

IJST

INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

Vol. (9) No.(1)- MARCH 2014

ICV: 4.32

ISSN: 2305-9346

www.ijst-jo.com

IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology

المجلة الدولية للعلوم والتقولوجيا

Volume 9. No. 1/ March 2014 / 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. +962796543469
E-mails: info@ijst-jo.com / ijst.jordan@yahoo.com
URL: www.ijst-jo.com

EDITORIAL BOARD - 2014

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
hayderalmunshi@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
albanaantoon@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.

Professor of 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

Birasal, Narayan R.

PhD in Zoology / KLE Society's GH College
Haveri / India
nrbirasal@gmail.com

Khamas, Wael

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

Mohammed, Ramadhan H.

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

Sharma, Sunanda

PhD in Veterinary Medicine / Dept. of Veterinary
Obstetrics and Gynecology / College of Veterinary
& Animal
Science / Rajasthan University of Veterinary &
Animal Sciences
dr.sunanda_sharma@rediffmail.com

Editorial Board Secretary

Pharmacist. Nansi Elian

Amman- Jordan
ijst.jordan@yahoo.com

FORWARD

IJST is coming for you all today in its first issue of volume nine for year 2014, as our deep belief in continuing the steps we began since nine years ago.

*The last year, IJST had gained a successful achievement **when it owned an international indexed value issued by Indexed Copernicus International and scored ICV: 4.32**, which increased the prestigious level of the journal to the international scientific society, as Indexed Copernicus is considered one of the high standard level indexing organizations for scientific journals all around the world. As many colleagues and researchers asked about this factor and how does it represent as an impact factor for IJST, I prefer to give you brief description of ICV.*

***‘Index Copernicus’ (IC)** is a web-based research infrastructure since 1999, which provides essential tools for scientists, research administrators and government agencies. Index Copernicus™ (IC) also provides an interactive and reliable scientists’ evaluation system. IC performs multi-parameter analysis of scientific output and research potential, both of individual scientists and research institutions. Particular scientists are assessed according to sixteen scientific activities, including, but not limited to: experience, innovation potential and aspect of scientists’ professional activity and produce Individual Annual Performance reports and Publication Activity Analysis expressed in the universal language of mathematics. Index Copernicus (IC) is a worldwide gateway to complex scientific information. Index Copernicus Value (ICV) is calculated by the following formula:*

$$9 + [(TBS) * (IF)]$$

Where TBS represent the Total Basic Score and IF (called Impact Factor) represents the ratio of impact. Journals indexed in one of the databases: Science Citation Index Expanded, Social Science Citation Index Expanded, Art and Humanities obtain the ICV = 9 points. This system is aimed at: Journal editors, academic-level researchers, government agencies, clinical practitioners, librarians and information and reprint providers. IC Journal Master List (JML) is a journal indexing, ranking and abstracting system. This service helps a journal to grow from a local level to a global one as well as providing complete web-based solution for small editorial teams. This service accepts peer-reviews and tracks manuscripts online and builds up relations with authors, reviewers and readers as well as increasing the international awareness of a journal. The Index Copernicus team has begun the evaluation of scientific journals in 2013. The purpose of the evaluation is to give scientific journals score, which will have an impact on the scores of scientific articles published in these journals. We are expecting that our Journal will raise its IC value for 2013 as IJST is officially listed with the methodology of the IC Journals Master List.

IJST had the honor to welcome new editorial board members from India and Pakistan, Dr. Birasal & Dr. Sharma, who joined the editorial board in 2014, which is another step toward the internationality of IJST.

Finally, on behalf of the International centre, I would like to express my 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. Iqbal S. Al- Shebany

Faculty of Pharmacy, Royal University for Medical Sciences (RUMS). Jordan

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. Mohammed Al- Bedri

Faculty of Allied Medical Sciences, Royal University for Medical Sciences (RUMS). Jordan

Dr. Ramadhan H. Mohammed

College of Sciences , Duhok University . Iraq

Prof. Taghreed H. Al- Noor

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

Prof. Waleed Al- Murrani

University of Plymouth , United Kingdom

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:

AGRICULTURE

Effect of Garlic treatment, Liquorices root extract and Salicylic acid spray on yield and fruit quality of Tomatoes under unheated plastic house conditions **7-10**

Fadhil H. Al- Sahaf, Ridha M. Al- Ubaidi & Ahmed H. Abdul- Razzaq

Effect of irrigation periods and spraying with Paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig cv. Kadota and type of cracking **11-16**

Abbas M. S. Al- Hmeedawi & Ruqayah M. H. Al- Noumani

CHEMISTRY

Cloud point extraction for separation, preconcentration and extraction of nickel (II) as chloroanion by use crown ether DB18C6 coupled with spectrophotometric determination **17-23**

Shawket K. Jawad & Ebaa A. Azooz

Preparation of Carboxymethylated mPEG –Block-(4-dodecylanilide) Copolymers and their Viscometric and Surface tension properties in THF **24-28**

Jawad K. Al- Khafaji & Dhefah H. Badri

DENTISTRY

Caries severity in relation to salivary vitamins (A, C and E) among blind children compared with normal children **29-33**

Nada Jafer MH. Radhi, Jinan M. Rashad & Ali Y. Al-Rubaii

ENGINEERING

Vehicle Speed Control Using Special Brake System **34-40**

Salameh A. Sawalha, Jawdat A. Al-Jarrah, Abdul – Rahman Bin Ali Malawi & Talal M. Abu-Mansour

ENVIRONMENTAL SCIENCES

Water pollution by aluminized residues free from cooking pots **41-43**

Kareem K. Jalut, Farqad A. Rashid, & Mohammed A. Ayyash

GENETIC ENGINEERING

A Novel Step To Transfer Transgenic Callus Primordia of Carrot, Embedded in Agar Droplets **44-48**

Amjad A.H. Mohammed & Mozahim K. Al- Mallah

MEDICINAL PLANTS

Antimicrobial activity of kombucha (KH) tea against bacteria isolated from Diabetic foot ulcer **49-56**

Esam. J. AL-Kalifawi

MEDICINE**AGT gene and ACE gene polymorphism and Their Association with Type 2 Diabetes in Nineveh Province** 57-61

Owayes M.H. Al- Hassani, Mahmood E. Aljuboory, Fatima H. Mahmood & Aumama M. Al- Hassani

Cytogenetic and hormonal study for sample of men infertile in Iraq 62-65

Mohammad M. F. Al-Halbosi, Farah Th. Abdulla, Shima Y. Abdulfattah, Sabah M. Hussein, Baraa A. Abdul Hameed, Wathiq Q. Shaker & Fathel A. Hasan

HLA Class-I Molecules in Iraqi Thalassaemia Patients 70-66

Lazem H. Al- Taei, Batool H. Al-Ghurabi & Abid J. Dager

The effect of gender on the high grade vesicoureteric reflux among Kurdish children in Duhok 71-74

Nadir A. Garjees, Akrem M. Al- Atrushi, & Kadir M. Salih

NANOTECHNOLOGY**The Effect of Nano Thin Film Gold on Bacteria Using Cold Plasma Sputter** 75-80

Anwar M. E. Al- Faydhi, Hiyam A. Al-Taii & Dilshad S. Ismael

PHYSICS**Fabrication and testing of CuS nanofilm as ammonia gas sensor** 81-84

AbdulHussain Kh. Elttayef & Muneer H. J. Al-Zubaidy

The Study of properties of AFM image of CdTe thin films using FCM and Marker-Controlled Watershed Segmentation 85-95

Ziad M. Abood, Raad M. S. Al- Haddad & Suha H. Ibraheem

VETERINARY MEDICINE**Effect of *Lactobacillus acidophilus* in immune response to Infections Bursal disease and Newcastle disease vaccines in broilers exposed to heat stress** 96-104

Balqees H. Ali

PUBLIC HEALTH**Situation of Chicken Pox in Iraq: A retrospective study(2007-2011)** 105-109

Maral F. Thabit, Sabah J. Amen & Abdul- Kareem Falih

(II) قسم الدراسات والبحوث العربية – ARABIC SECTION

الأحياء المجهرية

- 120-111 مقارنة كيموحيوية وجينية للسلالات المحلية للنوع *Pseudomonas aeruginosa* مع مثيلاتها القياسية
سهير عماد عبد الرزاق الصفار، اسراء غانم حازم السماك

أدوية نباتية

- 126-121 تقدير بعض المركبات الفعالة لمستخلصات بذور العنب *Vitis venifera* وتقييم فعاليتها ضد أنواع من البكتيريا
المرضية
زينة هاشم شهاب، بشرى محمد جابر، ميسم بلاسم نعيم، ميسم غسان حليم

علوم الحياة

- 129-127 تأثير الخزن المبرد لبيض أسد المن *Chrysoperla carnea* (Stephens) على المعالم الحياتية
باسم شهاب حمد، سحر عبد خضير، أحمد غربي عبد، أحمد مشتاق عبد اللطيف

العلوم الزراعية

- 135-130 تأثير عاثي بكتريا *Rhizobium leguminosarum* في بعض معايير النمو لنبات الباقلاء
(*Vicia faba* L.)
أمير خضير عباس، سندس علي جاسم، علي هاشم الموسوي، فرقد فرحان عبد الحميد

علوم الغذاء

- 139-136 تقييم النوعية الميكروبية والكيميائية للشرايت والعصائر الأكثر استهلاكاً في بغداد
مريم مال الله غزال، علياء سعد الحافظ

الفيزياء

- 145-140 طيف فصل السائل بواسطة ليزر CO₂
أحمد ذنون، أنور مصطفى عزت الفيضي

الهندسة

- 157-146 أثر الربح الاقتصادي للعمارة المؤسساتية على النتاج المعماري : دراسة في مجالات الاستثمار الخاص في مدينة
بغداد
هشام علاء علوان السعدي

ENGLISH SECTION

Effect of Garlic treatment, Liquorices root extract and Salicylic acid spray on yield and fruit quality of Tomatoes under unheated plastic house conditions

Fadhil H. Al- Sahaf (1), Ridha M. Al- Ubaidi (2) and Ahmed H. Abdul- Razzaq (2)

(1) Faculty of Agriculture / Kufa University (2) Dept. of Horticulture / College of agriculture / Baghdad University / Republic of Iraq

ABSTRACT

An experiment was conducted to test the effect of garlic treatment (tomato plant stem rubbed by injured garlic set, GT) and sprayed with liquorices root extract (2.5g crude powder extracted in warm water overnight then filtered through clothes mesh, LQ) or salicylic acid (50, 100 mg L⁻¹, SA) on yield and fruit quality of tomato cv. Wjdan during the season 2010 – 2011 under unheated 180m² plastic house. Results revealed that plants treated with GT+LQ +100mgL⁻¹ SA had the highest average fruit weight (108.77g), plant yield (3.12 Kg .plant⁻¹), early yield (467.25Kg .180m² plastic house⁻¹) and total yield 2.80Ton .180m² plastic house⁻¹). Although total soluble solids % was slightly affected by the interaction of the three factors, fruit firmness was sharply increased in particular with the 100mg .L⁻¹SA (6.37 Kg.m⁻²). Lowest values of above characteristics were found in control plants that received no spray or GT treatment. It has been concluded that garlic treatment with spraying tomato plants with 2.5 g .L⁻¹liquorices extract and 100mg .L⁻¹ salicylic acid will increase productivity and improve fruit quality for processing, handling and transport.

Keywords: salicylic acid, garlic treatment

الملخص باللغة العربية

نفذت تجربة لاختبار تأثير التثويم (دهن سيقان الطماطم بفصوص الثوم المقطوعة عرضيا ورمزها GT) والرش بمستخلص جذور السوس (2.5غم من مسحوق الجذور استخلصت بالماء الدافئ لمدة ليلة كاملة ثم رشحت الى لتر واستخدم الراشح في الرش ورمز له LQ) او الرش بحامض الساليساليك بتركيز 50 او 100ملغم .لتر⁻¹ ورمز لها SA على الحاصل ونوعية ثمار الطماطم صنف وجدان خلال الموسم 2010-2011 تحت ظروف البيت البلاستيكي غير المدفأ بمساحة 180م² اظهرت النتائج ان النباتات المعاملة بالثوم + الرش بمستخلص جذور السوس + الرش بحامض الساليساليك بتركيز 100ملغم .لتر⁻¹ اعطت اكبر معدل لوزن الثمرة (108.77غم) وحاصل النبات الواحد (3.12 كغم) وحاصل مبكر (467.3كغم) وحاصل كلي (2.80طن) للبيت البلاستيكي بمساحة 180م². بالرغم من ان نسبة المواد الصلبة الذاتية الكلية قد تأثر قليلا بتداخل العوامل الثلاثة الا ان صلابة الثمار ازدادت بدرجة كبيرة خصوصا عند المعاملة بحامض الساليساليك بتركيز 100ملغم .لتر⁻¹. اقل القيم للصفات اعلاه وجدت في نباتات معاملة المقارنة التي لم تعامل باي من العوامل الثلاث. استنادا الى النتائج اعلاه امكن الاستنتاج بان عملية التثويم مع الرش بمستخلص جذور السوس بمعدل 2.5 غم .لتر⁻¹ وحامض الساليساليك بتركيز 100ملغم .لتر⁻¹ سيزداد الحاصل وتحسن نوعية الثمار لغراض التداول والشحن والتصنيع.

