KS, Chen JD, *et al.* (2001). Abnormal glucose tolerance in transfusion-dependent beta-thalassemic patients. *Diabetic Care.* 24:850-854.
27. Weatherall DJ and Clegg JB. (2001). The Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Oxford (United Kingdom): Blackwell sci.:316-317.
28. Voskaridou E and Terpos E. (2004). New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassaemia. *Brit. J. haematol.* 127(2): 127-139

Formulation and In- vitro evaluation of ketotifen fumarate oral strips.**Ameera A. Radhi & Balkis A.Kamal***Pharmaceutical Dept. / College of Pharmacy / Baghdad University- Iraq.**Email: amera8228@gmail.com***ABSTRACT**

The current study aims to formulate ketotifen fumarate as oral dissolving films, and to investigate the effect of different formulation variables on the physical and mechanical properties of the prepared films, besides the drug release behavior. Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC 6cp) was used as the film forming polymer, TWEEN 80 (polysorbate 80) and SPAN 80 (sorbitan monooleate) as surfactants and polyethylene glycol (PEG 400) as a plasticizer. Nine formulas were prepared using solvent-casting method, and were evaluated. Official criteria for evaluation parameters were fulfilled by all formulations. Disintegration time showed by formulations was found to be in range of (20.4 to 38.6) seconds. Formula (F7) which contains HPMC (61.64% w/w), PEG (21.14% w/w), and TWEEN 80 (6.28%w/w) was found to be suitable for film formation with desirable physicochemical properties, faster disintegration and optimum in vitro -release. It can be concluded that ketotifen fumarate can be conveniently administered orally in the form of films where to improve patient compliance and convenience.

الملخص باللغة العربية

تهدف الدراسة الحالية لإجراء تصنيع شرائح ذائبة بالفم لدواء الكيتوتيفين فيوماريت ودراسة تأثيرات متغيرات التصنيع على الصفات الفيزيائية والميكانيكية ومعدل تحرر الدواء خارج الجسم من الشرائح . وقد استخدم الهيدروكسي بروبيل ميثيل سليولوز (HPMC 6cp) كبوليمر مكون رئيسي للشريحة ، والبولي أثيلين كلايكول (PEG 400) كمادة ملدنة ، بينما استخدم التوين (Tween 80) والسبان (Span 80) كعامل خافض التوتر السطحي .

في هذه الدراسة تم تحضير تسع صيغ بطريقة الصب ، ثم تقييمها. وأظهرت النتائج ان جميع الصيغ كانت مطابقة للمعايير الرسمية . وتراوحت نتائج التفكك الفموي بين (20.4 و 38.6)، وقد وجد ان الصيغة (F7) الحاوية على النسبة المئوية (61.64% w/w) من الهيدروكسي بروبيل ميثيل سليولوز و (21.14% w/w) من البولي أثيلين كلايكول و (6.28%w/w) من مادة التوين 80 أعطت أفضل نتائج من ناحية الصفات الفيزيائية والميكانيكية وأفضل معدل لتحرر الدواء من الشريحة . ويمكن ان نستخلص من هذه الدراسة أن دواء الكيتوتيفين فيوماريت ممكن أن يقدم بصيغة شرائح يتوقع فيها تحسن امتثال المريض وملائمة الصيغة الدوائية .

INTRODUCTION

Fast-dissolving drug delivery systems are rapidly gaining interest in the pharmaceutical industry. These systems either dissolve or disintegrate generally within a minute, without the need for water or chewing (1).

The first developed fast-dissolving dosage form consisted in tablet form, and the rapid disintegrating properties were obtained through a special process or formulation modifications (2). Recently, fast-dissolving films are gaining interest as an alternative of fast-dissolving tablets. The films are designed to dissolve upon contact with a wet surface, such as the tongue, within a few seconds, meaning the consumer can take the product without the need for additional liquid. This convenience provides both a marketing advantage and increased patient compliance (3).

Ketotifen Fumarate (KF), 4-(1-Methylpiperidin-4-ylidene) - 4Hbenzo [4,5] cyclohepta [1,2-b]thiophen-10(9H)-one monofumarate, is a histamineH1 receptor antagonist (4). Oral ketotifen is indicated as an add-on medication in the chronic treatment of mild atopic asthmatic children. It is given orally as the fumarate in the prophylactic management of asthma, and also used in the treatment of allergic conditions such as rhinitis and conjunctivitis (5,6).

The aim of the current study is to formulate ketotifen fumarate as orally dissolving films. To achieve this goal, the films are formulated by solvent-casting method, and then different variables will be studied, concerning the physical and mechanical properties of the prepared films in addition to the drug release behavior.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

Ketotifen Fumarate powder was purchased from Samara Drug Industries (SDI), Iraq. Hydroxypropyl methylcellulose (viscosity 6cp) was purchased from Sigma-Aldrich, USA. Polyethylene glycol 400 was purchased from J. T. baker chemical Co., China. Tween 80 was purchased from Sinopharm chemical reagent Co., Ltd, China. Sodium Saccharin was purchased from BDH Chemicals Ltd Poole manufactured in England. Mannitol was

purchased from Riedel-De-Haen manufactured in Germany.

Formulation of films:

Nine formulas were prepared (F1-F9), with their composition shown in table (1), using solvent casting method (7), each film with surface area approximately 4 cm² is loaded with 1.38 mg ketotifen fumarate which is equivalent to about 1 mg of ketotifen as a base. The area and number of films prepared for each batch can be calculated as follows (8):

Total area of petri dish = 154 cm²

Each film area = 2×2 = 4 cm²

Number of films in batch = 154/4 = 38.5 approximately 39 films

Total drug load = 1.38×39 = 53.82 mg approximately 54mg KF

Evaluation of films:

Drug content uniformity:

Five films from each formulation batch were picked randomly and were weighed individually (9). Each film was dissolved in 100 ml 0.1N HCL to measure absorbance spectrophotometrically at λ_{max} 300 nm. The average drug content was calculated.

Visual inspection:

Properties such as homogeneity, color, transparency and surface of the oral films were evaluated for all the prepared oral films (9).

Weight variation:

The weight variation of the KF oral film was done by weighting twenty films individually and the average weight was calculated. For the film to be accepted, the weight of not more than two films deviate from the average weight by no more than 7.5% and no film deviates by more than 15% (4).

Thickness measurements:

The thickness of each film was measured at five different locations (centre and four corners) using vernier caliper micrometer. The data are represented as a mean±SD of three replicate determinations (10).

Table (1): Composition of ketotifen fumarate oral films formulas

Ingredients (mg)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Ketotifen Fumarate	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38
HPMC (6cp)	34.32	34.32	34.32	32.32	35.48	30.82	30.82	30.82	30.82
PEG 400	8.57	10.57	6.57	10.57	10.57	10.57	10.57	10.57	10.57
Tween 80	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	3.14		
Span 80								3.14	
Na Saccharin	1.14	1.14	1.14	1.14		1.14	1.14	1.14	1.14
Citric acid	1.425	1.425	1.425	1.425	1.425	1.425	1.425	1.425	1.425
Mannitol	2.02		4.02	2.02		3.52	1.52	1.52	4.66
Total weight of a film	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg

Folding endurance:

The folding endurance of randomly selected films was determined by repeatedly folding one film at the same place till it break or folded maximum 250 times (11).

Tensile testing of the films:

The films used for investigating the tensile properties were cut around a standard template (dumbbell) according to American Society for Testing and Materials (ASTM) international test method for thin plastic sheeting. The template is illustrated in figure (1). The tensile properties of the films were evaluated by stretching the dumbbell-shaped sections to break using a universal testing machine. The breaking load in newtons [N] and elongation [%] were measured (12).

Four mechanical properties, namely, tensile strength (TS), elastic modulus (EM), and percent elongation (% E) and strain were computed for the evaluation of the film.

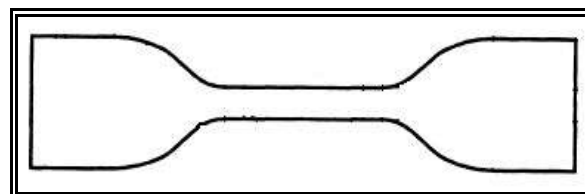


Figure (1): . The standard template (dumbbell) as defined by ASTM test for thin film

Tensile strength is the maximum stress applied to a point at which the strip specimen breaks. It is calculated by the applied load at rupture divided by the cross-sectional area of the strip as given in the equation below and was expressed in force per unit area: megapascals (MPa) (13):

$$\text{Tensile strength} = \frac{\text{Force at break (N)}}{\text{Initial cross-sectional area of the sample}}$$

Percent elongation at break (E %) was calculated by dividing the extension at the moment of rupture of the specimen by the initial gage length of the specimen and multiplying by 100 according to equation :

$$\% E = [(L_s - L_0) / L_0] \times 100$$

Elastic modulus or Young's modulus was calculated as the slope of the linear portion of the stress-strain curve. The result was expressed in force per unit area (MPa) (14):

$$F/A = EM [(L_s - L_0)/L_0]$$

Where F= breaking load (N), A = cross-sectional area of the sample, EM is the modulus of elasticity, L_0 is the initial gage length of the specimen and L_s is the length of the film after elongation.

Strain has been used as an indicator of the overall mechanical quality of the film (15).

Strain = tensile strength / elastic modulus

Surface pH measurement:

The surface pH of oral film was determined in order to investigate the possibility of any side effects in vivo. As an acidic or alkaline pH may cause irritation to the oral mucosa. Oral film was slightly wet with the help of water, and then the pH was measured by pH paper (16).

Disintegration test:

• In-vitro disintegration study:

Disintegration test was performed in the USP disintegration time testing apparatus using phosphate buffer pH 6.8 as a medium. The films were placed over the mesh of the

disintegration apparatus tube which was immersed in 250 mL beaker containing the disintegration media of and disintegration time was recorded (17).

• In- vivo disintegration study:

The time required for complete disintegration in the oral cavity was collected from three healthy volunteers. All volunteers were told about the purpose of the test. Before the test, the mouth cavity was rinsed with a cup of water. The film was placed on the tongue and subsequently the tongue was gently moved. The time required for disintegration in mouth was measured with a stopwatch and recorded as a disintegration time (18).

In-vitro dissolution study:

The in vitro dissolution test was carried out for all formulas in a basket dissolution apparatus (19). 4-cm² sample of KF-loaded film was exactly weighed. The dissolution medium was 250 mL of phosphate buffer pH 6.8 (20). The rotation speed was 100 rpm at 37±0.5°C. Five ml aliquot of the dissolution medium was withdrawn at specific time intervals, and replaced with 5 ml of the phosphate buffer. The drug release was analyzed spectrophotometrically at 300 nm. One film was placed into each vessel. The measurement was replicated three times with the standard deviation as a measure of variation. The time required for 80% of drug to be released ($t_{80\%}$) and percent drug dissolved in 2 minutes (D_{2min}) were considered for comparing the dissolution results.

Statistical Analysis:

The results of the experiments are given as a mean of triplicate samples ± standard deviation and were analyzed according to the one way analysis of variance (ANOVA) at the level of ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Drug content uniformity

Table (2) gives the physicochemical parameters of oral thin films of ketotifen fumarate. All the prepared films were found to contain an almost uniform quantity of the drug, the content uniformity studies indicating reproducibility of the technique used. The

preparations met the criteria of British Pharmacopeia content uniformity (85- 115) % of the label claim. On this basis, it was found

that the drug was dispersed uniformly throughout the 4 cm² constant area of the film.

Table (2): The physicochemical parameters of oral thin films of Ketotifen Fumarate

Formula code	Drug content uniformity (%)	Thickness (mm)	Surface pH	In vivo DT(sec)	In vitro DT (sec)
F1	108.69±3.05	0.109±0.01	6.1	31±1	39.4±5
F2	114.73±0.74	0.083±0.009	5.9	30.2±2	32.6±1.5
F3	96.31±1.66	0.093±0.005	6.1	33±2.2	35±3.3
F4	107.75±3.6	0.096±0.002	6.1	28.6±1	36.6±2.5
F5	111.71±1.64	0.143±0.003	6.2	33±1	47±2.8
F6	102.52±4.17	101±0.003	6.0	24.6±2.5	25.2±2
F7	98.10±1.66	0.136±0.002	5.9	20.4±1	22.7±1
F8	100.12±4.22	0.099±0.003	6.1	38.6±1	64.7±3
F9	104.73±3.1	0.092±0.002	5.9	29.4±3	36±4

Visual inspection

All the prepared films were transparent, colorless, thin and soft.

Weight variation

The results reveal that the average weights for all the prepared formulas were uniform and comply with referred values.

Thickness measurements

The thickness was found to vary between 0.083 to 0.143 mm. A very low standard deviation value is indicating that the method used for the formulation of films is reproducible and give films of uniform thickness and hence dosage accuracy in each film can be ensured.

Surface pH study:

The surface pH of all the films was found between (5.9-6.2) which is within the range of salivary pH. No significant difference was found in surface pH of different films.

Mechanical properties

Mechanical properties of the films are important for film casting on release liners, punching and packaging. Strain has been used as an indicator of the overall mechanical quality of the film. A high strain value indicates that the film is strong and elastic (15). Folding endurance values were considered also in comparison.

Orally dissolving films should possess moderate tensile strength, high % elongation (%E), high strain, low elastic modulus (21). In addition folding endurance values were considered satisfactory (>100 times) or folded maximum 250 times (11).

Effect of concentration of plasticizer (Polyethylene glycol 400):

Formulas F1, F2 and F3 which contain (17.14, 21.14 and 13.14% w/w of total dry weight) respectively were utilized to investigate the effect of concentration of PEG400 on the mechanical properties of the oral film. Increasing concentration of plasticizer from 17.14% (F1) to 21.14% (F2) caused a significant ($p < 0.05$) decrease of the elastic modulus (EM), which is an index of stiffness, and the tensile stress (TS). The ductility that is expressed as elongation percent (E%), increased by increasing the plasticizer amount. Similar results were obtained when maltodextrin plasticized with glycerin and PG (14). Formula (F3) prepared with lowest amount (13.14%) of plasticizer was weak and brittle and scored the lowest folding endurance and strain values. Table (3) displays the mechanical properties of film preparations.

Effect of concentration of Hydroxypropyl methylcellulose

The results of tensile testing of formulas F2, F4, F5 and F6 shown in table (3) reveal that increasing the polymer concentration produced films with higher tensile strength. This observation can be explained by the fact that higher polymer concentration results in densely packed chains of HPMC that require more force to break (22). Similar results were found with salbutamol sulphate films (23).

Effect of type and concentration of surfactant

The formula prepared without surfactant (F9) scored higher tensile strength value compared to other formulas (F6 to F9) (Table 3). This can be explained by the fact that addition of tween 80 adds to the porosity of the structure and hence it decreases the tensile strength (22).

The results in table (3) showed that changing the surfactant types had non-significant difference ($p > 0.05$) on the mechanical properties of oral films.

Disintegration test

The in-vivo and in-vitro disintegration time results of all films are listed in table (2).

Effect of concentration of plasticizer (Polyethylene glycol 400)

The results in table (2) showed that increasing the concentration of PEG 400 had non significant difference ($p > 0.05$) on the disintegration time of the prepared films.

Effect of concentration of Hydroxypropyl methylcellulose

The results in table (2) showed that the disintegration time of the films decreased significantly ($p < 0.05$) as the concentration of HPMC was decreased from 68.64% (w/w) in formula F2 to 61.64% (w/w) in formula F6. Similar observations were found with ondansetron HCl films⁽²⁴⁾ and valsartan films (25).

Effect of type and concentration of surfactant

Two types of surfactants, tween 80 (polysorbate 80) and span 80 (sorbitan monooleate) are taken. The disintegration was faster ($p < 0.05$) for films prepared with hydrophilic surfactant tween 80 (F7) than that for films prepared with span 80 (F8).

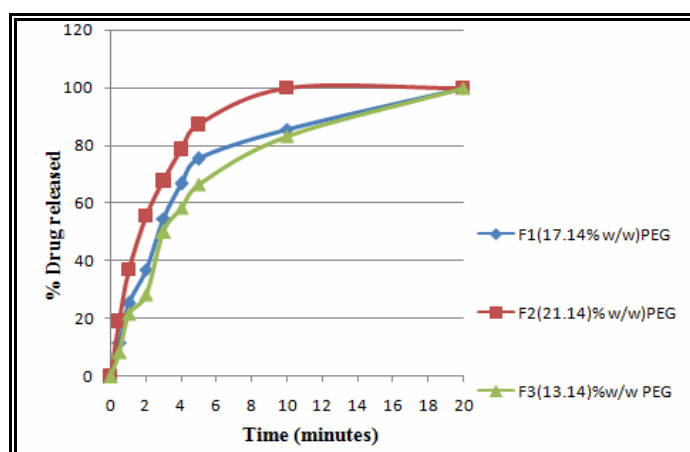
The results also revealed that the increase in concentration of tween 80 significantly ($p < 0.05$) reduces the disintegration time, being emulsifier it facilitates the diffusion of fluid into the film resulting in faster disintegration of the film. Hence the formula F7 formulated with high tween 80 content disintegrated faster (20.4 seconds) as compared to the films prepared with low tween 80 content (F6) and the films prepared without tween 80 (F9). Similar results were found with ambroxol hydrochloride films (9).

In vitro dissolution studies

The release profiles of KF from the prepared films are represented in figures (2, 3, 4 and 5). In addition, the time required for 80% of drug to be released ($t_{80\%}$) and percent drug dissolved in 2 minutes (D_{2min}) are listed in table (4).

Table (3): The mechanical properties of film preparations

Formula code	Folding Endurance	Tensile strength (MPa)	Elongation%	Elastic Modulus	Strain
F1	220	14.32	3.54	404.06	0.035
F2	>300	13.41	5.63	238.18	0.056
F3	150	7.63	1.71	444.12	0.017
F4	>300	12.88	5.59	230.41	0.055
F5	>300	14.76	2.77	531.70	0.027
F6	>300	11.83	3.94	303.33	0.039
F7	>300	11	3.31	332.32	0.033
F8	>300	9.55	3.48	248.05	0.038
F9	>300	14.32	2.9	493.79	0.029



Figure(2): .Effect of concentration of PEG 400 on the release of KF in phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C

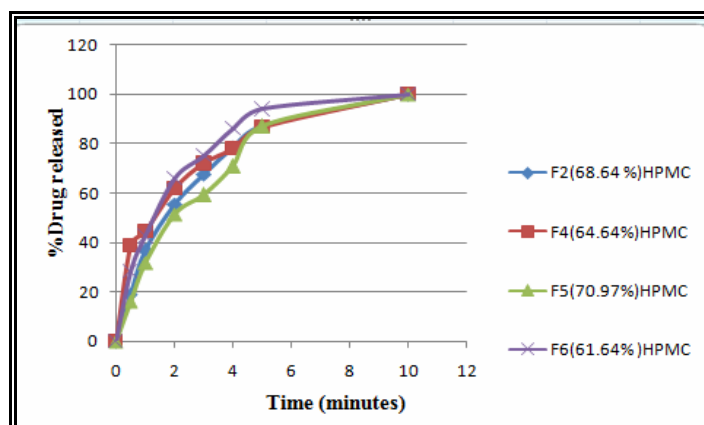
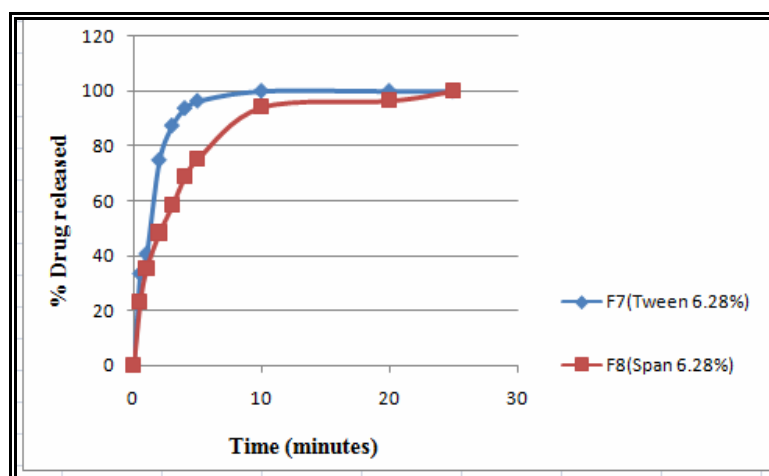


Figure (3): .Effect of concentration of HPMC on the release of KF in phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C



Figure(4): .Effect of surfactant type on the release of KF in phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C

Table (4): In –vitro dissolution parameters of film preparations

Formula code	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
T80%	7	4.1	9.1	4.1	4.6	3.7	2.1	5.3	4.1
D2min. (%)	37.05	55.45	28.33	61.93	51.53	65.93	74.77	48.24	55.62

Effect of concentration of plasticizer (Polyethylene glycol 400)

The release of KF from formulas F1, F2 and F3 is shown in figure (2). It is observed from the results in table (4) that the drug release rate increased significantly ($p < 0.05$) as the concentration PEG 400 was increased. Since Polyethylene glycol 400 is water soluble (26), it will diffuse out of polymeric films in aqueous media generating void spaces in the film through which diffusion occurs more readily. The result being accelerated release profile of the active ingredient (27).

Effect of concentration of Hydroxypropyl methylcellulose

The release of KF from formulas F2, F4, F5 and F6 which contain (68.64, 64.64, 70.97, and

61.64% w/w of total dry weight) respectively of HPMC is shown in figure (3). It is observed that the drug release rate increased significantly ($p < 0.05$) as the concentration of HPMC was decreased from 68.64% (w/w) in formula F2 to 61.64% (w/w) in formula F6.

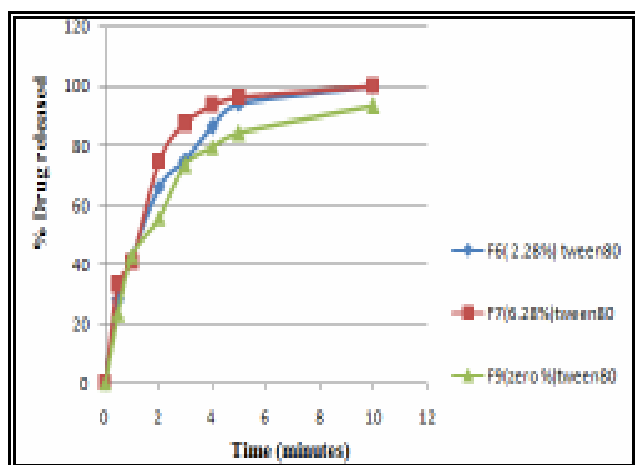
Effect of type and concentration of surfactant

The release of KF from formulas F7 and F8 which contain (6.28%w/w) of tween 80(polysorbate 80) and span 80 (sorbitan monooleate) respectively is shown in figure (4). It was seen that the drug release was faster ($p < 0.05$) in case of hydrophilic surfactant tween 80. This is due to the hydrophilic nature of the surfactant (28), tween 80 acts by decreasing drug surface tension and increased

drug wettability; thus, the dissolution rate of KF was enhanced markedly (29).

Span 80 HLB value is (4.3) and Tween 80 HLB value is (15). The HLB value of a surfactant provides an indication of the hydrophilic -lipophilic balance of the compound and the higher the HLB value, the more hydrophilic the compound (30, 31). The release of KF from formulas F6, F7 and F9 which contain (2.28, 6.28 and zero% w/w of total dry weight) respectively of tween 80 is shown in figure (5). It was seen that the drug release rate increased significantly ($p < 0.05$) as the concentration of tween 80 is increased. Similar results were found with salbutamol sulphate sublingual film (32) and oleanolic acid solid dispersion (33).

Based on the above results the films of the formula F7 showed fastest disintegration time (20.4 seconds), lowest T80% (2.1 minutes), the highest D_2 min % (74.77%) and satisfactory mechanical properties was selected as the promising formula for the formulation of ketotifen fumarate oral dissolving films.



Figure(5): Effect of concentration of tween 80 on the release of KF in phosphate buffer (pH 6.8) at 37°C

CONCLUSION

- Ketotifen fumarate was successfully formulated as orally dissolving films and the prepared films were found to be transparent, colorless, thin and soft.
- Amongst nine formulas, the film prepared using (61.64% w/w) of HPMC, (21.14% w/w) of PEG400, and (6.28%w/w) of tween 80 (F7) showed fastest disintegration time (20.4 seconds), lowest T80% (2.1 minutes), the highest D_2 min %

(74.77%) and satisfactory mechanical properties.

- Therefore, ketotifen fumarate can be conveniently administered orally in the form of films where improved patient compliance and convenience is expected.

REFERENCES

1. Liang AC, and Chen LH.(2001). Fast-dissolving intra-oral drug delivery system. *Expert Opin Ther Patents*. 11(6): 981-986.
2. Arya A, Chandra A, and Sharma V.(2010). Fast dissolving oral films: an innovative drug delivery system and dosage form. *Int J ChemTech Res*. 2(1):576-583.
3. Gavaskar B, Kumar SV, Sharan G, and Rao YM .(2010). Overview on fast dissolving films. *Int. J. Pharm. and Pharm. Sci*. 2(3): 29-33.
4. British Pharmacopoeia.(2009). London: Crown Inc. 223
5. Grant SM, Goa KL, Fitton A, and Sorkin EM.(1990). Ketotifen: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs*. 40:412-448.
6. Sweetman SS. (2009).Martindale: The Complete Drug Reference. 36th edition. London: Pharmaceutical Press; 582.
7. Raju S, Reddy PS, Kumar VA, Deepthi A, Reddy KS, and Reddy PV.(2011). Flash release oral films of metoclopramide hydrochloride for pediatric use: Formulation and in-vitro evaluation. *J. Chem. Pharm. Res*. 3(4):636-646.
8. Chaudhary R, Qureshi S, Patel J, Panigrahi UP, and Giri IC.(2010). Formulation, development and in-vitro evaluation of mucoadhesive buccal patches of methotrexate. *Int. J. Pharm. Sci. Res*. 1(9): 357-365.
9. Sapkal NP, Kilor VA, Daud AS, and Bonde MN. (2011). Development of fast dissolving oral thin films of ambroxol hydrochloride: Effect of formulation variables. *J. Adv. Pharmaceut. Res*. 2(2): 102-109.
10. Jadhav SD, Kalambe RN, Jadhav CM, Tekade BW, and Patil VR.(2012). Formulation and evaluation of fast dissolving oral film of levocetirizine dihydrochlorid. *Int J Pharm Pharm Sci*. 4(1): 337-341.
11. Prasanth VV, Mamatha Y, Arunkumar S, Mathew ST, and Abraham A.(2012). Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Buccal Patches of Aceclofenac. *Der Pharmacia Lettre* . 4 (1):297-306.
12. Boateng JS, Stevens H, Eccleston GM, Auffret AD, Humphrey MJ, and Matthews KH.(2009). Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 35(8): 986-996.
13. Bhyan B, and Jangra S.(2012). Formulation and evaluation of fast dissolving sublingual films of rizatriptan benzoate. *Int. J. Drug Dev. Res*. 4(1): 133-143.
14. Cilurzo F, Cupone IE, and Minghetti P.(2008). Fast dissolving films made of maltodextrins. *Eur J Pharm Biopharm*. 70(3):895-900.
15. Peh KK, and Wong CF.(1999). Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *J Pharm. Pharmaceut. Sci*. 2 (2):53-61.
- 16.Thimmasetty J, Pandey GS., and Babu PRS.(2008). Design and in vivo evaluation of carvedilol buccal mucoadhesive patches. *Pak. J. Pharm. Sci*. 21(3):241-248.
- 17.Kunte S, and Tandale P.(2010). Fast dissolving strips: A novel approach for the delivery of verapamil. *J Pharm Bio. Sci*. 2 (4):325-328.
18. Mishra R, and Amin A.(2009). Formulation development of taste masked rapidly dissolving films of cetirizine hydrochloride. *Pharm. Technol*. 33(2): 48-56.
19. Cilurzo F, Cupone IE, Minghetti P, Buratti S, Gennari C , and Montanari L.(2011). Diclofenac fast-dissolving film: suppression of bitterness by a taste-sensing system. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 37(3): 252-259.
20. GarsuchV, and Breitzkreutz J.(2009). Novel analytical methods for the characterization of oral wafer. *Eur. J. Pharm. And Biopharm*. 73:195-201.
21. El-Setouhy DA, and El-Malak NS.(2010). Formulation of a novel tianeptine sodium orodispersible film. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 11(3): 1018-1025.

22. Cole G, Hogan J, and Aulton M. (1995). In: Pharmaceutical Coating Technology. UK: Taylor & Francis. 29.
23. Mashru RC, Sutariya VB, Sankalia MG, and Parikh PP.(2005). Development and evaluation of fast-dissolving film of salbutamol sulphate. Drug Dev. Ind. Pharm. 31: 25–34.
24. Sumitha C., Karuna SN., Divya B., Madhavi K., Vimal KVM., and Charbe NN.(2009). Taste masking of ondansetron hydrochloride by polymer carrier system and formulation of rapid-disintegrating films. Int. J. Chem. Res. 1(2): 24-27.
25. Kaza R, and Kumar RA. (2012). Design and characterization of fast dissolving films of Valsartan. Int. J. Innov. Pharmaceut. Res. 3(2): 212-219.
26. Rowe RC, Sheskey PJ, and Owen SC (2005). Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical press; 545–550.
27. Miller D A., and McGinity J W.(2008). Aqueous polymeric film coating. 3rd.ed. New York: Informa Health Care; 424-425.
28. Pachua L, and Mazumder B.(2009). A study on the effects of different surfactants on Ethylcellulose microspheres. Int.J. Pharm. Tech Res.1(4):966-971.
29. Okonogi S, and Puttipipatkachorn S.(2006). Dissolution improvement of high drug-loaded solid dispersion. AAPS Pharm. Sci. Tech. 7(2): 52.
30. Aulton EM (2002). Pharmaceutics: The science of dosage form design. 2nd Edition, Churchill: Livingston; 534-543.
31. Margaret IO, Ndu ID, Jimson O , and Cecilia I.(2012). Assessment of the effect of base type and surfactant on the release properties and kinetics of paracetamol suppositories. J. Chem. Pharm. Res. 4(6): 3280-3286.
32. Prasanthi NL, Krishna CS, Gupta ME, Manikiran SS, and Rao NR.(2011). Design and development of sublingual fast dissolving films for anasthmatic drug. Der Pharmacia Lettre. 3(1): 382-395.
33. Liu L, and Wang X.(2007). Improved Dissolution of oleanolic acid with ternary solid dispersions. AAPS Pharm. Sci. Tech. 8 (4) : 113.

Immunizations of broiler chickens by using sonicate sporulated oocysts of *Eimeria tenella*.

Aws H. Muhammed, Haidar M. A. Al-Rubaie & Amer M. Abd

Dept. of Parasitology / Veterinary medicine College / Baghdad University- Iraq

ABSTRACT

The study was conducted to investigate the effects of immunization by using sonicate sporulated oocysts of *Eimeria tenella* in broiler chickens, using 150 chicks, one day old which were divided randomly into 5 groups at 7th day and the 1st and 2nd groups were immunized orally by 1 mg/bird and 0.5 mg/bird respectively, the 3rd group was vaccinated by coccivac-D, and the final two groups acted as a positive (4th groups) and negative (5th groups) which was given phosphate buffer saline. The first 4 groups were challenged by 1000 oocyst/bird at 21st day of age.

The results of the present study revealed a decrease in the body weight gain of all immunized, vaccinated and infected groups, but a significant ($p < 0.01$) decrease was recorded in the 1st and 3rd groups at 28 days of age and also, this was significant ($p < 0.01$) in the 3rd group at 45 day of age compared to negative control group. There was a significant ($p < 0.05$) decrease in the liver and heart weight in the 3rd and 2nd groups respectively. A significant ($p < 0.05$) increase was recorded in the spleen and gizzard in the 4th group.

There was a significant ($p < 0.01$) increase in the oocyst excretion in 1st group at 33th day of age followed by significant ($p < 0.05$) decrease at 38th and 41st day of age, while a significant ($p < 0.01$) decrease at 45th day of age. Also, a significant ($p < 0.05$) decrease was noticed in the 2nd at 31st day of age and 3rd groups at 28th day of age compared with control positive group. In conclusion the use of sonicate sporulated *Eimeria tenella* oocysts was useful to increase the body weight gain and reduce the oocysts excretion in the broiler chickens.

الملخص باللغة العربية

هدفت الدراسة الى معرفة تأثير التمنيع باكياس بيض الطفيلي *Eimeria tenella* المكسرة في افراخ دجاج اللحم ، من خلال استعمال 150 طير غير مجنسة من نوع كوب ، قسمت عشوائيا الى خمسة مجاميع متساوية (30 فرخا/مجموعة) بعمر 7 ايام . ومنعت المجموعتان الاولى والثانية باكياس البيض المكسرة بجرعة 1 ملغم /فرخ و 0.5 ملغم /فرخ بالفم على التوالي ، ولقحت المجموعة الثالثة باللقاح Coccivac-D عن طريق اضافته الى عليقة الافراخ وعدت المجموعتان الرابعة والخامسة كمجموعتين سيطرة موجبة (مصابة) وسالبة جرعت بالمحلول الملحي الفسلجي. منعت المجاميع، واجري فحص التحدي للمجاميع الاربعة الاولى بعمر 21 يوما بجرعة 1000 كيس بيض /فرخ.

سجلت نتائج الدراسة حصول انخفاض في معدلات اوزان الدجاج في المجاميع الممنعة والملقحة وكان هذا الانخفاض معنويا ($P < 0.01$) في المجموعتين الاولى والثانية بعمر 28 يوم وكان معنويا ايضا ($P < 0.01$) في المجموعتين الاولى والثالثة بعمر 45 يوم مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة. كما تأثرت معدلات اوزان بعض الاعضاء الداخلية فقد كان هنالك انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في وزن الكبد في المجموعة الثالثة و القلب في المجموعة الثانية وكان التأثير عالي المعنوية ($P < 0.01$) في المجموعة الثالثة في حين حصل ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في وزن الطحال والقانصة في المجموعة الرابعة مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة.

اما معدلات طرح ايكياس بيض الطفيلي في الفرشة فقد كانت هنالك زيادة عالية المعنوية ($P < 0.01$) في المجموعة الاولى بعمر 33 يوم اتبعها انخفاض (بعمر 38 و 41 يوم وكان الانخفاض عالي المعنوية ($P < 0.01$) بعمر 45 يوم ، كذلك انخفضت معدلات الطرح في المجموعة الثانية معنويا ($P < 0.05$) بعمر 31 و 41 وكان هذا الانخفاض عالي المعنوية ($P < 0.01$) بعمر 45 يوم، في حين اظهرت المجموعة الثالثة انخفاضا معنويا ($P < 0.05$) بعمر 28 و 31 يوم وكان هذا الانخفاض عالي المعنوية ($P < 0.01$) بعمر 33 و 41 و 45 يوم مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة. نستنتج من ذلك امكانية زيادة وزن افراخ اللحم وتقليل اعداد ايكياس بيض طفيلي الى *Eimeria tenella* المطروحة في الفرشة باستعمال التمنيع باكياس بيض الطفيلي المتبوعة المكسرة.

INTRODUCTION

Coccidiosis is a widespread disease worldwide affecting many vertebrates caused by the unicellular eukaryote *Eimeria*, which exhibits approximately 800 different species (1). It is one of the most common and expensive diseases in the poultry impact on both growers and broiler poultry industry worldwide (2). It was responsible for 6–10% mortality in broiler chicken and huge global economic loss due to impaired feed conversion and retarded growth (3). *Eimeria tenella* is the most common and pathogenic species that affect poultry industry (4), resulting in 100% morbidity and high mortality due to extensive damage of the digestive tract (5).

Anticoccidial drugs and, to a lesser extent, live and attenuated parasite vaccines, are the primary methods of disease control (6-9). Although prophylactic medication is the predominant method used to suppress flock infections, new disease control strategies are needed due to the emergence of drug-resistant field strains of *Eimeria* and increasing consumer demands for drug-free poultry meat (10).

Due to the importance of chicken coccidiosis, the present study was conducted to determine the effect of immunization by sonicate sporulated oocysts of *Eimeria tenella* on body weight gain and oocysts excretion in broiler chickens.

MATERIALS AND METHODS

1 - Parasite isolation :-

Eimeria tenella oocysts were obtained from the ceca of infected egg product chicken and the identity of isolate was determined in the laboratory of Parasitological department / Veterinary Medicine College/ University of Baghdad. Samples were maintained for three times in broiler chickens by infection and isolation, and sporulated by using potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at the level of 2.5% in the shaker water bath for about 72 hr. at 30°C, and kept in the refrigeration at 4-6 °C till use (11).

2- Oocysts count:

Oocysts count was done according to (11).

3-Oocysts sonication:-

Sporulated oocysts (89%) were sonicate according to Fue and Lee (1976) with some modification by use an ultrasonic homogenizer (Sonaprep-150/German), the homogenate was centrifuge at 3000 rpm for 30 minute, soluble material (supernatant) was collected and sterilized by Millipore filter (0.45 micron). Total protein of the supernatant was determined by using Biuret method (Kit-Biosystem, S.A. COD11800 ; Costa Drava 30, Barcelona, Spain)

4- Experimental animals:-

One hundred and fifty, 1-day old of Kobb broilers were purchased from local hatchery and kept in a room (36 m²) in an experimental animal house / Veterinary Medicine College / Baghdad University. Chickens were divided randomly into five groups ; 1st and 2nd groups (30 chickens each one) were ingested orally with 1mg and 0.5mg of sonicate sporulated oocysts /chickens, respectively; 3rd group (30 chickens) was vaccinated by Coccivac-D in the diet; 4th group (30 chickens) was infected orally 1000.

Oocysts / chickens (positive control) and 5th group (30 chickens) was ingested with 1ml of phosphate buffer saline (negative control);which had water and food(Commercial broiler feed formula and without anticoccidial medication) and libitum (12).

5- Body weight gain:

Five chicks of each group were randomly weighted from every 10 days.

6-Statistical analysis:

Statistical evaluation was carried out by using t-test. Values less than 0.05 was considerable as statistical significance (13).

RESULTS

1. Oocysts excretion:

Table (1) shows that the oocysts excretion in the litter was increased at 33rd day of age in the 1st (1 mg/chicken); while in 3rd (Coccivac-D)

group there was an increase and decrease in the oocysts excretion, and in the 4th (infected) group there was an increase in oocysts excretion at 31st, 33rd, 38th and 41st days of age (30800, 32000, 35200 and 34800 oocysts/g) respectively.

Table (1): Numbers of *Eimeria tenella* oocysts excretion in litter of broiler chickens.

Age days Groups	Mean ± SE						
	23	28	31	33	38	41	43
G 1	-	-	a 10400±42 61.4	b* 62400±37 89.85	b 12000±27 56.80	b 13600±11 73.03	b* 8800±149 6.66
G 2	-	a 6000±14 14.21	b 23600±30 59.41	a 28800±54 62.60	a 28000±57 61.94	b 14400±36 00	b* 16400±29 25.74
G 3	a 5200±10 95.44	b 4400±74 8.33	b 15200±77 09.73	b* 5200±13 56.46	a 22800±54 25.86	b* 7200±12 00	b* 6800±10 19.80
G 4	-	a 7200±10 19.80	a 30800±56 07.13	a 32000±26 83.28	a 35200±83 06.02	b* 34800±71 51.22	a 23200±36 66.06

Different letters within a column indicated that there was significant difference between treatment groups ($P < 0.05$; * $P < 0.01$); SE=Standard error, N=5 chickens in each group; G1= Sonicate *E. tenella* oocyst (1mg/chicken); G2= Sonicate *E. tenella* oocyst (0.5mg/chicken); G3= Vaccine (Coccivac-D); G4= Positive control (infected); G5= Negative control.

2-Weight gain of birds:

Table (2) denoted that there was a significant decrease ($p < 0.01$) in the means of weight gain (888.8 g) in 1st group (1 mg/chicken), as compared with the negative control group (1130.4 g) at 28th day of age. Also, a significant decrease ($p < 0.01$) in the means of weight gain (874.6g and 1608.4 g) of the 3rd group (Coccivac-D) as compared with the negative control group (1130.4 g and 2057.2 g); while there was no significant decrease ($P > 0.05$) in other groups (2nd group-0.5 mg/chicken and 4th group-infected) as compared with the negative control group.

Table (2): Weight gain of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens

Age days Groups	14	21	28	35	42
G 1	139.8±5.75 a	390±35.75 a	888.8±42.18 b*	1636.8±141.65 a	2057.8±67.45 a
G 2	129.8±5.60 a	380.8±41.07 a	1157.2±34.03 a	1724.6±49.48 a	2083.4±62.71 a
G 3	115.8±34.64 a	297.2±30.39 a	874.6±25.76 b*	1415±71.44 a	1608.4±65.22 b*
G 4	150.6±7.06 a	422.6±13.63 a	1142.4±22.49 a	1518±76.06 a	1633.2±1717.2 a
G 5	141.4±14.41 a	383.8±27.58 a	1130.4±63.51 a	1610.8±105.5 a	2057.2±158.0 a

3-Weight of some internal organs:

Results in the table (3) indicated that there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the mean (46.53 g) of liver weight in the 3rd group (Coccivac-D) as compared with the negative control group (54.7 g); while there was no significant decrease ($P > 0.05$) was record for the other groups (1st, 2nd and 4th), as compared with the negative control group. The mean of heart showed a significant decrease in 2nd group (9.76g) and 3rd group (7.83 g) as compare with the negative control group (10.4 g). The mean of spleen (2.36 g) was showed a significant increase ($p < 0.05$) in the 4th group (infected), while there were no significant increase ($P > 0.05$) in the means of the remaining groups (1st, 2nd and 3rd) as compared with the control group (1.9 g).

DISCUSSION

The critical issues to be addressed include the identification of stage-specific antigens capable of inducing protective immunity and the delivery methods in a form that will stimulate an adequate protective immune response (14).

Generally accepted that body weight gain and fecal oocysts shedding are reliable clinical signs for the evaluation of vaccine efficacy and protective immunity in avian coccidiosis (15). Several means of breaking down the oocyst wall have been described including sonication (15). Oocysts production was reduced due to lack of tissue suitable for gametogony; Although gametocytes appeared little slightly affected, oocysts production was drastically reduced presumably due to a reduction in the number of parasites produced sexual stage (16).

Table (3): Weight of some internal organs of *Eimeria tenella* infection broiler chickens at 45th day.

Organs Groups	Liver	Heart	Spleen	Gizzard
	Mean \pm SE (g)			
G 1	53.6 \pm 0.80 a	9.06 \pm 0.69 a	2.7 \pm 0.45 a	58.8 \pm 3.98 a
G 2	51.46 \pm 0.83 a	9.76 \pm 0.23 b	2.4 \pm 0.23 a	62.9 \pm 3.77 a
G 3	46.53 \pm 1.50 b	7.83 \pm 0.35 b*	2.23 \pm 0.28 a	55.06 \pm 7.18 a
G 4	55.46 \pm 3.31 a	9.76 \pm 0.78 a	2.36 \pm 0.04 b	43.96 \pm 7.07 b
G 5	54.7 \pm 2.05 a	10.4 \pm 0.15 a	1.9 \pm 0.17 a	60.3 \pm 2.48 a

Different letters within a column indicated that there was significant difference between treatment groups ($P < 0.05$; * $P < 0.01$); SE=Standard error, N=5 chicks in each group; G1= Sonicate *E.tenella* oocyst (1mg/bird); G2= Sonicate *E.tenella* oocyst (0.5mg/bird); G3= Vaccine (coccivac-D); G4= Positive control (infected); G5= Negative control.

Yadar and Gupto (2007) reported that there is no formation of second stage schizonts, which are concerned with the induction of immunity to *E. tenella* infection (17). Another reason for the same might be that the infection challenge was given to broiler chickens, when they were of 4 weeks of age is insufficient time for solid immunity to develop to *E. tenella* infection; This might be due to the fact that different isolates of *E. tenella* may have different virulence, and might have different immunogenicity.

In the past, most, if not all, carried out in *E. tenella* have focused on describing transcripts from merozoites and sporozoites because these 2 stages ultimately lead to the formation of the large maturing schizonts that are responsible for most of the pathology in the host. Sporulated oocysts and sporozoites share many of the same transcripts because essentially the sporulated oocyst contains 8 sporozoites. Even though many transcripts are shared between these 2 stages, more than half

of the sequences transcribed by sporulated oocysts have not been previously isolated from either merozoites or sporozoites and may represent genes whose expression may be limited to the sporulated oocysts. In contrast to genes expressed by sporulated oocysts, the vast majority of transcripts expressed by unsporulated oocysts have not been previously isolated from either sporozoites or merozoites; because unsporulated oocysts represent a fertilized, undifferentiated stage of the life cycle, which is very different from the highly differentiated, invasive sporozoites and merozoites, morphologically as well as physiologically; One of the most abundant transcripts isolated from sporulated oocysts encodes the *E.tenella* microneme protein (EtMIC-1), which accounts for 6.7% of all sequences recovered from sporulated oocysts. Two other transcripts that encode microneme proteins 2 and 5 were also isolated; however, these account for only 0.9% of all sequences isolated from sporulated oocysts (18). Microneme proteins are localized to the

microneme, an organelle that plays an important role in parasite invasion (19). Expression of microneme genes was detected from hour 12 of sporulation and was maintained through 48 hr; however, transcripts were not detected in unsporulated oocysts (20). Transcripts encoding 3 different microneme genes were detected only in cDNA of sporulated oocysts (18).

