

# IJST

## INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

---

Vol. (8) No. (3) SEPTEMBER 2013

---

ISSN: 2305-9346

[www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

# IJST International Journal for Sciences & Technology

**I**nternational **J**ournal for **S**ciences and **T**echnology

المجلة الدولية للعلوم والتقولوجيا

---

**Volume 8. No. 3/ September 2013 / 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](mailto:info@ijst-jo.com) / [ijst.jordan@yahoo.com](mailto:ijst.jordan@yahoo.com)  
URL: [www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

---

## EDITORIAL BOARD - 2013

---

**Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.**

**(Editor-in- Chief)**

Professor of Microbiology / Faculty of Pharmacy / Royal University for Medical Sciences (RUMS) / 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*

**Abdullah, Ahmed R.**

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

**Al – Banna , Anton S. A**

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

**Al- Dabbagh, Riadh H.**

Professor of Engineering Hydrology/ UAE  
*riadhdabbagh@yahoo.com*

**Al- Daraji, Hazim J.**

Professor of Avian Reproduction and Physiology / Animal Resources Dept./ College of Agriculture / Baghdad University / Iraq  
*prof.hazimaldaraji@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- Noor, Taghreed H.**

PhD in Chemistry / Dept. of Chemistry / College of Education – Ibn Al- Haitham / Baghdad University / Iraq  
*drtaghreed2@gmail.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*

**Khamas, Wael**

Professor of Anatomy and Histology / College of Vateriaary Medicine / Western University of Health Sciences / Ponomia -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**

**Pharmacist. Nansi Elian**

Amman- Jordan  
*ijst.jordan@yahoo.com*

---

## FORWARD

---

*IJST is coming for you all today in its recent issue of volume eight for year 2013, as our deep belief in continuing the steps we began since eight years ago.*

*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 8, No. 3 (2013), the third issue of this year, with diversity of researches and elite experts of the Editorial Board and Advisory Group. The current issue comes to you while the Islamic World is celebrating Eid Al- Adha , which gives me an opportunity to send you all my deep wishes and faithful prays to Allah for peaceful times.*

*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 had the honor to welcome a new editorial board member , **Associated Professor. Taghreed Al-Noor**, with all our deep appreciation and thanks for her valuable efforts in supporting the journal.*

*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 special thanking to the Editorial Board Secretary for her faithful efforts in 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, Royal University for Medical Sciences (RUMS). Jordan*

**Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shebani**

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

**Prof. Ahmed M. Abdul-Lettif**

*College of Sciences, University of Karbala. Iraq*

**Prof. Bashar R. Al- Shreidah**

*National Centre for Agricultural Researches . Jordan*

**Dr. Dawood S. Al- Azzawi**

*College of Pediatrics, Diyala University. Iraq*

**Dr. Harith F. Al- Mathkhouri**

*College of Sciences, Baghdad University. Iraq*

**Prof. Jamal A. Abbas**

*Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq*

**Dr. Khalid Al- Azzawi**

*Faculty of Pharmacy, Al- 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*

**Dr. Ramadhan H. Mohammed**

*College of Sciences , Duhok University . Iraq*

**Dr. Taghreed H. Al- Noor**

*College of Education for Pure Sciences, Ibn Al- Haitham , Baghdad University . Iraq*

**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:**
**CHEMISTRY**

- Synthesis and characterization of some new compounds derivatives from para-amino benzoic acid** ..... 6-11  
*Ismaeel Y. Majeed, Duhaa AL-Saady & Shaimaa A. Saoud*

**ENVIRONMENTAL SCIENCES**

- Evaluation of some limiting factors affecting the hygienic standards of water chlorination (Tap and Trough's Water) of Animal farm /Veterinary Medicine College - Baghdad University** ..... 12-17  
*Dergham H.Y.AL-Zwean*
- Heavy metal contamination in canned fish marketed in Baghdad** .....18-22  
*Salim S. Al- Timimi, Sundus H. Ahmed, Salwa Khudadat, & Qais Assi*

**GENOMIC**

- Mitochondrial Genome Variation within Iraqi Population** .....23-27  
*Basheer I. Azzawi, Abdulrahman A. Oleiwi, Majida J. Darweesh, Said Jaradat, & Ali Al-Zaag*

**MEDICAL SCIENCES**

- Cardiac complications in the Kurdish Infants of Diabetic Mothers in Duhok** .....28-31  
*Akrem M. Atrushi*
- Demographic study on rheumatoid arthritis (RA) in Babylon-Iraq** .....32-39  
*Amina N. Al-Thwani & Ibtisam A. I. El-Baghdady*
- Molecular Subtypes of Breast Carcinoma Using Immunohistochemical Stains in Central Public Health Labs.**.....40-50.  
*Anwar I. S. Al- Assaf, Rana Z. Naji, & Ali H.M. Al- Khafagi*
- Post-Injection Sciatic Nerve Injury in Duhok**.....51-55  
*Nadir A. Garjees*

## (II) قسم الدراسات والبحوث العربية – ARABIC SECTION

## تكنولوجيا الغذاء

- إعادة استخدام المياه العادمة لصناعات الألبان باستخدام التقنيات الحديثة.....63-57  
أسامة جورج أمين، أزهار قيس كيضان، ابتهاج عبد الجبار عبد القادر، أحمد سالم حمد، إلهام مجيد خورشيد،  
لمياء سلمان رشيد، سندس فؤاد أحمد، أحمد خلف حردان، صلاح عبد المحسن رحيم، هشام حميد علوان

- دراسة العلاقة بين تفضيل المستهلك والتحليل المختبري لأنواع شائعة من معجون الطماطم  
في مدينة بغداد.....68-64  
مريم مال الله غزال، علياء سعد الحافظ

## العلوم الزراعية

- تأثير التداخل بين الري بالماء الممغنط والتسميد في نمو نبات الميرمية *Salvia officinalis*  
وتركيز المادة الفعالة ( الثيوجين Thujone ).....78-69  
حسين محمود شكري

- تأثير الحامض العضوي Humic acid في بعض مؤشرات النمو الخضري لفسائل نخيل التمر  
*Phoenix dactylifera* L. المروية بمياه الآبار.....83-79  
جمال أحمد عباس، رعد طه بلاكت، علي حيدر عريان

## الوراثة الجينية

- دراسة العلاقة الوراثية لكل من عزلات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli*  
المعزولة من حالات من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية باستخدام تقنية تباينات اطوال القطع  
المتضخمة من الحمض النووي DNA (AFLP).....94-84  
أياد محمد علي العبيدي، مثنى بديع فرحان، علي صالح الجبوري، عقيل حسين علي

## ***ENGLISH SECTION***



## Synthesis and characterization of some new compounds derivatives from para-amino benzoic acid

Ismaeel Y. Majeed, Duhaa AL-Saady & Shaimaa A. Saoud

Dept. of Chemistry/ College of Education – Ibn Al- Haitham / Baghdad University/ Republic of Iraq

### ABSTRACT

The newly compounds containing 1,3-oxazepine and 1,3-thiazepinedioxide derivatives were synthesized by reaction of compounds containing imine group with maleic or phthalic anhydride and orthosulphobenzoic acid cyclic anhydride respectively in dry benzene to give compounds [1-5]. The other compound (oxo-Thiazolidine) [6] was synthesized by reaction of imine group with thioglycolic acid. Tetrazole derivative was synthesized by reaction of imine group with sodium azide to give compound [7]. Finally compound [1] was converted to ester compound by reaction with ethylchloroacetate in the presence of potassium carbonate and dry acetone, then, the compound [8] was reacted with hydrazine hydrate to give compound (9). The hydrazide derivative [9] was cyclized by KOH and CS<sub>2</sub> to give Oxadiazole derivative [10].

All these synthesized compounds have been characterized by melting points, elemental analysis, FTIR and HMNR spectroscopy.

**Keywords:** 1,3-Oxazepine, 1,3-Thiazepinedioxide, Thiozolidine-one, tetrazole, Oxadiazole.

### الملخص باللغة العربية

تم تحضير المركبات 1,3-او كسابرين و 1,3-ثيازابرين ثنائي الاوكسجين من خلال تفاعل المركبات الحاوية على مجموعة الامين مع الانهريدات الحلقية (الماليك، القتالك، الاورثوسلفونزويك انهريد) باستعمال البنزين الجاف كمذيب لتعطي المركبات (1-5). المركب الآخر الذي حضر هو مشتق الثيازابولدين (6) الذي حضر بمفاعلة مركب الشف مع حامض الثياكلايكولك، اما مشتق التيترازول فقد حضر من تفاعل مشتق قاعدة الشف مع ازيد الصوديوم لينتج مركب (7). اخيرا تم مفاعلة المركب (1) مع خلاص الاثيل كلوريد لينتج مشتق الاستر (8) الذي تم مفاعله مع الهيدرازين المائي الذي اعطى مركب (9) وهو مشتق الهيدرازيد الذي تم اجراء الغلق الحلقى له من خلال استعمال هيدروكسيد البوتاسيوم وثنائي كبريتيد الكربون حيث أنتج مشتق حلقة الاوكسادايازول (10). تم تشخيص جميع المركبات الناتجة باستخدام بعض الطرق الطيفية والفيزيائية.

## INTRODUCTION

Heterocyclic compounds (oxazepine, thiazepine, tetrazole, and thiazolidine) four-five-seven membered rings have occupied an important place in the field of pharmaceuticals and industries(1).

Oxazepine derivative (Oxazepam) is used as an antibiotic, enzyme inhibitor, pharmacological interest (2), and has a biological activity(3). It is used in relief of the psychoneuroses characterized by anxiety and tension(4).

Seven-membered ring analogous benzothiazepine derivatives exhibit diverse biological activities as vasodilatory (5), tranquilizer (6), antidepressant (7), CNS stimulant (8), antihypertensive (9), calcium channel blocker(10), antifungal (11) anti cancer(12), and inhibitors of enzymes(13). Thiazepine is one of hetrocyclic compound contains two heteroatoms (nitrogen and sulphur) in seven-membered ring.

Oxo-Thiazolidine ring system derives special important from the fact that it plays an important role in medicinal chemistry. Substituted thiazolidine derivatives represent important key intermediates for synthesis of pharmacologically active drug thiazolidinone has wide range biological activities such as antifungal (14), antiproliferative(15), anti-inflammatory(16), herbicidal (17), and antiviral properties(18).

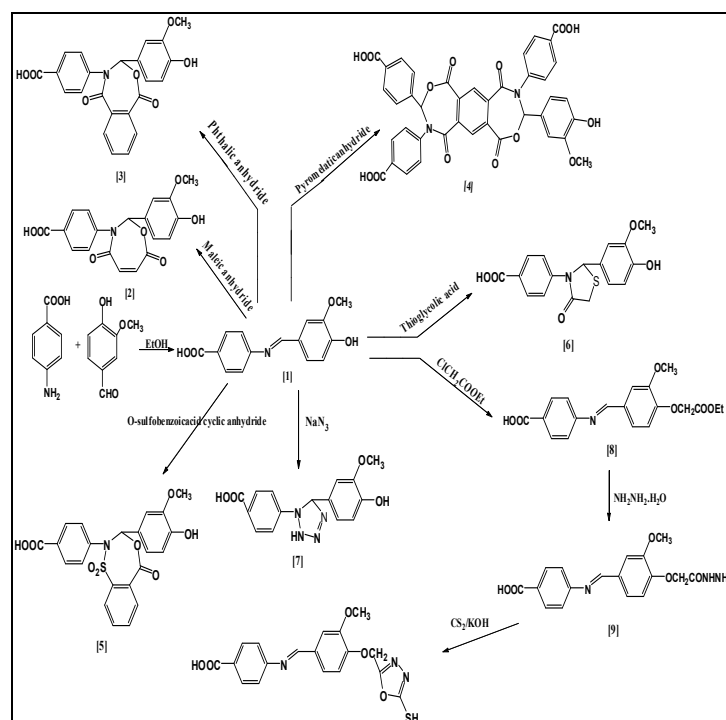
## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Chemicals, solvents were of analytical grade (supplied by either Merck or Fluka, Aldrich) received. All melting points were recorded using open capillary tube and uncorrected. Fouriertransform Infrared spectra were recorded in KBr disc on Shimadzu 8300 spectrophotometer.  $^1\text{H}$  NMR spectra were measured in DMSO solutions on a Bruker Av spectrophotometer (300 MHz) using TMS as an internal reference (chemicals) shifts in  $\delta$  ppm). All synthesized compounds were elemental analysis C, H, N and S on a European Elemental analyzer. Thin layer chromatography was performed on silica gel as a stationary phase, ethyl acetate as eluent.

### Synthesis procedure

The synthetic route of compounds is presented in scheme (1).



Scheme (1): The synthesis route of compounds (1-10)

### Synthesis of 4-(4-hydroxy-3-methoxybenzylideneamino) benzoic acid[1]

A solution of the p-amino benzoic acid (0.01 mol) in absolute ethanol (30 ml) was slowly added to a solution of the aldehyde (0.01 mol) in absolute ethanol (20 ml). The stirred reaction mixture was refluxed for 4hrs. After cooling, a precipitate was formed which collected by filtration then washed with cold ethanol and recrystallized from ethanol, Yield (90%), m.p.=(160-162) $^{\circ}\text{C}$ .

### Synthesis of Oxazepine [2,3,4]

A mixture of Schiff base (0.01 mol) with (0.01 mol) of maleic, phthalic, (0.02mol) of Schiff base with (0.01mol) of pyromellitic anhydride were dissolved in (10 ml) of dry benzene and refluxed in a water bath for 4 hrs. Then solvent was removed and the resulting crystalline solid was recrystallized from dioxan to give the titled compounds (2) Yield (83%), m.p.=(179) $^{\circ}\text{C}$ .

**(Z)-4-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,7-dioxo-1,3-oxazepin-3(2H,4H,7H)-yl)benzoic acid**

FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3460 and 3363(OH) 3080-3075 (C-H Aromatic), 2895-2899(C-H Aliphatic), 1695(C=O), 1670(C=O), 1660(C=O), 1566(C=C);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.98(s, 1H, OH, carboxylic), 9.01(s, 1H, OH), 8.4(s, 1H, in oxazepine ring)(19), 7.2-7.09(m, 7H, ArH), 3.8(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_7$ : C, 61.79; H, 4.09; N, 3.79. found: C, 61.88; H, 4.17; N, 3.87.

**Synthesis of 4-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,5-dioxobenzo[e][1,3]oxazepin-4(1H,3H,5H)-yl)benzoic acid**

Yield : (86%) m.p=(159) $^{\circ}\text{C}$  FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3502 and 3361(OH) 3070-3080 (C-H Aromatic), 2886-2889(C-H Aliphatic), 1717(C=O), 1683(C=O), 1665(C=O), 1594(C=C);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.88(s, 1H, OH, carboxylic), 9.71(s, 1H, OH), 8.35(s, 1H, in oxazepine ring), 7.3-7.12(m, 11H, ArH), 3.91(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{NO}_7$ : C, 65.87; H, 4.09; N, 3.34. found: C, 66.07; H, 4.13; N, 3.41.

**Synthesis of bis [4-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,5-dioxobenzo[e][1,3]oxazepin-4(1H,3H,5H)-yl)benzoic acid]**

Yield (85%) m.p=(300) $^{\circ}\text{C}$ . FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3499 and 3370(OH) 3091-3085 (C-H Aromatic), 2897-2887(C-H Aliphatic), 1714(C=O), 1676(C=O), 1669(C=O), 1577(C=C);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.80(s, 1H, 2OH, carboxylic), 9.65(s, 1H, 2OH), 8.31(s, 1H, in oxazepine ring), 7.13-7.11(m, 16H, ArH), 3.84(s, 3H, 2 $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{14}$ : C, 63.16; H, 3.71; N, 3.68. found: C, 63.89; H, 3.65; N, 3.70.

**Synthesis of Thiazepine dioxide derivative**

The orthosulfobenzoic acid cyclic anhydride (0.01 mol) was dissolved in a small amount of dry benzene for 30 min, schiff base (0.01 mol) in (10 ml) of dry benzene was added with a few drops of tetra hydro furan (THF) the mixture was refluxed in a water bath for (5-6) hrs. until the colour was converted. The mixture was cooled at room temperature. the precipitate was collected by filtration and washed with cold dry benzene, recrystallized from benzene (5) m.p= (230) $^{\circ}\text{C}$ , Yield 81%.

FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3499 and 3361(OH) 3090-3086 (C-H Aromatic), 2875-2874(C-H Aliphatic), 1701(C=O), 1653(C=O), 1589(C=C), 1140 and 1367( $\text{SO}_2$ );  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.95(s, 1H, OH, carboxylic), 9.67(s, 1H, OH), 8.26(s, 1H, in thiazepine ring), 7.6-7.31(m, 11H, ArH), 3.88(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_8\text{S}$ : C, 58.02; H, 3.76; N, 3.08; S, 7.04; found: C, 59.00; H, 3.79; N, 3.11; S, 7.11.

**Synthesis of 4-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxothiazolidin-3-yl)benzoic acid**

The compound (1) (0.01 mol) and thioglycolic acid (0.01 mol) in ethanol (50 ml) in the presence of  $\text{ZnCl}_2$  were allowed to react at room temperature.

The reaction mixture was first stirred on a magnetic stirrer for about 2.30 hrs. followed by reflux on a steam bath for about 5.0 hrs. the product was filtered and cooled at room temperature, m.p= (239) $^{\circ}\text{C}$ , Yield 75%. FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3498 and 3369(OH) 3087-3069 (C-H Aromatic), 2872 (C-H Aliphatic), 1701(C=O), 1657 (C=O), 1593(C=C);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.81(s, 1H, OH, carboxylic), 9.76(s, 1H, OH), 7.45-7.22(m, 7H, ArH), 5.26(s, 2H, in thiazolidine ring) 3.79(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$ : C, 59.12; H, 4.38; N, 4.06; S, 9.28. found: C, 59.32; H, 4.45; N, 4.13; S, 9.30.

**Synthesis of 4-(5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,5-dihydro-1H-tetrazol-1-yl)benzoic acid**

Sodium azide (0.01 mol) in (10 ml) of dry benzene was added to a stirring solution of Schiff base (0.01 mol) in (10 ml) of dry benzene. The mixture was refluxed for (7-8 ) hrs. then cooled at d at room temperature. The precipitate was filtered and washed with coldwater, recrystallized from benzene-petroleum spirit (40-60), m.p= (164) $^{\circ}\text{C}$ , Yield 80%. FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3456 and 3398(OH) 3091 (C-H Aromatic), 2889 (C-H Aliphatic), 1701(C=O), 1589(C=C);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$  ppm 9.81(s, 1H, OH, carboxylic), 9.76(s, 1H, OH), 7.45-7.22(m, 7H, ArH), 5.06(s, 2H, in tetrazole ring) 3.83(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.03(s, 1H, NH) weak: Anal. Calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ : C, 57.32; H, 4.49; N, 17.83; found: C, 57.93; H, 4.53; N, 17.90.

### Synthesis of (Z)-4-(4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-methoxybenzylideneamino)benzoic acid

The previous compound (1) (0.01 mol) was stirred with an equivalent amount of potassium carbonate in (30 ml) of acetone and then ethylchloro acetate was added and refluxed for 3hrs. after completion of the reaction (T.L.C). The mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure to give compound (8), m.p= (95)°C, Yield 74%. FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3456 (OH, carboxylic) 3099 (C-H Aromatic), 2898 (C-H Aliphatic), 1730(C=O), 1701(C=O), 1587(C=C): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ : C, 63.86; H, 5.36; N, 3.92; found: C, 63.98; H, 5.30; N, 3.97

### Synthesis of (Z)-4-(4-(2-hydrazinyl-2-oxoethoxy)-3-methoxybenzylideneamino)benzoic acid

Hydrazide compound (9) was synthesized by addition of the hydrazine hydrate (80%) (0.01 mol) to compound (8) (0.01 mol) with stirring, then the absolute ethanol (10 ml) was added and refluxed until the precipitate formed 3 hrs. after cooling, the precipitate was filtered off and recrystallized from ethanol, m.p=(252)°C, Yield 60%. FT-IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3449 (OH, carboxylic) 3083 (C-H Aromatic), 2819 (C-H Aliphatic), 1701(C=O), 1625(C=O), 1587(C=C): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$ : C, 59.47; H, 4.99; N, 12.24; found, C, 59.98; H, 5.09; N, 12.43.

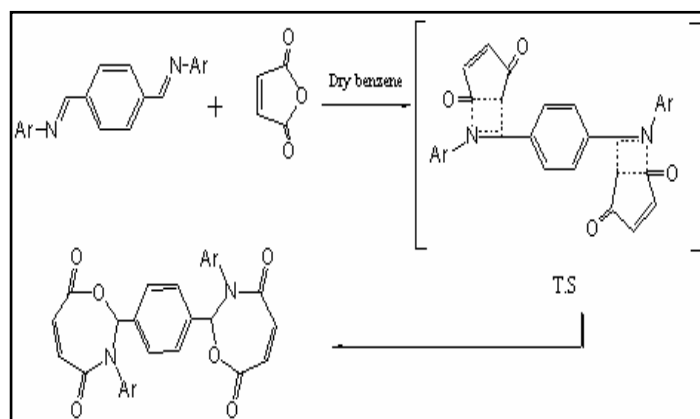
### Synthesis of (Z)-4-(4-((5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methoxy)-3-methoxybenzylideneamino)benzoic acid

This compound was synthesized by reaction of (0.01 mol)  $\text{CS}_2$  with hydrazide compound (9) (0.01 mol) in the presence of (0.01 mol) KOH in ethanol absolute (20 ml). The mixture was stirring at 0.5 hr. then refluxed for 4hrs., after cooling, the precipitate was filtered off and recrystallized from ethanol, m.p=(297)°C, Yield 59%. FT-IR(KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3456 (OH, carboxylic), 2890 (C-H Aliphatic), 2600(SH, w), 1701(C=O), 1635(C=N), 1576(C=C), 1047(C=S);  $^1\text{H NMR}$ (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ ppm 9.81(s, 1H, OH, carboxylic), 7.45-7.22(m, 7H, ArH), 3.83(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ): Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 56.10; H, 3.92; N, 10.90; S, 8.32; found: C, 56.45; H, 3.89; N, 11.09; S, 8.30

## RESULTS AND DISCUSSION

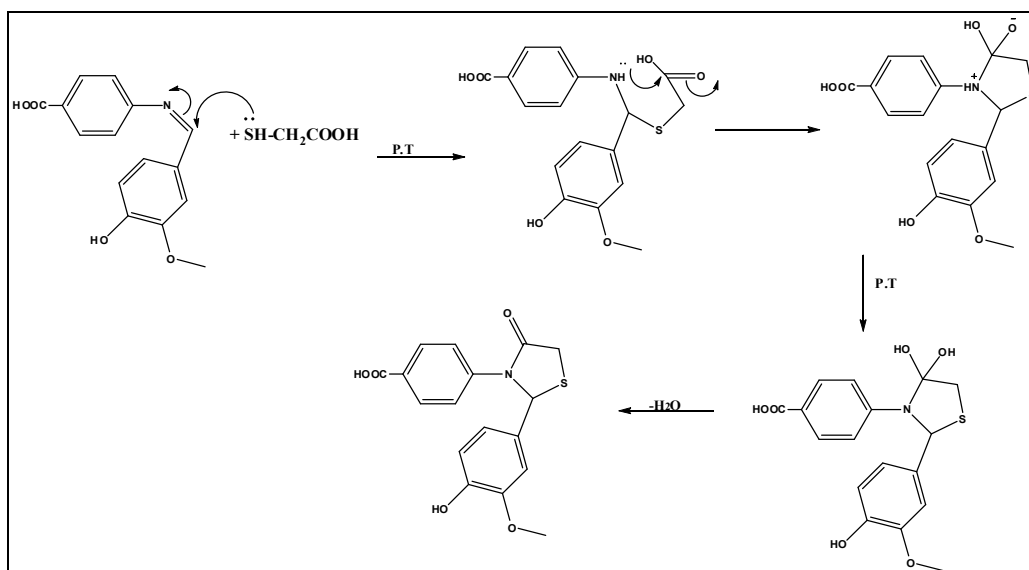
The reaction of aldehyde with primary amines is one of the most common reactions to synthesize Schiff base. Compound (1) was prepared from the condensation of p-aminobenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyde in ethanol with few drops of glacial acetic acid (GAA). Schiff base were identified melting point, (FT-IR) spectroscopy. The FT-IR spectra for Schiff base showed the appearance absorption band at  $1625 \text{ cm}^{-1}$  due to stretching vibration of the C=N for azomethine band besides the disappearance of the absorption band in the region (3290-3100)  $\text{cm}^{-1}$  due to symmetric and asymmetric stretching vibration of the ( $-\text{NH}_2$ ) group.

Seven membered rings were synthesized by cycloaddition of Schiff base. Cycloaddition reaction is classified as a 5+2, implying 5-atom component plus 2-atom component leading to 7-membered cyclic ring. The suggested mechanism for the formation of seven member ring derivatives as shown in scheme (2). The maleic anhydride may be replaced by phthalic or o-sulfobenzoic acid cyclic anhydrides but the same mechanism.



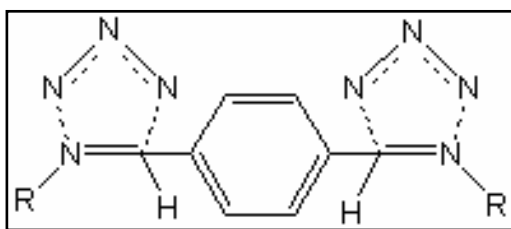
Scheme(2): mechanism for synthesis of seven membered ring (2-5)

The thiazolidinone (6) was obtained by refluxing equimolar amounts from imine (1) and thioglycolic acid in dry benzene. The suggested mechanism for the formation of thiazolidinone derivative (6) as following scheme(3).



**Scheme (3): mechanism for the Synthesis of thiazolidinone ring (6)**

Tetrazole is a five membered ring was prepared from the reaction of Schiff base [1] with sodium azide give compound[6]. The mechanism of the reaction systematically investigated as [3+2] cycloadditions which christened as 1,3-dipolar cycloadditions. The common features of this type of reactions is best accommodated by a transition state geometry between imine group with 1,3-dipolar of azide compound in scheme (4).



**Scheme (4): approximate transition state geometry for azide addition to Schiff base**

Substitution of oxadiazoles had attracted considerable interest owing their wide spectrum biological activity. Oxadiazole is a five membered ring containing oxygen and two atoms of nitrogen. compound [10] was prepared by the condensation of compound [1] with ethylchloroacetate with potassium carbonate in dry acetone to converted the(OH) phenolic group to ester compound[9], compound [9] was reacted with carbon disulfide with KOH give oxadiazole derivative [10].

## REFERENCES

1. Eicher T. and Hauptmann S. (2003). The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses and Applications. Wiley-VCH, 2<sup>nd</sup> ed.: 371.
2. Grier R; Lcopart CC; Amat M; Bosch J; Castillo JC; and Huguet J. (2005). A synthetic route to a novel type of conformationally constrained N-aryloxazolidinones. *BioOrgan. Med. Chem. Lett.* (15): 2515-2517.
3. Bajaj K; Archana A; and Kumar A. (2004). Synthesis and pharmacological evaluation of newer substituted benzoxazepine derivatives as potent anticonvulsant agents. *Eur. J. Med. Chem.* 39: 369.
4. Wilson CO; and givold O. (1966). Text book of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 5<sup>th</sup> ed. London Cott compne.
5. Kugita H; Takeo S; and Matsushima M. (1972). 1,5-Benzothiazepine derivatives. *Jap. Pat. Chem. Abstr.* 77:5554.
6. Kugita H; Inoue H; and Ikezaki M. (1971). 1,5-Benzothiazepine derivatives. *Jap. Pat. Chem. Abstr.* 75: 63848.
7. Geyer HM; Watzman N; and Buckley JP. (1970). Effects of a tranquilizer and two antidepressants on learned and unlearned behaviors. *J. Pharmacol. Sci.* 59: 964-968.
8. Kawashima Co. Ltd. (1985). Benzothiazepine derivative. *Jap. Pat. Chem. Abstr.* 103: 105014.

9. Inoue H; Konda M; Hashiyama T; Otsuka H; Takahashi K; Gaino M; Date T; Aoe K; Takeda M; Murata S; Narita H; and Nagao T. (1991). Synthesis of halogen-substituted 1,5-benzothiazepine derivatives and their vasodilating and hypotensive activities. *J. Med. Chem.* 34: 675-687.
10. Kugita H; Inoue H; Ikezaki M; Konda M; and Takeo S. (1971). Synthesis of 1,5-benzothiazepine derivatives III. *Chem. Pharm. Bull.* 19: 595-602.
11. Dandia A; singh R; and Khaturia S. (2007). Efficient microwave enhanced solvent-free synthesis of potent antifungal agents: Fluorinated benzothiazepine fused  $\beta$ -lactam derivatives. *J. Fluorine Chem.* 128: 524–529.
12. Sharma AK; Singh G; Yadav AK; and Prakash L. (1997). Improved Method for the Synthesis of New 1,5-Benzothiazepine Derivatives as Analogues of Anticancer Drugs. *Molec.* 2(9):129-134.
13. Ansari FL; Umbreen S; Hussain L; Makhmoor T; Nawaz SA; Lodhi MA; Khan SN; Shaheen F; Choudhary MI; and Rahman A. (2005). Syntheses and Biological Activities of Chalcone and 1,5-Benzothiazepine Derivatives: Promising New Free-Radical Scavengers, and Esterase, Urease, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors. *J. Chem. Biodiversity.* 2(4):487–496.
14. Xua X; Qianb X; and Zhong L.(2005). Synthesis and fungicidal activity of fluorine-containing phenylimino-thiazolidines derivatives. *J. Fluorine Chem.* 126:297-300.
15. Li W; Lu Y; Wang Z; James T; Dalton M DD. (2007). Synthesis and antiproliferative activity of thiazolidine analogs for melanom. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:4113-4117.
16. Vazzana I; Terranova E; Mattioli F; and Sparatore F. (2004). Aromatic Schiff bases and 2,3-disubstituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives as antiinflammatory agents. *Arkivok* 5:364-374.
17. Li G; Qian X; Cui J; Huang Q; Cui D; Zhang R; and Liu F. (2006). Synthesis and herbicidal activities of fluorine-containing 3-pyridylmethyl-2-phenyliminothiazolidine derivatives. *J. Fluorine Chem.* 127:182-186.
18. Ami E; Nakahara K; Sato A; Nguyen JT; Hidaka K; Hamada Y; Nakatani S; Kimura T; Hayashia Y; and Kisoa Y. (2007). Synthesis and antiviral property of allophenylnorstatine-based HIV protease inhibitors incorporating D-cysteine derivatives as  $P_2/P_3$  moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:4213-4217.
19. Silverstein M R. (2005). Spectrometric Identification of Organic compounds. Wiley 6<sup>th</sup> ed : 149.

## Evaluation of some limiting factors affecting the hygienic standards of water chlorination (Tap and Trough's Water) of Animal farm /Veterinary Medicine College -Baghdad University

Drgham H.Y.Al-Zwean

Dept. of veterinary Public Health/ College of Veterinary Medicine / Baghdad University /Republic of Iraq

E-mail: drg.la1960@yahoo.com

### ABSTRACT

This study was conducted to find out and evaluate of some limiting factors affecting the hygienic standard of water chlorination (tap and trough's water) of Animal Farm –Veterinary Medicine College / Baghdad University. One hundred and eighty water samples were collected at morning and evening times from the three farms (sheep, calves and cattle) lasted from 1<sup>st</sup>.Feb up to 1<sup>st</sup>. April 2013 with a range of sixty samples from each farm in order to estimate the concentration of free chlorine, pH, temperature and most probable number of Coliform (MPN). The results showed the free chlorine concentration of tap water and temperature were significantly ( $P<0.05$ ) higher than trough's water, while trough's water pH and MPN significantly ( $P<0.05$ ) and ( $p<0.01$ ) respectively recorded higher than tap water. Also the results revealed that there was significant ( $P<0.05$ ) and ( $P<0.01$ ) negative and positive correlation coefficients among parameters. However the water sampling time (morning and evening) had significant impact in the result and correlation coefficient respect. Tap and trough's water MPN higher than the recommended hygienic standard of international healthy and environmental organization and this due to contaminated trough's water with fecal Coliform bacteria those originated from domestic animals waste and human sewage, in addition for tap water is due to the present of biofilms of coliform on pipes fixtures, leaks and fractures. Therefore, it is recommended to clean and continuous washing the troughs at least at weekly intervals with drainage trough's water periodically, and comply with time of trough supply with water before watering of animals avoiding water stagnant and algae growth and comply with hygienic standard of trough's construction in order to obtain clean, health and safety water for animal consumption. In addition, it should notice for tap water pipes supply avoiding any leakage through any fixtures or fractions.

**Keywords:** Hygienic, Water, Tap, Troughs, Veterinary.

### المخلص باللغة العربية

هدف البحث إلى دراسة بعض العوامل المؤثرة في المستوى الصحي لمياه شرب حيوانات الحقل الحيواني (مياه الأسالة والأحواض) لكلية الطب البيطري – جامعة بغداد، أذ جمعت 180 عينة ماء صباحاً ومساءً من ثلاثة حقول (الأغنام، العجول، الأبقار) للفترة من (أشباط – نيسان، 2013) وبواقع 60 عينة لكل حقل لغرض قياس كل من تركيز الكلور الحر، الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة والعد الجرثومي الأكثر احتمالاً لبكتيريا القولون.

أظهرت النتائج تفوق مياه الأسالة معنويًا ( $P<0.05$ ) على مياه الأحواض في قيم تركيز الكلور الحر ودرجة الحرارة. وسجلت مياه الأحواض تفوقاً معنوياً ( $P<0.05$ ) على مياه الأسالة في قيم الأس الهيدروجيني وبمستوى ( $P<0.01$ ) في قيم العد الجرثومي، كما أظهرت النتائج وجود معاملات ارتباط معنوية موجبة وسالبة وبمستوى ( $P<0.05$ ) و ( $P<0.01$ ) بين المعاملات، وكان لوقت جمع العينات (صباحاً ومساءً) أثراً مهماً في النتائج ومعاملات الارتباط، وكانت قيم العد الجرثومي لمياه الأحواض والأسالة أعلى من المستوى الصحي الموصى به من قبل المنظمات البيئية والصحية الدولية وهذا عائد إلى التلوث الحاصل لمياه الأحواض ببكتيريا القولون البرازية وصدورها الفضلات البشرية والحيوانية، ولمياه الأسالة عائد إلى وجود الغشاء الحيوي لبكتيريا القولون المبطنة لأنابيب نقل المياه أو التسريبات والتكسرات لأنابيب المياه، وعليه يوصى بضرورة التنظيف والغسل المستمر للأحواض على الأقل مرة واحدة أسبوعياً مع تغيير مياه الأحواض دورياً والالتزام بمواعيد ملئ الأحواض قبل ورود الحيوانات إليها للشرب تجنباً لركود المياه ونمو الطحالب والأشنات فيها مع ضرورة التقيد بالمقاييس الصحية لإنشاء الأحواض وكذلك يجب ملاحظة أنابيب المياه المجهزة تجنباً لتسرب المياه بفعل التخسفات الحاصلة في شبكات المياه من أجل توفير مياه آمنة وصحية نظيفة وذات محتوى ميكروبي منخفض لشرب الحيوانات.

## INTRODUCTION

Animal life requires a steady supply of water to fulfill its vital function, it is accepted world that water is one of the most elements in both human and animals' life (1). Water is the most abundant ingredient of the animal body in all phases of growth and development. It is the medium in which all chemical reactions in the body take place, It also acts as lubricant to transport feed, aid in excretion, regulate body temperature and a buffering agent to regulate pH of body fluids(2). Quality of water is broadly defined as its fitness for consumption by livestock to maintain satisfactory production, water with a pH value below or above hygienic standards can cause acidosis or alkalosis, these affected animals usually go off feed, get infections easier, and have fertility problems(3).

The amount of water that stock drink depends on the temperature of the water. Generally, animals prefer water at or below body temperature (4). Troughs used in watering systems should be drained and cleaned regularly. Algae grow in troughs naturally respond to sunlight and fertilizers producing unpleasant odors in the water which can repeal stock (5).

Water is unsafe for human and animal consumption when it contains pathogenic, or disease – causing microorganisms. Pathogenic microorganisms (and their associated disease) may include bacteria such as *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, Viruses such as poliovirus or Hepatitis A and protozoa such as *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* that infects the upper portion of the small intestine of humans and many other species of mammals(6).

*Escherichia Coli* is a single species of bacteria that is a subset of total and fecal coliform is normally found in human and animal intestine, and is the most reliable indicator of fecal contamination in water. Its presence in drinking water represents a health concern because they are usually associated with sewage or animal wastes (7).

Therefore, the objectives of this study are the evaluation of some limiting factor that's affecting the hygienic standards of water, investigation of the correlations among these factors and to evaluate the effect of these factors in animal health.

## MATERIALS AND METHODS

### Water Sampling

The experiment was carried out in three animal farms of Veterinary college – Baghdad University lasted from 1<sup>st</sup> Feb up to 1<sup>st</sup> April 2013, One hundred and eighty water samples were collected from the three farms (Sheep, Calves, Cattle) for each tap and troughs water with a range of sixty samples for each farm divided into thirty samples for tap and thirty for troughs these also divided (fifteen samples at morning and fifteen at evening) All samples aseptically collected to the sterilized screw capped bottles and transported to the laboratory as early as possible.

### Free Chlorine Measurement

Free chlorine concentration in the water samples measured by pocket colorimeter II Analysis for free chlorine and total chlorine.(DPD Free Chlorine Reagent-PERMACHEM REAGENTS (USA)(2013) (8).

### pH and Temperature Measurement

pH and temperature of the water samples measured by pH 315/set (pH meter).

### Bacteriological examination of water sample:

#### 1. Neutralization of chlorine in the water:

Sodium thiosulphate should be added to the water samples contain chlorine before sterilization as a (0.1 ml of 3% sodium thiosulphate per 100 ml of water) should neutralize of residual chlorine(9).

**2. The most probable number (MPN):** The (MPN) method is most commonly used to estimate the number of bacteria in a water sample (10-12).

2-1: eleven tubes (1×50 ml, 5×10 ml, 5×1 ml) method with water expected to be of good quality one (50 ml) volume and five (10 ml) volumes of water sample are similarly added to their own volumes of double- strength MacConkey broth. (1 ml) volumes of water sample are pipetted into five tubes containing (5 ml) of single-strength MacConkey broth, also all the tubes contain



Durham tube for the detection of gas production.

The inoculated tubes are incubated at 37°C and examined for the presence of growth accompanied by gas production at 24 and 48 hours, tubes showing acid and bubble of gas in the Durham tube. Growth and gas production are both necessary for a positive result. The MPN is calculated and results are expressed as presumptive coliform MPN/100 ml (10,11).

2-2: Confirmed test (Indol test): each of positive tubes should then be subcultured to a tube of peptone water (each tube contain 10 ml of peptone water) both for incubation in water bath at  $44.5 \pm 0.2$  °C for 24 hours in order to give a rapid indication of the presence of Thermotolerant fecal coliform such as *E.Coli* produce Indole from tryptophan at  $44.5 \pm 0.2$  °C after incubation of peptone water culture, (0.2-0.3) ml of Kovac's reagent is added and the tube gently shaken if the test is positive a deep red color appears in the upper layer almost immediately (12).

2-3: Completed test: The presumptive positive tube may similarly be plated out or streak on Eosine Methylene Blue Agar (EMB), for isolated colonies, then the plates should be incubated at 37°C for 24-48 hours after that colonies type observed on EMB agar, gram-negative lactose-fermenting bacteria will show a relatively dark color, when observed directly against the light usually a green seen by reflected light. This sheen is due to the precipitation of methylene blue in the medium, a result of the very high amount of acid produced from fermentation. Those which from this type of colony are methyl red positive organisms including *E.coli* and those strains of *Citrobacter* which ferment lactose rapidly (12).

### Statistical Analysis

Data were analyzed using Complete Randomized Design (CRD). Least Significant Difference (LSD) among different treatment were used. Correlation coefficient among different traits were conducted (13- 15).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Water free chlorine concentration

Table (1) showed that the free chlorine concentration in tap water at morning time which supplied all different animals troughs was significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than the tap water supplied at evening, also the free chlorine concentration in tap water at evening of the sheep farm water troughs was significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than those of cattle, calves farm water troughs, but in general the free chlorine concentration in water trough's of all farms animals were significantly ( $P < 0.05$ ) recorded lower than the tap water which supplied also at morning and evening.

These results were accordance with that of (8,16) who noticed that free chlorine in water is not stable and its concentration will decrease rapidly due to exposure to sunlight, strong light or agitation will accelerate the reduction of chlorine.

### pH concentration

The pH concentration of cattle and calves farms troughs water at evening was significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than sheep farm troughs water at evening table (1), also the pH concentration recorded of cattle and calves troughs water was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in evening than in morning while the tap water which supplied different animals farm troughs. Its pH concentration was significantly lower than all different animals farm troughs, also the tap water of sheep farm recorded significantly lower at morning compared with tap water of cattle farm. These results are in agreement with pervious study result by (17, 18) that the best compromise of activity and stability is achieved by maintaining a water pH between (6.5-8.0) and the disinfecting efficiency of chlorine is dependent on the amount hypochlorous acid (HOCl) present. Because of the many possible forms of chlorine, HOCl is the really good disinfecting. At allow pH there will be more HOCl. As the pH rises the acid will dissociate into  $H^+$  and hypochlorite ion ( $OCl^-$ ). (6,7) recommended to maximize the HOCl and minimize all the other forms of chlorine that the most germicidal chlorine species is HOCl because  $HOCl^+$  destroys

pathogens approximately (40-100) times effectively than  $\text{OCl}^-$ .

### Temperature

The degrees temperature of tap water which supplied sheep farm troughs at morning and evening was significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher more than the tap water that supplied cattle and calves water troughs at the same time. While the troughs water temperature of the sheep farm troughs recorded significantly ( $P < 0.05$ ) higher more than those of cattle and calves troughs water (table 1). However the calves farm troughs water temperature significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than those cattle farm troughs water.

Generally the temperature of tap water that supplied the all farms significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than those cattle farm troughs water. Generally the temperature of tap water that supplied the all farms significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher compared with all animals farm troughs water, this could be attributed to (19), that chlorine activity slightly increase with temperature but some chlorine gas is lost to the atmosphere, as warmer temperature increase the rate of volatilization. The aesthetic objective for temperature of less than or equal ( $15^\circ\text{C}$ ) in water to be used for drinking water is adopted from (20).

### Most probable number of coliform (MPN)

Table (1) denoted that the troughs water MPN/100ml at evening significantly ( $P < 0.05$ ) recorded higher than those at morning for all farm of animals troughs, while the calves farm troughs water significantly ( $P < 0.05$ ) recorded more than the sheep farm troughs water at evening in the mean time, the (MPN) of the tap water which supplied to all animals farm troughs significantly recorded lower than the troughs water either at morning or evening time.

The higher significant recorded of MPN in tap water is not agreement with the recommendation of (2,6,7) that the standard for coliform bacteria in drinking water is less than (1) coliform colony per 100 ml of sample ( $< 1/100$  ml).

Also (21) refer to that the present of *E.coli* or (Thermotolerant coliforms) in drinking water (Tap chlorinated water) is indicative of (fecal contamination) the present of biofilms on pipes fixture and contact with soil as a result of leaks fractures or repair works.

While the higher significant recorded of MPN /100ml sample of troughs water due to the entering of these bacteria in trough's water directly from domestic animals waste and human sewage (22).

### Correlation Coefficients among treatments of the study

#### Tap water:

Tables (2,3 and 4) indicated that there was significant negative correlation coefficient ( $P < 0.01$ ) (-0.755) among free chlorine concentration and the (MPN) at morning time in the tap water of cattle farm, while there was significant negative correlation coefficient ( $P < 0.05$ ) (-0.571) among free chlorine concentration and MPN of cattle tap water at evening time. In addition, there was significant negative correlation coefficient among free chlorine concentration and temperature in tap water that supplied sheep farm at morning ( $P < 0.05$ ) (-0.558). While tap water free chlorine concentration recorded significant negative correlation coefficient ( $P < 0.01$ ) (-0.782) with tap water pH of sheep farm, also in cattle farm ( $P < 0.05$ ) (-0.628) and calves farm ( $P < 0.01$ ) (-0.880) at evening time. Also there was significant positive correlation coefficients among the pH and MPN of tap water that supplied sheep farm troughs only at morning time ( $P < 0.01$ ) (-0.664) and cattle farm at evening time ( $P < 0.05$ ) (-0.532). The temperature recorded negative correlation coefficient at morning time (-0.550) with MPN and positive at evening time ( $P < 0.01$ ) (-0.866) for water that supplied calves troughs and positive for water supplied sheep troughs only at morning time ( $P < 0.05$ ) (-0.602).

#### Troughs water:

There was significantly negative correlation coefficient among free chlorine concentration and MPN of troughs water of sheep ( $P < 0.01$ ) (-0.921) and calves farm ( $P < 0.01$ ) (-0.773) at morning time. Also for cattle ( $P < 0.01$ ) (-0.981) and calves farm ( $P < 0.01$ ) (-0.763) at evening time. The free chlorine concentration and pH recorded significantly negative correlation coefficient either in morning or evening time of cattle ( $P < 0.05$ ) (-0.519) (-0.554) and sheep troughs ( $P < 0.05$ ) (-0.221) (-0.100), while the positive correlation coefficient among temperature and MPN ( $P < 0.05$ ) (0.634) at evening time only for sheep farm troughs.