INTRODUCTION

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is a worldwide known vegetable because of different methods of use either fresh or processed and cooked. Many efforts had been experienced to increase yield and plant productivity and improve quality. Some of these are using fertilizers, growth regulators or using plant extracts, because of its effect on physiological and biochemical activities in plant. Garlic usually contains high percentage of sulfur amino acids like methionine and cysteine (1) in addition to some other active compounds such as asalicin. Egyptians long ago used injured garlic sets to rub tomato stems to increase fruit yield. Furthermore, It was found that liquorice root extract behaved similar to that of GA_3 when sprayed on pepper (*Capsicum annuum* L.) plants, where cell division and elongation were enhanced and plant growth, flowering and productivity were increased (2).

Salicylic acid is a plant hormone that can affect plant bioproductivity (3). In 2009, an experimental study emphasized that spraying salicylic acid on tomato plants improved growth and yield (4).

The aim of the current study is to use garlic treatment interacted with the spray of liquorices root extract and/or salicylic acid to increase tomato plant growth yield and improving fruit quality.

MATERIALS AND METHODS

An experiment was carried out in plastic house unit, Department of Horticulture, College of Agriculture, University of Baghdad during winter season of 2010 – 2011 to examine the effect of garlic treatment, and spraying liquorices root extract and/or salicylic acid on growth, yield and fruit quality of tomatoes. Wjdan hybrid was seeded on 5th Oct. 2010 and transplanted on 1st Dec. 2010 in unheated 180m² plastic house. Soil was treated with methyl bromide to avoid soil born infections. Chemical fertilizers (35Kg of urea (46%N) + 35Kg of NPK 27:27:0 as compound fertilizer for 180m² plastic house) were applied at four equal splits, first at transplanting and month between the others as recommended by (5).

Garlic treatment (GT) implemented by cutting set and rubbing main stem opposite to each inflorescence during January, February and March. Liquorices root powder was extracted in warm water (50 – 60 °C) for 12 hours then filtered through clothes mesh. The rate used 2.5g root powders per liter (2). Salicylic acid was used at rate of 50 or 100 mg.l⁻¹. For all spray treatments, twee 20at rate of 0.1% was added as surfactant. Spraying treatments were implemented three times starting from 20th Jan in a week interval between salicylic acid and liquorices root extract to avoid washing each other. Fruit ripening started on 3rd April 2011 and experiment was concluded on 10th June 2011. First three pickings regarded as early yield and number of fruits and total yield was recorded for each

experimental unit (3m length and 15 plants were planted on both sides of the trench at 40cm apart). A factorial (2x2x3) in randomized complete block design was adopted with three replicates and means were compared according to least significant differences at 0.05 probability (6).

RESULTS AND DISCUSSION

Results showed that main factors had significant effect on average fruit weight except liquorices extract (table 1). However interactive effect of the three factors increased average fruit weight where the highest was noticed in plants received garlic treatment and sprayed with both liquorices extract and 100mg.l⁻¹ salicylic acid (108.77g) whereas the lowest was in plants received only liquorices extract spray (70.61g). No significant differences were noticed due to the treatments on the number of fruit per plant.

Plant yield was found to be affected significantly by garlic treatment and liquorices spray only as main factors (table 1). Result also showed that with no garlic treatment or liquorices spray, salicylic acid spray had no effect on plant yield, whereas plants received spray with both materials but no garlic treatment increased plant yield gradually with salicylic acid concentrate increase. However, highest plant yield was found when plants received garlic treatment with liquorices extract (2.5g.l⁻¹) and 100mg.l⁻¹ of salicylic acid spray (3.12Kg plant⁻¹) as compared to control plants (2.70Kg plant⁻¹). Above results probably expected since liquorices root extract has Glycyrrhizin which has growth promotion effect similar to GA_3 (7). Salicylic acid was also found to increase tomato plant growth (8). As a result of the improved growth and translocation of the photosynthesis to the fruits so the average fruit weight and plant yield increased.

Early yield of plastic house is of great importance because of high price (during late March & April in Iraq) where no other sources of tomato production are available. Data of this experiment showed that the early yield (during April) is significantly affected by treatments (table 2) where plants received only salicylic acid, early yield increased gradually with the increase of salicylic acid concentration. More increase in early yield resulted when liquorices extract was sprayed. The highest early yield was found in plants received garlic treatment and sprayed with (2.5g.l⁻¹) liquorices extract and 100mg.l⁻¹ salicylic acid (476.7Kg.180m² plastic house⁻¹) as compared to non-treated control plants (388.2Kg.180 m² plastic house).

Table (1): Effect of Garlic treatment , liquorices root extract , and salicylic acid spray on yield of tomato plant

Garlic treatment	Liquorices extract (g.L ⁻¹)	Salicylic acid Concentration (mg.L ⁻¹)	Average fruit Wight (g)	No. of fruit plant ⁻¹	Plant yield (Kg plant ⁻¹)
GT0	0	0	73.46	36.76	2.70
		50	80.12	34.82	2.79
		100	84.44	32.83	2.77
	2.5	0	70.61	33.96	2.42
		50	85.40	29.88	2.55
		100	94.63	29.27	2.76
GT1	0	0	84.54	33.46	2.92
		50	87.25	30.13	2.63
		100	87.00	32.12	2.79
	2.5	0	89.85	31.63	2.85
		50	104.42	28.27	3.00
		100	108.77	28.65	3.12
LSD 0.05			23.512		0.251

Treatment significant: GT(9.599) n.s (0.103), Liquorices extract (ns)n.s (0.103), Salicylic acid (11.756) n.s (ns)

Table (2): Effect of Garlic treatment , liquorices root extract , and salicylic acid spray on plastic house productivity of tomato

Garlic treatment	Liquorices extract (g.L ⁻¹)	Salicylic acid Concentration (mg.L ⁻¹)	Early yield plastic house 180m ²	Total yield Ton /plastic house 180m ²
GT0	0	0	388.2	2.33
		50	394.0	2.36
		100	421.1	2.58
	2.5	0	408.4	2.45
		50	436.2	2.61
		100	447.0	2.68
GT1	0	0	438.5	2.63
		50	442.1	2.64
		100	443.1	2.66
	2.5	0	428.1	2.57
		50	446.5	2.67
		100	467.3	2.80
LSD 0.05			25.93	0.146

Treatment signification: GT (10.588) (0.059) , Liquorices extract(10.588) (0.059), Salicylic acid (12.960) (0.071)

Total yield behaved similarly as early yield where highest yield was found when all treatments with highest levels were implemental as compared to non- treated control plats with percent increase 20.17% (table2), which is about 0.5 ton difference per 180m² plastic house . If this difference is taken in account for 40 plastic house of 180m² in hectare, the increase in the yield will be mounted up to 20 ton/ha⁻¹.

Effect of garlic treatment was mainly on average fruit weight (table 1) because of the high content of amino acids those contain sulfur and had inductive effects on biochemical reactions and may improve photosynthetic translocation to fruits (1). Whereas , the effects of liquorices extract and salicylic acid are semi-hormonal so increased plant growth (data not shown) and reflected on enhanced fruit growth and early maturation (early yield)and total yield (table2). These results are coincided with (8) who found increased tomato yield when plants were sprayed

with salicylic acid. On the other hand ,it was found that increased pepper fruit yield when plants were sprayed with liquorices root extract and attributed these increases to the contents of liquorices root extract of semi-gebbilic acid and may increases endogenous auxin which may reflected positively on fruit yield(2).Spraying salicylaldehyde affected positively metabolic activities and endogenous hormones in tomato (9) .

Total soluble percentage is of a great importance for tomato processing (tomato paste and ketchup). Although this trait is high genetically controlled, some treatments could affect it. Highest TSS% (5.40%) was found either with no garlic treatment but spray with 2.5 g.L⁻¹liquorices root extract plus 100mg. L⁻¹ salicylic acid or with garlic treatment and spray with 100mg. L⁻¹ salicylic acid with no liquorices root extract spray (table 3) .

However, all plants treated with garlic and sprayed with 2.5g.L⁻¹liquorices root extract regardless

salicylic concentration had fruits with high TSS% significantly as compared to untreated control plants. The effect of the three treatments may be accumulative because these treatments increased the translocation of photosynthetic to the fruits so increased fruit mean weight and yield (table 2) , which may in turn increase total soluble solids percentage of the fruits (2, 10).

Tomato fruit firmness is of great importance to tomato production due to its effects on handling, transport and shelf life. These characteristics found to be highly correlated to the TSS% in tomato fruits (11). Gradual increase is noticed in fruit firmness as the concentration of salicylic acid increases

regardless garlic treatment or spray of liquorices root extract (table 3). Garlic treatment with 2.5g.L⁻¹ liquorices root extract with 50 or 100mg.L⁻¹ salicylic acid spray resulted in highest fruit firmness (6.00 and 6.37Kg.cm⁻² respectively as compared to control plants (3.77Kg.cm⁻²).

Table (3): Effect of Garlic treatment , liquorices root extract , and salicylic acid spray on some fruit quality of tomatoes

Garlic treatment	Liquorices extract (g.L ⁻¹)	Salicylic acid Concentration (mg.L ⁻¹)	Total soluble Solids(%)	Fruit firmness (Kg.cm ⁻²)
GT0	0	0	4.20	3.73
		50	4.53	3.77
		100	4.67	4.00
	2.5	0	4.50	4.17
		50	5.07	4.43
		100	5.40	4.43
GT1	0	0	5.03	4.10
		50	5.37	4.70
		100	5.40	4.93
	2.5	0	5.23	4.90
		50	5.23	6.00
		100	5.23	6.37
LSD 0.05			0.562	0.666

Treatment signification: GT(0.229)(0.272), Liquorices extract(0.229) (0.272), Salicylic acid (0.281)(0.333)

REFERENCES

1. Synge RLM. (1971). Proteins and poisons in plant. Nat. Wissen Schaffliche RundeSchar. 24(2): 54- 61.
2. AL-Jawary AKS.(2002) . Effect of spraying different nutrient compounds on growth and yield of sweet pepper *Capsicum annum*L. Master thesis. Horticulture Department, College of Agriculture , University of Baghdad ,Baghdad, Iraq.
3. Larque – Saavedra A. and Martine- Mex R.(2007). Effect of salicylic acid on the bioproductivity of plants. In salicylic acid: A plant Hormone. P. 15-23. Springer, Netherland.
4. Yidirim E. and Dursum A.(2009).Effect of foliar salicylic acid application on plant growth and yield of Tomato under green-house conditions. Acta. Hort. 807: 395- 400.
5. Matlob AN.; Mohammed ES. and Abdoul KS.(1989). Vegetable production . part 2., College of Agriculture and Forestry, Mosul University publication.
6. Steel RCD. and Torrie JH. (1980). Principles and Procedures in Statistics: A Biometrical aproach. 2nded, McGraw Hill Book CO.USA
7. AL-Ajeely TAZ.(2005).Enhancement of liquorices(*Glycerrhizaglabra*)activity by GA3 and some nutrients to produce Glycerrhizin and some compound of medicinal use. PhD. Thesis. Horticulture Department, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
8. Abdulla AA.(2009). Effect of salicylic acid spraying and some vitamins on growth and yield of some tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill) varieties under plastic tunnels in Basra dissert planting. PhD. thesis. College of Agriculture, University of Basra, Iraq.
9. Kord M. and Hathout T.(1992).Metabolic activities and endogenous hormones in tomato plant consequent to spraying with different concentration of salicylaldehyde. Egypt. J.Physiol. Sci. 16:117-139.
10. Fan X.; Matchees JP. and Feellowman JK. (1996). Inhibition Of apple fruit 1 amino cyclopropane 1 carboxylic acid oxides activity and respiration by acetyl salicylic acid. J. Plant Physiol. 149:469-471.
11. AL- Ubaidi RMA.(2006). Effect of spraying whey and mineral nutrition in growth and yield of Tomato *Lycopersiconesculentum* Mill. PhD. Thesis. Horticulture Department, College of Agriculture , University of Baghdad ,Baghdad,Iraq.