Nonetheless, the occurrence of subclinical coccidiosis in local chickens may be attributed to repeated exposure to different species of *Eimeria* as chickens maintain their immunity to a species of *Eimeria* by repeated re-exposure; Immune chickens upon reinfection become carriers and eliminate oocysts into the environment for long periods (21).

The existence of genetic variation in resistance to coccidiosis among breeds and strains has been reported (22,23). Our conclusion was conducted that the use of sonicate sporulated oocysts of *E. tenella* reduce the oocysts excretion and increase the body weight in broiler chickens.

REFERENCES

1. Mehlhorn H. (2001). Encyclopedic reference of parasitology. 2nd ed. Springer Press.
2. Pinard-Vanderlaan MH. ; Bedhom B, Coville JL, Pitel F, Feve K, Leroux S, Legros H, Thomas A.; Gourichon D.; Reperant J M. and Rault P. (2009). Microsatellite mapping of QTLs affecting resistance to Coccidiosis(*Eimeria tenella*) in a Fayoumi×White Leghorn cross. BMC Genom. 10:31-36.
3. Tipu MA.; Pasha TN. and Ali Z. (2002). Comparative efficacy of salinomycin sodium and neem fruit (*Azadirach toinfica*) as feed additive anticoccidials in broilers. Int. J. Poult. Sci. 1: 91-93.
4. Ayaz MM.; Akhtar M , Hussein I, Muhammed F. and Haq AU. (2008). Immunoglobulin producing cells in chickens immunized with egg propagated *Eimeria tenella* gametocyte vaccine. Vet. Medecina. 53: 207-213.
5. Fanatico A. (2006). Parasite management for natural and organic poultry Coccidiosis. National Center for Appropriate Technology (NCAT).
6. Vermeulen AN.; Schaap DC. and Schetters TP. (2001). Control of coccidiosis in chicken by vaccination. Vet. Parasitol. 100: 13-20.
7. Williams RB. (2002). Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). Avian Dis. 46: 375-802.
8. Chapman HD.; Cherry TF.; Danforth HD, Richard G. , Shirley MW, and William RB. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: The role of live vaccines. Int. J. Parasitol. 32: 617-629.
9. Lillehoj HS.; Win W. and Dalloul RA. (2004). Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. Poult. Sci. 83: 611-623.
10. Wilson PA. and Fairbairn D. (1961). Biochemistry of sporulation in oocysts of *Eimeria acervulina*. J. Protozool. 8 (4): 410-416.
11. Conway DP. and McKenzie ME. (2007). Poultry coccidiosis: Diagnostic and testing procedures. 3rd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 164.
12. NRC (National Research Council). (1994) Nutrients Requirements of Poultry. 9th ed. National Academy Press, Washington D.C. 974-990.
13. Al-Mohammed NT.; Al-Rawi KM.;Younis MA. and Al-Morani WK.(1986). Principles of statistics .Baghdad University:120-122.
14. Frolich S.; Entzeroth R. and Wallach M. (2011). Comparison of protective Immune responses to Apicomplexan parasites. J. Parasitol. Res. 20(12):1-11.
15. Lee SH.; Lillehoj HS.;Dalloul RA.; Park DW.; Hong YH. and Lin J J.(2007). Influence

of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86(1): 63-66.

16. Chappel LR. (1973). The Effect of *Histomonas meleagridis* on development of *Eimeria tenella*. *J. Parasitol.* 59(4): 637-643.

17. Yadar A. and Gupta SK. (2007). Effect of ionophorus on immunity to *Eimeria tenella* field isolation. *Ind. J. Anim. Sci.* 41(1): 43-46.

18. Miska KB.; Fetterer RH. and Barfield RC. (2004). Analysis of transcript expressed by *Eimeria tenella* oocyst using subtractive hybridization methods. *J. Parasitol.* 90(6):1245-1252.

19. Tomley FM. and Soldati DS.(2001). Mix and match module: Structure and function of microneme proteins in Apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 17: 81-88.

20. Ryan R.; Shirley M. and Tomley F.(2000). Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella* .*Int. J. Parasitol.* 30:1493-1499.

21. Hadipour MM.; Olyaie A.; Naderi M.; Azad F. and Nekouie O. (2011). Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens, Shiraz, Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5(20): 3296-3299.

22. Mc-Dougald LR. (2003). Coccidiosis, In: *Disease of Poultry*; Saif YM. ;Barnes HJ. ;Glisson JR.; Fadly AM., Mc Dougald LR .and Swayne DE.(ed). Iowa State University Press, Ames, Iowa. 974-991.

23. Ashenafi H.; Tadesse S.; Medhin G. and Tibbo M. (2004). Study on coccidiosis of scavenging indigenous chickens in central Ethiopia. *Trop. Anim.Health Prod.* 36:693-701.

Isolation of *salmonella* spp. from human urine in Iraqi patients.**Aseel M. Hamzah, Jenan M. Khalaf & Ibrahim A. Al- Zubaidy***Zoonotic disease unit / veterinary medicine college / Baghdad University - Iraq**E-mail: aseelm30@yahoo.com***ABSTRACT**

This study was aimed to investigate the presence of *Salmonella* spp. in urine samples from patients suffering from urinary tract infection (UTI). Out of (111) urine samples, (51) were males and (60) females with their ages ranged from (10-55) years suffering from urinary tract infection with and without typhoidal symptoms were collected from different places of Baghdad in AL-Bayia, AL-Hurria side lab and Al-Forat hospital in Al-Jihad quarter.

The urine samples were carried out into laboratory of zoonotic disease unit at veterinary medicine college-Baghdad university the samples were centrifuged then sediment inoculate into selenit broth at 37°C for 24 hr. after that one loopfull streaked into selective media then the isolated confirmed by routine biochemical test include urease, citrate utilization, catalase, indole, hydrogen sulphide production, methyl red Voges-Proskauer (MRVP) sugar fermentation tests.

The result showed that the percentage of isolated of *Salmonella* was 25 (22.5) % and 86 (77.5%) were found positive and negative respectively for *Salmonella* isolate from total samples from which ten male urine samples cultured positive (40%) with age range from (13-44 years) and fifteen female urine samples (60%) with age ranged (10-55 years) and there is a relationship between degree of urine clearance and bacterial isolated we also observed that *Salmonella* spp. isolate in the 20-45 years age group were more common than those in the 10-20 years age and elderly and finally the infected percentage in women more than mean.

Key words: *Salmonella*, Urinary tract infection, Typhoid fever, Non-typhoid fever.

الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة الى عزل جرثومة السالمونيلا من (111) عينة أدرار تضمنت (51) عينة ادرار ذكور و (60) عينة ادرار أناث لمرضى يعانون من التهاب المسالك البولية تراوحت اعمارهم (10-55 سنة) جمعت العينات من مختبرات أهلية في مناطق البياع و الحرية ومستشفى الفرات في حي الجهاد في منطقة بغداد.

تم نقل العينات الى مختبر الامراض المشتركة لكلية الطب البيطري في جامعة بغداد وبعد اجراء المنبذ المركزي للعينة زرع الراسب على وسط السلينايت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة بعد ذلك نقلت قطرة من العالق الجرثومي بواسطة الحامل الجرثومي على الاوساط الزرعية الصلبة الخاصة وبعد حضن الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة اجريت الفحوصات الكيمحيوية التوكيدية للبكتريا منها فحص اختزال اليوريز واستهلاك السترات و الاندول وفحص الحركة و الكاتليز و الفوكس بروسكاور و المثل ريد و تخمر السكريات .

أظهرت النتائج الى عزل جرثومة السالمونيلا بنسبة (22.5%) ايجابية لـ (25) عينة ادرار منها (10) عينات ادرار ذكور (40%) ايجابية لـ اعمار تراوحت بين (13-44) و (15) عينة ادرار أناث (60%) ايجابية لـ اعمار تراوحت بين (10-55) و (77.5%) سلبية لـ (86) من مجموع (111) عينة.

وجد أن هنالك علاقة بين درجة عكارة البول و نسبة العزل و كانت نسبة الاصابة اكثر شيوعا في الاعمار من 20 الى 45 سنة من 10 الى 20 سنة و كبار السن وان نسبة الاصابة في الاناث اكثر من الذكور.

INTRODUCTION

Salmonellosis is a major cause of morbidity and mortality in developing world with an estimated about 21.5 million cases occurring annually with Typhoid fever and 48 million cases with Foodborne illness in year 1997 and 2010 respectively (1,2).

About 10% of people suffering from urinary tract infections (UTI) during their life time It is serious ailment in human due to the frequency, recurrence and difficulty in eradication UTI (3).

Urinary tract infection (UTI) due to nontyphoidal strains of *Salmonella* is uncommon and usually develops in an individual with a predisposition(4,5,6). *Salmonella* species heretofore reported to cause UTI include *S.typhimurium*, *S. typhi*, *S. manhattan*, *S. oranienburg*, *S. saint-paul*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. enteritidis*, *S.newport*, *S. agona*, *S. thompson*, *S. montevideo*, *S.anatum*, *S. derby*, *S.javiana*, *S.panama* and *S. blockley*. *Salmonellae* infect the urinary tract either by direct urethral invasion followed by ascending infection or by hematogenous spread. The most common route outside of the neonatal period is presumed to be ascending infection (7).

Salmonella spp. are transmitted courtesy of fecal-oral spread and often gain access to the body as a consequence of ingestion of vast majority contaminated food or water ,Although most infections cause mild-to-moderate self-limited illness ,serious disease resulting in severe diarrhea and death does occur (8,9). Outbreaks of nontyphoidal *Salmonella* infections and sporadic illness have been associated with a variety of causes, particularly foods of animal origin (e.g., beef, poultry, eggs, and dairy products) also implicated are fruits and vegetables that have been contaminated with animal manure and contact with animals, including reptiles (10 -16). In addition extraintestinal illnesses due to *Salmonella* have been reported. Among these illnesses are urinary tract infections (UTIs) due to nontyphoidal *Salmonella* serotypes which causes acute gastroenteritis and bacteraemia occur as a complicated and subsequent focal infection occur (17,18) resulted in urinary tract infection (UTI) or via contamination of the distal urethra by fecal flora and secondary intraluminal ascending infection (19,20) , although alteration of the normal structure of the urinary tract is also a predisposing

factor(21-26) , Some strains of *Salmonella* are found more often in the urine of the infected person than in the stools. When *Salmonella* is found in the urine, the patient most often has a *Salmonella*-associated (UTI) (2) Besides Chronic illness and immunosuppressive therapy play an important role in the pathogenesis of UTI (19) .

The purpose of this study was to detection of *salmonella spp.* in urine specimens collected from patients with urinary tract infection (UTI) and clarification of the role various groups of *salmonella* play in UTIs seems warranted.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection: Over a 6-month period, multiple urine specimens were received from 111 patients suffering from urinary tract infection who either attended the Outpatients clinic from AL-Bayia, AL-Hurria side lab or were hospitalized from Al-Forat hospital in Al-Jihad quarter these urine samples included (51) male and (60) female .

Specimen processing: The urine was centrifuged at 3,000 x g, and the supernatant had been discarded and sediment cultured into selenite broth incubated for 24 hr at 37C°, then inoculated one loop full from selenite broth to selective media salmonella-shigella agar and XLD agar , Bismuth Sulfite Agar (BSA) and incubated at 37C° for 24hr, for recovery of isolates of *Salmonella*. Morphological characteristics and biochemical reactions of recovered isolates were studied. The biochemical tests carried out were urease, citrate utilization, catalase, indole, hydrogen sulphide production, methyl red Voges-Proskauer (MRVP) sugar fermentation tests(27).

RESULTS

Out of (111) total samples of patients suffering from urinary tract infection with different degree of turbidity as shown in table (1) that illustrates the main features of these 25 urine samples that the percentage of isolated of *Salmonella* was (22.5) % from which ten male urine samples cultured positive (40%) with age range from (13-44years) and fifteen female urine samples (60%) with age ranged (10-55 years) .

Salmonella spp. isolate in the 20–45 years age group were more common than those in

the 10-20 years age and elderly and the female more common infected than male.

The degree of turbidity ranged from (+ - +++) which mean the degree of the urine clearance that (+) refers to cloudy ,(++) means

turbid,(+++) very turbid and (++++) opaque urine sample in both sexes.

Table (1): the age, sex and degree of turbidity in patient suffering from UTI infection with *salmonella* isolate.

Case number	Patient age/sex	Degree of turbidity	<i>Salmonella spp.</i> isolated from urine culture
1.	40/F	++	+ve
2.	10/F	++	+ve
3.	40/F	+	+ve
4.	35/M	++	+ve
5.	17/F	++	+ve
6.	32/M	+	+ve
7.	27/F	++	+ve
8.	44/M	++	+ve
9.	27/F	++	+ve
10.	30/F	+++	+ve
11.	55/F	++++	+ve
12.	20/F	++	+ve
13.	25/M	++	+ve
14.	30/M	++	+ve
15.	40/F	++	+ve
16.	32/F	+	+ve
17.	45/F	+++	+ve
18.	31/M	++	+ve
19.	22/F	++	+ve
20.	30/F	++	+ve
21.	35/F	+	+ve
22.	30/M	+	+ve
23.	18/M	+	+ve
24.	35/M	++	+ve
25.	13/M	++++	+ve

F: female ; M: male ; + = degree of turbidity (cloudily) that(+) mean unclear (++) mean turbid,(+++) mean very turbid,(++++) mean opaque ; +ve = positive

DISCUSSION

This is the first time that to investigation and isolation of *Salmonella spp.* in urine was carried out in Iraq because there is no such study have been conducted.

The urine fraction contains most of the nutrients and only a minor proportion of the heavy metals and constitutes less than 1% of the volume, making it suitable for nutrient recycling (28) so that the pathogen found in urine like *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* .

The estimated prevalence of Urinary tract infection (UTI) due to *Salmonella spp.* is 22.5% (proportion of positive urine cultures) is higher than that reported by (29,30), This association related to serogroup of Non-Typhoidal *Salmonella*(30) also these result findings support similar data from other investigations reported around the world (6,31-35) while the results did not agree with (5,19 ,36) who recorded prevalence as 75% ,75% and 77%, respectively the higher percentage of isolate related with Immunocompromised conditions , structural Abnormality and AIDS patient (5,19,30, 33). On the other hand most patients of whom had received some antibiotic

therapy before presentation lead to no salmonella isolate in urine (37).

In the current study, the patients were classified according to age, gender and districts. Although we found no differences in *Salmonella* isolates in mean ages among patients, *Salmonella spp.* isolate in the 20–45 years age group were more common than those in the 10–20 years age and elderly. In addition, we observed a significantly isolated in the mean age of 20–45 years may be associated with the fact that this age of infected patients are more worker and travel although *Salmonella* can invade the joint and cause arthritis and there is no drug reach to the site when it hided so can carry the *Salmonella* for many years even if they recover from the initial disease. In terms of gender, there were increased the infection in female than in male this result may be associated with short urethra is considered to be a primary risk factor and the immune system in female depressed resulted from pregnancy, lactating period, chemical therapy due to breast cancer in female more than in male.

The isolation of *Salmonella* from urine specimens is unusual, urinary tract infection because of *Salmonella* may be related to bacteremia (19) and colonization of bacteria in urinary tract. Especially if uses prolong antimicrobial shedding through urine or ascending infection due to contamination by fecal bacteria from distal urethra.(9) Beside there is Common predisposing situations include immunodeficiency, structural abnormality of the urinary tract, nephrolithiasis, indwelling urinary catheter or other foreign body, pregnancy, chronic illness and overactive sexual activity. Our finding there is a relationship between cloudy urine and *salmonella* isolated (10) who isolate *Salmonella enterica* from infant and find that The mean age of persons infected with the 20 years are most common *Salmonella* serotypes ranged from 18 to 33 years agreement with our finding.

CONCLUSION

The *Salmonella* shedding in urine so that *Salmonella* test has been adapted for the testing of urine.

1. Bacteriological culture could be done on the urine to confirm diagnosis in addition to widal test and stool culture.
2. Women infected more than male.
3. The mean infected aged was 20–45 years in both sexes.

4. There is a relationship between urine turbidity and bacterial isolate.

REFERENCES

1. Center for Disease Control and Prevention.(2010). Foodborne disease outbreaks annual summary. CDC, Atlanta, GA.
2. Manuel L.; Guerrero F.; Ramos JM.; Nuñez A.; Cuenca M. and de Goñigolas M.(1997). Focal Infections Due to Non-typhi *Salmonella* in Patients with AIDS: Report of 10 Cases and Review. *Clin. Infect. Dis.*25:690–697.
3. Arjunan M.; Al-Salamah AA; and Amuthan M. (2010). Prevalence and Antibiotics Susceptibility of Uropathogens in Patients from a Rural Environment, Tamilnadu. *Am.J. Infect. Dis.* 6 (2): 29-33.
4. Cohen JL; Bartlett JA; Corey GR. (1987). Extra-intestinal manifestations of salmonella infections. *Medicine (Baltimore)*. 66(5):349-388.
5. Shobha K.; Dsouza A.; Mridula M. and Gowrish SR.(2012). Urinary Tract Infection Due to *Salmonella* Typhimurium in a HIV Seropositive Adult Male: A Case Report. *J. Admin. Int. Med. Molec. Med.* [URL:http://www.webmedcentral.com/article_view/2930](http://www.webmedcentral.com/article_view/2930) ;3(1):WMC002930.
6. Allerberger FJ., Dierich MP, Ebner MR. Keating JM. Steckelberg PK. and Anhalt JP. (1992). Urinary tract infection caused by nontyphoidal *Salmonella*: report of 30 cases. *Urol. Int.* 48:395–400.
7. Alexander KCL, Pion KC and William L M R.(2005). Urinary Tract Infection Due to *Salmonella* Stanleyville in an Otherwise Healthy Child; *J. Nation.Med.Assoc.* 97(2): 281-283.
8. Zhang S.; Kingsley RA.; Santos RL.; Andrews-Polymenis H.; Raffatellu M.; Figueiredo J.; Nunes J.; Tsolis RM.; Adams LG. and Bauml AJ. (2003). Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infect. Immun.*71(1):1-12.
9. Mermin J.; Hoar B.; Angulo FJ.(1997). Iguanas and *Salmonella* Marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics*. 99:399–402.
10. Mahon BE.; Ponka A.; Hall WN.; Komatsu K.; Dietrich SE.; Siitonen A.; Cage G.; Hayes PS.; Lambert-Fair MA.; Bean NH.; Griffin PM.; and Slutsker L.(1997). An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J Infect Dis*. 175:876–82.

11. Austin CC. and Wilkins MJ.(1998). Reptile-associated salmonellosis. *J. Am. Vet Med Assoc.*212:866–867.
12. Mead PS.; Slutsker L.; Dietz V.; McCaig LF.; Bresee JS.; Shapiro C.; Griffin PM. and Tauxe RV. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.
13. Beneden CAV.; Keene WE.; Strang RA.; Werker DH.; King AS.; Mahon B.; Hedberg K.; Bell A.; Kelly MT.; Balan VK.; Mac Kenzie WR. and Fleming D.(1999). Multinational Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport Infections Due to Contaminated Alfalfa Sprouts. *JAMA.* 281(2):158-162
14. Voetsch AC.; Gilder TJV.; Angulo FJ.; Farley MM.; Shallow S.; Marcus R.; Cieslak PR.; Deneen VC.; and Tauxe RV.(2004). FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 38 (Supplement 3): S127-S134 .
15. Mody RK.; Greene SA.; Gaul L.; Sever A.; Pichette S.; Zambrana I.; Dang T.; Gass A.; Wood R.; Herman K.; Cantwell LB.; Falkenhorst G.; Wannemuehler K.; et al. (2011). National Outbreak of *Salmonella* Serotype Saintpaul Infections: Importance of Texas Restaurant Investigations in Implicating Jalapeño Peppers. *PLoS ONE*6(2):e16579. doi:10.1371/journal.pone.0016579.
16. Curve E. (2012).Investigation Update : Multistate outbreak of Human *Salmonella typhimurium* infection linked to ground beef. CDC, Atlanta ,G A.
17. Hohmann EL.(2001). Nontyphoidal Salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* 32:263–269.
18. Dione M.(2010). Epidemiology of Non-Typhoidal *Salmonella* (Nts) in Humans and Animals in the Gambia and Senegal. *Tropicultura* .28 (4) 253-256.
19. Ramos JM.; Aguado JM.; Garcia-Corbeira P. ; Ales J.M. and Soriano F.(1996). Clinical Spectrum of Urinary Tract Infections Due to Nontyphoidal *Salmonella* Species. *Clin. Infect. Dis.* 23:388-390.
20. Leung AKC.; Kao CP. and Robson WLM.(2005). Urinary Tract Infection Due to *Salmonella* Stanleyville in an Otherwise Healthy Child. *J. Nation.Med.Asso.*97(2):281-283.
21. Saphra I. and Winter JW.(1957). Clinical manifestations of salmonellosis in man:an evaluation of 7,779 human infections identified at the New York *Salmonella* Center. *N Engl J Med* 256:1128-1134.
22. Melzer M.; Altmann G.; Rakowszczyk M.; Yosipovitch ZH. and Barsilai B.(1965). *Salmonella* infection of the kidney. *J Urol.* 94:23 - 27.
23. Dupuis F.; Vereerstraeten P.; van Geertruyden J.; Kinnaert P.; Schoutens E. and Toussaint C.(1974). *Salmonella typhimurium* urinary infection after kidneytransplantation: report of seven cases. *Clin Nephrol.* 2:131-135.
24. Hagood PG. and Steinhardt GF.(1988). *Salmonella* urinary tract infection associated with ureteropelvic junction obstruction. *J Urol* 1988; 140:351-352.
25. Gruenewald R.; Blum S. and Chan I. (1994). Relationship between human immunodeficiency virus infection and salmonellosis in 20- to 59-year-old residents of New York City. *Clin Infect Dis.*18:358-363.
26. Ramos JM.; Garcia-Corbeira P.; Aguado JM.; Arjona R.; Ales JM. and Soriano F.(1994). Clinical significance of primary vs. secondary bacteremia due to nontyphoid *Salmonella* in patients without AIDS. *Clin Infect Dis* 19:777-780.
27. Quinne PJB.; Carter ME.;Markey PK. and Carter JR.(2006).clinical vet.Micro.London Mosby-WOLF.PP:284-286.
28. Vinnera° sB., Palmquist H., Balme´ r P., Jo´ nsson H. (2006). The characteristics of household wastewater and biodegradable solid waste – a proposal for new Swedish design values. *Urb. Water J.* 3 (1), 3–11.
29. Wilkins EGL., and Roberts C. (1988). Extraintestinal salmonellosis. *Epidemiol. Infect.* 100:361–368.
30. Vugia DJ.; Samuel M.; Farley MM.; Marcus R.; Shiferaw B.; Shallow S.; Smith K.; and Angulo FJ. (2004).Invasive *Salmonella* Infections in the United States,FoodNet, 1996–1999: Incidence, Serotype Distribution,and Outcome.*Clin. Infect. Dis* .38(Suppl 3):S149–156.
31. Embil JM., and Nicolle LE. (1997). *Salmonella* urinary tract infections associated with exposure to pet iguanas. *Clin. Infect. Dis.* 25:172.
32. Glynn MKC, Bopp WDP, Dabney MM, and Angulo FJ. (1998). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* 338:1333–1338.
33. Paterson DL., Harrison MW, and Robson JMB. (1997). Clinical spectrum of urinary tract infections due to nontyphoidal *Salmonella* species.*Clin. Infect. Dis.* 25:754.

34. Oplustil CP.; Nunes R. and Mendes C.(2001). Multicenter Evaluation of Resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from Clinical Specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. *Braz. J. Infec. Dis.*..5(1):8-12.
35. Zaidenstein R.; Peretz C.; Nissan I.; Reisfeld A.; Yaron S; Agmon V. and Weinberger M.(2010). The epidemiology of extraintestinal non-typhoid *Salmonella* in Israel: the effects of patients' age and sex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* . 29:1103–1109.
36. Chaicumpa W.; Ruangkunaporn Y. ; Burr D.; Chongsa-Nguan M. and Echeverria.P. (1992). Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine. *J. Clin. Microbiol.* 30(9):2513-2515.
37. Rockhill RC.; Rumans LW.; Lesmana M. and Dennis DT. (1980). Detection of *Salmonella typhi* D, Vi, and d Antigens, by Slide Coagglutination, in Urine from Patients with Typhoid Fever. *J. Clin. Microbiol.* 11(3): 213-216

Production of bioflocculant from *Bacillus apiarius* and its ability to remove pollutants from the river water.

Shamim N. Radhi, Alyaa R. Hussein & Sana'a Burhan alden

Dept. of Biology/ College of Science /Baghdad University- Iraq

E-mail: shamam_bio@yahoo.com

ABSTRACT

Different soil samples were screened for *Bacillus apiarius* isolates capable of producing bioflocculants. Out of the fifteen isolates obtained, five isolates were grown on starch broth media and gave flocculating activity for kaolin suspension and one isolate *Bacillus apiarius* was selected for further studies depending on its highest flocculating activity 25%. The effects of cultural conditions: pH, production media and temperature were investigated on the production of bioflocculant by this isolate. Among three different media (starch medium, Molasse and whey medium) starch medium was selected as a best production media depending on flocculating activity 24%. The optimum pH for bioflocculant production was pH 9 flocculating activity was 30% and the optimum temperature was 37°C flocculating activity was 29%. *B. apiarius* bioflocculant was tested for its ability to remove four bacterial species spiked in river water the removal activity differ from one species to another the highest removal was to *Klebsiella pneumoniae* 25% then *Staphylococcus epidermidis* 22% and for *Staphylococcus aureus* was 17% while there where no removal for *Escherichia coli*. The efficiency of bacterial bioflocculant to remove three heavy metals (Zn^{+2} , Pb^{+2} and Fe^{+2}) was studied the highest removal was 89% for Zn^{+2} and 87% for Pb^{+2} while for Fe^{+2} was 79%.

Keywords: *Bacillus apiarius*, bioflocculant, whey medium, Molasse, heavy metals, flocculating activity.

الملخص باللغة العربية

تم غربلة عينات مختلفة من التربة لغرض الحصول على عزلات من بكتريا *Bacillus* قادرة على انتاج الملبد الحيوي ومن بين خمسة عشر عزلة اظهرت خمسة عزلات فقط من *Bacillus* نموا في وسط النشاء المغذي واعطت فعالية التلبد في عالق الكاولين انتخبت العزلة (*Bacillus apiarius*) والتي اعطت اعلى فعالية تلبدية في عالق الكاولين (25%) لمزيد من الدراسة . درس تأثير اوساط وظروف مختلفة في انتاجية الملبد الحيوي من قبل بكتريا *Bacillus apiarius* ومن بين ثلاثة اوساط انتاجية وهي (وسط النشاء والمولاس والشرش) اختير وسط النشاء المغذي حيث اعطى اعلى انتاجية للملبد الحيوي وبفعالية تلبدية 24% وقد اعطى الرقم الهيدروجيني 9 اعلى انتاجية للملبد الحيوي حيث وصلت الفعالية التلبدية الى 30% في حين بلغت الحرارة المثلى لانتاج الملبد الحيوي 37 وبفعالية تلبدية 29%. درست قابلية مادة التلبد على ازالة البكتريا الملوثة لماء النهر حيث اختبرت قابليته على ازالة اربعة انواع وهي: *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* وقد بلغت اعلى نسبة ازالة 25% لبكتريا *K. pneumoniae* وتلتها 22% لبكتريا *S. epidermidis* ومن ثم 17% لبكتريا *S. aureus* في حين لم تظهر اي ازالة لبكتريا *E. coli* . كذلك درست قابلية الملبد الحيوي على ازالة العناصر الثقيلة (Zn^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+2}) كانت اعلى نسبة ازالة لعنصر الخارصين Zn^{+2} 89% تلاها الرصاص Pb^{+2} 87% ومن ثم الحديد Fe^{+2} 79%.

INTRODUCTION

Microbial flocculants (MBFs) are special natural organic macromolecule substances that can flocculate suspended solids, cells, colloidal solids, etc. (1). With the advantages of high efficiency and biodegradability over traditional flocculants, MBFs have been paid more and more attention recently (2). However, in contrast to the well-known mechanisms of traditional flocculants, the flocculations mechanisms of MBFs are not entirely clear (3).

Flocculants are either cationic or anionic charged and are available in wide range of the molecular weights, the purpose of the flocculant is to neutralize the like charges in suspension by coagulating and flocculating them into large size. The larger is the particle size the faster is the settling rate, hence improved the settling and cleaner the supernatant are achieved rapidly. Owing to presence of negative surface charges on this particle, the electrostatic repulsion overwhelms the Van der Waals attractive forces, preventing aggregation, by adding positively charged flocculants that neutralizes the negatively charged particles allowing the particles to colloid aggregate as floc (4).

Removal of toxic heavy metals from industrial waste waters is essential from the standpoint of environmental pollution control (5). There are several reports on potential of various species of bacteria, fungi, algae and plants (6,7) to absorb metals. A number of heavy-metal removing bacterial bioflocculants have also been studied (8-11) due to them being environmentally friendly, biodegradable and non-toxic. The fact that these bioflocculants have higher efficiencies at low metal concentrations makes them very attractive for the removal of heavy metals from industrial effluents/wastewaters (12).

MATERIALS AND METHODS

Samples collection

Five samples of soil were collected from depth 12cm from different locations in Baghdad near river in sterilized nylon sacs and transported to the laboratory.

Isolation of bacteria

One gram of each soil sample was suspended in 20ml sterilized distilled water in sterile flasks, agitated vigorously in shaker water bath at 80°C for 10min. Serial dilutions for each sample were set up, then 0.1 ml of each dilution was spread on a nutrient agar plates,

and incubated aerobically at 37°C for 24 hrs. Bacterial colonies were transferred and purified by sub-culturing on nutrient agar for many times until obtained pure isolates which were subjected for microscopic examination bacteria was identified depending on microscopic examinations and biochemical tests.

Screening of bioflocculant producing isolates in starch broth medium

Starch broth medium that composed of 0.1%KH₂PO₄, 0.3%K₂HPO₄ and 0.051% NH₄Cl and 1% starch was prepared in a final volume of 50ml in 250 ml Erlenmeyer flasks; pH was adjusted to 7.2 sterilized then inoculated with 0.5ml (OD=0.35) of bacterial isolates suspension and incubated at 37°C for 48hr. After incubation period, cells were separated by normal centrifugation at 6000rpm for 30 min and flocculating activity was measured in the supernatant for each isolate (13).

Flocculating activity (flocculation test)

The flocculating activity was measured according to the method of (14) using a suspension of kaolin clay that prepared by suspending 5 g of kaolin clay in 1L of D.W. the pH was adjusted to 7. Bacterial isolates were inoculated in 50 ml of starch broth medium and incubated at 37°C for 48 hrs, cells were precipitated by centrifugation at 6000rpm for 30 min, and 0.5 ml of cell free supernatant was added to 45 ml of kaolin suspension (containing 4.5 ml of 1%CaCl₂ solution) in 100 ml beaker. The mixture was vigorously stirred for 20s and left to stand, without shaking, for 5 min. The absorbance of upper phase of the sample (A) was measured by the spectrophotometer at 550 nm. A control was prepared using the same method, but the cell free supernatant was replaced by distilled water (B). The flocculating activity was calculated according to the equation:

$$\text{Flocculating activity (\%)} = ((O.D_B - O.D_A) / O.D_B) \times 100$$

Where:

O.D_A: is the optical density of the sample experiment at 550 nm

O.D_B: is the optical density of control experiment at 550 nm

Effect of different conditions on bioflocculant production:

Production of bioflocculant in different media

Bacterial isolate was activated in nutrient broth and incubated at 37°C for 18hr. 50ml of different production media including starch broth medium, Molasse medium (used as carbon source instead of starch in starch broth medium) and whey medium (prepared according to (15) composed of 0.1% yeast extract, 0.05% K₂HPO₄ and 0.01% NH₄Cl, Malt extract and 0.01% MgSO₄ the components was dissolved in 100ml of whey; pH was adjusted to 7.2 and autoclaved at 121°C for 10 min.) were inoculated with 0.5 ml of bacterial suspension (OD=0.35 at 600nm) and incubated at 37°C for 48 hr, after incubation period flocculating activity was measured.

Effect of pH

To observe effect of pH on production of production 50ml of starch broth media were prepared at different pHs (4, 7 and 9) adjusted with 1N HCl or 1N NaOH and autoclaved (13).

Effect of temperature

Fifty ml of each starch broth media at pH 9, were inoculated with 0.5 ml of activated bacterial suspension (OD=0.35) and incubated at different temperatures (30°C, 37°C and 50°C) for 48 hrs, after incubation period flocculating activity was measured.

Determination of bioflocculants' flocculating activity in river water spiked with different bacterial species

To determine the removal of specific bacterial group from the river water using the bacterial bioflocculants (16) method was depended with little modification; river water used in this study was collected from Tigris River in a sterilized bottle. The bottle was first rinsed with water from the source before collecting the water sample by holding the bottle at the bottom and plunging it below the water surface. The mouth of the bottle was placed opposite the water current. If there was no current, it was created artificially by pushing the bottle forward. Forty five ml of river water was mixed with 4.5 ml of CaCl₂ solution in 100 ml beaker; the pH was adjusted to 9 then sterilized by autoclaving and allowed to cool. One millilitre of standardized culture (OD of 1 at 550 nm) of Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) were separately used

to spike the river water before adding bacterial bioflocculant.

Bacillus isolate was grown in 50 ml starch broth medium for 48 hrs, at 37°C, cells were removed from cultured broth by centrifugation at 6000 rpm for 30 min, and then 1 ml of cell free supernatant was added to the sample of river water. The mixture was vigorously stirred for 20 sec and left to stand, without shaking, for 2h. The turbidity of the sample supernatant was measured with a spectrophotometer at 550 nm and percentage removal was determined by comparing the estimated values to that of the control (river water without bioflocculant). The flocculating activity was calculated according to the equation:

$$\text{Flocculating activity (\%)} = ((O.D_B - O.D_A) / O.D_B) \times 100$$

Where:

O.D_A: is the optical density of the sample experiment at 550 nm

O.D_B: is the optical density of control experiment at 550 nm

Heavy metal removal efficiency of bacterial bioflocculant

The efficiency by which bacterial bioflocculant removed heavy metal was determined using the modified method described by (17) using heavy metals without kaolin clay. One ml from bacterial bioflocculant was suspended in 20ml of different heavy metal solutions (Zn⁺², Pb⁺² and Fe⁺²) in a concentration of 150 µg/ml for 2hr. The heavy metal concentrations were measured using Atomic Absorbance Spectrometer (18).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of *Bacillus*

Fifteen isolates of bacteria were obtained from local soil and identified as *bacillus* spp when subjected to morphological and microscopic tests (19).

Screening of bioflocculant producing isolates

In order to determine the ability of bacterial isolates to produce bioflocculant in liquid medium, broth culture of fifteen bacterial isolates were inoculated in starch broth media and screened on the basis of flocculating activity of bioflocculant in kaolin suspension.

The results showed that only five isolates of *Bacillus* were grown on starch broth media and gave flocculating activity for kaolin suspension. Among them *Bacillus apiarius*

gave the highest flocculating activity for kaolin suspension (25%), figure (1). According to these results, the isolate B3 was selected for further study.

Bacillus subtilis was found producing an extracellular flocculant in a large quantity with flocculating activity reached to 60% (20). While *B. mucilaginosus* produced bioflocculant with flocculating activity reached to 90%.

Effect of production medium

B. apiarius B3 was grown in different production media one synthetic media (starch medium) and two natural media (whey and Molasse) to determine the best medium for bioflocculant production. Results indicated in figure (2) showed that *B. apiarius* B3 was able to effectively grow in starch broth medium and production of bioflocculant with flocculating activity (24%), while less flocculating activity was observed in whey medium (5%) and there was no flocculating activity with molasses medium.

The mineral salts broth composed of starch, NH_4Cl , K_2HPO_4 and KH_2PO_4 was the best medium for bioflocculant production. Starch is an inexpensive substrate; NH_4Cl was the preferred and most cost-effective nitrogen source. K_2HPO_4 and KH_2PO_4 were used as a buffer to stabilize the pH of the production medium during the fermentation process, with optimal concentrations 3 g/l and 1 g/l, respectively (13).

There were no previous literatures in using whey or molasses as natural media in bioflocculant production so this study attempts to use them. The use of alternative regional low cost substrates has become very interesting because the ease of acquisition in addition to its low cost thus in this study two natural media were used. In comparing the flocculating activity in starch medium with whey medium it's very low this may attributed to the presence of nitrogen compounds in this medium at a level causing reduction in flocculating activity also the excess minerals and nitrogen constituents in the molasses may inhibit bioflocculant production.

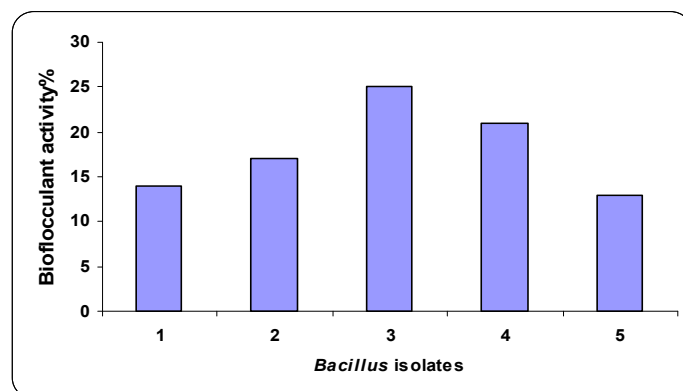


Figure (1): Production of bioflocculants by *Bacillus* isolates cultured in starch broth medium, pH 7 and incubated at 37°C for 48hrs

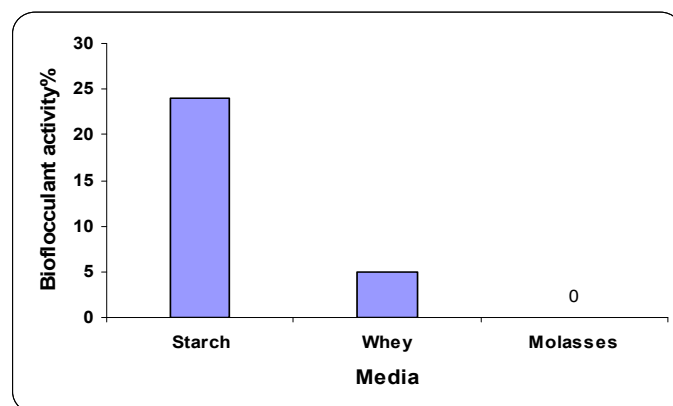


Figure (2): Effect of different media on flocculating activity by *B. apiarius* B3 at 37°C for 48hrs.

Effect of pH on bioflocculant production

The production medium was prepared at different pH values ranged between 4 to 9 to determine the optimum pH required for bioflocculant production by *B. apiarius* B3. It was noticed that flocculating activity increased gradually with increasing of pH to reach 30% at pH 9 while at pH 4 and 7 gave relatively low flocculating activity 6% and 16% respectively (figure 3).

The initial pH of culture medium determines the electric charge of the cells and the oxidation-reduction potential which can affect nutrient absorption and enzymatic reaction (17; 22).

pH change of the environment will change the electric charges of various molecules involved in multiple biological activities such as its effect on the solubility of protein and enzyme activities, pH also effect the permeability of cytoplasmic membrane of cell and metabolic activity of carbohydrates (23).

An optimum pH for the bioflocculant production by *B. licheniformis* was in pH 8 which appeared to be more favorable for bioflocculant production (13).

Other study referred that the initial pH of 8.0 was optimum for bioflocculant production in large amounts by *B. mucilaginosus* (21). The specific pH affects directly on the synthesis of those enzymes responsible for bioflocculant production (24).

The generation of bioflocculant from *Bacillus* sp. is influenced by the initial pH value of the culture medium. The Alkaline culture medium was favored while the bioflocculant production was inhibited in acidic culture medium (25).

Effect of temperature

B. apiarius B3 revealed maximum flocculating activity (29%) at 37°C figure (4). Production of bioflocculant by *B. apiarius* B3 revealed also at relatively high temperature (50°C) (22%), this property is favored in industrial application since it reduces the cost of cooling. The suitable temperature for flocculant production may vary among the different organism. The optimum temperature for *B. licheniformis* bioflocculant production was 37°C (13). Whereas the optimum temperature of *Aeromonas* sp. was 30°C (26), the maximum flocculant production of *B. subtilis* and *Enterobacter agglomerans* appeared at 45°C. (27).

The metabolism of microorganisms has direct relationship with culture temperature. The lower culture temperature might make *Proteus mirabilis* Strain TJ-1 hibernate partially and its enzyme system for bioflocculant production couldn't be activated completely (28).

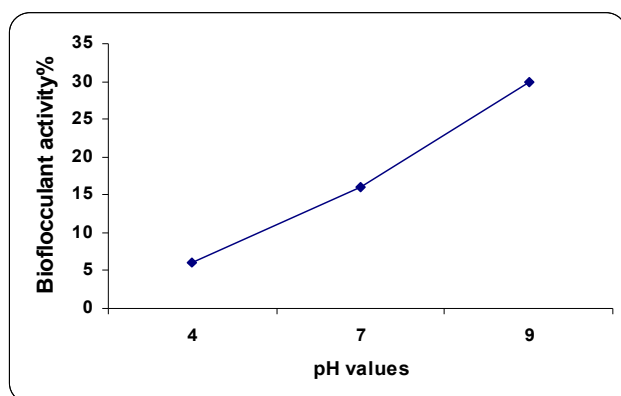


Figure (3): Effect of pH on flocculating activity by *B. apiarius* B3 in starch broth medium containing 1% starch incubated at 37°C for 48hrs

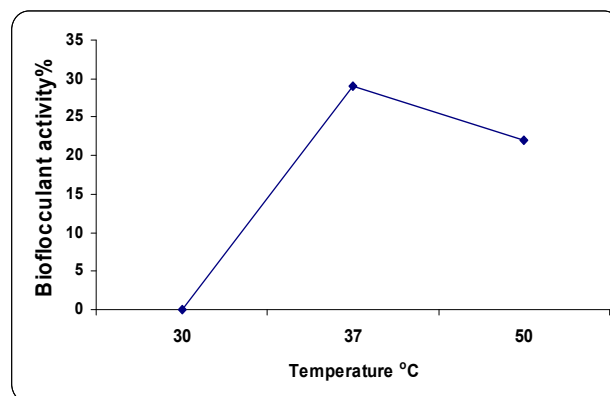


Figure (4): Effect of temperature on flocculating activity by *B. apiarius* B3 in starch broth medium containing 1% starch and NH_4Cl , incubated for 48hrs and pH 9

Determination of bioflocculants' flocculating activity in river water spiked with different bacterial species

In the experiment to determine the ability of the bioflocculant *B. apiarius* B3 to remove specific bacterial type from the contaminated river water the removal of *S. epidermidis* was 22% and for *S. aureus* was 17% while the highest removal was for *K. pneumoniae* 25% and there where no removal for *E. coli* figure (5).

Buthelezi *et al.*, (2009) (16) studied the ability of the *B. subtilis* bioflocculant to remove specific bacterial type Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*) and Gram negative (*Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*) from the contaminated river water with the removal rate range between 90-100% he mentioned that the removal of bacteria, although variable may exceed 90% during the flocculation process, while coagulation removes 74-99.4% of *E. coli* and coliforms.

The bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* could efficiently flocculate all suspended solids in aqueous solutions tested and had a wide flocculating activity against both organic and inorganic materials as well as microorganisms such as *E. coli* and alcohol yeast(14).

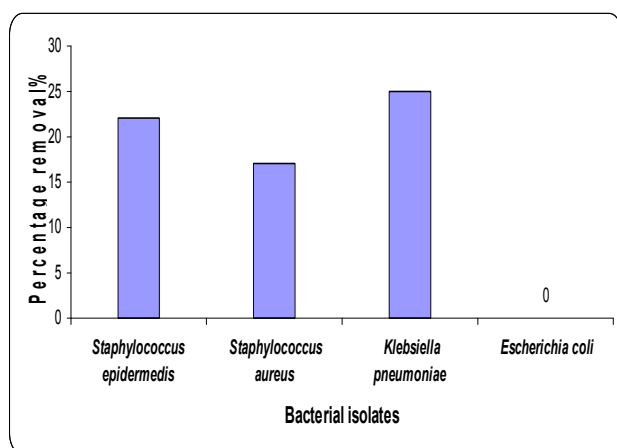


Figure (5): Bacterial load reduction in river water spiked with different Gram positive and Gram negative bacteria using bioflocculant of *B. apiarius*

Heavy metal removal efficiency of bacterial bioflocculant

B. apiarius B3 bioflocculant in this study demonstrate metal sorption potential with varying levels of efficiencies the highest removal 89% for Zn^{2+} and 87% for Pb^{2+} figure(6).

Biosorptions of heavy metals by a novel acidic polysaccharide produced from microorganisms have been reported (29). Bioflocculant produced by *Pseudomonas fluorescence* removed 70% mercury, 30% zinc and 45% cadmium (30).