Table (1): means of Parametric Scales  $\pm$  Standard error of Cattle, Calves and Sheep

Parametric scales	LSD value	Cattle farm				Calves farm				Sheep farm			
		Tap water		Troughs water		Tap water		Troughs water		Tap water		Troughs water	
		Morn.	Even.	Morn.	Even.	Morn.	Even.	Morn.	Even.	Morn.	Even.	Morn.	Even.
Cl	0.16	1.78 $\pm$ 0.08a	0.88 $\pm$ 0.05c	0.04 $\pm$ 0.006d	0.02 $\pm$ 0.006d	1.89 $\pm$ 0.05a	0.87 $\pm$ 0.05c	0.04 $\pm$ 0.008d	0.01 $\pm$ 0.003d	1.86 $\pm$ 0.07a	1.15 $\pm$ 0.01b	0.03 $\pm$ 0.005d	0.02 $\pm$ 0.005d
pH	0.18	7.38 $\pm$ 0.04c	7.35 $\pm$ 0.03 cd	7.92 $\pm$ 0.04b	8.41 $\pm$ 0.05a	7.33 $\pm$ 0.02cd	7.31 $\pm$ 0.04cd	7.83 $\pm$ 0.10b	8.28 $\pm$ 0.09a	7.18 $\pm$ 0.01d	7.20 $\pm$ 0.01 cd	7.92 $\pm$ 0.04b	7.86 $\pm$ 0.05b
Temp.	0.16	17.85 $\pm$ 0.09d	16.61 $\pm$ 0.05 hi	16.82 $\pm$ 0.07g	16.50 $\pm$ 0.05i	17.94 $\pm$ 0.08cd	16.67 $\pm$ 0.07gh	17.29 $\pm$ 0.08c	16.99 $\pm$ 0.02f	18.05 $\pm$ 0.16 bc	19.12 $\pm$ 0.10a	17.89 $\pm$ 0.14 cd	18.21 $\pm$ 0.20b
MPN/100ml	2.7	0.20 $\pm$ 0.11d	1.13 $\pm$ 0.32d	23.47 $\pm$ 1.59c	33.67 $\pm$ 1.58ab	0.13 $\pm$ 0.09d	0.60 $\pm$ 0.21d	24.47 $\pm$ 1.87c	35.00 $\pm$ 1.29a	0.13 $\pm$ 0.09d	0.20 $\pm$ 0.11d	25.00 $\pm$ 1.78c	31.00 $\pm$ 1.84b

Different letters indicated significant differences among treatment at level ( $P < 0.05$ )

Cl (free chlorine), pH (power of H ion), Temp. (temperature), MPN (most probable numer)

Table (2): Correlations coefficient among treatments of Cattle farm

Parametric scales	Tap water (morning)			Tap water (evening)			Troughs water (morning)			Troughs water (evening)		
	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH
Cl	-0.755 **	0.400	0.216	-0.571 *	-0.316	-0.628 *	-0.297	-0.207	-0.519 *	-0.981 **	0.122	-0.554 *
pH	-0.230	0.164		0.532 *	-0.110		0.544 *	0.250		0.541 *	0.458	
Temp.	-0.167	0.164		0.304			0.165			-0.164		

\* significant at 5% level \*\* significant at 1% level

Table (3): Correlations coefficient among treatments of Calves farm

Parametric scales	Tap water (morning)			Tap water (evening)			Troughs water (morning)			Troughs water (evening)		
	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH
Cl	-0.779 **	0.554 *	0.557 *	-0.867 **	-0.109	-0.880 **	-0.773 **	0.106	-0.810 **	-0.763 **	-0.250	-0.651 **
pH	-0.462	0.920 **		0.328	0.252		0.769 **	-0.266		0.812 **	0.133	
Temp.	-0.550			0.886 **			-0.161			0.067		

\* significant at 5% level \*\* significant at 1% level

Table (4): Correlations coefficient among treatments of Sheep farm

Parametric scales	Tap water (morning)			Tap water (evening)			Troughs water (morning)			Troughs water (evening)		
	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH	MPN	Temp.	pH
Cl	-0.890 **	-0.588 *	-0.782 **	-0.458	0.084	0.493	-0.921 **	0.042	0.221	-0.426	-0.382	-0.100
pH	0.664 **	0.461		-0.287	0.562		0.047	0.371		-0.215	-0.021	
Temp.	0.602 *			-0.375			0.194			0.634 *		

\* significant at 5% level \*\* significant at 1% level

The significant correlation coefficient either, positive or negative refer to present reversely correlation among parameters (Free chlorine, pH, Temp, MPN) of (tap, troughs water) vice versa, that is any lower record in the parameters (pH, Temp) attendant with higher record of (Free chlorine), consequently lower record in (MPN)(11,12,23,24).

## REFERENCES

1. Michael OS.(2012). Importance of water in animal life. Ehow Education, University of Florida.
2. UNESCO.(2009).Water in a changing world :The United Nation World Water Development Report 3,UNESCO Publishing, Paris /Earthscan, London.
3. Johanna P.(2012).Water and its importance to animals .Rangeland Management Specialist Natural Resource Conservation Service.
4. Mekonen MM; and Hoekstra AY.(2010).The green, blue and grey water footprint of farm animals and animal products; Value of water. Research report series (1) 48,December. UNESCO-IHE, Institute for Water Education ,University of Twente.
5. State of New South Wales (NSW) Department of Primary Industries.(2011).Water requirements for sheep and cattle. Prime Facts 326 Replaces AGfact AO.5.4.
6. Environmental Protection Agency (EPA).(2009).Edition of the drinking water standards and health advisories.
7. WHO.(2010).Guidelines for drinking water quality : Incorporation first addendum, 4th ed. Geneva, WHO Press.
8. HACH LANGE GmbH.(2011).Willstatte retrasel1:40549 Dusseldorf: Germany.
9. Salman LH.(2008).Evaluation of some limiting factors affecting water chlorination at Baghdad/Al-Rasafa District. Master Thesis, Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine/Baghdad University.
10. American Public Health Association.(2010).Standard methods for the examination of water and waste water,24<sup>th</sup> ed., Washington/USA.
11. Environmental Protection Agency (EPA). (2007). National primary drinking water standards. EPA 816-F-01-007,March ,Washington DC.
12. WHO. (2006). Guideline for Drinking water quality.3<sup>rd</sup>. Ed. Addendum: Microbiological Agent in drinking water. Geneva.
13. Steel RG; and Torries JH.(1997).Principles and procedures of statistics. Abiometrcal approach, 3<sup>rd</sup> ed. McGraw.Hill Book Co.NewYork.USA.
14. SAS.(2010).Statistical analysis system. User's Guide statistical version, 9<sup>th</sup> ed.SAS.InsT.Inc.Cary.N.C.USA
15. SPSS.(2013). Statistical package for the social sciences, Version 21(Win/Mac/Linux),User's guide SPSS Inc.,Chicago III,USA.
16. (WHO).(2011).Water safety plans. Geneva, World Health Organization. Undergoing Finalization.
17. Suslow T.(2005).Post harvest chlorination :Basic properties and key points for effective sanitation. Oakland: University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.
18. Tavakoli A; Yazdani R; Shahmansouri A; and Isfahani BN.(2007). Chlorine residual efficiency in inactivating bacteria from secondary contamination in Isfahan. East. Mediterran. Health J.11:3.
19. Ndiongue S; Huck PM; and Salwson RM.(2013).Effect of the temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water. Department of Civil Engineering, University of Waterloo, Ontario, Canada.
20. Saiful I; Housne AB;NilufarY; and Yeasmin.N. (2010). Bacteriological safety Assessment of Municipal tap water and quality of bottle water in Dhaka City:Health hazard analysis. J.Med.Microbiol. (10):9-13.
21. Health Canada (2006).Guidelines for Canadian drinking water quality: Technical guideline Document-*Escherichia Coli*. Water quality and Health Bureau, Health Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario.
- 22.ISO.(2011).Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia Coli* and Coliform bacteria in surface and waste water-part 31:Miniaturized method (Most Probable Number)by inoculation in liquid medium .Geneva. International Organization for Standardization (ISO/FDIS 9308-3).
23. Kim AA; and Michael DP.(2011). Drinking water and recreational water quality: microbiological criteria .University of Idaho, College of Agriculture.
24. Sarbatly RH; and Krishnaiah D.(2007).Free chlorine residual content with in the drinking water distribution system. Int. J. Phys. Sci. 2(8):196-201.

## Heavy metal contamination in canned fish marketed in Baghdad

Salim S. Al- Timimi (1), Sundus H. Ahmed (2), Salwa Khudadat (3), & Qais Assi (2)

(1) Market and consumer protection research centre/ Baghdad University. (2) Directorate of agricultural research/ Ministry of Sciences and Technology / Baghdad. (3) Al- Mustansiriyah University /Republic of Iraq

E-mail: drsundusahmed@gmail.com

### ABSTRACT

The presence of some heavy metals in food is considered hazardous for human to security and public health. They can be accumulated in marine habitats such as fish. The aim of this study was to determine chromouim (Cr) lead (Pb), cadmium (Cd), nickel (Ni) and iron (Fe) concentration levels in fifteenth brands of canned fish in Baghdad markets. Measurement of heavy metal contents of canned fish was carried out by using flame atomic absorption. The metal contents, expressed in ppm wet weight for The metal contents in canned fish, expressed in ppm. varied from (0.005 - 0.65) for chromium, (0.001 - 0.019) for cadmium, (0.039 - 0.0045) for nickel, and (0.001-0.019) for lead respectively. There is therefore serious health risk associated with the frequent consumption of canned fishes.

**Key words:** canned fish, chromouim lead, cadmium, nickel and iron, heavy metal.

### الملخص باللغة العربية

يشكل وجود بعض المعادن الثقيلة بتركيزات معينة في الأغذية خطورة تهدد الصحة البشرية وأمن الغذاء البشري، ومن هذه المعادن الثقيلة ما يتراكم في أنسجة الكائنات البحرية التي يتناولها الإنسان مثل الأسماك. هدفت الدراسة الحالية إلى الكشف عن تراكيز بعض المعادن الثقيلة في الأسماك المعلبة الموجودة في أسواق بغداد في جمهورية العراق، شملت الدراسة المعادن الثقيلة التالية: الكروم، الكاديوم، النيكل، الحديد والرصاص، وتم جمع خمسة عشر عينة من معلبات الأسماك المعروضة للبيع والاستهلاك في أسواق بغداد، إذ تم قياس محتويات هذه المعادن في العينات باستخدام تقنية الامتصاص الذري ذي اللهب، وقد تم تحديد مستويات تراكيز المعادن باستخدام وحدات قياس الوزن الرطب (ppm). أظهرت النتائج اختلافا في تراكيز المعادن المقاسة وكانت كالتالي: الكروم (0.005-0.65 ppm)، الكاديوم (0.001-0.019 ppm)، النيكل (0.0045- 0.039ppm)، والرصاص (0.001- 0.019ppm)، والحديد (أكثر من 1.5 ppm) في بعض العينات. وقد توصلت الدراسة من خلال هذه النتائج إلى أن بعض الأصناف المعروضة للاستهلاك من الأسماك المعلبة تشكل خطرا كبيرا على الصحة العامة خاصة في حال تكرار استهلاك تلك المنتجات.

## INTRODUCTION

Heavy metals are considered as one of the most important sources of pollution of the aquatic environment because of their toxicity and accumulation by marine organisms. , which can be delivered to humans by ingestion. Examples of these toxic heavy metals are: Chromouim(Cr), lead (Pb), cadmium(Cd), nickel(Ni) and iron(Fe), is through the ingestion of contaminated fish, especially larger predators. While cadmium and lead can be tolerated at extremely low concentrations, they are extremely toxic to humans(1). Heavy metal toxicity can result in damaged or reduced mental and central nervous function, lower energy levels, and damage to blood composition, lungs, kidneys, liver, and other vital organs (2). Long-term exposure may result in slow and progressive physical, muscular, and neurological degenerative processes such as muscular dystrophy and multiple sclerosis (3). Metal contaminations in food, especially in marine products, have been broadly investigated (4).

The present study was carried out in view of the paucity of information about heavy metals in canned products. It is hoped that the results of this study will help in generating data needed for the assessment of toxic metal intake from this food source. The objective of the study was to determine the concentration of chromouim, lead, cadmium, nickel and iron in canned fish products purchased from supermarkets located in Iraq/ Baghdad.

## MATERIALS AND METHODS

### Heavy metal detection

#### Reagents:

Standard stock solutions of chromouim, cadmium, lead, nickel, and iron were prepared from Titraxol (1000 mg/l) (Merck, Germany) and were diluted to the desired concentrations for the corresponding metals. The working solutions were freshly prepared by diluting an appropriate aliquot of the stock solutions using 10% HNO<sub>3</sub> for diluting lead and cadmium solutions. The solution was boiled for about 5 min, cooled, and nitrogen bubbled through it to expel any impurities. Sample preparation,

digestion and chemical analysis followed according to (5) for fifteen canned fish.

Table (1) gives general description for the study samples.

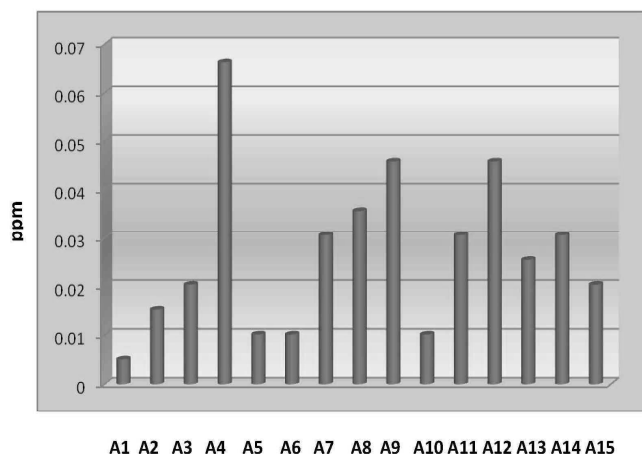
**Table (1): General description of study samples**

Sample no.	Type of fish	Origin	Contents
A1	Tuna	Thailand	Tuna, sun flower oil, salt
A2	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, plant oil, salt
A3	Sardine	Thailand	Sardine, Soya oil, salt
A4	Tuna	Thailand	Tuna, salt
A5	Tuna	Thailand	Tuna, Soya oil, salt
A6	Sardine	Thailand	Sardine, oil, salt
A7	Sardine	Thailand	Sardine, oil, salt
A8	Tuna	Thailand	Tuna, salt
A9	Tuna	Thailand	Tuna, sun flower oil, salt
A10	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A11	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A12	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A13	Sardine	Thailand	Sardine, Salsa
A14	Sardine	Thailand	sardine, vegetable oil
A15	Smoked Sardine	Thailand	Sardine, vegetable oil, salt

## RESULTS AND DISCUSSION

Table (1) showed the canned fish samples for different fifteen brands existed in Baghdad markets. Results showed that fish could be considered as good indicators for heavy metals contamination in aquatic systems because they occupy different tropic levels with different sizes and ages. In addition, fish is widely consumed in many parts of the world by human and its very danger to human health if it is polluted. Fifteen cans of fish were analyzed for chromium heavy

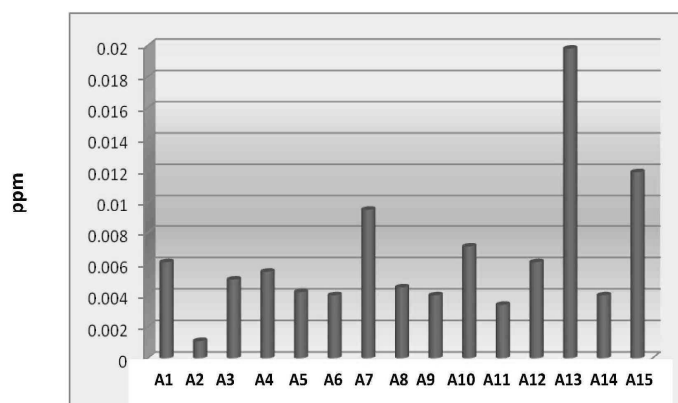
metal as shown in figure (1). The study found that the concentration of Chromium in all our samples were between ( 0.005- 0.065) ppm., A4 was the highest in chromium concentration followed by A9, A12, A8, A7, A11, A14, A15, A2, A10, A6, and A1. All the samples contained higher concentrations of this metal than the standard limits 0.008 ppm. (6) Except A1, which contains 0.005 ppm.



**Fig (1): Chromium concentration in canned fish.**

A1 Tuna, A2 Sardine, A3 Sardine, A4 Tuna, A5 Tuna, A6 Sardine, A7 Sardine, A8 Tuna, A9 Tuna, A10 Sardine, A11 Sardine, A12 Sardine, A13 Sardine, A14 , A15 Smoked Sardine

Cadmium is poorly excreted by the human body and although only 5–10% of the ingested cadmium is absorbed, it does accumulate in the body over time with renal damage being caused by long-term exposure (7). One sign of Cadmium damage is proteinuria (the appearance of increased levels of unaltered proteins in the urine. The major source of cadmium contamination in fish may be from supply of phosphate fertilizers, atmospheric deposition and sewage sludge. All samples were within the accepted cadmium concentration level except A13, A15, A7, A12, A10, A1 which were higher than the recommended standard level 0.005ppm (7). Figure (2) .

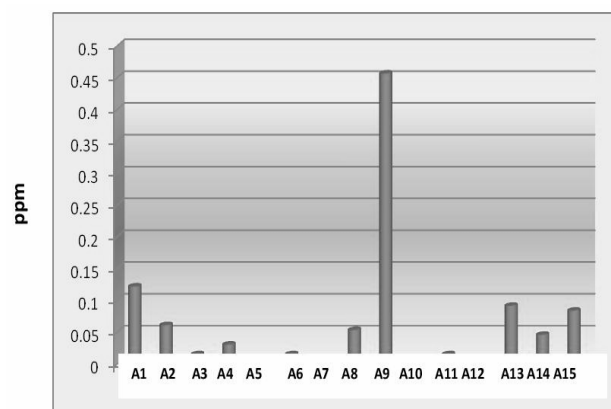


**Fig (2); Cadimium concentration in canned fish.**

A1, Tuna, A2 Sardine, A3 Sardine, A4 Tuna, A5 Tuna, A6 Sardine, A7 Sardine, A8 Tuna, A9 Tuna, A10 Sardine, A11 Sardine, A12 Sardine, A13 Sardine, A14 , A15 Smoked Sardine

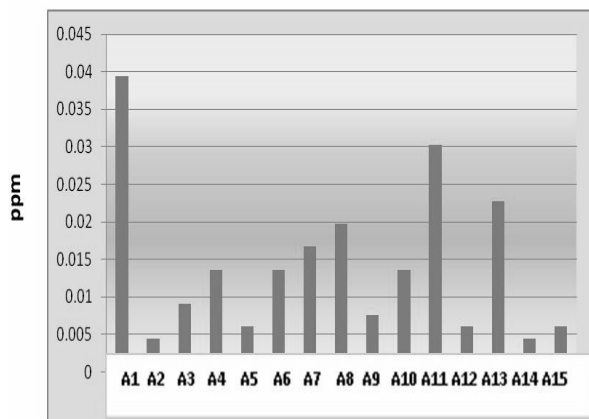
Lead is a widely distributed environmental poison. For instance, solder used in the manufacture of cans is a source of contamination of food by Pb. Clinical manifestations of Pb toxicity include symptoms referable to the Central nervous system, the peripheral nervous system, the hematopoietic system, the renal system and the gastrointestinal system (8). The maximum lead level permitted for canned fish is 0.3 ppm by (9). Sample A9 (0.45ppm) recorded the highest concentration of Pb but all samples had their concentration falling within the specified limits. Figure (3).

As well as the results indicated that the concentration varied from 0.0394 to 0.0045 ppm for nickel in fish samples the limits set by US-EPA for nickel was 1.0 ppm in fish (10). Figure (4).



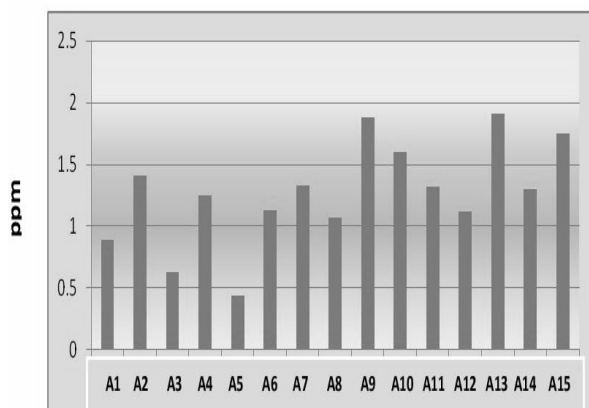
**Fig (3): Lead concentration in canned fish.**

A1, Tuna, A2 Sardine, A3 Sardine, A4 Tuna, A5 Tuna, A6 Sardine, A7 Sardine, A8 Tuna, A9 Tuna, A10 Sardine, A11 Sardine, A12 Sardine, A13 Sardine, A14 , A15 Smoked Sardine



**Fig (4): Nickel concentration in canned fish.**  
A1, Tuna, A2 Sardine, A3 Sardine, A4 Tuna, A5 Tuna, A6 Sardine, A7 Sardine, A8 Tuna, A9 Tuna, A10 Sardine, A11 Sardine, A12 Sardine, A13 Sardine, A14 , A15 Smoked Sardine

The concentration of iron, in canned fish reported by FDA (2000) was 1ppm. The results of the current study showed that all canned fish samples were over the permitted value except A1 0.886, A3 0.6247, A5 0.4449. Figure (5).



**Fig (5): Iron concentration in canned fish.**  
A1, Tuna, A2 Sardine, A3 Sardine, A4 Tuna, A5 Tuna, A6 Sardine, A7 Sardine, A8 Tuna, A9 Tuna, A10 Sardine, A11 Sardine, A12 Sardine, A13 Sardine, A14 , A15 Smoked Sardine

The results had shown that A1, A3 had unacceptable heavy metal concentrations of chromium, cadmium, Iron and lead while, A2, A6, A7, A8, A10, A11, A12, A1, 15 had unacceptable heavy metal concentrations of chromium. A9 had unacceptable lead concentration. The study suggested that all these samples were unacceptable as shown in the figures.

The levels of toxic elements in fish are related to age, sex, season and place (11). It is also reported that cooking reduces the amount of some metals (11).

### CONCLUSION

The metal contents in canned fish expressed in ppm. varied from 0.005 - 0.65) for chromium, (0.001 - 0.019) for cadmium, from 0.039 - 0.0045 for nickel, 0.001-0.019) for lead. The results from this study suggested that there were differences existed in the element concentrations across fifteen different canned fish brands. In addition, analytical data obtained from this study showed that the metal concentrations for the varieties of canned fishes were generally out of WHO/FAO. FDA and US. EPA recommended limits for fish for all samples. There is therefore serious health risk associated with the consumption of canned fishes analyzed, high-risk groups (pregnant mothers and children) followed by adolescents and adults must, based on the results obtained, reduce the consumption of canned fish as frequent consumption may result in bioaccumulation of the metals and increased health risks.

### REFERENCES

1. Krincs-Etherton PM; Hecker KD; Bonanome A; Coval SM; Binkoski AE; Hilpert KF; Griel AE; and Etherton TD. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113:71–88.
2. Kaye P; Young H; and O'Sullivan I. (2002), Metal fume fever: a case report and review of the literature. *Emerg. Med. J.* 19(3): 268 – 269.
3. International Occupational Safety and Health Information Centre (1999). Basics of chemical safety. International Labour Organization Conference, Geneva.



4. Catsiki VA; and Strogyloudi E. (1999). Survey of metal levels in common fish species from Greek waters. *Sci. Total Environ.* 237/238:387–400.
5. Frick F; and Robbins W.(1979). Trace elements Analysis of Food and Beverages by AAS. *Analyt. Atom. Spectro.* 2:185-286.
6. US EPA (1987). Quality Criteria for Water. EPA Publication 440/5-86-001. US Government Printing Office, Washington D.C.
7. WHO (1993). Evaluation of certain food additives and contaminants', WHO Technical Report Series Number 837, World Health Organization, Geneva.
8. Satarug S; and Moore MR. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette. *Environ. Health Perspect.* 12(10):1099.
9. Waqar A. (2004). Levels of selected heavy metals in Tuna fish. *Arab. J. Sci. Eng.* 31(1A): 19-23.
10. Atta MB; El-Sebaie LA; Noaman MA; and Kassab HE. (1997). The effect of cooking on the content of heavy metals in fish. *Food Chem.* 58:1–4.
11. Kagi JH; and Schaffer A. (1998). Biochemistry of metallothionein. *Biochem.* 27: 8509-8515.

## Mitochondrial Genome Variation within Iraqi Population

Basheer I. Azzawi (1), Abdulrahman A. Oleiwi (2), Majida J. Darweesh (2), Said Jaradat (3), & Ali Al-Zaag (1)

(1)Forensic DNA Centre / Al- Nahrain University- Baghdad/ Iraq. (2) Institute of Genetic Engineering and Biotechnology/ University of Baghdad / Iraq. (3) Princess Haya Biotechnology Center /Jordan University of Science and Technology/ Irbid/ Jordan.

### ABSTRACT

The sequence variation within the mitochondrial genomes of 153 individuals from Iraq was characterized. Hypervariable regions I and II of the D-loop control region were examined by direct sequencing. The most notable findings from the analysis of the composition of haplogroups were: (i) a high frequency of haplogroups U, M, K,H,J and W (15.3%, 8.1%,12%,16.9%,8% and 8.87% respectively), (ii) a moderate frequency of haplogroups HV,T,B, L3 and I, (6.45%, 3.22%,3.22%, 4% and 1.61% respectively) , (iii) a low frequency of haplogroups L4,L6, S and A (0.8% each) and (iiii) a lack of V, P, Y, X, O, Z, Q, G, E and C haplogroups.

**Key words:** mitochondrial DNA, haplotypes, sequencing, Iraqi population

### الملخص باللغة العربية

أظهرت نتائج التتميط لتغايرات تنابعات الدنا المايٲوكونديري لعينة مكونة من 153 فرد عراقي عن طريق الاختبار المباشر لتتابعات سلاسل الدنا ضمن مناطق التغير الفائق الأولى والثانية (Hypervariable regions I and II) في منطقة عروة الانفصال (D-loop) عن وجود سيادة لمجاميع الهابلوكروب التالية: U و M و K و H و J و W (15.3% و 8.1% و 12% و 16.9% و 8% و 8.87% على التوالي) ؛ في حين ظهرت بمستوى تردد متوسط مجاميع الهابلوكروب التالية: HV و T و B و L3 و I (6.45% و 3.22% و 3.22% و 4% و 1.61% على التوالي) ؛ بينما ظهرت مجاميع الهابلوكروب التالية: L4 و L6 و S و A (0.8% لكل منها) بمعدل تردد واطئ ؛ وكان هناك غياب تام لكل من المجاميع التالية : V و P و Y و X و O و Z و Q و G و E .

## INTRODUCTION

The earliest presence of modern humans outside of Africa has been documented in the Levant about 95–125 Kya before present, during a period of unusually warm climatic conditions (1). No subsequent modern human evidence emerges in the Levant again until 50 thousand years ago, also during a relatively warm period (2). As a link for ancient human migration between East Africa and South Asia, the Arabian Peninsula has recently attracted attention with the publication of several mitochondrial DNA (mtDNA) studies for this region (3). However, previous studies show that the bulk of the Arab mtDNA lineages have northern Neolithic or more recent Asian or African origins (4). Although a newly defined subclade L6 in Yemenis, with no close matches in the extant African populations, could suggest an ancient migration from Africa to Yemen (4), the lack of N and/or M autochthonous lineages leaves this “southern route” without genetic support. It could be that unfavorable climatic conditions forced a fast migration through Arabia without leaving a permanent track, but it is also possible that sample sizes to date have been insufficient to detect ancient residual lineages in the present day Arab populations (5). Because mtDNA is transmitted as non-recombining units through maternal inheritance, it provides an exceptional record of mutations over time. Therefore, in spite of the fact that mtDNA constitutes only a small fraction (less than 0.0001%) of total cellular DNA, it has been extensively used in elucidating the evolutionary history of anatomically modern humans through the reconstruction of prehistoric human dispersals (5). Recently, a sizeable number of mtDNA databases have been generated in many countries; however, most of the mtDNA sequence data published to date have been focused on the hypervariable region I (HVI), whereas studies on the hypervariable region II (HVII) segment remain relatively neglected (6).

The analysis of genetic polymorphism in humans is crucial for disease mapping, human anthropology and forensic applications. The aim of this study was to analyze the genetic variability of the mtDNA D-loop region in the Iraqi population, this time by including data for HVII as well as HVI.

## MATERIALS AND METHODS

Total genomic DNA was extracted from 153 blood samples using Promega DNA (Madison, WI, USA) extraction kit. The DNA was quantified using Nanodrop (Thermo 2000, USA). The HVI segments of the mtDNA D-loop region were amplified using L15996 5'-CAGTCTTGTAACCGGAGATG-3' and H16401 5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG-3' primers whereas the HVII segments were amplified by using L029 5'-CTCACGGGAGCTCTCCATGC-3' and H408 5'-CTGTAAAAAGTGCATACCGCCA-3' primers (mitochondrial universal primers). The PCR amplification was performed using a Verity ABI Thermal Cycler (Applied BioSystem, USA), the HVI and HVII amplification protocol involved an initial denaturation step of 12 minutes at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute (denaturation), 56°C for one minute (annealing), and 72°C for one minute (extension) with a final elongation for 10 minutes at 72°C to ensure complete extension of all PCR products (7).

HVI amplification resulted in a 350 base pair (bp) PCR product, whereas HVII resulted in a 400 bp fragment; the two amplified products were subjected to sequencing using the ABI 3130XL Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA). The resulting sequences were extracted using Chromas software (Technelysium Pty. Ltd., News land, Australia) and then analyzed by alignment to the revised standard reference sequence (Cambridge Reference Sequence-rCRS) by used same software. The differences haplogroups noted for all samples were reported.

## RESULTS AND DISCUSSION

The sequencing results indicate that specific variations fall into known haplotypes (Table 1), based on mitochondrial haplogroups software, where every haplogroup represents known specific mutations (8).

The results of the haplogrouping indicate the prevalence of HV, H, V, J, T, K, U, I, X, and W types (72%). This frequency is comparable to the Iranian haplogroup and Middle Eastern population, whereas it substantially differs from that observed in the Arabian Peninsula (Saudi Arabia). This overall frequency is less than Middle Eastern population values (75.1–80.4%), European population values (>90%), and more than Arabian Peninsula population values (60.4%) (9).

**Table (1): Haplogroups and their defining polymorphisms** (Error! Bookmark not defined.,Error! Bookmark not defined.).

Haplogroup	Variations
	Control regions polymorphisms(HVI and HVII)
L3	16223T
L4	16362C
L6	185C
L0	263G
S	249d
A	16233T, 16290T, 16319A, 235G
HV	16298C
T	16126C, 16294T
B	16217C, 16189C, 16159C
I	16223T, 199C, 204C, 250C
K	16224C, 16311C
H	73A and lack of CRS differences
J	16069T, 16126C, 295T
W	16223T, 189G, 195C, 204C, 207A
U	16270T
M	16223T, 16298C

Considering a single haplogroup, the incidence of haplogroup H (16.9%) is much lower than in Europeans (33–50%) but higher than in Central Asians (14%). Alternatively, the incidence of haplogroup U (15.3%) is in the range of those observed in Trans-Caucasian and European populations. The other Western Eurasian haplogroups, HV, J, K and W are all well represented (6.4% ,8.06%, 12% and 8.87% respectively), however, T and I, are rather uncommon and generally do not exceed a frequency of 3% (Table 2). In a related study (12) the incidence of haplogroups were different; HV, J, K and T were higher within the Iraqi population, while the incidence of haplogroups W and M are less; with the absence of L3 and I. consequently these variations leave the Iraqis in weak heritages of the South-West Asian and African along with a dominant autochthonous of Middle Eastern ancestry. As suggested by the presence or absence of particular haplogroups, gene flow to Iraq could have multiple origins: Europe, Africa, and Central Asia. A lack of haplogroup V is observed in Iraqi mtDNA, confirming gene flow from Europe as proposed by Torroni *et al* (10).The mtDNA M (8.1%) and B (3.22%) are most likely due to gene flow from Central Asia, whereas presence of haplogroups L (6.4%) signals mtDNA of African origin. Haplogroup L mtDNA is the mtDNA macro-haplogroup that is at the root of the human mitochondrial phylogenetic tree. As a result of this, haplogroup L represents the African mitochondrial descent for all humanity. Its origin is connected with

Mitochondrial Eve, and thus with the African origin of modern humans. Its major subclades currently include L0, L1, L2, L3, L4, L5 and L6, with L3 dominating all of non-African humanity (11). Iraq clusters with the other Middle Eastern populations, and together with Iran, occupies a central position among Arabia, Caucasus, and Europe (12). The component (J, T, pre-HV, M, and U in Table 2) separates Arabia from the others, mainly from Europe and Caucasus, being the Arabia characterized by a substantial presence of African haplogroups (10), whereas Europe and Caucasus lack the African components and harbor a high frequency of haplogroup H (13–15). The second component, which links the Iraqi and Iranian populations to each other and distinguishes them from the other Middle Eastern populations, is mainly due to the distribution of haplogroup HV and, in part to that of haplogroup U (10). The main determinant of Middle Eastern mtDNA is the presence of HV supercluster members, haplogroups H, HV, and pre-HV. In the European populations haplogroup H reaches its highest frequencies, whereas HV and pre-HV mtDNAs (when present) have a very low incidence. Haplogroup H is a descendant of haplogroup HV. The Cambridge Reference Sequence (CRS), the human mitochondrial sequence to which all other sequences are compared, belongs to haplogroup H. It is interesting to note the high frequency of haplogroups pre-HV and HV in the Arabians (18.8%) and in the Arabian Bedouins (20.6%) in which the H haplogroup shows one of its lowest values (16). These data support the hypothesis that haplogroup H originated in the Middle East where, although less frequent than in Europe, it displays the greatest heterogeneity (17). Haplogroup U has in Iraq a frequency comparable to haplogroup H(18). According to these authors, the Iraqi U5 mtDNA belongs to the highly derived European subcluster U5a1a, and is due to recent gene flow from Europe. The finding of the U6, which is typical of Berbers and North Africans (19) may be considered the result of contact with these populations. On the other hand it could also indicate a genetic connection between Southwestern Asia (Iran, Arabia, Anatolia, the two Caucasus regions, and India) and Eastern Africa (Nile Valley) where it is also found (15).

We conclude, based on the HV1 and HVII types, that the Iraqi population is similar to West Asian groups. It is more similar to European groups than Caucasus groups, and most distant from Central Asian groups (Table 2).

Table (2): mtDNA haplogroups frequency in different population

Population / Regions	Sample size	Haplogroup frequency %															
		L1	L3	X	Pre-HV	HV	V	T	B	I	K	H	J	W	U	M	others
Iraq	153	-	4	-	-	6.4	-	3.22	3.22	1.61	12	16.9	8.06	8.87	15.3	8.1	11.52
Iran <sup>a</sup>	451	Nr	2.2	2.9	5.5	5.5	-	8.4	Nr	2	7.5	17.1	13.5	2	21.5	Nr	8.6
Arabia <sup>a</sup>	389	Nr	10.5	1.8	3.6	3.6	-	4.6	Nr	0.8	3.6	12.9	20.8	1.8	10.5	Nr	6.2
Syria <sup>b</sup>	69	2.9	-	-	4.3	4.3	2.9	10.1	-	-	4.3	24.6	10.1	2.9	15.9	1.4	11.6
Palestinian <sup>b</sup>	117	0.9	-	3.4	1.7	1.7	-	12.8	-	-	6.8	30.8	9.4	2.6	7.6	1.7	15.4
Georgian <sup>c</sup>	139	-	-	10.1	7.2	7.2	0.7	12.9	-	2.2	10.1	17.3	3.6	1.4	21.6	2.9	9.3
American <sup>c</sup>	192	-	-	2.1	7.3	7.3	-	11.5	0.5	1.6	7.9	30.9	8.9	1	22.5	-	5.3
Anatolia <sup>a&amp;c</sup>	388	Nr	0.3	4.4	3.6	3.6	-	11.9	-	2.3	5.9	25	10.9	3.9	19.3	4.4	4.5
Italian <sup>d</sup>	99	-	-	3	2	2	5.1	9.1	-	4	8.1	33.3	7.1	2	22.2	-	4.1
Slav <sup>e</sup>	324	-	-	0.6	Nr	Nr	3.1	12.3	-	2.8	3.7	41.4	10.5	0.9	19.4	0.9	4.4
Finno-Ugric <sup>e</sup>	149	-	-	2	Nr	Nr	2	6	-	1.4	3.3	45.6	12.1	2.7	22.8	0.7	1.4
German <sup>f</sup>	200	-	-	0.5	Nr	Nr	2.5	8.5	-	2.5	6.5	50	7.5	1	13.5	-	7.5
C-Asian <sup>g</sup>	205	-	-	-	Nr	Nr	-	3.5	6.8	1	0.5	14	2.5	1	8	38.5	24.2
Indian <sup>a</sup>	1300	-	-	0.2	0.6	0.6	-	1.1	nr	0.6	0.2	2.4	0.8	1.5	12	nr	13.8

(20)<sup>a</sup>, (9)<sup>b</sup>, (15)<sup>c</sup>, (10)<sup>d</sup>, (21)<sup>e</sup>, (22)<sup>f</sup>, (23)<sup>g</sup>, Nr = not reported

### Acknowledgment

This study was supported by a Fund from Sandia National Laboratories (SPO 930915, 6). We are so thankful. We also thank Amanda C. Sozer of the SNA International for various scientific advice.

### REFERENCES

- Valladas H; Reyss J; Joron J; Valladas G; Bar-Yosef O; and Vandermeersch B.(1988). Thermoluminescence dating of Mousterian Proto-CroMagnon remains from Israel and the origin of modern man. *Nature*. 331:614-616.
- Mercier N; Valladas H; Bar-Yosef O; Vandermeersch B; Stringer C; and Joron J-L (1993). Thermoluminescence date for the Mousterian burial site of Es Skhul, Mt. Carmel. *J. Archaeol. Sci.* 20:169-174.
- Rowold DJ; Luis JR; Terreros MC; and Herrera RJ. (2007). Mitochondrial DNA gene flow indicates preferred usage of the Levant Corridor over the Horn of Africa passageway. *J. Hum. Genet.* 52:436-447.
- Abu-Amero KK; González AM; Larruga JM; Bosley TM; and Cabrera VM. (2007). Eurasian and African mitochondrial DNA influences in the Saudi Arabian population. *BMC Evol. Biol.* 7:32.
- Pakendorf B, and Stoneking M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet* 6:165–183.
- Pereira L; Richards M; Goios A; Alonso A; Albarran C; Garcia O; Behar DM; Golge M; Hatina J; Al-Gazali L; Bradley DG; Macaulay V A. (2005). High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res.* 15:19–24.
- Alfonso-Sánchez MA; Martínez-Bouzas C; Castro A; Pen a JA; Fernández-Fernández I; Herrera RJ; and de Pancorbo MM. (2006). Sequence polymorphisms of the mtDNA control region in a human isolate: The Georgians from Swantetia. *J. Hum. Genet.* 51:429–439.
- Butler JM. (2005). Forensic DNA Typing. Biology, Technology and Genetic of STR markers. 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier Academic Press.
- Richards M; and Macaulay V.(2000). Genetic data and the colonization of Europe: genealogies and founders. In: *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe* (eds C. Renfrew & K. Boyle), Cambridge: McDonald Institute for Archaeological Research. pp.139-151.
- Torroni A; Bandelt HJ; Macaulay V; Richards M; Cruciani F; Rengo C; Martinez-Cabrera V; Villems R; Kivisild T; Metspalu E; Parik J. *et al.* (2003). A signal from human mtDNA of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 69:844–852.
- Gonder M; Katherine HM; Reed FA; de Sousa A; and Tishkoff SA.(2006). Whole-mtDNA Genome Sequence Analysis of Ancient African Lineages. *Molec. Biol. Evol.* 24(3):757-768.
- Al-Zahery N; Pala M; Battaglia V; Grugni V; Hamod MA; Kashani BH; Olivieri A; Torroni A; Santachiara-Benerecetti AS. and

- Semino O. (2011). In search of the genetic footprints of Sumerians: a survey of Y-chromosome and mtDNA variation in the Marsh Arabs of Iraq. *BMC Evolu. Biol.* 11:288.
13. Torroni A; Petrozzi M; Durbano L; Sellitto D; Zeviani M; Carrara F; Carducci C; Leuzzi V; Carelli V; Barboni P; DeNegri A; and Scozzari R.(1997). Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.* 60:1107–1121.
14. Passarino G; Cavalleri GL; Lin AA; Cavalli-Sforza LL; Brresen-Dale AL; Underhill PA. (2002). Different genetic components in the Norwegian population revealed by the analysis of mtDNA and Y chromosome polymorphisms. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 521–529.
15. Tambets K; Kivisild T; Metspalu E; Parik J; Kaldma K; Laos S; Tolk HV; Geolge M; Demirtas H; Geberhiwot T; Papiha SS; de Stefano GF; Villems R. (2000). The topology of the maternal lineages of the Anatolian and Trans-Caucasus populations and the peopling of Europe: some preliminary considerations. In: Renfrew, C., Boyle, K. (Eds.), *Archaeogenetics: DNA and the Population Prehistory of Europe*. Cambridge, pp. 219–235.
16. Di Rienzo A; and Wilson AC. (1991). Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1597–1601.
17. Torroni A; Bandelt HJ; D\_Urbano L; Lahermo P; Moral P; Sellitto D; Rengo C; Forster P; Savontaus ML; Bonne-Tamir B; and Scozzari R.(1998). mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1137–1152.
18. Richards M; Macaulay V; Torroni A; and Bandelt HJ. (2002). In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1168–1174.
19. Macaulay V; Richards M; Hickey E; Vega E; Cruciani F; Guida V; Scozzari R; Bonne-Tamir B; Sykes B; and Torroni A.(1999). The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 232–249.
20. Kivisild T; Rootsi S; Metspalu M; Metspalu E; Parik J; Katrin K; Usanga E; Mastana S; Papiha SS; and Villems R. (2003). Genetics of the language and farming spread in India. In: Renfrew C; Boyle K. (Eds.). *McDonald Institute Monographs series*. Cambridge. UK. Cambridge.
21. Kivisild T; Kaldma K; Metspalu M; Parik J; Papiha S; and Villems R.(1999). The place of the Indian mitochondrial DNA variations in the global network of maternal lineages and the peopling of the old world. In: Papiha S; Deka R; Chakraborty R. (Eds.). *Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics*. Kluwer Academic/Plenum publishers. New York.
22. Lutz S; Weisser HJ; Heizmann J; and Pollak S. (1998). Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int. J. Legal Med.* 111:67–77.
23. Comas D; Calafell F; Mateu E; Perez-Lezaun A; Bosch E; Martinez-Arias R; Clarimon J; Facchini F; Fiori G; Luiselli D; Pettener D; and Bertranpetit J. (1998). Trading genes along the Silk Road: mtDNA sequences and the origin of Central Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1824–1838.

## Cardiac complications in the Kurdish Infants of Diabetic Mothers in Duhok

Akrem M. Atrushi

Pediatric Dept. / Faculty of Medical Sciences/ School of Medicine / University of Duhok

E-mail: ammt1975@gmail.com

### ABSTRACT

Cardiac functional abnormalities are present in up to 30% of IDMs and include intraventricular septal hypertrophy and cardiomyopathy; 10% may have frank heart failure. The intraventricular septal pathology is related directly to the degree of maternal—and thus fetal—hyperglycemia and concomitant fetal hyperinsulinemia, and it is caused by glycogen loading of the septum. It is frequently seen in association with cardiomyopathy. The study aims to assess the incidence of the cardiac complications and their types in the Kurdish infants of diabetic mothers in Duhok, North of Iraq.

Infants from 108 consecutive births to mothers with overt diabetes mellitus or gestational diabetes that took place in Duhok, North of Iraq were studied prospectively. All infants were weighed and were classified as low birth weight (<2500 grams), Large for gestational age (>4000 grams) and normal (2500-3999 grams). Echocardiographic studies were performed for all the patients. Chest X ray in erect posture was taken for all the patients. Heart failure was diagnosed in those with cardiomegaly, clinical symptoms and signs and reduced ejection fraction on echocardiographic study.

Mean maternal was 36.59 years. Diabetes was permanent in 51.8% of cases and gestational in the rest. Insulin therapy was used in 50% of mothers during pregnancy to control diabetes. The gestational age in 10 cases (9.25%) showed prematurity. Low Apgar score at birth was encountered in 7.4% of cases. A cardiac murmur was heard in 11.1% of cases. Cardiomegaly in 11.1% of cases. The mean birth weight was 3931 +/- 233 grams. The most common cardiac complication was heart failure in 66.6% of cases followed by septal hypertrophy in 41.6%, then Atrial septal defect in 16.6% and patent ductus arteriosus in 16.6%. One tetralogy of Fallot with atrial septal defect and patent ductus arteriosus and one pulmonary atresia with ventricular septal defect and aortic stenosis (8.3%) each. The study concluded that maternal diabetes is a significant risk factor for CHDs. A high incidence of CHDs was observed in this study population compared to other international studies. Early diagnosis and prompt management are important in this group of patients, as is the development of fetal diagnosis programs to detect pregnancies at risk of severe CHD.

**Keywords:** infants, diabetic mother, complication

### المخلص باللغة العربية

التشوهات القلبية الوظيفية توجد عند 30% من الرضع المولودين لامهات مصابات بداء السكر و تشمل تضخم الحاجز البطيني واعتلال العضل القلبي. عجز القلب يحدث في 10% من الحالات. اعتلال الحاجز البطيني يرتبط مباشرة بارتفاع مستوى السكر وبالنتيجة الانسولين عند الام والجنين حيث ترسب الكلايكونين يتزامن مع اعتلال العضل القلبي.

الهدف من هذه الدراسة تحديد نسبة حدوث المضاعفات القلبية وانواعها عند الاطفال الرضع المولودين للامهات الكورديات المصابات بداء السكر في دهوك شمال العراق.

شملت الدراسة الرضع المولودين لعدد 108 ولادات من امهات مصابات بداء السكر الدائمي و المرتبط بالحمل في دهوك شمال العراق. تم قياس الاوزان الولادية لجميع الرضع المشمولين و صنفوا الى قليلي الوزن (اقل من 2500 غم) وتقليبي الوزن (اكثر من 4000 غم) وطبيعيي الوزن (2500-3999غم). اجري تصوير القلب بالصدى واخذت اشعة سينية للصدر من وضع الوقوف لجميع المرضى. اعتبر المريض مصاب بعجز القلب بوجود تضخم القلب والاعراض السريرية مع ضعف الضخ الجزئي للقلب اثناء التصوير بالصدى، وقد أظهرت نتائج الدراسة أن متوسط عمر الامهات 36.59 سنة، وكان داء السكر لدى الامهات من النوع الدائمي في 51.8% من الحالات ومرتبط بالحمل في باقي الحالات. استخدم الانسولين في 50% من الحالات للسيطرة على السكر اثناء الحمل. الولادات كانت خديجة في 5.9% من الحالات. مقياس ايكار عند الولادة كان واطناً في 7.4% من الحالات. النفخة القلبية سمعت عند 11.1% من الرضع المشمولين بالدراسة. متوسط الوزن الولادي للرضع 3931-233غم. المضاعفات القلبية الأكثر شيوعاً هي عجز القلب 66.6% يليه تضخم الحاجز البطيني 41.6% ثم الفتحة الانبسية 16.6% بينما وجدت 233 كل من القناة الواصلة بين الشريانيين الأبهري والرئوي و الضمور الشديد للشريان الرئوي و الفتحة البطينية عند 8.3% من الحالات لكل منها.

## INTRODUCTION

Historically, infants born to mothers with diabetes have been at significantly greater risk for spontaneous abortion, stillbirth, congenital malformations, and perinatal morbidity and mortality (1). Cardiac functional abnormalities are present in up to 30% of IDMs and include intraventricular septal hypertrophy and cardiomyopathy; 10% may have frank heart failure (2). The intraventricular septal pathology is related directly to the degree of maternal—and thus fetal—hyperglycemia and concomitant fetal hyperinsulinemia, and it is caused by glycogen loading of the septum. It is frequently seen in association with cardiomyopathy, because septal hypertrophy can result in hypertrophic subaortic stenosis physiology and can compromise cardiac contractility. Although intraventricular hypertrophy and cardiomyopathy are frequently seen together, they are not always comorbid, which suggests that there be other causes (eg, iron deficiency) for the cardiomyopathy.

During the newborn period, the IDM with septal hypertrophy presents with symptoms of left ventricular outflow obstruction. Dehydration and hyperviscosity caused by polycythemia exacerbate the symptoms. Because the degree of impairment varies considerably, treatment needs vary from close monitoring to full cardiovascular and ventilatory support for congestive heart failure. Inotropes and hypovolemia exacerbate the condition, whereas beta-blockers relieve the outflow obstruction. Ultimately, the lesion is transient and resolves over a period of weeks to months (3).