Effect of irrigation periods and spraying with Paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig cv. Kadota and type of cracking

Abbas M. S. Al- Hmeedawi (1) and Ruqayah M. H. Al- Noumani (2)

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

ABSTRACT

An experiment was conducted on private orchard at Al- Abbasyia / Nijaf on 1/5/ at 2011 and 2012 respectively to investigate the effects of 3 periods of irrigation and spraying with paclobutrazol at conc. Of 200 mg/L and Zinc sulphate at conc. Of 3000 mg/L 6 weeks before fruit harvest in single way or combination on the Total soluble solids, , total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , firmness , type of cracking and total cracking on ripe Fruits of Fig cv.kadota . Results indicated that fruits of treated trees with periods of irrigation and spraying with Paclobutrazol and Zinc sulphate increased the Total soluble solids, , total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , firmness and reducing percentage of cracking and total cracking compared with control treatment . The treatment of (irrigation after 9 days + PBZ 200 mg/L + Zn 3000 mg/L) significantly increased the total soluble solids, total sugar , vitamin C , percentage of carbohydrate , Firmness for the two growing seasons , respectively and , this treatment gave the lowest percentage of longitudinal , tertiary , quaternary , basal cracking's and total cracking for both seasons.

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

الملخص باللغة العربية

أجريت التجربة في بستان خاص في ناحية العباسية /محافظة النجف الاشرف في 1/5/2011-2012 لدراسة تأثير 3 فترات من الري والرش بالباكلوبوترازول تركيز 200 ملغم / لتر وكبريتات الزنك تركيز 3000ملغم /لتر بصورة مفردة أو مشتركة قبل 6 أسابيع من جني الثمار في النسبة المئوية للمواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابة الثمار وأنواع التشقق والتشقق الكلي عند النضج لثمار التين صنف كادوتا . اظهرت النتائج أن ثمار الأشجار المعاملة بفترات الري والرش بالباكلوبوترازول وكبريتات الزنك ازدادت فيها نسبة المواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابة الثمار وتقليل نسبة التشقق والتشقق الكلي قياسا بثمار أشجار المقارنة . تميزت المعاملة (الري بعد 9 أيام + بالباكلوبوترازول تركيز 200 ملغم /لتر+كبريتات الزنك تركيز 3000ملغم /لتر) معنويا بزيادة النسبة المئوية للمواد الصلبة الذائبة الكلية والسكريات الكلية وفيتامين C والنسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية وصلابة الثمار وكذلك أعطت هذه المعاملة اقل النسب من التشقق الطولي والثلاثي والرباعي والقاعي والتشقق الكلي لموسمي الدراسة .

INTRODUCTION

Fig trees are deciduous fruits, belong to genus "Ficus", which follows to the Family "Moraceae", where it believed that its origin is Arabian peninsula and spread to the subtropical regions, fig fruits are infected by a number of physiological damages, and the foremost damage is crack, which its ratio increased due to the increase in periods of irrigation (1). AL – Abasy found that watering fig trees cv. "Asod Diala" with irrigation every 3 days increased the kinds of cracking and total of percentage of cracking while treated trees with irrigation after 6 and 9 days and Daminozide in single way or combination together produced a significant increase in fruit firmness and reducing percentage of type of cracking and total cracking compared with control treatment at ripening (2).

AL- Dulaimi stated that, reducing the period of irrigation on pomegranate trees cv. Salami from June at maturation period resulted in a significant decline in the proportion of fruit cracking compared with control treatment (3). EL-Khawaga observed that pomegranate trees when applied at (50, 100 and 150) mg/liter paclobutrazol and Zinc sulphate (2000, 3000 and 4000) mg/L in late May and mid-July increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and reducing percentage of crackings compared with control treatment (4). Abdallah found that spraying grape trees cv. Des- Anizs with paclobutrazol at conc. of 1000 mg/L increased fruit firmness and total carbohydrates percentage, total soluble solids, total sugar, vitamin C in fruits at ripening (5). AL – Hamdawi *et. al.* found that spraying fig trees cv. "Waziri" after one week from rest period of fruits with Zinc sulphate at conc. of 0.3% led to reduction in fruit cracking and increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and firmness at ripening (6). In another study, AL – Hamdawi *et. al.* noticed that, the spraying of Paclobutrazol (PBZ) at concentration of (25, 50 and 75 ppm) on Fig trees c.v. Wazeri, when fruits of second crop at the depressed period on 25/5/for seasons 2001 and 2002 has reduced the proportion of fruit cracking to 12% compared to 16% in the fruits of control treatment (7). AL – Hamdawi and AL – Numani mentioned that, pruning trees of Fig cv. Aswad Diala at percentage (20, 40 and 60)% and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate at conc. Of (100, 150 and 200) mg/L and (2000, 3000 and 4000) mg/L each after 6 weeks before fruit harvest increased the Total soluble solids, total sugar, vitamin C, percentage of carbohydrate and firmness of fruits and reduced the type of cracking and total cracking on ripe fruits during the months of 7 and 8 (8). The main objective of the current study is to examine the effect of using period irrigation, Paclobutrazol and Zinc sulfate applied as foliar sprays after one week from rest period of fruits quality and cracking percentage during ripening of fig trees cv. Kadota.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in a private farm at Abbasiya / Najaf governorate for the 2011 and 2012 seasons on fig trees cv. Kadota, 48 at same size and growth trees were selected with 8 years of age, that planted on (5 x 5 m.), they watered every five days, and fertilized by Nitrogenous and phosphatic in two periods in March and May of each year at a rate of 500 g. per tree, as well as by manual for the two years. The experiment included 16 treatments with three replicates. It is adopted according to Randomized Complete Block Design (RCBD), and the results were statistically analyzed according to LSD test at the probability level of 5% (9). Treatments were adopted in 15/5/2011 and 2012. Treatments of irrigation were 3, 5, 7, 9 days. Trees also spraying with Paclobutrazol and zinc sulfate at conc. of (200 and 3000) mg/L respectively alone or combined with to Irrigation treatments. Spraying was done early morning until wetness was full addendum. Tween 20 was added at conc. of 1cm³/L as spreader material. The experiment involved the following 16 treatments:

- 1- Control. Irrigation after 3 days.
- 2- Irrigation after 5 days.
- 3- Irrigation after 7 days.
- 4- Irrigation after 9 days.
- 5- Paclobutrazol (PBZ) as foliar sprays at concentration of (200) mg/L.
- 6- Zinc sulphate (Zn) as foliar sprays at concentration of (3000) mg/L.
- 7- PBZ + Zn.
- 8- Irrigation after 5 days + PBZ.
- 9- Irrigation after 7 days + PBZ.
- 10- Irrigation after 9 days + PBZ.
- 11- Irrigation after 5 days + Zn.
- 12- Irrigation after 7 days + Zn.
- 13- Irrigation after 9 days + Zn.
- 14- Irrigation after 5 days + PBZ + Zn.
- 15- Irrigation after 7 days + PBZ + Zn.
- 16- Irrigation after 9 days + PBZ + Zn.

Ten normal fruits were taken at random on 10/ 7/ 2011 and 2012 from each tree for quality determination. The juice was extracted and the total soluble solids were determined by hand refractometer. Total and reducing sugar % and vitamin C mg /100 ml Juice according to (10). Total carbohydrate in fruits determination according to (11). Firmness was measured on two sides of each fruit with an Effegi penetrometer (Model NI, McCormick Fruit Tech, Yakima, WA) Fitted with an 11.1mm tip. The percentage of types of crackings (longitudinal, quaternary, basal) and total cracking were calculated during the months of July and August for both seasons.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of irrigation, and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on fruit firmness

Periods of irrigation and spraying with Paclobutrazol and zinc sulfate led to increase in the fruits firmness significantly compared to control treatment. Firmness had increased with combination treatments until it reached its highest rates (0.417 and 0.423 kg/cm²) in the treatment (Irrigation after 9 days + PBZ + Zn) in comparison to the lowest values (0.337 and 0.361 kg/cm²) in control treatment for the 2011 and 2012 growing season, respectively (table 1) . The increase in firmness in fruits is due to periods irrigation and spraying trees PBZ and Zn because these treatments play important roles in strengthening the cell walls by enhancing pectin coherence, which increases the thickness of cell walls and makes them stronger and stiffness to resist pectin analysis enzymes (12).

Wielana and Wample noticed that increasing fruit firmness through spraying the (Daminozide) is due to the fact that this compound reduces vegetative growth and thus encourages the accumulation of carbohydrate materials in fruits leading to increase content of pectic materials by increasing its firmness (13).

Effect of irrigation, and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig

Table (1) shows that total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate , and vitamin C in fruits increased insignificantly when trees watered and received foliar paclobutrazol and zinc sulphate in single way or combination. The highest significance result was recorded with Irrigation trees after 9 days and spraying with palobutrazol at 200 mg / L and Zinc sulphate at concentration of 3000 mg/L in both seasons , that gave the highest percentages of total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate and vitamin C , they were (16.89 % , 19.87 % , 21.43% and 7.99 mg / 100 ml Juice) and (17.22 % , 21.13 % , 22.12 % and 9.01 mg / 100 ml Juice) comparison with (15.80 % , 17.70 % , 17.57% and 7.21 mg / 100 ml Juice) and (16.00 % , 18.75 % , 18.23 % and 8.08 mg / 100 ml Juice) in control treatment for the two year of study, respectively . Increasing fruits from total soluble solids , total sugar , percentage of carbohydrate , vitamin C which results through pruning spraying the Paclobutrazol and Zinc sulphate due to the fact that this compound reduce vegetative growth and thus encourages the accumulation of carbohydrate materials in fruits leading to increased content of these materials (14).

Effect of irrigation, and spraying with PBZ and Zn on types of crackings of fig fruits

Table (2) showed that Irrigation trees and foliar application with Paclobutrazol and Zinc Sulphate as a single or combination had led to significantly reduction in the percentage of cracking Fruits of Fig cv. Kadota cultivars in both seasons compared to control treatment .The minimum splitting value was observed by using the Irrigation after 9 days and the highest concentration of Palobutrazol and Zinc Sulphate (200 and 3000 mg/L respectively) and the treatment of (Irrigation after 9 days + PBZ + Zn) gave the lowest percentage of longitudinal , tertiary , quaternary , basal cracking's and total cracking which were (2.87, 2.70, 2.32, 0.00 ,and 7.89) % and (1.90 , 2.87 , 1.20 , 0.00 and 5.97) for the both seasons respectively .There were also significant differences between studied treatments in reducing the percentage of cracking types . These results are in agreement with those obtained by (6,7) who observed that splitting fruits in fig c.v. Wazeri cultivar were reduced when trees by paclobutrazo and zinc sulphate were spraying . Mitra confirmed that the distant of irrigation periods led to a reduction in trees vegetative growth and there by increase total chlorophyll and transformation of manufactured absorbed materials , causing firm fruit and makes it more resistant to cracking (15) . Paclobutrazol may decrease fruit cell division during the first stage of fruit growth and improve fruit cell enlargement during the following stage (4).