Bioflocculant from the three thermotolerant isolates, *E. agglomerans* SM 38, *Bacillus subtilis* WD 90 and *B. subtilis* SM 29, adsorbed nickel and cadmium up to 90% and 85% respectively (31). Bioflocculants produced in other study demonstrated that up to 90% of Pb^{2+} was removed by bioflocculant produced by *Pseudomonas* sp and *Paenibacillus* sp. bioflocculant removed 58% Pb^{2+} and less than 50% of Zn^{2+} was removed through the flocculation process (18). The composition of bacterial bioflocculants plays a major role in their flocculating activities (11). Type and physical characteristics of extracellular polysaccharide affect bioflocculation(32). In general, bioflocculants have been found to have a net negative charge. The presence of uronic acid of polysaccharide assists the metal uptakes (11). The presence of uronic acid in bioflocculants allows for adhesion of microorganisms to surfaces and is involved in the uptake of metallic ions.

Carboxylic and sulfate groups present in acidic (33).

Exopolysaccharides works as a non-specific ion exchange material which may convey chelating property (34). The protein component containing multiple carboxyl groups such as glutamic and aspartic acid (35) or the presence of galacturonic acid and glucuronic acid (36) are also important in the process of flocculation with kaolin clay and heavy metals.

Therefore, we conclude the following from this study:

1. *Bacillus apiarius* had the ability to produce bioflocculant in starch medium in optimal conditions.
2. *Bacillus apiarius* bioflocculant had the ability to remove river pollutants such as bacterial species and heavy metals.

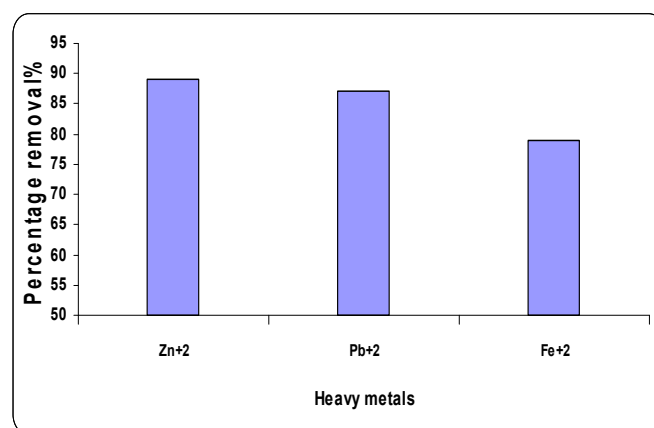


Figure (6): Percentage of heavy metal removal 2h after mixed with *B. apiarius* B3 bioflocculant

REFERENCES

1. Salehizadeh H. and Shojaosadati SA. (2001). Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnology importance. Biotech. Adv. 19(5): 371-385.
2. Zhang ZQ.; Lin B.; Xia SQ.; Wang XJ. and Yang AM. (2007). Production and application of a bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. J Environ Sci. 19: 660-666.
3. Zhang Z.; Xia S.; Zhao J. and Zhang J. (2010). Characterization and flocculation mechanism of high efficiency microbial flocculant TJ-F1 from *Proteus mirabilis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 75: 247-251.

4. Lachhwani P. (2005). Studies on polymeric bioflocculant producing microorganisms. MSC. thesis in Biotechnology. UK: University of Leeds.
5. Guangyu Y, and Thiruvengkatachari V .(2003). Heavy metals removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. Water Res. 37(18): 4486-4496.
6. Kira B, Kaushik A, and Kaushik CP .(2007). Response surface methodological approach for optimizing removal of Cr(VI) from aqueous solution using immobilized cyanobacterium, Chem. Eng. J.126: 147-153.
7. Kiran B, Kaushik A, and Kaushik CP. (2007). Biosorption of Cr (VI) by native isolate of *Lyngbya putealis* (HH-15) in the presence of salts, J.Hazard. Mater. 141: 662-667.
8. He N., Li Y., Chen J. and Lun SY. (2003). Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*. Bioresour. Technol., 94: 99-105.
9. Noghabi KA, Zahiri HS, and Yoon SC. (2007). The production of a coldinduced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals adsorption. Process Biochem. 42: 847-855.
10. Salehizadeh H, and Shojaosadati SA .(2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. Water Res., 37: 4231-4235.
11. Wu JY and Ye HF.(2007). Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. Process Biochem., 42: 1114-1123.
12. Kotrba P, Doleková L, De Lorenzo V, and Ruml T. (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. Appl. Environ. Microbiol., 65:1092-1098.
13. Li Z.; Zhong S.; Lei H.; Chen R.; Yu Q. and Li H. (2009). Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. Bioresource Technology. 100: 3650-3656.
14. Kurane R.; Takeda K. and Suzuk, T. (1986). Screening for and characteristics of microbial flocculants. J. Agri. Biol. Chem. 50: 2301-2307.
15. Khanafari A. and Akkhavan S A. (2007). Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. Int. J. Environ. Sci. Tech 4(4): 427-432.
16. Buthelezi SP., Olaniran AO. and Pillay B.(2009). Turbidity and microbial load removal from river water using bioflocculants from indigenous bacteria isolated from wastewater in South Africa. Afr. J. Biotechnol. 8 (14): 3261-3266.
17. Nakata K, and Kurane R .(1999). Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 2064-2068.
18. Lin J. and Harichund C. (2011). Isolation and characterization of heavy metal removing bacterial bioflocculants. Afr. J. Microbiol. Res. 5(6) : 599-607
19. Claus D. and Berkeley CW. (1986). The Genus *Bacillus*. In: Bergeys manual of systemic bacteriology (ed. Sneath, P. H. A.) Williams and Wilkins. pp. 1105-1139.
20. Patil SV.; Bathe GA.; Patil AV.; Patil RH. and Salunke BK. (2009). Production of Bioflocculant exopolysaccharide by *Bacillus subtilis*. Adv. Biotechnol.. 14-17.
21. Deng SB.; Bai RB.; Hu XM. and Luo Q. (2003). Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 588-593.
22. Salehizadeh H. and Shojaosadati SA. (2001). Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnology importance. Biotechnol. Adv. 19(5): 371-385.
23. Khafaji ZM. (1987). Biological activities of bacteria. Office of Book home for printing and establishment, University of Mosul, Iraq. (In Arabic).
24. Lawson C J. and Sutherland IW. (1987). Polysaccharide. In: Rose, A. H. Editor, Economic microbiology, Primary products of metabolism vol. 2, Academic Press Ltd., London, England pp: 328-389.
25. Zheng Y.; Ye Z.; Fang X.; Li Y. and Cai W. (2008). Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19. Biores. Technol. J. 99: 7686-7691.
26. Li X.; Yang Q.; Huang K.; Zeng G.; Liao D.; Liu J. and Long W.(2007). Screening and Characterization of a Bioflocculant Produced by *Aeromonas* sp. J. Biomed. Environ. sci. 20: 274-278.
27. Kaewchai S. and Prasertsan P. (2002). biosorption of heavy metal by thermotolerant polumer producing bacterial cells and the bioflocculant. J. Sci. Technol. 24(3) : 421-430
28. Xia SQ.; Zhang ZQ.; Wang XJ.; Yang A.; Chen L.; Zhao JF.; Leonard D. and Jaffrezic-Renault N. (2008). Production and characterization of a bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. Biores. Technol. J. 99: 6520-6527.
29. Salehizadeh H, and Shojaosadati SA. (203). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. Water Res., 37: 4231-4235.

30. Noghabi KA, Zahiri HS, and Yoon SC. (2007). The production of a coldinduced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals adsorption. *Process Biochem.*, 42: 847-855.
31. Kaewchai S, and Prasertsan P. (2002). Biosorption of heavy metal by thermotolerant polymer-producing bacterial cells and the bioflocculant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 24(3): 421-430.
32. Liao B, Allen DG, Droppo IG, Leppard GG, and Liss SN. (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res.*, 35: 339-350.
33. Aguilera M, Quesada MT, Aguila VGD, Morillo JA, Rivadeneyra MA, Cormenzana AR, and Sanchez MM. (2008). Characterization of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Biores. Technol.*, 99: 5640-5644.
34. Valls M, and De Lorenzo V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 327-338.
35. Dignac MF, Urbain V, Rybacki D, Bruchet A, Snidaro D, and Scribe P. (1998). Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.*, 38(3): 9-46.
36. Bender J, Rodriguez-Eaton S, Ekanemesang UM, and Phillips P. (1994). Characterization of metal-binding bioflocculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7): 2311-2311.

The role of *Van A* gene in the resistance of *nuc*-gene positive vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with skin infections.

Mushtak T.S. Al-Ouqaili (1) , Shaymaa H.M. Al-Kubaisy(2) & Narjis F.I. H. Al-Ani(3)

Pharmacy College, Al- Anbar University (1), (2) Faculty of Medicine, Al- Anbar University (3)- Iraq

E-mail: dr.mushtak_72@yahoo.com

ABSTRACT

Vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* (VRSA) have become an increasing problem worldwide. This study has been undertaken for detection the role of *VanA* gene in vancomycin resistant *S. aureus* isolated from patients with skin infections. Seventy five specimens obtained from patients admitted to Dermatology Department in Al-Ramadi Teaching Hospital and outpatient from Private clinics were studied. The suspected *Staphylococcal* colonies were bacteriologically identified and confirmed by biochemical test. Preliminary agar screening plate for detection of vancomycin resistant *S. aureus* which includes Muller Hinton agar containing 6mg/100ml vancomycin was performed. Also, broth dilution technique to detect minimal inhibitory concentration for VRSA was achieved. Further, Amplification of *nuc* and *vanA* genes by polymerase chain reaction was also performed. Out of Fourty five isolates of *Staphylococci*, 38 (84.4%) were diagnosed bacteriologically as *S. aureus*. Of these isolates, 27 (71.1%) isolates were resistant to oxacillin. Vancomycin resistant *S. aureus* were detected in 10 (37%) of them while the remaining, 1728.9%) were vancomycin sensitive. Among 10 (37%) of Vancomycin resistant *S. aureus*, 6 (60%) of them showed positive result for the presence of *VanA* gene. The increase in vancomycin resistance among MRSA and excessive use of antimicrobial agents have worsened the sensitivity. Also, the study suggested that *nuc* gene is cut off molecular diagnostic tool for confirmed diagnosis of *S. aureus*. Further, *VanA* gene play an important role in *nuc* gene positive vancomycin resistant *S. aureus*.

Key Words: Skin infection, ORSA, VRSA, *Nuc* gene, *Van A* gene.

الملخص باللغة العربية

أصبحت مشكلة مقاومة بكتريا العنقوديات الذهبية لمضاد الفانكوماميسين في تزايد مستمر في العالم. ان هدف الدراسة هو لتحديد دور جين *VanA* في مقاومة البكتريا اعلاه المعزولة من الاخماج الجلدية لمضاد الفانكوماميسين. تم دراسة 75 عينة من المرضى الداخليين لقسم الجلدية في مستشفى الرمادي التعليمي والمرضى المراجعين للعيادات الخاصة. شخصت مستعمرات العنقوديات بكتريولوجياً وتم تأكيد التشخيص باستخدام الفحوص الكيميوحيوية. تم إنجاز الفحص الأولي لكشف عن مقاومة هذا المضاد باستخدام اكار المولر هينتون الحاوي على مضاد الفانكوماميسين بتركيز 6ملغم/100مل. استخدمت طريقة التخفيف في المرق المغذي لتحديد بكتريا ال VRSA كما وتم تضخيم الجينات *nuc* وال *vanA* باستخدام تقنية تضاعف البلمرة التسلسلي. أظهرت النتائج بأنه من مجموع 45 عينة من العنقوديات فأً 38 (84.4%) بأنها تنتمي لنوع العنقوديات الذهبية منها 27 (71.1%) كانت مقاومة لمضاد الاوكساسيلين... حددت بكتريا العنقوديات المضادة للفانكوماميسين في 10 (37%) من مجموع المذكور اعلاه فأً 6 (60%) أظهرت نتائج موجبة لوجود الجين *VanA*. تستنتج الدراسة بأن الزيادة في مقاومة مضاد الفانكوماميسين لبكتريا العنقوديات الذهبية لمقاومة للمثيسيلين والاستخدام الزائد للمضادات الميكروبية سبب تقليل الحساسية الدوائية للمضادات اعلاه. كذلك تقترح الدراسة بأن جين ال *nuc* هو اداة تشخيصية بيولوجية جزيئية قاطعة للتشخيص المؤكد لبكتريا العنقوديات الذهبية كما وان الجين *VanA* يلعب دوراً مهماً في العنقوديات الذهبية المقاومة لمضاد الفانكوماميسين والمنتجة لجين *nuc*.

INTRODUCTION

With the increase of staphylococcal resistance to methicillin, vancomycin (or another glycopeptide antibiotic, teicoplanin) is often a treatment of choice in infections with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Three classes of vancomycin-resistant *S. aureus* have emerged that differ in vancomycin susceptibilities: vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), heterogenous vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA), and high-level vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) (1). High-level vancomycin resistance in *S. aureus* has been rarely reported (2). However, these strains may also be resistant to meropenem and imipenem, two other antibiotics that can be used in sensitive *Staphylococcus* strains.

Clinical experience suggests that barriers exist to the evolution of endogenous vancomycin resistance in *S. aureus*, given occasional reports of low-level vancomycin resistance. However, *in vitro* and *in vivo* experiments reported in 1992 demonstrated that vancomycin resistance genes from *Enterococcus faecalis* could be transferred by horizontal gene transfer to *S. aureus*, conferring high-level vancomycin resistance to *S. aureus* (3). Until 2002 such a genetic transfer was not reported for wild *S. aureus* strains.

In 2002, a VRSA strain was isolated from the catheter tip of a diabetic, renal dialysis patient in Michigan (4). The isolate contained the *mecA* gene for methicillin resistance. Vancomycin MICs of the VRSA isolate were consistent with the *VanA* phenotype of *Enterococcus* species, and the presence of the *vanA* gene was confirmed by polymerase chain reaction. The DNA sequence of the VRSA *vanA* gene was identical to that of a vancomycin-resistant strain of *Enterococcus faecalis* recovered from the same catheter tip. The *vanA* gene was later found to be encoded within a transposon located on a plasmid carried by the VRSA isolate (5). This transposon, Tn1546, confers *vanA*-type vancomycin resistance in enterococci (6).

This study has been undertaken for molecular detection of *Staphylococcus aureus* via nuc gene amplification and detection the role of *van A* gene in the resistance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin.

PATIENTS AND METHODS

The current study includes Seventy five clinical specimens obtained from patients infected with skin infection admitted to Dermatology Department in Al-Ramadi Teaching Hospital and outpatient department during the period from May to September, 2011. The patients were of different sex and the mean of age was 21 ± 13.7 . Out of these specimens, 38(50.7%) isolates were bacteriologically identified as *Staphylococcus aureus*.

Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staph. epidermidis*: Baron et al.(7) identified the suspected Staphylococcal colonies bacteriologically according to the following confirmatory methods which include staining with gram stain, morphology of colony, MIC, agar screening which including (mannitol salt agar, Muller Hinton agar with 6mg/100ml oxacillin, coagulase test (8,9).

1-preliminary screening agar plates:

A-Screening agar plates for Oxacillin resistance

Mueller-Hinton agar plates with 4% NaCl and 6 mg of oxacillin per ml (MHOX; Prepared Media Laboratories, Tualatin, Oreg.) were inoculated as a streak in three directions by using a cotton swab dipped into a direct colony suspension equivalent to a 0.5 McFarland standard in Tryptic soy broth (10). As a control, the same medium containing 4% NaCl without oxacillin was inoculated first. Plates were incubated in ambient air at 35°C and were read at 24 and 48 h. Any growth was considered a positive test result (11).

B-Screening agar plates for Vancomycin resistance

Muller Hinton agar (Hi-Media, India) screen plates containing 6 µg/ml vancomycin (Lilly Pharma, Giessen, Germany) were prepared. Inoculum suspensions were prepared by selecting colonies from overnight growth on nutrient agar plates. The colonies were transferred to sterile saline to produce a suspension that matches the turbidity of a 0.5 McFarland standard. The final inoculum concentration of 10^5 to 10^6 CFU per ml was prepared by adding the sterile saline to the

bacterial suspension. These suspensions were inoculated onto Muller Hinton agar plates and were incubated for 24 h at 35°C in ambient air. Any visible growth indicated the vancomycin resistance (12).

2-Confirmatory antibiogram:-

Broth dilution method (Minimum Inhibitory Concentration):

The antimicrobial agents used were pure powder of oxacillin and vancomycin, which were purchased from Himedia Company, India. In Bacterial standardization, Twenty-four isolates of different bacteria were included. The bacterial standardization was performed according to 0.5 McFarland turbidity standards (13). The result of minimal inhibitory concentration (MIC) was interpreted as the lowest concentration of antimicrobial agents, which inhibits visible bacterial growth after overnight incubation (14).

Molecular detection:-

DNA extraction:-

The procedure of DNA extraction was done according to the instructions laid down by Promega Company (10).

DNA quantitation:-

DNA samples, which were prepared from bacterial growth, were quantified by Ultraviolet spectrophotometer (Unico, USA) reading at 260 and 280 nm (10). All samples were stored at -20 °C until use. Reading were taken at wavelengths of 260 nm (OD 260) for DNA of sample and 280 nm (OD 280) for protein concentration of sample, the spectrophotometer was rezeroed between each wavelength reading. The ratio between the readings (OD260/OD280) provided an estimation of sample purity, which should be between (1-2). Values of (OD260/OD280) of less than 1 indicate contamination of the DNA by protein (10).

The concentration of DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was estimated by using the following equation: $\text{Concentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{reading in OD 260}) \times (\text{total/sample volume}) \times \text{constant}$ ($50 \mu\text{g}/1000 \mu\text{l} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

Polymerase chain reaction:-

All primers were supplied by Alpha DNA Co., Canada as a lyophilized product of different picomols concentrations and resuspended using deionized water to reach a final concentration for 10 picomols/ μl of suspension.

All the samples of bacterial culture examined for DNA extraction, which were assayed by PCR amplification process. The specific primers were synthesized from Alpha DNA (Alpha DNA Co., Canada), which were designed on the basis sequence information of the gene repeated unit that amplifies a highly repeated sequence of *Staphylococcus aureus* DNA.

Sequences of nuc gene and Van A gene,

Gene	name	nucleotide sequence (5' to 3')
		base pair

VanA- R
CCCCTTTAACGCTAATACGACGATCAA1
030 bp

VanA-F
CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA

Sequences' of nuc gene

Gene name	Nucleotide sequence (5'-3')	(base pairs)
-----------	-----------------------------	---------------

<i>nuc</i> gene	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC447 bp
-----------------	--------------------------------

Table (1) below shows the original PCR reagents and final concentrations, which were used in the procedure

Table (1): The original PCR reagents and final concentrations, which were used in procedure

Component	Volume	Final concentration
Go Taq Green	12.5 μl	1 X
Master Mix 2x		
Forward primer	2.5 μl	10 μM
Reverse primer	2.5 μl	10 μM
DNA template	5 μl	250 ng
Nuclease free water	2.5 μl	
Final volume	25 μl	

The thermal cycler (ESCO, USA) was used with the following thermal profile for *VanA* and *Nuc* gene: tables (2,3)

Table (2): The PCR program that used in the amplification of *Nuc* gene

PCR Program			
Initial	10 min.	94 °C	
Denaturation			
Denaturation	30 sec.	94 °C	
Annealing	1 min	50°C	
Extension	1:30 min	72 °C	30 cycles
Final	10 min.	72 °C	
Extension			

Table (3): The PCR program which used in the amplification of *Van A* gene

PCR Program			
Initial	10 min.	94 °C	
Denaturation			
Denaturation	30 sec.	94 °C	30
Annealing	45 sec.	50 °C	cycles
Extension	30 sec	72 °C	
Final	10 min.	72 °C	
Extension			

Loading DNA sample:

DNA ladder (Promega, 50-1000 bp , USA) was transferred onto the gel well by micropipette. 12 µl of the amplification DNA samples were loaded to the wells of the gel. the gel with tray was laid into the chamber with 1x TBE, and assured that the gel was completely covered with TBE, Electrophoresis condition was set up at 100 volts for 1 hour for small tank and 150 volts for large tank with same time. The gel for DNA fragments were observed by examining the gel under UV light of transilluminator with protective glasses and photographed (10).

Agarose gel electrophoresis:-

After genomic DNA extraction, agarose gel electrophoresis was adopted to confirm the presence and integrity of the extracted DNA¹⁰. In addition, the same process was used after amplification the genes by PCR to detect the target bands.

RESULTS

Out of Fourty five isolates of Staphylococci, 38 (84.4%) were diagnosed bacteriologically as *S. aureus*. Of these isolates, 27 (71.1%) isolates were resistant to oxacillin. Vancomycin resistant *S. aureus* were detected in 10 (37%) of them while the remaining, 17 (28.9%) were vancomycin sensitive. Table (4).

Table (4): Distribution Oxacillin resistance *Staphylococci aureus* according to type of infection.

	Clinical type of infection	No. of strain(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Impetigo	8 (29.6%)
	Superficial bacterial infection	12 (44.5%)
	Furunculosis	7 (25.9%)

Antimicrobial susceptibility test to choose MRSA from Staphylococcal isolates were detected according to the criteria laid down by National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2001) by using an international quality isolate of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. our results showed that MICs of oxacillin against *S. aureus* were as follow:- Two (7.4%) was appeared with MICs eight µg/ml, Six (22.2%) with MIC 16 µg/ml, 10 (37.1%) with MIC 32µg/ml, while six (22.2%) were produced MIC value of 64 µg/ml and 3 (11.1%) were appeared with MIC 128µg/ml.

On the other hand, Vancomycin resistant *S. aureus* were detected in 10 (37%) of them while the remaining, 17 (28.9%) were vancomycin sensitive as represented in the following table (5).

Table (5): Detailed description of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* three study groups.

Type of isolates	No. of isolates	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of Vancomycin (Mean \pm SD)
Oxacillin and vancomycin resistant <i>S. aureus</i> (VRSA)	10 (37%)	42.5 \pm 10.7
Oxacillin resistant and Vancomycin sensitive <i>S. aureus</i> (VSSA) positive	17 (28.9%)	1.2 \pm 6.2
Oxacillin and Vancomycin sensitive <i>S. aureus</i>	11 (28.9%)	0.78 \pm 3.7

In molecular part of this study, DNA was extracted from all study isolates of *S. aureus* with mean of purity of 1.57 ± 4.6 (figure 1)

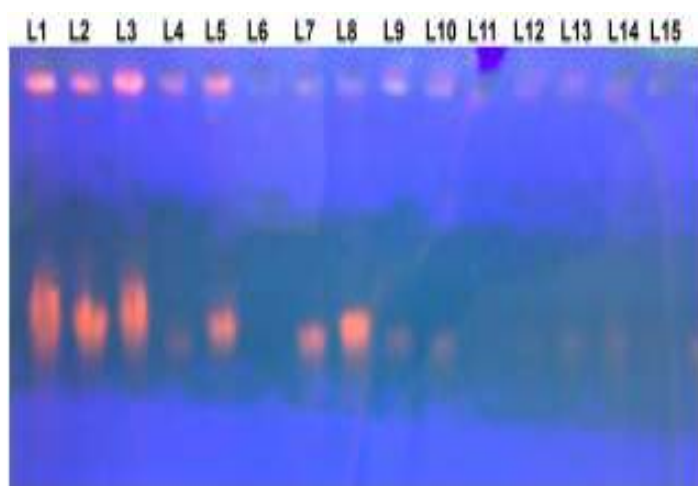


Figure (1): The result of agarose gel electrophoresis (0.7%) with ethidium bromide of DNA (pre-Polymerase chain reaction) from *Staphylococcal* genome.

Amplification of *nuc* gene target by polymerase chain reaction that is highly specific for *S. aureus* was performed. After that, electrophoresis by agarose gel electrophoresis for PCR product was done. The study result showed that *nuc* gene was observed in all the study isolates of *Staphylococcus aureus* while they were not appears in *S. epidermidis* as represented in figure (2).

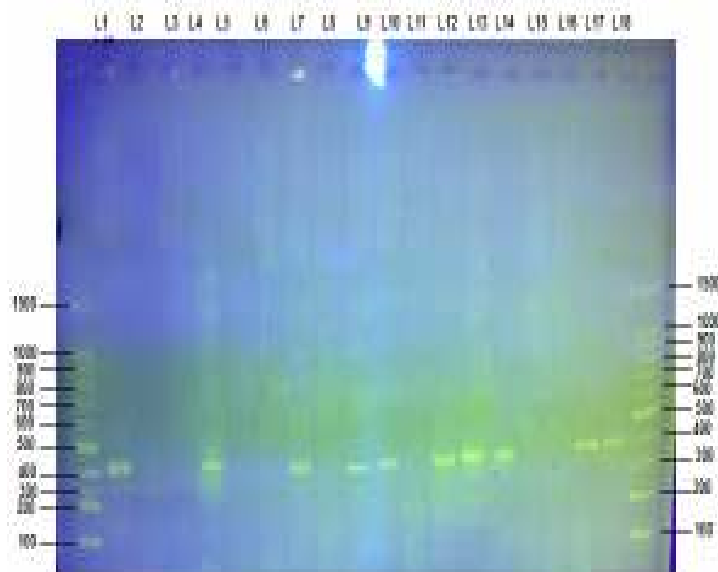


Figure (2): The results of agarose gel electrophoresis (2%) with Red safe stain, bands with amplified *nuc* gene obtained from *Staphylococcal* isolates which showed that positive results for *nuc* gen of *Staphylococcal* isolates were (L1, L4, L7, L9, L10, L12, L13, L14, L17, L18) while (L2, L3, L5, L6, L8, L11, L15, L16) were negative results, ladder with (100-1500 pb) on the right and left were used as DNA molecular weight marker.

Among 10 (37%) of Vancomycin resistant *S. aureus*, 6 (60%) of them showed positive result for the presence of *vanA* gene while the other 4 (40%) VRSA were negative for *vanA* gene (figure 3).

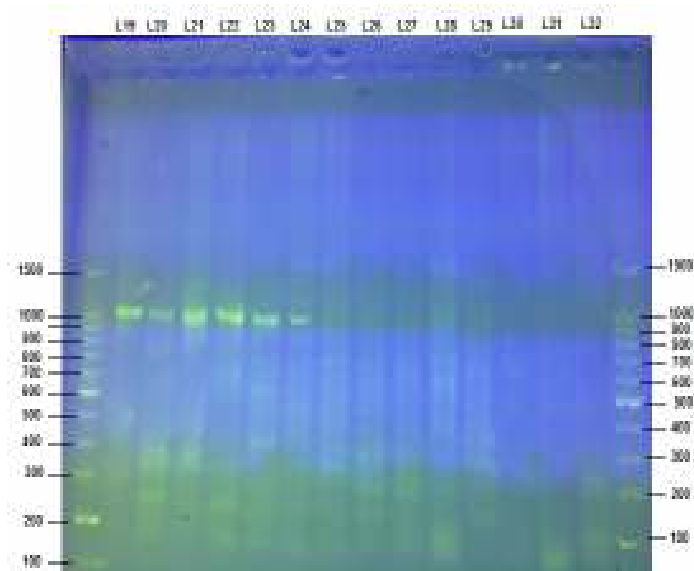


Figure (3): The results of agarose gel electrophoresis (2%) with Redsafe stain, bands with amplified *VanA* gene obtained from *Staphylococcal* isolates which showed that positive results for *VanA* gene of *Staphylococcal* isolates were (L19, L20, L21, L22, L23, L24) while (L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L32) were negative results, ladder with (100-1500 pb) on the right and left were used as DNA molecular weight marker.

DISCUSSION

It is well realized that glycopeptides such as vancomycin are frequently the antibiotics of choice for the treatment of infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Tiwari and Sen, 2006). The early 1990s have shown a discernible increase in vancomycin use. Consequently, selective pressure was established that eventually led to the emergence of strains of *S. aureus* and other species of staphylococci with decreased susceptibility to vancomycin and other glycopeptides (15). In 1997, the first strain of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and teicoplanin was reported from Japan (16).

It is well known that MIC is the lowest concentration of an antimicrobial agent which inhibits the visible growth of a microorganism after overnight incubation. In this study MICs for oxacillin against logarithmic phase cells were determined by using macro broth dilution technique. It is well known that the minimal inhibitory concentration (MICs) are considered the gold standard for determining the susceptibility of organisms to antimicrobial and therefore used to judge the performance of all other methods of susceptibility testing (17). It is well known that minimal inhibitory concentrations are important in diagnostic laboratories to confirm resistance of microorganisms to an antimicrobial agent and to monitor the activity of new antimicrobial agents. A lower MIC is an indication of a better antimicrobial agent. An MIC is generally regarded as the most basic laboratory measurement of the activity of an antimicrobial agent against an organism. The minimal inhibitory concentrations are used not only to determine the amount of antibiotic that the patient will receive but also the type of antibiotic used, which in turn lowers the opportunity for microbial resistance to specific antimicrobial agents. Currently, there are a few web-based, freely accessible MIC databases, our study with MICs not for pharmacokinetic reasons but to study role of *VanA* gene in the resistance of *nuc* gene positive *Staphylococcus aureus* to vancomycin.

Our results revealed that vancomycin resistant *S. aureus* were detected in 10 (37%) of them while the remaining, 17 (28.9%) were vancomycin sensitive. This result is inconsistent with those observed by Tiwari and

Sen (2006) who documented that there is a significant rise of reduced susceptibility of oxacillin, vancomycin and teicoplanin and the emergence of the glycopeptide resistance is of great concern and became observed. This may be due to thickening of cell wall of VRSA strains that become thinner with the loss of vancomycin resistance during the drug free passage and again become thick in resistant mutants. Pallazo and associates (18) have also demonstrated the thickening of cell wall in vancomycin resistant staphylococci. This could be the possible mechanism behind the vancomycin resistant staphylococcal isolates.

On the other hand, biochemical and transmission electron microscopy (TEM) examination of the Mu50 cell, suggested that it produces increased amounts of peptidoglycan. More murein monomers and more layers (probably 30–40 layers as judged by cell-wall thickness observed with TEM) of peptidoglycan are considered to be present in the cell wall. As a result, more vancomycin molecules are trapped in the peptidoglycan layers before reaching the cytoplasmic membrane where peptidoglycan synthesis occurs. Moreover, a higher concentration of vancomycin would be required to saturate all the murein monomers that are supplied at an increased rate in Mu50. Besides the vancomycin-trapping mechanism, designated "affinity trapping" (19, 20).

With regard to *VanA* gene results, our study revealed the presence of *vanA* gene in Six VRSA isolates while the other 4 (40%) VRSA isolates were negative for *vanA* gene. This study result was in agreement with those observed by Thati *et al.* (21). The experimental transfer of the *vanA* gene cluster from *E. faecalis* to *S. aureus* has raised fears about the occurrence of such genetic transfer in clinical isolates of methicillin resistant *S. aureus* (22). The level of MICs and mode of expression of antibiotic resistance is not controlled only through the transcription and translation of *VanA* gene but can also be profoundly influenced by a variety of environmental factors. These differences in results may be due to epidemiological reason like our study which is done in Iraq because variety of environmental factors that can cause deletion of gene or can drain new features (23). Resistance in bacteria can be intrinsic or acquired, intrinsic resistance is a naturally occurring trait arising from the biology of the organism. Acquired resistance occurs when a bacterium that has been sensitive to antibiotics develops resistance. This may happen by

mutation or by acquisition of new DNA. Mutation is spontaneous event that occurs regardless of whether antibiotic is present. A bacterium carrying such a mutation is at a huge advantage as the susceptible cells are rapidly killed by the antibiotic, leaving a resistant subpopulation (24).

On the other hand, Martineau, and associates (25), showed that the heterogeneous nature of methicillin resistances suggests that numerous factors could explain the sensitive phenotype MRSA; such factors include (i) the regulation of the expression of *mecA* and (ii) the absence of host factors associated with the phenotypic expression of methicillin resistance. The fact that ability to select resistant cells from originally susceptible strains demonstrates that upon in vitro selection in the presence of increasing gradients of the antimicrobial agent, it is possible to select for resistance. Furthermore, once induced, the resistance phenotype was shown to be stable (25).

The study suggested that the increase in vancomycin resistance among MRSA and excessive use of antimicrobial agents have worsened the sensitivity. In addition, the study suggested that *nuc* gene is cut off molecular diagnostic tool for confirmed diagnosis of *S. aureus*. Further, *VanA* gene plays an important role in *nuc* gene positive vancomycin resistant *S. aureus*.

REFERENCES

1. Appelbaum PC (2007). "Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". Int. J. Antimicrob. Agents 30 (5): 398–408.
2. Gould IM (2010). "VRSA-doomsday superbug or damp squib?". Lancet Infect Dis 10 (12): 816–8.
3. Noble WC, Virani Z, Cree RG (1992). "Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*". FEMS Microbiol. Lett. 72 (2): 195–199.
4. Chang S, Sievert DM, and Hageman JC. (2003). "Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene". N. Engl. J. Med. 348 (14): 1342–1347.
5. Weigel LM, Clewell DB, and Gill SR. (2003). "Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*". Sci. 302 (5650): 1569–1571.
6. Courvalin A. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci". Clin. Infect. Dis. 42 Suppl 1: S25.
7. Baron EJ., Peterson LR., and Finegold SM. (1994). Baily and scotts diagnostic microbiology. Toronto: mosby company; 19th ed. :389-400.

8. Frebourg NB., Nouet D., Lemee L., Martin E., Lemeland JF. (1998). Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staph, Vitek and Etest methods for detection of oxacillin heteroresistance in *Staphylococci* possessing *mecA*. *J. Clin. Microbiol.* 36:52-57.
9. Sakoulas G., Gold HS., Venkataraman L., DeGirolami PC., Eliopoulos GM., and Qian, Q. (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin Microbiol.* 39:3946-3951.
10. Sambrook J., Fritsch EF., and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed., cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.
11. Brown DF., Edwards DI., Hawkey PM., Morrison D., Ridgway G.L., and Towner KJ. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Antimicrob Chemother.* 56:1000-1018.
12. Tiwari H and Sen M. (2006). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect. Dis.* 6:156
13. Miles R S. and Amyes SGB. (1996). Laboratory control of antimicrobial therapy. In: Practical medical microbiology. By: Collee, J.G., Barrie, P. M., Fraser, A. G. simmer, A. California, Churchill, Livingston, 14th edition.
14. Ferraro MJ., Craig WA., Dudley MN., Ehoupoulos GM., and Hecht DW. (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th edition.
15. Tenover FC, Biddle JW, and Lancaster MV (2001). Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Inf Dis.* 7:327-332.
16. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, and Tenover FC (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 40:135-136.
17. Andrews JM. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:5-16; 44:1818-1824.
18. Palazzo ICV, Araujo MLC, and Darini ALC (2005). First Report of Vancomycin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 43:179-185.
19. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC, and Ackman DM (1999). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg Infect Dis* 5:147-149.
20. Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, and Schito GC. (2000). Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol* 38:866-869.
21. Thati V, Shivannavar C, and Gaddad S. (2011). Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *Indian J Med* 34.
22. Noble WC, Virani Z, Cree RGA. (1993). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 93 : 195-198
23. De-Lencastre H., Wu SW., Pinho MG., Ludovice AM., Filipe S., Gardete S., Sobral R., Gill S., Chung M., and Tomasz A. (1999). Antibiotic Resistance As a Stress Response: Complete Sequencing of a Large Number of Chromosomal Loci in *Staphylococcus aureus* Strain COL That Impact on the Expression of Resistance to Methicillin. *J. Microb. Drug Resist.* 5: 163-175
24. Hawkey PM. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *J. BMJ.* 317:657-660.
25. Martineau F., Picard FJ., Lansac N., Me'nard C., Roy PH., Ouellette M., and Bergeron MG. (2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility

Patterns of *Staphylococcus aureus* and
Staphylococcus epidermidis. J. Antimicrob.
agents chemother. 44:231–238.

قسم الدراسات العربية

ARABIC SECTION

التلوث الميكروبي ببكتريا السيدوموناس ايروجينوزا والفطريات لمياه كراسي الأسنان.

عصام شاكر حمزة ، أمير خضير عباس، فرقد فرحان عبد الحميد، سهيلة غفوري علي، سندس علي جاسم ،
ايمان عباس خلف ، عادل سعدي سلمان.

مركز بحوث تلوث الغذاء / وزارة العلوم والتكنولوجيا- بغداد/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: amirkheuhdeyer@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

تعتبر مياه كراسي الأسنان بيئة مثالية لتطور ميكروبات الفلم الحيوي ، التلوث الميكروبي للماء في كراسي الأسنان يظهر كنتيجة للفلم الحيوي الذي يكون مصدر وملاذ للمسببات المرضية.

تهدف الدراسة الى تعيين التلوث الميكروبي بـ (*Pseudomonas aeruginosa* , Fungi) لمياه كراسي الأسنان المسحوبة من كلية طب الأسنان / جامعة بغداد ووزارة الصحة.

تم جمع 87 نموذج من مياه كراسي الأسنان في حاويات معقمة نقلت الى المختبر تحت ظروف مبردة وتم فحصها في تعيين العدد الكلي للبكتريا الهوائية وبكتريا *Ps. aeruginosa* والفطريات.

بينت نتائج العدد الكلي للبكتريا الهوائية ان 83 نموذج 95.40% احتوائها على اعداد من البكتريا تفوق الحدود التي اوصت بها الجمعية الامريكية للأسنان لمثل هذه المياه والبالغة اقل من 200 مستعمرة / مليلتر في حين اظهر 59 نموذج 67.81% احتوائها على بكتريا *Ps. aeruginosa* و 55 نموذج 63.12% احتوائها على الفطريات.

ان مياه كراسي الأسنان يجب ان تخضع الى مراقبة وفحوصات ميكروبية دورية واخضاعها الى البروتوكولات المناسبة في ازالة التلوث الميكروبي لغرض تقليل خطورة التعرض للمسببات المرضية المتواجدة في مثل هذه المياه.

ABSTRACT

Dental chair water line (DCWLs) are ideal environment for development of microbial biofilms . Microbial contamination of water in(DCWLs) is thought to be the result of biofilm formation as it could serves as a haven for pathogen.

The aim of this study was to detect microbial contamination (*Ps. aeruginosa* and Fungi) of water in (DCWLs) of dental chairs located at the collage of Dentistry- Baghdad University and Ministry of Health.

Water samples 87 were collected aseptically in sterile containers , samples were transferred to the laboratory in cold box and examined for total aerobic bacteria , *Ps. aeruginosa* and Fungi.

The aerobic plate count levels were significantly exceeded the American Dental Association recommendation for (DCWLs) water quality <200 CFU/ml in 83 samples 95.40%. *Ps. aeruginosa* were found in 59 samples 67.81% and Fungi were found in 55 samples 63.12%.

(DCWLs) should be subjected to routine microbial monitoring and to a decontamination protocol in order to minimize the risk of exposure to potential pathogens from dental chair units.

المقدمة

المواد وطرائق العمل

النمذجة :

- 1- سحب المياه من كراسي الاسنان:
شملت الدراسة سحب 87 نموذج من مياه كراسي الاسنان موزعة على النحو التالي:
1- قسم معالجة الاسنان / كلية طب الاسنان / جامعة بغداد
- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، تم سحب 44 نموذج عشرون منها سحب من الكراسي التي تزود بقناني بلاستيكية (تملاء من مياه المغاسل) و 24 نموذج سحب من الكراسي التي تزود بالمياه بصورة اوتوماتيكية باستخدام ضغط الهواء وتجهيز الماء من خزانات المياه وللفترة من 20 /شباط ولغاية 27/اذار/2011.
2- دائرة صحة بغداد / وزارة الصحة
- المركز التخصصي لطب الاسنان في العلوية / الرصافة: تم سحب 17 نموذج للفترة من 22 /كانون الثاني ولغاية 12/شباط/2012
- المركز التخصصي لطب الاسنان في العامرية / الكرخ: تم سحب 17 نموذج للفترة من 22-29/نيسان/2012
- المركز الصحي في الدورة / بغداد: تم سحب 9 نموذج للفترة من 28/شباط ولغاية 10/نيسان/2012

تم سحب النماذج من (جهاز التربين Turbine ، جهاز تنظيف الاسنان Skeler وسرنجة الهواء Air syringe) نقلت النماذج تحت ظروف مبردة الى المختبر وتم فحصها مباشرة كما تم فحص نماذج المياه المجهزة لهذه الكراسي

2- العدد الكلي للبكتيريا الهوائية:
تم تعيين اعداد البكتيريا الهوائية باستخدام طريقة الحساب القياسية Standard Plate Count باستخدام الوسط الزرعي المغذي الصلب والحضانة بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وتم حساب اعداد البكتيريا بطريقة الحساب المباشر للمستعمرات / مليلتر (13).

3- تعيين بكتيريا *Ps. aeruginosa* في نماذج المياه:
استخدمت طريقة الترشيح بالاغشية Membrane Filtration في تعيين بكتيريا *Ps. aeruginosa* (14) بترشيح 100 مليلتر من النموذج واستخدام وسط M-Pseudomonas Agar المضاف اليه Cetrimide و Nalidixic Acid والحضانة بدرجة حرارة 37م ، تم التأكد من عزلات بكتيريا *Ps. aeruginosa* من خلال اجراء فحوصات Oxidase و Catalase والنمو في درجة حرارة 42م وانتاج صبغة البيوسيانين والنمو على وسط Cetrimide Milk Agar.

4- تعيين الاعفان والخمائر:
تم استخدام طريقة الترشيح بالاغشية حسب (15) بترشيح 100 مليلتر من النموذج من خلال اغشية الترشيح بقطر 45 ميكروميتر نوع (Sartorius Stedin – Cellulose Nitrate Filter-Biotech.) ثم بواسطة ملقط معقم يتم نقل ورقة الترشيح الى وسط Sabouraud Agar والحضن بدرجة حرارة 27م لمدة 3-5 ايام.

التلوث الميكروبي للمياه المستخدمة في كراسي الاسنان ممكن ان يشكل عامل خطورة على اطباء الاسنان ومساعدتهم وعلى المرضى بسبب تعرضهم للمياه مباشرة او عن طريق قطيرات الماء المحمولة بالهواء Aerosols المتولدة من الكراسي اثناء المعالجة (1) وتزداد خطورة هذه المياه في المرضى الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي والذين يخضعون لجلسات علاج منتظمة (2) لهذه الاسباب فان نوعية هذه المياه نالت اهتمام كبير خلال العقد الاخير ، من المعروف ان تلوث هذه المياه هو نتيجة لتكون الفلم الحيوي Biofilm (3) وان مصدر الاحياء المجهرية المكونة للفلم الحيوي هو اما المياه المجهزة للكراسي او لعاب المرضى الذي يلوث مياه الكراسي اثناء المعالجة بسبب فقدان او ضعف الصمامات المانعة Preventive Valves (4) ، ان البكتيريا التي عزلت من مياه كراسي الاسنان هي البكتيريا التي تتواجد في البيئة والبكتيريا الانتهازية والمرضية للانسان مثل *Pseudomonas aeruginosa* , *Legionella* , *Leptospira* spp. , *Staphylococcus* spp. , *Mycobacterium* spp. , *pneumophila* , *Cladosporium* spp. , *Penicillium* spp. , *Phoma* spp. , *Alternaria* spp. , *Giardia* spp. , *Cryptosporidium* spp. , *Microsporidium* spp (2,3,5,6)

تعتبر بكتيريا *Ps. aeruginosa* من بين اهم انواع البكتيريا الانتهازية التي تم عزلها من مياه كراسي الاسنان وان مصدر هذه البكتيريا يمكن ان يكون الماء المجهز للكراسي او التجويف الفمي للمرضى (7) وعند وصول هذه البكتيريا الى جدران الانابيب الداخلية لشبكة المياه تحصل عملية التمرکز Colonization وتتكاثر مكونة الفلم الحيوي (8) ، تمتاز هذه البكتيريا بمقاومتها للمضادات الحيوية وقابليتها على احداث اصابات شديدة في الاطفال وكبار السن وبصورة خاصة عند اجراء العمليات الجراحية للجيوب الانفية (9).

ان تعيين اعداد البكتيريا الهوائية مقدرة بمستعمرة لكل مليلتر من الماء تعتبر من الطرق القياسية المعتمدة في تحديد درجة تلوث في المياه التي يتم سحبها من كراسي الاسنان ، لقد حددت جمعية الاسنان الامريكية (ADA) American Dental Association عام 1996 ان مياه كراسي الاسنان يجب ان لايزيد اعداد البكتيريا الهوائية فيها عن 200 مستعمرة / مليلتر اما عند اجراء العمليات الجراحية فيجب ان تكون المياه معقمة وخالية من اي اعداد من البكتيريا (10)، وفي عام 2003 اوصى Center for Disease control- and Prevention (CDC) بان اعداد البكتيريا الهوائية اقل او يساوي 500 مستعمرة / مليلتر (11)، اما في الاتحاد الاوربي (EU) European Union فليس هنالك مواصفة قياسية خاصة بمياه كراسي الاسنان ولكن تمت التوصية بان مثل هذه المياه يجب ان تحتوي على اقل من 100 مستعمرة / مليلتر بدرجة حرارة 22م واقل من 20 مستعمرة / مليلتر في درجة حرارة 37م (12).