Hypertrophic cardiomyopathy observed in the infant of the diabetic mother is characterised by thickening of the interventricular septum, and to a lesser extent the ventricular free walls. It is observed in infants of diabetic mothers whether or not there is reasonable metabolic control (4). Maternal diabetes is known to have a teratogenic effect on the cardiovascular system with a reported risk of malformation in published studies of 1.7–4.0% (5,6).

Most studies on the relationship of maternal diabetes to cardiovascular malformations (CVM) have been prospective investigations of pregnancy outcome and therefore could not identify associations with rare cardiac lesions. The results of a retrospective study shed new light on the risks of specific cardiac defects in diabetic pregnancies (7). Infants born to diabetic mothers have an increased risk of developing congestive cardiac failure. Myocardial dysfunction (tachypnoea and tachycardia) may be caused by primary cardiac disease or secondary to hypoxia, polycythaemia, or metabolic disturbances (8).

## MATERIALS AND METHODS

During the period between April 2011 and June 2013, infants from 108 consecutive births to mothers with overt diabetes mellitus or gestational diabetes that took place at the Azadi Teaching Hospital in Duhok, North of Iraq were studied prospectively. All the women were proved to have diabetes mellitus through fasting and postprandial blood glucose concentrations. Insulin was given to some diabetic mothers while the others were managed by dietary control alone.

All deliveries were attended by a pediatrician well versed in techniques of resuscitation. Apgar scoring at birth was recorded in all. All babies who had uncomplicated deliveries were nursed with their mothers in the maternity ward. All infants were weighed and were classified as low birth weight (<2500 grams), Large for gestational age (>4000 grams) and normal (2500-3999 grams). Echocardiographic studies (HP Sonos 4500/5500 equipped with an 8- to 12-MHZ/pediatric probe) were performed for all the patients. Chest X ray in erect posture was taken for all the patients and cardiomegaly was considered to be present when cardiothoracic ratio exceeded 60%. Heart failure was diagnosed in those with cardiomegaly, clinical symptoms and signs and reduced ejection fraction on echocardiographic study.

## RESULTS

### Maternal history

Maternal age ranged from 22 to 41 years (36.59 years). Diabetes was permanent in 56 cases (51.8%) and gestational in 52 cases (48.2%). Polyhydramnios was present in 24 cases (22.2%). Hypertension was present in 6 cases (5.5%) while pre-eclampsia was in 30 cases (27.7%). Sixteen mothers (14.8%) had urinary tract infections during pregnancy. Insulin therapy was used in 54 (50%) of mothers during pregnancy to control diabetes.

### Patient characteristics

The gestational age ranged from 28 to 42 weeks (mean 38.4 weeks) with 10 cases (9.25%) being premature and 98 (90.75%) full term. Low Apgar score at birth was encountered in 8 cases (7.4%). A cardiac murmur was heard in 12 cases (11.1%). Chest X ray revealed cardiomegaly in 12 cases (11.1%). The mean birth weight was 3931 +/- 233 grams. Table (1) shows details of their weight distribution.



**Table (1): Birth weight of the infants of diabetic mothers**

Birth weight	Number	Percentage %
<2500 grams	16	14.9%
2501-3999 grams	48	44.4%
> 4000 grams	44	40.7%
Total	108	100

### Echocardiographic findings

Cardiac complications were present in 12 patients (11.1%). Echocardiographic study was done in the first month of life. The most common finding was heart failure that was present in 8 cases (66.6%) followed by septal hypertrophy in 5 cases (41.6%) then Atrial septal defect in 2 cases (16.6%) and patent ductus arteriosus in 2 cases (16.6%). Two complex congenital heart diseases were present; one tetralogy of Fallot with atrial septal defect and patent ductus arteriosus and the other pulmonary atresia with ventricular septal defect and aortic stenosis (8.3%) each.

### DISCUSSION

The incidence of CHD in this cohort is notably high. It accounts for 110 per 1000 live births. Alabdulgader reported an incidence of CHD of 10.7 per 1000 live births in Saudi Arabia (8). The large population-based case-control study design of the BWIS showed that overall risk of structural heart disease given overt maternal diabetes mellitus was 3.2 times higher than the risk if maternal diabetes was not present (9,10). Mills *et al.* reported an incidence of 2.8 and 3.2% in controlled and noncontrolled diabetes mellitus patients, respectively (11). The fact that poor diabetic control and hyperglycemia are associated with an increased risk of congenital malformation in offspring is well documented (15, 21, 25, 26).

Our high incidence is due mainly to detection of minor forms of congenital heart lesions by echocardiography, which could not be detected during routine physical exam immediately after birth and during infancy. Other genetic and environmental factors may play a role. The high consanguinity rate in the Kurdish community is associated with certain CHDs such as ASD and VSD (6). Gutgesel *et al.* first reported the occurrence of HCMP in infants of diabetic mothers (13). The clinical outcome appears to relate directly to the degree of dynamic obstruction to ventricular outflow or to the degree of diastolic dysfunction. This hypertrophy most commonly involves the interventricular septum but may also involve the free walls (13,27). Other researchers suggested that either

increased fetal endogenous catecholamine production or hormonal interactions of growth hormones and insulin produced this effect (8,17). A high level of fetal insulin (hyperinsulinemia) may also explain the development of HCMP.

Weber and co-workers have shown that fetuses of diabetic mothers who were thought to be in good control, compared with normal control, had evidence of cardiac hypertrophy by measuring IVS and left/right ventricular free walls by late gestation (28). In the BWIS, the risk of cardiomyopathy among offspring of mothers with IDDM was 18 times the risk among offspring of mothers not affected. In this study 41.6% of neonates had HCMP, especially the IVS. Although the incidence of HCMP is high, no significant left ventricular outflow tract obstruction occurred. Our population showed an increased incidence but a milder clinical course. Reller and coworkers reported that early treatment and control of diabetes mellitus in pregnancy improve the clinical outcome but do not prevent the development of the disease (23). Various forms of severe CHD have been reported in IDM with a particular predisposition to D-transposition of great arteries, hypoplastic left heart syndrome, tetralogy of Fallot, and pulmonary/tricuspid atresia (15, 26, 28-30).

### CONCLUSION

The findings in this study are consistent with previous observations. The most common CHD seen in this study after septal hypertrophy are atrial septal defect and patent ductus arteriosus. Heart failure was diagnosed in 66.6% of cases with cardiac complications. Maternal diabetes is a significant risk factor for CHDs. A high incidence of CHDs was observed in this study population compared to other local and international studies. Early diagnosis and prompt management are important in this group of patients, as is the development of fetal diagnosis programs to detect pregnancies at risk of severe CHD.

### REFERENCES

1. Kicklighter SD.(2001). Infant of diabetic mother.E-medicine. [www.emedicine.com/ped/topic485.htm](http://www.emedicine.com/ped/topic485.htm)
2. Georgieff MK.(1995). Therapy of infants of diabetic mothers. In: Burg FD; Ingelfinger JR; Wald ER; and Polin RA. Current pediatric therapy. 15<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 793– 803.
3. Nold JL; and Georgieff MK.(2004). Infants of diabetic mothers. *Pediatr. Clin. N. Am.* 51: 619– 637.
4. Hornberger LK.(2006). Maternal diabetes and the fetal heart. *Heart.* 92(8):1019–1021.

5. Ferencz C; Rubin JD; and McCarter RJ. (1990). Maternal diabetes and cardiovascular malformations: predominance of double outlet right ventricle and truncus arteriosus. *Teratol.* 41:319–326.
6. Becerra JE; Khoury MJ; and Cordero JF. (1990). Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediat.* 85:1–9.
7. Serrato M; Yeh TS; and Harris V. (1979). A prospective study on cardiopulmonary findings in infants of diabetic mothers. *Riviste Italiana di Pediatria.* 5:59–63.
8. Becker SM; Al Halees Z; and Paterson R. (2001). Consanguinity and congenital heart disease in Saudi Arabia. *Am. J. Med. Genet.* 99:8–14.
9. Chung CS; and Myrianthopos NC. (1975). Effects of maternal diabetes on congenital malformations. *Birth. Defects.* 11:23–58.
10. Criley JM; Lennon PL; and Abbasi AS. (1976). In: Levine H (ed). *Clinical cardiovascular physiology.* Grune and Stratton. New York, pp 771–827.
11. Ferencz C. (1990). A case-control study of cardiovascular malformation in live born infants: the morphogenic relevance of epidemiological findings.. In: Clark EB, Takao A (Eds.), *Developmental cardiology: Morphogenesis and function.* Future, Mount Kisco, NY, pp 523–539.
12. Ferencz C; Rubin JD; McCarter RJ; and Clark EB. (1990). Maternal diabetes and cardiovascular malformations: Predominance of double-outlet right ventricle and truncus arteriosus. *Teratol.* 41:319–326.
13. Gladman G; McCrindle B; Boutin C; and Smallhorn J. (1997). Fetal echocardiographic screening of diabetic pregnancies for congenital heart disease. *Am. J. Perinat.* 14:259–262.
14. Goldman JA; Dicker D; and Feldberg D. (1986). Pregnancy outcome in patients with insulin-dependant diabetes mellitus with preconception diabetic control: A comparative study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155:293–297.
15. Gutgesell HP; Mullins CE; and Gillette PC. (1976). Transient hypertrophic subaortic stenosis in infants of diabetic mothers. *J. Pediat.* 89:120–125.
16. Heinonen OP. (1976). Risk factors for congenital heart disease: A prospective study.. In: Klell S (Eds.), *Birth defects, risks and consequences.* Academic Press. New York. pp 221–264.
17. Kitzmiller JL; Cloherty JP; and Younger MD. (1978). Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 131:560.
18. Maron BJ; Clark CE; and Epstein SE. (1977). Asymmetric septal hypertrophy: Echocardiographic identification of the pathognomonic anatomic abnormality of IHSS. *Circulation.* 47:233.
19. Maron BJ; Edward JE; and Henry WL. (1974). Asymmetric septal hypertrophy in infancy. *Circulation* 50:809.
20. Menutti MT. (1985). Tetralogy and genetic counseling in the diabetic pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* 28:486–495.
21. Miller E; Hare JW; and Cloherty JP. (1981). Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *N. Engl. J. Med.* 304:1331–1334.
22. Mills J; Knopp R; and Simpson J. (1988). Lack of relation of increased malformation rate in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis. *N. Engl. J. Med.* 318:671–676.
23. Mills JL; Baker L; and Goldman AS. (1979). Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week: Implications for treatment. *Diabet.* 28:292–293.
24. Mills JL. (1982). Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratol.* 25:385–394.
25. Reller MD; Tsang RC; and Meyer RA. (1985). Relationship of prospective diabetes control in pregnancy to neonatal cardiorespiratory function. *J. Pediat.* 106:86–90.
26. Rowland TW; Hubbell JP; and Nadas AS. (1973). Congenital heart disease in infants of diabetic mothers. *J. Pediat.* 815–820.
27. Shields LE; Gan EA; and Murphy HF. (1993). The prognostic value of hemoglobin A1c in predicting fetal heart disease in diabetic pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 81:954–957.
28. Soler NG; Soler SM; and Malins JM. (1978). Neonatal morbidity among infants of diabetic mothers. *Diabet. Care.* 1:390.
29. Way GL; Wolfe RR; and Eshagpour E. (1979). The natural history of Hypertrophic cardiomyopathy in infants of diabetic mothers. *J. Pediat.* 95:1020–1025.
30. Weber HS; Copel JA; and Reece EA. (1991). Cardiac growth in fetuses of diabetic mothers with good metabolic control. *J. Pediat.* 118:103–110.

## Demographic study on rheumatoid arthritis (RA) in Babylon-Iraq

Amina N. Al-Thwani & Ibtisam A. I. El-Baghdady

*Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Post Graduations Studies /Baghdad / Republic of Iraq*

### ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder of unknown etiology despite therapy, may result in progressive joint destruction, deformity that lead to disability, and even premature death in some cases. The demographic study to the disease revealed that RA has more incidence in females than males with a ratio 4.2: 1 (female: male) with a higher incidence at age range (30-50) than young and elderly people. Also showed that RA has no association with the blood group according to tested specimen and increase in incidence in the subjects having family history with RA and subjects having diabetes mellitus type 2.

---

**Keywords:** rheumatoid arthritis, disability, blood group phenotype

### الملخص باللغة العربية

التهاب المفاصل الرثواني متلازمة مناعية المنشأ اسبابها مجهولة، وبالرغم من العلاج قد تتسبب في المراحل المتقدمة باتلاف المفاصل وتشوهها مما يؤدي الى الاعاقة وحتى الموت المبكر في بعض الاحيان. اشارت الدراسة الديموغرافية للمرض الى ان المرض اكثر انتشارا عند النساء مما هو عند الرجال بنسبة 4.2: 1 (انثى: ذكر) والى انه اكثر انتشار في الفئات العمرية بين-50 (30) منه في الاعمار الصغيرة وكبار السن. كما اظهرت الدراسة عدم وجود علاقة بين اصناف الدم والاصابة بمرض التهاب المفاصل الرثواني ضمن العينة المدروسة ووجود زيادة في نسبة الاصابة بالمرض عند الاشخاص الذين لهم تاريخ عائلي بالاصابة و الاشخاص المصابين بداء السكري النمط الثاني.

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a complex, systemic, chronic inflammatory with autoimmune features which is associated with significant disability and early mortality; it affects approximately 1% of the population worldwide and is therefore one of the most common autoimmune diseases (AID) (1). Rheumatoid arthritis characterized by inflammation of joints, progressive destruction of the synovial joints and subsequent cartilage damage leading to pain, long term disability, and reduced quality of life in many patients despite therapy (2). Rheumatoid arthritis is not a rare disease in Iraq it has been previously demonstrated its presence in Iraqi population with more frequency in women than men (3,4). The etiology of Rheumatoid arthritis remains largely unknown, although it is established as a multifactorial disease resulting from a complex interplay between genetic and environmental factors (5). Low concordance rates between monozygotic twins emphasize the importance of environmental factors in RA susceptibility otherwise monozygotic twins would have a 100% concordance (6).

Environmental factors can be classified as regional environmental factors, including geography, climate, endemic microbes, and socio-cultural environmental factors, such as lifestyle, smoking and dietary habits (7).

Long-term smoking remains the only validated environmental factor that contributes to an increased risk of developing seropositive RA, other studies have implicated other potential environmental risk factors including hormones, pollution, diet, infectious agents and Trauma, including surgery, may precipitate the initial symptoms and is often identified by patients in retrospect as a potential trigger (8,9).

There are different regimens used to treat RA including traditional non biological treatments and the recently used biological treatment (10). For the mentioned above reasons this study was planned to the association of RA with age, gender, risk factors and treatment in a sample of Iraqi RA patients.

## MATERIALS AND METHODS

The study was carried out from October 2012 till May 2013 on 108 subjects divided into two groups. The first group consist of 75 Iraqi rheumatic arthritis patient selected from RA patients attended the consulting clinic of

Mergan Hospital in Babylon, who have previously diagnosed with RA for at least three months.

The second group composed from 33 subjects of apparently healthy individuals from different Iraqi populations were selected randomly with no RA symptoms as joint pain, swollen joints, morning stiffness that were stated classification of RA and they had no family history of RA.

Serum samples from all healthy subjects were used to detect the presence of rheumatoid factor through RF latex kit (Sinreact, Spain), and blood from both of the healthy subjects and patients were used to detect ABO blood groups. Questionnaires were applied to both groups in order to obtain data concern: gender, age, presence of RA risk factors (smoking, presence of other autoimmune diseases, presence of family history of RA, and presence of other genetic diseases), and type of treatment.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The Distribution According to Gender

The demographic study revealed that there is a significant difference in distribution of RA patients according to gender, because 19.17% of the samples were males while 80.281% were females, as shown in table (1).

The overall ratio of male: female in this study was 1:4.2. Other studies in Iraq reported similar results (3) who reported that the percentage of disease incidence in male and female at a ratio 1:5.2, while (11) reported high disease incidence in female in compares to male with ratio was 5.27:1. Higher incidences of RA in female were reported by (12), (13) and (14). The ratio was 5.8:1, 11:1 and 6.1:1 respectively. In contrast to these results, Naji *et al.* (15) and Al Rubaye *et al.* (16) revealed higher incidence of RA in male than females in Baghdad, the ratio was 1.5:1 and 1.6:1 in male: female respectively.

The high incidence of RA among women than men have been previously reported in many geographic areas of Iraq like Baghdad (4,13,14), Babylon (17), Mosul (18), and Basrah (19).

The difference between the ratios which stated in most of researches, may be attributed to the small number of cases involved in these studies, while the higher frequency of the disease among females rather than males which stated in most articles, that attributed to

the hormonal differences between them and in turn, their effects on the immune responses, those make women tend to mount more T helper-1 responses which are proinflammatory, hence may enhance the development of autoimmunity (20).

Many studies have been done to detect the possible association between the gender differences (hormonal effect) and disease activity, characteristics and even response to different treatments and morbidity due to the complication of the disease, which found that the disease progression is more aggressive in women than men and women during pregnancy shows remarkable improvement and also the disease increase the mobility due to extra-articular RA complication in men (21,22).

#### The Distribution According to Age

Table (1) Reveals that the distribution of RA according to the age was higher in patients between (31-50) (60%), followed by group of patients between (51-70) (29.33%). About 80% of people with RA are diagnosed between the ages of 35-50. RA appears to run in families, although certain factors in the environment may also influence the development of the disease (23).

The current results come in accordance with the results of other studies, like the study of Manhal (24) who showed that (26%) patients were between 16-30 yrs age group, (54%) patients were between (31-50) yrs age group, and (20%) patients were between (51-70) yrs age group, and the results of Abdullah (25) who found that most of patients (57 %) were located within the range (41-60) yrs., while Merza (26) showed that (17%) were in age lower 35 years, (41%) were in age (35-55) yrs and, (42%) were in age above 55 yrs, which differed somehow from the current study results.

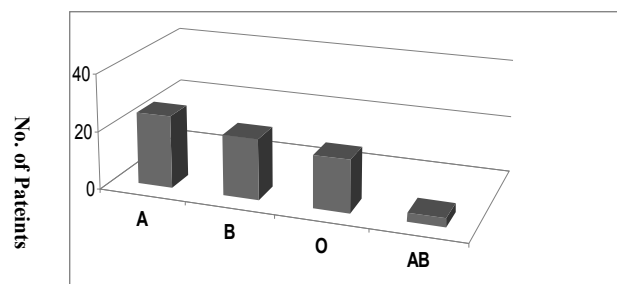
**Table (1): Distribution of RA patients according to age and gender**

Patients Age (Years)	Male		Female		Total	
	No.	%	No	%	No	%
10-30	1	7.14	7	11.47	8	10.66
31-50	9	64.28	36	59.01	45	60
51-70	4	28.57	18	29.50	22	29.33
Total	14	100	61	100	75	100

#### Relation between RA and Blood group

ABO blood groupings were determined for all the samples of patients and control group. The distribution of blood group phenotypes in total subjects was presented in figure (1).

The most frequent blood group phenotype in RA patients, was "A" with a percentage 38.35% followed by the blood group phenotypes, "B" with a 32.87% then phenotype "O" which had reached to 24.65% from the total count. Lately, the "AB" phenotype with the lowest percentage among the others, 4.10%, there was no significant association between blood groups and RA because the control shared a similar picture of the patient blood group.



**Fig. (1): The distribution of RA patients by blood group phenotype**

The current results are somehow similar to the results of Stoia *et al.* (27) who found that the distribution of blood group in Romanian RA patients in 1967 was "A", 42.22%, "B" 20.54%, "O" 30.10% and "AB" 7.13% and disagree with the findings of Papiha *et al.* (28), who found that in United Kingdom RA patients "O" blood group represent the highest

percentage 51.11%, "A" blood group 39.11%, "B" blood group 7.54% and "AB" blood group 2.66%.

However, there were no previous studies found an association between ABO blood groups and incidence of RA, but there were several previous studies in Iraq detected the presence of association between ABO blood group and some genetic disease like the study of Al-Shamma *et al.* (29) who studied the association of ABO blood group and bronchial asthma in Najaf Governorate and found that there is an increase in the incidence of bronchial asthma in subjects having O blood group, and the study of Hassab *et al.* (30) who found an increase in the incidence A blood group in beta thalassaemia patients in Baghdad, also the study of Al-Ali (31) increase of O blood group among diabetic and hypertension patients in Basrah.

#### **The Distribution according to the risk factors**

The distribution of RA patients was investigated according to the risk factors, such as family history with RA, other autoimmune diseases like asthma, smoking and presence of diabetes mellitus (DM) type 2 because they increase incidence of RA.

The ratio of patients with family history of RA and autoimmune disease (asthma) was 37.33% and 9.33% respectively.

There were no previous studies about the association of family history of autoimmune disease and RA in Iraq. Anyhow, Virella (32) mentioned that the incidence of familial rheumatoid arthritis is low, and only 15% of the identical twins are concordant for the disease.

However, 70–90% of Caucasians with rheumatoid arthritis express the HLA DR4 antigen, which is found in no more than 15–25% of the normal population. Individuals expressing this antigen are 6 to 12 times more at risk for having RA, but HLA-DR 1 was also found to increase susceptibility to RA and wide fluctuations in the frequency of these markers are seen between different patient populations (32). In Iraq Abdullah (25) reported the presence of highly significant frequencies of HLA-DR4 and DR53 antigens in RA patients.

The idea that there are genes predispose to multiple autoimmune diseases has been around for many years. Indeed, both the HLA region and the PTPN22 gene were known to be associated with multiple autoimmune diseases, overlap has also been identified for multiple

loci across a number of autoimmune diseases. All of the confirmed RA loci identified to date have also been associated with juvenile idiopathic arthritis (33).

Considerable overlap exists between loci identified for type 1 diabetes mellitus, celiac disease, Graves' disease, and RA, suggesting that multiple risk factors influence the breakdown of self-tolerance and the onset of autoimmunity. It is likely that RA specific loci exist, but of those tested so far, none has been associated exclusively with RA, with the possible exception of the shared epitope (34).

The percent of smoker among the studied group was very small (6.66%) that why it is cannot be considered important factor according to our data this small percentage of smoker in the studied subjects due to the fact that men subject, the main smokers, were low number and because of the ethical and social traditions of Iraqi people which restrict smoking among women who were high number among patients.

Smoking is interesting environmental risk factor for RA, there are different compounds in smoke may have different actions, it was demonstrated that smoking was a risk factor mainly in RF positive but not in RF negative RA, and that the disease risk conferred by smoking was greatly enhanced in individuals carrying some allelic forms of the major histocompatibility antigens, more precisely the shared epitope of HLA-DRB1: HLA-DRB1 SE (35).

Källberg *et al.* (36) suggested that smoking triggers a reaction in immuno-tolerance which can promote the onset of RA in people who have certain types of antibodies called anti-citrulline antibodies. Citrulline is an amino acid which affects proteins in the body and these proteins, modified with citrulline, are linked to the development of RA.

In a person with the correct genetic predisposition, chemicals from smoking activate an enzyme called peptidylarginine deiminase type 2, and the activation of this enzyme causes a biochemical change in the body's own proteins. This change is called citrullination. The citrullination stimulate neopeptides to form, which the immune system falsely identifies as foreign. These genetically susceptible individuals then form anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPAs) to fight the altered proteins, which lead to the eventual onset of rheumatoid arthritis, although ACPAs can be present years before the first clinical symptoms of

rheumatoid arthritis appear. Essentially, if a person inherits two copies of the genes that most strongly predispose to rheumatoid arthritis, and is a smoker, and is positive for ACPAs, then their risk of developing rheumatoid arthritis is 21 times greater than that of a non-smoker who doesn't have the genes (35,37).

According to the results in table (2), we found increase incidence of RA among Diabetes Mellitus (DM) type 2 patients (29.33%).

Similar association was found in a study done in the Specialized Center for Endocrinology and Diabetes, Al-Risafa Baghdad, 2011 in which also found an increase of the incidence of RF factor among DM patients comparing with healthy control, and explain it by the presence of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  which has been closely linked to obesity and insulin resistance it also play an important role in chronic inflammatory and autoimmune diseases like rheumatoid arthritis (38).

Raised levels of systemic inflammation have also been shown to predispose to developing both insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (DM). In the case of the latter, Pradhan and colleagues reported that the development of type 2 DM in women was predicted by elevated levels of C reactive protein (CRP) and interleukin, both markers of systemic inflammation (39).

The potential role of insulin resistance as a cardiovascular risk factor in patients with inflammatory arthritis has been examined by Svenson *et al.* (40) who reported impaired glucose handling in a sample of RA patients compared to controls. These investigators also found evidence of an inverse relationship between insulin sensitivity and acute phase markers in RA. Also significantly higher levels of insulin resistance in patients with inflammatory arthritis compared with controls, and an association between high CRP concentrations and insulin resistance were conferred by Doran (39).

**Table (2): The distribution of patients according to the risk factors**

Risk factor	Male		Female		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
History with RA	1	7.14	27	44.26	28	37.33
Asthma	1	7.14	6	9.83	7	9.33
Smoking	3	21.42	2	3.27	5	6.66
DM*	4	28.57	18	29.50	22	29.33
Total	14		61		75	

\*DM: Diabetes Mellitus

### Rheumatoid arthritis treatment

There are different drug regimens currently used for rheumatoid arthritis involve glucocorticoid like prednisone, disease modifying drugs like azathioprine and methotrexate, and biological treatment like infliximab and etanercept. The treatment usually involve one of the mentioned regimens or may involve combination of different drugs such as biological and disease modifying anti-arthritis drugs (DMARD) combination of prednisolone and MTX combination.

The subjects involved in our study were taken two regimens MTX in 42 cases (57.53%) and prednisone in 31 (42.46%) cases and few cases (four) taken combination of both regimens we could not find any patient taken biological treatments or any untraditional alternative medicine treatments like acupuncture or hypnosis.

The reason for this patients distribution may be that the subjects involved in the study were attending to the consulting clinic for joints of Merjan hospital in which the physician describe only these drugs.

Also, the biological treatment like TNF inhibitor or TNF blocker have limited usage in Iraq and limited to certain hospitals due their high economic cost and strict storage as constant temperature and because of the high risk of infections in their users due to their action that lead to decrease the immunity in the patients especially in immunocompromised patient and elderly. These facts have been demonstrated by many studies such as Borg (41), Lai and Chen (42), Fleischmann (43) and Furst (44).

The facts that MTX is the drug of choice for the treatment of RA in low doses which is known to be a potent anti-inflammatory and immunosuppressant agent that acts by decreasing cell proliferation, increasing

adenosine release, and inhibiting enzymes of folate metabolism. Morgan *et al.* (45) Cronstein (46) Halilova *et al.* (47), found that in patients with polymorphism in G80A in the reduced Folate Carrier which decrease its effect due to reduce uptake in B- and CD4 T-cells (48,49), and low percent of patients with increase toxicity who have C677T and A1298C Methylentetrahydrofolate gene (MTHFR) polymorphism and need monitoring to prevent toxicity as reported by (50) and (49), and Methotrexale side effects can be minimized by concomitant use of folic acid as supplement for MTX patients as mentioned by (50) and (51).

## REFERENCES

1. Yüksel-Konuk B; and Baltac V. (2009). Current Advances in the Genetic Basis of Rheumatoid Arthritis. *Turk. J. Rheumatol.* 24: 218–221.
2. March L; Rada J; Haesler E; and Jasper A. (2009). Early rheumatoid arthritis: a literature review of recent evidence. The Royal Australian College of General Practitioners.
3. Al-Thuwani NA; Abdullah NH; Nadir IM; and Al-Badri K.(2012). Diagnostic value of anti-CCP antibodies compared with Rheumatoid factor in Rheumatic Arthritis Patients . *J. Univ. Anbar pure sci.*; 7 (1):22-29.
4. Al-Taaee QR. (2012). Immunological and Physiologycal Study for Sample of Rheumatiod Arthritis Patients. *MSC. thesis* , collage of science, University of Al-Anbar.
5. Allister K; Eyre S; and Orozco G. (2011). Genetics of rheumatoid arthritis: GWAS and beyond. *Open Access Rheumatology. Res. Rev.* 3:31–46.
6. Alamanos Y; and Drosos AA. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4:130–136.
7. Perricone C; Ceccarelli F; and Valesini S. (2011). An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. *Aut. Rev.* 10: 599–608.
8. Kilimozhi C; Parthasarathy V; and Upendar K. (2010). Arthritis: A Review of Clinical Features, Differential Diagnosis and Treatments. *Int. J. Pharm. Technol.* 2: 1 – 40.
9. Tobón GJ; Youinou P; and Saraux A.(2010). The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 35:10–14.
10. Pisetsky DS; and Ward MM. (2012). Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 26: 251–261.
11. Gorial F. (2012). Validity and reliability of CDAI in comparison to DAS28 in Iraqi patients with active rheumatoid arthritis. *Fac. Med. Baghdad.* 54:231–233.
12. Tawfeeq H; and Ali J.(2012). Assessment of Liver Enzymes Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis in Nineveh province. *Tikrit J. Pharmaceut. Sci.* 8:138–144.
13. Ali A; and Jasim M. (2011). Performance of Anticyclic Citrullinated Peptide Antibodies versus Rheumatoid Factor in diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Diyala J. Med.* 1:81–90.
14. Abbas N; AL- Obeidy E; AL- Naim S; and Kadim A. (2006). Correlation between some immunological parameters and clinical presentation in RA patients. *J. Fac. Med. Baghdad.* 48: 293–296.
15. Naji Z; Mohammed Sh; and Muhammad M.(2012). Uric Acid as a Natural Scavenger of Peroxynitrite in a Sample of Iraqi Patients with Rheumatoid Arthritis. *Iraqi. J. Pharm. Sci.* 21:51–55.
16. Al-Rubaye M; Abdul-Qader S; Abdul-Majeed N; and Kamil L. (2012). The Role of Anti- Cathapsin G among Patients with R A. *Fac. Med. Baghdad.* 54:68–72.
17. Umran H.(2010). Hepatic Toxicity in Patients with Rheumatoid Arthritis and Those with Psoriasis taking Methotrexate Therapy. *Med. J. Babylon.* 7: 130–139.
18. AL-Jammas M; and AL-Khan H. (2008). Activity of the Enzymes: Alkaline Phosphatase, 5-Nucleotidase and Acetylcholine Esterase in the Blood and Synovial Fluid for Some Rheumatoid Arthritis Patients. *Uloom AlRafidain J.* 19:26–36.
19. Al-Ali H.S. (2008). Association of ABO and Rh Blood Groups with Diabetes Mellitus and Hypertension in Basrah. *Basrah J. Sci.* 26: 29–37.
20. Kindt T; Goldspy R; and Osborne B. (2007). HLA. In: Kuby Immunology. 6th edition. WH Freeman and company. New York. pp:401–21.
21. Sokka T; Sergio TS; Cutolo M; Kautiainen H; Makinen H; Gogus F; Skakic V; Pincus T; and the Quest-RA Group. (2009). Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis. Res. Ther.* 11(1): R7.
22. Vollenhoven RF. (2009). Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. *BMC Med.* 7(12): 1 – 4.



23. Carrasco R; and Barton A. (2010). Biomarkers of outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Rep.* 2: 26–28.
24. Manhal F. (2009). Cytokine Profile in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Fac. Med. Baghdad.* 51:433–436.
25. Abdullah NH. (2011). Evaluation of Some Immunogenetic Markers of Rheumatoid Arthritis in Samples of Iraqi Patients. PhD thesis / the Institute of genetic and biotechnology. University of Baghdad.
26. Merza R. (2009). Hand Deformities in Patients with Rheumatoid Arthritis. *MMJ.* 8:27–32.
27. Stoia I.; Ramneantu R; and Poitas M. (1967). Blood Groups ABO and Rh (D) Factor in the Rheumatic Diseases. *Annals Rheum. Dis.* 26:332–333.
28. Papiha S; Lanchbury J; and Pal B. (1986). Genetic structure of the population with rheumatoid arthritis in north east England: a genetic approach to define different subtypes. *Annals Rheum. Dis.* 45: 881–891.
29. Al-Shamma YMH; Al-Zubaidy A M; and Al-Turjomand SMA. (2008). The Association of Bronchial Asthma to (ABO) Blood Groups in Najaf Governorate. *Kufa Med. J.* 11: 234–245.
30. Hassab ZS; Abdullah NF; and Saleh YA.(2010). Polymorphism of ABO and MNS Blood Group Systems in Beta-Thalassemia. *Iraqi J. Cancer Med. Genet.* 3(2): 65– 69.
31. Virella G. (1998). Introduction to Medical Immunology. 4<sup>th</sup> ed.. MARCEL DEKKER, INC. p.298.
32. Hinks A; Worthington J; and Thomson W. (2006). The association of PTPN22 with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol.* 45:365–368.
33. Barton A; and Worthington J.(2009). Genetic Susceptibility to Rheumatoid Arthritis: An Emerging Picture. *Arthritis Rheuma.* 61: 1441–1446.
34. Klareskoga L; Padyukova L; and Alfredsson L. (2007). Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Opin. Rheumatol.* 19:49–54.
35. Källberg H; Ding B; Padyukov L; Bengtsson C; Rönnelid J; Klareskog L; Alfredsson L; and EIRA Study Group (2011). Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Annals Rheum. Dis.* 70: 508–511.
36. Klareskoga L; Stolt LK; Källberg H; Bengtsson C; Grunewald J; Rönnelid J; Harris H; Ulfgren A; Rantapää-Dahlqvist S; Eklund A; Padyukov L; and Alfredsson L.(2006). A New Model for an Etiology of Rheumatoid ArthritisSmoking May Trigger HLA–DR (Shared Epitope)–Restricted Immune Reactions to Autoantigens Modified by Citrullination. *Arthritis Rheuma.* 54: 38–46.
37. Salih R; Al-Gharawi A; and Al-Lehibi K. (2012). The Correlation between Hyperglycemia and Rheumatoid Factor in Type 2 Diabetic Patients in Al- Risafa Area, Baghdad. *Iraqi J Pharm. Sci.* 21:105–111.
38. Doran M. (2007). Rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: evidence for an association. *J. Rheumatol.* 34:460–462.
39. Svenson KL; Pollare T; Lithell H; and Hallgren R. (1988). Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: relationship to peripheral insulin resistance. *Metabol.* 37:125–130.
40. Borg AA. (2006). Biologic treatments in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Malta Med. J.* 18: 20-24.
41. Lai HM; and Chen CJ. (2008). Biologics in the treatment of rheumatoid arthritis: recent advances. *Formosan J. Rheumatol.* 22:12–24.
42. Fleischmann RM. (2009). Safety of Biologic Therapy in Rheumatoid Arthritis and Other Autoimmune Diseases: Focus on Rituximab. *Arthritis Rheum.* 38:265–280.
43. Furst ED. (2010). The Risk of Infections with Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Semin. Arthritis. Rheum.* 39:327–346.
44. Morgan S; Oster RA; Lee J; Alarcon GS; and Baggott JE. (2004). The effect of folic acid and folinic acid supplements on purine metabolism in methotrexate-treated rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50: 3104– 3111.
45. Cronstein B. (2005). Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Pharmacol. Rev.* 57:163–172.
46. Halilova KI; Brown E; Morgan SL; Bridges SL; Hwang MH; Arnett DK; and Danila MI. (2012). Markers of Treatment Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Where Do We Stand? *Int. J. Rheumatol.* 978396; Epub.
47. Baslund B; Gregers J; and Nielsen C. (2008). Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B and CD4 T cells. *Rheumatol.* 47:451–453.

48. Bilginer Y; Utine E; Kasapçopur Ö; Gülhan B; Demirkaya E; Topaloğlu R; Düzova A; Özaltın F; Alikışifoğlu M; and Özen S. (2011). Influence of Reduced Folate Carrier and Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide Transformylase gene polymorphisms on the efficacy of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Pediat. Rheumatol.* 9 (Suppl. 1): 120.
49. Aggarwal P; Naik S; Mishra KP; Aggarwal A; and Misra R. (2006). Correlation between methotrexate efficacy and toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J. Med. Res.* 124: 521–526.
50. Tasbas Ö; Borman P; Karabulut HG; Tükün A; and Yorgancıoğlu R. (2011). The Frequency of A1298C and C677T Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Gene in Turkish Patients with Rheumatoid Arthritis: Relationship with Methotrexate Toxicity. *Open Rheumatol. J.* 5:30–35.
51. Weisman MH; Furst DE; Park GS; Kremer JM; Smith KM; Wallace DJ; Caldwell JR; and Dervieux T. (2006). Risk Genotypes in Folate-Dependent Enzymes and Their Association With Methotrexate-Related Side Effects in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheuma.* 54: 607–612.

## Molecular subtypes of Breast Carcinoma using Immunohistochemical stains in Central Public Health Labs

Anwar I. S. Al- Assaf (1), Rana Z. Naji (2), & Ali H.M. Al- Khafagi (2)

(1) Dept. of Biology / College of Education / Baghdad University. (2) Dept. of Histopathology / Central Public Health Labs. / Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous group of disease. Steroid hormone receptors (estrogen ER and progesterone receptors PR) & epidermal growth factor receptor (HER2/neu) are used to study the gene molecular profile of breast cancer in addition to Ki67 which is the most important proliferation marker. The objective of this study is to evaluate the role of four biomarkers (ER, PR, Her2/neu & Ki67) in molecular classification of breast cancer patients. The study involved 79 cases with breast carcinoma taken from teaching labs/medical city and histopathology department of central public health labs both located in Baghdad/Iraq. Sent for immunohistochemical assessment of hormonal status and HER2/neu at the central public health labs /Baghdad/ Iraq, cases were reviewed by single pathologist for assessment of the diagnosis, tumors were typed according to the WHO classification of breast tumors and grading was done according to the Nottingham modification of BLOOM-RICHARDSON grading system. The age group of patients ranged from 30-73 years with an average of 48.4, clinical and pathological features were studied, the most common molecular subtype of breast carcinoma was triple negative subtype (38%) followed by luminal B (27.8%) then luminal A 24.1% finally HER2 subtype 10.1%, Ki67 is a well established cell proliferation biomarker in cancer, so adding this marker to standard biomarkers is useful to identify the non identified type of breast cancer using these markers alone.

**Keywords:** molecular subtype, breast carcinoma, immunohistochemical stains

### الملخص باللغة العربية

يعتبر سرطان الثدي ورم متنوع ويعد السبب الأول في الوفيات بين النساء في مراحل عمرية مختلفة. البحث هو دراسة استرجاعية لتسعة وسبعين حالة من حالات سرطان الثدي الموضعي و الانتشاري لمريضات عراقيات، تم جمعها من المختبرات التعليمية لمدينة الطب و شعبة النسيج المرضي في مختبر الصحة العامة المركزي في بغداد ابتداء من شهر شباط (فبراير) 2012 حتى شهر آب (أغسطس) 2012، و تم صبغ الحالات السرطانية بمعلّقات الأورام السرطانية الخاصة بالمستقبلات الهرمونية الأستروجين و البروجسترون و صبغة عامل نمو البشرة HER2/neu، وتم إضافة صبغة العامل التكاثري KI67، الغرض من البحث هو دراسة أنواع سرطان الثدي وتصنيفها جزيئياً اعتماداً على العامل التكاثري KI67 وبمساعده صبغات معلّقات الأورام السرطانية المحددة لهذه الدراسة.

تمت دراسة الحالات المرضية للمراحل العمرية 30-73 سنة وبلغ متوسط العمر 48.4 سنة، كذلك تمت دراسة الصفات السريرية- المرضية لجميع الحالات السرطانية. وجد أن أكثر أنواع السرطان شيوعاً هو سرطان الثدي الثلاثي السالب TRIPLE NEGATIVE بنسبه 38% يعقبه سرطان الثدي القنوي نوع B بنسبه 27.8% ثم سرطان الثدي القنوي نوع A بنسبه 24.1% وأخيراً سرطان الثدي الموجب لعامل النمو البشري Her2/neu بنسبه 10.1%. إن العامل التكاثري KI67 له دور في تصنيف سرطان الثدي وإظهار الأنواع الجزيئية منه والتي لا يمكن تصنيفها اعتماداً على صبغات معلّقات الأورام السرطانية الخاصة بالمستقبلات الهرمونية الأستروجين والبروجسترون وصبغه عامل نمو البشرة Her2/neu فقط.

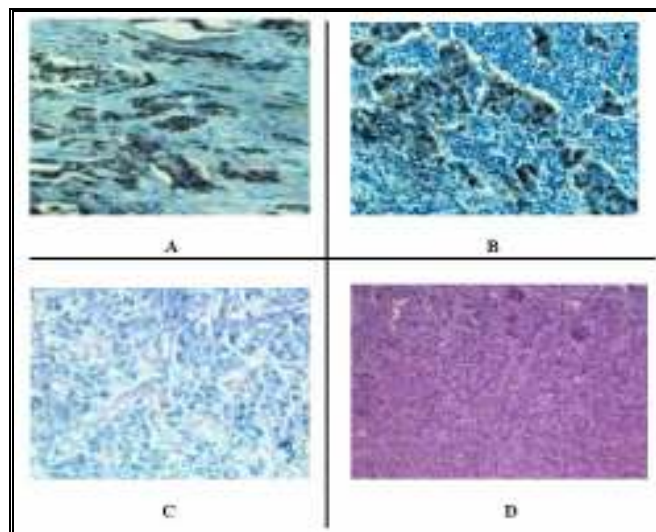
## INTRODUCTION

Breast carcinoma has become the most common malignancy in female population affecting one in eight women and it's one of the leading causes of death among females (1,2). In Iraq, it's considered number cancer among the top ten cancers (15.3% according to the published data of Iraqi cancer board registry 2006). Breast carcinoma is a heterogeneous disease; several prognostic factors are known to predict its biological behavior and clinical outcome of breast including proliferation index, tumor size, histological grade, age, steroid hormones receptors and her 2 status. Among them, the proliferation index is the most important parameter in predicting aggressiveness and prognosis in breast carcinoma (3). The importance of several molecular markers in breast cancer has been of considerable interest during recent years, not only as prognostic makers, but also as predictors of response to therapy. Especially the steroid hormones (estrogen receptors, progesterone receptors, Her2 / neu and KI67) have gained increasing interest (1).

The immunohistochemical assessment of cell proliferation is done by assessment of nuclear staining of KI67; it's the most widely used method for comparing the proliferation between different molecular and histopathological subtypes. It's expressed in all phases of the cell cycle other than G0. In spite of consistent data on KI67 as a prognostic marker in early breast carcinoma (3).

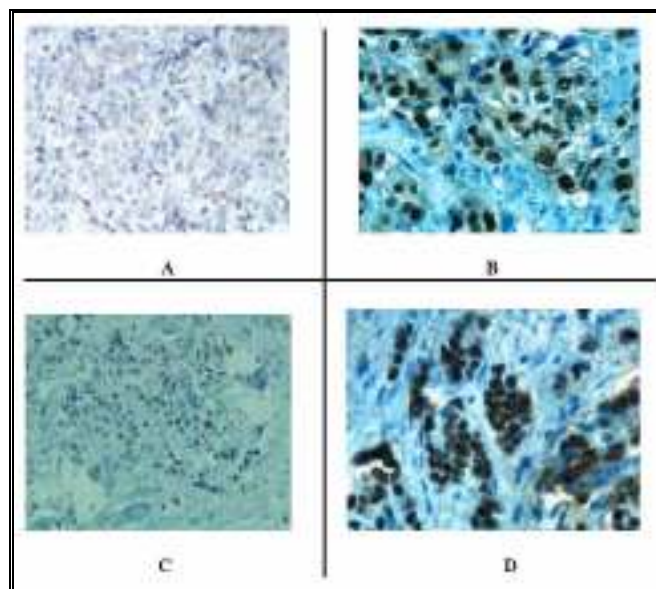
Breast carcinoma has at least four major subtype's classified immunohistochemically and by gene expression profile into:

- Luminal A (figure 1): characterized by having positive hormonal receptor (ER &/or PR), negative HER2 status, low KI67 index.
- Luminal B (figure 2): two subtypes (ER &/or PR positive, HER2 negative, high KI67 index) or (ER &/ or PR positive, HRE2 positive, high KI67 index).
- HER2 type (figure 3): characterized by having hormonal receptors negative (ER & PR negative), HER2 positive.
- Triple negative (figure 4): characterized by having hormonal receptors (ER&PR) and HER2 negative (4).



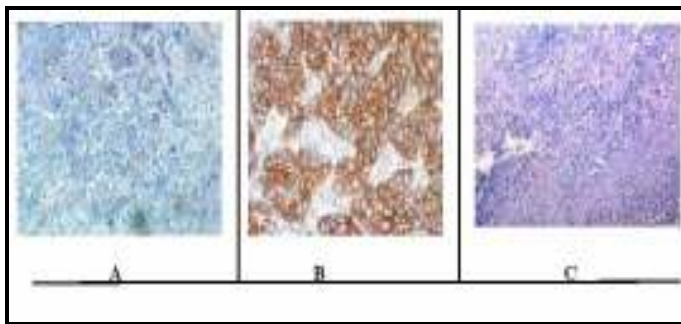
**Fig. (1): Luminal A subtype of Infiltrative ductal carcinoma non other wise specified.**

- A - Strong expression of ER x20HP**
- B - Strong – moderate expression of PR x20HP**
- C - HER2/neu negative expression x20HP**
- D - weak expression of ki67**



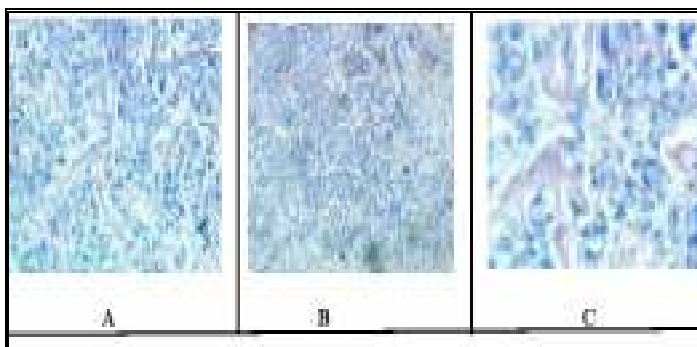
**Fig. (2): Luminal B subtype of Infiltrative ductal carcinoma non other wise specified.**

- A - negative expression of HER2/neu score 1 X10 HP**
- B - strong expression of KI67 X40HP.**
- C - Weak expression of PR X20 HP.**
- D - Strong expression of ER X40**



**Fig. (3): Her 2 subtype Infiltrative ductal carcinoma non other wise specified.**

**A - negative expression of ER X10 HP**  
**B - HER2/neu score 3 positive expression X20HP.**  
**C - Negative expression PR X10 HP**



**Fig. (4): triple negative Infiltrative ductal carcinoma non other wise specified.**

**A – negative ER expression X10HP.**  
**B – negative PR expression X10HP.**  
**C - NEGATIVE HER2/neu expression X20HP**

The only predictive markers with an associated targeted therapy are the estrogen, HER2/neu. For fifteen percent of patients with breast cancers that have HER2/neu over expressing or amplifying tumors are treated with trastuzumab that's an antibody targeting HER2. For two thirds of breast carcinoma that are positive for estrogen & / or progesterone hormone receptors endocrine therapy with tamoxifen or aromatase inhibitors is indicated. Recent studies have shown that high level of KI67 expression can be associated with worse outcome and can predict the long-term outcome yet KI67 estimation has not been implicated in the routine work of immunohistochemical assessment because of the lack of clarity of its measurement (5).