CONCLUSION

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

Table (1): Effect of irrigation, and and spraying with paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig fruits cv. Kadota for seasons 2011and 2012

Treatments	Season 2011					Season 2012				
	% Total soluble sold	%Total sugar	% Total carbohydrate	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²	% Total soluble sold	%Total sugar	% Total carbohydrate	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²
Control	15.80	17.70	17.57	7.21	0.337	16.00	18.75	18.23	8.08	0.361
Irrigation after 5 days	16.03	18.00	18.33	7.39	0.360	16.23	19.30	18.55	8.20	0.375
Irrigation after 7 days	16.13	18.35	19.09	7.59	0.372	16.41	19.49	18.79	8.35	0.385
Irrigation after 9 days	16.30	18.63	19.46	7.64	0.377	16.58	20.02	19.00	8.47	0.389
PBZ	16.38	18.59	19.60	7.65	0.375	16.50	19.87	19.22	8.50	0.382
Zn	16.25	18.67	18.98	7.60	0.373	16.35	18.98	18.86	8.41	0.380
PBZ + Zn	16.41	19.28	19.64	7.78	0.381	16.73	19.90	19.50	8.68	0.385
Irrigation after 5 days + PBZ	16.35	18.71	20.19	7.67	0.371	16.70	20.12	19.91	8.54	0.377
Irrigation after 7 days + PBZ	16.43	19.12	20.78	7.83	0.388	16.84	20.23	20.17	8.80	0.384
Irrigation after 9 days + PBZ	16.58	19.32	20.95	7.96	0.390	16.69	20.46	20.67	8.82	0.405
Irrigation after 5 days + Zn	16.08	18.84	18.90	7.63	0.368	16.65	19.62	19.78	8.45	0.370
Irrigation after 7 days + Zn	16.47	19.00	19.25	7.75	0.375	16.77	19.84	19.93	8.63	0.374
Irrigation after 9 days + Zn	16.53	19.11	19.75	7.72	0.379	16.75	19.89	20.16	8.75	0.381
Irrigation after 5 days + PBZ + Zn	16.40	18.80	20.32	7.86	0.397	16.80	20.15	21.07	8.77	0.400
Irrigation after 7 days + PBZ + Zn	16.66	19.45	20.81	7.91	0.406	16.96	20.86	21.50	8.93	0.412
Irrigation after 9 days + PBZ + Zn	16.89	19.87	21.43	7.99	0.417	17.22	21.13	22.12	9.01	0423
L.S.D. 0.05	0.16	0.23	0.27	0.07	0.014	0.08	0.42	0.14	0.06	0.011

Table (2): Effect of irrigation , and and spraying with PBZ and Zn on types of crackings of fig fruits cv. Kadota for seasons 2011 and 2012

Treatments	Season 2011					Season 2012				
	% Longitudinal cracking	% Tertiary cracking	% Quaternary cracking	% Basal cracking	% Total cracking	% Longitudinal cracking	% Tertiary cracking	% Quaternary cracking	% Basal cracking	% Total cracking
Control	7.10	6.32	4.86	1.99	20.27	6.87	5.68	4.95	1.70	19.20
Irrigation after 5 days	6.77	5.42	4.63	1.82	18.64	6.70	5.00	4.73	1.51	17.93
Irrigation after 7 days	6.25	5.01	4.18	1.55	16.99	6.43	4.81	4.55	1.42	17.21
Irrigation after 9 days	4.90	3.86	2.82	1.10	12.68	5.09	3.50	3.86	1.10	13.55
PBZ	5.38	4.95	3.30	1.60	15.23	4.93	3.86	4.78	1.00	14.57
Zn	6.20	3.97	4.25	1.60	16.02	5.15	4.43	4.45	1.32	15.35
PBZ + Zn	5.56	4.33	3.80	1.29	14.98	4.67	3.62	3.96	1.30	13.55
Irrigation after 5 days + PBZ	5.36	4.27	3.87	1.06	14.56	4.60	3.13	3.57	1.01	12.31
Irrigation after 7 days + PBZ	4.79	4.41	3.52	0.75	13.47	4.38	4.25	3.19	0.86	12.68
Irrigation after 9 days + PBZ	4.42	3.76	4.12	0.52	11.82	3.78	2.90	2.70	0.79	10.17
Irrigation after 5 days + Zn	5.71	4.66	3.82	1.42	15.64	4.75	4.00	4.22	1.16	13.13
Irrigation after 7 days + Zn	3.90	5.12	3.50	1.36	13.88	4.50	4.36	3.45	1.00	13.31
Irrigation after 9 days + Zn	4.19	3.38	3.00	0.68	12.25	4.05	3.16	3.86	0.55	11.26
Irrigation after 5 days + PBZ + Zn	3.59	3.25	2.77	0.00	9.16	3.49	3.35	1.67	0.23	8.49
Irrigation after 7 days + PBZ + Zn	3.36	2.97	2.50	0.00	8.83	3.00	2.70	1.51	0.00	7.21
Irrigation after 9 days + PBZ + Zn	2.87	2.70	2.32	0.00	7.89	1.90	2.87	1.20	0.00	5.97
L.S.D. 0.05	0.49	0.70	0.21	0.11	0.97	0.38	0.42	0.14	0.17	1.25

REFERENCES

1. Ibrahim AM. (1996). Deciduous Fruit , Growth and Production. College of Agriculture. University of Alexandria, Egypt.
2. AL-Abasy GB.(2009). Effect of periods irrigation , Ca and Daminozide on contening fruits Fig cv. Asowd Diala from Nutrient Element and percentage of cracking Wazeri . J. Al-Qadisiya for science . 14 (4) : 53-62.
3. AL-Dulaimi RM. (1999). Influence of some Factors effection on the splitting of pomegranate fruits . PhD. Thesis . Department of. Horticulture. Agriculture College. University of Baghdad, Iraq.
4. EL-Khawaga AS. (2007). Reduction in fruit cracking in manfaluty pomegranate following a foliar application with Paclobutrazol and zinc sulphate. J. Appl. Sci. Res. 3(9): 837-840.
5. Abdallah H K. (2009). Effect of Paclobutrazol spraying and summer pruning on growth and yield of the grape (Visit vinifera L.) , c.v Des- Aniz . PhD. Thesis . Department of Horticulture. Agriculture College. University of Kufa .Iraq.
6. AL-Hamdawi AM; Al-Khaffaf AA. and Al-Attabi AA. (2006). Effect of some nutrient spraying on vegetative and fruiting growth of fig CV. Wazeri. J. of Babylon Univ. 1 (3) : 439 – 446.
7. AL-Hamdawi AM; Al-Khaffaf AA. and AL-Truffi ZSM. (2004). Effect of Spraying with NAA and PBZ on vegetative and fruiting characteristics of fig trees. J. Babylon univ. 9(3):485-492.
8. AL-Hamdawi AM. and AL-Numani, RM. (2012). Effect of Pruning and spraying with Paclobutrazol and Zinc sulphate on fruits quality of fig cv. Asowd Diala and percentage of cracking .IJST. 7 (4):5- 10.

9. AL-Rawi KM. and Khalf Allah AM.(2000). Design and Analysis of Agricultural Experiments . College of Agriculture. University of Mosul . Iraq.
10. Association of Official Analytical Chemist (1985). Official Methods of Analysis.13th Ed. APAC. Washington D. C., U. S. A.
11. Joslyn AM. (1970). Methods in food analysis, physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2nd Ed., Academic Press. New York. London.
12. Jundi H M.(2003). Physiology of tree fruits. Arabic Home for publishing. Cairo. p. 128.
13. Wielana WF. and Wample RL. (2007). Effects of Daminozide on growth, photosynthesis and synthesis and carbohydrate content of Delicious Apples. Scientia. Horti. 26 : 139 – 147.
14. Ferguson L.; Michailides TJ. and Shorey HH. (1999). California Fig Industry. University of California. U.S.A.
15. Mitra SK. (1997). Postharvest physiology and storage of tropical and sub – tropical fruits . CAB . INT . West Bengal . India.

Cloud point extraction for separation, preconcentration and extraction of nickel (II) as chloroanion by use crown ether DB18C6 coupled with spectrophotometric determination

Shawket K. Jawad and Ebaa A. Azooz

Dept. of Chemistry / College of Education for Girls / Kufa University / Republic of Iraq

ABSTRACT

Absorbance spectrum for ion pair association complex extracted by cloud point extraction (CPE) method illustrated λ_{\max} was (295 nm). 0.5 M hydrochloric acid favorable for conversion metal cation to chloro complex extracted with 0.25M NaCl and 50 μ g Ni²⁺ (8.52×10^{-5} M) by existence 1×10^{-4} M DB18C6, as well as very necessary the aqueous solution contain 0.6ML from 1% Triton X-100, thermodynamic parameters was $\Delta H_{\text{ex}} = 0.2897 \text{ K.J.mole}^{-1}$, $\Delta G_{\text{ex}} = -63.92 \text{ K.J.mole}^{-1}$, $\Delta S_{\text{ex}} = 176.86 \text{ J.mole}^{-1}\text{s}^{-1}$. With suitable time of heating equal to 20 minutes, stoichiometry study shows ion pair complex extracted was 1:1. So this study include application about determination nickel (II) in different samples.

Key words: Cloud point extraction, preconcentration, crown ether DB18C6, Nickel.

الملخص باللغة العربية

طيف الامتصاص لمعقد الترابط الايوني المستخلص بتقنية استخلاص نقطة الغيمة اوضح ان الطول الموجي لاعظم امتصاص هو ($\lambda_{\max} = 295 \text{ nm}$). وقد وجد ان 0.5 M لحمض الهيدروكلوريك هو المفضل لتحويل الايون الفلزي الموجب الى معقد كلورو سالب مستخلص مع 0.25M NaCl, $50 \mu\text{g}$, Ni^{2+} ($8.52 \times 10^{-5} \text{ M}$) بوجود $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ DB18C6. كذلك من الضروري ان يكون المحلول حاوياً على 0.6 ML من السطح 1% Triton X-100. وقد كانت المدلولات الترموديناميكية لعملية الاستخلاص هي: $\Delta H_{\text{ex}} = 0.2897 \text{ K.J.mole}^{-1}$, $\Delta G_{\text{ex}} = -63.92 \text{ K.J.mole}^{-1}$, $\Delta S_{\text{ex}} = 176.86 \text{ J.mole}^{-1}\text{s}^{-1}$. مع زمن مناسب للتسخين 20 دقيقة، وقد بينت دراسة تركيب المعقد ان المعقد المستخلص وفق تقنية استخلاص نقطة الغيمة 1:1 كما ان هذه الدراسة شملت تطبيقات حول تقدير النيكل (II) في نماذج مختلفة.

INTRODUCTION

CPE method is based on the distribution ion pair association complex formed between surfactant and aqueous phase and when the solution is heated to fixed temperature the micelles formed cloud point layer with smallest volume and higher density containing ion pair association complex of Ni^{2+} in equilibrium with aqueous solution (1,2). A previous study used CPE methodology for separating Cu(II), Co(II), Pb(II) from different samples after complex formation with 1-phenyl thiosemicarbazide by used Triton X-114 coupled with flame atomic absorption with detection limit 3.42 $\mu\text{g/L}$ for Pb(II) 1 $\mu\text{g/L}$ Co(II) and 0.67 $\mu\text{g/L}$ Cu(II) (3). Extraction Cu(II), Ag(I) and Ni(II) after complexation with two ligand 2-[(4-formyl phenyl)azo]-4,5-diphenyl imidazole and 2-[(2-methylphenyl)azo]-4,5-diphenyl imidazole at optimum condition which is restricted experimentally (4). By used CPE methodology coupled with flame atomic absorption determined micro amount of lead in different samples of soil and water after complexation with 1-[2-pyridyl azo]-2-naphthol and Triton X-114 at pH=8 (5). By application of CPE methodology coupled with spectrophotometric technique for extraction and determination of Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} in different samples (6). Study for separation and determination of cadmium (II) by cloud point extraction coupled with flow injection atomic absorption by used methyl trioctyl ammonium to formation ion pair association complex with CdL_4^- with using Triton X-114 (7). By used BHIS as complexing agent for extraction Ag(I) at pH=8 in CPE methodology with Triton X-114 with detection limit 1.9 $\mu\text{g/L}$ (8). Separation and determination Pb, Cd, Pd in some vital samples by CPE method coupled with flame atomic absorption by used IPAI as complexing agent at pH=8 with Triton X-114 this study illustrate D.L.=1.6 $\mu\text{g/L}$ (9) by application of CPE methodology for separation and preconcentration small quantities of nickel(II) without using complexing agent as first step for determination by flame atomic absorption by used nonionic surfactant (PONPE7.5) (10). Used CPE methodology for determination Hg in different tissues of grilled chickens with application cloud vapors atomic absorption and complexing agent (DDTP) so Triton X-114 (11). Determination in sufficient quantity of iron in different sandy soil by CPE method coupled with flame atomic absorption by used Triton X-114 and $\text{N,N'-(2,2'-(ethane-1,2-diylbis(oxy)bis(ethane-2,1-diyl)bischloroacetamide)(EDBOCA)}$ a complexing agent at pH=5 (12). There are different studies for separation, preconcentration and extraction different element by CPE method coupled with atomic absorption spectrometry for determination by used different complexing agent and surfactant (13-20).

MATERIALS AND METHODS

All spectrophotometric studies were performed by double beam UV-VIS spectrophotometer, shimadzu UV-1700(Japan). Absorbance measurements making by single beam UV-VIS spectrophotometer, TRIUP International CORP-TRUV 74,s, Italy as well as all materials used as received without more perfection and all solutions prepared by double distilled water, stock solution of Ni^{2+} 1mg/ml was prepared by dissolved 0.673 gm. of $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml distilled water by used volumetric flask. $1 \times 10^{-2}\text{M}$ DB18C6 prepared by dissolved 0.360 gm. DB18C6 in 100 ml aqueous solution contain TritonX-100.

Aqueous solution 10 ml in volume contain 50 μg Ni^{2+} and 0.5M HCL and 0.2 M NaCl, $1 \times 10^{-4}\text{M}$ DB18C6, 0.5 ml from 1% TritonX-100, heating the solution in electrostatic water bath to 90°C for 20 minutes to appearance Cloud point layer separate this layer from aqueous solution, and dissolved cloud point layer in 5ml ethanol and measure the absorbance at $\lambda_{\text{max}}=295$ nm against blank prepared at the same manner without Ni^{2+} ion, as well as aqueous solution treated according to spectrophotometric method (dimethyl glyoxime method DMG) (21) for determination remainder quantity of Ni^{2+} ion aqueous solution after extraction, and subtract this quantity of Ni^{2+} ion from original quantity to calculate the transferred quantity of Ni^{2+} ion to cloud point layer and determine the distribution ratio (D).