تهدف الدراسة ولاول مرة في العراق البحث عن التلوث الميكروبي لمياه كراسي الاسنان في المؤسسات الحكومية والسعي لوضع مواصفة قياسية لهذه المياه وبالتنسيق مع وزارات الدولة ذات العلاقة.

5- التحري عن الطحالب والابتدائيات حرة المعيشة
أخذ 10 مليلتر من عينة الماء بعد الرج الجيد في انبوب زجاجي معقم ونبذه في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق وتم التخلص من الرائق وتؤخذ قطرة من الراسب وتفحص تحت المجهر الضوئي.

النتائج والمناقشة

بينت نتائج الفحوصات الأولية للقناني البلاستيكية التي تزود مياه كراسي الانسان ان هناك اهمال واضح في تنظيف وتعقيم هذه القناني حيث لوحظ وبالعين المجردة النمو الطحلي على الانابيب التي تسحب المياه من هذه القناني ونمو الاعفان في قاع القناني. صورة رقم (1)
اظهرت نتائج الفحوصات الميكروبية احتواء 83 من مجموع 87 نموذج 95.40% تم فحصها على اعداد من البكتريا الهوائية تفوق الحدود القياسية التي حددتها جمعية الانسان الامريكية والبالغة 200 مستعمرة / مليلتر. جدول (1).

في حين اظهر 59 نموذج من المياه المسحوبة من مجموع 87 تم فحصها ونسبة 67.81% احتوائها على بكتريا *Ps. aeruginosa* جدول (1-4) المنتجة لصبغة البيوساينين - صورة (2) وهي بكتريا انتهازية المسببة لحالات التهاب الجروح وتقرحات في الفم واصابات الجهاز التنفسي وتنصف هذه البكتريا بمقاومتها للمعقمات والمضادات الحيوية وقدرتها على النمو في بيئات تحتوي على تراكيز قليلة من المغذيات حيث تستطيع النمو حتى في الماء المقطر وهذا ما تم تثبيته في المياه المسحوبة من المركز التخصصي لطب الانسان في العامرية والدورة جدول (3،4) وتستطيع هذه البكتريا النمو في مدى واسع من درجات الحرارة (4-42) م وتعتبر من المكونات الاساسية للفلم الحيوي الذي يتكون عادة في انابيب المياه المجهزة لمياه كراسي المرضى (16،17).

اما بخصوص الفطريات فقد اظهرت 55 عينة من مجموع 87 من العينات المسحوبة ونسبة 63.21% احتوائها على الاعفان والخمائر ، لقد تم تثبيث انواع عديدة من الاعفان والخمائر بلغت 20 نوع جدول (5) صورة (3) والاعفان بصورة عامة هي مسببات مرضية انتهازية تسبب اصابات مزمنة ويمتاز المرض بتطوره البطيء ولكن في المرضى اللذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي يكون المرض حادا (18). تسبب الاعفان في احداث امراض عديدة والمتمثلة بتسمم الاغشية المخاطية والجلد والانسجة تحت الجلدية والتهاب الرئتين المتسبب نتيجة استنشاق ابواغ عفن *Aspergillus spp* والتهاب القصبات والربو والحساسية في المرضى اللذين يعانون من نقص في المناعة واللذين يتعرضون الى المياه الملوثة بالاعفان بجلسات منتظمة ممكن ان يصاب القلب والجهاز العصبي المركزي (19)، اما عفن *Penicillium spp* فيتسبب في احداث حالات الحساسية والربو وحساسية الانف (20).

اظهرت 31 عينة من مجموع 44 عينة من المياه المفحوصة (كلية طب الانسان / جامعة بغداد) احتوائها على الطحالب والدايتومات وابتدائيات حرة المعيشة والكلاميدوموناس جدول (1) ، ان تواجد هذه الانواع المختلفة من الطحالب والابتدائيات حرة المعيشة تشير الى عدم كفاءة عملية التعقيم ووجود الفلم الحيوي (21).

ان التنوع الميكروبي الذي تم تعينه في عينات المياه المسحوبة من كراسي الانسان وهو البكتريا والاعفان اضافة الى الطحالب تعتبر المكونات الاساسية للفلم الحيوي الذي هو عبارة عن تجمعات ميكروبية تلتصق على السطوح الداخلية للانابيب التي تجري فيها المياه فتصبح مصدر تلوث للمياه المجهزة للكراسي ، ويغلف الفلم الحيوي عادة بطبقة لزجة سكرية تعرف Glycocalyx ان هذه الطبقة تحمي الميكروبات المكونة للفلم الحيوي من الجفاف والمواد الكيميائية ، كذلك يولد الفلم الحيوي الظروف المناسبة لنمو انواع مختلفة من الاحياء المتضمنة (الاعفان والطحالب والابتدائيات والديدان) (3) ، وان مصدر الميكروبات المكونة للفلم الحيوي هو المياه المجهزة للكراسي الذي يعتبر من المصادر المهمة لتكوين الفلم الحيوي والذي كان واضحا في عينات المياه المسحوبة من المركز التخصصي لطب الانسان في العامرية جدول (3) والذي كان يحتوي على الاعفان (*Aspergillus spp* و *Penicillium spp*) وبكتريا *Ps. aeruginosa* والبكتريا الهوائية التي بلغ معيارها 10×2.3 مستعمرة / مليلتر وكذلك المياه المجهزة في المركز الصحي في الدورة جدول (4) حيث كان ايضا ملوثا بالاعفان (*Penicillium spp* و *Rhizopus spp*) وبكتريا *Ps. aeruginosa* والبكتريا الهوائية التي بلغ معيارها 10×2.3 مستعمرة / مليلتر ، كذلك يعتبر لعاب المرضى مصدر تلوث مياه كراسي الانسان عندما تكون الصمامات الراجعة معدومة او غير كفوءة (22) ، ان عدم صلاحية 83 عينة مياه المسحوبة من كراسي الانسان من مجموع 87 عينة اي بنسبة 95.40% بموجب المواصفات القياسية العالمية لمثل هذه المياه يشير الى فقدان الرقابة الصحية وعدم اتخاذ اي اجراءات التي من شأنها ان تقلل المحتوى الميكروبي لمثل هذه المياه والتي ممكن ان تشكل خطورة على الصحة العامة حيث ان كثير من الحالات المرضية وحتى الوفاة تسببت نتيجة التعرض الى مثل هذه المياه (23).

لحد من التلوث الميكروبي لمياه كراسي الانسان هنالك طرق عديدة يمكن اتخاذها من بين هذه الطرق هي Flushing حيث يمكن التخلص من المياه المتواجدة في كراسي الانسان لعدة دقائق قبل البدء بالمعالجة لتقليل المحتوى الميكروبي والذي يحدث بصورة مؤقتة دون التأثير على الفلم الحيوي. وقد تحتاج الى فترة زمنية بحدود ثمان دقائق للوصول الى العدد المطلوب من البكتريا ضمن المواصفات القياسية ، او استخدام المواد الكيميائية القاتلة للبكتريا او الفلاتر او الاشعة او استخدام الحاويات البلاستيكية (النظيفة والمعقمة) المجهزة للمياه (24)، ان اختيار الطريقة المناسبة لتقليل المحتوى الميكروبي في مياه كراسي الانسان يعتمد على نوع الجهاز المستخدم وضرورة الزام الجهة المصنعة للجهاز اختيار البروتوكول المناسب في منع تكوين الفلم الحيوي.

التوصيات :

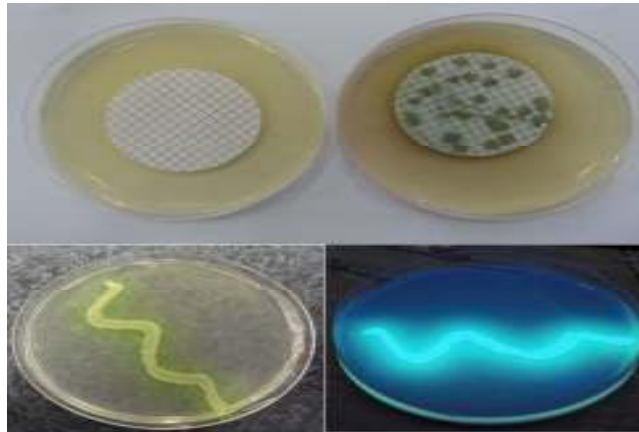
ندعو وزارة الصحة ووزارة التعليم العالي والبحث العلمي ونقابة اطباء الانسان العراقية والوزارات المعنية الاخرى بوضع مواصفة قياسية للمياه المستخدمة في كراسي الانسان ، المراقبة الدورية للمياه المجهزة لكراسي الانسان والتأكد من مطابقتها للمواصفات القياسية العالمية ، اجراء فحوصات دورية للمياه المستخدمة في كراسي الانسان والتأكد من صلاحيتها وخلوها من الملوثات الميكروبية ، التنظيف والتعقيم الجيدين للحاويات البلاستيكية المستخدمة في تجهيز كراسي الانسان واستخدام ماء معقم بدلا من استخدام مياه

بصمامات وفلاتر ونظام لتعقيم المياه للحد من التلوث الميكروبي.

الخزانات او الماء المقطر ، اخذ الاحتياطات اللازمة لمنع تكوين الفلم الحيوي في شبكة مجرى المياه في كراسي الاسنان باستخدام المعقمات المناسبة والتأكيد على ضرورة استخدام الكراسي الحديثة في معالجة المرضى المزودة



صورة رقم (1) نمو الطحالب والاعفان في الحاويات المجهزة لمياه كراسي الاسنان



صورة رقم (2): بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مياه كراسي الاسنان

جدول (1) التلوث الميكروبي لمياه كراسي الاسنان المسحوبة من كلية طب الاسنان / جامعة بغداد

ت	العدد الكلي للبكتريا الهوائية مستعمرة/مليتر	تواجد بكتريا <i>Ps. aeruginosa</i>	تواجد الاعفان والخمائر	تواجد الطحالب والابتدائيات حرة المعيشة
1	1.2×10^3	-ve	-ve	طحالب
2	9×10^4	+ve	<i>Mucor</i>	طحالب
3	9×10^4	+ve	<i>Asp. niger</i>	طحالب+دايتوم
4	7×10^4	-ve	-ve	-ve
5	3×10^4	+ve	-ve	-ve
6	6×10^4	+ve	<i>Penicillium spp</i> <i>Rhodotorella</i> <i>mucilaginoso</i>	طحالب+دايتوم
7	7×10^4	+ve	<i>Rhodotorella</i>	طحالب
8	9×10^4	+ve	-ve	-ve
9	3.5×10^3	-ve	-ve	كلاميدو موناس+دايتوم
10	6×10^4	+ve	<i>Penicillium spp</i>	ابتدائيات حرة المعيشة
11	5×10^4	+ve	-ve	ابتدائيات حرة المعيشة
12	8×10^4	-ve	-ve	طحالب
13	5×10^4	-ve	-ve	طحالب
14	4×10^4	+ve	<i>Asp. Versicolor</i> <i>Penicillium spp</i>	طحالب
15	9×10^4	-ve	-ve	-ve
16	9×10^4	+ve	<i>Penicillium spp</i>	طحالب
17	8×10^4	+ve	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginoso</i>	ابتدائيات حرة المعيشة+دايتوم
18	7.5×10^5	-ve	-ve	طحالب
19	5.2×10^5	-ve	-ve	-ve
20	6×10^4	-ve	-ve	طحالب
21	5×10^4	-ve	-ve	طحالب
22	-ve	-ve	-ve	-ve
23	-ve	-ve	-ve	-ve
24	-ve	-ve	-ve	-ve
25	-ve	-ve	-ve	-ve
26	8×10^4	+ve	-ve	-ve
27	7.5×10^5	+ve	-ve	-ve
28	7×10^5	+ve	<i>Mucor spp.</i>	طحالب+كلاميدو موناس
29	6.5×10^5	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
30	6.3×10^5	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
31	5×10^4	-ve	<i>Asp. niger</i>	طحالب+كلاميدو موناس
32	6×10^4	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
33	7×10^4	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
34	3.5×10^3	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
35	7×10^4	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
36	8×10^3	-ve	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	طحالب+كلاميدو موناس
37	3×10^3	-ve	<i>Penicillium spp</i>	طحالب+كلاميدو موناس
38	4×10^4	-ve	<i>Steganosporium spp.</i>	طحالب+كلاميدو موناس
39	6.5×10^5	-ve	<i>Steganosporium spp.</i>	طحالب+كلاميدو موناس
40	2×10^4	-ve	-ve	-ve
41	6×10^3	-ve	<i>Asp. Versicolor</i>	طحالب+كلاميدو موناس
42	8.5×10^4	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
43	9×10^4	-ve	<i>Cladosporium</i>	طحالب+كلاميدو موناس
44	9.5×10^3	-ve	-ve	طحالب+كلاميدو موناس
45*	95	-ve	<i>Cladosporium spp.</i>	-ve

جدول (2) التلوث الميكروبي لمياه كراسي الاسنان المسحوبة من المركز التخصصي لطب الاسنان في العلوية/الرصافة

ت	العدد الكلي للبكتريا الهوائية مستعمرة/مليتر	تواجد بكتريا <i>Ps. aeruginosa</i>	تواجد الاعفان والخمائر
1	3×10^5	+ve	-ve
2	8×10^5	+ve	<i>Penicillium</i> spp
3	5×10^3	-ve	<i>Penicillium chrysogenum</i>
4	5.5×10^4	+ve	<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Emmericella nidulans</i>
5	5×10^4	+ve	-ve
6	9×10^4	-ve	<i>Alternaria alternata</i> <i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.
7	3×10^3	+ve	<i>Alternaria alternata</i> <i>Chladosporium chladosporioides</i>
8	2.7×10^3	+ve	<i>Alternaria alternata</i> <i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.
9	2.9×10^2	+ve	<i>Bipolaris</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aureobasidium pullulans</i>
10	5.5×10^4	+ve	<i>Bipolaris</i> spp.
11	1.2×10^5	+ve	<i>Byssoschlamys</i> spp.
12	2.7×10^4	+ve	<i>Asp. fumigatus</i> <i>Chladosporium chladosporioides</i>
13	8×10^2	+ve	<i>Asp. niger</i> <i>Byssoschlamys</i> spp.
14	6×10^3	+ve	<i>Asp. fumigatus</i>
15	8.8×10^3	-ve	<i>Aspergillus</i> spp <i>Alternaria alternate</i> <i>Bipolaris</i> spp.
16	7.6×10^3	-ve	<i>Penicillium</i> spp
17	4.2×10^3	-ve	<i>Asp. fumigatus</i> <i>Asp. flavus</i> <i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Bipolaris</i> spp
*18	-ve	-ve	<i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.

جدول (3) التلوث الميكروبي لمياه كراسي الاسنان المسحوبة من المركز التخصصي لطب الاسنان في العامرية/الكرخ

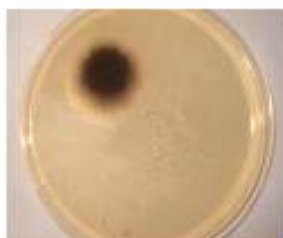
ت	العدد الكلي للبكتريا الهوائية مستعمرة/مليتر	تواجد بكتريا <i>Ps. aeruginosa</i>	تواجد الاعفان والخمائر
1	1×10^4	+ve	<i>Aspergillus</i> spp.
2	8×10^3	+ve	<i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.
3	7×10^3	+ve	<i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.
4	2×10^4	+ve	<i>Penicillium</i> spp.
5	6×10^4	+ve	-ve
6	1×10^4	+ve	<i>Aspergillus</i> spp.
7	1×10^4	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
8	4×10^3	+ve	<i>Chladosporium chladosporioides</i> <i>Penicillium</i> spp.
9	1×10^6	+ve	<i>Byssoschlamys</i> spp.
10	1.8×10^6	+ve	<i>Byssoschlamys</i> spp.
11	2.5×10^5	+ve	<i>Aspergillus</i> spp.
12	8.8×10^5	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.
13	3×10^5	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.
14	3.3×10^5	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.
15	2.5×10^5	+ve	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Paecilomyces</i> spp.
16	5.6×10^4	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.
17	1×10^5	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
*18	1×10^4	+ve	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.

جدول (4) التلوث الميكروبي لمياه كراسي الاسنان المسحوبة من المركز الصحي في الدورة

ت	العدد الكلي للبكتريا الهوائية مستعمرة/مليتر	تواجد بكتريا <i>Ps. aeruginosa</i>	تواجد الاعفان والخمائر
1	2.8×10^3	+ve	<i>Trichoderma</i> spp.
2	4×10^3	+ve	<i>Byssoschlamys</i> spp. Yeast
3	2.5×10^3	+ve	<i>Emericella nidulans</i>
4	2×10^3	+ve	<i>Chladosporium chladosporioides</i>
5	3×10^3	+ve	<i>Mucor</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
6	1.8×10^3	-ve	<i>Asp. niger</i>
7	5×10^3	+ve	<i>Penicillium</i> spp.
8	5×10^3	+ve	<i>Penicillium</i> spp.
9	1×10^4	+ve	<i>Asp. Niger</i> , <i>Penicillium</i> spp
10	$2.3 \times 10^{3*}$	+ve	<i>Penicillium</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp.

جدول (5) انواع الفطريات المعزولة من مياه كراسي الاسنان

No.	Fungi	No.	Fungi
1	<i>Aspergillus versicolor</i>	11	<i>Pencillium chrysogenum</i>
2	<i>Aspergillus niger</i>	12	<i>Pencillium roqueforti</i>
3	<i>Aspergillus fumigatus.</i>	13	<i>Alternaria alternata</i>
4	<i>Aspergillus flavus</i>	14	<i>Bipolaris</i> spp.
5	<i>Aspergillus ochraceus</i>	15	<i>Trichoderma</i> spp.
6	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16	<i>Emericella nidulans</i>
7	<i>Mucor</i> spp	17	<i>Rhizopus</i> spp.
8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	18	<i>Paecilomyces</i> spp.
9	<i>Aureobasidium pullulans</i>	19	<i>Byssochlamys.</i>
10	<i>Steganosporium</i> spp.	20	<i>Yeasts</i>

عفن *Steganosporium* spp.عفن *Aureobasidium pullulans*عفن *Aspergillus versicolor*عفن *Aspergillus flavus*عفن *Aspergillus fumigatus*عفن *Aspergillus niger*عفن *Aspergillus ochraceus*عفن *Emericella nidulans*عفن *Alternaria alternata*

صورة رقم (3) انواع الفطريات المعزولة من مياه كراسي الاسنان



يتبع..صورة رقم (3) انواع الفطريات المعزولة من مياه كراسي الانسان

4. Szymanska J. (2003). Biofilm and dental unit waterlines. Ann. Agric. Environ. Med. 10(2):151-157.
5. Abdulsalam IRA, Abo-Jnha B, and Kald T C.(2010). Assessment of Microbial pollution of the dental chairs water system (*pseudomonas aeruginosa*) in the city of Tripoli, Libya. World Academy of Science, Engineering and technology.36:60-66.
6. Schuster FL, and Visvesvara GS. (2004).Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 34(9):1001-1027.
7. Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard CL, Trudel L, and Prevost AP.(1996). Multiparametric analysis of waterline contamination in dental

المصادر

1. Souza-Gugelmin MC, Lima CD, Lima SN, Mian H, and Ito IY. (2003). Microbial contamination in dental-unit waterlines. *Braz Dent J.* 14(1):55-57.
2. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, and Marsh PD.(2000). Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbial.* 66(8):3363-3367.
3. Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK, Jr, Labib Me, and Williams HN.(2003). Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbial.* 69:3412-3420.

- barretos, state of SAO Paulo,Brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. Braz. J. microbiol.39:579-584.
18. Samaranayake L: (1988). essential Microbiology for dentistry,2nd Ed Elsevier limited Oxford.
19. Jolanta S. (2005). Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines. Ann Agric Environ. 12:153-155.
20. Lacey J, and Dukiewicz J.(1994).Bioaerosols and occupational lung disease. J. Aerosol Sci. 25:1371-1404.
21. Liaqat I. and Sabri AN.(2011). Biofilm , dental unit water line and its control .Afr. j. clin. Experim. microbiol.12 (1):15-21.
22. Luigi A., and Lucia C. (2010). Can technical, functional and structural characteristics of dental units predict *Legionella Pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* contamination. J. Oral Sci. 52(4):641-646.
23. Tambekar DH., Gulhane PB., Goyal KS. and Gulhane SR.(2007). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* In dental unit water-lines. Res. J. Microboil. 2(12):983-987.
24. Charles MC., Christopher RM. Sidney AM., Cathy PM., Brett LF., and Kren WRDH.(2002). How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels. J. Dent. Edu.. 66(4):549-555.
- units. Appl Environ Microbial. 62:3954-3959.
8. Walker JT, and Marsh PD. (2004).A review of biofilm and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). Int BiodeteriorBiodegradation.54:87-98.
9. Qarah S., and Cunha A B. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Infection. E. Med. (12): 1-10 .
10. ADA Council on Scientific Affairs.(1996). ADA statement on dental unit waterlinesJ Am Dent Assoc.127. 185-189.
11. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for infection Control in Dental Health-care setting. (2003). *M.MWR Rep.* 52 (RR-17): 1-66.
12. Council Directive 98/83/EC of 3 November (1998) on the quality of water intended for human consumption: *Official J. Eur. Commun.* 330: 32-54.
13. American Public Health Association (APHA). (2005). Standard methods for Examination of Water and Wastewater. 21thEd. Washington, D.C.
14. NHS (National Standard Methods). (2007). Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filter-health protection agency standard methods org. UK.
15. Mahnaz N, Maryam H, Zohre S, and Omolbanin Z. (2009). Microbial quality of water in dental unit waterlines. 1-4.
16. Boyle M., Ford T., Maki JS., and Mitchell R.(1991). Biofilms and survival of opportunistic pathogens in recycled water. Waste Manage Res. 9:465-470.
17. Oliveria AC. (2008) .Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environment and units in

عزل و توصيف عاثي الكولي فاج من الأجبان المحلية كدلائل للفيروسات المعوية.

عصام شاكر حمزة ، أمير خضير عباس، فرقد فرحان عبد الحميد ، هديل حسين عبد الأمير، سهيا عبد الحكيم علي

وزارة العلوم والتكنولوجيا - بغداد - العراق

البريد الإلكتروني: amirkheuhdever@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

عاثيات الكولي فاج هي الفيروسات التي تصيب بكتريا *E. coli* و تتشابه من حيث الحجم ، التركيب ، الشكل والمكونات مع الفيروسات المعوية التي تصيب الانسان ويمكن تعيينها بسهولة وبسرعة في النماذج البيئية والتي تشمل المياه والغذاء والتربة. تهدف الدراسة الى استخدام عاثيات الكولي فاج المعزولة من الاجبان المنتجة محليا كدلائل للفيروسات المعوية وباستخدام عزلات محلية من بكتريا *E. coli*.

جمعت عينات الاجبان بصورة عشوائية من الاسواق المحلية لمدينة بغداد. تم عزل عاثي الكولي فاج باستخدام طريقة Agar-overlay method ، اظهر شكل العاثي بالمجهر الالكتروني احتوائه على راس سداسي وذيل قابل للتقلص وغير مغلف وحسب المؤتمر العالمي لتصنيف الفيروسات فان العاثي ينتمي الى عائلة Myoviridae . تميزت البقع plaques للعاثي بكونها واضحة ودائرية وتراوح قطرها 2-3 ملم عند الحضانة بدرجة حرارة 30°م في حين كانت البقع اصغر حجما (1 - 1.5) ملم عند الحضانة بدرجة حرارة 37°م. لم يتأثر معيار العاثي عند معاملته بالمذيبات الدهنية التي شملت الكلوروفوم والداي اثيل الاثير في حين اظهر العاثي حساسية لاس الهيدروجيني الحامضي اكثر من الاس الهيدروجيني القاعدي. عزل عاثي الكولي فاج من الاجبان مصدره التلوث ببراز الانسان او الحيوان ويمكن استخدامه كدلائل للفيروسات المعوية كطريقة سريعة وسهلة وغير مكلفة.

ABSTRACT

Coliphages are viruses that infect *E.coli* and are similar in size ,structure, morphology and composition to human entericviruses but are more easily and rapidly detected in environmental samples include water, food and soils .

The aim of this study was to use coliphage isolated from local cheeses as indicator of enteroviruses by using local isolate of *E.coli* .

Cheeses samples are collected randomly from local markets of Baghdad capital. coliphage was isolated by using agar-overlay method electron microscopy show the phage had hexagonal head long contractile tail non-enveloped ,according to International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) the phage belong to the family Myoviridae.

The plaques of the phage were clear and rounded with diameter ranging from 2-3 mm at 30°C while the plaques appeared smaller 1-1.5 mm at 37°C.

The phage was found to be unaffected by chloroform and diethyl ether moreover the phage was sensitive to acidic PH more than alkaline PH.

Isolation of coliphage from cheese original from fecal pollution of human or animal sources and can use as indicator of enteroviruses as readily, simply and inexpensively method.

المقدمة

جينيا ومصليا تم تصنيف عاثيات Male Specific F⁺ Coliphages الى اربعة مجموعات والتي يمكن من خلالها معرفة مصدر التلوث هل هو انساني او حيواني فالمجموعتين الثانية والثالثة مصدرها براز الانسان والمجموعتين الاولى والرابعة مصدرها براز الحيوان (11).

تنتشر صناعة الاجبان في العراق بشكل واسع عادة في المناطق الريفية ولا يتم مراعاة شروط النظافة في انتاج مثل هذه الاجبان وبسبب فقدان الرقابة الصحية فغالبا ما تحدث حالات التهاب الامعاء والاسهال غير معروفة السبب بعد تناول مثل هذه الاجبان وبسبب عدم وجود مختبرات متخصصة في الكشف عن الفيروسات المعوية المنقولة بالاغذية وافتقار المواصفات القياسية العراقية للاغذية الى اي اشارة للفيروسات المعوية في الاجبان لذا يهدف البحث الكشف عن عاثيات الكولي فاج كدلائل للفيروسات المعوية والتلوث البرازي في الاجبان المحلية .

المواد وطرائق العمل

التمنجة:

جمعت عينات من الاجبان المنتجة محليا بصورة عشوائية من الاسواق المحلية لمدينة بغداد خلال الفترة من نيسان ولغاية حزيران / 2012.

عزل الخلايا المضيفة:

للتحري عن عاثيات الكولي فاج في عينات الاجبان تم استخدام عذلة محلية من بكتريا *E.coli* كخلايا مضيفة (Host cells) للعاثيات تم عزلها من عينات الاجبان المنتجة محليا وتم تشخيصها والتعرف عليها بتميتها على وسط Eosin Methylen Blue (EMB) .

عزل عاثي الكولي فاج من الاجبان المحلية:

تم اتباع طريقة (12) مع اجراء بعض التعديلات . حيث اخذ 100 غم من عينة الجبن ووضعت في خلاط كهربائي واضيف اليه 180 مليلتر من الوسط المغذي السائل Nutrient broth و دور الخليط لمدة دقيقتين ثم نبذ في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة ورشح الرائق من خلال مرشحات دقيقة بقطر 0.22 ملي مايكرون ، اخذ 1 مليلتر من الراشح واضيف اليه 0.1 مليلتر من بكتريا *E.coli* في الطور اللوغارتمي وحضن لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 37°م ثم اضيف الى 3مل من الوسط المغذي السائل الحاوي على 0.7% من الـ Agar بدرجة حرارة 45°م (Top agar) وتم المزج جيدا وصب المزيج على وسط المغذي الصلب الحاوي على 1.5% من الاكار (Bottom agar) وترك ليتصلب ثم حضنت الاطباق مقلوبة بدرجة حرارة 30 و 37°م لمدة 24 ساعة . فحصت الاطباق بملاحظة البقع (plaques) وتم تأكيد عزل عاثي الكولي فاج بنقل بقعة (plaque) منفردة بواسطة ماصة

الفيروسات المعوية عبارة عن طفيليات اجبارية Obligate parasites تصيب او تتكاثر في القناة الهضمية للانسان ويتم طرحها مع البراز بمعيار يتراوح بين 10⁵ - 10¹¹ فريون/غرام من الغائط وتضم هذه الفيروسات اجناس مختلفة مثل Adenoviruses, Parvoviruses, Hepatitis E, A viruses, Noroviruses, Astroviruses, Enteroviruses (Coxsackie viruses, Echoviruses, Polioviruses), Rotaviruses, (1).

تتسبب الفيروسات المعوية في احداث اعراض مرضية مختلفة والمتمثلة بالتهاب المعدة والامعاء واصابات الجهاز التنفسي والتهاب الكبد، التهاب ملتحة العين واصابات خطيرة مثل التهاب السحايا والتهاب الدماغ والشلل ومعظم حالات الاصابة بالفيروسات المعوية تحدث نتيجة تلوث الماء والغذاء بمياه الصرف الصحي (2,3).

تشكل الفيروسات المعوية خطورة كبيرة على صحة الانسان خاصة في الدول النامية ففيروسات الروتا مثلا تتسبب في احداث 140 مليون من حالات الاسهال الشديدة في الاطفال بعمر أقل من 5 سنوات والتي تشكل حوالي 25% من حالات الاسهال بصورة عامة ويموت منهم حوالي 800.000 كل عام (4).

الفيروسات المعوية لا تتواجد بصورة طبيعية في امعاء الانسان وانما تتواجد في الاشخاص المصابين والحاملين للفيروسات وخاصة العاملين في مجال تحضير واعداد الاغذية فتلوث سطح الاغذية او الغذاء وتبقى لفترة زمنية طويلة (5). كذلك يمكن ان تحدث الاوبئة بالفيروسات

المعوية (التهاب الكبد الفيروسي A ، Noroviruses) نتيجة استهلاك المنتجات الزراعية (الخضر والفواكه) التي تسقى بمياه الصرف الصحي (6).

تستخدم بكتريا دلائل التلوث الميكروبي وخاصة *E.coli* عادة في تحديد تلوث ومدى صلاحية الاغذية للاستهلاك البشري الا ان استخدام هذه البكتريا كدلائل للفيروسات المعوية يعتبر غير مناسب لكون الفيروسات هي اكثر ثباتا ومقاومة من البكتريا (7).

لذا بات من الضروري البحث عن دلائل للفيروسات المعوية يمكن من خلالها الاستدلال على وجود الفيروسات المعوية والتي مصدرها براز الانسان وتعتبر عاثيات البكتريا Bacteriophage والانواع منها التي تصيب بكتريا *E.coli* والتي يطلق عليها بعاثيات Coliphages من اهم الدلائل التي استخدمت كمؤشر لتواجد الفيروسات المعوية في الماء والغذاء (5، 8، 9).

تتصف عاثيات الكولي فاج بخصوصيتها في اصابة بكتريا *E.coli* والتي مصدرها براز الانسان والحيوان وهناك نوعين من عاثيات الكولي فاج تستخدم كدلائل للفيروسات المعوية والتلوث البرازي وهي Somatic Coliphages و Male Specific F⁺ Coliphages و تتواجد عاثيات Male Specific F⁺ Coliphages في المياه و الاغذية الملوثة ببراز الانسان والحيوان ولا تتواجد في البينات غير الملوثة بالبراز بمعنى ان هذه الانواع من العاثيات تتكاثر فقط عندما تكون في امعاء الانسان او الحيوان (10).

حساسية العاثي للمذيبات الدهنية

استخدمت طريقة (15) لدراسة حساسية العاثي للمذيبات الدهنية بمزج مليلتر واحد من الكلوروفورم او ثنائي اثيل الايثر مع مليلتر واحد من عاثي الكولي فاج بمعيار 10×10^{12} PFU/ml في انابيب زجاجية معقمة محكمة الغلق حضنت بصورة مائلة لمدة ساعة عند درجة حرارة 30°C مع الرج المتكرر، نبذ المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق فصل الجزء العلوي في حالة الكلوروفورم و الجزء السفلي في حالة ثنائي اثيل الايثر وتم معايرتها جنباً الى جنب مع ضابط التجربة المتكون من مليلتر واحد من العاثي ومليلتر واحد من الوسط المغذي السائل.

تأثير الاس الهيدروجيني على العاثي

تم دراسة تأثير الاس الهيدروجيني حسب (15) و استخدمت قيم الاس الهيدروجيني الواقعة بين 4 - 10. حيث تم اضافة 0.1 مليلتر من العاثي بمعيار (PFU/ml 10×10^{12}) الى 9.9 مليلتر من الوسط المغذي السائل وبعد حضن النماذج ذات القيم المختلفة من الاس الهيدروجيني لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة 30°C تم معايرة العاثي المتبقي واعتبر النموذج ذو الاس الهيدروجيني 7 كضابط للتجربة.

حساسية عزلات بكتريا *E. coli* للعاثي

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من (مياه سطحية عدد 3، نباتات ورقية (كراث) ، عزلة كلينيكية) حسب (15)، وذلك بنشر 0.1 مليلتر من الوسط الزراعي السائل لكل عزلة من بكتريا *E. coli* في الطور اللوغارتمي على الوسط المغذي الصلب وتركت الاطباق لمدة ساعة بدرجة حرارة 37°C بعدها قطر العاثي بمعيار (PFU/ml 10×10^{12}) على نقاط محددة في خط زرع بكتريا *E. coli* ولكل عزلة بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة وفحصت الاطباق لملاحظة مناطق التحلل Lysis zone في نقاط التقطير دلالة على حساسية عزلة *E. coli* للعاثي ويتأكد من حساسية العزلات للعاثي بتكرار الاصابة لعزلة *E. coli* الحساسة.

النتائج والمناقشة

استخدمت خمسة عزلات من بكتريا *E. coli* كخلايا مضيفة للعاثي تم تشخيصها وتميزت مستعمراتها على وسط (EMB) بلونها المعدني البراق (metallic sheen) صورة رقم (1)، وظهرت احدى العزلات حساسيتها للعاثي الكولي فاج الذي تم عزله من الاجبان المحلية. ان وجود عاثي الكولي فاج في الاجبان قد يكون بسبب تلوث الاجبان ببراز الانسان او الحيوان او تلوث المياه المستخدمة

باستور معقمة الى انبوب زجاجي معقم يحتوي 1 مليلتر من الوسط المغذي السائل وترك الانبوب مع الرج في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ، نبذ المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ورشح الرائق وتم اعادة نفس الطريقة اعلاه وكررت هذه العملية لثلاث دورات للتأكد من وجود وتنقية العاثي.

تحضير عاثي الكولي فاج الخزين

تم استخدام طريقة الوسط المغذي الصلب Agar overlay method (13) حيث تم اختيار الاطباق التي اظهرت اكبر عدد من البقع وتم اضافة 10 مليلتر من الوسط المغذي السائل لكل طبق تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 3 ساعات ثم جمع الوسط المغذي السائل ونبذ في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ورشح الرائق من خلال مرشحات دقيقة بقطر 0.22 ملي مايكرون وحفظ العاثي بدرجة حرارة 4°C .

دراسة شكل العاثي بالمجهر الالكتروني

تم دراسة شكل العاثي بالمجهر الالكتروني حسب (14)، حيث تم وضع قطرة من مخزون العاثي بمعيار PFU/ml 10×10^{13} على (Carbon-coated 400-mesh copper grids) وتم التخلص من القطرة الفائضة باستخدام ورقة الترشيح، بعدها تم اضافة قطرة من صيغة Phosphate (Tingestic Acid 2% , pH 7) وترك ليضعة دقائق وتم التخلص من الصيغة الفائضة باستخدام ورقة ترشيح وتم فحص العينة بجهاز Transmission electron microscope JEOL (JEM-1400 TEM)*.

دراسة شكل البقع

تم دراسة شكل وحجم البقع plaque باستخدام طريقة Agar overlay method [13] على الوسط المغذي الصلب والحضانة بدرجة حرارة 30°C و 37°C ولمدة 24 ساعة.

معايرة عاثي الكولي فاج

تم معايرة عاثي الكولي فاج باستخدام طريقة Agar overlay method (13)، اذ تم اضافة 0.1 مليلتر من بكتريا *E. coli* في الطور اللوغارتمي و 0.1 مليلتر من عاثي الكولي فاج من كل تخفيف من التخفيف العشرية الى 3 مليلتر من الوسط المغذي (Top agar) بدرجة حرارة 45°C ومزج جيداً وصب على سطح (Bottom agar) وتركت الاطباق حتى تتصلب وحضنت مقلوبة بدرجة حرارة 30°C لمدة 24 ساعة وتم اختيار الاطباق التي يتراوح عدد البقع فيها بين (100-200) بقعة وحساب معيار العاثي مقدراً (Plaque Forming Unit PFU) بضرب عدد البقع في مقلوب التخفيف.

التي تنمو بدرجات الحرارة المتوسطة (20-40) درجة مئوية mid temperature phages والعائيات التي تنمو بدرجات الحرارة الواطئة اقل من 20 درجة مئوية low temperature phages لم يتأثر معيار العائى بالمذيبات الدهنية الكلوروفورم وثنائي اثيل الايثر و يستدل من ذلك عدم احتواء العائى على المركبات الدهنية في تركيبه. وبخصوص تأثير عائى الكولي فاج المعزول بالقيم المختلفة من الاس الهيدروجيني فقد اظهر العائى تثبيط كامل في معياره عند الاس الهيدروجيني 4 وابدى العائى حساسيته للاس الحامضي (5,6) اكثر من الاس القاعدي جدول (1) حيث انخفض معيار العائى من $10 \times 1 \text{ PFU/ml}$ (10^{12}) الى $10 \times 1 \text{ PFU/ml}$ (10^7) عند الاس الهيدروجيني (10) في حين انخفض معيار العائى من $10 \times 1 \text{ PFU/ml}$ (10^{12}) الى $10 \times 1 \text{ PFU/ml}$ (10^3) عند الاس الهيدروجيني 5 ان تأثر العائى بالقيم المتطرفة للاس الهيدروجيني يعود الى تأثير هذه القيم على البروتينات المكونة للعائى وخاصة بروتينات الذيل المسؤولة عن التصاق العائى بالبكتريا.

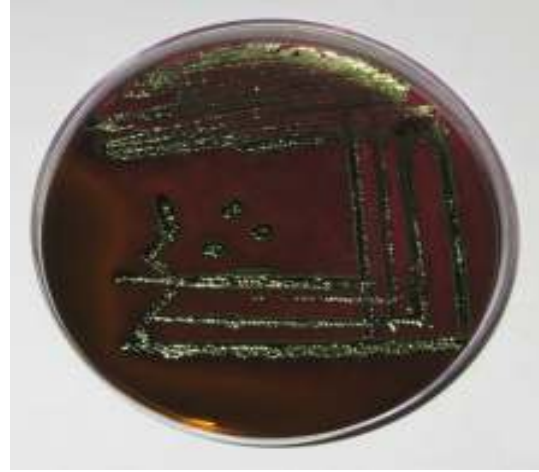
جدول (1) تأثير قيم الاس الهيدروجيني على عائى الكولي فاج المعزول

قيم الاس الهيدروجيني	معيار عائى الكولي فاج PFU/ml
10	10×3
9	10×5.5
8	10×1.6
7	10×1
6	10×2
5	10×1
4	0

في التصنيع بمياه الصرف الصحي او تلوث الادوات المستخدمة في صناعة الاجبان(16).

ان عملية التحري عن العائيات في الاغذية بصورة عامة يتطلب احتواء الاغذية على معيار عالي من البكتريا ($5 \log \text{ CFU/g}$) لذلك فان عزل العائيات التي تصيب بكتريا دلائل التلوث الميكروبي (*E.coli*) هو اكثر شيوعا من عزل العائيات التي تصيب البكتريا المرضية والتي تتواجد باعداد اقل عادة في الاغذية (17).

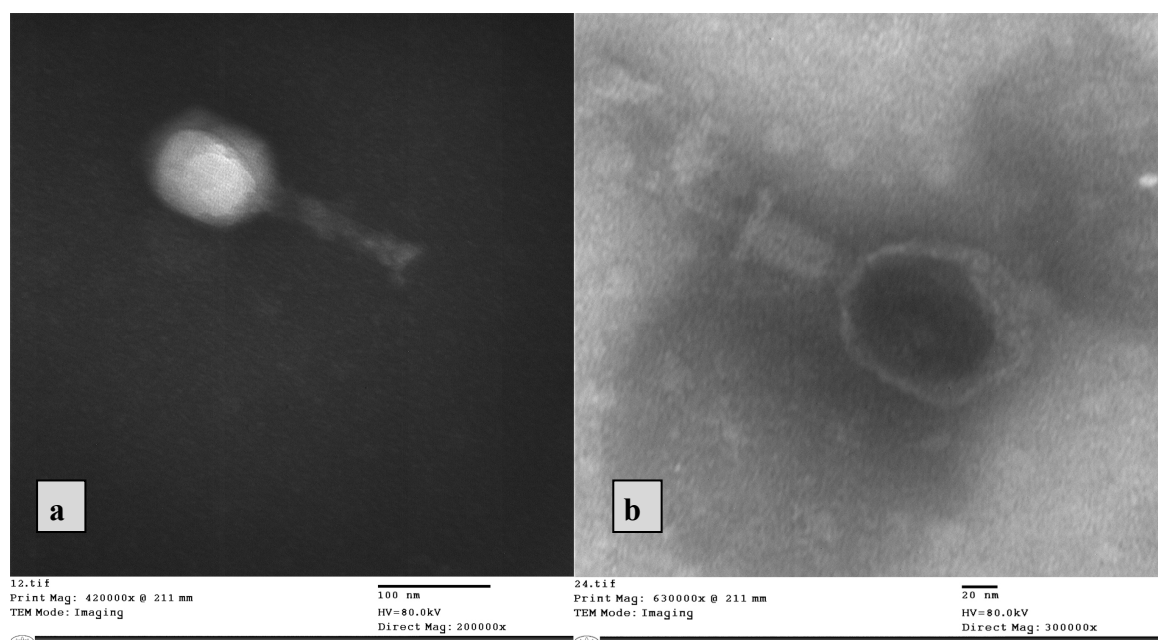
اظهر شكل العائى المعزول بالمجهر الالكتروني احتوائه على راس Head الذي تميز بشكله السداسي و بقطر (49nm) وعدم احتوائه على الغلاف Non-enveloped و يرتبط بالراس الذيل بطول 139nm والذي امتاز بقابليته على النقل Contractile tail و احتواء الذيل في نهايته على Base plate . صورة رقم (2) .



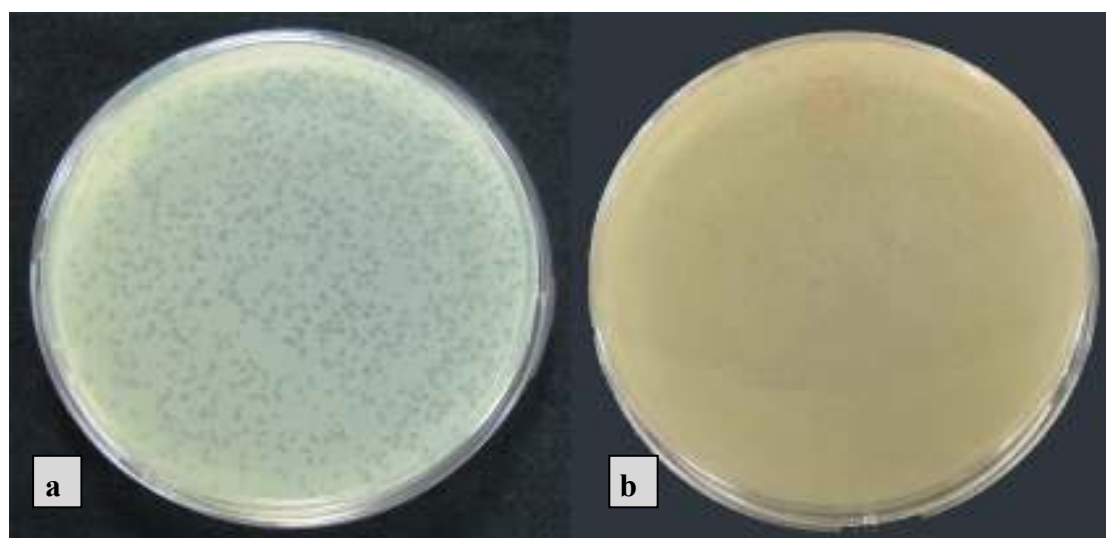
صورة رقم (1): نمو بكتريا *E. coli* على وسط EMB agar

ان احتواء العائى على ذيل قابل للتقلص وعدم احتوائه على الغلاف (Non enveloped - contractile tail) يجعل تصنيفه ضمن عائلة (Myoviridae) حسب تصنيف العائيات من قبل International Committee (ICTV) on Taxonomy of Viruses (18).