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Case Selection and Slide Review**

A retrospective study of breast carcinoma 79 cases, [15 diagnosed at teaching labs (histopathology unite)/medical city hospital and 64 diagnosed at histopathology department of central public health laboratories] both labs located in Baghdad/ iraq, starting from February 2012-August 2012. Sent for immunohistochemical assessment of hormonal status and HER2/neu to the central public health labs, cases were reviewed by single pathologist for assessment of the diagnosis tumors were typed according to the WHO classification of breast tumors and grading was done according to the Nottingham combined histological system used for tumor grading as follows:

- Grade I tumors with score 3, 4 or 5
- Grade II tumors with score 6, 7
- Grade III tumors with score 8, 9 (6).

No family history or previous history of adjuvant chemo or radiotherapy or hormonal therapy was available. Sections containing adequate tissue were selected to perform an immunohistochemical stain.

### **Protocol**

For immunohistochemical staining, sections were cut at 4 Mm thickness taken from formalin fixed paraffin embedded blocks, mounted onto sialanized slides and left to dry overnight inside the oven at 50C and at 70C for one hour next morning. Sections were deparaffinized with two changes of xylen and rehydrated by alcohol (95% ethanol alcohol two changes, 85% ethanol alcohol one change, 70% ethanol\_alcohol\_one change), epitope retrieval achieved by heat using bench tope water bath at 95-99C□, slides were placed in coplin jar containing enough preheated retrieval solution PH.9, PH.6, S1700 (all manufactured by dako/Denmark) for 20 minutes in water bath. After finishing the epitope retrieval, cooling of the slides for another 20 minutes (7). The staining procedure done using Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (dako cytomation) Code K5007 staining kit for ER, PR, KI 67 and

HercepTest TM, Code K5207 kit for HER-2 (dako cytometry). Using DAKO autostainer plus (automated staining) the device was programmed to do the following steps:

The endogenous peroxidase activity quenched by peroxidase block for 10 minutes. washed with wash buffer exchange for 5 minutes then slides were incubated with primary antibody 250 Ml for 30 minutes at room temperature in a moisturizing chamber, and then washed in wash buffer exchange for 5 minutes. The linkage was done by visualization reagent made of dextran back bone with numerous HRP molecules and secondary antibody linked to it. Slides were washed with wash buffer exchange for 5 minutes, DAB mixture was added (one drop of diaminobenzidine chromogen and 1 ml of chromogen substrate) for 10 minutes on tissue sections to have the characteristic brown colour then sections counter stained with mayer's hematoxylin at room temperature for 2 minutes. Tissue control was internal (7,8).

Semi quantitative histochemical scores were used to assess both estrogen and progesterone by ALLRED'S scoring system (9). It includes assessment of both intensity of staining and proportion of staining as follows:

- Score zero - negative.
- Score one - weak stain.
- Score two - moderate stain.
- Score three - strong stain.

Proportion Score (PS) estimates the proportion of positive tumor cells and range from zero to five as follows:

- Score one - 1% positive tumour cells.
- Score two - 10% positive tumour cells.
- Score three - 1/3 positive tumour cells.
- Score four - 2/3 positive tumour cells.
- Score five - 100% positive tumour cells.

The combination of proportion score and intensity score to get a total score of 3-8. Scores from 3 to 8 are considered to be

positive scores, those with total score less than 3 are considered to be negative cases (9).

Scoring of HER2/neu was done according to dako scoring system by assessing 10% of malignant epithelial cells (9):

- Score 0 - negative. Faint or no stain in less than 10 % of malignant cells.
- Score +1- negative. Faint /incomplete membrane staining in more than 10% of malignant cells.
- Score +2 - weakly positive. A weak to moderate complete membrane staining in more than 10% of malignant cells.
- Score +3 - strongly positive. A strong complete membrane staining in more than 10% of malignant cells.

For ki67 semi quantitative assessment is based on distinct nuclear brown color staining considered to be positive, at least 1000 malignant cells were counted within the tissue section (10 high power fields x 40) the cutoff value of the staining is considered as follows (3):

Nil- negative.

Low- < or equal 10% immune positivity.

High- > 10% immune positivity (3).

All the scoring of the four biomarkers was done virtually using light microscope type (Olympus). All clinicopathological parameters (including; the age, tumor size, lymph node and grade) were analyzed and correlated with the biomarkers. Molecular profiling (sub typing) was done according to susan komen.org sub typing of breast tumors dividing it into four subtypes as follows;

- Luminal A (ER+ and/or PR+, HER2-, low Ki67).
- Luminal B (ER+ and/or PR+, HER2+ (or HER2- with high Ki67).
- Triple negative / basal type (ER-, PR-, HER2-, cytokeratin 5/6 + and/or HER1+).
- HER2 type (ER-, PR-, and HER2+).

This classification has been adapted from (10-12).

### Statistics

All statistical analysis in the study was performed using SPSS program version 18.0 (Statistical Package for Social Science, Inc., Chicago, IL., USA). Descriptive analysis was used to show the mean and standard deviation of the variables. The point of statistical



significance was noted when probability was  $p < 0.001$ .

## RESULTS

All cases were reviewed by and confirmed to be breast tumors. The age of the patients ranged from 30-73 years old with a median of 46 years and average age of 48.4 years with a standard deviation of 9.6. The clinicopathological criteria of all cases were estimated in table (1) as follows:

**Table (1): Clinical and Pathological variables of the 79 cases included in the study**

Variables		No. of cases	%	p. value
Age group	< 50	42	54.4%	0.34 N.S.*
	≥ 50	37	45.6%	
Tumor size	T1	4	5.1%	< 0.001 sig
	T2	54	68.4%	
	T3	16	20.3%	
	T4	5	6.3%	
Nodal status	N0	24	30.4%	0.0024 Sig
	N1	32	38.0%	
	N2	18	22.8%	
	N3	5	6.3%	
Tumor grade	G.I	3	3.8%	0.0015 sig
	G.II	40	50.6%	
	G.III	36	45.6%	
ER	Positive	16	20.3%	< 0.001 sig
	Negative	63	79.7%	
PR	Positive	38	48.1%	0.75 N.S.
	Negative	41	51.9%	
HER-2 NEU	Positive	15	19.0%	< 0.001 sig
	Negative	64	81.0%	
Ki67	Positive	47	49.4%	0.91 N.S.
	Negative	32	50.6%	
Tumor type	Pure IDC	56	69.6%	< 0.001 sig
	IDC & DCIS	15	19.0%	
	Mixed type (IDC+ILC)	3	3.8%	
	ILC	4	5.1%	
	Pure CIS	1	2.5%	

\*N.S. ; Not significant, sig; significant

The molecular subtypes were estimated in all cases using chi square test and the p value was highly significant = 0.007, showing significant difference between the four groups. Tables (2,3,4).

**Table (2): Prevalence of tumor intrinsic subtype according to the molecular profiling**

Molecular subtypes	Number of cases	%
TRIPLE NEGATIVE	29	38.0%
LUMINAL B	22	27.8%
LUMINAL A	19	24.1%
HER 2 TYPE	9	10.1%
Total	79	100%
P. value = 0.007 sig		

**Table (3): Comparison of Ki67 expression in different subtypes of breast carcinoma**

Tumor type	Luminal A	Luminal B	HER2 neu	Triple negative	Total	value
IDC/Ki67 (no. of positive cases of Ki67 in IDC only)	4	13	6	16	39	0.0004 sig*
IDC/CIS Ki67 (no. of positive cases of Ki67 in IDC/CIS only)	1	3	3	1	8	0.54 Ns
Total	5	16	9	17	47	0.35 Ns

\*Significant difference is present within IDC type only while neither significant neither within IDC/CIS nor overall. The assessment done using ANOVA test.

**Table (4): Antibodies used for IHC characterization of tumor tissue section stain**

Antibody type	clone	Dilution	Source
ER	ID5	1:35	Dako
PR	PgR	1:50	=
Her 2 neu	Her 2/neu	Ready to use	=
Ki67	MIB -1	1:75	=

## DISCUSSION

CA breast is a molecularly heterogeneous disease that appears to include at least four major subtypes of the tumor. In this study, we developed on easily applied immunohistochemistry (IHC) surrogate for gene expression profile defined subtypes of breast carcinoma, we demonstrated that biological sub typing by use of this surrogate panel of four biomarkers (ER,PR,HER2&KI67).

Currently the choice of adjuvant systemic therapy is based on patient's age, tumor size, histological grade, lymph node (L.N) involvement, hormonal and her2status. Since they are considered as an important prognostic (13). The only predictive markers with an associated targeted therapy are ER & HER2. 15% of patient with CA. breast who have combination of herceptin a monoclonal antibody targeting her2 and adjuvant chemotherapy, for the two-thirds of breast carcinoma that are positive for ER &/or PR, endocrine therapy with tamoxifen or aromatase inhibitors is generally indicated. Breast carcinoma expressing KI67 (nuclear marker of cell proliferation) are associated with worse prognosis, ki67 is not included in routine clinical decision making because of lack of clarity regarding how ki67 measurements should influence clinical decision (5). In this study, 54.4% of patients were under 50 years old in regards to 45.6% of patients over 50 years old, this is explained by the fact that large percentage of ca. breast patients presented at premenopausal age (14) and seen in many developed countries (15).

Unlike patients of ca. breast diagnosed the highest overall incidence rate seen in old women were 80% of patients diagnosed > or equal 50 years old (16), while the age of breast carcinoma in Iraqi women living in KIRKUK province were 61% diagnosed under age of 50 years and 38 % years diagnosed over 50 years

old (17). In this study, the age ranged from 30-73 years with an average of 48.4 which was close to that of Runak *et. al.* who estimated that the average age of the Kurdish patients was 47.8 (18).

Tumor size is considered the most significant prognostic factors in breast carcinoma and there is increased incidence of auxiliary lymph node involvement with increased tumor size (19). As for tumor size in this study the largest percentage of breast tumors were diagnosed as T2 (no=54 cases, 68.4%) which is more than found by (21) who estimated that breast cancer at T2 is 37.6% and tumors present as T1 38.3% unlike our study, which revealed the percentage of tumors with T1 as (5.1%, no=4 cases ) the reason for this low percentage is probably due to late diagnosis and absence of health awareness. While tumors present as T3 were 20.3% which is less than that found by (21), who estimated that breast tumors present as T3 41.6% of mastectomy specimens of 120 patients, as for T4 in our study it was estimated to be 6.3 %, which was nearly compatible with (20) who estimated 6.6% T4 tumor size in his study. The p value of the tumor size assessment in our study was highly significant ( $p < 0.001$ ).

In regards to the nodal status the largest proportion of our cases presented with N1 nodal status (38%, no=32 cases) followed by (30.4% ,24 cases ) present with N0 status then N2 status in (22.8% ,no=18 cases ) finally N3 nodal status represent the least proportion presented as (3.8% ,no=3 cases) the overall significance value of nodal status is  $p = 0.002$ .(significance). Zubair A., *et al.* (21) estimated that the largest proportion of cases present as N1 status with 27% followed by NO status of 25.2% then N2 status 24% and finally N3 status of 23.3% which means that a large percentage of our patients have positively involved axillary L.N at first time when they seek a medical advice and majority of axillary L.N are those of N1 status the positivity of axillary L.N is one of the most important prognostic parameters in breast cancer and there is a sharp difference in survival in LN negative and LN positive patients of breast cancer (22).

Various studies have analyzed the importance of histologic grade (based on modified bloom & Richardson grading system ) as a prognostic factor in breast carcinoma ,it has been estimated that patients with a high grade tumors have a high frequency of L.N metastasis and more of such patients die



compared to those of low grade tumors (23,24).

In our study, the largest percentage of cases present with grade II (no=40 cases,50.6%) approaching the percentage registered by Iraqi national cancer program, which showed that majority of cases present as grade II 56.6% followed by grade III were 45.6% of our patients presented at this grade which is slightly higher than that of percentage registered by Iraqi national cancer program was 39.9% of cases present as high grade, in our study only 3.8% of cases present as grade I which is slightly less than of (21), who estimated 4.1%, so the majority of our patients present with G II & GIII with tumor size T2&T3 with largest proportion present with N1 axillary L.N status.

The assessment of hormonal status has been routinely used in diagnosis of breast carcinoma for their important predictive value to response to adjuvant therapy (chemo and radio therapy), the use of such markers in clinical practice have individualized the treatment, the assessment of hormonal status in our study revealed 20.3% of all tumors positive for ER which is far less than generally known about breast tumors to be 75% positive for ER (25). The p value is highly significant <0.001. Probably due to presentation late as poorly differentiated tumors were 45.6% of patients in this study present as grade III tumors. While PR was 48.1% positive, which is less than what reported by (26). The p value was non-significant 0.75. Who estimated that 65-67.7% of breast carcinoma patients positive for PR; this indicates that the detection of ER immunohistochemically does not necessarily reflect its functional competence and doesn't reflect the function of the ER dependent genes. Approximately 15-20% of breast carcinoma patient will develop genomic alterations involving HER2/NEU 2, gene locus, which result in amplification of region on chromosome 17 containing this proto-oncogene, this gene amplification is the early event in development of tumor for a subset of breast carcinoma drives HER2/neu gene & protein expression & results in a marked increase in the number of HER2 receptor molecule at tumor cell membrane for HER2 proto-oncogene assessment in our study revealed 19% positive of breast carcinoma which goes with (19). P value is highly significant <0.001.

Uncontrolled proliferation is a hallmark of malignancy and may be assessed by a variety of methods, including counting mitotic figures in stained tissue sections, incorporation of labeled nucleotides into DNA, and flow cytometric evaluation of the fraction of the cells in S phase (27-29). The most widely practiced measurement involves the immunohistochemical (IHC) assessment of Ki67 antigen (also known as antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 [MKI67]), a nuclear marker expressed in all phases of the cell cycle other than the G<sub>0</sub> phase (30). In spite of consistent data on Ki67 as a prognostic marker in early breast cancer, its role in breast cancer management remains uncertain (31). As shown by (32), 17 of the 18 studies that included more than 200 patients showed statistically significant association between Ki67 and prognosis providing compelling evidence for a biological relationship, but the cutoffs to distinguish "Ki67 high" from "Ki67 low" varied from 1% to 28.6%, thereby severely limiting its clinical utility.

Assessment of KI67 biomarker in our study showed positive expression in 49.4% which is less than that recorded by (33), who estimated that 54% of tumor examined was positive for ki67(33). The p value is non significant 0.91.

Considering the tumor type, our study shows pure infiltrative ductal carcinoma as the most prevalent type (69.6%, n=56), which is compatible with (34), who estimated that infiltrative ductal carcinoma (IDC) represents 50-75% of all types of invasive breast cancer for IDC containing component of ductal carcinoma in situ (DCIS). The study showed that 19% of cases, no=15 cases) proved to be IDC & DCIS which lies within the range of (35), who estimated that 8-36% of all breast cancer are IDC with DCIS component.

Mixed type carcinoma in our study was 3.8% unlike those found by Susan Komen .org (10-12), who estimated that mixed type carcinoma of 14%.

The rest of breast carcinoma in our study was infiltrative lobular carcinoma of 5.1% which goes with results obtained by (36), who did a large size study on breast carcinoma included 975 cases and found that ILC represent 5-10% of all cases.

The least type of breast carcinoma in our study was pure carcinoma in situ, which represent 2.5%, which is found to be much lower than that of (35), who estimated that 30-50% of all types of breast tumors are pure CIS (35).

The p value of significance of the types of breast tumors in this study was highly significant 0.001. This low percentage of pure CIS probably related to the small size of the studied cases or because the fact that Iraqi women are diagnosed at advanced stage III or IV according to the Iraqi national cancer research program.

The recent studies have added a new insight to the classification of breast carcinoma these studies have resulted in the identification of several breast cancer subgroups that vary in their gene expression signatures and clinical course the molecular distinct breast cancer subgroups identified to date include luminal A, luminal B, HER 2 type and triple negative subtypes (10-12).

In our study, we compared the expression of KI67 nuclear antigen biomarker in cases of pure infiltrative ductal carcinoma classified according to the Susan komen .org. (10-12) and (14). The total number of IDC was (39 cases, 69.6%) the p value of this correlation is found to be highly significant 0.0004 I, e there is a strong correlation between KI67in cases of IDC and molecular sub typing, while cases of IDC/DCIS (total no=8 cases, 23.3%) which were positive for KI67 expression showed no significant correlation with molecular sub typing of breast cancer (p value = 0.5) although the speculations seems to confirm that KI67 biomarker shows a lower expression in IDC/CIS than pure IDC alone yet our study showed no significant correlation between the expression of ki67 in pure IDC and ki67 expression of IDC/CIS which is supported by (37). As estimated earlier breast carcinoma is a heterogeneous disease morphologically and biologically (38).

Although the conventional histological classification system is independent for accurate histological diagnosis of breast cancer, it doesn't always provide sufficient information to evaluate the biological characteristics of individual tumors and it's not useful for treatment selection, this indicates that a more reliable classification system which guides clinical decision making such as determining the type of optimal therapy for cancer patient is indicated (39,40).

Susan komen org. (10-12) had proposed a biological classification depending on ER,PR,HER2/NEU and KI67 expression adapted from (10,11&12). It categorizes both carcinoma in situ and invasive carcinoma into the following subtypes:

- Luminal A (ER+ and/or PR+, HER2-, low Ki67).
- Luminal B(ER+ and/or PR+, HER2+ (or HER2- with high Ki67).
- Triple negative / basal type(ER-, PR-, HER2-, cytokeratin 5/6 + and/or HER1+).
- HER2 type (ER-, PR-, and HER2+).

These are the most common profiles for each subtype. However, not all tumors within each subtype will have all these features. In our study, the most prevalent molecular subtype of breast cancer was TN with 38% among all tumors (no=29 cases) it encompasses a breast tumor subtype that's clinically negative for biomarker expression of ER,PR and over expression of HER2/NEU which is far more than that's known indifferent studies such as those reported at san Antonio breast cancer symposium 2006 estimating that 47% of breast cancer in African American women are of triple negative subtype compared to 22% in white women. These disparities in incidence among different racial groups lead us to question whether genes or mutations predispose women, particularly premenopausal African American women, to triple negative Breast Cancer. Studies had shown that breast cancers in women with germ-line BRCA1 mutations are more likely to be triple-negative and high-grade.

Gene expression studies have confirmed this phenomenon and that BRCA1-associated breast cancer appears to cluster in the basal-like subtype. This explains that genetic background determines the breast cancer subtype and that the risk factors vary by tumor subtype (41,42).

The second most common molecular subtype is LUMINAL B (no=22 cases, 27.8%) which is much less than that of Hinde Fatemi *et al.* (43), who estimated that luminal B subtype in north African women from morocco had approximately 42% of breast cancer as luminal B subtype. The percentage in our study was slightly more than that of (44), who found that 26% of breast cancer in patients over 80 years old are of luminal B subtype. Moreover, more than that of estimates of cancer genome Atlas net work 2012, who estimated luminal B subtype as 24%. So it's not like the distribution recorded by the other IHC studies taking in consideration that majority of cases were selected from the same teaching labs the

possible effects of selection bias should be regarded.

As for luminal A was 24.1% in our study, unlike other studies that showed luminal A as prevailed subtype as in (45), who estimated that 55.4% of the breast cancer is luminal A & 48.6% luminal A as estimated by (46). Unlike Yanagawa *et al.*, (47), who estimated that Luminal A represents 30.6%, so our study is less than that of Yanagawa *et al.* (47). This variation probably was due to genomic polymorphism of luminal A subtype as suggested by (47), luminal A and B subtypes should be further divided into two subgroups according to the diploid and aneuploid status (diploid CIN - and aneuploid CIN + based on genomic status).

The least common subtype of breast carcinoma was HER2/NEU subtype (no=9 cases, 10.1%), which is compatible with that of Susan komen org. (10-12), who estimated HER2/NEU subtype as 10-15% of all cases of breast carcinoma.

#### **CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS**

Ki67 is a well established cell proliferation biomarker in cancer. Recent studies showed significant association between expression of ki67 and risk of relapse and death of breast cancer, although gene profiling is the most sensitive method yet adding KI67 to the standard biomarker panel ER, PR, HER2/NEU is important to identify the type of breast tumor that cannot be identified by such markers alone.

#### **REFERENCES**

1. Gerber B; and Muller H.(2003). Nutrition and life style factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 79: 265.
2. Gerber B; and Mylonas J.(2003). Reduction of the risk of the breast cancer. *Zentralbl. Gynaekol.* 125:6-16.
3. Deepa M; and Swarna SH.(2012). Retrospective study of immunohistochemical detection of ki67 and correlation with ER, PR& HER2 NEU status in invasive breast cancer. *J. clin. Oncol.* 30:128-134.
4. Genoly P; Masumi Y; and Kenzo K.(2012). Luminal A and luminal B subtypes of breast carcinoma consist a mixture of tumors with different genotypes. *Biomed. central.* 5: 376.
5. Maggie C; Stephen K; and David V.(2009). KI67 index, HER2 status and prognosis of patient with luminal B breast cancer. *J. Nat. cancer inst.* 10:736.
6. Rosai J.(2004). ROSAI and ACKERMAN'S surgical pathology. 9<sup>th</sup> ed. chapter 20. p.1763.
7. Kelly M. (2009). Education guide - Immunohistochemical staining method. 5<sup>th</sup> ed. Chapter 9. p.57.WWW.DAKO.COM(staining protocols).
8. Herceptest for dako autostainer. www.dako.com.
9. AL-Nafussi AI. (2005). Tumor diagnosis. 2<sup>nd</sup> ed. chapter 4. p.131.
10. Tamimi RM; and Baer HJ.(2008). Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma insitu and invasive breast carcinoma. *Breast cancer Res.* 67: 10.
11. Carley LA. (2012). Molecular intrinsic subtypes of breast carcinoma in: update. Hayes DF. Dizon DS (eds) Waltham.
12. Carley LA; and Perou CM.(2006). Breast carcinoma subtypes and survival in Carolina breast cancer study. *JAMA.* 21: 2492.
13. Yildiz M; and Sezgin A.(2013). Bcl2 & ki67 expression in young women with breast cancer. *J. Clin. Analyt. Med.* 4(50): 386.
14. Khalid D; and Renato MC. (2012). KI67 labeling index in primary invasive breast cancer from Sudanese patients a pilot study. *Pathol. J.* 232171. Epub.
15. Hermann B; and Timo H. (2004). Are patients diagnosed with breast cancer before 50 years ever cured?. *J. clin. Oncol.* (22) 3:16-21.
16. Cancer research in UK. www.breastcancerincidencestatistics.com.
17. Nahrain JA. (2009). breast cancer in Kirkuk- Iraq: A review of 170 breast cancer females. *Basrah J. surg.* 15(1):86-88.
18. Runnak M; and Mohammed H.(2012). A population based study of Kurdish breast cancer in northern Iraq; hormone receptor and her2 status: A comparison with Arabic women and united state seer data by. *BMC women's health.* 12:16.

19. Russo J; and Fredrick J. (1987). Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am. J. clin. Pathol.* 88:123.
20. Narode SA. (2012). Tumor size predicts long-term survival among women with lymph node positive breast cancer. *J. Med. Oncol.* 19: 5.
21. Ahmed Z; and Kurshid A. (2009). Breast cancer grading, tumor size, axillary lymph node status and staging and Nottingham prognostic index scoring on mastectomy specimens. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 52 (4) : 477-481.
22. Hutter RVP. (1980). The influence of pathologic factors on breast cancer management. *Cancer.* 46: 961.
23. Henson DE. (1988). Histologic grading of breast carcinoma, significance of grading on recurrence and mortality. *Pathol. Lab. Med.* 112:109.
24. Hopton DS; and Thorogood. J.(1989). Histologic grading of breast cancer significance of grading on recurrence and mortality: *Europ. J. Surg. Oncol.* 15:25.
25. Shapocka DO; and Zaletok SP.(2012). Relationship between NF-K & PR, her2/neu, ki67 and p53 expression in human breast carcinoma. *Exper. Oncol.* 12: 25.
26. Christopher I; and Kathleen E.(2003). Incidence of invasive breast cancer, her2 receptor status from 1992-1998. *J. Clin. Oncol.* 12(1): 28-34.
27. Tubiana M; Pejovic MH; Chavaudra N; Contesso G; and Malaise EP. (1984). The long-term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *Int. J. Cancer.* 33(4):441-445.
28. Dressler LG; Seamer L; Owens MA; Clark GM; and McGuire WL. (1987). Evaluation of a modeling system for S-phase estimation in breast cancer by flow cytometry. *Cancer Res.* 47(20):5294-5302.
29. Tovey SM; Witton CJ; Bartlett JM; Stanton PD; Reeves JR; and Cooke TG. (2004). Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res.* 6(3):R246-R251.
30. Gerdes J; Lemke H; Baisch H; Wacker HH; Schwab U; and Stein H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133(4):1710-1715.
31. Yerushalmi R; Woods R; Ravdin PM; Hayes MM; and Gelmon KA.(2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 11 (2):174-183.
32. Urruticoechea A; Smith IE; and Dowsett M.(2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 23(28):7212-722.
33. Bouzubar N; and Waker K.(1989). Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *British J. Cancer.* 59 :943.
34. Dillon DAG.(2010). Pathology of invasive breast cancer chapter 28. *Diseases of the breast.* 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins.
35. Tan PH.(2001). Pathology of ductal carcinoma insitu of breast. *Annals. Acad. Med.* 30: 671.
36. Sastre G; and Jouve M.(1996). ILC clinicopathological analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and secondary cancer. *Patients.* 77:113.
37. Ioannis M; and Josef M.(2005). Expression of steroid receptors ER, PR, KI67& p53 in invasive ductal carcinoma associated with ductal carcinoma insitu versus invasive breast carcinoma alone. *Anticancer Res. J.* 25:1719.
38. Reis-Filho JS.(2005). Molecular evaluation of breast cancer. *J. Pathol.* 205:248.
39. Oakman C; and Bessis S.(2009). Recent advances in systemic therapy, new diagnostics and biological predictors of outcome in early breast cancer. *Breast cancer Res.* 11: 205.
40. Rose AN; and Siegel RM.(2010). Emerging therapeutic targets in breast cancer. *Future. Oncol. J.* 6 (1):55.
41. Ismail-Khan MD; Marilyn M; and Bui MD.(2010). A Review of Triple- Negative Breast Cancer. *Cancer cont. J.* 17: 3.
42. Dezheug H; and Francis I. (2009). Population differences in breast cancer. *J. clin. Oncol.* 24: 27.

43. El- Fatemi H; and Sanae C L.(2012). Luminal B tumors are the most frequent molecular subtype in breast cancer of North African women: an immunohistochemical profile study from Morocco. *Diagnos. Pathol.* 7:170.
44. Durbecq V; and Ameye L. (2008). A significant proportion of elderly patients develop hormone-dependant “luminal-B” tumors associated with aggressive characteristics *Critic. Rev. Oncol./Hematol.* 67(1): 80-92.
45. Ihemelandu A; and Leffalo D.(2007). Molecular breast cancer subtype in premenopausal and postmenopausal African American women age specific prevalence and survival. *J. surg. Res.* 143(1):109- 118.
46. Ying-zheng Y. (2011). Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women population based study. *BMC cancer* 11: 292.
47. Yanagawa M. (2012). Luminal A & luminal B (her2 negative) subtype of breast carcinoma consist a mixture of different genotype. *BMC. Res. Notes.* 25(5):376.

## Post-Injection Sciatic Nerve Injury in Duhok

Nadir A. Garjees

*Pediatric Dept. / Faculty of Medical Sciences/ School of Medicine / University of Duhok*

*E –mail: nadir\_brivkani@uod.ac*

### ABSTRACT

In developing countries, sciatic nerve injury following gluteal intramuscular injection is a persistent problem. The objective of this study was to determine the pattern of the cases of injection induced sciatic nerve injury among children in Duhok Governorate in Kurdistan.

Forty eight patients, age ranged from 6 months to 12 years with post-injection sciatic nerve injury attended the Heevi Pediatric teaching Hospital in Duhok city from January 2010 to January 2012, formed the study population. All patients were evaluated for the site of injection, person who injected the drug, severity of neurological deficit. All patients were followed for 2 years (mean follow up 6 months).

A total of 48 patients with sciatic nerve injury after deep intramuscular injection were studied, 33 (68.75%) cases were male and 15 (31.25%) were female. The side affected was the left in 28 (58.33%) of the patients and right in 20 patients (41.66%). The results of nerve conduction study was normal in 18 patients. Twenty one patients had partial sciatic nerve injury. Nine patients had severe nerve injury. Following a program of electrical nerve stimulation and physiotherapy 26(54.16%) patients were completely improved, 13(27.06%) patients were partially improved while 9(18%) patients did not improve and developed foot drop. This alarming situation of unsafe injection practice needs an urgent check by preventing unauthorized personnel from injecting medicines, the site of injection should be the anterolateral aspect of the thigh instead of gluteal region.

**Key words:** Sciatic Nerve, Children, Post-injection injury

### الملخص باللغة العربية

ما زالت مشكلة إصابة العصب الإنسي نتيجة الحقن في عضلة الإلية في البلدان النامية مشكلة تحتاج إلى حل، وقد هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد نمط حالات إصابة العصب الإنسي نتيجة الحقن في عضلة الإلية وكذلك نتائج العلاج التحفظي للمرضى الذين يعانون من هذه الإصابات في مدينة دهوك.

شملت عينة الدراسة 48 مريضاً من الأطفال تتراوح أعمارهم بين 6 أشهر و 12 سنة تعرضوا لإصابة العصب الإنسي نتيجة الحقن في عضلة الإلية، حيث أجريت الدراسة في مستشفى هيفي التعليمي للأطفال في محافظة دهوك في شمال العراق للفترة بين كانون الثاني (يناير) عام 2010 م و كانون الثاني (يناير) عام 2011 م وتم تقييم موقع الحقن للعضلة الإلية و الشخص الذي قام بحقن الدواء و شدة العجز العصبي الناتج، ثم تم متابعة كل المرضى لمدة سنتين، وقد أظهرت النتائج أن 33 مريضاً من أصل عينة الدراسة (68,75%) كانوا ذكورا و 15 (31,25%) كانوا إناثاً . وأن الحقن كان في الجهة اليسرى (الساق الأيسر) في 28 (58,33%) حالة و 20 (41,66%) في الجهة اليمنى .

كما كانت نتائج دراسة التوصيل الكهربائي للعصب سليمة في 18 حالة وفي 21 حالة كانت النتيجة إصابة جزئية، بينما في 9 حالات كانت الإصابة شديدة . وبعد إجراء بروجرام من التحفيز الكهربائي للعصب والمعالجة الطبيعية للمرضى، فإن 26 (54,16%) من المرضى اكتسبوا الشفاء التام و 13 (27.06%) من المرضى اكتسبوا الشفاء الجزئي، بينما في 9 من المرضى لم يحصل أي درجة من الشفاء مما نتج عنه الإصابة بسقوط القدم . ومن هذه النتائج يتبين بأن الأطفال هم الأكثر عرضة للإصابة، لذا تتصح هذه الدراسة بعدم استخدام الحقن بالعضلة إلا في الحالات الضرورية ومن قبل الشخص الكفو .

## INTRODUCTION

Sciatic neuropathy is the second commonest neuropathy in the lower limbs after common peroneal nerve injury. The vulnerability of the nerve to damage is attributed to its long anatomic course from the lumbosacral plexus, through the sciatic notch down to its bifurcation just above the popliteal fossa (1,2). Damage to the sciatic nerve by injection has been reported from several parts of the world; these injuries are related mainly to a faulty injection technique and lack of trained manpower capable of administering paraneural drugs in the developing countries (3,4). The degree of nerve fiber injury depends on the site of injection and upon the specific agent injected. The pathological alteration in the nerve is evident as early as 30 minutes following injection injury in the form of wide spread axonal and myelin degeneration (5). The mechanism of injury includes direct needle trauma, secondary constriction by scar and direct nerve fiber damage to both axon and Schwann cell, with breakdown in the blood nerve barrier by neurotoxic chemicals in the injected agent (6). A review of literature on relevant injection procedure found that injury to sciatic nerve is associated with the use of dorsogluteal site for injection, because the sciatic nerve commonly courses this site (7). The World Health Organization (WHO) estimates that out of the 12 billion injections administered worldwide annually, 50% are unsafe and 75% are unnecessary (8). The most frequent presentation of sciatic nerve injury includes radicular pain and paresthesia with almost immediate onset of variable motor and sensory deficit (9). Sequels can range from minor transient sensory disturbance to severe sensory disturbance and paralysis with poor recovery (10). Children are more prone to sciatic injury than adults, because of their thin fat pad and less muscle bulk of buttock. Besides the thickness of fat and muscle bulk, the injection direction and the nature of the injected substance also has been implicated (11). This study was conducted to analyze the clinical features and outcomes of conservative treatment of patients with sciatic nerve injury following gluteal intramuscular injection.

## PATIENTS AND METHODS

The study was carried out at Heevi Pediatric Teaching Hospital in Duhok city; during the period from January 2010 to January 2012. All patients with history of lower limb weakness after intragluteal injection were referred to our hospital from other health centers in the city, because we had a focal unit for such cases. Our inclusion criteria (neurological symptoms and/or signs in the lower limb following an intragluteal injection (like numbness, limping, radicular pain and variable motor and sensory deficit). All patients had history of recent gluteal intramuscular injection and they did not have any weakness in the lower limbs or associated sensory disturbance before the injection. The total number of the patients with post injection sciatic nerve injuries enrolled was 48; aged 6 months to 12 years (mean age was 3.2 years). Thirty three (68.75%) were males and 19 (39.6%) were females. All patients were thoroughly evaluated for the indication for injection, site of injection and person who injected the drug. Nerve conduction study was done for all patients. Two stool specimens were collected 24-48 hours apart from each patient and evaluated for polio virus in the National Laboratories in Baghdad. All patients were followed up for 6 months to 2 years. Also the patients were examined for any sensory or motor deficits. Passive stretching exercise and electrical stimulation used to prevent contractures and denervation atrophy. The statistical analysis used in this study included Chi-square and Fisher's exact tests for testing association. A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

Out of the 48 patients of post injection sciatic nerve injury fulfilling the inclusion Criteria studied, 33 (68.75%) were males and 19 (39.6%) were females, so the ratio of male to female was 1.73:100. The relationship between age groups and frequency of post injection sciatic nerve injury were illustrated in Table (1). Age group 1-5 years had the highest number of cases 28 (58.34%).

Table (1): Age and sex distribution of the study samples

Sex	No. & % of Patients	< 1 year	1-5 years	> 5years
Male	33 (68.75 %)	7 (14.58%)	20 (41.66%)	6 (12.5%)
Female	15 (31.25%)	3 (6.25%)	8 (16.66%)	4 (8.3%)
Total	48 (100%)	10 (20.83%)	28 (58.32%)	10 (20.8%)

Fisher's exact  $P = 0.909$

Sex distribution according to side affected is shown in Table (2). From this table it appears that the side affected was the left in 28 patients (58.34%) while 20 patients (41.66%) had their right side affected. Females had a higher percentage of left sided affection while in males the right side was slightly more affected than the left.

Injections were administered by the nurses in 42 patients (87.5%) and by unqualified persons in 6 patients (12.5%). Injections were not administered at the recommended sites in all of the affected patients. The nerve conduction study was normal in 18 patients (37.5 %) and in 21 patients (43.75%) there was partial sciatic nerve injury, while in 9 patients (18.75%) there was severe sciatic nerve injury.

Table (2): Sex distribution of affected lower limb

Sex / affected side	No. of patients	Percentage %
<b>Male</b>		
Right side	17	35.41
Left side	16	33.33
<b>Female</b>		
Right side	2	4.16
Left side	13	27.08
Total	48	100

Chi-square = 2.501,  $P = 0.114$

After two years of follow up and electrical nerve stimulation with physiotherapy 26 patients (54.16%) were completely improved, while 13 patients (27.08%) were partially improved and only 9 patients (18.%) did not improve and developed foot drop as shown in Table (3). All cases were negative for poliomyelitis.

Table (3): Distribution and outcomes of nerve lesions

Nerve Conduction Study	No. and % of patients	Complete recovery	Partial recovery	No recovery (drop foot)
Normal	18 (37.5 %)	15 (31.25 %)	3 (6.25%)	0
Complete nerve injury	9 (18.75%)	1 (2.08%)	2 (4.16%)	6 (10.42%)
Partial nerve injury	21 (43.75%)	10 (20.83%)	8 (16.66%)	3 (6.25%)
Total	48 (100%)	26 (54.15%)	13 (27.1%)	9 (18.75%)

Fisher's exact  $P = 0.001$

## DISCUSSION

Intramuscular administration of drugs is presently a common practice in developing countries, especially among pediatric age group (12). Some health workers are known to have strong preference for injections even when oral and other alternative routes for drug administration are equally good and safer, on the other hand parents of ill children consult health workers, demanding to be given injections, which they believe, would work better and faster than drugs given orally (13).

Male to female ratio in this study was 1.73:1.00 which was similar to other studies like a study done by (14), and a study by (15), but it is higher than another study done by Ezeukwu AO, where the ratio was (1.13:1) (16). Children within age group one to five years were the ones most affected by sciatic nerve injury in this study. These findings are similar to those obtained by (17). The predominance of this age group in those affected can be explained by the fact that this age group is often affected with respiratory tract infections, the commonest condition for which the injections were administered (18).

All the cases reviewed were unilateral with higher incidence affecting the left lower limb than the right. This observation was similar to that of previous studies such as Mansoor (19), Hamzat and Omotade (20), while Ezeukwu AO (13) found that the right lower limb was more affected (52.1% of the patients) than the left lower limb, but in this study males had no side predominance while females had the left side predominantly affected. In our study, it was observed that in 87.5% of cases the injections were administered by nurses and in 12.5% of patients the injections were administered by unqualified persons. This



result is consistent with those of other studies (13 and 21). The outcome of conservative treatment (electrical nerve stimulation and physiotherapy) in this study was 54.16% of patients completely improved, while 27.08% showed partial improvement and only 18. % did not improve at all and developed drop foot. This is in agreement with the results of two studies which showed partial or no recovery in 72% and 82% of the cases respectively (22). We found that when the sciatic nerve was severely injured, the recovery is difficult and even is insufficient. This is also considered with most of the previous reports (21,22).

### CONCLUSION

Sciatic nerve injury from an intramuscular injection in the upper outer quadrant of the buttock is an avoidable but persistent global problem. This alarming situation of unsafe injection practice needs an urgent check by preventing unauthorized personnel from injecting medicines, the site of injection should be the anterolateral aspect of the thigh instead of gluteal region.

### REFERENCES

1. Kline DG; Kim D; Midha R; Harsh C; and Tiel R.(1998). Management and results of sciatic nerve injuries: A 24-years experience. *J. Neurosurg.* 89: 13-23.
2. Sharma S; and Kale R. (2003). Post injection Paralysis in Chhatisgraph region. *Indian pediatr.* 40:508-510.
3. Simonsen L; Kane A; Lloyd J; Zaffran M; and Kane M. (1999). Unsafe injection in developing world and transmission of blood borne pathogens. *Bull World Health Organ.* 77: 789-800.
4. Kotwal A; Priya R; Thakur R; Gupta V; Kotwal J; and Seth T. (2004). Injection Practices in Metropolis of North India. Perceptions, determinants and issues of safety. *Indian J. Med. Sci.* 58: 334-344.
5. Raglow GJ; Luby SP; and Nabi N.(2001). Therapeutic injection in Pakistan from the patient's perspective. *Trop. Med. Int. Health.* 6: 69-75.
6. Villarejo FJ; and Pascual A M.(1993). Injection injury of the sciatic nerve 370 cases. *Child. Nerve Syst.* 9: 229-232.
7. Ndiaye A; Sakho Y; Fall F; Dia A; and Sow M L.(2004). Sciatic nerve in gluteal portion: Application of sciatic nerve post injection lesion. *Morphol.* 88(282): 135- 138.
8. Halsey NA. (2003). Commentary: poliomyelitis and unnecessary injections. *Int. J. Epidemiol.* 32: 278-279.
9. Gentili F; Hudson AR; and Midha R.(1997). Peripheral nerve injuries: Types, causes, and grading. In Wilkins RH, Rengachary SS (eds): *Neurosurgery*, 3<sup>rd</sup> ed. McGraw- Hill, New York. pp. 3105-3114.
10. Napiontek M; and Ruszkowski K.(1993). Paralytic drop foot and gluteal fibrosis after intramuscular injections. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 75: 83-5.
11. Ahuja B. (2003). Post injection sciatic nerve injury. *Indian Pediatr.* 21: 797-801.
12. Adetunji O; Olusola E; Joseph A; Dare O; Ademola O; and Segun O. (2006). Injection-Induced Sciatic Nerve Injuries among Children Seen At A Nigerian Physiotherapy Unit. *Int. J. Third World Med.* 3: 12-15.
13. Oyediji OA; Elimile PO; Adebami OJ; Ogunlusi JD; Oyediji GA; and Oluwafemi S.(2006). Injection-induced sciatic nerve injuries among children seen at a Nigerian Physiotherapy unit. *Int. J. Third World Med.* 3(2): 21-24.
14. Orubuloye IO; and Ajakaiye DO. (2002). Health Seeking Behaviour in Nigeria. New World Press, Ibadan. 80-133.
15. Ezeukwu AO. (2007). Injection- induced sciatic nerve injury among children managed in Nigeria. *Physiotherapy child: a five-year review. J. Med. Rehabil.* 1: 22-24.
16. Naddumba EK; and Ndoboli P.(1999). Sciatic nerve palsy associated with intramuscular quinine injection in children. *East and Central Afri. J. Surg.* 2:17-20.
17. Lagunju IA; and Okafor OO. (2009). An Analysis of Disorders seen at the Paediatric Neurology Clinic, University College Hospital, Ibadan, Nigeria. *West Afr. J. Med.* 28(1): 326-3304.
18. Mansoor F. (2004). Case definition of traumatic injection neuropathy. *Pakistan J. Med. Res.* 43 (3): 143-149.
19. Hamzat TK; and Omotade TT. (2006). Acute flaccid paralysis: A five-year review of cases managed by physiotherapy at the University College Hospital, Ibadan. *Afri. J. Health Sci.* 13: 28-32.
20. Alonge IAO; and Akinwola MO. (2010). Post-injection sciatic neuropathy: A five-year review of cases managed. *AJPARS.* 3(1): 13-16.

21. Maqbool W; Saleem S; and Asrar A.(2009). Clinical, electrophysiological and prognostic study of post injection sciatic nerve injury: An avoidable cause of loss of limb in the peripheral medical service. *Annals Indian Acad. Neurol.* 12: 116-119.
22. Pandian JD; Bose S; Daniel V; Singh Y; and Abraham AP.(2006). Nerve injuries following intramuscular injections: a clinical and neurophysiological study from Northwest India. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 11: 165-171.

قسم الدراسات العربية

***ARABIC SECTION***

## إعادة استخدام المياه العادمة لصناعات الألبان باستخدام التقانات الحديثة

أسامة جورج أمين (1)، أزهار قيس كيطان (1)، ابتهاج عبد الجبار عبد القادر (1)، أحمد سالم حمد (2)، إلهام مجيد خورشيد (2)، لمياء سلمان رشيد (2)، سندس فؤاد أحمد (2)، أحمد خلف حردان (1)، صلاح عبد المحسن رحيم (1)، هشام حميد علوان (1)

(1) وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد (2) مصنع ألبان أبو غريب / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: okaser61@gmail.com

## الملخص باللغة العربية

تم في هذا البحث تطبيق وتجربة التقانات الحديثة لمعالجة المياه العادمة لمعمل ألبان أبو غريب وذلك بتصميم وتنفيذ منظومة مفاعل الأغشية البيولوجية وهي من التكنولوجيات الجديدة في هذا المجال (Membrane Bio Reactor) MBR سعة 24 L/hr باستخدام غشاء نوع Hollow fiber الليف المجوف , وإجراء تجربة استمرت لأكثر من 133 يوم وكانت معدل نسبة الإزالة للمتطلب الأوكسجين الكيماوي COD بلغت 96.8% (75 ملغم/لتر) وهي أقل من المحددات البيئية العراقية 100 ملغم/لتر) و للفسفور بلغت 59.1% كما بلغت قيمة تعكر الماء المعالج المنتج 3 NTU أما بالنسبة للنترات بلغت قيمته في الماء المعالج 16 ملغم/لتر وهي أقل من المحددات القياسية العراقية للمياه المعالجة المطروحة (50 ملغم/لتر). أشارت نتائج البحث إلى أن فرق الضغط عبر الغشاء المستخدم في المنظومة لم يتغير بشكل كبير مما يدل على عدم وجود انسداد مؤثر على عمل المنظومة .

**الكلمات المفتاحية:** نترات , ليف مجوف , فسفور , متطلب الأوكسجين الكيماوي, مفاعل غشائي بيولوجي

## ABSTRACT

In this research, the design and implementation of MBR system was done. The capacity of the unit is 24L/hr and using a Hollow Fiber membrane, An experiment for 133 days was implemented in which the % removal of COD (Chemical Oxygen Demand) was 96.8% (75 mg/lit. which was less than Iraqi limits standards 100 mg/lit.) and for phosphor 59.1%, the value of NTU 3 was obtained for treated water (product water) and for nitrates the value 16 mg/liter which was less than Iraqi standard limits for treated wastewater (50 mg/liter) The results of the research showed that the pressure difference across the used membrane in the system did not changed significantly, and that refers that there was no effective blockage on the system work.

## المقدمة

لمعامل الألبان خلال أحواض التهوية Aeration tank والتي يتم فيها المعالجة البيولوجية للتخلص من المواد العضوية الذائبة عن طريق التهوية لانجاز الهضم البيولوجي يتم في هذه العملية تحويل المواد العضوية الذائبة إلى غاز ثاني أكسيد الكربون والذي يطرح إلى الجو ومواد صلبة حية وغير حية يتم فصل المواد الصلبة عن المياه المعالجة بإمرارها بأحواض الترسيب Settling tank بترسيبها بفعل الجاذبية وطرحها إلى الخارج .

أما في تقنية المعالجة البيولوجية ذات الأغشية النفاذة MBR فهي تتضمن منظومة Suspended Growth Activated Sludge حاوية على أغشية نفاذة دقيقة نوع Ultra Filter لفصل المواد الصلبة عن السائلة كبديل عن أحواض الترسيب المستخدمة في التقنية التقليدية مما تسمح للعمل بـ (Mixed liquor suspended solid, MLSS) أعلى مما هو في المعالجة التقليدية وبعمر حمأة أكبر (sludge age) والذي يؤدي إلى نمو بكتيري. ان زيادة تركيز MLSS يؤدي إلى صغر حجم المعالجة الهوائية والمنظومة بشكل عام مما يعطي إمكانية احتواء المنظومة داخل بناية (3، 4). ويمكن تلخيص المقارنة بين تقنية المعالجة البيولوجية MBR والتقنية التقليدية CASP بالجدول رقم (1).

جدول رقم (1): مقارنة تقنية MBR مع التقنية التقليدية CASP

CASP	MBR
تشغل حيز كبير	تشغل حيز أقل بحدود 30%
تنتج حمأة (sludge) أكثر	تنتج حمأة أقل بحدود 25%
تنتج روائح أكثر	تنتج روائح أقل بمكان بناء منظومة على بعد 50 متر من أقرب بناية مأهولة
عدم ثباتية المواصفات للمياه المنتجة	ثباتية عالية في مواصفات الماء المنتج BOD5 < 5 mg/L , TSS < 1mg/L Turbidity 1 N.T.U.