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric study

Extraction Ni^{2+} ion according to CPE methodology which is previous detailed, the Cloud point layer after dissolved in 5mL ethanol and taken the spectrum against blank prepared at the same manner without Ni^{2+} ion. This study as in figure (1) shows the wave length of maximum absorbance for ion pair complex extracted was $\lambda_{\text{max}}=295$ nm.

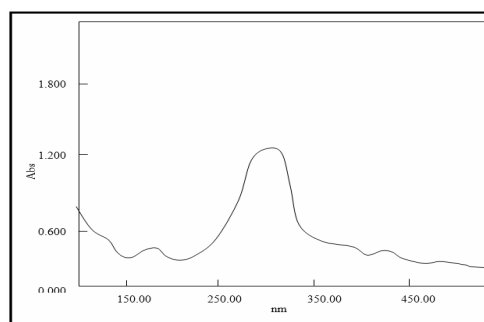


Figure (1): UV-VIS. Spectrum of ion pair complex for Ni^{2+} .

Effect of HCl concentration

Extraction Ni^{2+} according to CPE method by taken 10 ml aqueous solution contain $50 \times \text{g Ni}^{2+}$ ion and different concentration of HCl (0.2-1M), 0.2M NaCl, 1×10^{-4} M DB18C6 with 0.5 ml of 1% TritonX-100, after heating these solution in water bath to 90°C for 20 minutes, separate CP layer, dissolved CP layer in 5ml ethanol and determine the absorbance against blank prepared at the same manner without Ni^{2+} ions, and the aqueous phase treated according to spectrophotometric procedure (21) and return to calibration curve figure(2), to determine remainder Ni^{2+} ions in aqueous solution and transferred Ni^{2+} to Cloud point to calculate distribution ratio (D). The results as in figures(3, 4) showed that 0.5M HCl was the optimum value, which is giving best efficiency of extraction and higher value for distribution ratio (D). Concentration less than optimum did not allow to reach thermodynamic equilibrium for formation stable chloroanion complex for nickel NiCl_4^{2-} and NiCl_3^- which extraction as ion pair association complex, as well concentration more than optimum value effect to decline extraction efficiency because effect to increase dissociation equilibrium for chloroanion complex NiCl_4^{2-} according to Lechatelier principle.

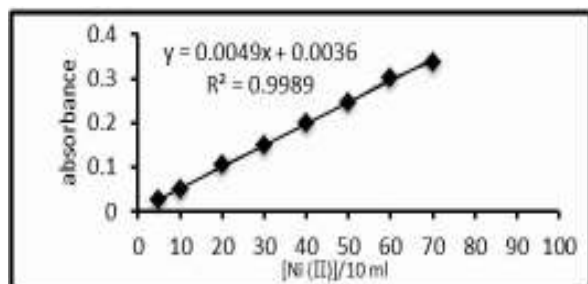


Figure (2): calibration curve for method.

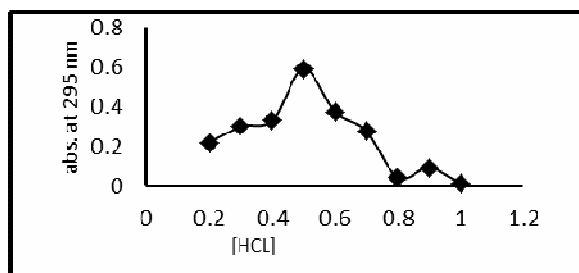


Figure (3): extraction efficiency change as a function of HCl concentration

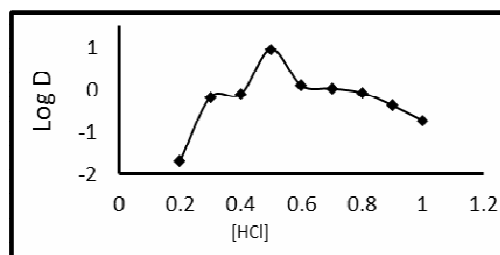


Figure (4): $D = f [\text{HCl}]$

Effect of NaCl concentration

Extraction Ni^{2+} as chloroanion complex NiCl_4^{2-} , NiCl_3^- according to CPE method by existence different concentration of NaCl in 10 ml aqueous solution (0.01-0.6M) and the same values of another material as in the previous experiment except HCl at 0.5M. Figures (5,6). The results showed absorbance of ion pair complex and D values increase with NaCl concentration increase to optimum value 0.25M NaCl then decrease with more concentration, any concentration of NaCl less than 0.25M was not suitable for reached favorable thermodynamic equilibrium, which plays major role to change DB18C6 into large cation by association with Na^+ to form ion pair association complex with NiCl_3^- or NiCl_4^{2-} .

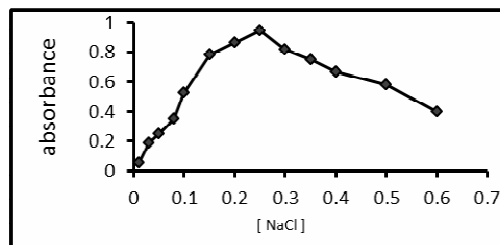
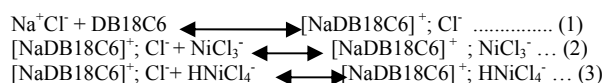


Figure (5): effect of NaCl concentration on ion pair complex formation and stability

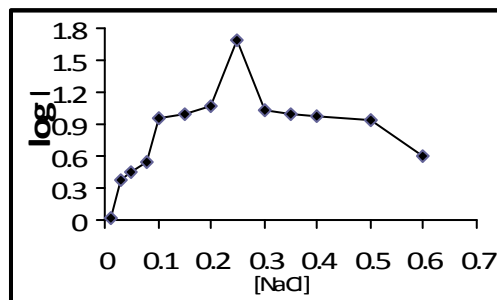


Figure (6): $D = f [\text{NaCl}]$

Any concentration of NaCl more than optimum value deviates equilibrium into dissociation according to Lechatelier principle, and decreases the extraction ability, but when we used another alkaline and alkaline earth metals, the results showed that potassium cation K^+ was best because of good fitting between metal cation and the cavity of crown ether DB18C6 to give more stability of large cation produced $[KDB18C6]^+$.

Effect of Ni^{2+} concentration

Extraction Ni^{2+} according to CPE method from 10 ml aqueous solution containing different concentrations of Ni^{2+} ion (0.05–0.8M) and 0.25M NaCl, 0.5M HCl, 1×10^{-4} M DB18C6 0.5 ml of 1% TritonX-100 and heating in water bath to $90^\circ C$ for 20 minutes, after determined the absorbance of ethanol solution of cloud point and distribution ratio (D) obtained the results as in figures (7,8). The results showed that $50 \mu g/10$ ml was optimum concentration, which gave favorable equilibrium for ion pair complex formation and stability as well as higher distribution ratio. Any concentration less than optimum value did not allow to reach equilibrium also Ni^{2+} concentration more than optimum concentration effect to increase dissociation equilibrium and decline extraction ability.

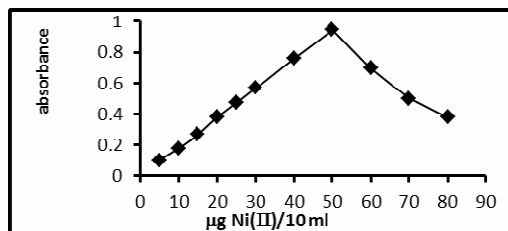


Figure (7): effect of Ni^{2+} concentration on ion pair complex formation and stability

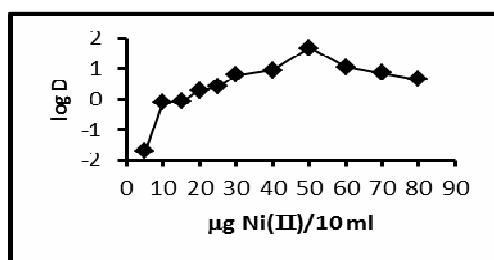


Figure (8): distribution ratio change as a function to Ni^{2+} concentration

Effect of DB18C6 concentration

All optimum conditions were measured at previous experiment and with different concentrations of DB18C6 (10^{-6} – 10^{-3} M), after determined absorbance and distribution ratio D. Figures (9, 10). The results shows 1×10^{-4} was optimum value giving favorable equilibrium but less concentration did not allow to

reach equilibrium as well as more concentration effect to increase dissociation equilibrium.

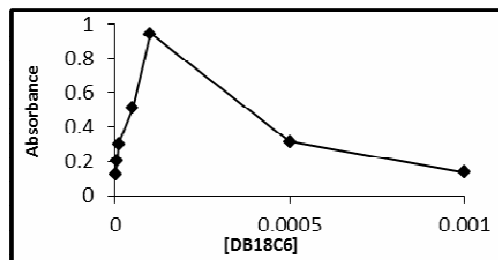


Figure (9): ion pair complex formation = f [DB18C6]

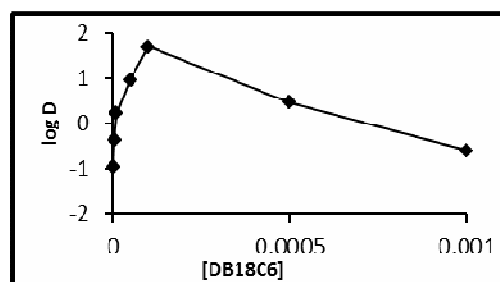


Figure (10): $D = f [DB18C6]$

Effect of TritonX-100 concentration

10 ml of aqueous solution containing $50 \mu g Ni^{2+}$ 0.25M NaCl, 0.5M HCl, 1×10^{-4} M DB18C6 with different volumes of 1% TritonX-100 (0.1–1mL) were added and the solution was heated in water bath to $90^\circ C$ for 20 minutes to produce Cloud point layer after separate this layer and dissolved in 5ml ethanol determine absorbance at $\lambda_{max} = 295$ nm against blank prepared at the same manner without Ni^{2+} ion, so aqueous solution treated according to spectrophotometric method (dimethyl glyoxime method DMG) for determination remainder quantity of Ni^{2+} in aqueous solution after CPE extraction, the results obtained were as in figures (11,12). The results showed 1 ml of 1% TritonX-100 was optimum value for extraction giving high efficiency, throughout absorbance values and distribution ratio D, any value less than optimum effect to decline extraction efficiency, and value more than optimum effect to increase diffusion of surfactant in aqueous solution and decrease extraction efficiency.

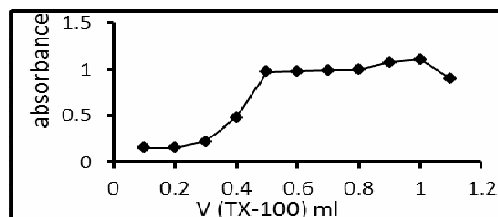


Figure (11): the effect of Triton X-100 concentration on extraction efficiency

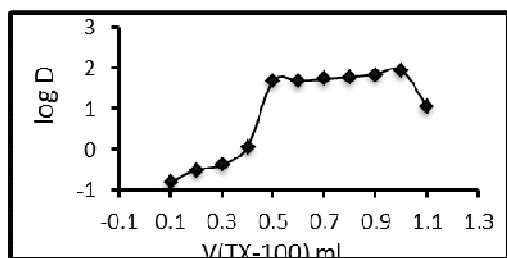


Figure (12): D =f volume of 1% TritonX-100

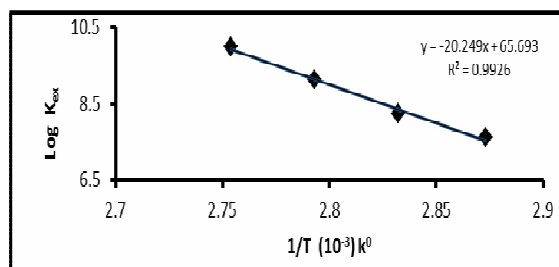


Figure (15): effect temperature on extraction constant

Thermodynamic

Extraction Ni^{2+} at optimum condition under different temperature (70 – 100) $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. ,from other hand extracted at optimum condition at 90 $^{\circ}\text{C}$ for different time (10 -35) min. , the results as in Figures (13,14). The results showed 90 $^{\circ}\text{C}$ and 20 min. was optimum values, after determined D value at different temperature and calculate K_{ex} from the equation below:

$$K_{ex} = \frac{D}{[\text{Ni}^{+2}][\text{DB18C6}]}$$

The results reflected straight line relation as in figure (15). In addition, thermodynamic data for this application are shown in table (1).