تميزت بقع plaques العائى المعزول بكونها دائرية الشكل اما حجم البقع فقد تبين اعتمادا على درجة الحضانة ففي درجة حرارة 37°م تميزت البقع بصغر حجمها (1-1.5) ملم في حين كانت البقع اكبر حجمها (2-3) ملم عند الحضانة بدرجات حرارة 30°م صورة (3) وكانت البقع اكثر وضوحا و حجما (2-4) ملم عند معاملة العائى بالكلوروفورم . ان تأثير درجة حرارة الحضانة على شكل و حجم البقع لعائى الكولي فاج المعزول تتفق الى ما توصل اليه (19)، حيث صنف 38 من عائيات الكولي فاج المعزولة من عشرة منتوجات غذائية الى ثلاثة اصناف هي العائيات التي تنمو بدرجات الحرارة العالية اكثر من 40 درجة مئوية high temperature phages والعائيات



صورة رقم (2): a / شكل العاثي بالمجهر الالكتروني ، b / عاثي الكولي فاج يلاحظ تقاص الذيل



صورة رقم (3): a / شكل البقع plaques لعاثي الكولي فاج بدرجة حرارة 30°م ،
b / شكل البقع plaques لعاثي الكولي فاج بدرجة حرارة 37°م

اما بخصوص حساسية عزلات *E.coli* من مصادر اخرى غير الاجبان فقد اظهرت عزلة *E.coli* من الخضر الورقية (الكراث) حساسيتها للعاثي صورة (4) .
تمتاز عاثيات الكولي فاج بخصوصيتها في اصابة بكتريا *E.coli* والتي مصدرها براز الانسان و الحيوان و بالتالي فان تواجد عاثيات الكولي فاج في الاجبان يعني احتمالية تواجد الفيروسات المعوية (20)، بسبب التشابه الكبير بين عاثيات الكولي فاج و الفيروسات المعوية من حيث الحجم

3. Caroline T, Thomas J, Daniel G, Sandra VB, Lara T, Samuel C, Kathrin M, Nicolas R, Joun-David A, Paola MS, Philippe E, Evgeny Z, and Laurent K. (2009). New respiratory enterovirus and recombinant Rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerging Infectious Diseases*. 15(5):719-726.
4. Steele AD, Peenze I, de Beer MC, Pager CT, Yeats J, Potgieter N, Ramsaroop U, page NA, Mitchell J.O, Geyer A, Bos P, and Alexander J.J. (2003). Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. *Vaccine*, 21: 354-360.
5. Le Guyader FS, Mittelholzer C, Haugarreau L, Hedlund KO, Alsterlund R, Pommepuy M, and Svensson L. (2004). Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 179-186.
6. Anthony IO, Thulani S, and Siyabulela SG. (2010) Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7:2620-2637.
7. He JW, and Jiang S. (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2250-2255.
8. Girones R (2006). Tracking viruses that contaminate environments using PCR to track stable viruses provides an effective means for monitoring water quality for environmental contaminants. *Microbe*, 1: 19-25.
9. Hejkal TW, Wellings FM, Lewis AL, and Larock PA. (1981). Distribution of viruses associated with particles in waste water. *Appl Environ Microbiol.* 41:628-34.
10. Schper M, Jofre J, Uys M, and Grabow WOK. (2002). Distribution of genotypes of F⁺ specific RNA bacteriophages in human and nonhuman sources of fecal pollution in south Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92(4): 657-667.
11. Yee SYF, Fong NY, Fong GT, Tak OJ, Hui GT, and Ming YS. (2006). Male specific RNA coliphages detected by plaque assay and RT-PCR in tropical river waters and animal

والتركيب الجيني و مقاومتها للظروف البيئية و المعقمات(21).

يتعذر الكشف عن جميع الفيروسات المعوية في الاغذية بسبب تواجدها بصورة منفردة و بتركيز قليلة وان الطرق المختبرية المتبعة لتعنيها تتصف بصعوبتها و كلفتها و تستغرق فترة زمنية طويلة لتشخيصها و تحتاج الى مختبرات متخصصة لذا تم اعتماد التحري عن عاثيات الكولي فاج كدلائل على تواجد الفيروسات المعوية وبالتالي التلوث البرازي للاغذية (22) نظرا " لافتقار وزارات الدولة المعنية الى المختبرات المتخصصة في التحري عن الفيروسات المعوية المنقولة بالاغذية وازدياد الحالات المرضية المتسببة عن الفيروسات المعوية مثل التهاب الكبد الفيروسي نوع A, E و فيروس الروتا المسبب لحالات الاسهال في الاطفال و عدم وجود قاعدة بيانات معلوماتية عن بقية الفيروسات المعوية وخاصة فيروس Noro وعدم وجود اي اشارة في المواصفات القياسية العراقية عن الفيروسات المنقولة بالاغذية ندعو الجهات ذات العلاقة الى اعتماد التحري عن عاثيات الكولي فاج كدلائل للفيروسات المعوية في الاغذية باعتبارها طريقة سهلة و دقيقة و غير مكلفة و لا تحتاج الى اجهزة و لا تستغرق فترة طويلة لتعيينها ويمكن بواسطتها ايضا تحديد مصدر التلوث هل هو انساني او حيواني (23).



صورة رقم (4): حساسية بكتريا *E. coli* المعزولة من الخضار الورقية لعائي الكولي فاج

المصادر

1. Carter MJ.(2005). Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1354-1380.
2. Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, Van der Veer B, Dorrestijn B, and Koopmans M. (2007). Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin Microbiol.* 45: 1389-1394.

- beef and poultry meat. J. Food Prot. 65:93-99.
23. Shaone C, Long SS, El-Khory SJ, Oudejans MD, and Sobsey J. (2005). Assessment of sources and diversity of Male-Specific coliphages for source tracking. Environ. Eng. Sci. 22(3): 367-377.
- fecal matter. Int. J. Environ. Health Res. 16: 59-68.
12. Michel G, Annette R, Philippe S, and Romain B. (1995). Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. Appl. Environ. Microbiol. 61(7):2572-2576.
13. Maier MR, Pepper IL, and Gerba ChP. (2000). *Environmental microbiology*. Academic Press. U.S.A. p491-500
14. Muniesa M, Lucena F, and Jofre J. (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. Journal of Applied microbiology 87: 402-409.
15. Amir AL-Sultany, Farooq Y AL-Ani, and Ebtesam AL-Khafajy, (1994). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages from lysogenic local isolate. Iraqi J. of science, 35(3):950-976.
16. Oflynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, and Coffey A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3417-3421.
17. Gordon GG. (2005). Bacteriophage control of foodborn bacteria. Journal of Food Protection, 68(5):1102-1111.
18. Maharajan A. (2011). Bacteriophage in Virology. PG & Research Department of Zoology. Khadir Mohideen College. Adirampattinam – 614701. Thanjavur Dist., Tamil Nadu, India.
19. Kennedy J, Wei C, and Oblinger J. (1986). Characterization of coliphages recovered from foods according to temperature of infectivity. Journal of Food Protection, 49(12): 952-954.
20. Dore WJ, Henshilwood K, and Lees DN. (2000). Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66:1280-1285.
21. Lechevallie, MW, Karim M R, Weihe J, Rosen J S, and Sobrinho J. (2006). Coliphage as a potential indicator of distribution system integrity. J. AWWA, 98(7): 87-96.
22. Hsu FC, Shieh C, and Sobsey MD. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground

مشكلة ترتيب تعاقب (تسلسل) الأعمال على مراكز الإنتاج / الخدمات وطرائق حلها

تيسير "محمد رضا" احمد مقدادي (1) كاسر نصر المنصور(2)

قسم الحاسبات وتقنية المعلومات/ كلية العلوم والآداب بالكامل /جامعة الملك عبد العزيز(1) قسم إدارة الأعمال / كلية الاقتصاد والإدارة /جامعة الملك عبد العزيز(2) المملكة العربية السعودية

البريد الإلكتروني: tmugdadi@yahoo.com

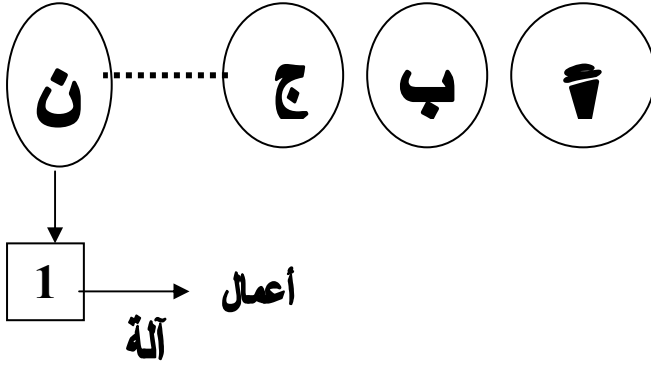
الملخص باللغة العربية

تعد مسألة ترتيب (تسلسل) الأعمال على الآلات/ مراكز الخدمة من المسائل المهمة في إدارة الإنتاج والعمليات، وبخاصة جدولة الأعمال ، لأنها تسعى إلى تحقيق الترتيب الأمثل لمرور الأعمال على الآلات ، من جهة ، ومن جهة أخرى تأتي في سياق الطرائق لتحسين الانتاجية ورضا العملاء من خلال تقليص الزمن الإجمالي لإنجاز الأعمال على عدد من الآلات ، وتقليل الوقت الضائع للآلات/ مراكز الخدمة أثناء إنجاز الأعمال عليها. بالإضافة الى الدقة في تحديد مواعيد التسليم والاستلام. لقد توصلت الدراسة الحالية إلى صياغة قواعد (خوارزميات) عامة في التطبيق، تساعد في الوصول إلى الترتيب المثالي للأعمال على الآلات/ مراكز الخدمات ، وبدون استثناءات كما هو معروف في القواعد المستخدمة في هذا المجال . ولا يتطلب تطبيقها أية شروط، بالإضافة إلى سهولتها وبساطتها ووضوحها ودقتها، وإمكانية تطويرها ببرامج حاسوبية .

ABSTRACT

Job sequencing on machines is considered as an important issue in the management of production processes, and scheduling work in particular as it strives to achieve the ideal process on machines, on the one hand, on the other hand to improve productivity and gain customer satisfaction by reducing the total time to complete the work on a number of machines; in addition to the precision in meeting delivery and receipt time limit. The study has come up with rules (algorithms) of general application that help to reach the ideal sequencing jobs on machines / service centers, with no exceptions, as it is known in the rules used in this area. Applying the rules does not require any conditions. Also, they attain the ease and simplicity, clarity and accuracy, and the possibility of developing computer programs.

المقدمة



3- قاعدة جونسون Johnson's Rule

وعلى الرغم من سهولة تطبيق هذه القواعد إلا أنها تختلف في الحلول التي تقدمها، بالإضافة إلى كثرة العيوب والقيود التي تخص كل منها، وتحول دون تقديم الحل الأمثل للجدولة، وترتيب أولوية الأوامر وتعاقبها على الآلات .

خلص (2) إلى قواعد ترتيب التسلسل التالية:

أ. قاعدة ترتيب تسلسل (ن) عدد من الأعمال على آلتين فقط Sequencing N jobs on two machines . وهذه القاعدة تركز على استغلال طاقة وزمن الآلة الأولى بالكامل دون ترك أي فترة عاطلة ، أو على تقليل الزمن العاطل على الآلة الثانية إلى أدنى حد ممكن . ولكن في حالة حدوث أي خطأ في تأخير زمن العمل على الآلة الأولى فإن ذلك يؤدي لتأخير العمل على الآلة الثانية بنفس المقدار . وتعد هذه النقطة أهم عيوب هذه القاعدة .

ب- قاعدة ترتيب تسلسل (ن) عدد من الأعمال على ثلاث آلات Sequencing N jobs on three machines . بالإضافة إلى عيب القاعدة الأولى فإن هذه القاعدة لا تطبق إلا في حالات خاصة، وفي حالة تحقق إحدى الشرطين التاليين أو كلاهما معاً ، وذلك في حالة كان العمل ينجز ويمر على الآلات الثلاث بالتسلسل :
1- أن يكون أقصر وقت معالجة على الآلة الأولى أكبر أو يساوي أطول وقت معالجة على الآلة الثانية .

2- أن يكون أقصر وقت معالجة على الآلة الثالثة أكبر أو يساوي أطول وقت معالجة على الآلة الثانية .

وقدم (Baker and Trietsch) دراسة خوارزمية لجدولة مرور عدة أعمال على آلتين (3).

وكما توصل Campbell وآخرون إلى قواعد لتحسين ترتيب تسلسل الأعمال على الآلات. وعرفت هذه القواعد بخوارزمية CDS اختصاراً لأسماء مقدميها ، وعبئها أنها تتطلب إجراءات

تعد زيادة الإنتاجية باستمرار أحد أهم المزايا التنافسية لمنظمات الأعمال، بالإضافة إلى الاستجابة لمتطلبات العميل من حيث الدقة في الإستملا والتسليم ، والسرعة في الإنجاز. تعد كل من: (a) مسألة تقليل زمن المعالجة لمجموعة أعمال متعاقبة على عدة آلات/ مراكز خدمة ، (b) وتقليل إجمالي الزمن العاطل للآلات/ مراكز الخدمة ، من المسائل الهامة في جدولة الإنتاج والعمليات ، لما لها من أثر كبير على خفض تكاليف الإنتاج وبالتالي زيادة الإنتاجية في منظمات الأعمال، والدقة في استلام وتسليم الأعمال للعملاء، وبالتالي زيادة رضا العملاء ، وزيادة القدرة التنافسية للمنظمة.

بالرغم من تعدد إجراءات الجدولة القصيرة الأمد للآلات Short-term scheduling tactics وفعالية معظمها في جدولة عمل الآلات والعمال ، إلا أن قواعد ترتيب تسلسل الأعمال (الأوامر) على مراكز العمل (الآلات) Sequencing jobs in work center تبقى قاصرة في كثير من الحالات ، وبخاصة في الحالتين التاليتين :

(أ) حالة ترتيب تسلسل (ن) عدد من الأعمال على ثلاث آلات Sequencing N jobs on three machines .
(ب) حالة ترتيب تسلسل (ن) عدد من الأعمال على (م) عدد من الآلات Sequencing N jobs on M machines .
ففي كلا الحالتين لا تطبق القواعد المعروفة لترتيب الأعمال على الآلات إلا في حالات خاصة واستثنائية، ولا تقدم دائماً الحل الأمثل (1) . لهذا تأتي هذه الدراسة لصياغة قواعد عامة التطبيق تحقق الحل الأمثل في جدولة الأعمال، ولا يشترط تطبيقها أية شروط .

إن أهمية هذه الدراسة تتبع من كونها تعالج أحد الموضوعات الهامة التي تشغل تفكير وجهود أصحاب الاختصاص والمهنيين في الحياة العملية ، وبخاصة في الصناعة لوضع الحلول المثالية لجدولة الأعمال .
إن قواعد ترتيب تسلسل الأوامر في مراكز الإنتاج كثيرة وأهمها ما يلي :

1- قواعد أولوية الأعمال السريعة Priority Rules for Dispatching Jobs

وأهم هذه القواعد هي التالية :

- (أ) الوارد أولاً يخدم أولاً FCFS: First-Come First Served
(ب) زمن العملية الأقصر SPT: Shortest Processing Time
(ج) التاريخ الأبعد للاستحقاق EDD: Earliest Due Date
(د) زمن العملية الأطول LPT: Longest Processing Time

2- قاعدة النسبة الحرجة Critical Ratio:

وهذه القواعد المذكورة أعلاه يقتصر تطبيقها على ترتيب تسلسل مرور عدة أعمال على آلة واحدة (1) ، حيث يأخذ تسلسل تلك الأعمال على الآلة الشكل التالي :

معقدة جداً لتطبيقها (4)، ومع ذلك فإنها لا تقدم الحل المثالي بل القريب منه (5). ونتيجة لعدم كفاية قواعد الجدولة وقواعد الترتيب السابقة ظهرت دراسات لاحقة لتحسين قواعد الحل المثالي، ومن هذه الدراسات ما يلي :
(أ) دراسة M.S Fox and S.F. Smith 1984 والتي قدمت الأنظمة الخبيرة Expert Systems لتحسين الحلول (1) .

(ب) دراسة (6) والتي قدمت الجدولة المحددة .
(ج) دراسة (7) قدمت خوارزمية وبرنامج حاسوبي لجدولة عدة اعمال على عدة الآت.
بالرغم من كافة التحسينات التي قدمتها الدراسات الأخيرة (فقرة أ، ب، ج) للوصول إلى الحل الأمثل فإن مسألة ترتيب (ن) عدد من الأعمال على (م) عدد من الآلات ما زالت تحتاج إلى المزيد من الدراسة ، للوصول إلى قواعد جديدة عامة للتطبيق (8)، وتستطيع تقديم الحلول المثالية دون وجود استثناءات أو شروط في تطبيقها كما هو الحال في القواعد السابقة. وفي إطار هذه الجهود نقدم عملاً هذا متمثلاً بالقواعد (الخوارزميات) المقترحة التالية :

القواعد المقترحة لترتيب تسلسل (ن) عمل على (م) آلة / مركز خدمة

القاعدة الأولى (K1): ترتيب (ن) عمل على آلتين
Sequencing N jobs on two machines

إن تسلسل مرور الأعمال على آلتين (بالتسلسل) يأخذ الشكل التالي :



وإجراءات تطبيق هذه القاعدة هي التالية :

1- نشكل مصفوفة من ثلاثة صفوف و (ن) عمود، ثم نضع في الصف الأول الأعمال وفي الصف الثاني الأزمنة اللازمة لمعالجة الأعمال على الآلة (1) . كما نضع في الصف الثالث الأزمنة اللازمة لمعالجة الأعمال على الآلة (2) .

2- نختار العمل الذي يستغرق أقل زمن معالجة على الآلة الأولى حتى نقلل الوقت العاطل على الآلة الثانية إلى أدنى حد ممكن في حالة عدم حجز الآلة الثانية لأية أعمال أخرى . ويشترط في هذا الاختيار أن يكون زمن المعالجة على الآلة الأولى أقل من زمن المعالجة على الآلة الثانية لنفس العمل، كي لا يزداد الوقت العاطل على الآلة الثانية بمقدار الفرق بين زمن المعالجة على الآلة الأولى وزمن المعالجة على الآلة الثانية .

3- نختار العمل الثاني الذي يكون زمن معالجته على الآلة الأولى أكبر مباشرة من زمن معالجة العمل السابق المختار على الآلة الثانية ، إذا لم يوجد نأخذ الذي يساويه، فإذا لم يوجد نأخذ الزمن الأصغر منه مباشرة .
4- نكرر الخطوة رقم (3) حتى ننهي ترتيب تسلسل كافة الأعمال .

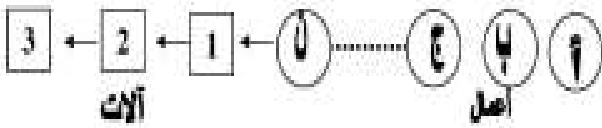
مثال : لدينا مجموعة الأعمال الخمسة التالية : A ، B ، C ، D ، E ، ويجب أن تعالج على الآلة الأولى أولاً ثم الثانية ، والأزمنة اللازمة لمعالجة كل أمر على كل آلة كما هو وارد في الجدول التالي :

الأعمال	B	E	D	C	A
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	3	7	10	8	5
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	6	12	7	4	2

وباستخدام خرائط Gantt لتحديد الزمن الإجمالي للمعالجة الشكل (1) نرى أن الزمن الإجمالي لمعالجة هذه الأعمال على الآلتين مقداره (35) يوم، وهو أقل زمن ممكن للمعالجة ، علماً أن قاعدة جونسون تقدم نفس الحل ولكن بخطوات أكثر وتكرار ممل (6).

القاعدة الثانية (K2): ترتيب (ن) عمل على ثلاث آلات Sequencing N jobs on three machines

إن تسلسل الأعمال في هذه القاعدة يأخذ الشكل التالي :



وإجراءات تطبيق هذه القاعدة هي التالية :

1- تشكل مصفوفة من أربعة صفوف و(ن) عمود . نضع في الصف الأول الأعمال، وفي الصف الثاني والثالث والرابع الأزمنة اللازمة لمعالجة الأعمال على الآلات رقم (1) و(2) و(3) على الترتيب .

2- نختار العمل الذي يحتاج أقصر زمن على الآلة (1)

شريطة أن يكون أصغر من زمن نفس العمل على الآلة (3)

. ونضع هذا العمل أول الترتيب .

3- يتم ترتيب باقي الأعمال بمقارنة زمن المعالجة للعمل المختار أولاً على الآلة رقم (3) مع أزمنة المعالجة على الآلة رقم (2) للأعمال الباقية . ونختار العمل الذي زمن معالجته أكبر مباشرة، فإذا لم يوجد نختار الذي يساويه ، فإذا لم يوجد نختار الأصغر مباشرة . ونكرر هذه الخطوة على الأعمال الباقية حتى ننهي ترتيب كافة الأعمال . ويكون الترتيب النهائي هو الأمثل .

مثال : لدينا أربعة أعمال يتوجب معالجتها على ثلاث آلات وبالتسلسل، والمصفوفة التالية تبين الأزمنة اللازمة لمعالجة هذه الأعمال على الآلات الثلاث بالأيام :

الأعمال	A	B	C	D	E
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	5	3	8	10	7
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	2	6	4	7	12

بتطبيق القاعدة (K1) المقترحة على المثال أعلاه نلاحظ ما يلي :

- زمن المعالجة الأقل على الآلة (1) يعود للعمل (B) وهو (3)، وبالمقارنة مع زمن المعالجة على الآلة (2) لنفس العمل نلاحظ أنه أصغر لأن الزمن اللازم على الآلة (2) هو (6). فنختار العمل (B)، ويكون الأول في الترتيب . ويصبح الترتيب كما في الجدول التالي :

الأعمال	B
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	3
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	6

- نقارن الآن زمن المعالجة للعمل (B) على الآلة (2) ومقداره (6) مع أزمنة معالجة الأعمال الباقية على الآلة رقم (1) ، ونختار العمل الذي يكون زمن معالجته أكبر مباشرة من (6)، وهو هنا العمل (E)، وزمن معالجته على الآلة رقم (1) هو (7) . فنختار العمل (E) . ويكون الثاني في الترتيب ويصبح الترتيب كما في الجدول التالي :

الأعمال	B	E
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	3	7
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	6	12

- نكرر العملية السابقة ونلاحظ أن زمن معالجة (E) على الآلة (2) هو (12) وبالمقارنة مع الأزمنة الباقية لمعالجة الأعمال على الآلة رقم (1) نرى أنها أصغر منه فنختار الأصغر مباشرة ، وهو العمل (D) وزمن معالجته على الآلة رقم (1) هو (10). ويصبح الترتيب كما يلي :

الأعمال	B	E	D
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	3	7	10
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	6	12	7

- نكرر العملية السابقة، ونلاحظ أن زمن المعالجة (D) على الآلة (2) هو (7). وبالمقارنة مع أزمنة المعالجة للأعمال الباقية على الآلة رقم (1) نجد أن زمن المعالجة الأكبر مباشرة هو زمن (C)، وهو (8)، فنختار العمل (C) ويصبح العمل الرابع ويكون الترتيب الأمثل في نهاية هذه العملية كما يلي :

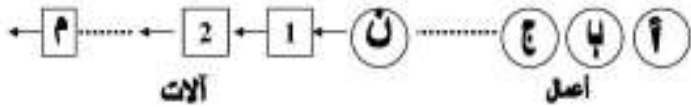
D	C	B	A	الأعمال
7	6	5	13	زمن المعالجة على الآلة (1) بالأيام
2	4	3	6	زمن المعالجة على الآلة (2) بالأيام
			الزمن المعدل	
6	5	7	9	زمن المعالجة على الآلة (3) بالأيام

حيث أن أطول زمن معالجة على الآلة الثانية هو أكبر من أصغر زمن معالجة على الآلة الأولى، وكذلك الآلة الثانية . بينما الحل المثالي يمكن الوصول إليه بتطبيق القاعدة المقترحة وهذا الترتيب هو (B ، C ، A ، D) والزمن الإجمالي لمعالجة الأعمال على الآلات الثلاث يزداد يوم واحد فقط ويصبح (44) يوم . وكما يتضح ذلك من مخططات Gantt ، الشكل (3). وهذا ما يؤكد صحة ودقة وسهولة القاعدة المقترحة ، ويجعلها القاعدة العامة الأولى لترتيب (ن) عمل على (م) آلة دون استثناءات أو شروط .

D	C	A	B	الأعمال
7	6	13	5	زمن المعالجة على الآلة (1) بالأيام
2	4	6	3	زمن المعالجة على الآلة (2) بالأيام
6	5	9	7	زمن المعالجة على الآلة (3) بالأيام

القاعدة الثالثة (K3) : ترتيب (ن) عمل على (م) آلة Sequencing N jobs on M machines

إن تسلسل الأعمال في هذه الحالة يأخذ الشكل التالي :



مثال : لدينا خمسة أعمال يعالج كل منها على خمس آلات بالتسلسل، وتوضح المصفوفة التالية أزمنة المعالجة لهذه الأعمال على الآلات الخمس :

F	C	D	B	A	الأعمال
9	11	8	6	10	زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة
6	8	12	10	11	زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة
5	6	8	3	4	زمن المعالجة على الآلة (3) بالساعة
7	12	8	9	11	زمن المعالجة على الآلة (4) بالساعة
5	10	8	10	12	زمن المعالجة على الآلة (5) بالساعة

D	C	B	A	الأعمال
7	6	5	13	زمن المعالجة على الآلة (1) بالأيام
2	4	3	5	زمن المعالجة على الآلة (2) بالأيام
6	5	7	9	زمن المعالجة على الآلة (3) بالأيام

بتطبيق القاعدة (K2) المقترحة على المثال أعلاه نلاحظ ما يلي :

- العمل الذي يحتاج إلى أقل زمن معالجة على الآلة رقم (1) هو (B) ، وهو أصغر من زمن المعالجة على الآلة رقم (3) لذلك نختار العمل (ب)، ويكون ترتيبه الأول .
- بعد أن تم ترتيب العمل (B) أولاً نلاحظ أن زمن معالجته على الآلة (3) هو (7) . وبمقارنة هذا الزمن مع أزمنة المعالجة الباقية على الآلة رقم (2) ، نلاحظ أن كافة الأزمنة الباقية هي أصغر منه. ولذلك نأخذ الأصغر منه مباشرة، وهو زمن معالجة (A) ومقداره (5) ويتم على الآلة رقم (2) . ويتم وضع العمل (A) الثاني في الترتيب .
- نقارن زمن معالجة العمل (A) على الآلة رقم (3) مع باقي الأزمنة على الآلة (2) فنلاحظ أنها جميعها أصغر من زمن معالجة العمل (A) على الآلة رقم (3) ، ومقداره (9) فنأخذ العمل الذي زمن معالجته أصغر مباشرة على الآلة رقم (2) وهذا العمل هو (C) وزمن معالجته هو (4) على الآلة رقم (2)، فيتم وضع العمل (C) الثالث في الترتيب .
- يبقى العمل (D) أخيراً فنضعه الرابع في الترتيب، وبذلك نصل إلى الترتيب الأمثل، وكما في الجدول التالي:

D	C	A	B	الأعمال
7	6	13	5	زمن المعالجة على الآلة (1) بالأيام
2	4	5	3	زمن المعالجة على الآلة (2) بالأيام
6	5	9	7	زمن المعالجة على الآلة (3) بالأيام

والزمن الإجمالي لمعالجة الأعمال على الآلات الثلاث مقداره (43) يوم، وكما يتضح ذلك من مخططات Gantt الشكل رقم (2) .

إن مقارنة هذه القاعدة المقترحة مع قاعدة جونسون لترتيب (ن) عمل على ثلاث آلات تؤكد على أن هذه القاعدة عامة التطبيق وبدون قيود أو شروط، كما هو الحال في قاعدة جونسون . فمثلاً لو كان زمن معالجة العمل (ش) على الآلة الثانية مقداره (6) أيام أو أكثر فإنه يتعذر تطبيق قاعدة جونسون في حل هذه المسألة لأن شروط تطبيقها لم تتحقق (5).

الحل الأول :

نأخذ زمن المعالجة على الآلة الأولى وزمن المعالجة على الآلة الخامسة فقط، فنحصل على ما يلي :

	F	D	C	B	A
1م	9	11	8	6	10
2م	5	10	8	10	12

وبتطبيق قاعدة جونسون فإن الترتيب يكون كما يلي : B ، A ، C ، D ، F

الحل الثاني :

نضيف زمن المعالجة على الآلة الثانية إلى زمن المعالجة على الآلة الأولى . ونضيف زمن المعالجة للآلة الرابعة إلى زمن المعالجة على الآلة الخامسة، فنحصل على ما يلي :

	F	D	C	B	A
1م	15	19	20	16	21
2م	12	22	16	19	23

وبتطبيق قاعدة جونسون فإن الترتيب يكون : A ، D ، B ، F ، C

الحل الثالث :

نضيف زمن المعالجة على الآلة الثالثة إلى زمن المعالجة على الآلة الأولى في الحل الثاني . ونضيف زمن المعالجة على الآلة الثالثة إلى زمن المعالجة على الآلة الثانية في الحل الثاني، فنحصل على ما يلي :

	F	D	C	B	A
1م	20	25	28	19	25
2م	17	28	24	22	27

وبتطبيق قاعدة جونسون فإن الترتيب يكون : D ، A ، B ، F ، C

الحل الرابع :

نضيف زمن المعالجة على الآلة الرابعة إلى زمن المعالجة على الآلة الأولى في الحل الثالث . ونضيف زمن المعالجة على الآلة الثانية إلى زمن المعالجة على الآلة الثانية في الحل الثاني، فنحصل على ما يلي :

	F	D	C	B	A
1م	27	37	36	28	36
2م	23	36	36	32	38

وبتطبيق قاعدة جونسون فإن الترتيب يكون : C ، A ، B ، F ، D

ولاختبار مثولية الحلول يجب استخدام مخططات Gantt التي تبين الزمن الإجمالي اللازم لمعالجة الأعمال على الآلات .

وباستخدام مخططات Gantt الأشكال (4 ، 5 ، 6 ، 7) الموضحة للحلول الأربعة التي تقدمها خوارزمية CDS

بتطبيق إجراءات القاعدة (ج) نلاحظ ما يلي :

- نبدأ بالعمل الذي يتطلب أقل زمن معالجة على الآلة (1)، شريطة أن يكون أقل من زمن المعالجة على الآلة الأخيرة آلة رقم (5) . وهنا نرى أن العمل الذي يحقق ذلك هو (B) ، حيث زمن معالجته على الآلة رقم (1) هو (6) ، وعلى الآلة رقم (5) هو (10) . نضعه في الترتيب أولاً، ثم نقارن بين زمن معالجته على الآلة رقم (5) مع أزمنة المعالجة للأعمال الباقية على الآلة رقم (4) . ونختار الأكبر مباشرة ، وهو زمن معالجة العمل (A) ، ويساوي (11)، فنختار العمل (A) . ويكون ترتيبه الثاني .

- نقارن بين زمن معالجة العمل (A) على الآلة رقم (5)، وأزمنة الأعمال المتبقية على الآلة رقم (4) ، ونختار الأكبر مباشرة ، وإذا لم يوجد نختار الذي يساويه . ونلاحظ أنه العمل (D) ، حيث زمن معالجته على الآلة رقم (4) هو (12)، لذلك نضع العمل (د) الثالث في الترتيب .

- نقارن بين زمن معالجة العمل (A) على الآلة رقم (5)، وأزمنة الأعمال المتبقية على الآلة رقم (4)، ونختار أكبرها مباشرة . وهنا لا يوجد فنأخذ العمل الذي زمن معالجته على الآلة (4) أصغر مباشرة، وهو هنا العمل (C)، وزمن معالجته على الآلة رقم (4) هو (8) ، ونضع العمل (C) الرابع في الترتيب .
بقي العمل الأخير وهو (F) نضعه في آخر الترتيب، ويصبح الترتيب المثالي على الشكل التالي :

الأعمال	F	C	D	A	B
زمن المعالجة على الآلة (1) بالساعة	9	8	11	10	6
زمن المعالجة على الآلة (2) بالساعة	6	12	8	11	10
زمن المعالجة على الآلة (3) بالساعة	5	8	6	4	3
زمن المعالجة على الآلة (4) بالساعة	7	8	12	11	9
زمن المعالجة على الآلة (5) بالساعة	5	8	10	12	10

وباستخدام مخططات Gantt الشكل رقم (6) نجد أن : الزمن الإجمالي اللازم لمعالجة الأوامر الخمسة هو (77) ساعة وهو أقل زمن ممكن للمعالجة الشكل رقم (6) . وبالتالي تكون هذه القاعدة المقترحة أفضل خوارزمية لترتيب تسلسل مرور (ن) عمل على (م) آلة . ونستطيع إثبات ذلك من خلال مقارنة الحل الذي تقدمه هذه القاعدة مع الحلول التي تقدمها خوارزمية CDS والتي يعدها البعض أنها الأفضل من خلال العرض المختصر التالي (1):

حل المثال بتطبيق CDS algorithm :

لتطبيق CDS algorithm يجب معرفة عدد الحلول الممكنة . ثم اختيار هذه الحلول باستخدام مخططات Gantt ، واختيار الحل المقبول والذي ليس بالضرورة أن يكون الحل المثالي بل القريب منه (1).

الحلول الممكنة في هذه الحالة هي م-1 = 5-1 = 4 حلول

حيث أن : م عدد الآلات الموجودة في النظام .

المصادر

1. Gilman A. (1994). Interest in Finite Scheduling is growing ... Why?. APICS: Perform. Advan. 4(8):. 45 – 48.
2. Baker KR., and Trietsch D. (2010). Three heuristic procedures for the stochastic two-machine flow shop problem. J. Sched.. doi: 10.1007/s10951-010-0219-4
3. Campbell HG, Dudek RA, and Smith ML.(1970). Heuristic Algorithm for the (n) job (m) machine sequencing problem. Manag. Sci. 16(10): 630-637.
4. Heizer J. and Render B. (2007). Operations Management Flexible Version. 8th Edition, Pearson Prentice Hall.
5. Fox MS. and Smith SM. (1984). ISIS: a Knowledge-Based System for Factory Scheduling. Exp. Sys. 1(1): 25 – 49.
6. Portougal V, and Trietsch B. (2006). Johnson's problem with stochastic processing times and optimal service level. Euro. J. Operat. Res. 169 : 751–760.
7. Ruiz R. and Maroto C.(2006). A genetic algorithm for hybrid flowshops with sequence dependent setup times and machine eligibility. Euro. J. Operat. Res. 169: 781–800.
8. Russell R A. and Bernard WT. (1997). Operations Management. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall .92.
9. Narasimham SL, McLeavy DW., Billington PG. (1997). Production Planning and Inventory Control. Prentice – Hall of India, New Delhi. 490.
10. Johnson SM. (1954). Optimal Two and Stage Production Schedules with Set-up Times Included. Naval Research Logistics Quarterly, 1(1): 61-68.
11. Stevenson WJ. (2007). Operations Management, 9th ed., McGraw-Hill/Irwin. 126

نلاحظ الاختلافات في الأزمنة الإجمالية لمعالجة الأوامر، وكما يلي :

الحل الأول : (F ، D ، A ، C ، B)، والزمن الإجمالي للمعالجة (82) ساعة .

الحل الثاني : (B ، D ، A ، C ، ب) ، والزمن الإجمالي للمعالجة (79) ساعة .

الحل الثالث : (B ، D ، A ، C ، ب)، والزمن الإجمالي للمعالجة (77) ساعة .

الحل الرابع : (B ، D ، C ، A ، ب)، والزمن الإجمالي للمعالجة (82) ساعة .

وبمقارنة الزمن الإجمالي للمعالجة في كل حل نلاحظ أن الحل الثالث يتطلب أقل زمن معالجة إجمالية للأعمال الخمسة على الآلات الخمسة، وبالتالي يكون هو الحل الأفضل . وهذا الحل توصلنا إليه مباشرة بتطبيق الخوارزمية (K3) المقترحة التي استعرضناه . علماً أن الحل الذي تقدمه خوارزمية CDS ليس بالضرورة هو الحل الأمثل . ولقد توصلنا إلى الحل الأمثل باستخدام خوارزمية CDS بالصدفة في هذا المثال، كما أنه في حالة كان عدد الآلات التي تمر عليها الأعمال بالتسلسل كبير تزداد صعوبة استخدام هذه الخوارزمية، بينما تبقى خوارزمتنا المقترحة بسيطة وسهلة وعامة التطبيق .

النتائج والتوصيات

1) من خلال مقارنة القواعد المقترحة مع القواعد المعروفة بقواعد Johnson's rule والمستخدمه في ترتيب تعاقب الأعمال على الآلات تظهر أفضلية القواعد المقترحة، وذلك للأسباب التالية:

- بالنسبة لقاعدة ترتيب (ن) عمل على آلتين فإن القاعدة المقترحة أسهل من قاعدة جونسون علماً أنها تعطي نفس النتيجة .

- بالنسبة لقاعدة ترتيب (ن) عمل على ثلاث آلات فإن القاعدة المقترحة عامة ولا يوجد لها استثناءات كما في قاعدة جونسون(5)

. وتطبيقها لا يتطلب وجود أي شرط، بالإضافة إلى سهولتها ووضوحها. وبهذا تعد هذه القاعدة الأولى في هذا المجال .

2) إن مقارنة القواعد المقترحة لترتيب (ن) عمل على (م) آلة والمعروفة اختصاراً بخوارزمية (CDS algorithm) لم تستطع الوصول إلى الحل المثالي، وبقيت مجرد اقتراحات مشابهة لقواعد Johnson، أو تطويراً محدوداً لها (9) . ولهذا فإن قاعدتنا المقترحة لترتيب (ن) عمل على (م) آلة هي الأولى في هذا المجال، ولا يوجد ما يقابلها من القواعد في المراجع . كما أنها عامة التطبيق بدون شروط والحل الذي تقدمه مثالي .

3) نرى من الضروري تطوير برنامج حاسوبي على أساس القواعد المقترحة في جدولة الأعمال ، وننصح بمتابعة البحوث والدراسات في تطوير هذه الخوارزميات.

تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L – Carnitine إلى العليقة في الصفات النسيجية لخصى ذكور دجاج غينيا.

وليد خالد الحياني، حازم جبار الدراجي.

قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة بغداد - العراق

الملخص باللغة العربية

أجريت الدراسة لبحث تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L – Carnitine إلى العليقة في الصفات النسيجية لخصى ذكور دجاج غينيا. إذ أستخدم في التجربة 24 ذكر من دجاج غينيا بعمر 30 أسبوع. وزعت عشوائياً على أربعة معاملات C_0 , C_{100} , C_{200} , C_{300} ، التي تمثل إضافة الكارنتين إلى العلائق بمستويات 0، 100، 200، و 300 ملغم كارنتين / كغم علف. غذيت الطيور طوال مدة التربية البالغة 22 أسبوعاً على عليقة موحدة تحتوي 17.77% بروتين خام و 2933.8 كيلو سعرة / كغم طاقة ممثلة. أضيف الكارنتين L – Carnitine إلى تلك العلائق ابتداءً من عمر 34 أسبوع ولغاية نهاية التجربة البالغة 18 أسبوع بضمنها فترة أسبوعين استخدمت بمثابة فترة معاملة تمهيدية بالكارنتين. أشارت نتائج التجربة إلى أن إضافة الكارنتين إلى علائق دجاج غينيا أدت إلى ارتفاع عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في الوزن المطلق والنسبي للخصى، قطر النبيب المنوي وقطر تجويفه، وسمك طبقة الخلايا الجرثومية، وفي الكثافة الحجمية والوزن النسبي لكل من سليفات النطف، الخلايا النطفية، طلائع النطف، النطف، مجموع الخلايا المكونة للنطف، خلايا سيرتولي، مجموع مكونات النبيب المنوي، خلايا ليدج، مجموع مكونات النسيج البيني للخصية لصالح معاملات الكارنتين الثلاثة مقارنة بمجموعة السيطرة. كما أشارت النتائج إلى انخفاض عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في الكثافة الحجمية والوزن النسبي للفجوات البينية وتجويف النبيب المنوي والمسافات البينية في معاللات الكارنتين مقارنة بمجموعة السيطرة. وعليه يستنتج من هذه الدراسة أن إضافة الكارنتين إلى علائق دجاج غينيا يعمل على تحسين الصفات النسيجية للخصى وبالمحصلة تحسين الصفات التناسلية لذكور دجاج غينيا.

ABSTRACT

The current study was conducted at the Poultry Farm of Department of Animal Resource, College of Agriculture, University of Baghdad during the period from 15 / 2 / 2011 to 1 / 8 / 2011. The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation with different levels of carnitine on semen characteristics of guinea fowl male.

A total of 42 guinea fowl male, 30 weeks of old were used in this study. Birds were randomly distributed into 4 treatment groups (C_0 , C_{100} , C_{200} , C_{300}) which is added to the diets carnitine levels 0, 100, 200, 300 mg Carnitine / kg diet. Birds were fed during the whole period of birds rearing which lasted 22 weeks on diet contain 18.38 % crude protein and 2962.1 Kcal metabolic energy / Kg. L-carnitine was added to the diets of birds at the beginning of 34 weeks of birds age till the end of experiment which lasted 18 weeks including 2 weeks which considered as preliminary carnitine treatment period. Guinea fowl were reared during experimental period in separated cages.

The resulted Showed significant improvement ($P < 0.05$) or ($P < 0.01$) in Significant improvement respecting testes weight, seminiferous tubules and volume density and relative weight of active components of seminiferous tubules and interstitial tissues.

Conclude from this study that the addition of carnitine to the diets of Guinea fowl is leads to improved testes tissues characteristics of guinea fowl male.

المقدمة

يؤدي دوراً مهماً في تنظيم أيض طاقة النطف لدعم حركة النطف وتحسين مورفولوجيا غشاء النطف وصفاته. كما وجد Neuman وآخرون (16) أن إضافة الكارنتين إلى عليقة ذكور اللكهرون الأبيض الفتية والمتقدمة بالعمر بتركيز 500 ملغم / كغم لم تؤدي إلى زيادة تركيز النطف فقط ولكنها أدت أيضاً إلى الحد من تأكسد الدهون في غشاء النطف مما انعكس بالمحصلة على تحسن حيوية النطف. إذ لوحظت زيادة معنوية في الوزن النسبي لخصى الذكور المعاملة بالكارنتين في حين لم يكن هنالك فرق معنوي في نسبة النطف الميتة، ولا في حجم القذفة. كما لاحظ الباحث نفسه زيادة عالية المعنوية في تركيز النطف في السائل المنوي لذكور اللكهرون الأبيض المعامل بالكارنتين على مدى أسابيع التجربة الستة. ولأخذ تحسناً عالي المعنوية في صفات كل من حجم القذفة وفعالية السائل المنوي في مقاومة الأكسدة وحجم السائل المنوي ودليل نوعيته. وهذا يؤكد فاعلية الكارنتين بوصفه مضاداً للأكسدة وبذلك فإن بالإمكان استعمال الكارنتين لزيادة مدة حفظ السائل المنوي وتخزينه لمدة طويلة.

أما Zhai وآخرون (17)، فقد بحثوا في دراستهم تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين (125 و 250 و 500 جزء بالمليون) إلى عليقة ذكور اللكهرون الأبيض، ولاحظوا أن إضافة الكارنتين إلى العليقة ولاسيما عند المستويين 125 و 250 جزء بالمليون قد أدت إلى زيادة معنوية في تركيز النطف وحجم القذفة وعدد النطف الكلي، ولم يلاحظوا فرق معنوي في نسبة النطف الميتة. وفي تجربة ثانية لاحظ الباحثون أنفسهم بعد أن استعملوا التراكيز نفسها المستعملة في التجربة الأولى أن إضافة الكارنتين خصوصاً المستويين 125 و 250 جزء بالمليون إلى علائق ديك اللكهرون الأبيض قد أدت إلى زيادة معنوية في فاعلية النطف وحيوتها وانخفاض في عملية أكسدة الدهون أي زيادة مقاومة السائل المنوي للأكسدة، وبالمحصلة أدت إلى تحسن في مدة حفظ السائل المنوي.

وفي طيور السمان درس Sarica وآخرون (18)، تأثير استعمال ثلاثة تراكيز من الكارنتين (0 و 250 و 500 ملغم / كغم)، ولاحظوا انخفاضاً معنوياً في النسبة المئوية للنطف الميتة لكلا التراكيزين (250 و 500 ملغم / كغم) وعدد الخلايا العملاقة (متعددة النوى) multinucleated giant في الخصى مقارنة بالسيطرة ولم يكن هنالك تأثير معنوي في الوزن المطلق والنسبي للخصى، وحجم القذفة وتركيز النطف. ولتحديد تأثير الكارنتين في تحسين الصفات التناسلية أجريت هذه الدراسة النسيجية لخصى طيور غينيا لمعرفة التغيرات الناتجة من إضافة الكارنتين إلى علائقها.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في حقل الطيور الداجنة التابع لقسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة / جامعة بغداد، استمرت التجربة الحقلية للمدة من 15/شباط/2011، ولغاية 1/آب/2011. لدراسة تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L - Carnitine، إلى علائق دجاج غينيا Guinea fowl في الأداء التناسلي.