## خيارات المعالجة الحيوية الهوائية :

هناك نوعان من أنظمة ربط الأغشية البيولوجية MBR هما:

- 1- أنظمة MBR ذات الربط الخارجي: وفيها تكون الأغشية البيولوجية خارج حوض المعالجة. شكل (1).
- 2- أنظمة MBR ذات الربط الداخلي: وفيه تكون الأغشية البيولوجية داخل حوض المعالجة. شكل (2).

انتشر استخدام تقنية الأغشية membranes technology في معالجة مياه الصرف الصحي والصناعي، بشكل واسع عبر العالم في السنوات العشر الأخيرة وتشير الدراسات والتقارير الدولية والاقتصادية إلى أن قيمة المشاريع لمحطات معالجة الصرف الصحي باستخدام الأغشية MBR عبر العالم بلغت 10 مليون دولار عام 1995 وتضاعفت إلى 217 مليون دولار عام 2005 وإلى 360 مليون دولار عام 2010. ويرجع سبب انتشارها للنوعية فائقة الجودة للمياه المعالجة النهائية الناتجة عن محطة المعالجة وبالتالي قدرتها التامة على تلبية اشد المتطلبات والمعايير اللازمة توفرها في نوعية ومواصفات المياه المعالجة لإعادة استخدامها بشكل آمن بما يخدم الصحة والبيئة المحيطة. بالإضافة إلى أن استخدام الأغشية ضمن نظام المعالجة البيولوجية يؤدي إلى تخفيض المساحة اللازمة لمحطة المعالجة إلى حد كبير مقارنة مع طرق المعالجة التقليدية كنظام الحمأة المنشطة والتهوية المطولة وفوق هذا كله فهي تتميز بالكلفة المعتدلة وبالقابلية التامة للتأقلم مع أي تغيير بالمواصفات اللازمة للمياه المعالجة في المستقبل. بسبب الميزات اعلاه فقد اعتبرت تقنية الأغشية البيولوجية انطلاقة مهمة في مجال معالجة مياه الصرف الصحي والصناعي وإعادة الاستخدام المستدام للمياه المعالجة على نحو أوسع مما كان عليه سابقا وخصوصا للمناطق التي تعاني شحا في المصادر المائية (1).

إن توفير منظومات صغيرة (MBR) Package units ذات كفاءة لمعالجة مياه الصرف الصحي والصناعي توفر فرصة للامركزية معالجة مياه الصرف الصناعي وإعادة استخدامها موقعا لأغراض مختلفة مثل ري الحدائق، الغسيل وماء الحرائق. ولتجنب نقل المياه لمسافات طويلة كالذي يحصل في معامل الألبان (معمل البان أبو غريب) حيث يتم يوميا إنتاج كميات كبيرة من المخلفات السائلة وتتم معالجتها إما باستخدام برك مفتوحة للجو (تجميع المخلفات في أحواض ومن ثم تضخ إلى البرك وتترك لتجف) أو باستخدام الطريقة التقليدية (Conventional Activated Sludge Process, CASP) (تجميع المياه العادمة في أحواض ومن ثم تضخ إلى محطة المعالجة التقليدية التي تبعد مسافة 4km عن المعمل).

ان مخلفات مصانع الألبان ومنتجاتها عديدة ومتنوعة واهم تلك المخلفات السائلة (2):

- 1 - الألبان الناتجة عن الغليان أو اللبب المسكوب.
- 2 - منتجات الألبان الناتجة عن المعدات والآلات في حالة الأعطال ولا يمكن إعادة استخدامها.
- 3 - الشرش الناتج عن إنتاج الأجبان وهو ذا محتوى عضوي عالي لما يحتويه من بروتينات ودهون وسكريات وأملاح.
- 4 - المياه الناتجة عن مخلفات الغسل لمعدات التصنيع للألبان في تلك المصانع .

## تعريف بالتقنية :

وهي تقنية تجمع بين عملية المعالجة البيولوجية Activated sludge والترشيح بالأغشية ultra filtration ففي منظومات المعالجة التقليدية يتم إمرار المخلفات السائلة

مرغوب بها وهي النوعية التي تهمنا في مياه الصرف الصناعي ومن أهم المواد البوليمرية المستخدمة بصنع الأغشية هي: (4، 7، 8):

1. Polyvinylidene Difluoride ( PVDF).
2. Polyethylene( PE).
3. Polypropylene (PP).

#### أشكال الأغشية :

هناك ستة أشكال رئيسية للأغشية والتي لكل منها خصائصه المميزة واستخداماته المتنوعة وعموماً إما أن تكون أنبوبية أسطوانية أو مسطحة على شكل رقائق وهذه الأنواع هي: (4، 8):

- 1- Plate –and Frame/ Flat Sheet(FS)
- 2- Hollow fiber (HF).
- 3- Multi tubular (MT) .
- 4- Capillary Tube (CT).
- 5- Pleated Filter Cartridge (FC) .
- 6- Spiral – Wound ( SW )

#### المواد وطرق العمل

##### المواد :

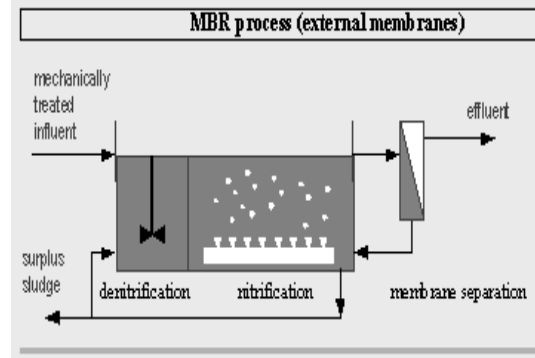
تم استخدام مياه صرف صناعي من معمل البان ابو غريب، الجدول رقم (3) يوضح مواصفات المياه مع المحددات الوطنية المطلوبة لأطلاق هذه المياه الى البيئة:

جدول رقم(3): يبين مواصفات مياه معمل البان ابو غريب مع المحددات الوطنية

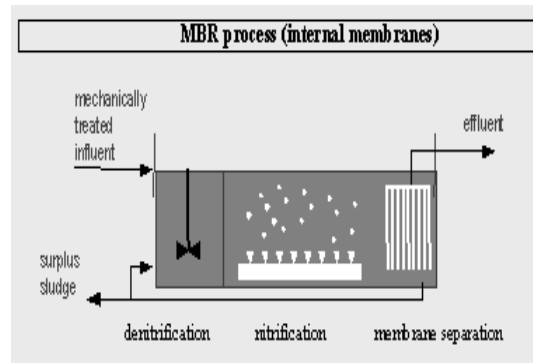
نوع الموصافة	مياه صرف صناعي (معمل البان أبو غريب)	المحددات الوطنية للمياه المصروفة إلى المصادر المائية
Biochemical oxygen demand, BOD <sub>5</sub>	2000 mg/l	<40 mg/l
Chemical oxygen demand, COD	1200-3500 mg/l (معدل 2350)	<100 mg/l
Total suspended solid, TSS	250 mg/l	60 mg/l
Total nitrogen, TN	125 mg/l	50 mg/l nitrate
Total phosphorous, TP	11 mg/l	3ppm phosphate
Turbidity	500NTU	----
pH	6 - 8	6 - 9.5

#### المنظومة :

تتكون منظومة MBR من خزان التهوية MBR tank المصنوع من مادة البلاستيك الشفاف وأبعاد (1×1×0.5 متر) مثبت في داخل الخزان الغشاء البيولوجي نوع PP hollow fiber بالمواصفات التالية (10) كما في الجدول رقم (4).



شكل(1): أنظمة MBR ذات الربط الخارجي



شكل(2): أنظمة MBR ذات الربط الداخلي

ويبين الجدول رقم (2) مقارنة ما بين أنظمة MBR ذات الربط الخارجي cross flow وأنظمة MBR ذات الربط الداخلي submerged (5، 6).

جدول رقم (2): مقارنة بين أنظمة ربط الأغشية البيولوجية MBR

أنظمة MBR ذات الربط الداخلي	أنظمة MBR ذات الربط الخارجي
مستوى جريان واطيء 10-20 l/m <sup>2</sup> .h	مستوى جريان عالي up to 200 l/m <sup>2</sup> .h
تكاليف الغشاء البديلة عالية	تكاليف الاغشية البديلة منخفضة
الحاجة الى غسل عكسي	سهولة التنظيف (cleaning In Place-CIP) unit
استهلاك طاقة قليل	استهلاك طاقة عالي

#### مادة صنع الأغشية :

تصنع الأغشية من مواد عديدة منها المواد البوليمرية السليولوزية أو السيراميك أو تصنع من الأكاسيد المعدنية وبعضها يتكون من تشكيل طبقة رقيقة من البولي اميد . تتميز الأغشية التقليدية ببنية متباينة الخواص (Anisotropic Structure) وتملك فقط تناسفاً في الاتجاه المتعامد مع سطح الغشاء كما أن الاغشية البوليمرية تصنع لتحقيق مسامية سطحية عالية او مسامية عالية ضمن المقطع العرضي للأغشية وفق توزيع معين للثقوب الذي يتراوح بين 0.01-0.4µm وبما يحقق حجز المواد الغير

**التحليل اللازمة للتجربة :**

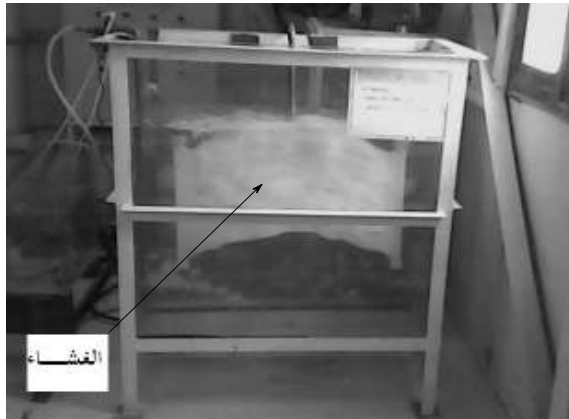
تتطلب التجربة إجراء عدة تحاليل للمخلفات السائلة للألبان  
وفيما يلي جدول رقم (5) يبين نوع التحاليل والأجهزة  
المستخدمة :

جدول رقم (5) :الاختبارات ونوع الأجهزة المستخدمة في التجربة

Wastewater quality parameter	Analytical Instrument & method
COD	The titration method according to standard method NO.5220B
Turbidity	Turbid meter (TURBO550, WTW, Germany)
Nitrite nitrogen	Colorimetric method, spectrometer (UV <sub>754</sub> , CANY, China)
Mixed liquor suspended solid MLSS	The drying method according to standard method NO.2540D
pH	pH 110 (Senso Direct, Lovibond, Type 330)

**طريقة العمل :**

تم إضافة 350 لتر من المخلفات السائلة للألبان / معمل  
ألبان أبو غريب إلى خزان التهوية الذي يضم حوض  
المعالجة البيولوجية مع الأغشية كما موضح بالشكل (4).



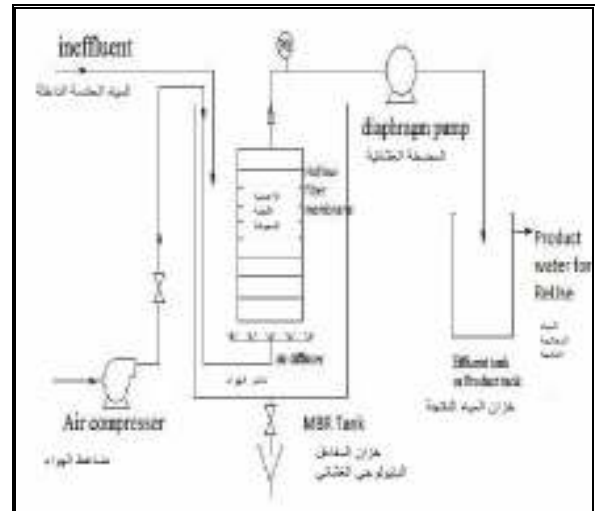
شكل (4): خزان التهوية مع الغشاء البيولوجي

تم ترك المخلفات السائلة في الخزان لمدة أسبوعين تقريباً  
مع التهوية المستمرة عن طريق ناشر الهواء لحين تغير لون  
المياه إلى اللون البني الذي يدل على أن هناك نمواً بكتيرياً (بكتيريا هوائية) وبالإمكان تسريع العملية بإضافة حمأة  
منشطة (20 لتر) يتم سحب المياه المعالجة بالضغط السالب  
من الغشاء عن طريق مضخة السحب diaphragm pump  
وأخذ النماذج من الماء الداخل (influent) wastewater  
والماء المنتج effluent لإجراء التحاليل اللازمة، مع  
الاستمرار بإضافة المخلفات السائلة للألبان إلى خزان  
التهوية (استمرت التجربة 133 يوم) و بنفس معدل سحب

جدول رقم (4): مواصفات الغشاء المستخدم في التجربة

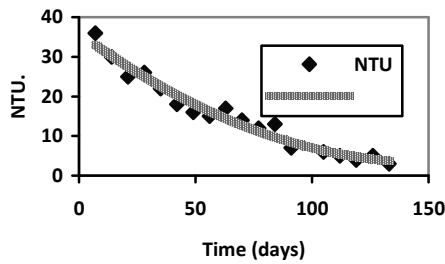
Parameters	Membrane module
Type	hollow fiber
Material	Polypropylene (PP)
Nominal pore size (μm)	0.1
Wall thickness (μm)	40
Outside diameter (μm)	400
Membrane area m <sup>2</sup>	8
Size( length*width) (mm)	790*580

يجهز الخزان من الأسفل بناشر للهواء وهو أنبوب مثقب  
(PVC 1/2") عن طريق ضاغط الهواء (هواء خالي من  
الدهون) لضمان التهوية المستمرة داخل الخزان . بعد  
الوصول إلى النمو البيولوجي المطلوب (خلال أسبوعين) يتم  
سحب الماء المنتج من الغشاء عن طريق مضخة السحب  
نوع diaphragm بمعدل جريان 0.4 L/min وضخه إلى  
خزان التجميع effluent tank مع الاستمرار بإضافة المياه  
العادمة للألبان وسحب الماء المنتج يتم مراقبة فرق الضغط  
للغشاء , وهو عادة 0.9 - 0.95 بار (ضغط جوي) في هذه  
التجربة كما في الشكل (3).



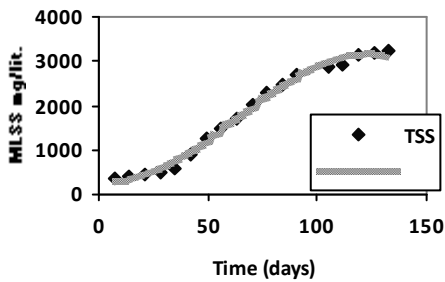
شكل (3): مخطط يوضح سير العملية

لوحظ أيضا القيمة المرتفعة لتعكر الماء NTU (Nephelometric Turbidity Unit) و البالغة 36 للمياه المعالجة الناتجة لتصل بعد 133 يوم إلى 3 NTU و هذا يعود إلى تكون الكتلة الحيوية في مفاعل الأغشية حيث كلما يزداد تركيزها يزداد تكون اللزجة البيولوجية و تحسن من معالجة المياه المشبعة بالملوثات العضوية و خاصة ذات الحجم الصغير بالتصاقها على المادة اللزجة منها مع أن قياس التعكر في داخل خزان المفاعل MBR بلغ 1000 NTU و الماء المعالج الداخل للمنظومة 500 NTU و الذي يمثل معظمه مواد عضوية بروتينية أو حليب أو شرش الألبان أو أي مواد أخرى من منتجات الألبان (شكل 7).



شكل (7): العلاقة بين تعكر الماء المنتج وزمن التشغيل بالأيام

الشكل (8) يبين علاقة خطية للتركيز تزداد مع مرور زمن التشغيل بلغت أقصاها 3220 ملغم/لتر وفي هذه التقنية بالإمكان أن تزداد إلى 20000 ملغم/لتر حسب نوعية الأغشية المستخدمة و التي بدورها تكون عامل إيجابي في نوعية المياه المنتجة كما نبين في الشكل (6) حيث تتحسن نوعية المياه المنتجة مع مرور زمن التشغيل بسبب ازدياد تركيز الكتلة الحيوية (المواد السائلة والصلبة العالقة) MLSS.



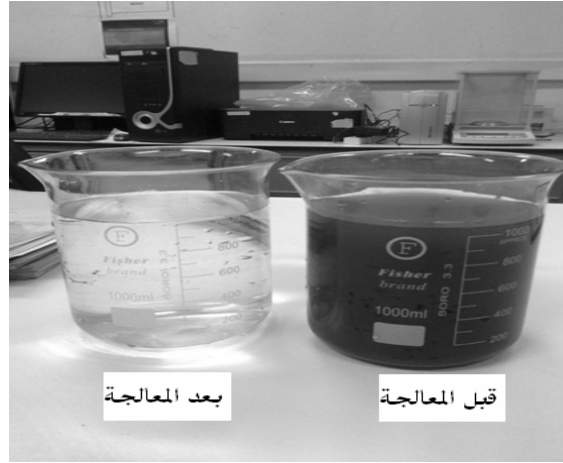
شكل (8): العلاقة بين زمن التشغيل بالأيام و تركيز المواد السائلة والصلبة العالقة MLSS

أن تركيز النترات في المياه الملوثة الداخل الى منظومة المفاعل الغشائي البيولوجي 125 ملغم /لتر و مع مرور الوقت يحصل هبوط في تركيز النترات في المياه المعالجة ليصل في نهاية المطاف 15 - 16 ملغم/لتر و هي أقل من المحددات البيئية العراقية (50 ملغم/لتر). شكل (9).

الماء المنتج (24 لتر /ساعة) و ضمان استمرار العملية البيولوجية و إن هذه العملية تزيد من كثافة المخلفات السائلة و الصلبة داخل الخزان (MLSS) وبالتالي زيادة Activated sludge , بإمكان الأغشية أن تعمل على MLSS بمديات عالية تصل إلى 20000 ملغم/لتر (11). وكانت قيمة pH (الأس الهيدروجيني) بحدود 6-8 .

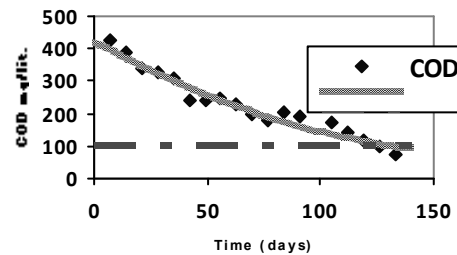
### النتائج والمناقشة

يبين الشكل (5) الماء المعالج بعد مرور ستة أسابيع على التجربة تبين تغير لون الماء في حوض المعالجة إلى البني مما ينعكس إيجابا على الماء المنتج حيث استمر العمل 133 يوم تقريبا.



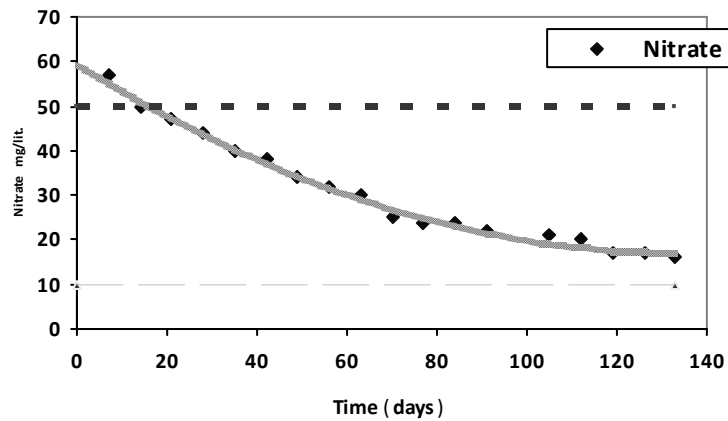
شكل (5): الماء المعالج بعد مرور ستة أسابيع من التجربة

وقد لوحظ هبوط في قيمة COD من 2350 ملغم/لتر إلى 425 ملغم/لتر في بداية فترة عمل الأغشية (الأسبوع الأول و الثاني) و يستمر النزول في قيمة COD ليصل في نهاية التجربة 75 ملغم/لتر (96.8% نسبة إزالة) و يلاحظ التذبذب في قيمة COD للماء المعالج و ذلك بسبب اختلاف تراكيز المياه العادمة المضافة حسب عمل معمل الألبان الذي تراوحت قيمة COD للمياه المضافة 1200 إلى 3500 ملغم/لتر (شكل 6).

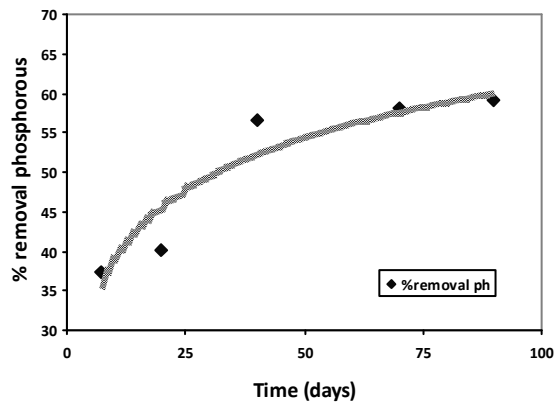


شكل (6): العلاقة بين زمن التشغيل بالأيام ومقدار المتطلب الأوكسجين الكيميائي COD





شكل (9): تركيز النترات في المياه المعالجة مع زمن التشغيل



شكل (11): نسبة الإزالة للفسفور مع الزمن بالأيام

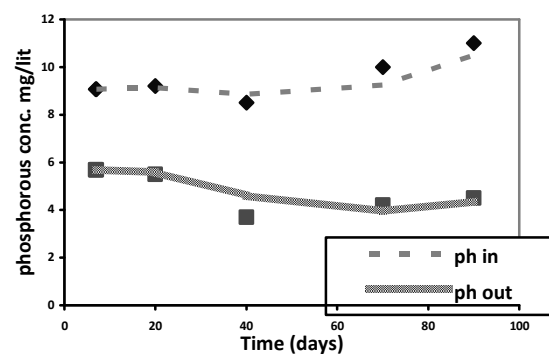
### النتائج

تشير نتائج البحث العملية نجاح الغشاء البيولوجي الليفي المجوف نوع hollow fiber ضمن العملية البيولوجية MBR في معالجة المياه الصناعية نوع مخلفات الالبان وذلك بتقليل تعكر الماء و المواد العضوية وتقليل نسبة النترات والفسفور على الرغم من ان قيمة النترات في الماء المنتج تعتبر مرتفعة قليلا 16 ملغم/لتر مقارنة مع المواصفة العراقية لمياه الري وهي 10 ملغم/لتر ولكن بالإمكان النزول بهذه القيمة باستمرار التجربة .

إن استخدام الأغشية ضمن حوض المعالجة البيولوجية MBR لسحب المياه المعالجة بالضغط السالب يلغي الحاجة لأحواض الترسيب الثانوية بالإضافة إلى حجزه الشوائب والكائنات الدقيقة ضمن الحوض البيولوجي مما يعطي مياه معالجة ذات جودة عالية ومناسبة جدا لإعادة الاستخدام بالإضافة إلى تخفيض المساحة اللازمة لمحطة المعالجة إلى حد كبير مقارنة مع طرق المعالجة التقليدية.

إن الفسفور المزال في الشكل (10) وصل إلى قيمة 3.7 ملغم/لتر من أصل 8.5 ملغم /لتر و هي قريبة من المحددات المطلوبة للمياه المعالجة حسب المواصفة العراقية (3 ملغم/لتر) وقد اتضح تأثير العملية بمقدار الحمل الواصل إلى خزان المعالجة و لكن من الشكل (11) و مقارنة نسبة الإزالة للفسفور تبين إن عملية المعالجة في تقدم مع زمن التشغيل حيث وصلت إلى 59.1% نسبة إزالة بعد 90 يوم تشغيل مقارنة مع 37.4% نسبة إزالة في بداية زمن التشغيل وتزداد نسبة الإزالة عند الوصول إلى الحالة المستقرة كما أن عملية إزالة الفسفور تتطلب هضم هوائي و لاهوائي (9).

تم إجراء البحث لدراسة أداء الغشاء مع الخزان المحتوي فيه دون إضافة توسيع للخزان لغرض المعالجة الأمثل كما في الشكل (2) .



شكل (10): تركيز الفسفور في المياه المعالجة الناتجة و الداخلة

تتميز هذه المحطات بإمكانية إقامتها ضمن المعمل نظرا لثباتية أدائها مما يوفر التكاليف الكبيرة لمجمعات الصرف المركزية، إذ تمثل لامركزية معالجة مياه الصرف الصناعي وإعادة استخدامها من أهم السمات التي تجعل لتقنية MBR دورا مهما في إستراتيجية إدارة المياه في العراق.

#### المصادر

1. Mani AR. (2011). Membranes bioreactor sewage treatment for sustainable effluents reused MBR WWTPs. Ministry of Sciences and Technology , Baghdad. Iraq.
2. عزيزي، محمد. (2010). تقييم الأثر البيئي لصناعة الألبان والأجبان وتصميم محطة معالجة. منشورات المجموعة الهندسية للأبحاث البيئية. [www.env-gro.com](http://www.env-gro.com)
3. Judd S. (2006). The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors for Water and Wastewater Treatment. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier Ltd. P. 306-330.
4. Wesch P. (2006). spiral wound immersed membranes future .ultra filtration technology. AWWOA Annual Seminar. USA. March. P. 2-6.
5. Wang Y; Huang X; Yuan Q; and Cheng Y. (2002). Anoxic/aerobic membrane bioreactor for treatment of industrial wastewater containing high strength of carbon and nitrogen. xiandai huagong (Japanese Journal). 22(8):47-49.
6. O'Connor K; and Dophen M. (2010). Pilot testing membrane bioreactor reactant plant for reuse applications. EPA. USA. P. 46.
7. John R; and Morrison MT. (1996). Use of membrane bioreactor for biodegradation of MTBE in contaminated water. Water Res.30(7): 2385–2392.
8. Chu LB; and Li SP. (2006). Filtration capability and operational characteristics of dynamic membrane bioreactor for Municipall wastewater treatment. Sep. Purif. Technol. 51:98-112.
9. Fitzke B. (2009). Membrane BioReactors (MBR) For Dairy Effluent Treatment IDF World Dairy Summit. (Berlin).
10. water and wastewater treatment solutions – Ecologix environmental systems. P. 125.
11. Patsios SI; and Karabelas AJ. (2007). Advanced wastewater treatment processes: membrane bioreactors for water reuse “Modern Technologies for Water and Wastewater Treatment. Workshop, May 16. INTERREG III A / CARDS, Greece. F.Y.R.O.M.

## دراسة العلاقة بين تفضيل المستهلك والتحليل المختبري لأنواع شائعة من معجون الطماطم في مدينة بغداد

علياء سعد الحافظ، مريم مال الله غزال

قسم الاقتصاد المنزلي / كلية التربية للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: Aliasaad80@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

من الملاحظ في الأسواق العراقية وجود أنواع كثيرة من معجون الطماطم، من مناشئ مختلفة، ونظرا لكثرة استهلاك العائلات العراقية لهذا المنتج، هدفت هذه الدراسة الى توفير بيانات علمية تساعد المستهلك في اختيار الأنواع الأفضل من معجون الطماطم. وزعت استمارات استبانة على 1000 عائلة في مناطق مختلفة من بغداد، لمعرفة اتجاهاتها نحو نوع المعجون المفضل لديهم ومواصفاته. وجمعت عينات معجون مختلفة من أسواق بغداد وتم تحليلها كيميائيا ومايكروبيولوجيا، لمعرفة مدى مطابقتها للمواصفة القياسية العراقية، بالإضافة الى التقييم الحسي. بينت نتائج الدراسة أن: أكثر الأنواع استهلاكاً هي: زير وتوسان و KDD وليلى. وحصلت هذه الأنواع على أعلى تقييم حسي هو (9,8) و (9,5) و (9) على التوالي. وكانت هذه الأنواع هي الأفضل في التحليل الكيماوي أيضاً، ومطابقة للمواصفة القياسية العراقية. أما النماذج الأخرى وهي معجون طماطم: لوسن وطراوت وحسني وحدائق شتورة والواحة، فقد كانت نسب: الدهون والبروتين والمواد المائلة التي دونت على بطاقتها الإعلامية غير مطابقة للتحليل الكيميائي. وقد احتوت على نسب من ملوثات (القصدير والنحاس والرصاص) أعلى من النسب المسموح بها في المواصفة العراقية، وحصلت على أدنى درجة في التقييم الحسي، وهي (5,5) لمعجون حسني و (5,8) معجون طراوت.

**الكلمات المفتاحية:** عصير الطماطم ثنائي التركيز، عصير الطماطم ثلاثي التركيز، المواصفة القياسية العراقية

### ABSTRACT

It can be noticed that among the Iraqi markets there are different brands of tomato pastes, with different origins. According the high consumption among families, the current study aimed to provide some scientific information that could help consumers in choosing the best brands of tomato pastes.

A questionnaire was distributed to 1000 families in different areas of Baghdad to clarify their attitudes toward certain brand which is preferable and its characteristics. Moreover, samples of tomato pastes brands sold at Baghdad markets were collected and analyzed chemically and microbiologically to determine their extent to meet the Iraqi standard, in addition to applying the sense evaluation.

Results showed that the most consumable brands were: Zeer Tosan, KDD, and Laila, where these brands had reflected the highest values of sense evaluation: (9.8), (9.5) and (9) respectively. These brands also were the best regarding the chemical analysis, as well as the most compatible to Iraqi standard. The other brands such as: Losen, Trawt, Husni, Shtoor gardens and Al- Waha were not matched the information registered on their packages such as: percentages of fat, protein, and additives, which inturns were not compatible to the Iraqi standard. These tomato pastes brands contain some yields of cupper, lead and aluminum pollutants in a higher percentages than permitted in the Iraqi standard, and had the lowest values of sense evaluation, with (5.5) for Husni tomato paste and (5.8) for Trawt.

## المقدمة

## المواد وطرق العمل

جمعت عينات من نماذج معجون الطماطم والشائعة الاستهلاك من قبل العائلات العراقية ، وذلك من خلال توزيع استبانات على (1000) عائلة وبشكل عشوائي قصدي ، وبعد جمع البيانات فرزت الإجابات بشكل تنازلي للنماذج وأدرجت في الجدول رقم (1) الذي مثل تراكيز النماذج ، والجدول رقم (2) تضمن المتطلبات المتعلقة بالقوام واللون والرائحة والخلو من التحلل والتحمض . والخلو من الشوائب والحشرات ، والجدول رقم (3) تضمن نسبة الملح المضاف والأس الهيدروجيني وحامض الستريك والرماد والمواد المائلة ، والمواد الملونة.

جدول رقم(1): أنواع معجون الطماطم المستهلكة بشكل شائع حسب التراكيز

اسم المعجون	لونا KDD/	العلالي	وسن	ليلى	توسان	زير	طراوت	حسني	حدائق شتورة	الواحة
التركيز	24	28	30							

جدول رقم (2): درجات التقييم الحسي لنماذج المعجون في عينة الدراسة\*

اسم المعجون	التقييم الحسي						
	اللون	القوام	الطعم	الخلو من التحمض	الخلو من الشوائب	الخلو من الحشرات	المعدل العام
لونا	6	6	4	5	10	10	6,8
KDD	9	8	9	8	10	10	9
العلالي	7	5	6	4	10	10	7
لوسن	5	5	4	4	10	10	6,3
ليلى	8	9	9	7	10	10	8,8
توسان	10	10	9	8	10	10	9,5
زير	10	10	10	9	10	10	9,8
طراوت	4	4	4	3	10	10	5,8
حدائق شتورة	5	6	4	4	10	10	6,5
حسني	4	4	3	2	10	10	5,5
الواحة	7	6	5	6	10	10	7,3

\*درجات التقييم الحسي من (10) وأدنى الدرجات صفر وفق ما جاء في المصدر العلمي الخاص بتقييم التغذية(2)

تعد الطماطم فاكهة حقيقية ، ولكن في ضوء وجبات الطعام نجد أن تناولها أكثر رواجاً بحالتها الطازجة، بوصفها مكون من مكونات السلطة ،وهي من المواد الأولية ذات الأهمية والقيمة الغذائية البالغين لنطاق واسع جداً من الأغذية المصنعة حيث أن الطلب كبير من قبل مصانع الأغذية عليها مستمر ومتزايد على نحو كبير ، وذلك لتحويل ثمار الطماطم إلى معجون ، والذي يعرف بأنه المنتج الغذائي المعد من تركيز عصير الطماطم تحت تفريغ ، حتى تركيز 28-30% مواد صلبة ، ويطلق عليه ثنائي التركيز ( Double Concentration) أو 35-40% مواد صلبة ويطلق عليه ثلاثي التركيز (Triple Concentration) أو 45% مواد صلبة ويطلق عليه عالي التركيز ( Highly Concentration) أما ملح الطعام فيضاف بنسبة لا يزيد تركيزها عن 10% من نسبة المواد الصلبة والطماطم يجب أن تكون سليمة ومكتملة اللون الأحمر بعد فصل البذور والقشور وتركيزها بالحرارة إلى نسبة معينة من المواد الصلبة (2,1).

إن تحويل ثمار الطماطم إلى معجون الطماطم تعد في الوقت الحاضر فقرة صناعية مهمة في التجارة الدولية ، فضلاً عن علاقتها بوجبات الطعام فهي تستهلك معلبة ، أو مجمدة ، أو مقشرة وتحفظ أما كاملة أو تقطع بهيئة شرائح ، أو تستعمل كمكون من مكونات الصلصة (Sauces) والشوربات (Soup) ، أو تحفف بشكل كامل إلى مسحوق الذي يستعمل مكون جاهز للعديد من المنتجات الغذائية الأخرى (3). وعند خطوات الصناعة ، يجب تحديد أهم مواصفات الطماطم لصناعة المعجون والتي هي:

- 1- احتواء الثمار على نسبة عالية من المواد الصلبة الذائبة
  - 2- تامة النضج وذات لون أحمر كثيف وحموضتها واطئة
  - 3- غير مصابة بالحشرات والفطريات
  - 4- خالية من الخدوش والضرر أثناء جنيها ونقلها (1)
- وتتضمن خطوات تصنيع معجون الطماطم : الغسل ، الفرز ، السحق ، للحصول على اللب المهروس ( Pulp ) ثم التسخين والتصفية لإزالة القشور والبذور ، وبعد ذلك التركيز إلى المستوى المطلوب والتعبئة في عبوات محكمة القفل ، ثم الخزن ( 1 )

ونظراً للأهمية الكبيرة لهذا المنتج الغذائي والذي لا تستغني عنه العائلة يوم واحد سواء كان بشكله الطازج أو كمعجون ، ونظراً للتنوع الكبير في أصناف المعاجين ، وامتلاء السوق المحلية بالمنتجات والمتباين المصدر منه، وبغية التعرف على أفضل النماذج من حيث الصفات والتحليل الكيميائية ومدى مطابقتها للمواصفة العراقية الخاصة بمعجون الطماطم وذلك لوضع المستهلك أمام إضاءة صحيحة لاختيار الأفضل والأنسب من حيث الصفات الصحية والميكروبية وبشكل يضعه بالجانب الآمن لاختيار النموذج الأفضل والأمن والسليم ، وهو ما هدف إليه بحثنا الحالي بإعطاء الإجابة المتلى عن العينة التي تستحق الاستهلاك والشراء ذلك بمقارنة ، الأنواع الشائعة الاستهلاك منها .

جدول رقم (3): نتائج التحليل الكيميائي لنماذج معجون الطماطم في عينة الدراسة

اسم المعجون	التحليل الكيميائي	pH	نسبة حامض الستريك	نسبة الرماد	نسبة المواد المائلة	نسبة الدهون	نسبة البروتين
لونا	3	4	5.1	1.1	1	3	
KDD	4	3	3	-	-	2	
لوسن	3.1	4	5.3	0.5	0.5	2	
ليلي	4.2	3.5	4.6	-	-	2.1	
توسان	4.2	3.5	4.6	-	-	2.4	
زير	4.4	3	4.6	-	-	2.4	
طراوت	2	4	5.6	0.3	2.1	1	
حدائق شتورة	3	2.7	5.2	0.2	3	1	
حسني	3	3.8	5.1	2.3	1	1	
الواحة	3.4	3.6	5.2	1.4	1	1	

## طرق العمل

أولاً/ قياس الأس الهيدروجيني pH :

قدر الأس الهيدروجيني حسب طريقة Gashti (2002) حيث أخذ (5غم) من كل عينة من المعجون وأضيف له (5مل) من ماء مقطر ومزجت جيداً ، وتم قياس الأس الهيدروجيني باستعمال جهاز pH-meter (4) ثانياً/ قياس نسبة الرماد : قدر الرماد حسب طريقة A.O.A.C (2005) وذلك بأخذ (2غم) من كل عينة لمعجون الطماطم في ملعقة ذات وزن معلوم ووضعت في فرن الترميد Muffle Furnace وبدرجة حرارة 252م لمدة 24 ساعة ثم بردت الملاعق ووزنت.(5)

ثالثاً / فحص النشا باستعمال محلول اليود للكشف عن المواد المائلة (النشا) وتتلخص طريقة العمل بالآتي : نلقح أطباق وسط النشا بالتخطيط ، وحضنها عند درجة حرارة 37م ولمدة 48 ساعة ، ثم غمر الأطباق بمحلول لوكال Lugal Solution ، وتعد النتيجة موجبة عند ظهور نقطة شفافة حول المستعمرات دلالة على إنتاج أنزيم الأميليز المحلل للنشا(6)، ويتفق هذا المصدر مع المصدر (13) الأقل حداثة، الذي أشار إلى أن التحري عن التحلل المائي للنشا يتم باستخدام كاشف اليود، فاللون الأزرق الذي يحدث عند إضافة اليود إلى النشا يعبر عن جزء الأميلوز حيث يمتص الأميلوز اليود، وتنمى الجراثيم في مرق مغذي أو آكار يحوي على النشا وبعد الحضان يضاف محلول النشا إلى الوسط فبعد تكوين لون أزرق دلالة على عدم حدوث تحلل مائي، أما غياب اللون الأزرق بعد إضافة اليود يدل على غياب النشا أي أنه قد تحلل مائياً.

رابعاً/ قياس حامض الستريك وتتلخص طريقة العمل بالآتي : أساس الطريقة يعتمد على اللون الناتج من التفاعل الذي يعطيه حامض الستريك مع البيريدين وحامض الخليك الخالي من الماء فيتكون مع حامض الستريك خلات الحامض ، ثم يحصل لهذا الحامض غير المائي تفاعل مع البيريدين يصاحبه ظهور لون خاص بذلك . وتقاس شدة اللون المتكون باستعمال Spectrophotometer على موجة طولها 428، فيؤثر البروتين الموجود في النموذج في عملية الفحص ،لذا يجب التخلص منه بواسطة ترسيبه باستعمال Trichloride –acetic acid ثم يرشح .(7)

خامساً / تقدير الدهن : قدرت نسبة الدهن حسب طريقة Soxhlet باستعمال جهاز السوكسيليت Diethyl- (Ether) .(8)

سادساً / تقدير البروتين : قدرت نسبة البروتين حسب طريقة Pearson ، حيث استخدمت طريقة Semi-Microkeldal في تقدير النتروجين الكلي وأستخدم العامل (6,25) للحصول على نسبة البروتين .(9)

سابعاً/ تقدير الملوثات : وشملت عناصر القصدير ، النحاس ، الرصاص وتتلخص طريقة العمل بالآتي :

استعمال جهاز الامتصاص الذري اللهب Atomic Absorption Flame Spectrophotometer وتتلخص عملية تحضير العينة للفحص كما يلي : يؤخذ وزن معين من النموذج ويذاب في حامض النتريك المركز ، وبعد إذابته ينقل إلى قنبينة حجمها (50مل) ثم يخفف النموذج ليكون ضمن (Working Curve) المستخدم في القياس ، وتجري الحسابات الآتية :

حجم النموذج × عدد مرات التخفيف × تركيز النموذج في الجهاز / وزن النموذج = % تركيز النموذج الناتج / 10000 = % تركيز النموذج .(10)

ثامناً / التقييم الحسي : تم اختيار طريقة المقارنات المتعددة Multiple Comparison Test وفي هذه الطريقة يتم اختيار عدد من العينات في وقت واحد ثم يطلب من المحكمين تقييم العينات من حيث صفة معينة أو مجموعة من الصفات مثل / اللون القوام / الطعم / الخلو من التخمض / الخلو من الشوائب / الخلو من الحشرات ، وذلك عن طريق الاستبيانات وتشمل :

1-الترتيب حيث ترتب العينات تبعا لدرجة التفضيل لكل صفة مما سبق .

2-استخدام معايير كمية أو ما يعرف بالـ Scoring، حيث تعطى درجات من عشرة لكل صفة من الصفات الواردة في الفقرة ثامناً .(2)

## النتائج والمناقشة

أولاً / نماذج معجون الطماطم الأكثر استهلاكاً من قبل العائلات العراقية ، مرتبة / وقد صنفت حسب التراكيز كما بينها الجدول رقم (1):

لقد تم إدراج التصنيف الوارد في الجدول رقم (1) وفق ما جاء بالوصفة العراقية الخاصة بمعجون الطماطم (11) حيث قسمت إلى الأنواع الآتية :

أ/ المعجون خفيف التركيز لا تقل فيه نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية عن 24% وزناً.

ب/ المعجون متوسط التركيز لا تقل فيه نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية عن 28% وزناً .

ج/ المعجون المركز لا تقل فيه نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية عن 32% وزناً .

وأشارت الفقرات التي تضمنها الجدول رقم (2) إلى التقييم الحسي للنماذج السابقة والذي يعرف بالجودة الحسية Sensory Quality والتي تعرف بأنها انطباع الشخص عن الصفات الحسية عند اختياره لغذاء ما ، وتنتج من محصلة حكم المستهلك على المنتج الغذائي بواسطة أحاسيسه المختلفة ( النظر ، الشم ، التذوق ، اللمس، الطعم ،القوام) وهذا ما بينته المصادر العلمية في هذا المجال(2).

ثالثاً: نسبة الدهن:

1-لونا صفر / 1

2-حسني صفر / 1

3-لوسن صفر / 0,5

4-طراوت 0,9 / 0,3

5-حدائق شتورة صفر / 0,2

وبذلك يتبين أن النماذج السابقة احتوت معلومات غير دقيقة عن العناصر الغذائية التي يتضمنها المنتج الغذائي . والفحص الكيميائي الآخر المهم هو نسب العناصر الملونة والمواد المعدلة للحموضة التي تحتويها المنتجات السابقة والتي يوضحها الجدول رقم (4).

جدول رقم (4): نسب العناصر الملونة في نماذج عينات الدراسة

اسم المعجون	النسب المئوية للعناصر الملونة والمواد المعدلة للحموضة			
	الكربونات الصوديوم ppm	الرصاص ppm	النحاس ppm	القصدير *ppm
لونا	0.12	0.11	0.43	0.31
KDD	0.073	0.13	0.51	0.41
لوسن	0.21	0.16	0.53	0.57
ليلي	0.303	0.12	0.12	0.31
توسان	0.62	0.32	0.54	0.41
زير	0.032	0.16	0.31	0.047
طراوت	0.56	0.805	0.52	0.054
حدائق شتورة	0.54	0.16	0.27	0.62
حسني	0.101	1.27	0.53	0.061
الواحة	0.102	2.11	0.81	0.61

\*ppm: part per million

النتائج السابقة في جدول رقم (4) تشير إلى احتواء نماذج : حدائق شتورة / حسني / الواحة على نسب مرتفعة من الملوثات ، وقد يعزى ذلك إلى العلب التي تحتويها العينات فقد كانت بعضها متأكلة ومصابة بالصدأ ، وقد يكون ذلك له تأثير في ارتفاع محتواها من تلك العناصر ، فضلاً عن العرض والخزن والحفظ السيئ، أو قد يكون السبب هو سوء المواد الأولية المستخدمة في الأعداد والتحضير . فضلاً عن كون الضرر قد ينتج من أثناء عملية الشحن ، بفعل الارتفاعات الشوكية ، وتلعب طبيعة هذا المنتج الغذائي دور في حدوث التلف فيه ، فلو تضررت علبه واحدة يمكن أن تنتسب في تآكل العلب الأخرى من الخارج على نحو سيء فتتسبب في تلف المنتج من العلب المتضررة ، وهو ما أشارت إليه بحوث ومصادر علمية ذات علاقة بالموضوع (12) ، كما تلعب الأحياء المجهرية دور كبير في الفساد ومنها :

1-الانتفاخ الهيدروجيني : وهو تفاعل كيميائي يحدث بين معدن العلب والحموضة الموجودة في المنتج مما يؤدي إلى انتفاخ العبوة .

من ملاحظة الجدول رقم (2) نجد أن أعلى معدل للصفات الحسية حصل عليها نموذج معجون زير وبلغ (9,8)وبالتدريج تلاه نموذج توسان (9,5) و KDD (9) ونموذج ليلي (8,8) .

أما أدنى النسب فقد كانت : نموذج معجون حسني (5,5) ومعجون طراوت (5,8) ونموذج معجون لوسن (6,3) ونموذج معجون لونا (6,8) .

أن النماذج التي حازت على أعلى النسب من حيث الصفات جاءت مطابقة للمتطلبات الواردة في المواصفة العراقية والتي تشير إلى كون المنتج متجانس القوام ، خالي من التكتلات والفقايعات ، وهذا يدل على طريقة تصنيع جيدة ، فضلاً عن لونه أحمر جيد وله رائحة وطعم طبيعيين وخالي من التخمض ، والنماذج كانت خالية من الأتربة والشوائب. أما نسبة الملح فقد كانت للنماذج بالتركيز الخفيف 3% والنسبة بالمعجون المركز 5% وكانت جميع النماذج ضمن تلك الحدود ، وقد أدرجت الخصائص المتعلقة بالتحليل الكيميائي للنماذج في الجدول رقم (3)، حيث أظهر التحليل الكيميائي أن نماذج معجون طماطم التي كانت مطابقة للمواصفة العراقية الخاصة بما يأتي:

1-قيمة (pH) (4,2) ± 0,2 وكانت نماذج معجون : KDD / ليلي / توسان / زير / هي الأفضل من العينات .  
2-نسبة حامض الستريك لا تزيد عن 3,5% والنماذج التي سجلت أفضل المستويات هي: KDD / ليلي / توسان / زير .

3-نسبة الرماد لا تزيد عن 5% والنماذج التي حصلت على أفضل النسب هي : KDD / ليلي / زير / توسان .

4-نسبة المواد المائلة يجب أن تكون خالية والنماذج التي سجلت الأفضل هي : KDD / ليلي / توسان / زير .

5-نسبة الدهن صفر والنسب الأفضل كانت لنماذج معجون طماطم هي : KDD / ليلي / توسان / زير .

6-نسبة البروتين لا تزيد عن 2,4 ، النماذج التي حصلت على أفضل النسب كانت لمعجون طماطم : KDD / لوسن / ليلي / توسان / زير .

وبذلك فإن النماذج التي حصلت على أفضل النسب لكل التحليلات الكيميائية كانت لمعجون طماطم نوع: KDD / ليلي / توسان / زير .

أما البطاقة الإعلامية وما تتضمنه من معلومات غذائية فقد كانت بعض النماذج كاملة والتي شملت عينات معجون طماطم (KDD / ليلي / توسان / زير ) والتي كانت مطابقة للمواصفة العراقية للعام 2001 (10).