Table (1): thermodynamic data obtained

ΔH_{ex} K.J.mole ⁻¹	ΔG_{ex} K.J.mole ⁻¹	ΔS_{ex} J.mole ⁻¹ s ⁻¹
0.2897	- 63.92	176.82

Effect of cavity

Extraction Ni^{2+} according to CPE methodology at optimum condition by used different crown ethers and criptand differ in the diameter of its cavity 12C4, 15C5, 18C6 ,C222.The results as in figures (16,17) showed the agreement between Na^{+} diameter and cavity size of crown ether play a major rule for consolidate ion pair complex formation and stability as well extraction, so to lean on this rule 18C6 and DB18C6 give the best agreement, therefore giving higher extraction but DB18C6 contain two phenyl rings effect to withdrawing the electron density which affects to decrease the strength of association between crown ether and Na^{+} and decline extraction efficiency.

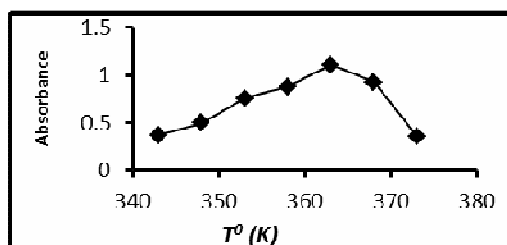


Figure (13): thermodynamic relation between extraction efficiency and temperature

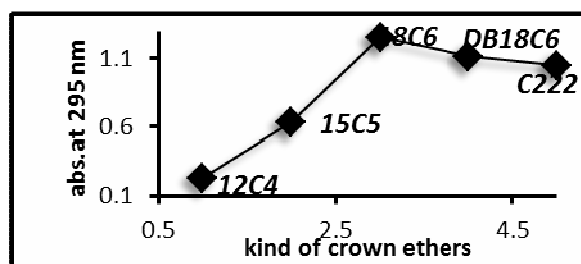


Figure (16):effect of cavity size on extraction

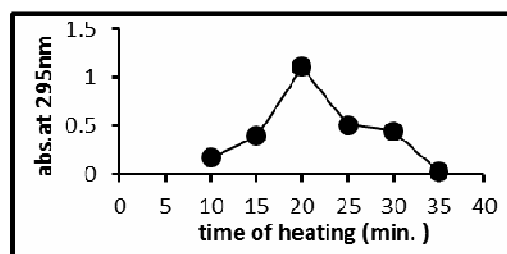


Figure (14): effect of time of heating on extraction

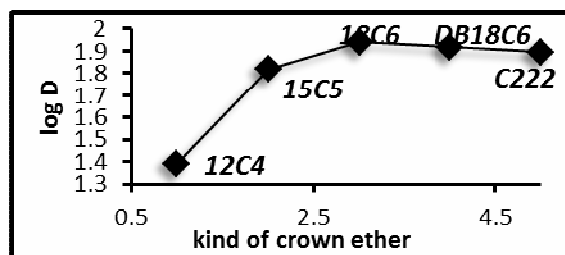


Figure (17): the relation between distribution ratio and cavity size

Extraction in HCl media

Extraction Ni^{2+} according to CPE method from HCl media in absence NaCl give the results as in figures (18, 19). The results show in HCl media in absence NaCl the extraction was less efficiency because the cation which is associated with crown ether and C222 is proton H^+ with less agreement in association.

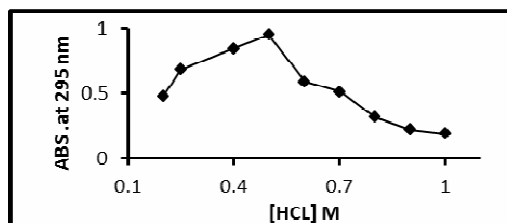


Figure (18): effect different concentration of HCl on ion pair complex extracted

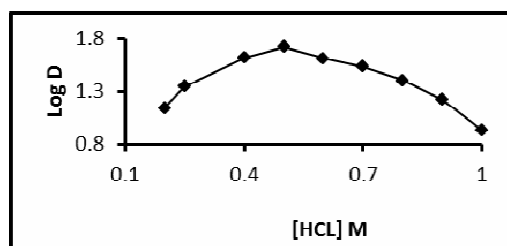


Figure (19): effect of HCl concentration on distribution ratio

Spectrophotometric determination

For Spectrophotometric determination of nickel (II) in different vital and environmental samples prepared calibration curve by CPE methodology as in figure (20) and table (2).

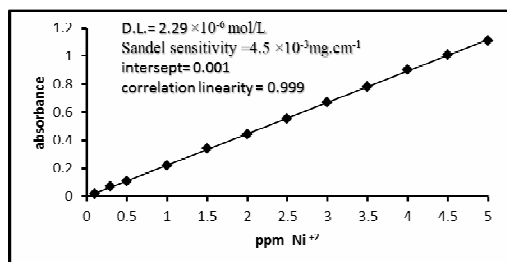


Figure (20): calibration curve for Spectrophotometric determination of Ni^{+2} in different sample

Table (2): spectrophotometric determination of nickel (II) in different samples after cloud point extraction

Samples	Proposed method (ppm)
Agricultural soil	0.3
Un agricultural soil Wade Al Salam graveyards	0.34
Native cows meet	1.8
Native fish	0.85
Native date	0.5
Egyptian banana	1
Egyptian orange	1.8
Spinach	1.1
Celery	1.5
Peppergrass	0.35

REFERENCES

1. Sanz-Medel A.; Camp MRF.; Gonzalez EB. and Fernandez-Sanchez ML. (1999). organized surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. *Spectrochim. Acta*. 54:251-287.
2. Holmberg K.; Jonssen B.; Kronberg B. and Lindan B. (2003). surfactants and polymers in aqueous solution. 1st Ed. John. Willy and sons, LTD, London pp .22.
3. Shariati S.; Yamini Y. and Zanjani MK. (2008). Hazardous matters. 158.
4. Abood FK. (2009). Synthesis of two new ligand and this application in extraction of some transition metal cat ions from aqueous solution . Master Thesis, college of education for Girls, University of Kufa.
5. Tavallali H.; Esrari E.; Attaran AM. and Tabandeb M. (2010). Sensitive determination of lead in soil and water samples by cloud point extraction flame atomic absorption spectrophotometry method. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2(3):1731-1737.
6. Muslim JR. (2012). Extraction and spectrophotometric determination of Pb^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} cat ions in different samples by cloud point extraction. Master Thesis, college of education for girl, University of Kufa.
7. Dadfarnia S.; Haji-Shabani AY. and Kamranzach E. (2010). Selective cloud point extraction of cadmium prior to atomic absorption spectrophotometric determination. *J. Baz. chem. soc.* 21 (12): 2353- 2358.
8. Ahmadi F.; Niknam K.; Delavari S. and Ohammadi A. (2011). Cloud point extraction and determination of silver ion in real samples using bis (H-benzo[d]imidazol-2-yl)-methyl sulfane. *J. chem.* 8(1):435-442.
9. Ghaedi M.; Niknam K. and Soylalc M. (2011). Cloud point extraction and flame atomic absorption determination of lead, cadmium and palladium in some food and biological samples. *Pak .J. Anal .Environ .chem.* 12(1,2): 42-48.
10. Zadeh HA. and Zadeh EE. (2011). Ligandless cloud point extraction for trace nickel determination in water samples by flame atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (3): 517-524.
11. Shah AQ.; Kazi TG.; Baig JA.; Afridi HI.; Kanhro GA.; Arain MB.; Kolachi NF. and Wadhwa SK.

- (2010). Total mercury determination in different tissues of broiler chicken by using cloud point extraction and cloud vapor atomic absorption spectrometry. Food chem., toxicol. 48 :65-69.
12. Duran C. ; Ozdes D.; Celenl E.; Ktekin H.; Bulut NV. and Tufekci Z,(2012). Optimization of a new cloud point extraction procedure for the selective determination of trace amounts of total iron in some environmental samples. Turk .J.chem 36:445-456.
13. Ojeda CB.; Rojas FS. and Camparon JM.(2010). Preconcentration of cadmium in environmental samples by cloud point extraction and determination by FAAS. American J. Anal .chem. 1:127-134 .
14. Masrounia M.; Nezhadali A.; Taghzadeh – Darban B.; Ahmad A. and Mollaei B. (2010). speciation of Cr(II) and Cr(VI) in water sample by spectrophotometric with cloud point extraction .Int. appl. Geolog. Islamic Azad university Mashhad – branch –Iran 1:26- 28.
15. Depoi FDS.; Bentin FR. and Pozebon D.(2010). Methodology for Hg determination in honey using *cloud point extraction* and cloud vapor s – inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Anal. Method. 2:180 -185.
16. Liang P. and Yang J. (2010). Cloud point extraction Preconcentration and spectrophotometric determination of copper in food and water samples using amino acid as the complexing agent. J. food compos. Anal. 23:95-99.
17. Ghaedi M. and Niknam E.(2010). Application of TritonX-100 coated poly vinyl chloride as new solid phase for Preconcentration of Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions and their flame atomic absorption , determination. Bull. Chem. Soc. Ethiop 24(1):11-20.
18. Ghaedi M.; Niknam K.; Niknamb E. and Soylake M. (2009). Application of Cloud Point Extraction for Copper, Nickel, Zinc and Iron Ions in Environmental Samples. J. Chinese Chemi. Soc. 56:981-986,
19. Ghonaim AK.; El-Naggar WS.; Lasheen T. and Nouh SA.(2009). Cloud point extraction and Preconcentration of gold in geological matrices pair to flame atomic absorption determination. J. chem. 3: 1-11.
20. Shkollalm A.; Ghaedi M. and Hosseini S. (2008). Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometry combination for copper (II) ion in environmental and biological samples . J. Hazard. Mater. 160(2-3):345-440.
21. Marczenko Z. (1986). Separation and spectrophotometric determination of elements. Allis Horwoord limited.

Preparation of Carboxymethylated mPEG–Block-(4-dodecylanilide) copolymers and their viscometric and surface tension properties in THF

Jawad K. Al- Khafaji and Dhefah H. Badri

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

ABSTRACT

Each monomethyl polyethylene glycol (mPEG) were carboxy methylated by its reaction with monochloroacetic acid and then modified by 4-dodecylaniline to produce the block-copolymer, and the synthesized products were identified by FTIR spectrophotometer. Viscometric and surface tension of the three block-copolymers in THF solution at 25°C had been studied. The results proved that THF is good solvent for the block-copolymer chains, and the chains are flexible coils. The results showed that the air/liquid surface tension decreased with increasing the hydrophobic to hydrophilic ratio of the block-copolymer chain.

Key words: block-copolymer, amphiphilic PEG, intrinsic viscosity, surface tension

الملخص باللغة العربية

تمت مفاعلة كل من مركب بولي اثلين كلايكول أحادي المثل مع أحادي كلورو حامض الخليك للحصول على كاربوكسي مثيليتيد بولي اثلين كلايكول أحادي المثل الذي تم تحويله بعد ذلك بواسطة 4-دوديسايل اثلين لإنتاج بوليمر مشترك - مقفل وان جميع المركبات المحضرة تم تشخيصها بواسطة طيف الأشعة تحت الحمراء. تمت دراسة الخصائص اللزوجية والشد السطحي لمحاليل البوليمرات المشتركة الثلاث في رباعي هيدروفيوران عند 25°م. أثبتت النتائج ان رباعي هيدروفيوران كان مذيبا جيدا لسلاسل البوليمر المشترك وان هذه السلاسل بشكل لفائف مرنة. أظهرت النتائج ان الشد السطحي هواء/ سائل يتناقص مع ازدياد نسبة المحب للماء إلى غير المحب للماء في سلسلة البوليمر المشترك.

INTRODUCTION

Poly (ethylene glycol)s (PEG) are hydrophilic and water soluble, and their copolymers containing hydrophobic are amphiphilic block. These blocks have natural tendency to self-assemble into aggregates when dissolved in selective solvent (1,2). The hydrophobically modified water soluble polymers have attracted research interest in recent years due to their similarity to the biological system and to their strong self-organization in the solution caused by the combination of the hydrostatic of the hydrophilic and the hydrophobic part (3).

Studying the relation between surface adsorption characteristics and solution viscosity was observed that an increase in viscosity resulted a decreased surface pressure early in drop growth and also it was found that dynamic surface pressure correlated with solution viscosity and diffusion coefficient via Stokes-Einstein equation, so, the viscosity and surface tension are an important measurements performed in solution (4-6).

Amphiphilic copolymers such as poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers are versatile compounds whose hydrophile-hydrophobe balance can be tailored by changing the hydrophile [poly(ethylene oxide)] or the hydrophobe [poly(propylene oxide)] chains in the solvent and give rise to a very rich phase behavior. This capability of amphiphilic block copolymers to form superstructures of different topologies makes them useful in many applications such as colloidal stabilization, solubilization, controlled release, viscosifying, and enhance oil recovering (7,8).