طيور غينيا من الطيور أحادية التزاوج أي أن النسبة الجنسية 1 : 1. يمكن لبعض أنواع طيور غينيا التزاوج في أي من أشهر السنة، لكن يكثر التزاوج في أشهر كانون الأول وشباط (1). وفي المناطق البعيدة عن خط الاستواء يتناسل في أثناء موسم المطر (2)، إذ يرتبط موسم تناسل طيور غينيا مع توقيت المطر وكميته (1، 2، 3، 4). تعد الخصوبة والفقس من أكبر معوقات إنتاج طيور غينيا إذ تمتاز ذكور طيور غينيا بالخصى صغيرة الحجم (1 - 9 غم) مقارنة بديكة الدجاج (14 - 16 غم) (5، 6). انخفاض حجم خصى ديك طيور غينيا يجعل منها منخفضة الخصوبة، وذلك لإرتباط إنتاج النطف طردياً بحجم الخصى في الطيور عموماً (7). وجد Alawa وNwagu (6) أن انخفاض الرطوبة، وقلة هطول الأمطار، وارتفاع درجة الحرارة، تسبب انخفاضاً ملحوظاً في إنتاج النطف، وتدهور صفات المني من خلال انخفاض عدد النطف عموماً، وارتفاع نسبة النطف الميتة والمشوهة، وبالنتيجة انخفاض نسبة النطف الحية.

تتراوح نسبة الخصوبة في التزاوج الطبيعي لطيور غينيا بين 49 - 58%، وترتفع نسبة الخصوبة عند استعمال التلقيح الاصطناعي لتصبح 70 - 88% (7، 8). ترتبط الخصوبة المنخفضة في التزاوج الطبيعي مع سلوك التزاوج الطبيعي الأحادي (1 ذكر : 1 أنثى)، فضلاً عن انخفاض خصوبة الذكر. من ناحية ثانية، فإن تداول بيض تفقيس طيور غينيا يدويا ومدة الخزن، يؤثران كثيراً في نسبة الفقس. فقد أشار Alawa وNwagu (6) إلى أن كل يوم زيادة في مدة الخزن أكثر من 7 أيام يخفض نسبة الفقس بمقدار 4%. وقد حصل Kabera (9) على نسبة فقس بلغت 67% بينما حصل Galor (8) على نسبة فقس 70 - 75% باستعمال التفقيس الاصطناعي.

الكارنتين مركب طبيعي يعد عاملاً مساعداً في أكسدة الأحماض الدهنية في المايوتوكونديا، ويساهم في السيطرة على نسبة الـ Acetyl CoA في المايوتوكونديا، والسيطرة على البيروكسيدات ومنعها من أكسدة الدهون وإنتاج الأجسام الكيتونية، يؤدي الكارنتين دوراً مهماً في معالجة الأمراض الأيضية والاضطرابات ذات الصلة بالمايوتوكونديا (10).

أظهر استعمال الكارنتين أملاً للسيطرة على بعض حالات العقم في الرجال إذ يعمل على تحسين نوعية النطف (11) (Lenzi وآخرون، 2003). إذ لاحظ Cavallini وآخرون (12) تفوق الكارنتين على هرمون التستستيرون في علاج حالة انخفاض الرغبة الجنسية مع تقدم العمر لدى الرجال. وأدى إلى تحسن معنوي في الرغبة الجنسية وكمية السائل المنوي ونوعيته. كما أنه أدى إلى تعزيز دور هرمون التستستيرون من خلال زيادة عدد مستقبلات هذا الهرمون في الخلايا الهدف. كما وجد أن استعمال بعض مستحضرات الكارنتين مفيد في علاج حالة دوالي الحبل المنوي أو الصفن varicocele، الذي يعد السبب الرئيس لحالات العقم لدى الرجال (13) (Seo وآخرون، 2010).

ولاحظ Michael (14) أن إضافة الكارنتين يومياً إلى عليقة الخنازير أدت إلى تحسن معنوي في حركة وتركيز النطف. وأشار Agarwal وآخرون (15) إلى أن الكارنتين

استعمل في التجربة 24 ذكر من دجاج غينيا بعمر 30 أسبوعاً. جهزت من الأسواق المحلية. ربيت الطيور في إحدى قاعات التربية الأرضية الكائنة في حقل الطيور الداجنة، التابع لقسم الثروة الحيوانية للتعود على أجواء التربية داخل القاعات. وعندما بلغت الطيور عمر 34 أسبوعاً نقلت إلى قاعة التجربة المتضمنة أقفاص سلكية شبكية بواقع طيرين لكل قفص، رقت الطيور بوضع رقم معدني في جناح كل طير. غذيت الطيور على عليقة موحدة طوال مدة التربية البالغة 22 أسبوعاً، أحتوت على 17.77% بروتين خام، و 2933.8 كيلو سرعة طاقة ممثلة/ كغم. إذ جهزت المواد العلفية من السوق المحلية في أبو غريب، وجرشت الحبوب وخلطت، في معمل علف الطيور الداجنة العائد لحقل الطيور الداجنة / قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة بغداد. أضيف الكارنتين L - Carnitine، إلى تلك العلائق بأربعة تراكيز (0، 100، 200، 300 ملغم/ كغم) وقدم العلف بصورة حرة، ابتداءً من عمر 34 أسبوعاً وحتى نهاية التجربة البالغة 18 أسبوعاً، بضمنها مدة تمهيدية امتدت لأسبوعين، ليصبح توزيع المعاملات على النحو الآتي: مجموعة السيطرة (C_0): 0 ملغم كارنتين / كغم عليقة، المعاملة الأولى (C_{100}): 100 ملغم كارنتين / كغم عليقة، المعاملة الثانية (C_{200}): 200 ملغم كارنتين / كغم عليقة، المعاملة الثالثة (C_{300}): 300 ملغم كارنتين / كغم عليقة.

عند نهاية التجربة، ذبح 3 ذكور من كل معاملة بعد تثبيت أوزانها ثم شرحت الذكور، واستخرجت الخصيتان من التجويف الجسمي، وسجلت أوزانها، وحسب الوزن النسبي للخصية.

وضعت الخصى في عبوات بلاستيكية، حاوية على الفورمالين بتركيز 10%، لحين إجراء التقطيع النسيجي لها. إذ أعدت الخصى للتقطيع النسيجي، على وفق ما ذكر Pearse (19).

اتبعت طريقة Morphometric analysis لتقدير الكثافة الحجمية Volume density لمكونات النبيب المنوي للخصية وأوزانها النسبية على وفق طريقة Weibull (20)، بعد إجراء بعض التحويرات عليها إستناداً إلى ما ذكر الدراجي وآخرون (21).

لتحسب الكثافة الحجمية والوزن النسبي لكل من: سسليفات النطف Spermatogonia، الخلايا النطفية Spermatocyte، طلائع النطف Spermatides، النطف Sperms، الخلايا المكونة للنطف Spermatogenic cells (مجموع المكونات الأربعة الأولى). تجويف النبيب المنوي Lumen، الفجوات البينية Vacuoles، الغشاء القاعدي Basement membrane، خلايا سرتولي Sertolicells، المجموع الكلّي للنبيب المنوي Totalseminiferoustubule (كل المكونات الواقعة ضمن النبيب). كما قيست الكثافة الحجمية والوزن النسبي لمكونات النسيج البيني، التي تتضمن الآتي: خلايا ليدج (Leydig cells) أو الخلايا البينية Interstitial cells، الخلايا العضلانية Myoid cells، المسافات البينية

النتائج والمناقشة

يتبين من الجدول 1 وجود ارتفاع عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في معدل الوزن المطلق والنسبي للخصية وقطر النبيب المنوي وسماك طبقة الخلايا الجرثومية في معاملات الكارنتين (C_{100} و C_{200} و C_{300}) عند مقارنتها بمجموعة السيطرة (C_0). من ناحية ثانية، أن إضافة الكارنتين إلى العليقة (C_{100} و C_{200} و C_{300}) أدت إلى انخفاض عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في قطر تجويف النبيب المنوي مقارنة بمجموعة السيطرة (C_0). ولم تكن هناك فروق معنوية بين المعاملتين (C_{100} و C_{200} و C_{300}) في الوزن المطلق والنسبي للخصية. كما لم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين الثلاث فيما يختص بقطر النبيب المنوي (C_{100} و C_{200} و C_{300}). ولم تسجل فروق معنوية بين المعاملتين الأولى والثانية (C_{100} و C_{200}) في سمك طبقة الخلايا الجرثومية في حين سجلت المعاملة الثالثة (C_{300}) أعلى معدل لسمك طبقة الخلايا الجرثومية مقارنة بمعاملات الكارنتين الأخرى (C_{100} ، C_{200}).

ومن الجدول 2 يتضح وجود ارتفاع عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في معدل الكثافة الحجمية لكل من الخلايا النطفية وطلائع النطف والنطف ومجموع الخلايا المكونة للنطف وخلايا سرتولي ومجموع مكونات النبيب المنوي، لصالح معاملات الكارنتين (C_{100} و C_{200} و C_{300}) عند المقارنة بمجموعة السيطرة (C_0). علاوة على ذلك لم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين الثلاث (C_{100} و C_{200} و C_{300}) فيما يختص بالكثافة الحجمية لمكونات النبيب المنوي المذكورة في أعلاه. ولم تسجل أي فروق بين معاملات التجربة الأربع فيما يتعلق بالكثافة الحجمية لسليفات النطف. ويلاحظ من الجدول نفسه انخفاضاً لمعاملات الكارنتين الثلاث (C_{100} و C_{200} و C_{300}) انخفاضاً عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في الكثافة الحجمية للفجوات البينية وتجويف النبيب المنوي عند المقارنة بمجموعة السيطرة (C_0). من ناحية ثانية، لم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين الثلاث فيما يختص بالكثافة الحجمية للفجوات البينية وتجويف النبيب المنوي. كما لوحظ انخفاض معنوي ($p \leq 0.05$) في الكثافة الحجمية للغشاء القاعدي في المعاملة الثانية (C_{200}) مقارنة بمجموعة السيطرة (C_0).

الجدول (1): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين إلى العليقة في معدل الوزن المطلق (غم) والوزن النسبي للخصبة (%) وقطر النبيب المنوي وقطر تجويفه وسمك طبقة الخلايا الجرثومية (مايكرون) (المتوسط \pm الخطأ القياسي) لذكور دجاج غينيا

مستوى المعنوية	المعاملات				الصفات
	C ₃₀₀	C ₂₀₀	C ₁₀₀	C ₀	
0.01	^{AB} 0.78 \pm 11.12	^A 0.67 \pm 11.91	^B 0.43 \pm 9.20	^C 0.67 \pm 6.58	الوزن المطلق للخصبة (غم)
0.01	^{AB} 0.047 \pm 0.707	^A 0.046 \pm 0.749	^B 0.027 \pm 0.593	^C 0.042 \pm 0.419	الوزن النسبي للخصبة %
0.01	^A 20.38 \pm 302.50	^A 7.72 \pm 325.25	^A 7.41 \pm 330.50	^B 6.35 \pm 273.00	قطر النبيب المنوي (مايكرون)
0.01	^B 6.67 \pm 92.00	^B 4.61 \pm 85.25	^B 6.29 \pm 96.25	^A 5.30 \pm 111.50	قطر تجويف النبيب المنوي (مايكرون)
0.01	^A 16.38 \pm 135.50	^B 8.17 \pm 116.50	^B 8.18 \pm 95.25	^C 4.81 \pm 81.00	سمك طبقة الخلايا الجرثومية (مايكرون)

المعاملات: C₀: 0 ملغم كارنتين / كغم علف، C₁₀₀: 100 ملغم كارنتين / كغم علف، C₂₀₀: 200 ملغم كارنتين / كغم علف، C₃₀₀: 300 ملغم كارنتين / كغم علف. الحروف المتباينة ضمن الصف الواحد دلالة على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات

الجدول (2): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين إلى العليقة في الكثافة الحجمية لمكونات النبيب المنوي للخصى (المتوسط \pm الخطأ القياسي) لذكور غينيا

مستوى المعنوية	المعاملات				الصفات
	C ₃₀₀	C ₂₀₀	C ₁₀₀	C ₀	
N.S	1.32 \pm 11.75	1.25 \pm 13.25	0.65 \pm 14.50	1.04 \pm 13.50	سليقات النطف
0.01	^A 0.85 \pm 17.25	^A 0.65 \pm 18.50	^A 0.65 \pm 16.50	^B 0.48 \pm 13.25	الخلايا النطفية
0.01	^A 1.03 \pm 18.75	^A 1.19 \pm 19.50	^A 1.18 \pm 18.75	^B 0.85 \pm 14.75	طلائع النطف
0.01	^A 1.29 \pm 10.00	^A 0.95 \pm 9.25	^A 0.63 \pm 6.25	^B 0.48 \pm 3.75	النطف
0.01	^A 2.18 \pm 57.75	^A 1.19 \pm 60.50	^A 1.68 \pm 56.00	^B 1.89 \pm 45.25	مجموع الخلايا المكونة للنطف
0.01	^A 0.65 \pm 17.50	^A 0.41 \pm 17.00	^A 0.48 \pm 16.25	^B 0.48 \pm 14.25	خلايا سيرتولي
0.01	^B 0.22 \pm 1.36	^B 0.31 \pm 1.72	^B 0.36 \pm 2.04	^A 0.52 \pm 3.41	الفجوات البينية
0.01	^B 0.86 \pm 6.14	^B 0.81 \pm 7.84	^B 0.87 \pm 9.35	^A 1.74 \pm 13.41	تجويف النبيب المنوي
0.05	^{AB} 0.17 \pm 3.95	^B 0.40 \pm 3.13	^{AB} 0.57 \pm 4.45	^A 0.45 \pm 4.78	الغشاء القاعدي
0.01	^A 2.39 \pm 86.70	^A 2.24 \pm 90.18	^A 1.89 \pm 88.09	^B 0.84 \pm 81.09	مجموع مكونات النبيب المنوي

المعاملات: C₀: 0 ملغم كارنتين / كغم علف، C₁₀₀: 100 ملغم كارنتين / كغم علف، C₂₀₀: 200 ملغم كارنتين / كغم علف، C₃₀₀: 300 ملغم كارنتين / كغم علف. الحروف المتباينة ضمن الصف الواحد دلالة على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات

الخلايا النطفية ومجموع الخلايا المكونة للنطف و خلايا سيرتولي ومجموع مكونات النبيب المنوي. من ناحية ثانية لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين جميع معاملات التجربة الأربع فيما يتعلق بالوزن النسبي لكل من الفجوات البينية وتجويف النبيب المنوي والغشاء القاعدي.

أما من الجدول 3 فيتبين تفوق معاملات الكارنتين الثلاث (C₁₀₀ و C₂₀₀ و C₃₀₀) تفوقاً عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في الوزن النسبي لكل من سليقات النطف والخلايا النطفية وطلائع النطف والنطف ومجموع الخلايا المكونة للنطف و خلايا سيرتولي ومجموع مكونات النبيب المنوي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة (C₀). ولم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين الثلاث (C₁₀₀ و C₂₀₀ و C₃₀₀) فيما يختص بالوزن النسبي لسليقات النطف وطلائع النطف. علاوة على ذلك لم تكن هناك فروق معنوية بين معاملتي الكارنتين C₂₀₀ و C₃₀₀ في الوزن النسبي لكل من

الجدول (3): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين إلى العليقة في الوزن النسبي لمكونات النبيب المنوي للخصى (%) (المتوسط \pm الخطأ القياسي) في ذكور دجاج غينيا

مستوى المعنوية	المعاملات				الصفات
	C ₃₀₀	C ₂₀₀	C ₁₀₀	C ₀	
0.01	^A 0.82 \pm 8.21	^A 1.08 \pm 9.91	^A 0.60 \pm 8.61	^B 0.35 \pm 5.54	سليقات النطف
0.01	^A 1.39 \pm 12.31	^A 0.67 \pm 13.80	^B 0.39 \pm 9.76	^C 0.43 \pm 5.50	الخلايا النطفية
0.01	^A 1.27 \pm 13.30	^A 1.57 \pm 14.70	^A 1.03 \pm 11.15	^B 0.42 \pm 6.09	طلائع النطف
0.01	^A 1.39 \pm 7.25	^A 1.13 \pm 7.02	^B 0.23 \pm 3.67	^B 0.33 \pm 1.60	النطف
0.01	^A 4.03 \pm 41.06	^A 3.54 \pm 45.43	^B 1.65 \pm 33.18	^C 1.33 \pm 18.74	مجموع الخلايا المكونة للنطف
0.01	^A 1.08 \pm 12.39	^A 1.02 \pm 12.76	^B 0.50 \pm 9.63	^C 0.63 \pm 5.96	خلايا سرتولي
N.S	0.11 \pm 0.94	0.22 \pm 1.28	0.23 \pm 1.21	0.34 \pm 1.48	الفجوات البينية
N.S	0.90 \pm 4.43	0.75 \pm 5.89	0.45 \pm 5.51	1.18 \pm 5.80	تجويف النبيب المنوي
N.S	0.15 \pm 2.78	0.32 \pm 2.33	0.37 \pm 2.64	0.05 \pm 1.94	الغشاء القاعدي
0.01	^A 5.76 \pm 61.59	^A 5.30 \pm 67.70	^B 2.14 \pm 52.17	^C 3.37 \pm 33.92	مجموع مكونات النبيب المنوي

المعاملات: C₀: 0 ملغم كارنتين / كغم علف، C₁₀₀: 100 ملغم كارنتين / كغم علف، C₂₀₀: 200 ملغم كارنتين / كغم علف، C₃₀₀: 300 ملغم كارنتين / كغم علف. الحروف المتباينة ضمن الصف الواحد دلالة على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات

الجدول (4): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين إلى العليقة في الكثافة الحجمية لمكونات النسيج البيني للخصى (المتوسط \pm الخطأ القياسي) في ذكور دجاج غينيا

مستوى المعنوية	المعاملات				الصفات
	C ₃₀₀	C ₂₀₀	C ₁₀₀	C ₀	
N.S	0.16 \pm 1.75	0.10 \pm 1.62	0.18 \pm 1.56	0.13 \pm 1.46	الخلايا العضلية
0.01	^A 0.71 \pm 16.00	^A 0.96 \pm 14.90	^B 0.56 \pm 12.31	^C 0.92 \pm 8.91	خلايا ليدج
N.S	0.047 \pm 0.418	0.089 \pm 0.205	0.063 \pm 0.305	0.056 \pm 0.135	الأوعية الدموية
0.01	^B 0.14 \pm 2.17	^B 0.18 \pm 2.53	^B 0.58 \pm 2.32	^A 1.41 \pm 6.07	المسافات البينية
0.01	^A 0.75 \pm 20.34	^A 0.89 \pm 19.26	^B 0.39 \pm 16.50	^B 1.07 \pm 16.57	مجموع مكونات النسيج البيني
0.05	^B 0.24 \pm 4.29	^{AB} 0.33 \pm 4.73	^A 0.16 \pm 5.35	^{AB} 0.36 \pm 4.96	نسبة مجموع مكونات النبيب المنوي / مجموع مكونات النسيج البيني

المعاملات: C₀: 0 ملغم كارنتين / كغم علف، C₁₀₀: 100 ملغم كارنتين / كغم علف، C₂₀₀: 200 ملغم كارنتين / كغم علف، C₃₀₀: 300 ملغم كارنتين / كغم علف.

الحروف المتباينة ضمن الصف الواحد دلالة على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات

($p \leq 0.01$) في الكثافة الحجمية لمجموع مكونات النسيج البيني لصالح المعاملتين الثانية والثالثة (C₂₀₀ و C₃₀₀) عند المقارنة بمجموعة السيطرة (C₀) والمعاملة الأولى (C₁₀₀). كما سجلت المعاملة الأولى (C₁₀₀) ارتفاعاً معنوياً ($p \leq 0.05$) في الكثافة الحجمية لنسبة مجموع مكونات النبيب المنوي / مجموع مكونات النسيج البيني عند المقارنة بالمعاملة الثالثة C₃₀₀، ولم تكن هناك فروق معنوية بين مجموعة السيطرة (C₀) والمعاملتين الأولى والثانية (C₁₀₀ و C₂₀₀)، ولا بين مجموعة السيطرة والمعاملتين الثانية والثالثة فيما يختص بالكثافة الحجمية لهذه الصفة. ولم تسجل

تشير النتائج في الجدول 4 إلى وجود زيادة عالية المعنوية ($p \leq 0.01$) في معدل الكثافة الحجمية لخلايا ليدج لصالح معاملات الكارنتين (C₁₀₀ و C₂₀₀ و C₃₀₀) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة (C₀)، ولم تكن هناك فروق معنوية بين المعاملتين C₂₀₀ و C₃₀₀ فيما يتعلق بالكثافة الحجمية لخلايا ليدج. كما يلاحظ من الجدول نفسه انخفاضاً عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) في معدل الكثافة الحجمية للمسافات البينية في معاملات الكارنتين الثلاث (C₁₀₀ و C₂₀₀ و C₃₀₀) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (C₀)، ولم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين لهذه الصفة. من ناحية ثانية يلاحظ من الجدول 4 أيضاً، وجود ارتفاع عالي المعنوية

بالوزن النسبي للأوعية الدموية. علاوة على ذلك لم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات التجربة الأربع في الوزن النسبي للمسافات البينية. ومن الجدول نفسه (الجدول 5) يتضح وجود انخفاض معنوي ($p \leq 0.05$) في الوزن النسبي لنسبة مكونات النبيب المنوي / مجموع مكونات النسيج البيني في المعاملة الثالثة (C_{300}) مقارنة بالمعاملة الأولى (C_{100})، ولم تكن هناك فروق معنوية بين مجموعة السيطرة (C_0) والمعاملتين الثانية والثالثة (C_{200} و C_{300})، وبين مجموعة السيطرة (C_0) والمعاملتين الأولى والثانية (C_{100} و C_{200}) فيما يتعلق بالوزن النسبي لهذه الصفة.

فروق معنوية بين معاملات التجربة الأربع في معدل الكثافة الحجمية للخلايا العضلاتية والأوعية الدموية. وفيما يختص بالوزن النسبي لمكونات النسيج البيني يتبين من الجدول 5 وجود ارتفاع عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) لصالح معاملات الكارنتين (C_{100} و C_{200} و C_{300}) في الوزن النسبي للخلايا العضلاتية وخلايا ليدج والأوعية الدموية ومجموع مكونات النسيج البيني عند المقارنة بمجموعة السيطرة (C_0). ولم تكن هناك فروق معنوية بين معاملات الكارنتين الثلاث (C_{100} و C_{200} و C_{300}) فيما يتعلق بالوزن النسبي للخلايا العضلاتية وبين معاملتي الكارنتين الثانية والثالثة (C_{200} و C_{300}) فيما يختص بالوزن النسبي لخلايا ليدج ومجموع مكونات النسيج البيني، وبين معاملتي الكارنتين الأولى والثانية (C_{100} و C_{200}) فيما يتعلق

الجدول (5): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين إلى العليقة في الوزن النسبي لمكونات النسيج البيني للخصى (%) (المتوسط \pm الخطأ القياسي) لذكور دجاج غينيا

مستوى المعنوية	المعاملات				الصفات
	C_{300}	C_{200}	C_{100}	C_0	
0.01	^A 0.174 \pm 1.255	^A 0.069 \pm 1.208	^A 0.127 \pm 0.933	^B 0.111 \pm 0.622	الخلايا العضلاتية
0.01	^A 0.60 \pm 11.25	^A 0.57 \pm 11.07	^B 0.47 \pm 7.30	^C 0.14 \pm 3.62	خلايا ليدج
0.01	^A 0.016 \pm 0.289	^B 0.068 \pm 0.156	^{AB} 0.031 \pm 0.176	^C 0.026 \pm 0.059	الأوعية الدموية
N.S	0.15 \pm 1.54	0.20 \pm 1.90	0.32 \pm 1.36	0.76 \pm 2.62	المسافات البينية
0.01	^A 0.86 \pm 14.33	^A 0.61 \pm 14.34	^B 0.39 \pm 9.77	^C 0.80 \pm 6.92	مجموع مكونات النسيج البيني
0.05	^B 0.24 \pm 4.29	^{AB} 0.33 \pm 4.73	^A 0.16 \pm 5.35	^{AB} 0.35 \pm 4.96	نسبة مجموع مكونات النبيب المنوي / مجموع مكونات النسيج البيني

المعاملات: C_0 : 0 ملغم كارنتين / كغم علف، C_{100} : 100 ملغم كارنتين / كغم علف، C_{200} : 200 ملغم كارنتين / كغم

علف، C_{300} : 300 ملغم كارنتين / كغم علف.

الحروف المتباينة ضمن الصف الواحد دلالة على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات

إذ توفر المواد الأساس لهذه العملية والعمل على نمو الخلايا الجرثومية وتطورها بتوفير البيئة الملائمة لتطور النطف، كما تعمل هذه الخلايا على إطلاق النطف ضمن النبيب المنوي إطلاقاً منتظماً (25، 26، 27، 28). أما هرمون التستستيرون الذي أدت المعاملة بالكارنتين إلى ارتفاع تركيزه في مصل الدم (29)، فإنه يعد عاملاً محورياً لنمو الخصيتين وإدامة الأعضاء التناسلية الأخرى، علاوة على أهميته في تحفيز عملية تكوين النطف Spermatogenesis (28، 30، 31، 32). كما ساهمت علاقات موجبة معنوية تربط وزن الخصى والكثافة الحجمية لمكونات النبيب المنوي بوزن النسيج البيني والخصى في صفات السائل المنوي كفاءة (33، 34، 35، 36). وتأتي نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما توصلت إليه الدراسات السابقة في أعلاه، إذ تراقف التحسن المعنوي في وزن الخصى وقياسات النبيب المنوي والكثافة الحجمية والوزن النسبي لمكونات النبيب المنوي للمكونات الفاعلة في النبيب المنوي والنسيج البيني للخصى مع التحسن المعنوي في صفات السائل المنوي كفاءة (29).

من ناحية ثانية يعد الكارنتين بديلاً مثالياً لهرمون التستستيرون لنمو الخصية وإدامة وظائف المكونات الفعالة

يتضح من نتائج الجداول 1 و 2 و 3 و 4 و 5 جلياً بما لا يقبل الشك، التأثير الكبير لمعاملات الكارنتين في زيادة وزن الخصية المطلقة والنسبية وسمك الطبقة الجرثومية وقطر النبيب المنوي وزيادة الكثافة الحجمية والوزن النسبي للمكونات الفاعلة في النبيب المنوي والنسيج البيني للخصية. ولذا ربما يعود إلى دور الكارنتين في زيادة إفراز هرمون التستستيرون من الخصية بطريقتين الأولى التأثير المباشر في محور تحت المهاد - النخامية لإطلاق هرمون GnRH الذي يحفز إفراز هرمونات FSH و LH من الفص الأمامي للغدة النخامية، إذ يعمل الهرمون اللوتيني LH على زيادة إفرازات الخصى من هرمون التستستيرون. أما الطريق الثاني فهو تأثير الكارنتين المباشر في الخصى لإنتاج وإفراز هرمون التستستيرون (24). كما يؤدي هرمون FSH إلى زيادة حجم الخصى وقطر النبيب المنوي ويعزز عملية تمايز خلايا سيرتولي Sertolicell، فضلاً عن دور هيفيتيز عملية تكوين النطف. أما هرمون LH فتعمل زيادة تركيز هيفيدماطوري على تحفيز تمايز خلايا ليدج Leydig cells مؤدية إلى زيادة مستويات هرمون التستستيرون في الدم، الذي يقوم بدوره بزيادة مستقبلات هرمون FSH في خلايا سيرتولي لما لها من أهمية كبرى في عملية تكوين النطف،

- crossover trial. Fertility and Sterility, 79 (2): 292 – 300.
12. Cavallini G AP., Ferraretti L., Gianaroli G, Biagiotti F., and Vitalli G. (2004). Cinnoxican and L – carnitine acetyl – L – carnitine treatment for idiopathic and varicocele – associated oligoasthenospermia. J Androl. 25: 761 – 770.
 13. Seo JT., Kim KT, Moon MH, and Kim WT. (2010). The significance of microsurgical varicocelectomy in the treatment of subclinical varicocele. Fertil. Steril. 93 (6): 1907 – 10.
 14. Michael KD. (2002). Enhancing Boar Reproductive Performance for Purposes of Artificial Insemination. <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-12102002-124412/>. date of access: 12/1/2010.
 15. Agarwal A., Prabakaran ASA, and Said TM. (2005). Prevention of Oxidative Stress Minireview Injury to Sperm. J. Andrology, 26 (6): 654 – 660.
 16. Neuman SL., Lin TL, and Hester PY. (2002). The Effect of dietary carnitine on semen traits of white leghorn roosters. J. Poult Sci. 47907: 495 – 503.
 17. Zhai W., Neuman SL, Latour ML, and Hester PY. (2007). The effect of dietary L – carnitine on semen traits of white leghorns. Poult Sci. 86: 2228 – 2235.
 18. Sarica SM., Corduk M, Suicmez F., Cedden M. Yildirim S, and Kilinc K. (2007). The effects of dietary L – carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. Appl. Poult. Res. 16: 178 – 186.
 19. Pearse ED. (1964). Histological techniques for electron microscopy. 2nd edn. Academic Press, New York.
 20. Weible E. (1979). Stereological Methods. Academic press. New York.
 21. الدراجي، حازم جبار، محمد، علي إسحق وحسام، جاسم حسين. (2011). إبتكار تقنية جديدة بديلة عن المجهر نوع Visopanscreenmicroscope لإجراء الفحوصات النسيجية وتقدير الكثافة الحجمية والوزن النسبي لمكونات الأنسجة. موضوع مقدم إلى الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية لغرض التقويم.
- في النبيبي المنوي، إذ أن الكارنتين يمنع من حالات إنكماش بطانة النبيبات المنوية وانفصال الخلايا السائدة والخلايا المولدة للنطف عن الغشاء القاعدي التي تؤدي إلى انكماش نسيج الخصية وانخفاض وزنها، وأن للكارنتين دور أهم من دور هرمون التستستيرون في ديمومة خلايا ليدج المسؤولة عن إفراز هرمون التستستيرون (37، 38، 39). كما أن للكارنتين خاصية عالية في السيطرة على تكوين الجذور الحرة إذ يعد الكارنتين مضاد أكسدة فاعل جداً (15)، وذلك بمنحه دور إضافي في حماية المكونات الفاعلة للنبيب المنوي والنسيج البيني للخصية (41).
- المصادر**
1. GFIA. (2012). Guinea fowl international. <http://www.guineafowlinternational.org/links/>. Data of access: 12/1/2012.
 2. Guineafowl. (2012). Fritsfarm, guineas. <http://www.guineafowl.com/fritsfarm/guineas/> Date of access: 11/1/2012.
 3. Britannica. (2012). Britannica Concise Encyclopedia. guinea fowl. <http://www.britannica.com/guineafowl>. data of access: 17/1/2012.
 4. Answers. (2012). guinea fowl. <http://www.answers.com/topic/guineafowl>. data of access: 4/1/2012.
 5. Belshaw RH. (1985). Guinea fowl of the world :world of ornithology. Minirod Book Services, Hampshire, England.
 6. Nwagu BI. and Alawa CBI. (1995). Guinea fowl production in Nigeria. Wld'sPoult. Sci. J.51: 260 – 270.
 7. Ayorinde KL., Ayeni JSO, and. Oluyemi JA. (1989). Laying characteristics and reproductive performance of four indigenous helmeted guinea fowl varieties (*Numidia meleagrisgaleatapallas*) in Nigeria. Trop. Agr. (Trinidad) 66 (3): 277 – 280.
 8. Galor A. (1983). The French guinea fowl. Presentation. Service Technique. Galor, Amboise, France, pp 15.
 9. Kabera C. (1997). Breeding guinea fowl in Vhumba. Farm. 67 (12): 16 – 17.
 10. Lehninger AL. (1975 a). Oxidation of fatty acids, in: Biochemistry. New York, Worth Publishers, Inc.: 543 – 558.
 11. Lenzi A F. Lombardo P. Sgro P. Salacone L. Caponecchia F. and Gandini.L. (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double – blind

34. الدراجي، حازم جبار. (1998). تأثير إضافة حامض الأسكوربيك إلى العليقة في الصفات الفسلجية والإنتاجية لقطعان أمهات فروج اللحم فاويرو المرباة خلال أشهر الصيف. أطروحة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
35. البيار، محمد علاء عطية. (2010). تأثير استخدام مستويات مختلفة من الأرجنين L-Arginine في العليقة في الكفاءة التناسلية للديك الرومي المحلي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
36. الخزرجي، رعد حاتم رزوقي. (2009). تأثير بذور الجرجير *Eruca Sativa* Mill في الصفات الانتاجية والتناسلية في ديك وإناث دجاج البيض. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
37. Moncada ML., Vicari E, Cimino C, Calogero AE, Mongioi A, and D'Agata E. (1992). Effect of acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *ActaEurFertil*, 23 (5): 221 – 224.
38. Loumbakis P., Anezinis P, Evangeliou A, Delakas D, Sbyrakis N, and Cranidis A. (1996). Effect of L – carnitine in patients with asthenospermia. *Eur Urol*. 30 (S2): 255 – 260.
39. Rober W., and Griffith MD . (2004). Acetyl – L Carnitine is it an Alternative to Testosterone. <http://www.lifesource4life.com/article-acetyl-testosterone.htm>. date of accss: 23/2/2012.
40. Agarwal A. and Said TM. (2004). Carnitines and male infertility. *Reprod. Biomed. Online* 8 (4): 376 – 384.
41. Citil M., Gunes V, Atakisi O, Ozcan A, Tuzcu M, and Dogan A. (2005). Protective effect of L-carnitine against oxidative damage caused by experimental chronic aflatoxicosis in quail (*Coturnixcoturnix*). *Acta. Vet. Hungarica*. 53 (3): 319 – 324.
22. Duncan DB. (1955). Multiple range and Multiple F test. *Biomet.* 11: 1 – 42.
23. SPSS. (2010). User guide statistic version, 18th ed. SPSS, statistical package for social science, user guide statistical version, 6thed.
24. Kraemer WJ., Volek JS, Spiering BA, and Vingren JL. (2005). L – carnitine supplementation: a new paradigm for its role in exercise. *Monatshefte fur Chemie*. 136: 1383 – 1390.
25. Brown NL., Bayle JD, Scanes CG., and Follett BK. (1975). The actions of avian LH and FSH on the testes of hypophysectomized quail. *Cell Tiss. Res*. 156: 499 – 520.
26. الحسني، ضياء حسن. (2000). فسلجة الطيور الداجنة. دار الكتب للطباعة والنشر. بغداد.
27. Sturkie PD. (2000). *Avian Physiology*. 5thed. New York, Heiderberg, Barlin, Springer Verlag.
28. الدراجي، حازم جبار. (2007b). فسلجة تناسل الطيور الداجنة. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
29. الحياتي، وليد خالد عبد اللطيف. (2012). تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L – Carnitine إلى العلائق في الأداء الإنتاجي والفسلجي والتناسلي لدجاج غينيا. أطروحة دكتوراه. قسم الثروة الحيوانية - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
30. Rommerts FFG. (1990). Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism, and action. In: *Testosterone, Action, Deficiency and Substitution*, 1stedn. (eds. Nieschlag, E., and H.M. Behre) PP.3, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg.
31. الدراجي، حازم جبار. (2007a). التلقيح الاصطناعي في الطيور الداجنة. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
32. Natural – Hormones Understanding (N. H. U.). (2012). Testosterone role and effects. <http://www.natural-hormones.net/testosterone-role-effects.htm>. data of access: 1/2/2012.
33. Wilson JL., Krista M, McDaniel GR, and Sutton CD. (1988). Correlation of broiler breeder male semen and testes morphology. *Poult Sci*. 67: 660 – 668.

تأثير رش المحلول المغذي (Decson) وعدد الرشاشات في نمو وإزهار نبات الجريبيرا (*Gerbera Jamissoni*)

جمال احمد عباس، مشتاق طالب حمادي الزرفي ، رنا فيصل كريم

كلية الزراعة / جامعة الكوفة / العراق

الملخص باللغة العربية

نفذت تجربة في مشتل خاص (مشتل جنة الاحلام) في محافظة بابل للموسم الزراعي 2011 - 2012 لدراسة تأثير رش المحلول المغذي Decson وعدد الرشاشات في صفات النمو والازهار لنبات الجريبيرا. نفذت تجربة عاملية بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R.B.C.D.) بثلاث مكررات بعاملين الاول ثلاث تراكيز من المحلول المغذي Decson (0، 1.5، 3 مل.لتر⁻¹) والثاني عدد الرشاشات (2، 3، 4) والتداخل فيما بينهما، قورنت المتوسطات بحسب اختبار اقل فرق معنوي L.S.D Test بمستوى احتمال 5%،

بينت النتائج بان رش النباتات بالمحلول المغذي بتركيز 3مل.لتر⁻¹ او الرش بثلاث رشاشات ادى الى تحسين صفات النمو الخضري والجذري والزهري، اذ ازداد عدد الاوراق الكلية، الوزن الجاف للمجموع الخضري، عدد الفسوخ، محتوى الاوراق من الكلوروفيل الكلي والكاربوهيدرات الكلية الذائبة، عدد الازهار، طول الساق الزهري، قطر الزهرة، عدد البتلات، طول اطول الجذور، عدد الجذور، الوزن الجاف للجذور مقارنة مع المقارنة والتي اعطت اقل القيم، اما التداخل بين العاملين فقد اعطى التركيز 3 مل.لتر⁻¹ وبأربع رشاشات أعلى معدل في صفات النمو الخضري والجذري والزهري، اذ ازداد عدد الاوراق، الوزن الجاف للمجموع الخضري، عدد الفسوخ، محتوى الاوراق من الكلوروفيل الكلي والكاربوهيدرات الكلية الذائبة، طول الساق الزهري اذ بلغت 32.79 سم بينما في معاملة المقارنة اذ بلغت 24.94 سم، عدد الازهار، قطر الزهرة، عدد البتلات، طول الجذور، عدد الجذور، الوزن الجاف للجذور.

ABSTRACT

The experiment was conducted in a private nursery at Babylon Province, during the growing season 2011 - 2012 to study the effect of spraying nutritional solution Decson and number of spraying on growth and flowering parameter of Gerbera plant. The experiment was adopting at Randomized Complete Block Design (R.C.B.D) in three replicates with tow factors; first factor implementing three concentration of nutritional solution Decson (0, 1.5 and 3 Mg.L⁻¹), second three number of spraying (2, 3 and 4) and the interaction between the treatments. The mean were analyzed by using L.S.D under probability level 0.05.

The results showed that spraying nutritional solution Decson at concentration 3 Mg.L⁻¹ or spraying in three time improved vegetative, rooting and flowering parameters which increased significantly the following; number of total leaves, shoot dry weight, number of off-shoots, leaf total chlorophyll and carbohydrates content, length of the longest root, number of roots, root dry weight, number of flower and petals, diameter of flower and length of flower stalks compared to the control treatment (sprayed with distilled water) which gave least values.

The interaction results showed that spraying with nutritional solution Decson at concentration 3 Mg.L⁻¹ at four spraying had a significant increase in all studied growth parameters; number of total leaves, shoot dry weight, leaves total chlorophyll and carbohydrates content, length of the longest roots, number of roots, root dry weight, number of flowers and petals, diameter of flower and length of flower stalk. i.e. the, number of flowers and petals, diameter of flower and flower stalk gave 6.67 flower. plant⁻¹ and 56.67 petals. Flower⁻¹, 10.10 cm and 34.37 cm compared with the control treatment which gave 3.00 flower. plant⁻¹ and 38.00 petals. Flower⁻¹, 4.77 cm and 23.90 cm respectively.

المقدمة

الكلوروفيل ويرجع ذلك الى تأثيره المباشر في عملية تكوين الاحماض الامينية والكاربوهيدرات (2). وقد وجد الربيعي (2003) ان رش ابصال الفريزيا *Freesia hybrida L.* بالمحلول المغذي النهرين احدث زيادة معنوية في صفات النمو الخضري والزهرى اذ ازدادت عدد الازهار وبلغت 22.25 زهرة. نبات مقارنة بنباتات المقارنة والتي بلغت 4.13 زهرة. نبات (9)، كما وجد الدليمي (2005) عند رش نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus L.* بالمحلول المغذي ان هنالك زيادة معنوية في صفات النمو الخضري والزهرى اذ ازداد طول الساق الزهرى وعدد البتلات بلغا 49.40 سم و 28.41 بتلة. زهرة مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت 40.75 سم و 25.44 بتلة. زهرة وعلى التوالي (10). كذلك تتفق مع ما توصلت اليه الجبوري (2006) عند رش نبات الجعفري *Tayetes ereta L.* بالمحلول المغذي وجدت هناك زيادة معنوية في صفات النمو الخضري والزهرى ، إذ ازداد ارتفاع النبات ، عدد التفراعات ، قطر الساق الرئيسي ، عدد الازهار والنسبة المئوية للمادة الجافة في الازهار (11). ولأهمية هذا النبات وتعدد اغراضه في الحدائق والمنتزهات العامة وازهاره الصالحة للقطف أجريت هذه التجربة لبيان تأثير رش المحلول المغذي Descon وعدد الرشات في صفات النمو الخضري والزهرى لنبات الجربيرا .

المواد وطرائق العمل

اجريت تجربة خلال الموسم الزراعي 2010 - 2011 في احد المشاتل الخاصة بمدينة الحلة (مشتل جنة الاحلام) لبيان تأثير المحلول المغذي Decson المنتج من شركة Kule والمبينة مواصفاته في جدول (1) وعدد الرشات في نمو وازهار نبات الجربيرا اذ تم تحضير 27 شتلة من نبات الجربيرا ذات 4 - 6 اوراق حقيقة ، وزرعت في أصص بلاستيكية ذات قطر 20 سم وارتفاع 25 سم وفيها 3 كغم وسط مكون من 3 تربة: ايتموس دانماركي والمبينة مواصفاته في جدول (2) بواقع شتلة واحدة لكل أصيص وهذا وقد تم اخذ عينات عشوائية من تربة الحقل لتحليل بعض صفاتها الفيزيائية والكيميائية في مختبر الدراسات العليا والمبينة في جدول (3) .

جدول رقم (1): مكونات المحلول المغذي DECSON.

العنصر	الرمز الكيماوي للعنصر	التركيز
حديد	Fe EDTA	0.4%
منغنيز	MN EDTA	0.4%
مغنيسيوم	MG	0.2%
بورون	Cu EDTA	0.45%
نحاس	ZN EDTA	0.08%
زنك	ZN EDTA	0.3%
كاليوم	CA	0.35%
الموليبيدوم	MO	0.05%

تنتمي نباتات الجربيرا *Gerbera Jamisoni* الى العائلة المركبة ، وهي احد نباتات الزينة العشبية المعمرة المهمة ، يصل ارتفاعها الى 45 سم ، الاوراق جلدية كبيرة متطاولة مفصصة الحواف وازهاره محمولة على اعناق طويلة خالية من الاوراق وهي شعاعية الوانها متعددة منها الاحمر والوردي والاصفر والابيض والبرتقالي وغيرها، وتصلح ازهاره لعمل التنسيقات الزهرية لاختلاف الوانها وجمالها وكبر قطر ازهارها وطول اعناقها وبقائها مدة طويلة بعد القطف اذا اعتني بمعاملتها وحفظها في المزهريات وترجع اهمية هذا النبات الى تعدد اغراض زراعته فهو يزرع في البيوت الزجاجية للحصول على ازهاره الصالحة للقطف التجاري طوال ايام السنة،

يحتاج نبات الجربيرا الى التسميد بصورة منتظمة خلال نمو النبات وقبل تكوين البراعم وذلك عن طريق رش المحلول المغذي عليه ، اذ يعد التسميد الورقي من العوامل المهمة التي تعمل على زيادة معدل نمو النبات واكتمال تكوين الازهار فيه وجودتها ، اذ انه التسميد يعمل على زيادة النمو الخضري للنبات وتحسين التزهير فيه (1)، كذلك فان المركبات المخيلية هي مواد عضوية طبيعية او صناعية تغلف العنصر الغذائي وترتبط معه بأكثر من جهة (2) ، وتمتاز بدرجة ثباتية عالية اي قدرتها على ابقاء ايون العنصر المغذي ثابتا في تركيبه العضوي في ظل المشاكل التي تعانيها التربة والتي تعيق جاهزية العنصر للنبات (3) لاسيما في تربة العراق التي تعاني من مشاكل عديدة ، منها درجة التفاعل القاعدي وارتفاع نسبة الكلس فيها ، لذا ينصح بإضافة العنصر المغذي رشا على النبات اذا ما قورن بالصورة المعدنية اذ يمتاز بسهولة الامتصاص وانتقاله وتحلله داخل النبات (4) يعد عنصر النتروجين من العناصر التي تلعب دورا مهما في حياة النبات فهو يؤدي ايضا العديد من الوظائف الفسلجية الهامة للنبات حيث انه يدخل في تكوين البروتين والاحماض الامينية والكلوروفيل والانزيمات والفيتامينات والهرمونات النباتية بالإضافة الى دخوله في تكوين الاغشية الخلوية ومركبات الطاقة (ATP و NADP) والاميدات واشباه القلويدات ، اما عنصر الفسفور فهو يدخل مع النتروجين في بناء الاغشية الخلوية وتكوين مركبات الطاقة والاحماض النووية (2)، كذلك فان عنصر البوتاسيوم هو الايون الاحادي الموجب الشحنة الوحيد الذي تحتاجه كافة النباتات الراقية بالرغم من عدم دخوله في اي مركب عضوي سوى الاحماض التي يتحد معها مكونا املاح عضوية، (5)، كما انه يحفز تكوين ال ATP المهم في النبات وامتصاص العناصر وعملية التركيب الضوئي وغيرها، وانه ضروري لانتقال نواتج التمثيل الغذائي وعليه فان البوتاسيوم ضروري لتكوين البروتين، اما عنصر الحديد فهو يساهم في عملية تكوين الكلوروفيل كما انه يدخل في تكوين الفريديوكسين والسايتوكرومات المهمة في التركيب الضوئي والتنفس كما يلعب الحديد دورا مهما في عملية تكوين البروتين لمساهمته في اختزال النترات ولدوره في رفع قدرة احياء التربة في تثبيت النتروجين الجوي (6)، اما عنصر الزنك يعد من العناصر المغذية الصغرى الذي يسبب نقصه خلا في نمو النبات لما له من اثر في تنشيط عدد الانزيمات (7، 8) ، كما تحتاجه النباتات في تكوين الحامض الاميني التربتوفان Tryptophan الذي يكون الهرمون IAA الضروري لانقسام واستطالة الخلايا، وهو ضروري لعملية الفسفرة وتكوين الكلوكوز ، ويساعد عنصر الزنك في تكوين

جدول رقم (2) : صفات البتموس المستخدم في الدراسة

pH	Salt content g.L ⁻¹	mg.L ⁻¹		
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O
5.5 - 6.0	0.9	140	160	180

جدول رقم (3): تحليل التربة.