واحتوت بعض النماذج على معلومات غير مطابقة للتحليل الكيميائي والتي شملت نماذج معجون طماطم:

أولاً: نسبة البروتين ببطاقة المعلومات ونسبته بالتحليل الكيميائي كما يأتي :

1-نموذج لوسن 3,9 / 2

2-نموذج طراوت 3,8 / 1

3-نموذج لونا 4,2 / 3

4-حدائق شتورة 3,2 / 1

5-الواحة 2 / 1

ثانياً: المواد المائلة احتوتها النماذج الآتية :

1-حسني 4 / 2,3

2-لوسن 5,5 / 0,5

3-طراوت 0,9 / 2,1

7. زمارليتسكي، ستانسواف ، كافو ، يولييان ، مولسكا ، أرينا (1985). الطرق العملية لتحليل الحليب ومشتقاته وبعض الخضراوات. ترجمة الراوي ، طارق ساكن حكيم ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بغداد .

8. A.O.A.C (2000). Association of Official analytical Chemists . Official methods of Analysis .USA

9. Pearson D. (1972). The Chemical Analysis of National College of food Technology , University of Reading . Weighbridge . Surrey.

10. المواصفة العراقية رقم (2270 / 3) الحدود الميكروبية والتلوث الكيميائي في الأغذية، الجزء الثالث، للعام 2006 .

11. المواصفة العراقية رقم (248) التحديث الأول ، معجون الطماطم (عصير الطماطم المكثف ) التعديل الأول عام 2001.

12. مجلة الصناعات الغذائية (1989). واقع وآفاق صناعة المعبّات الغذائية في الوطن العربي. الاتحاد العربي للصناعات الغذائية. العدد العاشر. ص 213 . بغداد.

13- دوناج- بلانديفيل، كريستي ماري ادر (1982). مبادئ الاختبارات الكيميائية الحيوية في علوم الأحياء المجهرية التشخيصي. ترجمة صائب نظمي السخن، مطابع جامعة الموصل ، ص 105-107 .

2-الانتفاخ البكتيري : ويكون سببه واحد أو أكثر من بكتريا *Lactobacillus Lycopersica* .

3-التحمض المستتر : ويتميز بنكهة غير مرغوبة ومظهر عكر ، حيث يحدث تعكر في لون الطماطم ، وهذه من الدلالات على تحمض وفساد الطماطم المعلبة .

4-فساد بواسطة الخمائر المخمرة : وهي تتحمل الحرارة العالية ، وتظهر نكهة الخميرة في المنتج ، مع تكوين غاز (12).

#### الاستنتاجات والتوصيات

1-عدم شراء المنتجات الغذائية لمجرد كونها مناسبة الثمن بل يجب اختيار النوع الجيد أولاً .

2-قراءة البطاقة الإعلامية الموجودة ومحاولة التعرف على المحتويات فيها .

3-اقتناء المنتجات المعلبة خصوصاً والمنتجات الغذائية عموماً ، المحفوظة بشكل جيد والمعروضة بشكل جيد.

4-إجراء دراسة مسحية عن منتجات غذائية أخرى والعمل على التحليل الكيميائي لمحتوياتها وبيان مدى مطابقتها للمواصفة العراقية .

5-تجنب شراء العبوات المتضررة لأنها قد تتعرض للفساد بأي نوع من أنواعه كالانتفاخ الهيدروجيني أو البكتيري أو الإصابة بالخمائر والأعفان ،

6- أفضل أنواع العبوات المستعملة في التعليب هي الزجاجية ، حيث كانت أفضل الخصائص للمنتجات المحفوظة بها ، تليها العبوات المعدنية المطلية بمادة لا تتفاعل مع المنتج الغذائي .

#### المصادر

1. الأسود ، ماجد بشير ، عبد العزيز ، عمر فوزي و سولاقا ، أمجد بوي ( 2000 ) مبادئ الصناعات الغذائية ، الطبعة الثانية ، دار الكتب للطباعة والنشر والتوزيع ، الموصل .

2. خليل ، محمد خليل ، عبد العال ، محمد حمادي ، وأبو سماحة ، أسامة راشد ، أبو غريبة ، هاني علي (2010) تطبيقات عملية في حفظ وتصنيع الأغذية ، مكتبة بستان المعرفة للطباعة والنشر ، الإسكندرية -مصر .

3. الجندي ، محمد ممتاز ( 1983 ) الصناعات الغذائية ، الجزء الثاني ، دار الآفاق الجديدة .

4. Ghshti GZ. (2002). Estimation of microbiological and chemical variation in minced fish processing of Atlantic Pollpck (pollachius vireas ) final project . The United Nations University fisheries training program. P. 30.

5. A.O.A.C. (2005). Association of Official Analytical Chemist. Official methods of analysis . microbiological food testing .chapter (17) .USA

6. Atlas RM; Lawrence C; Parks A; and Brown E. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology . Mosby Company Inc . London.

## تأثير التداخل بين الري بالماء الممغنط والتسميد في نمو نبات الميرمية *Salvia officinalis* وتركيز المادة الفعالة ( الثيوجين Thujone )

حسين محمود شكري

قسم التقنيات الإحيائية البيئية / مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: hmshukri@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

أجريت تجربة لدراسة تأثير استخدام المياه الممغنطة في نمو وإنتاج نبات الميرمية من المادة الفعالة في النبات (الثيوجين Thujone) بالتداخل مع سماد فوسفات ثنائي الأمونيوم (DAP) (21%P) في البيت البلاستيكي . صممت التجربة وفق تصميم القطاعات الكاملة العشوائية RCBD . العامل الرئيسي مغنطة مياه الري بخمسة شدد مغناطيسية 0, 500, 1000, 1500 و 2000 كاوز (Gauss) , العامل الثاني أربع مستويات من سماد DAP كمصدر للفسفور بدون اضافة 100, 200 و 300 كغم اهكتار ., زرعت النباتات في أصص سعة 5 كغم . تم قياس ارتفاع النباتات عند اكتمال نمو النباتات قبل التزهير وحساب الوزن الرطب و الوزن الجاف للنبات لكل سدانة والمساحة السطحية للأوراق و قياس المادة الفعالة (الزيت ) في الأوراق (الثيوجين Thujone) أظهرت النتائج وجود اختلافات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 لمعاملات المياه المعالجة مغناطيسيا والمستويات السمادية والتداخل بينها إذ بلغت القيم لارتفاع النبات , الوزن الرطب , الوزن الجاف في معاملة السيطرة 54.33 سم , 47.66 غم/أصيص و 27.39 غم/أصيص على التوالي وكانت أعلى القيم في معاملة 2000 كاوز و 300 كغم/اهكتار DAP 74.00 سم , 66.43 غم/أصيص و 38.17 غم/أصيص على التوالي . بلغ تركيز الزيت الفعال (الثيوجون Thujone) 1.51% عند معاملة السيطرة و بلغت 3.41% عند معاملة 2000 كاوز و 300 غم/اهكتار DAP .

الكلمات المفتاحية: نبات الميرمية، الثيوجين، الماء الممغنط

### ABSTRACT

During spring 2012 Biological experiment was done to study magnetic water treatment (MWT) and its effect on growth and yield of sage plant, interacting with 21% Di-Ammonium Phosphate (DAP) fertilizer , in green house.

The first factor was 5 levels of MWT; (0, 500, 1000, 1500 and 2000 Gauss). The second factor was 4 doses of DAP 21%P; (0, 100, 200 and 300 Kg/H). The experiment was designed according to complete random block design (CRBD), and planted in 5Kg pots.

Before flowering, the heights of plants, wet and dry weights, surface areas and the active oil components in the leaves of the sage were measured.

Results revealed significant differences ( $p=0.05$ ) in MWT and fertilizers levels and in between.

Plants heights and wet and dry weights in the control group were (54.33cm, 47.66g/pot and 38.17g/pot respectively). Higher values were reported with 2000Gauss MWT and 300Kg/H DAP (74.00cm, 66.43g/pot and 38.17g/pot respectively). Concentration of active oil (Thujone) was 1.51% at control group, and 3.41% at 2000Gauss and 300kg/H treatment.



## المقدمة

تعد النباتات الطبية احد اهتمامات المراكز البحثية في مجال التقنيات الإحيائية وصناعة الأدوية والمستحضرات الطبية الأخرى . ويعد نبات الميرمية أو المريمية احد هذه النباتات وهو نبات طبي عشبي معمر له ساق يرتفع قليلا عن الأرض بحدود 30 الى 60 سم ويصل أحيانا إلى 100سم وهي من الفصيلة الشفوية جدول رقم (1) يوضح التصنيف العلمي للنبات الذي ينتمي إلى عائلة تضم الريحان والنعناع والحبق والزعرور والمرامية وهي من أشهر وأقدم النباتات التي تستخدم في الطب القديم والحديث . وتشتهر بها بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط . وتكثر في الأماكن الجبلية . وتوجد على مدار السنة وتزهر في الربيع وأوائل الصيف ، ولون الزهرة زهري ويتحول بعد ذلك إلى ثمر بحجم حبة الكرز ويصبح لونه أبيض في حالة الجفاف ( 1 ) .

## جدول رقم (1): التصنيف العلمي لنبات الميرمية (2)

Kingdom	المملكة
Plantae	
Magnoliophyta	القسم
Magnoliopsida	الصف
Lamiales	الرتبة
Lamiaceae	العائلة
Salvia	الجنس
S. officinalis	النوع
Binomial name الاسم الثنائي	
L.Salvia officinalis	

جزئيات الماء خلال غشاء الخلية وزيادة ما تحمله من مغذيات مما ينعكس على الأداء الفسلجي للنبات ( 5 ) . استخدمت التقنية المغناطيسية في الزراعة عالميا وعربيا وفي العراق وعالجت العديد من المشاكل منها التربة المالحة والمياه المالحة وزيادة النمو والإنتاج ( 6 ) و ( 7 ) . كما وجد Hozayn و Amira ( 2010 ) أن للماء الممغنط تأثيرات إيجابية في صفات النمو في محصول الحنطة إذ زاد ارتفاع النبات والوزن الجاف والوزن الطري ومحتوى الأوراق من الكلورفيل وعزيت الزيادة لمركبات الأندول ( 8 ) .

وجد Hilal وآخرون أن الماء الممغنط يؤثر على حركة العناصر الغذائية في المنطقة الجذرية ويختلف من عنصر لآخر حسب قابلية العنصر للمغنطة وكانت حركة الحديد أعلى بتسع مرات في المغنطة مقارنة مع الحالة العادية (معاملة السيطرة) وحركة الزنك أعلى خمسة مرات والفسفور ثلاث مرات وكان محتوى الفسفور تضاعف ثلاث مرات في الأوراق ولم يتأثر النيتروجين بالمغنطة. كما أشار البحث إلى أنه يمكن أن ينتقل الماء المعالج مغناطيسيا خلال أنابيب بلاستيكية لمسافة (550-700 م) بدون أن يفقد الطاقة المغناطيسية ( 9 ) .

وجد الجبوري وآخرون زيادة نسبة الإنبات لبذور الحنطة عند معاملتها بمياه معالجة مغناطيسيا بمستويات 1000, 1250, 1500 و 2000 كاووس مقارنة بمعاملة السيطرة كما حصلوا على زيادة ارتفاع النباتات والوزن الرطب والجاف والمساحة الورقية للمعاملات المعاملة بالمياه المعالجة مغناطيسيا مقارنة بمعاملة المحاييد ( 10 ) .

يستخدم شراب الميرمية الساخن كشرب عشبي طبي كالشاي حيث ذكر العالم جيرارد في القرن السابع عشر أن المرمية تقوي الذاكرة وقد أكد الباحث الانجليزي هذه الصفة حيث أثبتوا أن الميرمية تهبط مستوى الأنزيم المسئول عن تحطيم استيلايل كولين الدماغ ( colane esterase ) والذي يسبب الزهيمر ( 3 ) . كما تحتوي الميرمية على مواد مضادة للأكسدة ومن أهم المركبات المهمة في المرمية الزيت الطيار الذي يحتوي على مركب الثيوجين (Thujone) ولكن يجب الحذر من استخدام كمية كبيرة من هذا المركب حيث أنه يسبب بعض التشنجات ، وتحتوي الميرمية على زيوت طيارة وفلافونيدات وأحماض فينولية ومواد عفصية والمادة الفعالة تعود إلى مركبات الزيت الطيار ( 4 ) .

للميرمية عدة فوائد : صناعة طبية ومنزلية طبية ونباتات زينة في الحدائق النباتية Botanic Gardens والحدائق المنزلية ( 1 )

وللتوسع وزيادة في الإنتاج الزراعي كانت هناك عدة تقنيات علمية حديثة منها استخدام الأسمدة ، الأصناف المحسنة وراثيا وطرق الري . وبرز حديثا استخدام الوسائل الفيزيائية في المجال الزراعي ومن أهمها استخدام التقانة المغناطيسية إذ يعتقد ان هذا العصر سيكون عصر تطبيق الوسائل الفيزيائية. تشمل التقانة المغناطيسية ري النبات بماء ممغنط أو التحفيز الحيوي المغناطيسي للبذور وذلك بنقع البذور بماء ممغنط . عند معالجة الماء مغناطيسيا تحدث تغييرات في خواص الماء الفيزيائية منها الشد السطحي واللزوجة والقدرة على إذابة الأملاح وبالتالي سهولة عبور

حرارة 20 درجة مئوية (13).

عدد البذور النابتة  
نسبة الإنبات =  $\frac{\text{عدد البذور الكليّة للعينة في الطبق}}{100 \times X}$

ثانياً: تجربة أصص لزراعة نبات المرمية وفق تصميم القطاعات الكاملة العشوائية RCB / العوامل المنشقة (14). تكون المعاملات 3x4x5 (ماء معالج مغناطيسياً x تسميد x مكررات) 60 وحدة تجريبية. و تم تصميم المعاملات وكما يلي:  
العامل الأول نوعية المياه:

1. معاملة سيطرة (control) ماء حنفية . (M0)
2. ماء معالج مغناطيسياً بشدة 500 كاوز. (M1)
3. ماء معالج مغناطيسياً بشدة 1000 كاوز. (M2)
4. ماء معالج مغناطيسياً بشدة 1500 كاوز. (M3)
5. ماء معالج مغناطيسياً بشدة 2000 كاوز. (M4)

العامل الثاني :

تم إضافة سماد فوسفات ثنائي الامونيوم Di Ammonium phosphate "DAP" 21% P كمصدر للفسفور أربع مستويات ، بدون إضافة ، 100 ، 200 ، 300 كغم/هكتار وأضيف سماد اليوريا 100 كغم/هكتار ( يوريا 46% N ) كمصدر مكمل لعنصر النيتروجين على دفعتين الأولى مع الزراعة والثانية بعد شهر ونصف من الزراعة لجميع المعاملات وأضيف سماد كبريتات البوتاسيوم (41% K) كمصدر لعنصر البوتاسيوم 100 كغم/هكتار دفعة واحدة قبل الزراعة. جدول رقم (2) يبين مواصفات الأسمدة.

معاملات التسميد بسماد DAP :

1. بدون إضافة (معاملة سيطرة). (F0)
2. 100 كغم/هكتار DAP (F1)
3. 200 كغم/هكتار DAP (F2)
4. 300 كغم/هكتار DAP (F3)

جدول رقم (2): مواصفات الأسمدة المستخدمة (15)

اسم السماد	الرمز الكيميائي	النسبة المئوية للعنصر
السوبر فوسفات ثنائي الأمونيوم "Di Ammonium phosphate"	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	P%21
اليوريا Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	N%46
كبريتات البوتاسيوم Potassium sulfate	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> O %50 S %17

وجد فهد وآخرون أن استخدام ماء ممغنط بشدة 2500 كاوز يعطي زيادة معنوية في ارتفاع النبات والوزن الجاف والرطب لنبات الذرة الصفراء (11). كما وجد عبد المنعم (2008) زيادة ارتفاع نباتات الذرة الصفراء عند الري بمياه معالجة مغناطيسياً في ترب كلسية وجبسية (12). في حين لم يحصل الجبلي وإحسان على فروقات معنوية في معاملات مغنطة مياه الري في صفات النمو لنبات الحنطة (5).

إن الهدف من الدراسة تطوير زراعة وإنتاج نبات الميرمية في ظروف وبيئة وسط العراق وللحصول على نمو جيد للنبات وزيادة تركيز الزيت الفعال المسمى الثيوجون (Thujone) في أوراق النبات، أجريت هذه الدراسة باستخدام أربعة مستويات لمغنطة مياه الري والتسميد المركب لمعرفة التداخل وتأثيره على نمو وزيادة الإنتاج الخضري المصحوب بزيادة تركيز المادة الزيتية الفعالة . وتسعى الدراسة الحالية للأهداف التالية:

1. لمعرفة تأثير استخدام المياه المعالجة مغناطيسياً في زيادة نمو وإنتاج نبات الميرمية وزيادة كمية المادة الفعالة (الزيت) في النبات.
2. دراسة تأثير الأسمدة المركبة في نمو النبات وزيادة تركيز الزيت الفعال الثيوجون Thujone.
3. دراسة تأثير الماء المعالج مغناطيسياً بالتداخل مع السماد المركب في نمو النبات وزيادة تركيز الزيت الفعال الثيوجون Thujone.

#### المواد وطرق العمل

أجريت الدراسة خلال الموسم الربيعي 2011-2012 في تربة مزيج في البيت البلاستيكي لزراعة وإكثار نبات المرمية ومعرفة التداخل بين مغنطة مياه الري والتوصية السمادية إذ تم تهيئة ثلاث مغناط Magnetic Rod بثلاث شدد مغناطيسية صنعت في قسم التقنيات الاحيائية البيئية مركز بحوث التقنيات الاحيائية جامعة النهرين.

أ. 500 كاوز Gauss

ب. 1000 كاوز Gauss

ج. 1500 كاوز Gauss

د. 2000 كاوز Gauss

قيست الشدة المغناطيسية للمغناط (بقطر 0.5 انج) بواسطة جهاز Gauss meter الذي أنتجته شركة ALPHA LAB. Inc. موديل GM-2 صناعة الولايات المتحدة الأمريكية.

#### التجربة البيولوجية:

أولاً :إجراء تجربة لمعرفة تأثير الماء المعالج مغناطيسياً في نسبة إنبات البذور.

تم الحصول على بذور نبات المرمية من الأسواق المحلية مستوردة من خارج القطر (بذور غوطه الشام) مثبت على الاكياس الاسم العلمي Salvia Officinalis ، النقاوة 98% والانبات 79% ، وأجريت عليها تجربة نسبة الإنبات إذ وضعت ووزعت خمسة وعشرون بذرة في أطباق زجاجية (Petri dish) على ورق ترشيع وشم تم إضافة الماء وتغطى بورق ترشيع وفقاً للمعاملات وبثلاث مكررات 3X5 بتاريخ 2012/3/1 تم وضعها في حاضنة على درجة

عند اكتمال نمو النباتات وقبل مرحلة التزهير قطعت النباتات عند سطح التربة. وتم حساب الوزن الرطب و الوزن الجاف للنباتات ومعدل مساحة الورقة الواحدة (سم<sup>2</sup>) لكل أصيص.

تم حساب معدل مساحة الورقة الواحدة من أوراق كل وحدة تجريبية (أص) أخذت عشوائياً قبل مرحلة التزهير باستخدام جهاز قياس المساحة الورقية نوع Menolta .

تم قياس الزيت الفعال في الأوراق (الثيوجون Thujone) قبل مرحلة التزهير اعتماداً على الطريقة الواردة في Walch وآخرون (18).

حللت النتائج إحصائياً وفق تصميم القطاعات الكاملة المعشاة (RCBD) Randomized Complete Block وبثلاثة مكررات (14) وقورنت المتوسطات للمعاملات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference باستخدام برنامج تحليل التباين.

تم تقدير الصفات الفيزيائية للتربة المستعملة في الدراسة وهي: النسجة بطريقة Pipette-method والكثافة الظاهرية بطريقة Core Sample كما ورد في (19) تم تقدير الصفات الكيميائية للتربة الأيضية الكهربائية باستخدام جهاز HANNA- HI 8820 والدالة الحامضية للتربة (pH) باستخدام جهاز pH - meter في مستخلص الإشباع. كذلك تم تقدير السعة التبادلية للأيونات الموجبة (CEC) باستخدام واحد عياري خلات الصوديوم وخلات الامونيوم وقياس الصوديوم بجهاز اللهب (Flame Photometer)، والأيونات الذائبة والجبس والكلس كما ورد في (20) جدول رقم (4).

زرعت البذور بشكل دابة في ظروف البيت البلاستيكي في شهر (تشرين ثان 2011) في مادة عضوية متحللة (بيت موس pet moss) بعد نقعها في ماء معالج مغناطيسياً وفق المعاملات لمدة 24 ساعة وريها بنفس المعاملات ومن ثم نقلها وتغريدها إلى أصص (سنادين) - نبات واحد في كل سنادنة سعة 5 كغم بقطر 20 سم بعد شهر من الانبات في تربة مزيج من صفاف نهر دجلة مواسفاتها في الجدول رقم (2) كذلك في ظروف البيت البلاستيكي في شهر (شباط 2012).

تم إضافة سماد الداب وكبريتات اليوتاسيوم دفعة واحدة قبل الزراعة (16).

تم الري وفقاً لاحتياج النبات للسعة الحقلية باستخدام الميزان وفقاً للمعاملات. علماً تم التخلص من تأثير أيون الكلور المضاف للماء في محطات التصفية وذلك بترك الماء في خزان بلاستيك وتعريضه للهواء للسماح للكلور بالتطاير. ومن ثم معالجته مغناطيسياً وفقاً للمعاملات. وللحصول على الماء المعالج مغناطيسياً تم إمرار الماء خلال المغناط وتصفير ثابت وتركه لمدة عشرون دقيقة قبل استعماله مع مراعاة استعمال أنابيب وحاويات بلاستيكية للحفاظ على مغنطة المياه (17). جدول (3) يبين الخواص الكيميائية لمياه الري المستخدمة للري (ماء حنفية).

تم قياس ارتفاع النباتات (ارتفاع النبات عن سطح التربة لنهاية أعلى ورقة في النبات) أسبوعياً لمعرفة الفرق في الأطوال حسب المعاملات قبل اختفاء الفروق في الارتفاعات وقبل مرحلة التزهير (نيسان 2012).

جدول رقم (3): الخواص الكيميائية لمياه الري المستخدمة للري (ماء حنفية)

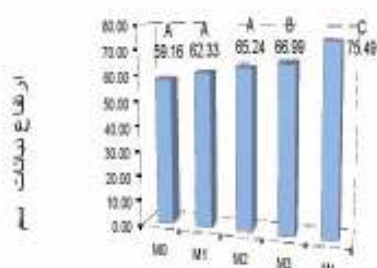
SAR	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-4</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	Cl <sup>-</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	K <sup>+</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	Mg <sup>++</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	Ca <sup>++</sup> mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	PH	EC dS.m <sup>-1</sup>
1.91	3.41	2.40	4.21	0.10	3.41	2.30	4.10	7.0	0.8

جدول رقم (4): بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المستخدمة للزراعة

الوحدة	القيمة	الصفة
-	7.56	درجة تفاعل التربة pH
ديسي سيمنز م. <sup>1</sup>	1.33	التوصيل الكهربائي EC <sub>e</sub>
سنتيمول.كغم <sup>-1</sup> تربة <sup>1</sup>	5.98	السعة التبادلية الكاتيونية (CEC)
غم.كغم <sup>-1</sup> تربة <sup>1</sup>	4.30	المادة العضوية Organic matter
	0.35	الجبس غم.كغم Gypsum
	44	الكلس غم.كغم Lime
mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	5.80	الكالسيوم
	3.30	المغنيسيوم
	4.70	الصوديوم
	0.1	البوتاسيوم
mmol <sub>c</sub> .l <sup>-1</sup>	5.80	الكلور
	3.40	البكربونات
	4.74	الكبريتات
	Nil	الكربونات
غم . كغم <sup>-1</sup>	50	الطين Clay
	100	الغرين Silt
	850	الرمل Sand
Sandy رملية مزيجة Loam		النسجة Soil Texture
ميكاغرام م. <sup>3</sup> تربة <sup>3</sup>	1.33	الكثافة الظاهرية density
المحتوى الرطوبي الحجمي θ سم <sup>3</sup> .سم <sup>-3</sup>		
0.4000	عند الاشباع (0) كيلوباسكال	
0.2200	عند اشد (33) كيلوباسكال	
0.1300	عند شد (1500) كيلوباسكال	
0.1500	عند استنزاف 75% من الماء الجاهز	
0.0900	الماء الجاهز	

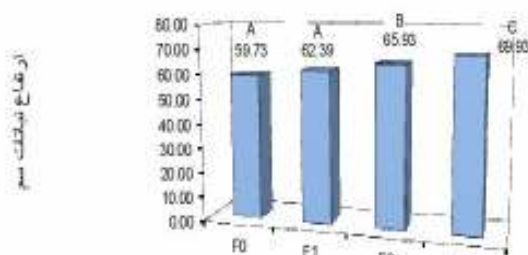
## النتائج والمناقشة

. LSD فرق معنوي



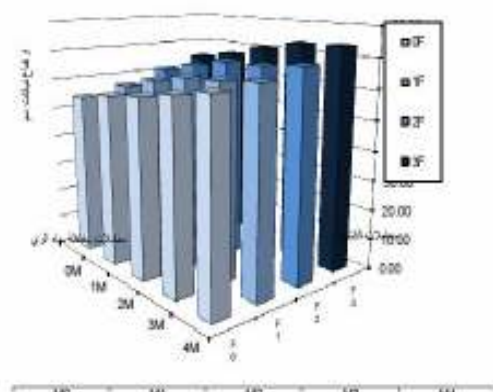
معدلات مغنطة الري

( أ ) تأثير ماء الري المغنط في ارتفاع نباتات الميرمية ( سم )



معدلات السماد

( ب ) تأثير التسميد في ارتفاع نباتات الميرمية ( سم )



( ج ) تأثير مغنطة مياه الري والتسميد في ارتفاع نباتات الميرمية سم

شكل (1): تأثير الماء المغنط والتسميد والتداخل بينهما في ارتفاع نباتات الميرمية لمعاملات الدراسة ( سم )

أشارت النتائج إلى وجود تأثير معنوي لمغنطة المياه على نسبة إنبات بذور الميرمية حيث كانت نسبة الإنبات 79.00% لمعاملة المحاليد باستخدام مياه بدون تعريضها لشدة مغناطيسية ( ماء حنفية Tap water ) في حين ازدادت نسبة الإنبات عند تعريض المياه إلى شدد مغناطيسية إذ بلغت 82.00% عند مغنطة مياه 500 كاوس (جدول 5) وبلغت 83.00 عند 1500 و 2000 كاوس بدون فرق معنوي بين الشدد المغناطيسية على مستوى 0.05 وفقا لأقل فرق معنوي .

جدول رقم (5): تأثير شدة مغنطة المياه على نسبة إنبات بذور الميرمية

نسبة الإنبات %	شدة مغنطة المياه
79.00 a	بدون مغنطة معاملة محاليد
82.00 b	500 كاوس
83.00 b	1000 كاوس
83.00 b	1500 كاوس
83.00 b	2000 كاوس

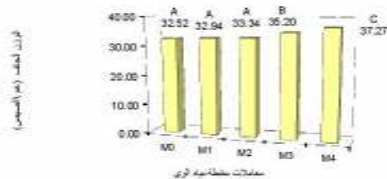
LSD 0.05=1.0

تتفق النتائج مع الجبري وآخرين (10) الذين حصلوا على زيادة معنوية في نسبة الإنبات مع مغنطة المياه مقارنة بالمياه في معاملة المحاليد . وتتفق النتائج مع (17) حيث بينت تأثير معنوي لاستخدام المياه المعالجة مغناطيسيا على إنبات بذور و بزوغ يادرات محاصيل الخضر .

كما تتفق النتائج مع الجرواني وعبد الرحمن ( 21 ) إذ وجدا زيادة في إنبات بذور المحاصيل استخدامهم مياه ممغنطة لري ثلاثة محاصيل هي الحنطة والطمطم والفاصولياء.

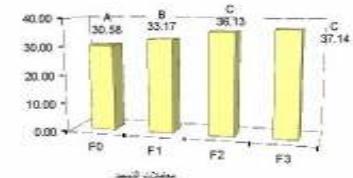
تبين النتائج شكل ( 1 , أ ) تأثير مغنطة مياه الري في ارتفاع نباتات الميرمية بالتداخل مع معاملات مستويات الأسمدة، إذ بلغ أقل معدل ارتفاع نبات الميرمية عند معاملة المقارنة M0 ( بدون مغنطة ) 59.16 سم مقارنة مع معدل أعلى ارتفاع 75.49 سم عند شدة مغنطة لمياه الري 2000 كاوس M4 بفرق معنوي على مستوى المعنوية 0.05 بين المعاملات وفقا لأقل فرق معنوي LSD، وعدم وجود فروق معنوية بين M0 و M1 و M2 وبين الشكل ( 1 , ب ) تأثير مستويات التسميد بالتداخل مع معاملات مغنطة مياه الري في ارتفاع نباتات الميرمية إذ بلغ معدل أقل ارتفاع 59.73 سم بدون إضافة سمادية F0 ومعدل أعلى ارتفاع للنباتات 69.93 سم عند مستوى السماد 300 كغم/هكتار F3 ، وأشار التحليل الإحصائي إلى عدم وجود فروق معنوية بين F0 و F1 و F2 و F3 عند المقارنة بأقل فرق معنوي LSD. وبين الشكل ( 1 , ج ) تأثير مغنطة مياه الري والتسميد بدون تداخل في ارتفاع نباتات الميرمية إذ يبلغ معدل أقل ارتفاع 54.33 سم عند معاملة المقارنة ري بمياه بدون مغنطة وبدون تسميد M0F0 في حين أعلى ارتفاع 74.00 سم عند ماء ري تحت شد مغناطيسي 2000 كاوس وسماد 300 كغم/هكتار M4F3 والتحليل الإحصائي يبين وجد فروق معنوية على مستوى المعنوية 0.05 وفقا

تبين النتائج شكل ( 3 ، أ ) تأثير مغنطة مياه الري في الوزن الجاف للجزء الخضري لنباتات الميرمية بالتداخل مع معاملات مستويات الاسمدة إذ بلغ أقل معدل للوزن الجاف لنبات الميرمية عند معاملة المقارنة M0 ( بدون مغنطة ) 32.52 غم مقارنة مع معدل أعلى وزن جاف 36.63 غم عند شدة مغنطة لمياه الري 2000 كاوز M4 وبفرق معنوي ، ويبين الشكل ( 3 ، ب ) تأثير مستويات التسميد بالتداخل مع معاملات مغنطة مياه الري في الوزن الجاف للجزء الخضري لنباتات الميرمية إذ بلغ معدل أقل وزن رطب 30.07 غم بدون إضافة سمادية F0 ومعدل أعلى وزن جاف للنباتات 37.14 غم عند مستوى السماد 300 كغم/هكتار F3 بين التحليل الإحصائي على وجود فروقات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 بين المعاملات عند المقارنة بأقل فرق معنوي LSD ، ويبين الشكل ( 3 ، ج ) تأثير مغنطة مياه الري والتسميد في الوزن الجاف للجزء الخضري لنباتات الميرمية إذ يبلغ معدل أقل وزن 27.39 غم عند معاملة المقارنة ري بمياه بدون مغنطة وبدون تسميد M0F0 في حين أعلى وزن 38.17 غم عند الري بماء تحت شد مغناطيسي 2000 غاوس وسماد 300 كغم/هكتار M4F3 والتحليل الإحصائي يبين وجد فروقات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 وفقا لأقل فرق معنوي.



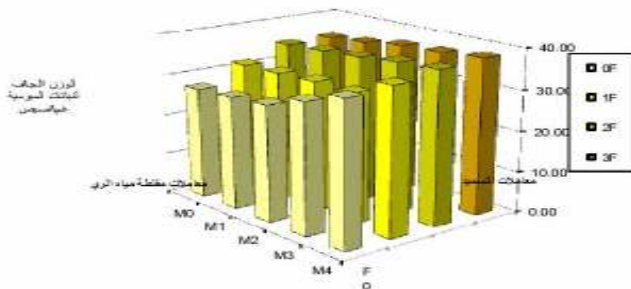
( أ ) تأثير الري بالماء المغنط في الوزن الجاف لنباتات الميرمية

LSD.0.05=1.1



( ب ) تأثير التسميد في الوزن الجاف لنباتات الميرمية

LSD.0.05= 1.72

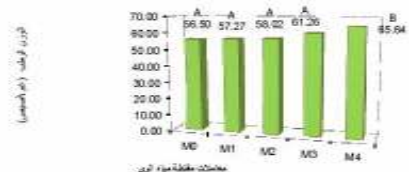


( ج ) تأثير التداخل بين مغنطة مياه الري والتسميد في الوزن الجاف لنباتات الميرمية

LSD.0.05=1.11

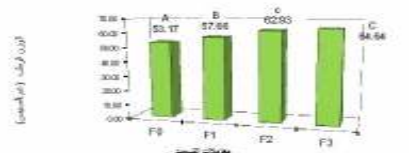
شكل ( 3 ) : تأثير الماء المعالج مغناطيسيا والتسميد و التداخل بينهما في الوزن الجاف لنباتات الميرمية لمعاملات الدراسة

تبين النتائج شكل ( 2 ، أ ) تأثير مغنطة مياه الري في الوزن الرطب للجزء الخضري لنباتات الميرمية بالتداخل مع معاملات مستويات الاسمدة إذ بلغ أقل معدل وزن رطب لنبات الميرمية عند معاملة المقارنة M0 ( بدون مغنطة ) 56.50 غم مقارنة مع معدل أعلى وزن رطب 65.64 غم عند شدة مغنطة لمياه الري 2000 كاوز M4 وبفرق معنوي وعدم وجود فروق معنوية بين M0 و M1 و M2 و M3 . ويبين الشكل ( 2 ، ب ) تأثير مستويات التسميد بالتداخل مع معاملات مغنطة مياه الري في الوزن الرطب للجزء الخضري لنباتات الميرمية إذ بلغ معدل أقل وزن رطب 53.17 غم بدون إضافة سمادية F0 ومعدل أعلى وزن رطب للنباتات 64.64 غم عند مستوى السماد 300 كغم/هكتار F3 وبفرق معنوي ، ويبين التحليل الإحصائي بعدم وجود فروق معنوية بين F2 و F3 عند المقارنة بأقل فرق معنوي LSD . ويبين الشكل ( 2 ، ج ) تأثير مغنطة مياه الري والتسميد في الوزن الرطب للجزء الخضري لنباتات الميرمية إذ يبلغ معدل أقل وزن 47.66 غم عند معاملة المقارنة ري بمياه بدون مغنطة وبدون تسميد M0F0 في حين أعلى وزن 66.43 غم عند ماء ري تحت شد مغناطيسي 2000 كاوز وسماد 300 كغم/هكتار M4F3 والتحليل الإحصائي يبين وجد فروق معنوية على مستوى المعنوية 0.05 وفقا لأقل فرق معنوي.



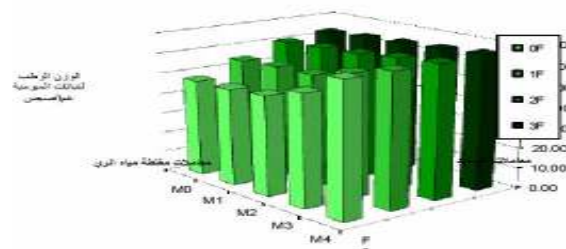
( أ ) تأثير ماء الري المغنط في الوزن الرطب لنباتات الميرمية ( غم / أصيص )

LSD.0.05=4.46



( ب ) تأثير التسميد في الوزن الرطب لنباتات الميرمية ( غم / أصيص )

LSD.0.05=3.02



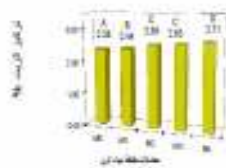
( ج ) تأثير مغنطة مياه الري والتسميد في الوزن الرطب لنباتات الميرمية

LSD.0.05= 0.3.37

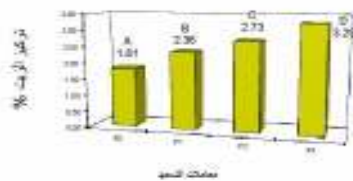
شكل ( 2 ) : تأثير الماء المغنط والتسميد و التداخل بينهما في الوزن الرطب للجزء الخضري لنباتات الميرمية لمعاملات الدراسة ( غم / أصيص )

تبين النتائج شكل ( 4 , أ ) تأثير مغطة مياه الري في المساحة السطحية لأوراق نباتات الميرمية بالتداخل مع معاملات مستويات الاسمدة اذ بلغ أقل معدل للمساحة السطحية للأوراق عند معاملة المقارنة M0 ( بدون مغطة ) 6.23 سم<sup>2</sup> مقارنة مع معدل أعلى مساحة 8.51 سم<sup>2</sup> عند شدة مغطة لمياه الري 2000 كاوز M4 وبفرق معنوي , ويبين الشكل ( 4 , ب ) تأثير مستويات التسميد بالتداخل مع معاملات مغطة مياه الري في المساحة السطحية للأوراق اذ بلغ معدل أقل مساحة 6.53 سم<sup>2</sup> بدون اضافة سمادية F0 ومعدل اعلى مساحة 7.91 سم<sup>2</sup> عند مستوى السماد 300 كغم/هكتار F3 يبين التحليل الاحصائي الى وجود فرق معنوي بين المعاملة F0 و F3 على مستوى المعنوية 0.05 عند المقارنة باقل فرق معنوي LSD. ويبين الشكل ( 4 , ج ) تأثير مغطة مياه الري والتسميد في المساحة السطحية الورقية لنباتات الميرمية اذ يبلغ معدل أقل مساحة 5.215 سم<sup>2</sup> عند معاملة المقارنة ري بمياه بدون مغطة وبدون تسميد M0F0 في حين أعلى مساحة 9.211 سم<sup>2</sup> عند ماء ري تحت شد مغناطيسي 2000 غاوس وسماد 300 كغم/هكتار M4F3 والتحليل الاحصائي يبين وجد فروقات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 وفقا لأقل فرق معنوي.

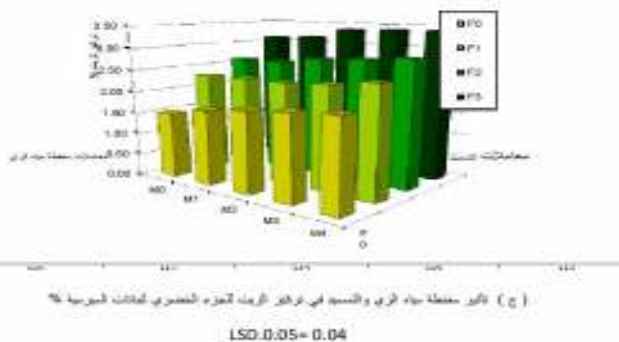
تبين النتائج شكل ( 5 , أ ) تأثير مغطة مياه الري في تركيز الزيت في الجزء الخضري لنباتات الميرمية بالتداخل مع معاملات مستويات الاسمدة اذ بلغ أقل معدل تركيز الزيت في الجزء الخضري للنباتات عند معاملة المقارنة M0 ( بدون مغطة ) 2.38% مقارنة مع معدل أعلى تركيز 2.71% عند شدة مغطة لمياه الري 2000 كاوز M4 وبفرق معنوي ويبين الشكل ( 5 , ب ) تأثير مستويات التسميد بالتداخل مع معاملات مغطة مياه الري في تركيز الزيت اذ بلغ معدل أقل تركيز 1.81% بدون اضافة سمادية F0 ومعدل اعلى تركيز 3.29% عند مستوى السماد 300 كغم/هكتار F3 ويبين التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية على مستوى المعنوية 0.05 بين جميع معاملات التسميد عند المقارنة باقل فرق معنوي LSD. ويبين الشكل ( 5 , ج ) تأثير مغطة مياه الري والتسميد في تركيز الزيت اذ يبلغ معدل أقل تركيز 1.51% عند معاملة المقارنة ري بمياه بدون مغطة وبدون تسميد M0F0 في حين أعلى تركيز 3.41% عند ماء ري تحت شد مغناطيسي 2000 غاوس وسماد 300 كغم/هكتار M4F3 والتحليل الاحصائي يبين وجد فروقات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 وفقا لأقل فرق معنوي.



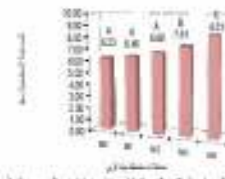
( أ ) تأثير ماء الري المغط في تركيز الزيت الجزء الخضري لنباتات الميرمية (%)  
LSD 0.05=0.05



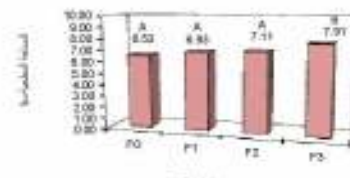
( ب ) تأثير التسميد في تركيز الزيت الجزء الخضري لنباتات الميرمية (%)  
LSD 0.05=0.20



( ج ) تأثير مغطة مياه الري والتسميد في تركيز الزيت الجزء الخضري لنباتات الميرمية (%)  
LSD 0.05= 0.04



( أ ) تأثير ماء الري المغط في المساحة السطحية لأوراق نباتات الميرمية (سم²)  
LSD 0.05=0.46



( ب ) تأثير التسميد في المساحة السطحية لأوراق نباتات الميرمية (سم²)  
LSD 0.05=0.64



( ج ) تأثير مغطة مياه الري والتسميد في المساحة السطحية لأوراق نباتات الميرمية (سم²)  
LSD 0.05= 1.00

شكل ( 4 ) : تأثير الماء الممغط والتسميد و التداخل بينهما في المساحة السطحية لأوراق نباتات الميرمية (سم<sup>2</sup>)

شكل ( 5 ) : تأثير الماء الممغط والتسميد و التداخل بينهما في تركيز الزيت في الجزء الخضري لنباتات الميرمية (%)

يتبين من النتائج وجود تأثيرات معنوية على مستوى المعنوية 0.05 لمستويات الشدة المغناطيسية و لمستويات الاسمدة والتدخل بينهما في معدل ارتفاع نباتات الميرمية وزيادة في الوزن الرطب والجاف والمساحة السطحية للأوراق وتركيز الزيت الفعال للجزء الخضري للنباتات.

ان زيادة الوزن الرطب والجاف للجزء الخضري لنباتات الميرمية هو انعكاس الى زيادة اطوال وحجم النبات ويعزى سبب ذلك الى استجابة النباتات الى زيادة الشدة المغناطيسية لمياه الري و المستويات السمادية المضافة . ان اضافة الاسمدة الكيميائية وخاصة النيتروجين تسبب زيادة في النمو الخضري الذي يتمثل بزيادة ارتفاع النبات وتفرعاته مما يسبب زيادة الوزن الرطب والجاف للنباتات .

يعزى سبب الزيادة الى التأثير الأيجابي للتسميد وتأثير النيتروجين في نشاط الأنسجة المرستيمية و دوره في الانقسام الخلوي ودخول النيتروجين في تركيب الكلورفيل وفي تكوين العديد من مركبات والأنزيمات مما تؤثر في زيادة نمو النبات والى تأثير الفسفور في عملية تكوين وانقسام الخلايا واشتراكه في تحفيز وتطور الجذور مما يسبب زيادة كفاءة النبات لامتصاص المغذيات من التربة (5) اما الزيادة الناتجة في صفات النمو الناتجة من الري بالمياه المغنطة فيعزى الى التأثير الايجابي لهذه المياه في زيادة وحركة المغذيات في المنطقة الجذرية وبالتالي زيادة دخولها الى النبات من خلال المنظومة الجذرية (9).

تتفق النتائج مع Hilal وآخرين ( 9 ) في زيادة النمو عند استخدام المياه المغنطة للري و تتفق مع الجبوري وآخرون (10) اذ وجدوا زيادة في نمو نبات الحنطة عند استخدامهم المياه المغنطة للري, وتتفق النتائج مع عبد المنعم (12) الذي وجد زيادة في ارتفاع نباتات الذرة الصفراء عند الري بمياه معالجة مغناطيسياً في ترب كلسية وجبسية . كما تتفق النتائج مع فهد وآخرون (11) الذين وجدوا ان استخدام ماء ممغنط بشدة 2500 كاوس ادى الى زيادة معنوية في ارتفاع النبات والوزن الجاف والرطب لنبات الذرة الصفراء. وتتفق النتائج مع Amira و Hozayn ( 8 ) الذين وجدوا تأثير ذو مغزى لاستخدام المياه المعالجة مغناطيسياً في صفات النمو والانتاج لنبات الحنطة.

كما وتتفق النتائج مع المعاصيدي ( 6 ) اذ وجد ان هناك زيادة في كل من اطوال النباتات والمساحة السطحية الورقية والوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري عند الري بمياه مغنطة لنباتات الزينيا والجيريبرا. كما تتفق النتائج مع الجرواني وعبد الرحمن (21) اذ وجدوا زيادة في تحسين صفات النمو والانتاج عند استخدامهم مياه مغنطة لري ثلاثة محاصيل هي الحنطة والطماطم والفاصولياء .لا تتفق النتائج مع الجلبى وأحسان (5) كونهم لم يحصلوا على تأثيرات معنوية للماء المعالج مغناطيسياً على صفات النمو والانتاج لنباتات الذرة الصفراء .

تبين من خلال النتائج التأثير الايجابي للري بالمياه المغنطة بالتدخل مع استخدام سماد الـ DAP الى زيادة في نمو نباتات الميرمية الوزن الرطب والجاف لنباتات الميرمية والزيت الفعال في الأوراق .