The aim of this work is to prepare new hydrophobically modified monomethyl PEG(mPEG) of different hydrophilic mPEG chain length and constant hydrophobic length of 4-dodecylaniline to study their the intrinsic viscosity $[\eta]$, chain radius (R_v) and surface tension (γ) in tetrahydrofuran (THF) solutions at 25°C under the atmospheric pressure.

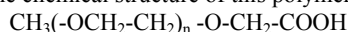
MATERIALS AND METHODS

Materials

mPEG of molecular mass 1100, 2000, and 5000 g/mol, 4-dodecylaniline, and thionylchloride 90% (Fluka), dimethylformamide DMF > 99%, monochloroacetic acid mCAA, triethyl amine (TEA), and tetrahydrofuran (THF) 99% (Aldrich), sodium metal (Lab. Grade). mPEGs were dried under vacuum. SOCl_2 was distilled, (THF) was distilled-filtered, and benzene was distilled before used. Other materials were used without further purification.

Preparation of carboxymethylated mPEG (mPEGcm):

The chemical structure of this polymer is:

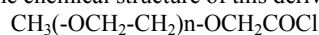


For fast and more accurate preparation, the procedure reported (9) was modified in this study. The procedure was carried out in a 250 ml two necked round bottom flask holds magnetic bar and fitted with reflux and thermometer. The required

amount of mPEG was mixed with dry benzene and introduced into the flask. The mixture was then stirred at 40°C until mPEG is completely dissolved and then cooled to room temperature $\sim 22^\circ\text{C}$. equivalent moles of small thin layered sodium metal was added gently to the solution mixture with continuous stirring at 22°C followed by the addition the equivalent moles of powdered mCAA through a wide necked flask and stirred under the reflux at 60°C for 6h. Then, the flask was cooled to room temperature and the mixture was filtrated through a sinter (G4) to remove the solid sodium chloride. The sinter was washed twice with benzene before being sucked dry, then the filtrate was rotary evaporated at 40°C using vacuumed oil pump. The prepared compound was dried under vacuum and then identify by FTIR and stored in dry place.

Preparation of mPEGcm-Cl

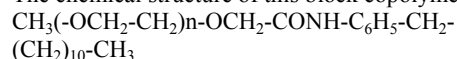
The chemical structure of this derivative is:



The apparatus used for this preparation was a 250 ml three necked round bottom flask holds magnetic stirrer, tap funnel, and condenser reflux the top of which connected to gas absorption device. The required amount of mPEG-cm was introduced into the flask with DMF as catalyst (10) and the entire apparatus was mounted at appropriate angle to prevent the condensate to run into the side arm, followed by gradually addition of 0.3 molar excess SOCl_2 with very slow mixing over 30 min. The stirred solution was left at 40°C (using a water bath) until no further evolution of gasses is observed. The excess of SOCl_2 was then rotary evaporated at 74°C and the produced derivative was dried under vacuum at 50°C for 1h and then identified by FTIR.

Preparation of mPEGcm-block-(4-dodecylaniline) copolymer (mPEGcm-b-4DDcAn):

The chemical structure of this block copolymer is:



Following the reported procedures (11,12) into a 250 ml two necked round bottom flask holds magnetic stirrer and fitted with thermometer and tap funnel, a 1:1 molar ratio of 4-dodecylaniline and TEA both dissolved in dry benzene were introduced and stirred at room temperature ($\sim 23^\circ\text{C}$) for 10 min. to mix well followed by a drop wise addition (for $\sim 2\text{h}$) for benzene solution contains the equivalent moles of mPEG-cm chloride, and the reaction mixture was then stirred for 10h at room temperature.

The solution mixture was filtrated to remove TEA-hydrochloride salt, and the filtrate was rotary evaporated at 40 °C to remove benzene. The produced compound was dried under vacuum at 50°C for 1h and then identified by FTIR.

Infrared Analysis

Each sample was dried and analyzed by Fourier Transfer Infrared Spectroscopy (FTIR) type Thermo Scientific Nicolet 380 at room temperature, and the spectra were recorded at the absorbance mode from 4000-400 cm^{-1} .

Intrinsic Viscosity [η] Measurement

Intrinsic viscosity of polymers in dilute solutions is a measure of their hydrodynamic average size from and shape in the solution, and it reflects the capability of the polymer in a solution to enhance the viscosity of the solution, also it is the specific viscosity (η_{sp}) to the concentration of the solute extrapolated to zero concentration (13,14).

A modified Desreux-Bischoff Capillary Viscometer mounted in a water bath maintained at 25 °C was used to measure the viscosities of the samples. This viscometer was chosen because it has low shear stress and negligible kinetic energy (15).

Each solution was prepared by dissolving the block-copolymer sample in THF. The flow times of eight concentrations (0.001-0.008)g/ml together with that of pure THF were measured using a stopwatch with a resolution time of 0.1 sec., and each measurement was repeated until consistency to within 0.2 sec.

Surface tension measurements

Dynamic Wilhelmy plate tensiometer DCAT 11 (Germany) was used to measure the surface tension (γ) of six concentrations (0.001-0.006)g/mol of block- copolymer THF solutions at 25 °C. The (γ) values were monitored during 24h (16).

RESULTS AND DISCUSSION

Preparations:

The complete conversion of mPEG to mPEGcm was proved by FTIR due to the appearance of a band at (1710 cm^{-1}) which assigned to stretching vibration of the (acid carboxyl C=O) and a broad stretching band at (3460-3230 cm^{-1}) which is attributed to the (acid carboxyl-OH).

The spectra of mPEGcm-Cl showed the disappearance of band at (3460-3230 cm^{-1}) which was attributed to the stretching of (carboxylic OH) and the appearance of bands at (1800 cm^{-1}) and (580 cm^{-1}) which attributed to the stretching vibration of (C=O) and the stretching vibration of (C-Cl) respectively, and that gave the evidence for the substitution of (OH) by (Cl).

The spectra of the block copolymers showed of bands at (3440 cm^{-1}), (1670 cm^{-1}), (1570 cm^{-1}), and (1550 cm^{-1}) which are attributed to the vibration of (-NH), amid I, amid II, and (C=C) aromatic respectively, and also the disappearance of the band at (580 cm^{-1}) which was attributed to (-Cl), all that confirmed the success of the amidation reaction and the synthesis of block copolymers. All the IR frequencies of the analyzed samples are listed in table (1).

Table (1):Infrared stretching vibration frequencies for mPEGcm, mPEGcm-Cl, and mPEGcm co polymers at 25°C

	Samples		
	mPEGcm	mPEGcm-Cl	mPEGcm-b-4DDcAn
ν O-H cm^{-1} (car.a.)	3460-3230	-	-
ν C=O cm^{-1} (car.a.)	1700	-	-
ν C=O cm^{-1} (acy.Cl)	-	1800	-
ν -Cl cm^{-1}	-	580	-
ν C=O cm^{-1} (ami)	-	-	1645
ν N-H cm^{-1}	-	-	3440
ν ami.I cm^{-1}	-	-	1670
ν ami.II cm^{-1}	-	-	1570
ν C=C cm^{-1} (arom.)	-	-	1550

Car.a.: carboxylic acid, acy.Cl: acyl chloride, ami.: amide, arom.: aromatic

Viscometric:

[η] was defined as the dilution limit of the specific viscosity (η_{sp}) over the concentration of the polymer (c) which the state of ideal dilute solution in which the conformational probability is at its maximum:

$$\lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/c) = [\eta] \quad \dots 1$$

$$\text{and } \eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad \dots 2$$

the relative viscosity (η_r) = $\eta / \eta_0 = t / t_0$

where η , η_0 , t , t_0 are the solution viscosity, solvent viscosity, solution flow time, and solvent flow time respectively (17).

The solvent used in the viscosity experiments was THF because it is a good solvent for both hydrophilic and hydrophobic parts of the copolymer chain, and the plot of (η_{sp}/c) against different concentration (0.001- 0.008) g/mol of block-copolymer in THF gave a straight line which extrapolated to zero concentration to obtain the [η] in ml/g (Table 2 and Figure 1). It was found that [η] increases as the molecular mass of the amphiphilic copolymer was increased and that could be due to the increase in the length of the hydrophilic part of the polymer chain and that could be increases the entanglements of the molecules, which increases that share rate, that leads to an increase in the viscosity of the solution (18).

The [η] for the three mPEGs of known molecular masses were obtained from their THF solutions by the same former steps. Log [η] of the three samples were plotted against their molecular masses to obtain (K) and (a) of the Mark- Houwing equation constants from the intercept ($K=0.032$ ml/g) and the slop ($a=0.72$) of the plotted straight line (19). The value of (a) was more than 0.5 and less than 0.8 indicated that THF is a good solvent for this polymer (20). and the following equation was used to calculate the viscosity molecular mass (Mv) of the block-copolymers:

$$[\eta] = 0.032 M_v^{0.72} \quad \dots 3$$

The calculated Mv values from equation (3) of the three prepared block-copolymers were not much lower than those mathematically calculated (Mt)

from their chemical formulas. Values of (Mv) and (Mt) are recorded in (Table 2).

The $[\eta]$ was used to calculate the radius (Rv) of the polymer chain in solution from the following equation (21):

$$\langle Rv \rangle = (3[\eta] Mv)^{1/3} (10 \pi N_A)^{-1/3} \dots 4$$

Where (NA) is the Avogadro number (6.02×10^{23}), and the (Mv) results are listed in (Table 2).

If we assumed that (Rv) is approximately equal to the radius of gyration (Rg), then the mean square end-to-end distance ($\langle h^2 \rangle$) of the block-copolymer chain can be calculated from the following equation (22):

$$\langle h^2 \rangle^{0.5} = (6^{0.5} Rv) / 0.665 \dots 5$$

The calculated results of $\langle h^2 \rangle$ (Table 2) showed that end-to-end chain distance is greater than the chain radius, gives an indication that copolymer chains are of extended coil conformation, that because chains tend to compact and that could be due to their inter hydrogen bonding between (H) of the amide group and the oxygen of PEG chain and THF molecules. That tendency increases with increasing the PEG chain length i.e increasing (Mv), while coil conformation could be due to the intra hydrogen bonding between (H) of the amide group with oxygen of PEG and to the size effect of the bulky phenyl groups (22,23).

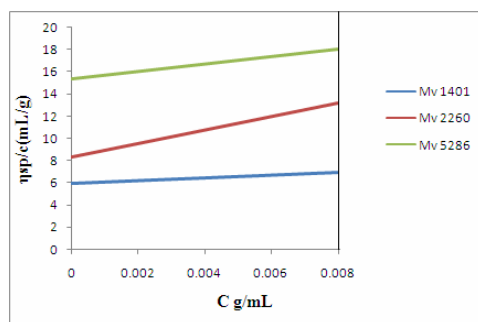


Figure (1): η_{sp}/C vs. concentrations of block-copolymers in THF at 25°C

Table (2): Values of $[\eta]$, Mv, Mt, Rv and $\langle h^2 \rangle$ values for amphiphilic block-copolymer mPEGMcm-b-4DDcAn

Sample No.	$[\eta]$ ml/g	Mv g/mol	Mt g/mol	Rv nm	$\langle h^2 \rangle$
1	5.90	1401	1431	1.09	16.12
2	8.32	2260	2331	1.44	28.13
3	15.34	5286	5331	2.34	74.29

Surface Tension

The molecules in the solution have a degree of attraction to each other, while the molecules at the air /solvent interface has a large attraction towards the liquid face than towards the air face, that leads to a net attractive force toward the bulk and the air / liquid will minimizing its area and contract (20).

The surface tension results which are listed in table (3) and figure (2) observed that (γ) was increased as the molecular mass of the block-copolymer was increase, but it was slightly decreased as the concentration of each block-copolymer was increased, that could be due to the different in

compatibility between THF molecules and each segment of the two different parts of the amphiphilic chain, and that gives an

information about their capability to dissolve in THF and this difference in solubility is due to the hydrophilic character of ethylene oxide chain, which increases its solubility in polar solvents such as THF and that leads to pointing the hydrophobic chain towards air causing a decrease in (γ), hence, the increase in the ethylene oxide due to the increase in the molecular mass of the block-copolymer increases the surface tension (13,24,25).