الايونات الذائبة ملي مكافئ / لتر						pH	EC DS/ m	المادة العضوية غم.كغم	نسجه التربة
HCO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻	CL ⁻	Na ⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺				
230	2	3	1	1	3	7.8	1.8	7.5	رملية مزيجيه

وفي نهاية التجربة وبتاريخ (1-4-2012) تم قياس الصفات التالية .

اولا: صفات النمو الخضري

1- عدد الاوراق الكلية: ورقة نبات¹

2- الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)

تم تجفيف النبات وذلك بوضع النبات في فرن كهربائي ذات درجة حرارة (70م²) لمدة 48 ساعة ولحين ثبوت الوزن ثم وزنت بميزان حساس (HR- 200) ياباني المنشأ .

3- محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي (ملغم 100غم وزن طري¹)

تم التقدير حسب ما جاء ب (13) .

ثانيا: صفات النمو الجذري

1- طول اطول الجذور (سم) :

2- عدد الجذور الرئيسة :

تم حساب عدد الجذور في كل معاملة وذلك باستخراج النبات من الأصص ووضعه في حوض كبير لمدة 24 ساعة ولحين نزول كل التربة حول الجذور ثم اخذت وغسلت الجذور وبعدها لاستخراج ما تبقى من التربة بماء الحنفية الهادئ بعدها تم حساب عدد الجذور في النبات .

ثالثا : صفات النمو الزهري :

1- طول الساق الزهري (سم) :

تم حساب طول الساق الزهرية باستخدام المسطرة الاعتيادية .

2- عدد الإزهار: (زهرة نبات¹)

3- عدد البتلات: (بتلة زهرة¹)

4- قطر الزهرة (سم) :

نفذت تجربة عاملية (3*3) بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة R.C.B.D. بعاملين الاول ثلاثة تراكيز من المحلول المغذي Decson هي (3,1.5,0) مل .لتر والثاني عدد الرشاش هي (4,3,2) وبثلاث مكررات وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي L.S.D. وعلى مستوى احتمال 5%(12)، وتم رش التراكيز المختلفة من المحلول المغذي Decson بعدد الرشاش بين رشاة واخرى اسبوعين واجريت كافة عمليات الخدمة من ري وتعشيب لكل معاملات وكلما احتاج النبات لذلك والمخطط رقم (1) يوضح معاملات التجربة

المعاملة الاولى A1B1 (0مل.لتر من محلول Decson +2رشاة)

المعاملة الثانية A1B2 (0مل.لتر من محلول Decson +3رشاة)

المعاملة الثالثة A1B3 (0مل.لتر من محلول Decson +4رشاة)

المعاملة الرابعة A2B1 (1.5مل.لتر من محلول Decson +2رشاة)

المعاملة الخامسة A2B2 (1.5 مل.لتر من محلول Decson +3رشاة)

المعاملة السادسة A2B3 (1.5 مل.لتر من محلول Decson +4رشاة)

المعاملة السابعة A3B1 (3 مل.لتر من محلول Decson +2رشاة)

المعاملة الثامنة A3B2 (3مل.لتر من محلول Decson +3رشاة)

المعاملة التاسعة A3B3 (3مل.لتر من محلول Decson +4رشاة)

يتبين من نتائج (جدول 5) التأثير الإيجابي للرش بالمحلول المغذي DECSON في صفات النمو الجذري ، إذ تفوقت النباتات التي رشت بالتركيز 3مل.لتر⁻¹ معنويا واعطت أكبر طول وعدد للجذور والوزن الجاف للجذور إذ بلغت 28.03 سم و 76.56 جذر.نبات⁻¹ و 12.28 غم مقارنة بمعاملة الرش بالماء المقطر والتي اعطت أقل القيم بلغت 19.06 سم و 58.89 جذر.نبات⁻¹ و 8.39 غم وعلى التوالي وقد يعود السبب إلى محتوى المحلول المغذي من العناصر الغذائية ومنها البوتاسيوم الذي له دور في تشجيع نمو الجذور (18) أما وإن الفسفور يعمل على زيادة عدد الجذور في النبات ويرجع السبب إلى دور عنصر الفسفور في تحسين نمو النبات بشكل عام واثرة في زيادة عدد الأوراق ومحتواها من الكلوروفيل الكلي مما عمل على تنشيط عملية التركيب الضوئي مما أدى بالنهاية إلى تحفيز النبات لتكوين الجذور وتكوين مجموع جذري جيد (19) وهذه النتيجة تشبه مع ما توصل إليه الدركلي (2005) عند تسميد نبات الكليل الجبل بالسماد النايتروجيني والفوسفاتي من أن هناك زيادة معنوية في صفات النمو الجذري إذ ازداد الوزن الجاف للجذور (20).

يتبين من نتائج (جدول 6) أن المحلول المغذي Decson أثر معنويا في صفات النمو الزهري ، إذ تفوقت النباتات المرشوشة بالتركيز 3مل.لتر⁻¹ في زيادة عدد الأزهار والبتلات وقطر الزهرة وطول الساق الزهري ، إذ بلغت 5.89 زهرة.نبات⁻¹ و 54.00 بتلة.زهرة⁻¹ و 9.16 سم و 32.79 سم مقارنة بمعاملة الرش بالماء المقطر فقط والتي اعطت 3.11 زهرة.نبات⁻¹ و 40.22 بتلة.زهرة⁻¹ و 5.19 سم و 24.94 سم وعلى التوالي وقد يعود السبب إلى دور المحلول المغذي في احتوائه على العناصر الغذائية ودورها في عملية التركيب الضوئي وزيادة إنتاج المواد الغذائية داخل النبات والتي تحسن النمو وزيادة عدد الأزهار أو إلى دور النتروجين في النبات والتي تعتمد عليها عملية نشوء مبادئ الأزهار ونموها (21) بالإضافة إلى دور البوتاسيوم في تنشيط عملية التزهير (2) ، وكان للبوتاسيوم في تركيب المحلول المغذي دور في إطالة عمر الأزهار وقد يعود دوره الإيجابي في تصنيع وانتقال المواد الغذائية المصنعة ومنها البروتينات تجاه الزهرة فيطيل عمرها (22) ، وقد تشابه مع ما ذكره (23)، حيث أشير إلى أن سبب زيادة قطر الأزهار هو حصول النباتات على الكمية الكافية من العناصر الغذائية والحصول على نمو خضري جيد مما أدى إلى زيادة قطر الأزهار .

تم قياس قطر الزهرة وذلك باستعمال (Vernia) بين بعد نقطتين من الزهرة .

رابعا :الصفات الكيميائية

1- تقدي محتوى الأوراق من الكربوهيدرات الكلية الذاتية :

تم اخذ عينة من الأوراق الكلية الذاتية النبات ثم جففت واتبعت طريقة (14) لتقدير محتوى الأوراق من الكربوهيدرات الكلية الذاتية .

النتائج والمناقشة

اولا: تأثير المحلول المغذي على صفات النمو :

يتضح من الجدول (3) أن رش المحلول المغذي DECSON اثر معنويا في صفات النمو الخضري وأن التأثير ازداد طرديا مع زيادة مستويات المحلول المغذي ، إذ اعطى الرش بالتركيز 3مل.لتر⁻¹ أعلى معدل لعدد الأوراق في النبات وأكبر وزن جاف للمجموع الخضري وأكبر عدد للفسوخ وأعلى محتوى للأوراق من الكلوروفيل الكلي والكربوهيدرات الكلية الذاتية إذ بلغت 27.11 ورقة.نبات⁻¹ و 9.31 غم وزن جاف و 5.22 فسوخة /نبات⁻¹ و 24.25 ملغم 100 غم⁻¹ مادة جافة و 6.90 ملغم .غم⁻¹ وزن جاف مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت أقل المؤشرات 20.11 ورقة.نبات⁻¹ و 4.52 غم و 2.00 فسوخة /نبات⁻¹ و 17.74 ملغم 100 غم⁻¹ مادة جافة و 3.51 ملغم .غم⁻¹ وعلى التوالي ، وقد يعود سبب الزيادة في هذه الصفات إلى ما يحتويه هذا المحلول من عناصر غذائية كالنتروجين الذي له دور مهم في نمو النبات إذ يدخل في بناء الأحماض الأمينية والبروتينات والمركبات الثانوية الأخرى التي تتكون في الأوراق وتنقل بدورها إلى أجزاء النبات الأخرى (4) ، كما أنه يعمل على تنشيط الهرمونات التي تؤدي دورا مهما في استطالة وزيادة حجم الخلايا (5) ، وكذلك عنصر الفسفور يعد من المكونات الأساسية للخلية النباتية ويدخل في تركيب بروتين نواة الخلية الذي بدوره لا يحصل انقسام للخلايا ويعد مهما جدا في عمليات تمثيل الدهون وتحول الكربوهيدرات في النبات ويعمل الفسفور المكون لجزيئة ATP مخزنا وناقلا للطاقة خلال العمليات الحيوية للنبات (15) ، والبوتاسيوم فهو لا يدخل في تركيب المركبات العضوية في النبات ولكن يحتاجه النبات لماله من دور أساسي في بعض العمليات الحيوية ، إذ يؤثر في تكوين الكربوهيدرات ونقل السكريات ، وله دور في تنشيط انزيمات عديدة مهمة من ضمنها انزيمات تصنيع البروتين بالإضافة إلى دوره في زيادة معدل التركيب الضوئي والعمل على تنظيم الضغط الأزموزي للخلايا (16) ، أن وجود الزنك ضروري لعملية الفسفرة وتكوين الكلوكوز ومن ثم فإن نقصه يوقف عملية تمثيل النشا وتراكم الدهون والفوسفوليبيدات والمركبات الفينولية في الفجوة العصارية للنبات ويساعد عنصر الزنك في تكوين الكلوروفيل ويرجع ذلك إلى تأثيره المباشر في عملية تكوين الأحماض الأمينية والكربوهيدرات (2) ، وهذا يشابه ما توصل إليه ناصر 2012 على نبات الجيرانيوم *Pelargonium zonale* L. من أن زيادة تركيز الرش بالمحلول المغذي PRO.SOL اثر معنويا في زيادة صفات النمو الخضري إذ ازداد ارتفاع النبات ، عدد الأفرع الكلية ، عدد الأوراق ، المساحة الورقية ، الوزن الجاف للمجموع الخضري (17) .

جدول رقم (4) :يبين تأثير رش المحلول المغذي DECSON وعدد الرشاشات في صفات النمو الخضري لنبات الجريبيرا

المعاملات	عدد الأوراق الكلية (ورقة.نبات ⁻¹)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	عدد الفسوخ (فسخه . نبات ⁻¹)	محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي (ملغم.100غم ⁻¹ مادة جافة)	محتوى الأوراق من الكاربوهيدرات الكلية الذائبة (ملغم.غم ⁻¹)
المحلول المغذي Decson مل.لتر ⁻¹	0	20.11	2.00	17.74	3.51
	1.5	23.78	2.89	20.42	4.84
	3	27.11	5.22	24.25	6.90
L.S.D. 0.05					
عدد الرشاشات	2	22.00	2.67	19.65	4.47
	3	23.78	3.33	20.89	5.04
	4	24.80	3.91	21.58	5.56
L.S.D. 0.05					
المحلول المغذي Decson × عدد الرشاشات	A1	2	18.33	2.00	16.92
		3	20.33	2.00	17.97
		4	21.67	2.00	18.34
	A2	2	22.33	2.33	19.09
		3	24.00	2.67	20.57
		4	25.00	3.67	21.61
	A3	2	25.33	3.67	22.95
		3	27.00	5.33	24.13
		4	29.00	6.67	25.66
	L.S.D. 0.05				
	0.769				
	0.699				
	0.754				
	0.559				
	6.362				

جدول رقم (5): يبين تأثير رش المحلول المغذي DECSON وعدد الرشاشات في النمو الجذري لنبات الجريبيرا.

المعاملات	طول اطول الجذور(سم)	عدد الجذور (جذر.نبات ⁻¹)	الوزن الجاف للجذور (غم)
المحلول المغذي Decson مل.لتر ⁻¹	0	19.06	8.39
	1.5	23.77	9.05
	3	28.03	12.28
L.S.D. 0.05			
عدد الرشاشات	2	22.40	9.38
	3	23.44	10.18
	4	24.63	10.09
L.S.D. 0.05			
المحلول المغذي Decson × عدد الرشاشات	0	2	17.53
		3	18.67
		4	20.97
	1.5	2	22.13
		3	24.27
		4	24.90
	3	2	27.53
		3	27.40
		4	29.17
	L.S.D. 0.05		
	3.302		
	2.335		
	1.491		

جدول رقم (6): يبين تأثير رش المحلول المغذي DECSON في النمو الزهري لنبات الجريبيرا

المعاملات		عدد الازهار (زهرة.نبات ⁻¹)	عدد البتلات (بتلة.زهرة ⁻¹)	قطر الزهرة (سم)	طول الساق الزهري (سم)
المحلول المغذي Decson مل.لتر ⁻¹	0	3.11	40.22	5.19	24.94
	1.5	4.44	46.89	6.79	28.41
	3	5.89	54.00	9.16	32.79
L.S.D. 0.05		0.366	0.902	0.347	0.348
عدد الرشاشات	2	4.11	44.89	6.52	27.77
	3	4.33	46.67	6.72	28.56
	4	4.86	48.87	7.66	29.52
	L.S.D. 0.05	0.366	0.902	0.347	0.348
المحلول المغذي Decson × عدد الرشاشات	0	2	3.00	4.77	23.90
		3	3.00	5.20	25.03
		4	3.33	5.60	25.90
	1.5	2	4.00	6.27	27.90
		3	4.33	6.13	28.13
		4	5.00	7.97	29.20
	3	2	5.33	8.53	31.50
		3	5.67	8.83	32.50
		4	6.67	10.10	34.37
		L.S.D. 0.05	0.634	0.601	0.603

بلغت 22.40 سم و 64.22 جذر.نبات⁻¹ و 9.38 غم وعلى التوالي وان سبب زيادة المجموع الجذري يزداد زيادة عدد مرات الرش يعود الى احتواء المحلول من العناصر المغذية .

وتشير نتائج (جدول 6) ان لعدد الرشاشات تأثير معنوي في زيادة الصفات الزهرية اذ ازداد عدد الازهار وعدد البتلات وقطر الزهرة وطول الساق الزهري اذ تفوقت الرشاة الثالثة على باقي الرشاشات واعطى اعلى معدل بلغ 4.86 زهرة.نبات⁻¹ و 48.87 بتلة.زهرة⁻¹ و 7.66 سم 29.52 سم مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت اقل معدل بلغ 4.11 زهرة.نبات⁻¹ و 44.89 بتلة.زهرة⁻¹ و 6.52 سم 27.77 سم وعلى التوالي ويعود سبب زيادة عدد الازهار في النبات بزيادة عدد مرات الرش الى احتواء المحلول على العناصر المغذية ودورها في عملية التركيب الضوئي ودخول P و N في المركبات الغنية بالطاقة ومن ثم انتاج المواد الغذائية داخل النبات والتي تحتل النمو وزيادة عدد الازهار (21).

تأثير التداخل بين المحلول المغذي DECSON وعدد الرشاشات في صفات نمو الجريبيرا :

يلاحظ من (جدول 4) تفوق التأثير المعنوي للتداخل بين الرش بالتركيز مل.لتر⁻¹ من المحلول المغذي DECSON والرشاة الثالثة من عدد الرشاشات باعطاء اعلى معدل لعدد الاوراق والوزن الجاف للمجموع الخضري وعدد الفسوخ ومحتوى الاوراق من الكلوروفيل الكلي والكاربوهيدرات الكلية الذاتية اذ بلغت 29.00 ورقة.نبات⁻¹ و 10.81 غم و 6.67 فسخة/نبات⁻¹ و 25.66 ملغم 100 غم مادة جافة و 8.20 ملغم .غم⁻¹ وزن جاف مقارنة بمعاملة الرش بالماء

ثانيا :تأثير عدد الرشاشات في صفات النمو لنبات الجريبيرا:

يلاحظ من نتائج (جدول 4) التأثير الايجابي لعدد الرشاشات في الصفات الخضرية اذ تفوقت النباتات التي رشت معنويا هذه الصفات مقارنة مع تلك التي لم ترش ، اذ يميز ان النباتات التي رشت بأربعة رشاشات باعطاء اعلى معدل لعدد الاوراق والوزن الجاف للمجموع الخضري وعدد الفسوخ ومحتوى الاوراق من الكلوروفيل الكلي والكاربوهيدرات الكلية الذاتية اذ بلغت 34.80 ورقة.نبات⁻¹ و 7.38 غم و 3.91 فسخة/نبات⁻¹ و 21.58 ملغم 100 غم مادة جافة و 5.56 ملغم.غم⁻¹ وزن جاف مقارنة

بمعاملة المقارنة التي اعطت اقل المعدلات بلغ 22.00 ورقة.نبات⁻¹ و 6.00 غم و 2.67 فسخة/نبات⁻¹ و 19.65 ملغم 100 غم مادة جافة و 4.47 ملغم.غم⁻¹ وزن جاف وعلى التوالي ويعود السبب الى دور العناصر الغذائية الموجودة ضمن توليفة المحلول المغذي وزيادة عدد الرشاشات الى ثلاثة والتي قد وفرت حجم اكبر من العناصر الغذائية المهمة لنمو النبات نتيجة تكرار عملية الرش والذي عمل على اعطاء تغذية جيدة للنبات مما ادى الى زيادة انقسام الخلايا وتكوين البراعم الخضرية ولدور النتروجين في زيادة النمو الخضري (2) مما ادى بالنهاية الى تحسين صفات النمو الخضري نتيجة رش النباتات بأربعة رشاشات ،

تبين نتائج (جدول 5) ان عدد الرشاشات اثر معنويا في زيادة معدل اطوال الجنور وعدد الجنور والوزن الجاف للجنور اذ تفوقت الرشاة الثالثة على باقي الرشاشات اذ اعطى اعلى معدلات بلغت 24.63 سم و 69.84 جذر.نبات⁻¹ و 10.09 غم مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت اقل المعدلات

النمو والأزهار والعمر المزهري في الفريزيا *Freesia hybrida* L. رسالة ماجستير . قسم البستنة . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

10. الدليمي ، حيدر عريس عبد الرؤف . (2005). تأثير بعض المغذيات وأوساط النمو وطريقة التربية في انتاج ازهار القرنفل *Dianthus caryophyllus* L رسالة ماجستير كلية الزراعة – جامعة الكوفة . العراق .

11. الجبوري ، انتصار رزاق ابراهيم . (2006). تأثير سماد Agrotonic والماء الممغنط وموعد الزراعة في النمو الخضري والزهري وانتاج بعض المركبات الكاروتينويدية لنبات الجعفري *Tagetes erecta* رسالة ماجستير كلية الزراعة – جامعة بغداد . العراق .

12. الراوي ، خاشع محمود خلف الله، عبد العزيز . (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل – العراق .

13. Goodwin TW. (1976). Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2nd ed. Academic Press, London, N.Y., San Francisco. USA., 373.

14. Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Robers RA. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substance. Anal. An. Chem. 28: 350-356.

15. السلطان ، سالم محمد ، الجبلي، طلال محمود، الصراف، محمد داود. (1992). نباتات الزينة. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. العراق .

16. النعيمي ، سعد الله نجم . (1990) . علاقة التربة بالماء و النبات . جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق .

17. عبد القادر ، فيصل ، عبداللطيف ، فهيمة ، شوقي ، احمد وأبو طيخ ، عباس والخطيب غسان. (1982). علم فسيولوجيا النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. العراق .

18. ابو ضاحي ، يوسف محمد. (1989). تغذية النبات العملي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. بيت الحكمة. العراق .

19. ساهي ، بلقيس غريب . (2005) . دراسة فسلجية في نمو وانتاج نبات الجيربرا *Gerbera jamesonii* . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد . العراق .

20. الدركزلي ، علاء الدين ، عباس، عبد المنعم. (2005). تأثير التسميد النتروجيني الفوسفاتي في النمو الخضري لنبات اكليل الجبل *Rosemarinus officinalis* L. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد. العراق .

21. Thomas M and Spurway M. (1998) . Nutrition of container- grown Freesia . J Plant. Nutr. (2):2485-2496.

22. Adams PMA. and Winsor GW., (1979). Some effects of boron, nitrogen and liming on the bloom production and quality of glass-house carnation. J. of Hort.sci. 54 (2): 149-154.

المقطر فقط والتي اعطت اقل معدل بلغ 18.33 ورقة.نبات⁻¹ و 4.22 غم و 2.00 فسحة.نبات⁻¹ و 16.92 ملغم 100 غم مادة جافة و 3.37 ملغم.غم⁻¹ وعلى التوالي .

أظهرت نتائج (جدول 5) ان التداخل بين المحلول المغذي بتركيز 3 مل .لتر⁻¹ مع الرشثة الثالثة ذات تأثير معنوي في الصفات الجذرية لطول الجذور والوزن الجاف للجذور اذ بلغ 29.17 سم و 81.00 جذر.نبات⁻¹ و 13.74 غم مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت اقل معدل بلغ 17.53 سم و 57.00 جذر.نبات⁻¹ و 7.88 غم وعلى التوالي .

تبين نتائج (جدول 6) ادى تداخل الرش بالمحلول المغذي DECSON وعدد الرشاشات زيادة معنوية في عدد الازهار وعدد البتلات وقطر الزهرة وطول الساق الزهري فقد اعطت النباتات التي رشت بالمحلول المغذي بتركيز 3 مل.لتر⁻¹ مع الرشثة الثالثة اعطى اعلى معدل بلغ 6.67 زهرة.نبات⁻¹ و 56.67 بتلة.زهرة⁻¹ و 10.10 سم و 34.37 مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت اقل معدل بلغ 3.00 زهرة.نبات⁻¹ و 38.00 بتلة.زهرة⁻¹ و 4.77 سم و 23.90 سم وعلى التوالي .

المصادر

1. النبوي ، صلاح الدين ويوسف محمد أمين والي . (1972). الحاصلات البستانية (أعدادها وإنتاجها وتخزينها وتصديرها) ، الطبعة الأولى . دار المعروف . مصر .

2. أبو ضاحي ، يوسف محمد ومؤيد احمد اليونس . (1988). دليل تغذية النبات. دار الكتب للطباعة والنشر جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق .

3. Leonard CD. and Stewart L. (1952) . Correction of Iron chlorosis in citrus with chelated Iron . Pros. Florida state , Hort . Soc . 65 : 20 – 24 .

4. النعيمي ، سعد الله نجم . (1984) . مبادئ تغذية النبات ، مترجم للمؤلفين مينكل وكيريبي. مطبعة دار الكتب . جامعة الموصل . العراق .

5. الصحاف ، فاضل حسين. (1989). تغذية النبات التطبيقي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. مطبعة الموصل – العراق .

6. Mengel K., and Kirkby AE. (1978) . Principles of Plant Nutrition . Int. Potash institute Bene, Switzerland.

7. Cakmak I. ; Marschner H, and Banger TH. (1988). Effect of zinc nutritional status on growth , protein metabolism and levels of Indol - 3 - Acetic Acid and other phytohormones in bean *Phaseolous vulgaris* L. J. Exp. Bot. , 40 (212) : 405 - 412

8. Coleman JE .(1992) . Zinc proteins : enzymes ,storage proteins ,transcription factors , and replication proteins .Ann .Rev. Biochem 16: 897- 946

9. الربيعي ، نوال محمود . (2003) . تأثير الرش بالمحلول المغذي النهرين ومستخلص عرق السوس في

23. Hassan M R. and khattab M.(1980). Effect of different ratio and levels of Fertilizers on the vegetation growth and flower production of Chrysanthemum .Alex. J. Agric Res. 28(3) :225-23.

تأثير عدة تراكيز ورشات المحلول المغذي Foliartal المتوازن في مؤشرات النمو والإزهار لنبات الببتونيا *Petunia hybride*

زينب حسن ثجيل

كلية الزراعة / جامعة الكوفة / العراق

الملخص باللغة العربية

أجريت تجربته في مشتل كلية الزراعة- جامعة الكوفة خلال الموسم 2011-2012 لبيان تأثير عدة تراكيز وعدد الرشاشات من المحلول المغذي Foliartal المتوازن في نمو وأزهار نبات الببتونيا. نفذت تجربته عاملية بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة R.C.B.D. بعاملين الأول ثلاث تراكيز من المحلول المغذي هي (0 و 2 و 4) مل.لتر⁻¹ والثاني عدد رشاشات هي (رشه , رشتان وثلاث رشاشات). قورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي وتحت مستوى احتمال 0.05. أظهرت النتائج أن رش المحلول المغذي Foliartal بتركيز 4 مل.لتر⁻¹ او الرش بواقع ثلاث رشاشات للمحلول المغذي أدى الى تحسين صفات النمو الخضري والزهرى، آذ ازداد (عدد الأوراق , الأفرع الجانبية , الوزن الجاف للمجموع الخضري , محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي , محتوى الأوراق من الكاربوهيدرات الذاتية , عدد الجذور , طول أطول جذر , الوزن الجاف للجذور , عدد الأزهار , قطر الزهرة , الوزن الجاف للأزهار) مقارنة بالنباتات غير المرشوشة او التي رشت لمرة واحدة والتي أعطت اقل القيم لجميع الصفات المذكورة اعلاه . أظهرت نتائج التداخل بين العاملين ان الرش بالمحلول المغذي Foliartal ولثلاث مرات كان لها تأثير معنوي لجميع صفات النمو الخضري والزهرى المدروسة , اذ ازدادت (عدد الأوراق , عدد الأفرع الجانبية , الوزن الجاف للمجموع الخضري , محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي , محتوى الأوراق من الكاربوهيدرات الذاتية , عدد الجذور , طول أطول جذر , الوزن الجاف للجذور , عدد الأزهار من 6.33 زهرة.نبات⁻¹ الى 11.67 زهرة.نبات⁻¹ , قطر الزهرة من 4.37 سم الى 7.93 سم , الوزن الجاف الأزهار من 1.96 غم الى 5.91 غم) مقارنة بمعامله المقارنة التي أعطت أقل القيم.

ABSTRACT

An experiment was conducted in Agriculture College nursery in 2011-2012 seasons to estimate the effect of several concentrations and number of spray times of nutrient solution (Foliartal) on growth and flowering of petunia plant. The design of this experiment was factorial experiment with completely randomized block design (R.C.B.D.) of two factors: first contained three concentrations of nutrient solution (0, 2, 4) ml.L⁻¹, and the second factor is the number of spraying (one and two times). The averages of treatments were compared by using least significant difference test on 0.05 probability level.

Results showed that spraying of nutrient solution with concentration 4 ml.L⁻¹ or spraying three times due to increase in flowering and growth parameters (number of leaves, branches number, leaf content of total chlorophyll, leaf content of dissolved carbohydrates, roots number, length of tallest root, dry weight of roots, number of flowers, flower diameter, dry weight of flower) compared with unsprayed plants or plant sprayed for one time that gave lowest values for all previous parameters.

Also, results appeared that the interaction between two factors have significant effect on all growth and flower parameters, the spraying of nutrient solution Foliartal for three times gave increased in number of leaves, branches number, leaf content of total chlorophyll, leaf content of dissolved carbohydrates, roots number, length of tallest root, dry weight of roots, number of flowers from 6.33 flower.plant⁻¹ to 11.67

flower.plant⁻¹, flower diameter from 4.37 cm to 7.93 cm, dry weight of flower from 1.96 gm to 5.91 gm compared with control treatment that gave lowest values.

المقدمة

خضري جيد (10)، وأشجار Khan وأخرون (1992) إن التسميد بالفسفور على هيئة سوبر فوسفات ثلاثي (42-47% P_2O_5) في مقدار 40 كغم هـ⁻¹ أدى إلى زيادة معنوية في عدد النورات الزهرية لنبات الحبة الحلوة (11). ذكرت العباسي (2000) في بحثها حول تأثير إضافة عنصر البوتاسيوم على هيئة كبريتات البوتاسيوم K_2O في ثلاث مستويات (120,60,0 كغم هـ⁻¹) إلى نبات الداليا *Dahlia rosea* إلى المستوى 120 كغم هـ⁻¹ أدى إلى زيادة معنوية في قطر الساق، والوزن الجاف الطري إلى المجموع الخضري، (12) وذكر (التويج، 1999) أن معامل نبات شقائق النعمان *Ranunculus asiaticus* L. أن سماد البوتاسي بتركيز 4% كان له تأثير في زيادة الأزهار وقطر الزهرة والحامل الزهري وعلى الرغم من أهميته هذا النبات واستعمالاته الكثيرة فلا تزال الأبحاث المجراة حوله قليلة لذا أجريت هذه التجربة لبيان أهميته الرش بالمحلول المغذي Foliartal المتوازن وتأثير عدة تراكيز وعدد الرشاشات من المحلول المغذي في نمو وأزهار نبات البيتونيا (13).

المواد وطرائق العمل

أجريت تجربته في مشتل كلية الزراعة- جامعة الكوفة خلال الموسم 2011-2012 لبيان تأثير عدة تراكيز وعدد الرشاشات من المحلول المغذي Foliartal المتوازن في نمو وأزهار نبات البيتونيا تمت زراعة البذور بتاريخ 2011/9/1 وبعد أنبات البادرات تم تقريدها بعد ظهور أربعة أوراق حقيقية في أصص ذات قطر (15 سم) وارتفاع (20 سم) وفيها تربة غرينية مزيجية بحجم (1.5 ملغم) تربة حللت صفاتها الفيزيائية والكيميائية وحسب ماشار إليه في جدول رقم (1) بواقع شتلة واحدة لكل أصيص نفذت تجربته عامليه بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة R.C.B.D بعاملين الأول ثلاث تراكيز من المحلول المغذي Foliartal المتوازن هي (0، 2، 4) مل.لتر⁻¹ والثاني عدد رشاشات (رشة واحدة، رشتان، ثلاث رشاشات) تم رش المحلول المغذي في الصباح الباكر ووضعت الحواجز بين المعاملات لمنع تطاير المحلول المغذي بين النباتات وتم رش المحلول بين رشه وأخرى أسبوعين، قورنت المتوسطات حسب اختيار أقل فرق معنوي L.S.D وعلى مستوى احتمال 5% (14) وأجريت كافة عمليات الخدمة من ري وتغشيب وحسب الحاجة ولكل المعاملات.

ينتمي نبات البيتونيا *Petunia hybride* إلى العائلة Solanaceae وهو من الأزهار الحولية التي عرفت قديماً في العراق، وتضم هذه العائلة 35 نوع من النباتات المزهرة، موطنها الأصلي أمريكا الجنوبية، اسمها مشتق من كلمه فرنسيه (petunb) وتعني التبغ، ساق النبات نصف زاحف اسطواني الشكل تحتوي على شعيرات زغبية والأوراق بيضيه قلبية الشكل ذات أعناق متبادلة على الساق في الجزء السفلي متبادلة في الجزء العلوي (1). تمتاز أزهارها بتعدد الألوان وهي جميلة وجذابة مما جعلته واحد من النباتات الواسعة الانتشار في الحدائق والمنتزهات والمنازل، كذلك يستعمل في عمل الباقات للاستفادة من رونقه وجاذبية زهوره، أزهاره مفردة إلى عميقة الشكل (الأبيض، الوردي، الأحمر، البنفسجي) تصلح للقطف (2).

إن زراعة هذا النبات تتطلب ارض جيدة الصرف غنية بالعناصر الغذائية ومنها النتروجين والفسفور والبوتاسيوم إذ يعتبر عنصر النتروجين من العناصر التي تدخل في بناء العديد من المركبات الضرورية في نمو النبات (3)، إضافة عنصر الفسفور يدخل في تركيب الأحماض النووية والامنيه وتكوين مركبات الطاقة الضرورية إلى نمو النبات (4)، أما عنصر البوتاسيوم يعتبر هذا العنصر عامل مساعد في تكوين الكربوهيدرات وتحللها إلى سكريات، وتكوين الأحماض الأمينية والبروتينات إضافة إلى أهمية في انقسام الخلايا (5)، وأشجار الدركزلي (2005) أن رش نبات أكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في تراكيز (0.2، 0.2، 0.4 غم.لتر⁻¹) على هيئة يوريا سبب زيادة معنوية ارتفاع النبات، عدد الأفرع الجانبية، الوزن الجاف إلى المجموع الخضري، المساحة الورقية، محتوى الأوراق من الكلوروفيل عند تركيز (0.4 N لتر⁻¹) وأوضح عبد أخرون (2005) أن تسميد النتروجين في هيئة يوريا إلى نبات التولب *Tulipa hybrida* L. في تركيز (0 و 100 و 200 ملغم.لتر⁻¹) أدى إلى زيادة ارتفاع النبات، الوزن الجاف إلى المجموع الخضري عند تركيز (200 ملغم.لتر⁻¹) (7). وقد ذكر الظالم (2007) في بحثه حول تأثير مصادر مختلفة من النتروجين هي اليوريا 2.55 غم يوريا.أصيص⁻¹ وفوسفات الامونيوم الثنائية 5.88 غم فوسفات الامونيوم الثنائية.أصيص⁻¹ وكبريتات الامونيوم 5.6 غم كبريتات الامونيوم.أصيص⁻¹ أدت النباتات المعاملة اليوريا إلى زيادة معنوية في طول النبات، والمساحة الورقية، والوزن الجاف للمجموع الخضري، والوزن الجاف للمجموع الجذري، كذلك أدت إضافة فوسفات الامونيوم الثنائية محتوى الأوراق إلى الكلوروفيل الكلي إما التسميد في كبريتات الامونيوم تفوقت معنوياً في عدد التفروع الجانبية إلى النبات مقارنة في معاملة عدم التسميد (8).

أشار كل من Janes و Lersel (2001) في دراستهما حول تسميد نبات ورد البوري *Petunia hybrida* والبيكونيا *Begonia simper-florens* أن التسميد بسماد سوبر فوسفات ثلاثي بمستويات (0، 100,50، 100 ملغم.لتر⁻¹) أن زيادة تركيز السماد أدى زيادة ارتفاع النبات، الوزن الجاف إلى كلا النباتين وزاد من عدد أزهار النبات والبيكونيا. (9) وذكرت رقية وأخرون (1991) أن إضافة 50 كغم سماد فوسفاتي هـ⁻¹ على هيئة سوبر فوسفات ثلاثي (42-53% P_2O_5) إلى نبات أكليل الجبل أدى إلى الحصول مجموع

جدول (1) : يبين الصفات الفيزيائية والكيميائية لتربة التجربة

الأيونات الذائبة ملي مكافئ، لتر ⁻¹						pH	EC (DS/M)	نسجه التربة
COH ₃ ⁻	SO ₄ ⁻	Cl ⁻	Na ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺			
1.5	3.2	5	2	3	5	7.1	1.3	غرينية مزيجية

جدول (2) : يبين مكونات المحلول المغذي Foliartal المتوازن

النسبة	العناصر
w/v %15.0	Total Nitrogen(N) ureic
w/v %15.0	Phosphoric Anggdride(P ₂ O ₅)
w/v %15.0	Potassium Oxide (K ₂ O)
w/v %0.026	Boron (B)
w/v %0.066	Copper (CU)
w/v %0.066	Iron (Fe)
w/v %0.066	Manganese (Mn)
w/v %0.0026	Molybdenum (Mo)
w/v %0.013	Zinc (Zn)

جدول رقم (3) يبين مخطط التجربة

المعاملات	التكرارات	المستويات
T1	A1 B1	0 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشه واحدة
T2	A1 B2	0 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشتان
T3	A1 B3	0 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + ثلاث رشات
T4	A2 B1	2 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشه واحدة
T5	A2 B2	2 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشتان
T6	A2 B3	2 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + ثلاث رشات
T7	A3 B1	4 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشه واحدة
T8	A3 B2	4 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + رشتان
T9	A3 B3	4 مل .لتر ⁻¹ من المحلول المغذي + ثلاث رشات

4- محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي (ملغم . 100غم⁻¹ وزن طري)

تم تقدير محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي وذلك بأخذ عينات من أوراق النبات في كل وحدة تجريبه واعتمدت على طريقة (16) في مختبر الدراسات العليا في كلية الزراعة- جامعة الكوفة

5- محتوى الأوراق من الكربوهيدرات الكلية الذائبة تم تقدير محتوى الأوراق من الكربوهيدرات وذلك بحسب طريقة (17)

ثانيا: مؤشرات النمو الجذري

1- عدد الجذور (جذر-نبات⁻¹)

وفي نهاية التجربة وبتاريخ 2012/3/1 تم قياس مؤشرات النمو التالية

اولا: مؤشرات النمو الخضري

1- عدد الأوراق الكلية (ورقه.نبات⁻¹)

2- عدد الأفرع الجانبية (فرع.نبات⁻¹)

3- الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)

تم تجفيف النبات بالكامل بعد انتهاء التجربة وذلك بقطع المجموع الخضري للنبات في السندانة ووضع في غرفه ذات تهويه جيدة لمدة (7-14) يوم ولحين ثبوت الوزن

(15)

الجذري آذ نفوقت النباتات المرشوشة بالتركيز 4 مل.لتر⁻¹ في إعطاء أعلى معدل لصفات النمو الجذري آذ ازداد عدد الجذور الرئيسية وطول أطول جذر والوزن الجاف للجذور آذ بلغ (10.00 جذر.نبات⁻¹, 8.78 سم, 3.73 غم) وعلى التوالي مقارنة بمعامله المقارنة والتي أعطت أقل القيم بلغ (6.33 جذر.نبات⁻¹, 4.89 سم, 1.41 غم) يعود السبب إلى محتوى المحلول المغذي Foliartal على العناصر الغذائية ومنها النتروجين أنه يعد من العناصر المهمة في زيادة نمو المجموع الجذري من خلال زيادة النمو العام للنبات وان زيادة نمو ونشاط المجموع الجذري مرتبط إيجابياً بزيادة نمو وكفاءة نشاط المجموع الخضري كما أن النتروجين يشجع على تعمق ونمو غزير للجذور كما يسهم في تثبيت النبات وزيادة قدرته على امتصاص الماء والمغذيات (4) فيما يعطى عنصر الفسفور قوة النمو ويعمل على زيادة التفراعات وتقوية المجموع الجذري آذ يساعد على النمو وتطور الجذور من خلال عمليات الانقسام الخلوي (19) كما يعمل البوتاسيوم على تشجيع نمو الانسج المرستيمية ومن ثم تكوين نمو خضري وجذري جديدين كما يزيد من كفاءة امتصاص الماء والمغذيات الجاهزة من التربة وهذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليه (13) لمعرفة تأثير السماد البوتاسي المضاف للتربة بتركيز 4% في النمو الخضري والزهرى لنبات الرانكسيل وقد توصلت إلى زيادة عدد الأفرع والنسبة المؤوية NPK في الأوراق وزيادة عدد الأزهار وأقطارها .

يتضح من الجدول (6) أن رش النباتات بالمحلول المغذي Foliartal أثر معنوياً في زيادة صفات النمو الزهرى آذ ازدادت عدد الأزهار , قطر الزهرة , الوزن الجاف للأزهار آذ بلغ (10.33 زهرة . نبات⁻¹, 7.34 قطر الزهرة سم , 5.06 غم) مقارنة بمعامله الرش بالماء المقطر فقط التي أعطت أقل معدل بلغ (6.78 زهرة . نبات⁻¹, 4.84 سم , 2.42 غم) يعود السبب إلى محتوى المحلول المغذي Foliartal على العناصر الغذائية ومنها النتروجين الذي يدخل في كثير من المركبات ومنها الأحماض والامنيه التي تعد وحدات البناء الاساسيه للبروتين والانزيمات التي تلعب دور في التفاعلات البروتوبلازم التي تحفز انقسام الخلايا ومن ثم زيادة الساق الزهرى كذلك الفسفور والبوتاسيوم دور مهم في عمليه تحسين صفات النمو الخضري ومن ثم انعكاسه على النمو الزهرى من خلال التحكم في كميته السكريات المنتقلة الى المناطق المرستيمية والتي تكون بدورها النشأة الاولى للأزهار ولبوتاسيوم دور في نقل الكربوهيدرات المصنعة من مناطق الإنتاج في تنجته وتراكمها في الأزهار آذ تساعد في زيادة الضغط الازموزي (20) وهذا يتفق مع ما أشار إليه (21) عند معاملة الورد الشجيري بسماد كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 (52.52) K_2O باعتبارها مصدر للبوتاسيوم لثلاث مستويات (0 , 100 , 200 ملغم .لتر⁻¹) أعطى المستوى 100 ملغم .لتر⁻¹ زيادة معنوية في عدد الأزهار وأقطارها

ثانياً : تأثير عدد الرش لصفات النمو لنبات البيتونيا أظهر نتائج جدول (4) وجود زيادة معنوية عند زيادة عدد رشات المحلول المغذي Foliartal آذ أن زيادة عدد الرش في مقدار ثلاث رشات آذ أدى من عدد الأوراق , عدد الأفرع الجانبية , الوزن الجاف إلى المجموع الخضري , محتوى الأوراق من الكلوروفيل , ومحتوى الأوراق من الكربوهيدرات وعلى التوالي آذ بلغ أعلى (37.11 ورقه.نبات⁻¹, 5.78 فرع .نبات⁻¹, 4.80 غم , 29.68 ملغم لكل 100 غم⁻¹, 9.46 ملغم⁻¹) مقارنة في

تم حساب عدد الجذور في كل معاملة وذلك باستخراج النبات في السندانة ووضعه في حوض ماء لمدة 24 ساعة وبعدها أخرج النبات لغرض إزالة الاتربة بالكامل بغسلها بالماء الجاري الهادئ وبعدها حساب عدد الجذور

2- طول الجذر (سم)

تم حساب طول أطول الجذور وذلك باستخدام المسطرة ولكل معاملة

3- الوزن الجاف للجذور (غم)

تم حساب الوزن الجاف للجذور وذلك بقطع الجذر من النبات ووضعه في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70م° لمدة 72 ساعة ولحين ثبوت الوزن

ثالثاً: مؤشرات النمو الزهرى

1- عدد الأزهار (زهرة-نبات⁻¹)

تم حساب عدد الأزهار , لكل وحدة تجريبية

2- قطر الزهرة (سم)

تم حساب قطر الزهرة وذلك باستخدام ألقدمه Vernier من اوسع نقطتين

3- الوزن الجاف للأزهار (غم)

تم قياس الوزن الجاف للأزهار وذلك بقطع الأزهار وضعت في أكياس في فرن كهربائي على درجة حرارة 70م° ولعدة أيام ولحين ثبوت الوزن.