## المصادر

14. الساهوكي , مدحت و كريمة محمد وهيب .(1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي , جامعة بغداد , دار الحكمة للطباعة والنشر. ص 221 - 226.
15. النعيمي , سعد الله نجم . (1987). الأسمدة وخصوبة التربة. جامعة الموصل .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.. جمهورية العراق. ص 122-151-167.
16. نشرة إرشادية . (2005) . زراعة ري تسميد افات امراض حصاد محصول الميرمية. قسم بحوث النباتات الطبية. معهد بحوث البساتين .مجلة الخيرات الزراعية . نشرة رقم 985 .
17. Hilal MH; and Hilal MM. (2000). Application of Magnetic Technologies in desert agriculture I. Seed Germination and seedling emergence of some crops in a saline calcareous soil. Egypt . J. Soil Sci. 40(3): 413-422.
18. Walch SG; Thomas K; Wolf S; and Dirk W L. (2011). Determination of the biologically active flavor substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.). . Chem. center J. (5): 44.
19. Black CA. (1965). Method of Soil Analysis. Part(1). Physical properties. Am. Soc. Agron. Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, USA.
20. Jackson ML. (1979). Soil Chemical Analysis. Advanced Course, 2<sup>nd</sup> printing. Madison, Wis.
21. الجرواني , محمد محمد , عبد الرحمن بن محمد المدني و أحمد بن عبد العزيز العمران . (2011) . تأثير مغنطة مياه الري على نمو و إنتاجية المحاصيل الزراعية .جامعة الملك فيصل.
1. ابو زيد , الشحات نصر . (2000) . النباتات والاعشاب الطبية .الدار العربية للنشر والتوزيع.بيروت.ص.80.
2. Kintzios S E. (2000) . Sage: The Genus *Salvia*. CRC Press. pp. 10–112.
3. Guyton AC; and Hall JE. (2011). Medical physiology. 12<sup>th</sup> ed .Saunders.P.5513.
4. Akhondzadeh S; Noroozian M; Mohammadi M; Ohadinia S; Jamshidi AH; and Khani M. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial". J Clin. Pharm. Ther. 28 (1): 53–59.
5. الجلبي , فائق توفيق و احسان نواف دحل . (2012) . تأثير مياه الري المغنطة ومستويات الأسمدة في صفات النمو لحنطة الخبز . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 43(1): 10 – 24.
6. المعاضدي ,علي فاروق قاسم (2006). تأثير التقنية المغناطيسية في بعض نباتات الزينة. اطروحة دكتوراة . قسم البستنة . كلية الزراعة. جامعة بغداد.
7. أمين , سامي كريم محمد و علي فاروق قاسم . 2009 . تأثير ملح ماء الري المغنط في صفات النمو الخضري لنبات الجريبيرا *Gerbera Jamesonii* .مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . 25 (1): 63 – 74.
8. Hozayn M; and Abdul Qados AM. (2010) . Magnetic water application for improving wheat (*Triticum aestivum* L.) crop production. Agric. Biol. J. N. Am. 1(4): 677-682.
9. Hilal MH; Shata SM; Abdel Dayem AA; and Hilal MM. (2002). Application of magnetic technologies in desert agriculture : III . Effect of magnetized water on yield and uptake of certain element by citrus in relation to nutrient mobilization in soil. Egypt .J. Soil Sci. 42(1): 43-55.
10. الجبوري , عبد الجاسم محيسن , اشواق شنان عبد , خالد عباس رشيد , ضحى ميسر مجيد , صلاح محمد حسن و ايمان نعمان اسماعيل . (2011) . تأثير مغنطة مياه الري المالحة في انبات ونمو بادرات حنطة الخبز *Triticum aestivum* L. مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية. 5(3): 32-38.
11. فهد , علي عبد , قتيبة محمد حسن , عدنان شبار فالح و طارق لفتة رشيد .(2005) . التكييف المغناطيسي لخواص المياه المالحة لأغراض ري المحاصيل : الذرة الصفراء والحنطة . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 36(1): 29-34.
12. عبد المنعم , سنان نزار .(2008) . تأثير مغنطة مياه الري في بعض الصفات الفيزيائية لعينات ثلاث ترب كلسية وجبسية ونمو الذرة الصفراء *Zea mays* L .رسالة ماجستير , قسم علوم التربة والمياه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .
13. السعدي , محمد عبيد ,كامل سعيد جواد و سيد عرفان راشد . (1984) . اساسيات انتاج المحاصيل الحقلية – العملي . مؤسسة المعاهد الفنية – دار التقني للطباعة – بغداد . ص 106-107-113.

## تأثير الحامض العضوي Humic acid في بعض مؤشرات النمو الخضري لفسائل نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. المروية بمياه الآبار

جمال أحمد عباس (1)، رعد طه بلاكت (2)، علي حيدر عريان (3)

(1) كلية الزراعة / جامعة الكوفة (2) المعهد التقني / الكوفة (3) الهيئة العامة للنخيل / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: phdjamal@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

نفذ البحث خلال العامين 2012 و 2013 حيث تم اختيار (20) فسيلة من نخيل التمر بعمر سنة واحدة لكل من الصنفين نيرسي وسلطاني متماثلة تقريبا في الحجم والمجموع الخضري مزروعة في بستان النخيل بقسم الانتاج النباتي في المعهد التقني / كوفة , استخدمت طريقة الري بالتنقيط من بئر عمق 23 متر , اضيفت مادة حامض الهيوميك Humic acid السائلة تركيز 12 % إلى التربة المحيطة بكل فسيلة مرة واحدة شهريا لمدة 12 شهرا متتاليا اعتبارا من 5 / 2 / 2012 بمقدار لتر واحد من المحاليل المائية المحضرة بأربعة معاملات اشتملت الكميات ( صفر , 2 , 4 أو 8 مللتر من حامض الهيوميك ) وقد استخدمت خمسة مكررات ( فساتل ) لكل معاملة . صمم البحث وفق تصميم القطاعات كاملة التعشبية ( R . C . B . D ) وتم قياس معنوية الفروق بين المتوسطات بواسطة الفرق المعنوي الأصغر ( L . S . D ) بمستوى احتمال 5 % . أظهرت النتائج المحسوبة بعد مرور 13 شهر من تاريخ تنفيذ البحث بأن استخدام حامض الهيوميك 12% سبب حصول زيادة معنوية في عدد الأوراق الجديدة وطول الورقة لفسائل كلا الصنفين كما سبب زيادة في محتوى الأوراق من عنصري النتروجين والبوتاسيوم والكلوروفيل والكربوهيدرات وكانت أفضل النتائج هي عند استخدام المعاملة 8 مللتر من حامض الهيوميك 12% لكل فسيلة شهريا .

الكلمات المفتاحية: الحامض العضوي هيوميك، فساتل نخيل التمر

### ABSTRACT

The current study was carried out during the years 2012 and 2013. Twenty date palm offshoots with one year old were selected from each of Nersy and Sultani cultivars almost similar in the shoot and size planted in the orchard of the plant production department / technical institute at Kufa / Iraq. Drip irrigation systems were used from a well depth of 23 meter for the purpose of irrigation , liquid humic acid 12% with four treatment ( 0 , 2 , 4 , or 8 ml. ) was added to the soil around the offshoots once a month for 12 months from 5 / 2 / 2012 by one liter of the water solutions prepared for these treatment. Randomized complete block design was used with five replicates (offshoots) in each treatment. The results were calculated after 13 months from the date of conducted the study and indicated that used humic acid 12% caused significantly increase in the number of new leaves and leaf length in offshoots for both cultivars ,also caused increased in leaves contain of nitrogen, potassium , chlorophyll and carbohydrate. Best results showed when using the treatment of humic acid 12 % at 8 ml./ Offshoot monthly .

## المقدمة

Gen stat وتم اختبار معنوية الفروق بين المتوسطات بواسطة الفرق المعنوي الأصغر بمستوى احتمال 5 % (6).

## قياسات الصفات المدروسة :

بعد مرور 13 شهر من تاريخ بدء تنفيذ البحث بتاريخ 5 / 3 / 2013 تم إجراء القياسات التالية في جميع المكررات بمختبرات المعهد التقني / كوفة وكلية الزراعة / جامعة الكوفة .

أولا : القياسات الحقلية للنمو الخضري :

1- عدد الأوراق ( السعف ) : حسب عدد الأوراق الجديدة التي ظهرت بعد الأوراق الثلاثة للقمّة النامية ثم حسب المعدل لكل معاملة .

2- طول الورقة : حسب طول كل ورقة جديدة بواسطة شريط القياس من بداية قاعدتها إلى مكان اتصال آخر ورقة ( خوصة ) بالسفحة ثم حسب المعدل بالسنتيمتر لكل معاملة .

ثانيا : القياسات المختبرية : أخذت عينات من وريقات الورقة الأقدم عمرا من الأوراق الجديدة (7) لجميع المكررات وتم حساب القياسات التالية :

1- محتوى الورقة من العناصر المعدنية : بعد غسل وتقطيع النماذج جفت بالفرن بدرجة 70 درجة مئوية حتى استقر وزنها ثم طحنت العينات المجففة وأخذ منها 0,5 غم خلطت مع حامض الكبريتيك المركز  $H_2SO_4$  (96 %) وحامض البكلوريك  $HCl_3$  (4 %) وفقا لطريقة (8) ، ثم حسبت النسبة المئوية للنتروجين بواسطة جهاز مايكروكلدال، أما النسبة المئوية للبتاسيوم فقد حسبت بواسطة جهاز اللهب Flame photometer .

2- محتوى الورقة من الكلوروفيل : تم حساب تركيز الكلوروفيل بواسطة جهاز SPAD meter اليدوي بطريقة (9)، حيث ان كل وحدة SPAD تساوي 1 مايكروغرام / لتر .

3- محتوى الورقة من الكربوهيدرات : حسبت النسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية الذاتية بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectro photometer على طول موجي 490 nm حسب طريقة (10).

## النتائج والمناقشة

## أولا : النمو الخضري :

يوضح شكل (1) بأن استعمال حامض الهيوميك بمقدار 8 مل سبب زيادة معنوية في إنتاج الأوراق الجديدة لفسائل صنف النيرسي والسلطاني وقد تفوقت الزيادة على جميع المعاملات الأخرى المستعملة حيث بلغ معدل عدد الأوراق الجديدة في الفسائل المعاملة بهذه الكمية 4,80 ورقة و 4,60 ورقة في كلا الصنفين على التوالي بينما لا نلاحظ تأثيرا معنويا لاستعمال المعاملة 2 مل في زيادة عدد الأوراق للفسائل المعاملة به مقارنة بفسائل معاملة المقارنة وقد بلغ فيها معدل عدد الأوراق الجديدة اقل من جميع معاملات حامض الهيوميك الأخرى وهي 3,80 ورقة و 3,40 ورقة في كلا الصنفين على التوالي ، كما نلاحظ في الشكل بأن استعمال معاملة 4 مل لم يؤثر معنويا في زيادة عدد الأوراق للصنف السلطاني مقارنة باستعمال معاملة

من الثابت لدى المزارعون والمهتمون بدراسة نخلة التمر بأنها تتحمل ملوحة التربة والماء أكثر من العديد من أشجار الفاكهة الأخرى حيث تستطيع النخلة تحمل ملوحة الماء ومقاومة ضرر التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم لفترة طويلة دون ضرر في النمو والإنتاج لحد تركيز ملحي مقداره 6000 جزء بالمليون لكن زيادتها عن ذلك سوف يؤثر في نموها وإنتاجها بنسب تتفاوت حسب كمية الملوحة في ماء الري (1، 2).

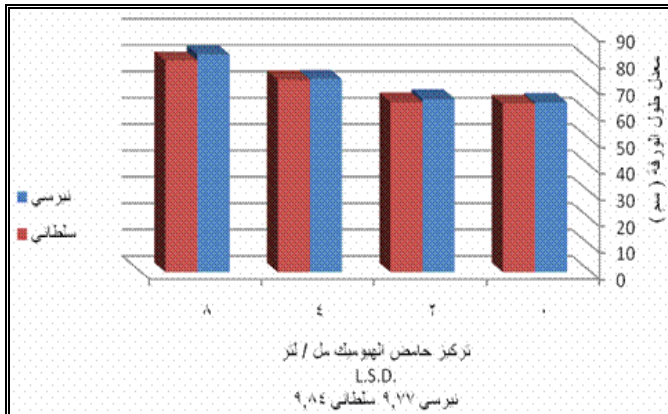
إن لملوحة التربة أو مياه الري تأثيرات سمية على النبات حيث تسبب إحداث زيادة في تركيز ايونات الصوديوم والكلور والبورون في أنسجة النبات يرافقها تثبيط جاهزية العناصر المعدنية للامتصاص من قبل النبات وبالتالي الإخلال بالعمليات الحيوية والتوازن الغذائي والإنزيمي والهرموني في خلايا أنسجته (3، 4)، وفي ظل ظروف شحة مياه الأنهار في العراق صار الاتجاه حاليا إلى استخدام مياه الآبار في عمليات الري والتي تعتبر ذات تراكيز ملحية عالية مقارنة بالمياه العذبة ، ولغرض دراسة إمكانية تقليل ضرر الإجهاد المتسبب من زيادة ملوحة ماء الري فقد نفذ هذا البحث على فسائل نخيل التمر المروية بمياه الآبار مع استعمال حامض الهيوميك (Humic acid) السائلة وهو من الأحماض العضوية المتوفرة في الأسواق المحلية بشكل سائل أو صلب (حبيبات) حيث تسبب إضافتها للتربة تحسين خواصها وزيادة محتواها من العناصر المعدنية الجاهزة للامتصاص من قبل جذور النباتات وحماية النبات من الإجهاد الملحي وبالتالي تحسين النمو والإنتاج (5)، وقد استخدمت فسائل الصنفين النيرسي والسلطاني وهما من الأصناف الشائعة في المنطقة الوسطى من العراق ثمارهما ذات قيمة غذائية واقتصادية تسوق وتؤكل في مرحلتى الرطب والتمر .

## المواد وطرق العمل

نفذت الدراسة الحالية خلال العامين 2012 و 2013 في بستان النخيل بقسم الانتاج النباتي / المعهد التقني في الكوفة حيث اختيرت (20) شجرة نخلة تمر بعمر سنة واحدة لكل من الصنفين نيرسي وسلطاني متماثلة تقريبا من حيث الحجم وطبيعة النمو الخضري مزروعة بالطريقة الرباعية 10 \* 10 متر جلبت فسائلها من محطة النخيل في محافظة النجف الاشرف / الهيئة العامة للنخيل وقد استخدمت طريقة الري بالتنقيط من بئر بعمق (23) م و تم تثبيت اعداد الاوراق ( السعف ) لكل فسيلة قبيل تنفيذ البحث . استعمال الحامض العضوي السائل Humic acid بتركيز 12% اضافة ارضية بأربعة معاملات ( صفر ، 2 ، 4 أو 8 مللتر ) وذلك بعد تخفيفها بمقدار لتر واحد من الماء المقطر واضافتها إلى التربة المحيطة بكل فسيلة مرة واحدة شهريا لمدة 12 شهرا متتالية اعتبارا من 5 / 2 / 2012 . كما تم تحليل ماء الري وتربة البستان من عمق صفر — 50 سم وكانت المواصفات الفيزيائية والكيميائية كما موضحة في الملحق المرفق وقد اقتصر البستان بزراعة الفسائل ولم يسد طيلة فترة الدراسة .

صممت الدراسة وفق تصميم القطاعات كاملة التعشية بخمسة مكررات لكل معاملة حيث اعتبرت كل فسيلة وحدة تجريبية وحلت النتائج باستخدام الحاسوب الآلي حسب نظام

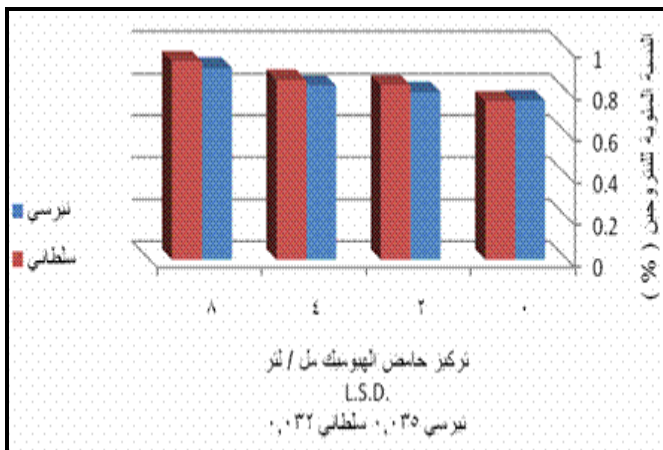
8 مل حيث بلغ عدد الأوراق 4.40 ورقة و 4.60 ورقة في فساتل هاتين المعاملتين بعكس الحالة في فساتل الصنف نيرسي التي اختلفت معنويا .



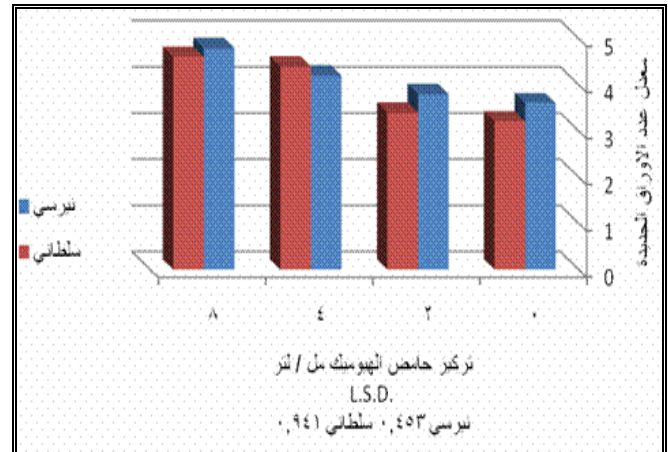
شكل (2): تأثير حامض الهيوميك في معدل طول الورقة (سم)

ثانيا : محتوى الورقة من العناصر المعدنية:

توضح النتائج في الشكل ( 3 ) محتوى الأوراق من النيتروجين حسب المعاملات المستعملة إذ نلاحظ بأن نسبة العنصر ازدادت معنويا في الأوراق لجميع معاملات حامض الهيوميك لكلا الصنفين مقارنة بالنسبة في أوراق معاملة المقارنة وقد تفوق استعمال المعاملة 8 مل معنويا على معاملي 2 و 4 مل حيث بلغت النسبة 0.914 % و 0.944 % في أوراق صنف النيرسي والسلطاني وقد تناسبت الزيادة طرديا مع زيادة الكمية حيث بلغت اقل نسبة 0.978 % و 0.830 % في أوراق فساتل معاملة 2 مل لكلا الصنفين على التوالي .



شكل (3): تأثير حامض الهيوميك في النسبة المئوية للنيتروجين في الأوراق

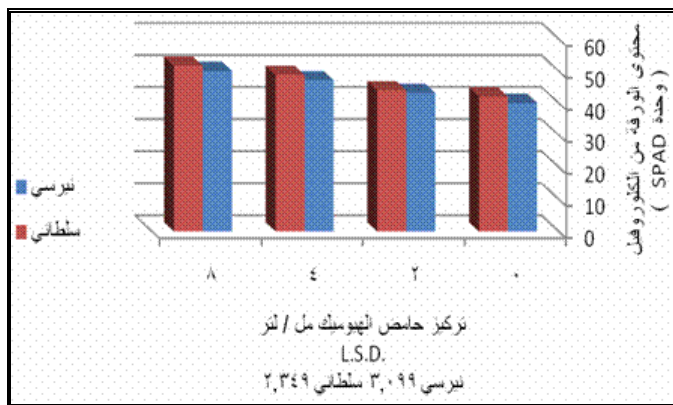


شكل (1): تأثير حامض الهيوميك في معدل عدد الأوراق الجديدة

أما الشكل ( 2 ) فهو يوضح تأثير المعاملات في معدل طول الورقة حيث نلاحظ تفوق معنوي في زيادة طول الورقة لفساتل صنف النيرسي و السلطاني عند استخدام المعاملة 8 مل من حامض الهيوميك مقارنة بجميع المعاملات الأخرى حيث بلغ المعدل 82,60 سم و 80,20 سم فيهما على التوالي ، بينما لا نلاحظ وجود تأثير معنوي للمعامليتين 2 مل أو 4 مل من حامض الهيوميك في تأثيرهما على زيادة طول الورقة في الفساتل المعاملة بهما مقارنة بفساتل معاملة المقارنة وقد كان اقل معدل هو عند استعمال المعاملة 2 مل إذ بلغ 65 ، 80 سم و 64 ، 60 سم في كلا الصنفين على التوالي .

إن التأثير الاسموزي وحالة عدم التوازن الغذائي المتسببان من تأثيرات الشد الملحي الناتج من ارتفاع ملوحة ماء الري سببا قلة امتصاص الماء والعناصر الغذائية واختزال عملية الانقسام والتنظيم الخلوي وإعاقة بناء الحوامض النووية و الهرمونات النباتية مثل الأوكسينات والجبرلينات وتقليل نمو الجذور (11-13) . لذلك نلاحظ ضعف النمو الخضري لفساتل معاملة المقارنة بينما سببت الحموضة اليومية المضافة للتربة في معاملات حامض الهيوميك تحسين امتصاص الماء والعناصر الغذائية مما أدى الى زيادة قوة نمو المجموعة الجذرية وتحسينها وزيادة تكوين الهرمونات النباتية وبالتالي تحسين النمو الخضري ( 14 ، 15 ) ، وقد أيد ذلك نتائج دراسة (16)، حيث بينت بأن زيادة ملوحة ماء الري تسبب انخفاضا واضحا في النمو الخضري وإنتاج الأوراق الجديدة لنبيتات نخيل التمر وإن إضافة البوتاسيوم إلى ماء الري سبب حصول زيادة في معدلات النمو الخضري .

إن محتوى الورقة من الكلوروفيل قد بلغ في فساتل معاملة المقارنة 40,128 و 42,096 وحدة SPAD في كلا الصنفين وذلك بسبب تعرض الفساتل للإجهاد المائي حيث إن مستويات الملوحة العالية تؤدي إلى زيادة مستويات الهرمون النباتي حامضي الاليسيسك (ABA) وزيادة فعالية إنزيم الكلوروفيليز اللذان يسرعان في عملية تحليل الكلوروفيل بالإضافة إلى تأثير الملوحة في تقليل امتصاص العناصر الضرورية لبناء جزيئة الكلوروفيل مثل النتروجين والمغنيسيوم (20-22)، لذلك فقد سببت إضافة حامض الهيوميك زيادة محتوى الأوراق من الكلوروفيل نتيجة تأثيره في تحسين نمو المجموعة الجذرية وزيادة امتصاص الماء والعناصر المعدنية من التربة وتكوين الاوكسينات وتحسين النمو الخضري (14، 15، 23).

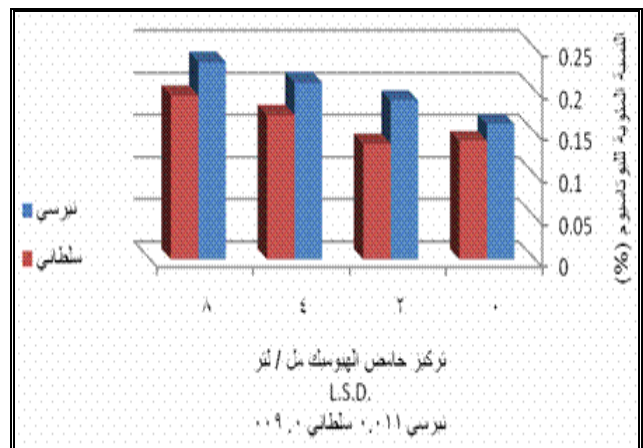


شكل (5): تأثير حمض الهيوميك في محتوى الورقة من الكلوروفيل (وحدة SPAD)

رابعا : النسبة المئوية للكربوهيدرات:

يوضح الشكل (6) بأن استعمال حامض الهيوميك سبب زيادة في النسبة المئوية للكربوهيدرات في أوراق كلا الصنفين تناسبت طرديا مع زيادة الكمية المستخدمة من الحامض في المعاملات حيث بلغت أعلى نسبة 0.146 % و 0.136 % عند استعمال المعاملة 8 مل في كلا الصنفين على التوالي وكانت هذه الزيادة معنوية مقارنة بالنسبة في أوراق معاملة المقارنة التي بلغت فيها نسبة الكربوهيدرات 0.080 % و 0.059 % في أوراق كلا الصنفين وذلك نتيجة تأثير ارتفاع ملوحة ماء الري والتي أثرت على نشاط إنزيم RUBP Carboxylase الضروري لتثبيت CO<sub>2</sub> في سلسلة تفاعلات الظلام في عملية التركيب الضوئي (24)، (25)، وقد سببت المعاملة بحامض الهيوميك زيادة نسبة الكربوهيدرات في الأوراق نتيجة تأثيره في تحسين النمو الخضري وقد أيد ذلك نتائج دراسة (23، 26) عندما تم استخدام حامض الهيوميك في تأثيره على نمو أشجار الزيتون وشتلات الكازورينا .

أما محتوى الأوراق من البوتاسيوم فيلاحظ في الشكل (4) بأن معاملة 8 مل من حامض الهيوميك سبب زيادة معنوية في النسبة المئوية للبوتاسيوم في الأوراق حيث تفوق على جميع المعاملات الأخرى فقد بلغت النسبة 0.234 % و 0.194 % في صنف النيرسي والسلطاني ونلاحظ بأن تأثير المعاملة 2 مل في زيادة النسبة كان معنويا فقط في أوراق الصنف نيرسي مقارنة بالنسبة في أوراق معاملة المقارنة إذ بلغت 0.188 % . إن ارتفاع نسبة الأملاح في مياه الري يؤثر على النشاطين الفسلجي والفيزيائي لعملية امتصاص الماء ويعيق امتصاص وانتقال العناصر الغذائية وبالتالي انخفاض تركيز العناصر ومنها النتروجين والبوتاسيوم في النسيج النباتي (12، 17، 18)، وقد سببت إضافة حامض الهيوميك تحسين عملية امتصاص الماء والعناصر الغذائية لذلك ازداد محتوى الأوراق من عنصري النتروجين والبوتاسيوم (5)، كما ذكر Kodoma وآخرون (19) بأن حامض الهيوميك يزيد من تحرر البوتاسيوم في محلول التربة ومن ثم زيادة امتصاصه من قبل النبات فتزداد مستوياته في الأنسجة النباتية .



شكل (4): تأثير حمض الهيوميك في النسبة المئوية للبوتاسيوم في الأوراق

ثالثا : محتوى الورقة من الكلوروفيل:

نلاحظ في الشكل (5) بأن محتوى الورقة من الكلوروفيل قد تفوق معنويا في الصنفين النيرسي والسلطاني في معاملي حمض الهيوميك 4 مل و 8 مل مقارنة بمعاملة المقارنة ومعاملة استعمال 2 مل التي لم تسبب تأثيرا معنويا في زيادة المحتوى وقد بلغت أعلى كمية 50,074 و 51,634 وحدة SPAD في أوراق كلا الصنفين على التوالي عند استعمال المعاملة 8 مل ، كما نلاحظ من خلال الشكل عدم وجود فروق معنوية بين نتائج استعمال المعاملتين 4 مل و 8 مل من حامض الهيوميك في الصنف نيرسي بعكس الحالة في الصنف سلطاني حيث تفوق استعمال المعاملة 8 مل معنويا على معاملة 4 مل في زيادة المحتوى فقد بلغت الكمية 51,634 و 48,786 وحدة SPAD في أوراق المعاملتين.

## المصادر

16. Rasmia D; and EL-Banna AA. (2011). Role of potassium and salinity effects on growth and chemical composite ions of date palm plantlets. J.Agric.Sci,Ain- shams univ. 19(1):233-244.
17. Szalai I. (1968). Plant biology . pp:223-256 . Budapest.
18. Julian W. (2004). Text citrus subtropical fruits nutritice and fertilization . Horticulture taxas cooperative extension. P. 145.
19. Kodoma H; and Schnitzer M; and Jack K. (1983). Chlorite and biotite weathering by fulvic solution in closed and opened system . J. Soil Sci. 63:619-629.
20. العاني، عبد الله نجم (1980). مبادئ علم التربة . كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.
21. Sun C X; Hong X; Cao H; Xin T; and Yongxiao O. (2011). Growth and physiological responses to water and nutrient stress in oil palm . African J. biotechnol. 10(51):10465-10471.
22. Jain BL; and Pareek OP. (1989). Effect of drip irrigation and mulch on soil and performance of date palm under saline water. The biochemical constituents of tomato plant. Zagazig J. Agric. Res.12: 417-441.
23. Tatini M; Bertoni P; Landi A; and Traverisi ML. (1991). Effect of humic acids on growth and biomass portioning of container - grown olive plants. Acta . Hort. 294 :75 – 80.
24. Seemann RJ; and Sharky TD. (1986). Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulos 1,5 by phosphate carboxylase and metabolite pool size in *Phaseolus vulgaris L* . Plant physiol. 82:555-560.
25. Sinha A; Gupta SR; and Rana RS. (1986). Effect of soil salinity and soil water availity on growth and chemical composition of *Sorghum halepense L*. Plant and soil .95 :411-418.
26. درويش، منى احمد (2008). تأثير التسميد الحيوي والسماد المتكامل ( نتروجين، فسفور، بوتاسيوم ) وحامض الهيوميك على النمو والتركيب الكيماوي لشتلات الكازورينا النامية في تربة رملية. مجلة الانتاجية والتنمية 13 (3): 169-177 جامعة الزقازيق، جمهورية مصر العربية.
1. Furr JR; andBallard AL. (1966). Growth of young date palm in relation to soil salinity and chloride content of the pinnae . Date Growers Inst. Rept. 43:4 – 8.
2. فرج، كريم محمد . (2005). نخلة التمر بين البحث والتطبيق . دولة الامارات العربية المتحدة، أبو ظبي.
3. Marschner H. (1995). Mineral nutrition of higher plant .2<sup>nd</sup> ed. Academic press. Inc. London. P.446.
4. التميمي، ابتهاج حنظل (2006). استخدام النمذجة الرياضية للتنبؤ بإنتاجية نخلة التمر *Phoenix dactylifera L*. صنف الحلاوي تحت تأثير تغاير بعض عوامل الإنتاج . اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق.
5. Cimrin KM; Onder T; Metin T; and Burcu T. (2010). Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling. African J. biotechnol. 9 (36):58451.
6. الراوي، خاشع محمود ; خلف الله، عبد العزيز محمد . (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية . كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.
7. العاني، مؤيد رجب عيود (1998). دراسة امكانية تمييز جنس النخيل في مرحلة البادرات باستخدام الهجره الكهربائية للبروتينات والمواد الشبيهة بالجبرلينات . اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.
8. Cresser MS; and Parsons JW. (1979). Sulphuric perchloric and digestion of plant material for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium , calcium and magnesium . Anal . Chem . Acta . 109: 431-463.
9. Felixloh J G; and Nina B. (2000). Use of the Minolta SPAD - 502 to determine chlorophyll concentration in *Ficus benjamina L* . and populous deltoids Marsh leaf tissue . Hort. Sci. 35 (3): 423.
10. Dubois MK; Crilles KA; Hamilton JK; Rebers DA; and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances . Anal . Chem. 28 :350 – 356.
11. Bose TK. (1985). Fruit of indid , Tropical and subtropical , Naya prokash . India.
12. النعيمي، سعد الله نجم عبد الله . (1990). علاقة التربة بالماء والنبات . جامعة الموصل، العراق، ص 532.
13. الحمداني، فوزية محسن علي (2000). تأثير التداخل بين ملحوة الري والسماد الفوسفاتي على بعض خصائص التربة وحاصل النبات . اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.
14. Donnel RW. (1973). The auxin - like effects of humic preparation from leonardite . Soil Sci. 16 :106 – 112.
15. Senn TL; and Kingman AR. (1973). A review of humus and humic acid . South Carolina agricultural experiment station. Clemson, Sc. Research. Series report .No.145.

## دراسة العلاقة الوراثية لكل من عزلات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* المعزولة من حالات من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية باستخدام تقنية تباينات اطوال القطع المتضخمة من الحمض النووي DNA (AFLP)

اياد محمد علي العبيدي (1)، مثنى بديع فرحان (2)، علي صالح الجبوري (3)، عقيل حسين علي(3)

(1) قسم التقنيات الإحيائية / كلية العلوم / جامعة النهرين. (2) قسم علوم الحياة / كلية التربية للبنات / جامعة الأنبار. (3) قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة تكريت / جمهورية العراق.

البريد الإلكتروني: ayad\_university@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

جمعت عزلات بكتيريا *Escherichia coli* من مستشفى الرمادي التعليمي والتي شملت 26 عزلة (12 عزلة من حصى المرارة و 10 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية) اما عزلات بكتيريا *Klebsiellapneumoniae* فشملت 14 عزلة (4 عزلات من حصى المرارة و 6 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية). وقد بينت نتائج البعد الوراثي باستخدام تقنية تباينات اطوال القطع المتضاعفة (AFLP) وقد بينت نتائج البعد الوراثي بالنسبة لبكتيريا *E. coli* اقل بعد وراثي كان (0.4466) لكل من العزلتين 13 و 14 وكلاهما من عزلات الحصى البولية لذلك قد تكون كل من هاتين العزلتين هما السلالتين الاقرب وراثيا من جميع سلالات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية اما اعلى بعد وراثي فقد كان (0.8798) لكل من العزلة 4 وهي احدى عزلات حصى المرارة والعزلة 24 احدى عزلات القناة الهضمية لذلك تكون العزلة 4 تعود لسلالة ذات نمط وراثي يختلف عن السلالات التي تم عزلها من القناة الهضمية، اما بالنسبة لبكتيريا *K. pneumoniae* فقد كان اقل بعد وراثي هو (0.18757) لكل من العزلتين 11 و 12 وهما من عزلات القناة الهضمية والتي يمكن ان تشير الى امكانية ان تكون كلا العزلتين هما الاقرب وراثيا من بين جميع عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* الموجودة في القناة الهضمية. اما اعلى بعد وراثي بين عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* فقد كان (0.95256) بين كل من العزلة 5 وهي احدى عزلات الحصى البولية والعزلة رقم 11 وهي احدى عزلات القناة الهضمية وهذا قد يفسر بان السلالة البكتيرية للعزلة رقم 5 قد تكون من مصدر اخر غير القناة الهضمية بل وقد يكون مصدرها خارجيا خصوصا ان منطقة الجهاز البولي يمكن ان تتعرض الى وجود بكتيريا من مصدر خارجي . كذلك لوحظ المجاميع الرئيسية للشجرة الوراثية لعزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية ان العلاقة الوراثية بين عزلات حصى المرارة هي الاقرب وراثيا لعزلات الحصى البولية اكثر مما هو لعزلات القناة الهضمية وهذا واضح من خلال وجود مجموعتين رئيسيتين ارتبطت فيها عزلات حصى المرارة وراثيا مع عزلات الحصى البولية ومن هنا نجد ان كل من البكتيريا المرافقة لحصى المرارة والبكتيريا المرافقة لحصى الكلى قد تكونان في بعض الحالات من مصدر واحد ، في حين كانت هنالك مجموعة رئيسية واحدة ارتبطت فيها عزلات حصى المرارة وراثيا مع عزلات القناة الهضمية كما لم نلاحظ وجود اي علاقة وراثية بين عزلات الحصى البولية وعزلات القناة الهضمية ، اما المجاميع الرئيسية للشجرة الوراثية لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية نجد عموما ان العلاقة الوراثية بين عزلات حصى المرارة هي الاقرب وراثيا لعزلات الحصى البولية كما لم نجد اي من عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية ضمن علاقة وراثية متقاربة ضمن اي مجموعة رئيسية وفي نفس الوقت لم نلاحظ وجود اي علاقة وراثية بين عزلات الحصى البولية وعزلات القناة الهضمية في اي من المجاميع الرئيسية .

**الكلمات المفتاحية:** تقنية تباينات اطوال القطع المتضخمة من الحمض النووي DNA (AFLP)، حصى المرارة والقناة الهضمية

### ABSTRACT

Bacterial isolated were collected from Al-Ramadi Teaching Hospital from total samples 65 of gallstone , 42 of urine stone and 8 samples of stool. Twenty six isolates of *Escherichia coli* were collected (12 from gallstones , 10 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal) and 14 isolates of *Klebsiellapneumoniae* (4 from gallstones , 6 from urine stones and 4 from gastrointestinal canal). The result of *E. coli* showed lower genetic distance (0.4466) between isolates 14 and 13 of urine stone while larger genetic distance (0.8798) between isolate 4 of gallstone and isolate 24 of gastrointestinal canal. The result of *K. pneumoniae* showed lower genetic distance (0.18757) between isolates 11 and 12 of gastrointestinal canal , while larger genetic distance (0.95256) between isolate 5 of urine stone and isolate 11 of gastrointestinal canal , this meaning isolate 5 from another source of gastrointestinal canal . The result of *E. coli* also showed there was genetic relationship between isolates of gallstone and urine stone more than between isolates of gallstone and gastrointestinal canal , this meaning probability bacteria of gallstone and urine stone from similar source in the some cases . The result of *K. pneumoniae* also showed there was genetic relationship between isolates of gallstone and urine stone and not found any genetic relationship between isolates of gallstone and gastrointestinal canal and also between isolates of urine stone and gastrointestinal canal .

## DNA Purification Kit

## المقدمة

## تركيز DNA :

اجري توحيد التراكيز الخاصة للدنا الجينومي الذي تم استخلاصه من العزلات البكتيرية  $250 \text{ ng} / 1 \mu\text{l}$  لغرض اجراء اختبار AFLP واجري العمل تحت ظروف مشددة من تعقيم المواد ومكان العمل .

## تفاعلات (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism:

وقد تضمن اختبار (AFLP) ثلاث مراحل رئيسية وهي مرحلة تفاعلات AFLP استخدمت عدة اختبارات تقنية AFLP المجهزة اغلبها من شركة Gibco BRL وقد تم اجراء ظروف هذا الاختبار حسب تعليمات شركة Gibco BRL . والمرحلة الثانية هي اجراء الترحيل الكهربائي في هلام الاكريلاميد بتركيز 6% باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي العمودي اما المرحلة الثالثة فهي مرحلة التصفية باستخدام صبغة نترات الفضة المجهزة من شركة بروميكا (Promega) . وقد تضمنت المرحلة الاولى مرحلة تقطيع الجينوم Restriction digestion of genomic DNA باستخدام انزيمي التقطيع انزيمي (EcoR I / Mse I) وهنا يتم تقطيع الدنا لجميع البكتيريا المعزولة في المواقع التعريفية لكل انزيم قاطع وهي EcoRI AATTC ↓ G و MseI T ↓ TAA Ligation of adapters ومراحل لحم المكيفات ذات التتابعات التالية :

EcoRI adapter 5- CTCGTAGACTGCGTACC -3

5- AATTGGTACGCAGTCTAC -3

MseI adapter 5- GACGATGAGTCCTGAG -3

5- TACTCAGGACTCAT -3

المرحلة الاخرى ضمن المرحلة الاولى هي مرحلة تفاعل التضخيم التمهيدي Pre-amplification reaction وقد تم استخدام توليفة بادئات E-00 و M-00 المنتجة من شركة Alpha DNA اذ وضع مزيج التفاعل في انبوبة ايندورف 0.2 مليلتر في جهاز البلمرة الحراري وينظم الجهاز 20 دورة على 94 م لمدة 30 ثانية : 56 م لمدة 1 دقيقة : 72 م لمدة 1 دقيقة . والمرحلة الاخيرة من المرحلة الاولى هي مرحلة التضخيم الانتقائي Selective pre-amplification عند هذه المرحلة شملت توليفة البادئات مع القواعد النيتروجينية المضافة المجهزة لكل من انزيمي القطع EcoRI و MseI والمنتجة من شركة Alpha DNA وهي توليفتي E-A/M-C و E-C/M-A وقد حضر مزيج التفاعل حسب توصيات شركة Gibco BRL وتهيئة المزيج لوضعه في جهاز المبلر الحراري وحسب البرنامج المرحلة الاولى دورة واحدة 94 م لمدة 30 ثانية / 65 م لمدة 30 ثانية / 72 م لمدة 1 دقيقة , المرحلة الثانية ضمن برنامج جهاز المبلر الحراري 12 دورة وفي كل دورة يتم تقليل درجة الحرارة عن 65 م بحدود 0.7 - م يليها المرحلة الاخيرة وتتضمن 23 دورة ضمن 94 م لمدة 30 ثانية / 56 م لمدة 30 ثانية / 72 م لمدة 1 دقيقة .

وبعد اجراء مرحلة التضخيم الانتقائي لجميع عينات الدنا للبكتيريا المعزولة بواسطة جهاز البلمرة الحراري اصبحت جميع هذه العينات جاهزة للمرحلة الثانية وهي مرحلة

تعد تقنية تباينات اطوال القطع المتضخمة من التقنيات البالغة الاهمية في التشخيص الجزيئي وهي مختصر (Amplified Fragment Length Polymorphism) اذ تكون تقنية ملائمة ودقيقة للحصول على مؤشر البصمة الوراثية Finger printing لكائن حي معين سواء نبات او حيوان او بكتيريا ومن خلال هذه التقنية يمكن من خلالها الاستفادة من نتائجها لاجراء تحليلات وراثية اخرى كرسوم الخارطة الوراثية لكائن معين وهذه التقنية تعتمد ايضا على تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR وفي هذه التقنية يمكن الحصول على العشرات من قطع لدنا لكائن معين تتراوح حوالي 50-100 قطعة من الدنا المقطع بانزيمات قاطعة محددة والمضاعفة باستخدام تقنية PCR باستخدام مكيفات (Adapters) ذات عدد قليل من النيوكليوتيدات ((Oligonucleotides وتسلسلات من الدنا مقطعة للكائن الحي يتم التعرف عليها كمواقع هدف ترتبط معها البادئات الخاصة حسب نوع الانزيم القاطع المستخدم (1-8) .

استخدمت تقنية AFLP في دراستنا هذه على مستوى الاحياء المجهرية للمرة الاولى في العراق، بالإضافة الى ان تطبيق تقنية AFLP من المحتمل ان يكون الاول من نوعه على المستوى العالمي تم تطبيقه لاجراء المقارنة الوراثية لعزلات بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة وحصى الجهاز البولي والقناة الهضمية اي من ثلاث بيئات مختلفة من جسم الانسان حيث لم نجد في الدوريات العلمية او في شبكة المعلومات الدولية الى ما يشير الى ذلك .

## المواد وطرق العمل

## عزل وتشخيص البكتيريا :

عزلت كل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* من عينات حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية من مستشفى الرمادي التعليمي للفترة من 2010/5/24 الى 2011/3/17، اذ تم اجراء الزرع البكتيري بعد الحصول على العينات مباشرة وذلك باستخدام الطرق التقليدية المتبعة لزرع العينات مع مراعاة الظروف المعقمة ابتداء من مرحلة اخذ العينات . ولغرض تشخيص العزلات أجريت الاختبارات الكيموحيوية بالاعتماد على مصنف بركي (9) وما تم إجرائه وفق (10) لغرض تأكيد تشخيص البكتيريا كما تم استعمال عدة التشخيص API System وهي API 20 E . وشملت العزلات البكتيرية 26 عزلة لبكتيريا *E. coli* تمثلت بـ 12 عزلة من حصى المرارة و 10 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية (عينات برازية) ، اما بكتيريا *K. pneumoniae* فقد شملت 14 عزلة بكتيرية تمثلت بـ 4 عزلات من حصى المرارة و 6 عزلات من الحصى البولية و 4 عزلات من القناة الهضمية (عينات برازية) .

## استخلاص الدنا الجينومي :

استخلصت عينات الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية لبكتيريا *E. coli* و بكتيريا *K. pneumoniae* باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتيريا السالبة لصبغة غرام المنتجة من قبل شركة بروميكا (Promega) ذي الرقم التسلسلي A1120 باسم منتج Wizard® Genomic



MseI وبالتالي فإن استخدام انزيمين قاطعين مختلفين سيقبل من عدد القطع الكثيرة الناتجة من استخدام انزيم القطع بتكرار عالي وذلك لتهيئة القطع الناتجة للارتباط مع المكيفات النوعية Specific adapters الخاصة لكل من انزيمي القطع (1، 9)، وقد اشارت العديد من البحوث التي اعتمدت على مؤشرات AFLP استخدام كل من انزيمي EcoRI و MseI لهضم الجينوم الخاص لكل من البكتيريا التي لا تكون غنية بمحتواها من القاعدتين النتروجينيتين الكوانين والسايروسين G-C % وان الانزيم القاطع MseI يعمل بشكل مثالي عندما تكون نسبة G-C % اقل من 50% ولكن هذا الانزيم يعمل ايضا عندما تكون نسبة G-C % تتراوح ما بين (50-65) % (10)، وإذا ما علمنا ان نسبة G-C % لبكتيريا *E. coli* تتراوح (48-52) % ولبكتيريا *K. pneumoniae* تتراوح ما بين (50-65) % (11-13)، لذلك فإن اختيارنا لكل من الانزيمين القاطعين EcoRI و MseI يكونان من الاختيارات الجيدة فضلا عن استخدام كل من هذين الانزيمين القاطعين مع الجينوم الخاص لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* في العديد من البحوث التي اعطت نتائج موفقة لتحقيق الاهداف المتوخاة من استخدام تقنية AFLP (14-17)، لذلك جاء استخدام الانزيمات القاطعة المصنعة ضمن عدة خاصة من شركة GIBCO BRL مطابقا لما هو مطلوب ضمن دراستنا إذ كان عدد الحزم المتضاعفة المرحلة في هلام الاكريلاميد يتراوح ما بين 16 الى 50 حزمة وهو الى حد كبير مطابق لما ظهر عليه عدد الحزم لدى الباحثين (14) إذ كان عدد الحزم المتضاعفة المرحلة في هلام الاكريلاميد عند استخدام الانزيمات القاطعة EcoRI و MseI المنتجة من شركة GIBCO BRL يتراوح ما بين 20 الى 50 حزمة. تم استخدام مكيفات لحم نوعية لكل من انزيمي القطع EcoRI و MseI ويلاحظ من نتائج ظهور الحزم في هلام الاكريلاميد بعد عملية التصيبغ للهلام بصبغة نترات الفضة ان عملية ربط المكيفات مع نهايتي كل قطعة من قطع دنا الجينومي المهضومة كانت جيدة إذ تعتمد عملية تضاعف الحزم على مرحلة ربط المكيفات إذ ان المسافة لكل من المكيفين عند نهايتي كل حزمة ستمثل الموقع الهدف الذي ينتج عنه الحزمة المتضاعفة بعد ارتباط كل واحد من البادئين المناسبين ضمن الموقع الهدف مع شريطي الدنا المنفصلين خلال مرحلة التضاعف الانتقائي، إذ تعمل المكيفات المرتبطة على منع إعادة ارتباط قطع الدنا المهضومة بانزيمي القطع إذ ان هذه المكيفات لا تحتوي على النهاية المفسفرة بالاتجاه 5- وبالتالي يزداد احتمال ارتباط هذه المكيفات مع المواقع المناسبة لها في نهايتي كل قطعة دنا ناتجة من عملية هضم الدنا وبالتالي زيادة نسبة القطع التي التحمت معها تلك المكيفات (10). مرحلة التضاعف التمهيدي هي الاخرى يتم فيها اختزال عدد قطع دنا الجينومي الناتجة من عملية هضم دنا الجينومي بانزيمين القاطعين EcoRI و MseI وفي نفس الوقت اعتبرت نواتج هذه المرحلة كخزين يمكن الرجوع اليه وخصوصا في حالة استخدام توليفات combinations اخرى من البادئات في مرحلة التضاعف الانتقائي وقد تم استخدام البادئين E-00 و M-00 المجهزين من شركة Alpha DNA وكان الهدف من استخدام توليفة البادئين الاخيرين بناء قاعدة يكون مستوى الاختلاف والتباين في نتائجها معتمدة على ما يضاف من القواعد إلى البادئات الانتقائية في المرحلة اللاحقة وهي مرحلة التضاعف الانتقائي بشكل محدد دون التعرض إلى تفسير التداخلات التي تنجم من

الترحيل في هلام الاكريلاميد بتركيز 6% المحضر حسب (5) وتم اجراء هذه المرحلة حسب توصيات شركتي Gibco BRL و Promega اما المرحلة الثالثة وهي مرحلة الكشف بواسطة صبغة الفضة Silver staining إذ استخدمت صبغة الفضة المجهزة من شركة بروميكا (Bromega) وقد تطلبت طريقة العمل بالاضافة الى مواد الصبغة المجهزة من الشركة تجهيز محلول حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid).

#### التحليل الإحصائي:

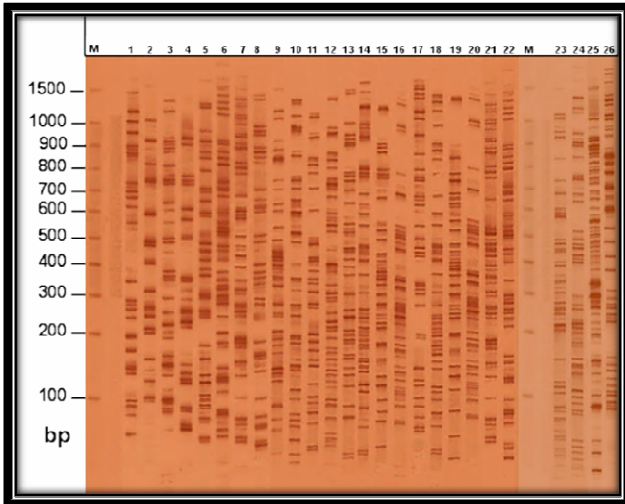
تحليل النتائج لاختبار AFLP لايجاد العلاقة الوراثية لكل من عزلات بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* كل على حدة والمعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية إذ تحسب الحزم الناتجة من عملية التضاعف والواضحة على هلام الاكريلاميد من خلال جعل الرقم 1 يرمز إلى وجود الحزمة والرقم 0 يرمز الى عدم وجود الحزمة، ويتم ترتيبها بشكل جدول متسلسل يشمل كافة نتائج البادئات لعزلات بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* كل على حدة ومن اجل تحليل هذه البيانات واستخراج البعد الوراثي (Genetic distance) منها يتم إدخالها إلى الكمبيوتر ضمن برنامج (Similarity for Quantitative Data) (SIMQUAL). وتعتمد حسابات هذا النظام بالأساس على معادلة (6) وبعد استخراج قيم الأبعاد الوراثية بين عزلات بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* كل على حدة يتم رسم مخطط التحليل التجمعي Dendrogram الذي يجسد المجاميع الوراثية التي تنتمي إليه تلك النماذج، وذلك عن طريق إدخال تلك القيم إلى نظام Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (7) الذي يعتمد على حساب المعدلات الحسابية ضمن (SAHN) (Unweighted Pair – group method with arithmetic averages) (UPGMA) وكل ذلك ضمن البرنامج الإحصائي -: (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System NTSYS – PC Version (8).

#### النتائج والمناقشة

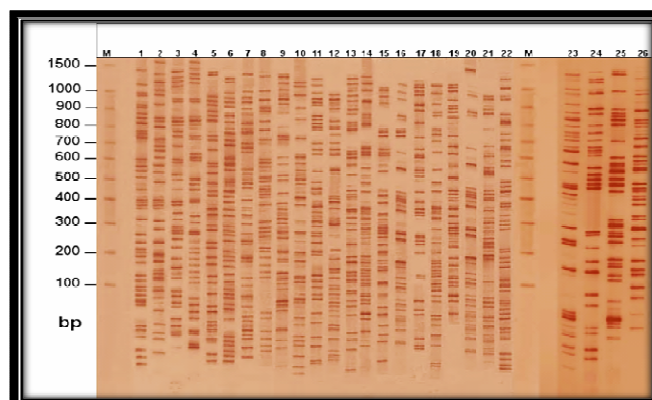
استخدمت تقنية AFLP في دراستنا على مستوى الاحياء المجهرية للمرة الاولى في العراق، بالاضافة الى ان تطبيق تقنية AFLP من المحتمل ان يكون الاول من نوعه على المستوى العالمي تم تطبيقه لاجراء المقارنة الوراثية لعزلات بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة وحصى الجهاز البولي والقناة الهضمية اي من ثلاث بيئات مختلفة من جسم الانسان حيث لم نجد في الدوريات العلمية او في شبكة المعلومات الدولية الى ما يشير الى ذلك. اجريت تقنية AFLP على عدة مراحل وتعتبر المرحلة الاولى من المراحل المهمة وهي مرحلة اختيار الانزيمات القاطعة المناسبة للجينوم مع النوعين البكتيريين *E. coli* و *K. pneumoniae*، ويستخدم في تقنية AFLP نوعين من الانزيمات القاطعة الانزيم الاول يعمل على قطع الجينوم بتكرار قطع معتدل (Average cutting frequency) مثل الانزيم القاطع EcoRI والانزيم الاخر يعمل على قطع الدنا الجينومي بتكرار قطع عالي (Higher cutting frequency) مثل الانزيم القاطع

البادئات E-A و M-C والتوليفة E-C و M-A كانت موفقة في اظهار عدد حزم مناسبة لبكتيريا *E. coli* وقد تكون توليفات البادئات المستخدمة في الدراسة هي الانسب من بقية التوليفات الاخرى اذ ذكر الباحث (14) عند استخدامه لتوليفة بادئات E-A و M-C في مرحلة التضاعف الانتقائي ان عدد الحزم التي ظهرت في هلام الاكريلاميد كانت تتراوح ما بين 20-50 حزمة لبكتيريا *E. coli* . اما في بكتيريا *K. pneumoniae* فقد كان عدد الحزم الناتجة اقل مما هو في بكتيريا *E. coli* ويبدو ان توليفة البادئات E-A و M-C هي انسب من توليفة البادئات E-C و M-A من خلال مدى عدد الحزم الناتجة لذلك يتم استخدام توليفة البادئات E-A و M-C من قبل اغلب الباحثين عند استخدام تقنية AFLP مع البكتيريا من العائلة المعوية (3، 14، 15).

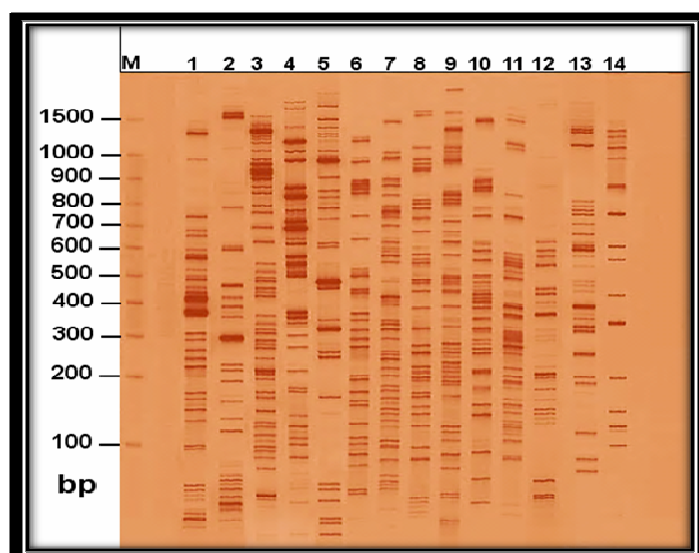
صورة (1): نواتج تضاعف توليفة البادئين E-A / M-C



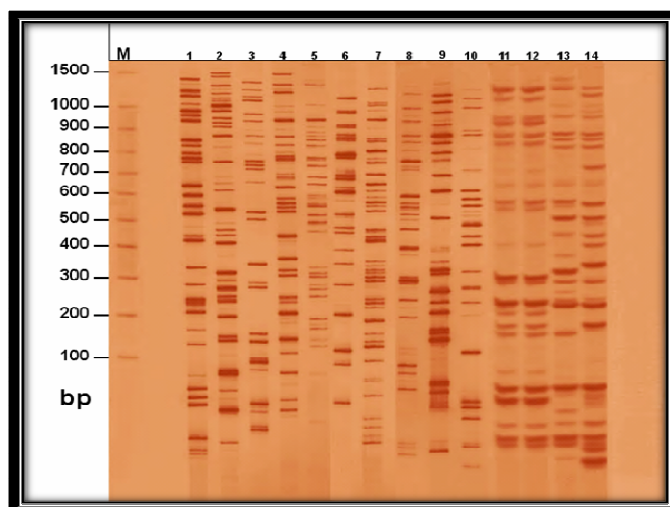
أضافه القواعد النتروجينية في اكثر من مرحلة، بالاضافة إلى إن الهدف هو لإيجاد خزين يمكن استخدامه فيما بعد بدراسات مستقبلية للمقارنة أو لإيجاد مواقع تأثير أخرى ، وقد اكدت العديد من الدراسات استخدام هذه النوعية من البادئات الخاصة لكل من مواقع القطع والمكيفات الخاصة لكل من الانزيمين القاطعين EcoRI و MseI بل وحتى عند استعمال مكيفات لانزيمات قاطعة أخرى عند اجراء اختبار تقنية AFLP للبكتيريا (3، 10، 14)، اما مرحلة التضاعف الانتقائي والتي ايضا يتم فيها اختزال عدد قطع دنا الجينومي الداخلة في هذه المرحلة وتلعب توليفة البادئات المستخدمة وطبيعة وحجم الدنا الجينومي لكل من بكتيريا *E. coli* و *K. pneumoniae* دورا هاما في تحديد عدد الحزم التي تظهر في هلام الاكريلاميد وخصوصا وان كل من البكتيريتين يوجد منهما الكثير من السلالات التي يتغير فيها حجم الجينوم بين هذه السلالات الى نسبة قد تزيد عن 20% للعديد من هذه السلالات وهذا له تأثير في عدد الحزم الناتجة (15) . إن فاعلية برنامج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) لكل قطعة دنا تحتوي على المكيفات المناسبة والمعد لهذه المرحلة كان له التأثير ايضا في اختزال أعداد قطع الدنا التي دخلت إلى هذه المرحلة والتي يكون عددها كبيرا جداً بالمقارنة مع عدد الحزم الظاهرة على الهلام التي تتم بعد اكمال مرحلة التضاعف الانتقائي وذلك لتأثير البرنامج الخاص لتفاعل الـ (PCR) في مرحلة التضاعف الانتقائي في توجيه عملية الانتقاء إلى نوعية معينة من القطع لها خصوصية تحمل التدرج الحراري الذي تضمنه برنامج الـ PCR كون ترتيب هذا البرنامج بهذه الكيفية اسهم في استبعاد اكبر عدد ممكن من باقي القطع الصغيرة من خلال درجات حرارة الالتحام العالية وخصوصا تلك التي استهل البرنامج العمل بها والتي بلغت 65 م° ، ومن ثم تلتهها دورات أخرى تتخفف فيها درجة حرارة الالتحام 0.7 م° لكل دورة تقريبا مما يتسبب في استبعاد منظم ودقيق قدر الإمكان لأي قطعة لا تمتلك المطاولة إلى نهاية دورات التضاعف التنازلية، لتصبح مؤهلة للتضاعف من خلال 23 دورة تكون فيها درجة التحام البادئات ثابتة عند درجة 56 م° وهي الدرجة التي يمكن ان تكون مناسبة بالفعل لبادئي كل توليفة . بالاضافة الى ذلك فان عدد القواعد النتروجينية المضافة مع كل بادئ خاص لمكيفات الانزيمات القاطعة ايضا لها تأثير في اختزال اعداد قطع الدنا الداخلة في مرحلة التضاعف الانتقائي والذي بدوره يؤثر في عدد الحزم الظاهرة في هلام الاكريلاميد اذ ان اضافة قاعدة نتروجينية واحدة الى تتابعات البادئات وبالاخص في مرحلة التضاعف الانتقائي يختزل اعداد قطع الدنا الداخلة لهذه المرحلة اربعة مرات (1) ، وقد اظهرت نتائج استخدام توليف البادئات لكل من E-A و M-C وتوليفات البادئات E-C و M-A نتائج ايجابية لظهور حزم الدنا في هلام الاكريلاميد اذ تراوحت عدد الحزم الظاهرة في هلام الاكريلاميد باستخدام توليفة البادئات E-A و M-C ما بين 22-52 حزمة (الصورة 1) وفي توليفة البادئات E-C و M-A تراوحت ما بين 24-46 حزمة (الصورة 2) في بكتيريا *E. coli* البالغ عددها 26 عذلة ، اما في بكتيريا *K. pneumoniae* والتي كان عددها 14 عذلة فقد تراوحت اعداد الحزم التي ظهرت في هلام الاكريلاميد باستخدام توليفة البادئات E-A و M-C ما بين 15-40 حزمة (الصورة 3) وفي توليفة بادئات E-C و M-A تراوحت اعداد الحزم ما بين 20-32 حزمة (الصورة 4) ، يتبين من خلال نتائج ظهور الحزم في هلام الاكريلاميد ان توليفة



صورة (2) : نواتج تضاعف توليفة البادينين M-A / E-C



صورة (3): نواتج تضاعف توليفة البادينين M-C / E-A



صورة (4) : نواتج تضاعف توليفة البادينين M-A / E-C

فقد يكون مصدرها من موقع اخر من الجسم عدا القناة الهضمية وعن طريق مجرى الدم وصلت الى المنطقة الصفراوية او نتيجة تلوث بهذه السلالة خلال عمليات تداخل جراحي سابق للمنطقة الصفراوية وتشير عدد من البحوث عن امكانية وصول البكتيريا الى المنطقة الصفراوية بهاتين الطريقتين (18، 19)، اما الاحتمال الثاني والذي قد يكون اكثر احتمالا ان مصدر هذه السلالة هي القناة الهضمية فعلا وبالتالي هذا يشير الى امكانية وجود اكثر من سلالة واحدة من بكتيريا *E. coli* في القناة الهضمية وخصوصا في منطقة المعي كما اشار الى ذلك كل من (20، 21).

اما بالنسبة لبكتيريا *K. Pneumoniae* فكما موضح بالجدول (2) فقد كان اقل بعد وراثي هو (0.18757) لكل من العزلتين 11 و 12 وهما منعزلات القناة الهضمية والتي يمكن ان تشير الى امكانية ان تكون كلا العزلتين هما الاقرب وراثيا من جميع عزلات بكتيريا *K. Pneumoniae* الموجودة في القناة الهضمية. اما اعلى بعد وراثي بين عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* فقد كان (0.95256) بين كل من العزلة 5 وهي احدى عزلات الحصى البولية والعزلة رقم 11 وهي احدى عزلات القناة الهضمية وهذا قد يفسر بان السلالة البكتيرية للعزلة رقم 5 قد تكون من مصدر اخر غير القناة الهضمية بل وقد يكون مصدرها خارجيا خصوصا ان منطقة الجهاز البولي يمكن ان تتعرض الى وجود بكتيريا من مصدر خارجي والتي تستطيع الدخول عن طريق منطقة الاحليل ومن ثم الى المثانة في حالة قدرتها على استعمار منطقة الاصابة ومن ثم قد تنتقل الى الاجزاء العلوية من الجهاز البولي مسببة التهابات في منطقة الاصابة وقد تدخل هذه البكتيريا نتيجة لتلوث الادوات الطبية وخصوصا خلال عملية القسطرة لمنطقة الجهاز البولي (23 ; 24 ; 22) وهناك احتمال ان تكون هذه البكتيريا مصدرها القناة الهضمية ولكنها لسلالة تختلف عن السلالات التي تم الحصول عليها لبكتيريا *K. pneumoniae* وقد اشار البعض (25، 26) ان المخزن الرئيسي لسلالات بكتيريا *K. pneumoniae* هي بكتيريا *K. pneumoniae* الموجودة في القناة الهضمية والتي منها يمكن ان تنتقل هذه البكتيريا عن طريق مجرى الدم الى اجزاء اخرى من جسم الانسان كالجهاز البولي مسببة تجرثم الدم (Bacteremia) او انتان الدم Septicemia بالإضافة الى التهابات في منطقة الجهاز البولي ، وهناك احتمال ان يكون مصدر بكتيريا *K. pneumoniae* من حالات الاصابة في منطقة الجهاز التنفسي او الجروح في منطقة الجلد وهناك سلالة مهمة تسبب التهابات في منطقة الجهاز التنفسي تعود الى النمط الذي يحتوي على نمط المحفظة Capsule من نوع K1 وهي السلالة CC82<sup>K1</sup> التي تكون اكثر شيوعا والتي يمكن ان تصل عن طريق مجرى الدم الى منطقة الجهاز البولي (27) .

اما حجم الحزم الناتجة والظاهرة في هلام الاكريلاميد فقد تراوح حجمها حسب الدليل الحجمي المستخدم وهو الدليل الحجمي 100bp المجهز من شركة بروميكا فقد تراوحت احجام الحزم لكل من بكتيريا *E. coli* وبكتيريا *K. pneumoniae* ما بين اقل من 100 bp الى حوالي 1500 bp او اكثر بقليل وهذا ما يتفق تقريبا مع ما ذكره الباحث (3) من ان الحزم الناتجة لبكتيريا *K. pneumoniae* يتراوح ما بين اقل من 100 bp الى ما يقارب من 2000 bp ، وايضا اكدت النتائج المتعلقة باجراء اختبار AFLP نظريا باستخدام نفس توليفة البادئات E-A و M-C طبقت على 30 سلالة مختلفة من بكتيريا *E. coli* نفس النتائج عندما اظهرت حزما بحجم جزئي تراوح ما بين اقل من 100 bp الى حوالي 2000 bp او اقل بقليل ، حيث ان حجم القطع يعتمد على البعد بين المواقع التعريفية للإنزيمي القطع والمكملة لتتابعات البادئات المستخدمة لذا يكون من المتوقع أن يظهر هكذا حجم لبعض القطع لاحتتمالية وجود مواقع القطع للإنزيمات بشكل متباعد ومتناثر على الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية وقد يكون هذا التفسير الاكثر منطقيا من التفسير الاخر الذي يعزى اليه ظهور حزم كبيرة الحجم الى حدوث هضم جزئي بدلا من الهضم الكامل لعينات الجينوم ولكن استخدام تقنية AFLP نظريا مع بكتيريا *E. coli* وظهور مثل هذه الحزم الكبيرة الناتجة من هضم الجينوم بنفس الانزيمات القاطعة وتوليفة البادئات المستخدمة ابعد احتمالية من حدوث الهضم الجزئي للجينوم.

#### تقنية AFLP وإيجاد البعد الوراثي :

استخدمت نتائج التوليفات في هذه الدراسة التي اظهرت نتيجة موجبة لظهور الحزم للكشف عن البعد الوراثي بين عزلات بكتيريا *E. coli* والتي كان عددها 26 عزلة وكذلك البعد الوراثي بين عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* والتي كان عددها 14 عزلة وكلا النوعين من البكتيريا معزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية وقد تم استخدام البرنامج الوراثي (NTSYS,PC Version 1.7) لإيجاد قيم البعد الوراثي، لذلك تكون دراستنا الاولى على المستوى المحلي في العراق والاولى ايضا على المستوى العالمي اذ تم اجراء هذه المقارنات الوراثية بين العزلات البكتيرية لكل من النوعين من البكتيريا من ثلاث بيئات من جسم الانسان وهي بيئة المنطقة الصفراوية للمصابين بحصى المرارة وبيئة منطقة الجهاز البولي للمصابين بالحصى البولية وبيئة منطقة القناة الهضمية وبالتالي كانت مؤشرات تقنية AFLP هو محاولة ايجاد علاقة وراثية لكل من البكتيريتين كل على حدة الموجودة في هذه البيئات الثلاثة ]، وقد بينت نتائج البعد الوراثي بالنسبة لبكتيريا *E. coli* كما موضح بالجدول (1) ان اقل بعد وراثي كان (0.4466) لكل من العزلتين 13 و 14 وكلاهما من عزلات الحصى البولية لذلك قد تكون كل من هاتين العزلتين هما السلالتين الاقرب وراثيا من جميع سلالات بكتيريا *E. coli* المعزولة من الحصى البولية اما اعلى بعد وراثي فقد كان (0.8798) لكل من العزلة 4 وهي احدى عزلات حصى المرارة والعزلة 24 احدى عزلات القناة الهضمية لذلك تكون العزلة 4 تعود لسلالة ذات نمط وراثي يختلف عن السلالات التي تم عزلها من القناة الهضمية ، واذا ما اخذنا بنظر الاعتبار مصدر البكتيريا الموجودة في حصى المرارة فيكون لدينا احتمالين الاحتمال الاول هو ان مصدر هذه البكتيريا ليس من منطقة القناة الهضمية لذلك كانت سلالة العزلة 4 انت من مصدر آخر

جدول رقم (1): قيم الابعاد الوراثية لعزلات بكتيريا *E. coli*: 12-1 عزلات حصى المراءة / 22-13 عزلات الحصى البولية / 23-26 عزلات القنائة الهضمية

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	0.0																									
2	0.5952	0.0																								
3	0.5730	0.6584	0.0																							
4	0.7138	0.7052	0.5238	0.0																						
5	0.6521	0.4648	0.7355	0.7346	0.0																					
6	0.5444	0.5954	0.4948	0.7469	0.5484	0.0																				
7	0.6470	0.5709	0.6878	0.6406	0.5909	0.5601	0.0																			
8	0.7199	0.6857	0.5596	0.6961	0.5991	0.6198	0.6325	0.0																		
9	0.6929	0.6152	0.6714	0.6246	0.6506	0.5928	0.7531	0.6148	0.0																	
10	0.7037	0.6474	0.6817	0.6808	0.6600	0.6971	0.5748	0.564	0.7274	0.0																
11	0.6366	0.6005	0.6366	0.6961	0.6182	0.6382	0.6725	0.6221	0.6982	0.6870	0.0															
12	0.7030	0.5667	0.7241	0.6773	0.5175	0.7610	0.5295	0.5365	0.6207	0.6701	0.5722	0.0														
13	0.5339	0.6109	0.5719	0.7733	0.6682	0.4681	0.6437	0.6927	0.6454	0.6750	0.6725	0.6783	0.0													
14	0.6220	0.6264	0.6026	0.7013	0.6044	0.6621	0.5805	0.6273	0.6403	0.7367	0.5888	0.7346	0.4466	0.0												
15	0.6602	0.7164	0.5591	0.7531	0.5609	0.6186	0.5942	0.6238	0.6819	0.7161	0.6444	0.6292	0.5209	0.5319	0.0											
16	0.7187	0.7113	0.6722	0.6992	0.7160	0.5647	0.6434	0.6550	0.6280	0.6857	0.6775	0.6587	0.6211	0.6602	0.5732	0.0										
17	0.6464	0.5686	0.6683	0.6455	0.6672	0.7035	0.6406	0.8427	0.5821	0.6578	0.7426	0.7447	0.5597	0.5537	0.6134	0.6992	0.0									
18	0.6418	0.6689	0.5465	0.7967	0.7035	0.4893	0.7629	0.6471	0.5808	0.5890	0.6471	0.6727	0.5467	0.5390	0.5696	0.5351	0.5937	0.0								
19	0.6366	0.7311	0.5783	0.8427	0.6776	0.6198	0.7576	0.4934	0.6556	0.5838	0.6419	0.6092	0.5772	0.6673	0.5644	0.7005	0.7426	0.5888	0.0							
20	0.7614	0.6576	0.6464	0.6455	0.6457	0.6618	0.6841	0.5100	0.5821	0.6354	0.6517	0.5741	0.6191	0.7720	0.7285	0.6269	0.7178	0.5937	0.5100	0.0						
21	0.6515	0.6369	0.8056	0.8114	0.5037	0.5444	0.5887	0.5973	0.6929	0.5785	0.6366	0.5669	0.5539	0.6026	0.5213	0.7428	0.5630	0.5648	0.4881	0.5630	0.0					
22	0.5802	0.6843	0.5989	0.6508	0.7188	0.4889	0.5776	0.6625	0.7188	0.7520	0.7439	0.6881	0.5978	0.6285	0.5472	0.6756	0.7873	0.6285	0.7244	0.6723	0.6180	0.0				
23	0.6873	0.5679	0.7093	0.6410	0.6450	0.7027	0.5243	0.8077	0.6876	0.7941	0.6294	0.6151	0.7017	0.6347	0.5912	0.6678	0.5765	0.7423	0.6711	0.6635	0.6658	0.6501	0.0			
24	0.6878	0.6316	0.6672	0.8798	0.6480	0.6303	0.6429	0.6325	0.7086	0.6548	0.6523	0.6010	0.6631	0.6377	0.6548	0.6879	0.7771	0.6983	0.6523	0.5989	0.6672	0.6146	0.5804	0.0		
25	0.7274	0.7137	0.5556	0.6385	0.6305	0.5829	0.6440	0.6721	0.6256	0.6338	0.5966	0.6042	0.6833	0.6579	0.6338	0.6405	0.6802	0.7590	0.5786	0.6385	0.6283	0.5992	0.6201	0.5713	0.0	
26	0.6115	0.6804	0.6115	0.7614	0.6521	0.5614	0.6272	0.6168	0.6297	0.6817	0.6774	0.6424	0.5719	0.6620	0.5983	0.5852	0.5832	0.7037	0.6774	0.6464	0.5921	0.6572	0.6873	0.6672	0.5043	0.0

جدول رقم (2): قيم الابعاد الوراثية لعزلات بكتيريا *K. pneumonia*: 4-1 عزلات حصى المراءة / 5-10 عزلات الحصى البولية / 11-14 عزلات القنائة الهضم

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.00													
2	0.70515	0.00												
3	0.79843	0.71765	0.00											
4	0.61638	0.63898	0.60478	0.00										
5	0.69086	0.66487	0.70336	0.62470	0.00									
6	0.61070	0.89907	0.62321	0.65345	0.71488	0.00								
7	0.61454	0.68477	0.58158	0.64736	0.57040	0.85338	0.00							
8	0.75324	0.61981	0.63569	0.86328	0.77258	0.88340	0.67948	0.00						
9	0.70589	0.60249	0.66838	0.64107	0.69086	0.66477	0.68686	0.57556	0.00					
10	0.68065	0.71427	0.61310	0.56111	0.76251	0.70902	0.63287	0.79749	0.73780	0.00				
11	0.67848	0.65176	0.63969	0.66565	0.95256	0.69840	0.60878	0.61981	0.73254	0.54722	0.00			
12	0.66477	0.58399	0.59723	0.68244	0.88478	0.79493	0.59102	0.66025	0.88100	0.61665	0.18757	0.00		
13	0.64948	0.59610	0.68865	0.58401	0.72289	0.98786	0.50917	0.56550	0.64948	0.65543	0.47249	0.45234	0.00	
14	0.69713	0.67360	0.62508	0.78280	0.69009	0.80650	0.54090	0.69429	0.89129	0.71701	0.61476	0.54699	0.42754	0.00

4- المجموعة الرئيسية الرابعة : وتضمنت العزلتين 3 و 4 وهما احدى عزلات حصى المرارة وهذه يمكن ان تؤيد ما تم تفسيره في المجموعة الرئيسية الثالثة .

5- المجموعة الرئيسية الخامسة : وتضمنت 6 عزلات هي 2 و 5 و 7 و 11 و 12 من عزلات حصى المرارة والعزلة 23 من عزلات القناة الهضمية وهنا الى حد كبير يمكن ان تؤيد ما تم تفسيره لكل من المجموعتين الثالثة والرابعة باستثناء العزلتين 7 و 23 للذان الاقرب وراثيا من بين عزلات هذه المجموعة على اساس عدد قطع الجينوم المتشابهة لكلا العزلتين مما يشير ذلك الى احتمالية كون العزلة 7 يمكن ان يكون مصدرها القناة الهضمية باعتبارها الاقرب وراثيا الى احد عزلات القناة الهضمية وهي العزلة رقم 23 وبالتالي قد يكون لدينا من ان بكتيريا *E. coli* الموجود في حصى المرارة تعود بالاصل من البكتيريا الموجودة في القناة الهضمية .

6- المجموعة الرئيسية السادسة : وتضمنت 5 عزلات والعزلتين 8 و 10 من عزلات حصى المرارة والعزلتين 19 و 20 و 21 من عزلات الحصى البولية وفي هذه المجموعة كانت العزلتين 8 و 20 هما الاقرب وراثيا من بقية عزلات هذه المجموعة وهذا ما يعزز ما تم تفسيره لكل من العزلتين 6 و 22 العائدين الى المجموعة الاولى . ونجد ايضا في المجموعة الرئيسية السادسة بان كل من العزلتين 19 و 21 هما الاقرب وراثيا عن باقي عزلات هذه المجموعة وهذا يؤيد ما تم تفسيره لعزلات المجموعة الرئيسية الثانية . وقد انفردت في هذه المجموعة العزلة 10 عزلات هذه المجموعة لذلك فان عزلات هذه المجموعة قد يتفق تفسيرها الوراثي مع ما تم التوصل اليه في العزلات لمجموعات سابقة .

7- المجموعة الرئيسية السابعة : وتضمنت ثلاث عزلات هي 24 و 25 و 26 وجميعها من عزلات القناة الهضمية وبالتالي من المحتمل ان تكون هذه العزلات من الفلورا الطبيعية الموجودة في القناة الهضمية وان كل من العزلتين 25 و 26 هما الاقرب وراثيا اكثر مما هو عليه مع العزلة 26 .

ان لقاء نظرة عامة على المجاميع الرئيسية للشجرة الوراثية لعزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية نجد عموما ان العلاقة الوراثية بين عزلات حصى المرارة هي الاقرب وراثيا لعزلات الحصى البولية اكثر مما هو لعزلات القناة الهضمية وهذا واضح من خلال وجود مجموعتين رئيسيتين ارتبطت فيها عزلات حصى المرارة وراثيا مع عزلات الحصى البولية ومن هنا نجد ان كل من البكتيريا المرافقة لحصى المرارة والبكتيريا المرافقة لحصى الكلى قد تكونان في بعض الحالات من مصدر واحد , في حين كانت هنالك مجموعة رئيسية واحدة ارتبطت فيها عزلات حصى المرارة وراثيا مع عزلات القناة الهضمية وبالتالي نجد ان هنالك احتمالية بسيطة ان يكون مصدر بكتيريا *E. coli* من البكتيريا الموجودة في القناة الهضمية . وفي نفس الوقت لم نلاحظ وجود اي علاقة وراثية بين عزلات الحصى البولية وعزلات القناة الهضمية في اي من المجاميع الرئيسية السبعة وبالتالي هذا يعطي احتمالية كبيرة جدا بان العزلات المرافقة للحصى البولية يكون مصدرها غير القناة الهضمية وقد يكون بنسبة كبيرة ناتجة اما من خلال تلوث الجهاز البولي بهذه البكتيريا التي تدخل من الخارج عن طريق الاحليل او يكون مصدر هذه البكتيريا نتيجة لتلوث الادوات

ان ترتيب العزلات البكتيرية ضمن طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis باستخدام البرنامج الوراثي (NTSYS,PC Version 1.7) ونتيجة هذا التحليل وبالاغتماد على قيم الابعاد الوراثية سيتم الحصول على شكل شبيه بالشجرة (Dendogram) ان ترتيب مجاميع العزلات لكل من بكتيريا *E. coli* وبكتيريا *K. pneumoniae* يعتمد على المدى الوراثي الذي ترتبط فيه المجاميع لكلا النوعين كل على حدة لذلك نلاحظ من خلال الشكل الظاهري (Phenogram) لكلا النوعين من البكتيريا ظهور عدة مجاميع رئيسية وبالتالي فان وجود قسم من العزلات في مجموعة معينة يدل على مدى الكم الوراثي المتشابه لعزلات تلك المجموعة وقد تضمنت تلك المجاميع لكل من بكتيريا *E. coli* وبكتيريا *K. pneumoniae* ما يلي:

اولا : المجاميع التصنيفية الوراثية لبكتيريا *E. coli* : وزعت الى 26 عزلة من بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية الى سبعة مجاميع رئيسية كما موضح في الشكل (1) وهذه المجاميع هي :

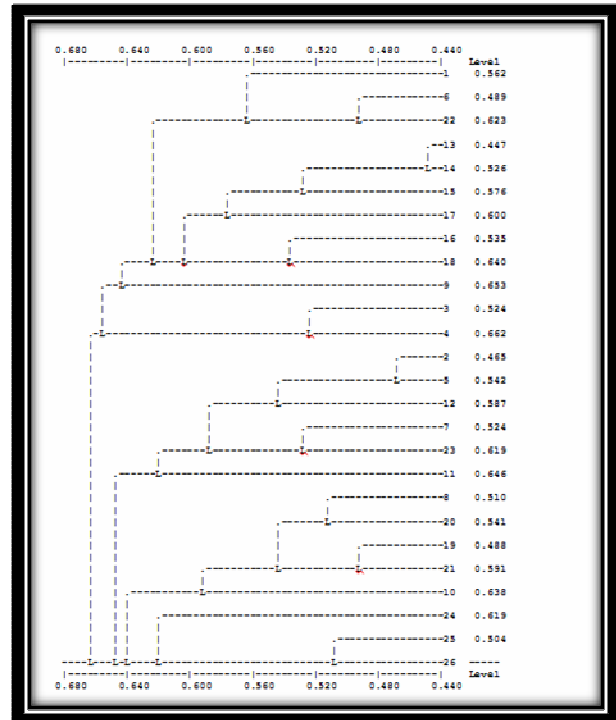
1- المجموعة الرئيسية الاولى : وتضمنت 3 عزلات هي 1 و 6 من عزلات حصى المرارة والعزلة 22 من عزلات الحصى البولية . بالنسبة لهذه المجموعة فان قسما من الخزين (الجينومي) الوراثي (Genetic pool) لكل من العزلات 1 و 6 و 22 قد تشابه تبعا لعدد قطع الدنا الجينومي لهذه العزلات المكملات لتتابعات توليفة البادئات المستخدمة , ويلاحظ ان العزلة 22 كان بعدها الوراثي مع العزلة 6 اقل مما هو مع العزلة 1 وبالتالي تكون العزلة 22 هي اكثر تشابه وراثيا مع العزلة 6 ومن ثم يليها العزلة 1 وبالتالي فان سلالات من بكتيريا *E. coli* التي يمكن ان نجدها مرافقة لحصى الجهاز البولي يمكن ان نجدها ايضا ضمن سلالات هذه البكتيريا التي يمكن ان توجد في حصى المرارة

2- المجموعة الرئيسية الثانية : وتضمنت 6 هي العزلات 13 و 14 و 15 و 16 و 17 و 18 وجميعها من عزلات الحصى البولية وبذلك تميزت هذه المجموعة بكونها تمتلك بعدا وراثيا كبيرا بينها وبين العزلات الاخرى من عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية مما قد يحى ان مصدر هذه العزلات ليس من القناة الهضمية او حتى من المنطقة الصفراوية ولكون عزلات هذه المجموعة متقاربة مع بعضها وخصوصا العزلتين 13 و 14 والعزلتين 16 و 18 وبالتالي فقد يكون مصدر الذي انتقلت منه هذه البكتيريا الى داخل منطقة الجهاز البولي ومرافقة للحصى المتكونة قد يكون من سلالات بكتيريا *E. coli* الموجودة طبيعيا على سطح الجلد او قد يكون المرضى تعرضوا الى التلوث بهذه البكتيريا نتيجة لتلوث الادوات الطبية خلال عملية القسطرة خصوصا وانه قد تم جمع العينات اتي تم الحصول منها على جميع العزلات الستة في هذه المجموعة من مستشفى الرمادي التعليمي .

3- المجموعة الرئيسية الثالثة : وتضمنت عزلة واحدة وهي العزلة 9 وهي احدى عزلات حصى المرارة ووجود هذه العزلة لوحدها في هذه المجموعة قد يفسر ان مصدرها ليس القناة الهضمية وبالتالي قد يكون مصدرها نتيجة تلوث بسبب تدخل جراحي سابق او وصولها المنطقة الصفراوية عن طريق مجرى الدم نتيجة لدخول هذه البكتيريا من خلال اي جرح موجود في اي جزء من الجسم .



الطبية بها وبالتالي فإن أي تداخل طبي أو جراحي يسبب تلوث تلك المنطقة ببكتيريا *E. coli* وقد يكون الاحتمال الآخر وجود سلالات أخرى لهذه البكتيريا في القناة الهضمية قد تكون لها علاقة وراثية متقاربة مع عزلات الحصى البولية ولكن لم يتم عزلها في هذه الدراسة .



شكل (1): العلاقات الوراثية بين عزلات بكتيريا *E. coli* المعزولة من حصى المرارة (عزلات 1-12) وحصى الجهاز البولي (عزلات 12-22) وعزلات القناة الهضمية (23-26) وفقا لمؤشرات AFLP

3- المجموعة الرئيسية الثالثة : وتضم ثلاث عزلات هي عزلات 3 و 4 من عزلات حصى المرارة والعزلة 10 من عزلات الحصى البولية وهنا كانت العزلة 4 اقرب وراثيا مع العزلة 10 اكثر مما هو عليه مع العزلة 3 وبالتالي يمكن ان تكون هنالك اكثر من سلالة متقاربة وراثيا توجد مع بعض حصى المرارة والحصى البولية وفي نفس الوقت تكون هنالك اكثر من سلالة حتى وان كانت مختلفة وراثيا توجد مع البعض من حصى المرارة .

4- المجموعة الرئيسية الرابعة : وتضم عزلة واحدة فقط وهي العزلة 7 من عزلات الحصى البولية وبالتالي قد تكون هذه العزلة تابعة الى سلالة معينة تبعد وراثيا كثيرا عن باقي عزلات حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية خصوصا .

5- المجموعة الرئيسية الخامسة : وتضم كل من العزلتين 11 و 12 وهما من عزلات القناة الهضمية وهذا قد يدل على احتمالية كون هذه البكتيريا كانت نامية ضمن بيئة القناة الهضمية متمثلة لكل من عيني هذه الدراسة والتي تم الحصول منها على هاتين العزلتين وذلك نتيجة للتقارب الوراثي بينهما وفي نفس الوقت يوجد لهذه العزلتين بعدا وراثيا عاليا بينها وبين باقي العزلات لكل من عزلات حصى المرارة والحصى البولية وبالتالي قد يستبعد وجود مثل سلالات هاتين العزلتين مرافقة لكل من حصى المرارة والحصى البولية .

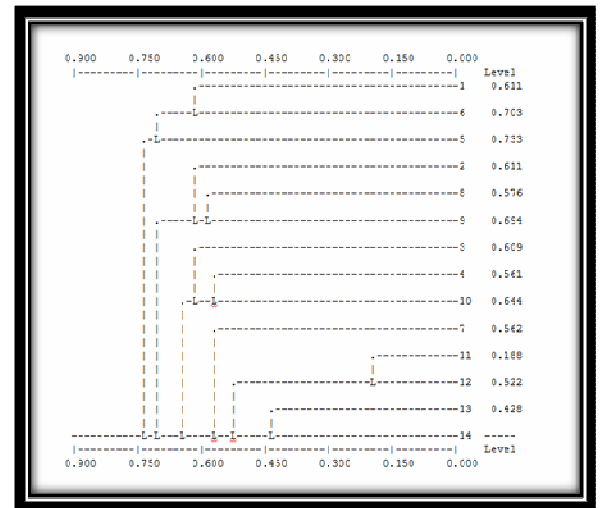
6- المجموعة الرئيسية السادسة : وتضم كل من العزلتين 13 و 14 وهما من عزلات القناة الهضمية ويبدو ان هذه المجموعة تؤيد ما تم التوصل اليه في المجموعة الرئيسية الخامسة .

ثانيا : المجاميع التصنيفية الوراثية لبكتيريا *K. pneumoniae* :

وقد توزعت الـ 14 عزلة من بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية الى ستة مجاميع رئيسية كما موضح في الشكل (2) وهذه المجاميع هي :

1- المجموعة الرئيسية الاولى : وتضم ثلاث عزلات هي العزلة 1 من عزلات حصى المرارة والعزلتين 5 و 6 من عزلات الحصى البولية وهنا نجد ان العزلتين 5 و 6 هما وراثيا اكثر قربا مما هو مع العزلة 1 وهذا يعني ان العزلتين 5 و 6 تحتويان على عدد قطع متشابهة اكثر مما هو عليه من العزلة 1 ولكننا نجد هنا ان العزلة 1 هي الاقرب وراثيا من بين جميع عزلات حصى المرارة الاخرى وهذا قد يشير الى امكانية وجود سلالات متقاربة وراثيا يمكن ان تكون مرافقة للحصى البولية وكذلك لحصى المرارة .

2- المجموعة الرئيسية الثانية : وتضم ثلاث عزلات هي العزلة 2 من عزلات حصى المرارة والعزلتين 8 و 9 من عزلات الحصى البولية ومن الملاحظ انها تشابهت مع المجموعة الاولى اذ نجد هنا ان العزلتين 8 و 9 هما وراثيا اكثر قربا مما هو مع العزلة 2 لذلك فان هذه النتيجة تؤيد ما تم التوصل اليه في المجموعة الاولى .



الشكل (2): العلاقة الوراثية بين عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة (عزلات 4-1) وحصى الجهاز البولي (عزلات 10-5) وعزلات القناة الهضمية (11-14) وفقا لمؤشرات AFLP

#### المصادر

1. Vos P ; Hogers R ; Bleeker M; Reijans M; Van de Lee T; Hornes M ; Frijters A; Pot J; Peleman J; Kuiper M. and Zabeau M. (1995) . AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucliec Acid Res.23 (21): 4407-4414 .
2. Tan Y; Wan C; Zhu Y L; Xiang Z; and Deng H. (2001). An Amplified Fragment Length Polymorphism map of the silkworm . Genetics. 157: 1277-1284 .
3. Zee A; Steer N; Thijssen E; Nelson J; Veen A; and Buiting A. (2003) . Use of multienzyme multiplex PCR Amplified Fragment Length Polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit . J. Clin. Micro. 41 (2): 798-802 .
4. Brugmans B; Van Der Hulst RG; Visser RGF; Lindhout P; and Van Eck HJ. (2003). A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers . Nuc. Acid Res. 31(10): 1093-1101.
5. Hazen SP; Leroy P; and Ward RW. (2002). AFLP in *Triticum aestivum* L: Pattern of genetic diversity and genome distribution . Euphytica. 125 (1): 89-102 .
6. Nei M; and Lei W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. P. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.
7. Sneath PHA; and Sokal RR. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. pp: 573.
8. Rohlf FJ. (1998). NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0, User Guide. Exeter Software, Applied Biostatistics, New York. pp: 1-31 .
9. Savelkoul PH; Aarts HJ ; Haas JD ; Dijkshoorn L; Duim B; Otsen M; Rademaker JL; Schouls L; and Lenstra JA. (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism

ان القاء نظرة عامة على المجاميع الرئيسية للشجرة الوراثية لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من حصى المرارة والحصى البولية والقناة الهضمية نجد عموما ان العلاقة الوراثية بين عزلات حصى المرارة هي الاقرب وراثيا لعزلات الحصى البولية وهذا واضح من خلال وجود ثلاث مجاميع رئيسية ارتبطت فيها عزلات حصى المرارة وراثيا مع عزلات الحصى البولية ومن هنا نجد ان كل من البكتيريا المرافقة لحصى المرارة والبكتيريا المرافقة لحصى الكلى قد تكونان في بعض الحالات من مصدر واحد ولسلالات متقاربة وراثيا , ومن جهة اخرى لم نجد اي من عزلات حصى المرارة والقناة الهضمية ضمن علاقة وراثية متقاربة ضمن اي مجموعة رئيسية دلالة على التباعد الوراثي لسلالات العزلات في هذه الدراسة وبالتالي نجد ان هنالك احتمالية كبيرة جدا في ان لا يكون مصدر بكتيريا *K. pneumoniae* لبعض حصى المرارة ليس من القناة الهضمية بل من مصادر اخرى كان يكون وصول هذه البكتيريا عن طريق مجرى الدم آتية اما من حالات التهاب القناة البولية او من حالات التهاب الجهاز التنفسي او من خلال الجروح وقد يكون الاحتمال الاخر ان هنالك سلالات اخرى لهذه البكتيريا في القناة الهضمية لكن لم يتم عزلها في هذه الدراسة وبالتالي عدم ظهور علاقة وراثية بين عزلات هذه البكتيريا لهذه الدراسة المعزولة من حصى المرارة والقناة الهضمية . وفي نفس الوقت لم نلاحظ وجود اي علاقة وراثية بين عزلات الحصى البولية وعزلات القناة الهضمية في اي من المجاميع الرئيسية السبعة وبالتالي هذا يعطي احتمالية كبيرة جدا بان العزلات المرافقة للحصى البولية يكون مصدرها غير القناة الهضمية وقد يكون بنسبة كبيرة ناتجة اما من خلال تلوث الجهاز البولي بهذه البكتيريا التي تدخل من الخارج عن طريق الاحليل او يكون مصدر هذه البكتيريا نتيجة لتلوث الادوات الطبية بها وبالتالي فان اي تدخل طبي او جراحي يسبب تلوث تلك المنطقة ببكتيريا *K. pneumoniae* وقد يكون الاحتمال الاخر وجود سلالات اخرى لهذه البكتيريا في القناة الهضمية قد تكون لها علاقة وراثية متقاربة مع عزلات الحصى البولية ولكن لم يتم عزلها في هذه الدراسة.



21. Lukjancenko O; Wassenaar TM; and Ussery DW. (2010) . Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. Micro. Ecol. 60: 708-720 .
22. Kil KS; Darouiche RO; Hull RA; Mansouri MD; and Musher DM. (1997). Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. J. Clin. Microbiol. 35 (9): 2370-2374 .
23. Fang C; Lai S ; Yi W; Hsueh P; Liu K; and Chang S. (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess . Clin. Infect. Dis.(45): 284-293.
24. Nagano N; Cordevant C; and Nagano Y. (2008). Upper and lower urinary tract infection caused by *Klebsiella pneumoniae* serotype K2 and CTX-M-15  $\beta$ -lactamase-producing serotype K1: a case report and characterization of serum killing resistance . J. Med. Microbiol. 57: 121-124.
25. Favre-Bonte S; Darfeuille-Michaud A; and Forestier C. (1995). Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to Human Intestine-407 Cells . Infect. and Imm. 63 (4): 1318-1328 .
26. Struve C; Forestier C; and Krogfelt KA. (2003). Application of a novel multi-screening signaturetagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. Microbiol. 149: 167-176 .
27. Brisse S; Fever C; Passet V; Issenhut-Jeanjean S; Tournebize R; Diacourt L; and Grimont P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae* identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization . Plos One. 4: 4982-4994.
- analysis: the state of an art . J. Clin. Microbiol. 37 (10): 3083-3091 .
10. Janssen P; Coopman R; Huys G ; Swings J; Bleeker M; Vos P; Zabeau M; and Kersters K. (1996) . Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy . Microbiol. 142: 1881-1893.
11. Sadhu C; Dutta S; and Gopinathan KP. (1984) . Influence of formamide on the thermal stability of DNA . J. Biosci. 6 (6): 817-821 .
12. Holt JG; Krieg NR; Sneath PHA; Staley JT; and Williams ST.(1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, U.S.A.
13. Collee JG; Fraser AG; Marmion BP; and Simmons A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14<sup>th</sup> ed., Vol.1, Churchill Livingstone, New York.
14. Lin J; Kuo J; and Ma J. (1996) . A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria . Nucleic Acid Res.24 (18): 3649-3650 .
15. Arnold C; Metherell L ; Willshaw G ; Maggs A; and Stanley J. (1999). Predictive Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis of *Escherichia coli*: High-Resolution typing method with phylogenetic significance . J. Clin. Microbiol.37 (5): 1274-1279 .
16. Jonas D; Spitzmüller B; Daschner FD; Verhoef J; and Brisse S. (2004). Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. Res. Microbiol.155: 17-23.
17. Keto-Timonen R. (2008). Amplified Fragment Length Polymorphism analysis in strain typing and identification of *Listeria* and *Clostridium* species. Academic Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine . University of Helsinki .pp: 17-54 .
18. Stewart L; Smith AL; Pellegrini C A; Motson RW; and Way LW. (1987) . Pigment gallstones form as a composite of bacterial microcolonies and pigment solids . Ann. Surg. 206 (3): 242-249 .
19. Hazrah P; Oahn K; Tewari M; Pandey A; Kumar K; Mohapatra T; and Shukla H. (2004) . The frequency of live bacteria in gallstone . H. P. B. 6 (1): 28-32 .
20. Itoh K; and Freter R. (1989). Control of *Escherichia coli* populations by a combination of indigenous clostridia and lactobacilli in Gnotobiotic mice and continuous-flow cultures. Infect. and Imm. 57(2): 559-565.