النتائج والمناقشة

اولاً : تأثير رش المحلول المغذي المتوازن Foliartal في صفات النمو إلى نبات البيتونيا يتضح نتائج في جدول رقم (4) رش المحلول المغذي أثر معنوياً في صفات النمو الخضري وأن التأثير وزيادة كان طردياً مع زيادة محلول المغذي , آذ أعطى الرش في تركيز 4 مل.لتر⁻¹ أعلى معدل إلى عدد الأوراق , عدد الأفرع الجانبية , الوزن الجاف إلى المجموع الخضري , محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي , ومحتوى الأوراق من الكربوهيدرات كليا آذ بلغ (39.44 ورقة.نبات⁻¹, 6.44 فرع .نبات⁻¹, 5.62 غم, 31.02 ملغم لكل 100 غم⁻¹, 10.90 ملغم⁻¹ وزن جاف مقارنة في معاملة الرش في الماء المقطر فقط 0 والذي أعطى أقل القيم (31.67 ورقه . نبات⁻¹, 4.11 فرع .نبات⁻¹, 3.13 غم, 6.32 ملغم لكل 100 غم⁻¹, 5.92 ملغم⁻¹) وعلى التوالي وقد يعود سبب الزيادة في هذه الصفات إلى ما يحتويه هذا المحلول من عناصر كعنصر النتروجين الذي له دور في نمو النباتات آذ يدخل مباشرة في تركيب جزيئه الكلوروفيل مع عنصر المغنسيوم والحامض الأميني والتي تعد وحدة البناء الأساسي . إلى البروتين في الإنزيمات الذي هو يدخل في جميع الخطوات المرتبطة في تفاعل البروتوبلازم وعمليات التمثيل الضوئي (18) كما أن يعمل على تنشيط الهرمونات في استطالة وزيادة حجم الخلايا (3) وكذلك عنصر الفسفور الذي له دور مباشرة في معظم العمليات الحيوية داخل الخلايا النباتية آذ أنه يساعد على انقسام الخلايا فضل عن مشاركته في تكوين المركبات الغنية بالطاقة مثل ATP الضرورية في تكوين الفسفوليبيدات وفي تكوين المرافقات الإنزيمية التي تصاحب تمثيل الكربوهيدرات فيما يعمل على تحسين النمو الخضري (19). كذلك عنصر البوتاسيوم في تمثيل الكربوهيدرات فضلاً على أنه منظم ازموزي يشترك في عمليتي فتح وغلق الثغور وما يتبع ذلك مع تأثير في زيادة امتصاص الماء والمغذيات (3). يتبين من نتائج جدول (5) أن المحلول المغذي Foliartal أثر معنوياً في زيادة صفات النمو

مذكوره (23) في يجب أجرئها على أبعصال النرجس *Campanula medium* أن أضافه المستوى المرتفع من السماد وقد بكر في موعد التزهير وازداد عدد الزهيرات نورة وقل قطر الزهرة في حين عامل المستوى المتوسط على زيادة النسبة المؤية في المادة الجافة حيث استخدمت أربعة مستويات من السماد NPK (0.27-0.25-0.23:0) 0.11-0.12-0.13، 0.03-0.04-0.04 (غم/ أصيص و بثلاث دفعات متساوية.

ثالثاً: .: تأثير التداخل بين المحلول المغذي وعدد الرشاش لصفات النمو لنبات البيتونيا يلاحظ من جدول (4) تفوق التأثير المعنوية تداخل بين الرش بتركيز 4مل. لتر⁻¹ من المحلول المغذي وزيادة عدد الرش ثلاث رشاش أعطى أعلى معدل (الى عدد الأوراق ، عدد الأفرع الجانبية، الوزن الجاف الى المجموع الخضري، محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي ، ومحتوى الأوراق من الكربوهيدرات كليا الذاتية) إذ بلغ (42.33) ورقه 0نبات⁻¹ ، 7.67 فرع 0نبات⁻¹ ، 6.37 غم ، 32.33 ملغم لكل 100غم ، 11.97 ملغم⁻¹) مقارنة بمعامله المقارنة والتي أعطت أقل القيم إذ بلغ (31.00 ورقه .نبات⁻¹ ، 4.00 فرع .نبات⁻¹ ، 2.67 غم ، 25.68 ملغم لكل 100غم ، 5.00 ملغم⁻¹). كما يتبين من جدول (5) وجود زيادة معنوية للتداخل بين المحلول المغذي وعدد الرشاش إذ أعطى التداخل 4مل. لتر⁻¹ وعدد الرشاش ثلاث رشاش أعلى معدل (عدد الجذور ، طول أطول جذر ، الوزن الجاف للجذور) إذ بلغ (11.33 جذر .نبات⁻¹ ، 10.33 سم ، 4.44 غم) مقارنة بالمعاملة المقارنة والتي أعطت أقل القيم بلغ (5.67 جذر 0نبات⁻¹ ، 4.33 سم ، 1.17 غم). كما يتبين من جدول (6) أن التداخل بين المحلول المغذي 4مل. لتر⁻¹ وعدد الرشاش ثلاث رشاش زاد معنوياً من عدد الأزهار وقطر الزهرة والوزن الجاف للأزهار إذ أعطت (11.67 زهرة .نبات⁻¹ ، 7.93 قطر الزهرة سم ، 5.91 غم) مقارنة بمعاملة المقارنة والتي أعطت أقل القيم بلغ (6.33 زهرة .نبات⁻¹ ، 4.37 قطر الزهرة سم ، 1.96 غم)

معامل الذي استخدمه فيها رشه واحده والذي أعطى أقل معدل (33.89 ورقه .نبات⁻¹ ، 4.78 فرع .نبات⁻¹ ، 3.80 غم ، 27.97 ملغم لكل 100غم⁻¹ ، 7.77 ملغم⁻¹) يعود السبب دور المحلول المغذي Foliar الذي يحتوي على العناصر الغذائية النتروجين والفسفور والبوتاسيوم في الاضافه على انه يحتوي على العناصر الصغرى الذي له دور مهم في نمو النبات ومنها عنصر الحديد الذي يدخل في عملية الضوئي وبناء الأحماض النووية DNA و RNA الضرورية الى انقسام الخلايا وكذلك في تركيب جزيئه الكلوروفيل الذي يدخل عملية التركيب الضوئي وبناء المواد الضرورية الى نمو النبات (3) وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه (22) من أن زيادة تركيز الرش في المحلول المغذي الحاوي على NPK اثر معنوياً في زيادة صفات النمو الخضري الى نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* إذ ازيد نمو الأوراق، النسبة المؤية الى الماد الجافة الى المجموع الخضري ومحتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي يتبين من الجدول (5) أن لعدد الرشاش تأثير معنوي إذ كلما زاد عدد الرشاش الى ثلاث رشاش أعطى زيادة في عدد الجذور ، طول أطول جذر ، الوزن الجاف للجذور إذ بلغ (9.11 جذر .نبات⁻¹ ، 7.67 سم ، 2.96 غم) مقارنة بمعامله التي استخدم فيها رشه واحدة والذي أعطت أقل القيم بلغ (7.44 جذر 0نبات⁻¹ ، 5.89 سم ، 2.25 غم) ويعود السبب الى دور المحلول المغذي في تشجيع النمو الجذري للنبات والذي يعمل على امتصاص اكبر كميته من العناصر الغذائية التي تحسن النمو وزيادة إنتاج الأحماض العضوية التي تنطلق من الجذور الى التربة وبالتعاقب وزيادة ذوبانية في معظم المغذيات كما يعمل بالنهاية على تحسين النمو الخضري والجذري للنبات (19) كما يتبين في جدول (6) أن زيادة عدد الرشاش الى ثلاث رشاش زاد من عدد الأزهار ، قطر الزهرة ، الوزن الجاف للأزهار إذ بلغ (9.33 زهرة .نبات⁻¹ ، 6.66 قطر الزهرة سم ، 4.30 غم) مقارنة بالمعاملة التي استخدم فيها رشه واحدة والتي أعطت أقل معدل بلغ (7.78 زهرة .نبات⁻¹ ، 5.52 قطر الزهرة سم ، 3.27 غم) على التوالي ويرجع السبب الى دور المحلول المغذي الذي يحتوي على العناصر التي تزيد من مستوى هرمونات النمو الداخلية في النباتات المعامل به وبالتالي زيادة صفات النمو الزهري وهذه النتيجة تتفق مع

جدول رقم (4): تأثير المحلول المغذي Foliartal عدد الرشاش والتداخل في مابينهما في صفات النمو الخضري

المعاملات		عدد الأوراق ورقه.نبات- ¹	عدد الأفرع الجانبية فرع.نبات- ¹	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	محتوى الأوراق من الكلوروفيل ملغم/100غم- ¹ وزن طري	محتوى الأوراق من الكربوهيدرات الكلية الذاتية ملغم.غم- ¹ وزن جاف
المحلول Foliartal المتوازن	0	31.67	4.11	3.13	26.34	5.92
	2	35.22	5.00	4.21	28.74	8.69
	4	39.44	6.44	5.62	31.02	10.90
L.S.D. 0.05		1.336	0.521	0.218	1.058	1.115
عدد الرشاش	1	33.89	4.78	3.80	27.97	7.77
	2	35.33	5.00	4.36	28.44	8.29
	3	37.11	5.78	4.80	29.68	9.46
L.S.D. 0.05		1.336	0.521	0.218	1.058	1.115
المحلول المغذي × عدد الرشاش	1	31.00	4.00	2.67	25.68	5.00
	2	31.67	4.00	3.40	26.03	5.90
	3	32.33	4.33	3.33	27.30	6.87
	1	33.67	4.67	3.67	28.05	8.13
	2	35.33	5.00	4.24	28.76	8.40
	3	36.67	5.33	4.70	29.41	9.53
	1	37.00	5.67	5.06	30.18	10.17
	2	39.00	6.00	5.42	30.54	10.57
	3	42.33	7.67	6.37	32.33	11.97
	L.S.D. 0.05		2.419	1.306	1.196	2.119

جدول رقم (5) تأثير المحلول المغذي Foliartal وعدد الرشاش والتداخل في مابينهما في صفات النمو الجذري

المعاملات		عدد الجذور جذر.نبات-1	طول الجذر (سم)	الوزن الجاف للجذور (غم)
المحلول المغذي Foliartal المتوازن	0	6.33	4.89	1.41
	2	8.00	6.56	2.44
	4	10.00	8.78	3.73
L.S.D. 0.05		0.926	0.889	0.299
عدد الرشات	1	7.44	5.89	2.25
	2	7.78	6.67	2.37
	3	9.11	7.67	2.96
L.S.D. 0.05		0.926	0.889	0.299
المحلول المغذي × عدد الرشات	1	5.67	4.33	1.17
	2	6.33	5.00	1.42
	3	7.00	5.33	1.63
	1	7.67	6.00	2.30
	2	7.33	6.33	2.21
	3	9.00	7.33	2.80
	1	9.00	7.33	3.27
	2	9.67	8.67	3.47
	3	11.33	10.33	4.44
	L.S.D. 0.05		1.826	1.627

جدول رقم (6) تأثير المحلول المغذي Foliartal وعدد الرشاشات والتداخل في مابينهما في صفات النمو الزهري

المعاملات		عدد الأزهار زهرة نبات ¹	قطر الزهرة	الوزن الجاف للأزهار (غم)
المحلول المغذي Foliartal المتوازن	0	6.78	4.84	2.42
	2	8.56	6.04	3.79
	4	10.33	7.34	5.06
L.S.D. 0.05		0.267	0.492	0.669
عدد الرشاشات	1	7.78	5.52	3.27
	2	8.56	6.06	3.71
	3	9.33	6.66	4.30
L.S.D. 0.05		0.267	0.492	0.669
المحلول المغذي × عدد الرشاشات	1	6.33	4.37	1.96
	2	7.00	4.70	2.64
	3	7.00	5.47	2.68
	1	8.00	5.37	3.45
	2	8.33	6.20	3.61
	3	9.33	6.57	4.30
	1	9.00	6.83	4.40
	2	10.33	7.27	4.88
	3	11.67	7.93	5.91
	L.S.D. 0.05		1.332	1.202

المصادر

10. رقيه , نزيه وعماد عبد الحميد وفاتنة التايب. (1991). النباتات الطبية والعطرية. مديرية الكتب والمطبوعات. جامعة تشرين. كلية الزراعة. دمشق. سوريا.
11. Khan MMA., Samiullan SH, and Afridi MMRK. (1992). Xieid and anality of fennel (Foliar: culum vulgare mill) in relation to basal and Foliar phospharas. J. plant Nut. . 15 (11) : 250 -251.
12. العباسي , أزهار مهدي عبد الصاحب حسين. (2000). تأثير التسميد وخف البراعم في النمو الخضري والزهري وتكوين الجذور الدرنية في النبات الداليا *Dahlia variabilis* L. أطروحة ماجستير. كلية الزراعة-جامعة البصرة. العراق.
13. تويج , سهي ضياء. (1999). تأثير أوساط النمو والسماذ البوتاسي في نمو نبات الزنجبيل *Ruunculas asiaticus*. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.
14. الراوي , خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله. (2000). تصميم وتحليل تجارب الزراعة. كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل. العراق.
15. أحسان , سعد علي. (1999). دراسه بعض العوامل المؤثرة في الصفات الكميّه والنوعيّة للزيوت العطريّة النعناع والبطيخ . اطرحه دكتوراه. كلية الزراعة -جامعة بغداد. العراق.
16. Goodwin TW. (1976). Chemistry and biochemistry of plant pigments and ed. Academic Press condon, N.Y. San Farnscisco. U S A , P. 373.
17. Duboies M., Gilles KA., Hamifon JK., Robers RA. and Smith H. (2006). Colorlmetric method for determination of Sugar and related Substance. Anal. An. chem. 28: 350 -356.
18. الرئيس , عبد الهادي جواد. (1987). التغذية النباتية. الجزء الأول. التغذية النباتية. جامعة بغداد - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. كلية الزراعة-العراق.

1. محمود ,أمين , خلف , محسن , كريم , سامي. (1989). الزينة وهندسة الحدائق. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد.
2. البطل , نبيل نعيم. (2005). نباتات الزينة الداخلية منشورات جامعة دمشق كلية الزراعة مطبعة العجلوني سوريا.
3. الصحاف , فاضل حسين. (1989). تغذية النبات التطبيقي. وزارة التعليم والبحث العلمي. جامعة بغداد. مطبعة الموصل -العراق.
4. أبووضاحي , يوسف محمد ومؤيد احمد واليونس (1988). دليل تغذية النبات مدير بدار الكتب للطباعة والنشر. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد.العراق.
5. رسول , طاهر نجم. (1988). هندسة الحدائق. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد.
6. الدركزلي , علاء الدين عبد المنعم عباس. (2005). تأثير التسميد النتروجيني والفسفات في النمو الخضري لنبات أكليل الجبل *Rosemarinus officinalis* L. رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
7. عيد , عبد الكريم محمد واحمد موسى طواحين ومؤيد فاضل عباس. (2005). تأثير النتروجين والبوتاسيوم في النمو الخضري والزهري وتكوين الأصيل لنبات النيوالب *Tulipa hybrida* L. مجلة البصرة للعلوم الزراعية. مجله 18(2): 59-71.
8. ألظالمي , سليمان عبد الحسن مشكور. (2007). تأثير مصادر مختلفة من الأسمدة النتروجينية ومواعيد الحث في النمو , وحاصل ونوعية الزيت الأساسي لنبات العطر (العطرة) *Pelargonium odoratissimum* L. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. العراق.
9. Jones E. and Lersel MV. (2001). Flow production of petunias and Beyonias as affected by Fertilizers with different phosphorus content. Hort. Sci. 36 (2): 282 - 285.

19. النعيمي , سعد الله نجم عبد الله. (2000). مبادئ تغذية النبات. دار الكتب للطباعة والنشر. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. العراق.
20. عواد , كاظم مشعون. (1990). التسميد وخصوبة التربة. دار الكتب والوثائق. بغداد.
21. الجليبي , عبد الرزاق عثمان. (1999). تأثير بعض العناصر المعدنية ومعوقات النمو الخضري والزهري وانحناء عنق الزهرة بعد القطف في نبات الورد الشجيري *Rosa Hybrida*. صنف السلطاني. رسالة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة البصرة.
22. الدليمي , حيدر عريس عبد الرؤوف. (2005). تأثير بعض المغذيات وأوساط النمو وطريقه الزينة في إنتاج أزهار القرنفل. *Dianthus caryophyllus L.* رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة الكوفة. العراق.
23. عبود , بان محمد علي. (2005). تأثير وزن البصلة والتسميد الكيميائي وطريقة الزراعة في نمو وتزهير أبصال النرجس البري المخزونة في درجات حرارية مختلفة. أطروحة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة بغداد.

دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للسرطان باستخدام خطوط الخلايا السرطانية نوع RD, AMGM

سندس حميد أحمد(1)، ناهي يوسف (2)، محمد مؤيد(3)، فرح داود(4)

وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد / العراق (1) (3) (4)، المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الخلوية(2)

الملخص باللغة العربية

في دراستنا الحالية تم استخلاص وتنقية الليكوبين من متبقيات الطماطم (القشور) وبحصيلة عالية، فقد وجد عند اجراء دراسة مقارنة لتركيز الليكوبين في القشور، العصير وخليط الطماطم الكلي وجد ان القشور اعطت اعلى تركيز لصبغة الليكوبين مقارنة بالاجزاء الاخرى. وعند دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة ازالة الجذور الحرة المتولدة باستخدام مادة الـ DPPH وجد ان الليكوبين المنقى جزئيا من عصير الطماطم اعطى اعلى فعالية مقارنة بالليكوبين المنقى كليا ، كما اثبتت الدراسة ان الليكوبين المنقى جزئيا اعطى فعالية عالية في تثبيط الخلايا السرطانية نوع RD عندما استخدم بالتراكيز 67.5 و 125 و 250 و 500 مايكروغرام / مل في فترة حضانة 24 ساعة حيث تراوحت بين 34 و 90% وفي فترة حضانة 48 تراوحت بين 48 و 91% اما في فترة حضانة 72 فتراوحت بين 49 و 93 مقارنة بالنسبة المثوية للتثبيط في الخلايا السرطانية نوع AMGM اذ تراوحت في فترة حضانة 24 ساعة بين 44 و 69% وفي فترة حضانة 48 تراوحت بين 50 و 71% وفي فترة حضانة 72 تراوحت بين 61 و 72% باستخدام نفس تراكيز الليكوبين المذكورة.

ABSTRACT

In our current study lycopene was extracted and purified from tomato residues (Peel) in a high yield. The highest lycopene concentration was found in peel as compared to the other fractions. partial purified lycopene gave the highest activity against free radicals as compared to purified lycopene during the antioxidant activity test using DPPH. Our study approved that partial purified lycopene gave the highest inhibition activity against cancer cells type RD in the concentrations 67.5, 125, 250, 500 µg/min and incubation time 24 hr it gave inhibition between 34 ,90% and at 48hr it gave inhibition between 48,91% and at 72hr it gave inhibition between 49,93% as compared to cancer cells type AMGM which gave inhibition between 44,69% during incubation for 24hr and inhibition between 50,71% during incubation for 48hr and inhibition between 61,72% during incubation for 72hr using the same lycopene concentrations above.

المقدمة

اللامائية، وخط المستخلص جيداً لحين انفصاله الى طبقتين، فصلت طبقة الايثانول عن طبقة الاثيل اسيتيت واعد غسل طبقة الاثيل اسيتيت ثم تم تركيزه الى حجم 30 مل بدرجة حرارة 35م. تم تقدير تركيز الليكوبين باستعمال جهاز الامتصاص الضوئي على طول موجي 503 نانومتر.

اجراء عملية الصوبنة:

اتبعت طريقة (8) مع بعض التحوير لاجراء الصوبنة لازالة اللييدات، اذ يضاف 100 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 10% الى الليكوبين ويترك لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة الغرفة وبعدها يهمل الجزء المائي ويتم تجفيف الليكوبين بوجود كبريتات الصوديوم اللامائية بدرجة حرارة 30م ويعلق الليكوبين مرة اخرى بـ 1 مل من الاثيل اسيتيت والميثانول (50:50) حجم:حجم.

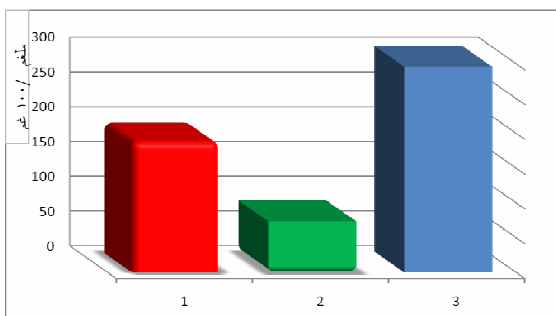
دراسة فعالية الليكوبين على خطوط الخلايا السرطانية:

حيث اتبعت طريقة (9) في دراسة التأثير القاتل للايكوبين على خطوط الخلايا السرطانية نوع RD, AMGM واحتسبت النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية وفقاً للمعادلة الآتية :

$$\% \text{cell inhibition} = 100 - \left\{ \frac{(At-Ab)}{(Ac-Ab)} \right\} \times 100$$

النتائج والمناقشة

وجد ان قشور الطماطم تحتوي على اعلى تركيز من الليكوبين مقارنة بالعصير والطماطم الكلية اذ كان تركيز الليكوبين 275 ملغم، 70 ملغم، 171 ملغم/100غم كما في الشكل رقم (1). وعند تشخيص الليكوبين المنقى مقارنة بالليكوبين القياسي لوحظ ان وقت الاحتجاز (RT) لليكوبين القياسي كان 11 دقيقة والليكوبين المنقى هو 11.2 دقيقة باستعمال جهاز الـ HPLC شكل (2)، وعند قراءة الطيف للأشعة فوق البنفسجية وعلى طول موجي (300-600 نانومتر) لوحظ ظهور ثلاث قمم القمة الاولى عند الطول الموجي 440 نانومتر والقمة الثانية عند الطول الموجي 460 نانومتر والقمة الثالثة عند 503 نانومتر وان معامل التحديد Coefficient determination هو 0.9 و 1.00 و 0.96 وهي مماثلة لقراءات الليكوبين القياسي شكل رقم (3). واعطت نتائج الكشف باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) شكل (4) حزمة واحدة لليكوبين المنقى مقارنة بالليكوبين القياسي.



شكل (1) تركيز الليكوبين في الطماطم والقشور والعصير: 1- الطماطم كاملة 2- عصير الطماطم 3- قشور الطماطم

تعتبر الطماطم واحدة من الخضروات الأساسية لصحة الإنسان ومن أهم مكوناتها مادة الليكوبين Lycopene والليكوبين هي الصبغة الحمراء الطبيعية التي تتكون في ثمار الطماطم الناضجة وهي عبارة عن كاروتينويد Carotenoid يتواجد في سيتوبلازم خلايا الثمار مصاحبة لتراكيب الغشاء الخلوي. يتواجد الليكوبين أيضاً في خلايا جسم الإنسان ومصل الدم. يتواجد الليكوبين في الطماطم بنسبة 15% منه بصورة Cis – lycopene بينما أساس تواجده يكون بصورة Trans- Lycopene في الطماطم وبنسبة 79 – 91% من إجمالي الكاروتينويدات المستخلصة. ويعد الليكوبين من مضادات الأكسدة القوية ويلعب دوراً هاماً في حماية الأنسجة من الأكسدة بالجذور الحرة التي تتكون مع عمليات التمثيل الغذائي. وقد ثبت حديثاً ان لليكوبين علاقة بخفض نسبة الإصابة بالعديد من الأمراض المزمنة. (3,2). فقد أكدت الأبحاث العلمية بالولايات المتحدة ان الليكوبين يحمي غده البروستاتا من الإصابة بالسرطان حيث وجد أن الرجل الذي يحصل على 6.5 ملليجرام ليكوبين أو أكثر يومياً تقل فرصة إصابته بالمرض بنسبة 21% مقارنة بالذين يحصلون على قدر أقل منه. كما أكدت الدراسة أيضاً أن من يأكل عشرة وجبات أسبوعياً بأغذية تحتوي على الطماطم أو منتجاتها يقل تعرضهم للإصابة بسرطان البروستاتا بنسبة 35% (4 و 5). وتأييداً لذلك فقد وجد أن مستوى الليكوبين في الدم يكون منخفضاً بدرجة كبيرة في المصابين وأنه يتفوق على باقي الكاروتينويدات في تثبيط نمو الخلايا السرطانية في الإنسان. وفي دراسة أخرى وجد أن أكثر من 25% من راغبي تناول الطماطم ومنتجاتها تقل فرصة تعرضهم لسرطان الفم الهضمية وبنسبة تتراوح من 30 – 60% مقارنة بمن لا يأكلونها. كما وجد أيضاً ان 75% من النساء من أكلة الطماطم تقل إصابتهن بسرطان عنق الرحم بنسبة 3.5-4.7 مرة مقارنة بمن لا يداومون على أكلها. إضافة إلى ذلك فقد أشارت دراسات أخرى ان العلاقة إيجابية بين تناول أغذية غنية بالليكوبين والحماية من سرطان الثدي وأن ارتفاع نسبته في الدم يحمي الإنث من الإصابة بهذا المرض (6 و 7).

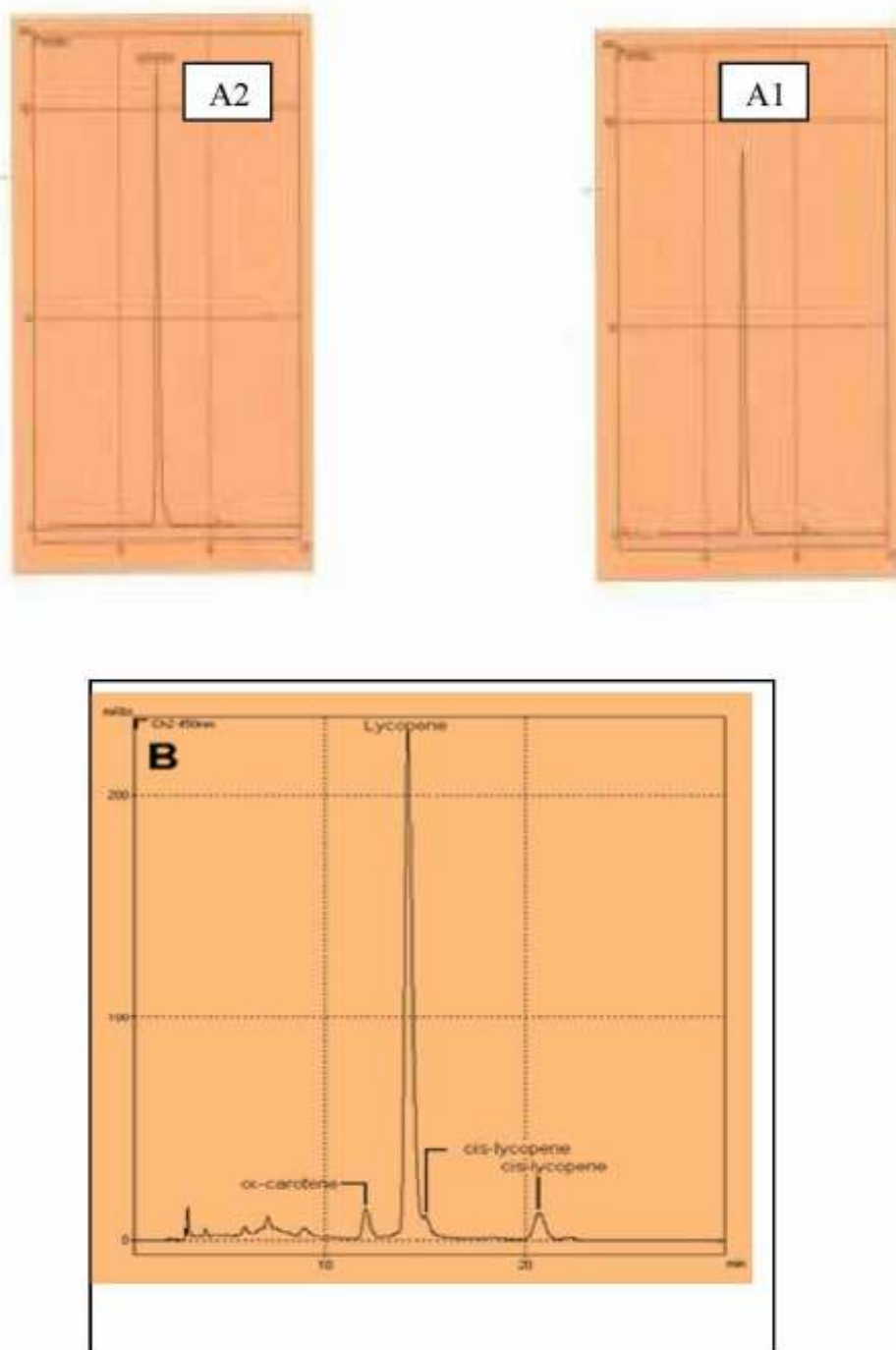
الهدف من الدراسة

دراسة فعالية الليكوبين المضادة للاكسدة والمضادة للخلايا السرطانية.

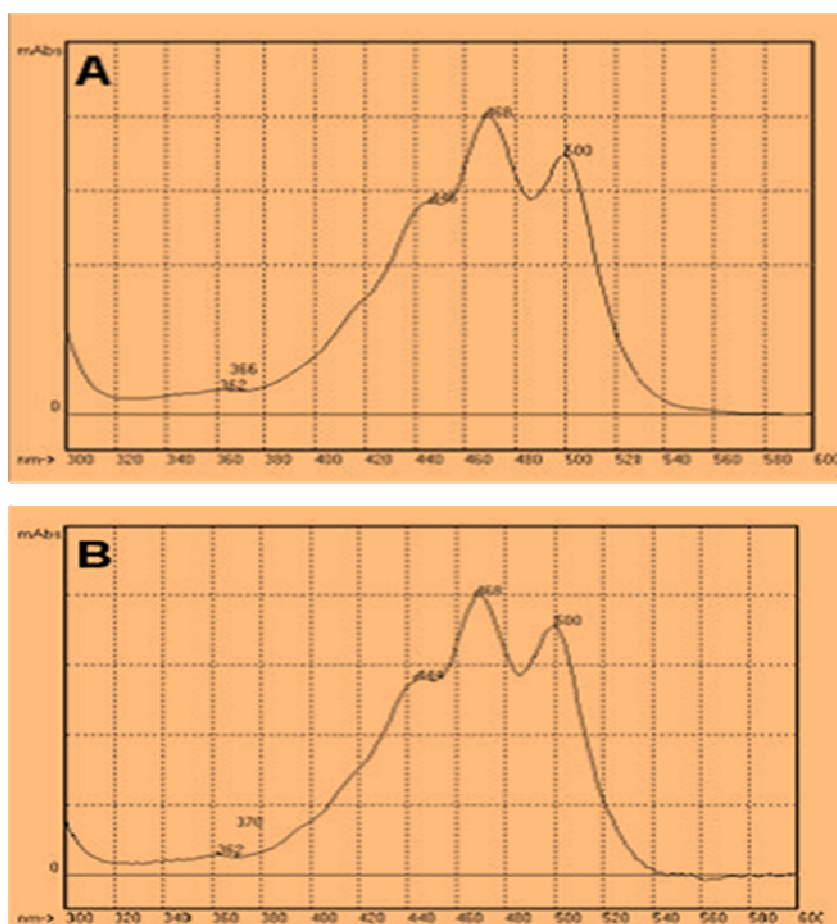
المواد وطرائق العمل

استخلاص الليكوبين:

اتبعت طريقة (3) مع بعض التحوير للحصول على مستخلص الليكوبين النقي جزئياً من الطماطم، اذ تم تقسيم مقدار 300غم من الطماطم الى ثلاث اجزاء وكل جزء بوزن 100غم، الجزء الاول هرس الطماطم بالكامل، الجزء الثاني جمع العصير فقط والجزء الاخير اخذت القشور فقط. وتم معاملة الاجزاء بخليط المذيبين العضويين اثيل اسيتيت:ايثانول بنسبة 1:2 وتم خلطهما جيداً باستعمال خلاط (Vortex) مع اضافة المذيبات العضوية على دفعات وفي درجة حرارة المختبر الى ان اصبحت القشور عديمة اللون واذيف 5% من محلول كبريتات الصوديوم



شكل (2) تشخيص الليكوبين باستخدام تقنية الـ HPLC وتحت ظروف
 يبين فيه قراءة الطيف للأشعة فوق البنفسجية (300-600) نانوميتر عمود الهلام المستخدم C18 Vydac 218TP54 column 250
 ، $4.6 \text{ mm} \times$ الطور الثابت 100% ميثانول وبسرعة جريان 1 مل لكل دقيقة
 A1 - يبين فيه تشخيص الليكوبين القياسي
 A2 - يبين فيه تشخيص الليكوبين المنقى
 B - الليكوبين المنقى جزئيا



شكل رقم (3) يبين فيه قراءة الطيف للأشعة فوق البنفسجية (300-600) نانوميتر

A الليكوبين القياسي

B الليكوبين المنقى جزئياً

الطماطم كما يبين جدول (2) قابلية الليكوبين في إزالة الجذور الحرة المتولدة بوجود الـ DPPH بواسطة الليكوبين المنقى جزئياً والنقي وعصير الطماطم.

يبين جدول رقم (1) الكشف السريع عن إزالة الجذور الحرة اذ وجد ان الليكوبين المنقى جزئياً ذو فعالية عالية جداً في إزالة الجذور الحرة بلبه الليكوبين النقي واخيراً عصير

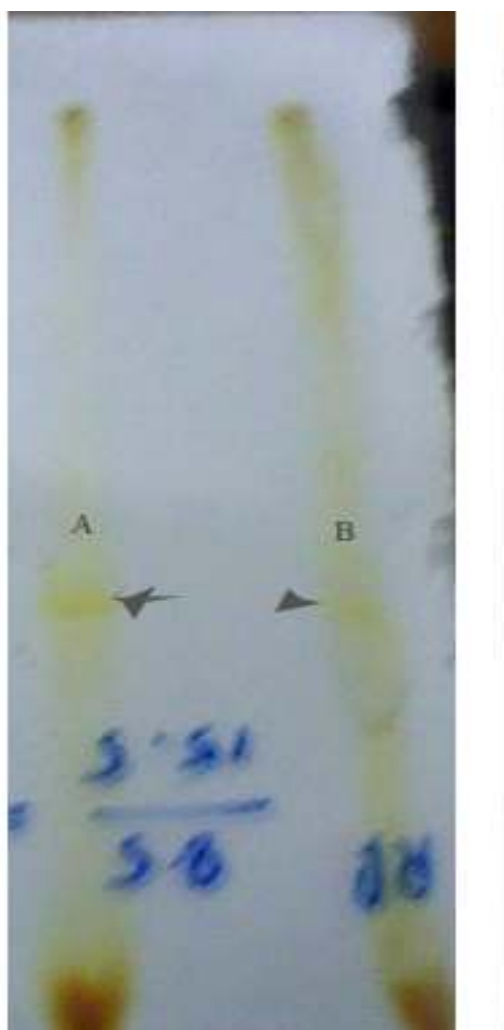
جدول رقم (1) الكشف السريع عن إزالة الجذور الحرة

النموذج	سرعة ظهور البقعة	كثافة البقعة
الليكوبين المنقى جزئياً الليكوبين النقي عصير الطماطم	أكثر سرعة سريع بطيء	+++ ++ +

+++ = ظهور البقعة لحظة الكشف

++ = ظهور البقعة بعد مرور 15 دقيقة من اجراء الكشف

+ = بطيء بعد مرور 20 دقيقة



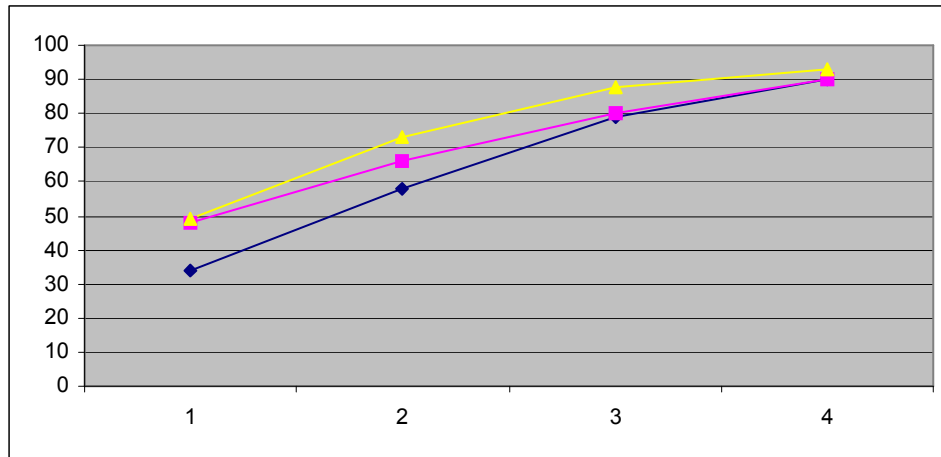
شكل (4) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):
A- الليكوبين القياسي B- الليكوبين المنقى

جدول (2) يبين فعالية الليكوبين في إزالة الجذور الحرة المتكونة بواسطة الـ DPPH

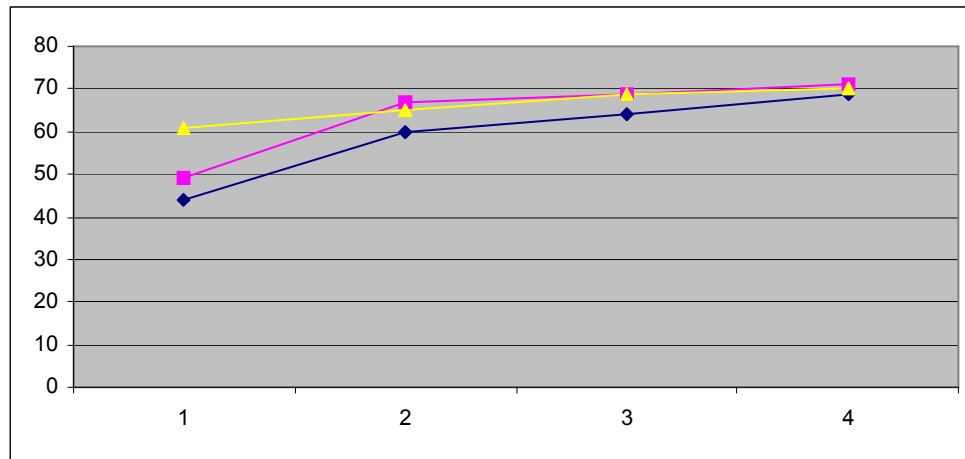
النماذج	تركيز ميكروغرام / مل	% لإزالة الجذور الحرة للـ DPPH	التركيز الذي يحدث 50% تثبيط للجذور الحرة للـ DPPH
الليكوبين المنقى جزئيا	1000	98.3±0.12a	0.6a
	500	85±0.21b	
	250	70.33± 0.22c	
	125	65.7± 0.03d	
الليكوبين النقي	1000	80.65 ± 0.37a	1.3b
	500	73.33 ± 0.01b	
	250	62 ± 0.74 c	
	125	51.60± 0.33d	
عصير الطماطم	1000	61.70 ± 0.32a	7.1c
	500	44.16 ± 0. 33b	
	250	30.54 ± 0.11c	
	125	20.50 ± 0.32d	

49 و 73 و 88 و 93 وكما مبين في الشكل (5) . اما النسبة المئوية للتنشيط في الخلايا السرطانية نوع AMGM كانت كالآتي في فترة حضانة 24 ساعة كانت 44 و 60 و 64 و 69% وفي فترة حضانة 48 كانت 50 و 67 و 69 و 71% وفي فترة حضانة 72 كانت النسبة المئوية للتنشيط 61 و 65 و 69 و 72% كما في الشكل (6).

تم اختبار الليكوبين المنقى جزئياً لفعاليته العالية المضادة للاكسدة مقارنة بالمستخلصات الاخرى لاجراء دراسة فعاليته في تنشيط الخلايا السرطانية لنوع RD, AMGM وبينت النتائج ان تنشيط الخلايا السرطانية نوع RD في التراكيز 67.5 و 125 و 250 و 500 مايكروغرام / مل عند فترة حضانة 24 ساعة كانت 34 و 58 و 79 و 90% وعند فترة حضانة 48 ساعة كان التنشيط 48 و 66 و 80 و 90 % وبفترة حضانة 72 ساعة كان التنشيط



شكل (5) يبين فيه فعالية الليكوبين في تنشيط الخلايا السرطانية على ثلاثة خطوط من الخلايا السرطانية RD



شكل (6) يبين فيه فعالية الليكوبين في تنشيط الخلايا السرطانية على ثلاثة خطوط من الخلايا السرطانية AMGM

المصادر

1. European Commission. (1994). European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. Off. J. the Europ. Commun. L 237: 13-29.
2. European Food Safety Authority (EFSA). (2008). Safety of lycopene oleoresin from tomatoes. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. EFSA J. 675: 1-22.
3. Ishida BK., Ma J., and Chan B. (2001). A simple, rapid method for HPLC analysis of lycopene isomers. Phytochem. Anal. 12:194-198.
4. FAO/WHO. (1965). Specification for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: food colours and some antimicrobials and antioxidants (Eighth report on the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 309).
5. FAO/WHO. (1975). Evaluation of certain food additives (Eighteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 557).
6. FAO/WHO. (1978). Evaluation of certain food additives (Twenty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 617).
7. FAO/WHO. (2006). Evaluation of certain food additives (Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 940).
8. Lee MT., and Chen BH. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. Food Chem. 78: 425-432.
9. Heny E., Eka P., and Undri R. (2011). The activity fraction from *Nigella sativa* and its activity against T47D cell line. Indo. J. :11 222-217
10. Xianquan S., Shi J., Kakuda, Y., and Yueming J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage. J. Med. Food. 8: 413-422.

نلاحظ من الشكل رقم (1) ان قشور الطماطم تحتوي على اعلى تركيز من الليكوبين مقارنة بالعصير والطماطم الكلية وان ذلك يتفق مع ماتوصل اليه (11)، اذ وجدوا ان القشور واللبن تحتوي على اعلى تركيز من الليكوبين مقارنة بالعصير والطماطم الكاملة.

كما نلاحظ من الشكل رقم (3) ظهور حزمة واحدة عند الترحيل في هلام السليكا مقارنة بالليكوبين القياسي وهذا يتفق مع ما توصل اليه (12،3) اذ اعطت نتائج فحص قراءات الطيف للأشعة فوق البنفسجية وعلى طول موجي (300-600 نانوميتر) لليكوبين المنقى من الكريب فروت ذو اللون الوردي ومن الطماطم نفس القمم التي قد تم الحصول عليها في دراستنا، واعطت نتائج الكشف باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) حزمة واحدة لليكوبين المنقى مقارنة بالليكوبين القياسي كما في الشكل رقم (4)، وعند احتساب معامل الترحيل (R_f) وجد انه 0.52 مطابق لحزمة الليكوبين القياسي وهذا يتفق مع ما توصل اليه (14) اذ وجد عند ترحيل الليكوبين المنقى من البطيخ الاحمر ومن الطماطم اعطى نفس قيمة (R_f) المذكورة.

و نلاحظ من الجدول (2) ان الليكوبين المنقى جزئيا اعطى فعالية عالية مضادة للاكسدة يليه الليكوبين النقي واخيرا عصير الطماطم وذلك لامتلاك الليكوبين عدد كبير من الاواصر المزوجة والتي لها القدرة على اقتناص جذور الاوكسجين المتولدة اذ يعمل الليكوبين على تثبيط تأكسد الدهون الغير مشبعة (18).

اما الشكلين رقم (5) و(6) فنلاحظ ان تثبيط الخلايا السرطانية نوع RD كان اعلى مقارنة بالتثبيط الحاصل للخلايا السرطانية نوع AMGM وتحت نفس الظروف من حيث التراكيز وفترات الحضان وهذا يتفق مع ما توصل اليه (19) اذ وجد ان الليكوبين اعطى فعالية عالية في تثبيط الخلايا السرطانية للبروستات وانواع اخرى من الخلايا السرطانية.

ان الليكوبين يوجد في الطماطم، البطيخ الاحمر والكريب فروت الوردي وله دور فعال في خفض نسبة الامراض المتولدة عن زيادة الضغط التأكسدي في الجسم نتيجة لارتفاع نسبة الجذور الحرة في جسم الانسان وله فوائد لصحة الجهاز الهضمي وامراض السرطان المختلفة (15،16،17).

نستنتج من هذه الدراسة بأنه قد تم التوصل الى طريقة ذات جدوى اقتصادية لكونه يمكن الاستفادة من متبقيات الطماطم في انتاج الليكوبين المنقى كليا والمنقى جزئيا بحصيلة عالية مقارنة لما قد ثبت في الدراسات السابقة ولاهيمته الطبية تم استكمال دراستنا في دراسة فعالية الليكوبين كمادة مضادة للاكسدة ووجد انها فعالة جدا في ازالة الاضرار الناتجة عن الجذور الحرة وذلك يعود لاحتواء تركيبه الكيميائي على عدد كبير جدا من الاواصر المزوجة وبذا سوف يكون هذا البحث ذا جدوى في اعادة تدوير متبقيات الطماطم لانتاج مادة فعالة مهمة للوقاية من السرطانات والامراض المزمنة الاخرى بالإضافة الى خفض الكوليسترول وحماية الكبد والقلب من الضغط التأكسدي الذي يتولد عن وجود الجذور الحرة في جسم الانسان.

11. Yang K., Lule U., and Xiao-Lin D. (2006). Lycopene: Its properties and relationship to human health. *Food Rev. Int.* 22:309–333
12. Davies BH. (1976). Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T. W. Goodwin, Ed.), Academic Press, London. 2: 38-165.
13. Di Mascio P., Kaiser S., and Sies H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274:532-538.
14. Gerster HY. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 16:109-126. Handelman, G. J. 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nut.* 17:818-822.
15. Krinsky NI. (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66:1003-1010.
16. Nassar NMA, Vizzotto CS., Silva HL., Schvartz CA., and Pires Junior OR. (2005). Potentiality of cassava cultivars as a source of carotenoids. *J. Food & Agric. Env.* 3:33-35.
17. Palozza P, and Krinsky NI. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Meth. Enzymol.* 213:403-420.
18. Stahl W. (1998). Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218:121-124.
19. Wilson AP. (2000). *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 3rd ed, Oxford University Press: Oxford.