Table (3): Air / liquid (γ) of three different (Mv) of mPEGcm-b-4-DDcAn copolymers in THF solutions at 25°C

Conc. g/ml	Mv = 1401 g/mol	Mv = 2260 g/mol	Mv = 5286 g/mol
	(γ) mN/m	(γ) mN/m	(γ) mN/m
0.000	28.2	28.2	28.2
0.001	27.4	27.6	27.9
0.002	26.7	27.3	27.8
0.003	26.2	26.8	27.7
0.004	25.5	26.5	27.5
0.005	24.8	26.1	27.4
0.006	24.2	25.8	27.3

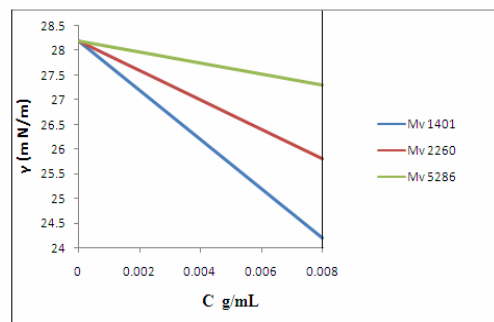


Figure (2): Surface tension vs. concentrations of block-copolymers in THF at 25°C

REFERENCES

- Booth C. and Attwood D. (2000). Effects of block architecture and composition on the association properties of poly(oxyethylene) copolymers in aqueous solution. *Macromol. Rapid. Commun.* 21:501-527.
- Mahaian S.; Renker S.; Simon P.; Gutmann J.; Jain A.; Gruner S.; Fetters L.; Coates G. and Wiesner U. (2003). Synthesis and characterization of amphiphilic Poly(ethylene oxide)-block-poly(hexyl methylacrylate) copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* 204:1047- 1055.
- Bellettini I.; Nandi L.; Eising R.; Domingos J.; Macha V. and Minatti E. (2012). Properties of aqueous solutions of hydrophobically modified polyethylene imines in absence and presence of sodium dodecylsulfate. *Macromol. Chem. Phys.* 370(1):94-191.
- Rushing T. and Hester R. (2003). Low-shear rate capillary viscometer for polymer solution intrinsic viscosity determination at varying temperatures. *Rev. Sci. Instrum.* 74:176- 181.
- Staggemeier B.; Collier T.; Prazen B. and Synovec R. (2005). Effect of solution viscosity on dynamic surface tension detection. *Analitica Chimica Acta.* 534(1):79-87.

6. Afantitis A.; Melagrak G.; Sarimvels H.; Koutetis P.; Markopoulos J. and Igglessi O. (2006). Prediction of intrinsic viscosity in polymer-solvents using aQSPR model. *Polymer*. 47(9):3240-3248.
7. Imae T. (2003). In *Structure-Performance Relationship in Surfactants*. Esumi K., Ueno M., Eds., Marcel Dekker, New York.
8. Rodriguez-Abreu C.; Sanchez-Dominguez M.; Sarac B.; Rogac M.; Shrestha R.; Shrestha L.; Varode D.; Gosh G. and Aswal V. (2010). Solution behavior of aqueous mixtures of low and high molecular weight hydrophobic amphiphiles. *Colloid Polym. Sci.* 288:739- 751.
9. Mukherjee G.; Shukla N.; Singh R. and Mathur G. (2004). Studies on the properties of carboxymethylated polyvinyl alcohol. *J. Sci. Indust. Res.* 63:596- 602.
10. Jonathn C. (2001). *Organic Chemistry*. Oxford University Press. Pp.276- 296.
11. Lin-Gibson S.; Bencherif S.; Cooper J.; Wetzel S.; An-Tonucci J.; Vogel B.; Horkay F. and Washburn N. (2004). Synthesis and characterization of PEG dim-Ethacrylates and their hydrogels. *Biomacromol.* 5:1280- 1287.
12. Naik M.; Kumar H. and Shubhavathi Y. (2011). Synthesis and antioxidant evaluation of novel 5-methoxy indole analogues. *Int. J. Current Pharm. Res.* 3(3):109- 113.
13. Adamson A. (1986). *A Text Book of physical Chmistry*. 3rd Ed. Academic Press, San Diego, CA.
14. Bohdanecky M. and Kavor J. (1986). *Viscosity of polymer Solutions*. Elsevier, New York.
15. Hamidi N. and Massoudi R. (2003). Treatment of intrinsic viscosity of poly(2,6-dimethylphenylmethacrylate). *Thermochimica Acta*. 398:27- 32.
16. Bolten D. and Turk M. (2011). Experimental study of the surface tension density, and viscosity of aqueous poly(vinylpyrrolidone) solution *J. Chem.. Eng. Data* 56:582-588.
17. Matsuoka S. and Cowman M. (2002). Equation of state for polymer solution. *Polymer*. 43:3447-3453.
18. Qi W. and Cui S. (2005). *Understanding the Physical Properties of Food Polysccarides*. Chapter 4; Taylor & Francis Group. LLC. Philadelphia, USA.
19. Brandrup J. and Immergut E. (1989). *Polymer Handbook*. John Wiley, New York.
20. Bicerano J.; Douglas J. and Brune D. (1999). Model for the viscosity of particle dispersions. *Macromol. Chem. Phys.* C39(4):561- 564.
21. Kharchenko S. and Kannan R. (2003). Role of architecture on the conformation, rheology, and orientation behavior of liner, star, and hyperbranched polymer melts. 1- Synthesis and molecular characterization. *Macromol.* 36:399-405.
22. Tanford C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. Wiley, New York.
23. Hezaveh S.; Samanta S.; Milano G. and Roccatano D. (2012). Molecular dynamics simulation study of solvent effect and dynamics of polypropylene oxide and polyethylene oxide in water and common organic solvents. *J. Chem. Phys.* 136:124901-124913.
24. Shaw D. (1980). *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. Butteruorth & Co., London.
25. Peesan M.; Sirivant A.; Suppaphol P. and Rujiravanti R. (2006). Dilute solution properties of hexanoyl Chitosan in chloroform, dichloromethane, and tetrahydrofurane. *Carbohydrate Polym.* 64:175-183.

Caries severity in relation to salivary vitamins (A, C and E) among blind children compared with normal children

Nada JMH. Radhi (1), Jinan M. Rashad (2) and Ali Y. Al-Rubaii (3)

(1) Dept. of Pediatric and Preventive dentistry/ College of Dentistry/ Baghdad University (2) Technical Medical Institute/ Foundation of Technical Education / Baghdad (3) Poison Center/ Surgical Specialty Hospital / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Oral health is an important aspect of health for all children, and is all the more important for children with special health needs. The oral health of children who are visually impaired can be disadvantaged. The aim of this study was to assess the caries severity and its correlation with salivary antioxidants (vitamin A, C and E) among blind and normal children.

The total sample consisted of 60 children (the study group was 30 blind children and the control group was 30 normal children). The age was 7-10 years old. dmfs, Dmfs indices by WHO (1997) were used and caries severity (d_{1-4s}) was assessed according to Muhlemann (1976). Stimulated whole saliva samples were collected and chemically analyzed by using colorimetric method to determine the salivary vitamins (A, C and E). All data were analyzed using SPSS version 18.

The results showed a lower mean value of dmfs among blind children in comparison to normal children with statistically highly significant difference ($P < 0.001$). According to grades of lesion severity, d_4 was significantly lower among blind children ($P < 0.001$). For permanent teeth, higher mean values of DS, MS, DMFS were noticed among blind children with highly significant difference ($P < 0.001$). Significantly higher mean values of all vitamins were recorded among study compared to control group ($P < 0.001$). Negative non significant correlations were found between D_1 , D_4 , dmfs and vitamin A, D_4 and vitamin C as well as E in study group.

The study found that the target group (visually impaired) tends to have a higher dental caries-experience and difficulty in accessing dental care. An oral preventive program is required for those children with special needs.

Key words: blind children, vitamin A, C, E, dental caries

المخلص باللغة العربية

صحة الفم تعكس الصحة العامة وهي ضرورة لكل الأطفال وخصوصاً ذوي الاحتياجات الخاصة وعدم العناية بصحة الفم تسبب الاذى لدى الأطفال فاقدى البصر . الهدف من هذه الدراسة هو لحساب شدة التسوس وعلاقته بالفيتامينات (أ، ج، هـ) في اللعاب لدى فاقدى البصر والأطفال الطبيعيين.

تكونت العينة من ستين طفل (مجموعة الدراسة متكونة من ثلاثين طفل فاقدى البصر والمجموعة الضابطة متكونة من ثلاثين طفل طبيعي) بعمر 7-10 سنوات. استخدم مؤشري (dmfs, Dmfs) وفق منظمة الصحة العالمية (1997) واحتسبت شدة تسوس الاسنان تبعاً لمuhlemann (1976). تم جمع عينات اللعاب المحفز وحللت كيميائياً باستخدام (colorimetric method) لتحديد الفيتامينات (أ، ج، هـ) في اللعاب. جميع البيانات حللت احصائياً باستخدام SPSS 18.

اشارت النتائج الى انخفاض في قيم متوسط تسوس الاسنان اللبينية لدى الأطفال فاقدى البصر مقارنة الى الأطفال الطبيعيين مع فرق معنوي عالي احصائياً ($P < 0.001$). تبعاً لاجزاء شدة التسوس سجل ارتفاع معنوي في (d_4) لدى فاقدى البصر. لوحظ ارتفاع في قيم متوسط تسوس الاسنان الدائمة لدى الأطفال فاقدى البصر مقارنة الى الأطفال الطبيعيين مع فرق معنوي عالي احصائياً ($P < 0.001$). سجلت فروق معنوية عالية لارتفاع قيم الفيتامينات لدى مجموعة الدراسة مقارنة الى المجموعة الضابطة ($P < 0.001$). وجدت ارتباطات غير معنوية سالبة بين اجزاء شدة تسوس الاسنان الدائمة واللبنية (D_1 , D_4 , dmfs) والفيتامين (أ)، و (D_4) مع فيتامين (ج) بالإضافة الى فيتامين (هـ) في مجموعة الدراسة. وجدت الدراسة ان المجموعة المستهدفة (فاقدى البصر) تميل الى ارتفاع في تسوس الاسنان وصعوبة العناية بالاسنان. يتطلب برنامج وقائي للعناية بصحة الفم لذوي الاحتياجات الخاصة من فاقدى البصر.

INTRODUCTION

Disability (Handicapped) is the loss or limitation of opportunities to take part in the normal life of the community on an equal level with others due to physical or social barriers (1). Visual impairment is a problem with one's ability to see and can range from low vision to total blindness (2). The causes of blindness include; ocular diseases and anomalies, injuries and accidents as well as systemic and general diseases. Vitamin A is essential for the buildup of the surface tissues in our body, including eye. Vitamin A deficiency may lead to corneal damage, ulceration and blindness, particularly in combination with measles or malnutrition (3,4).

People with visual impairment are at an increased risk of developing oral diseases, namely dental caries and periodontal disease (5,6). Limited Iraqi studies were conducted among blind individuals regarding dental caries in comparison to other types of disability (7) and normal children (8). The etiology and pathogenesis of dental caries are known to be multifactorial (9). The secretion rate and quality of saliva are important not only in caries development but also for remineralization (10). Saliva is vital to the integrity of the teeth as well as the soft tissues. It is not uncommon to observe patients presenting with loss of tooth structures due to dental caries or dental erosion. The most possible reasons for change in the oral balance that is favoring demineralization may be answered by measuring important salivary parameters (11). Studies showed controversial results concerning the relations between salivary vitamins and dental caries among different population (12-14). As far as, No researches were conducted to study the concentrations of salivary vitamins and their correlations with severity of dental caries in blind children, thus the present study was designed.

MATERIALS AND METHODS

The sample consisted of 60 children with age 7-10 years old. The study group was 30 blind children from institution for blindness disabled in Baghdad city and the control group was 30 children chosen randomly from primary school depending on lists of students in each class (15) matching with age and gender. DMFS, dmfs indices were used for diagnosis of dental caries of permanent and deciduous teeth respectively by using plane mirror and sickle-shaped dental explorer (16). Carious tooth was diagnosed according to criteria suggested by Muhlemann (17), this allowed recording decayed lesion of primary teeth by severity ($d_{1-4}mfs$).

Each child was asked to chew a piece of Arabic gum (0.5-0.7gm) for ten minutes until the whole stimulated saliva was collected in a sterile capped bottle using a standardized method (18). Salivary vitamin E (mg/dl) was determined by using a colorimetric method. This method depends on Emmerie-Engel reaction (oxidation-reduction reaction) (19). Level of vitamin C (mg/dl) in saliva was determined photometrically with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) to form red bis-hydrazone (20). The optical density differences between irradiated and non-irradiated saliva extracts can therefore be used to estimate vitamin A concentration in saliva (21).

SPSS version 18 was used for statistical analyses. The variables were described by mean and SD and the parametric statistical tests of significance were used. The independent samples t-test was used to test the statistical significance of difference in mean between groups of this study. The confidence limit was accepted at 95%. The linear correlation between two quantitative variables is measured by Spearman's rank linear correlation coefficient, while multiple linear regressions were used to assess independent effect of variables on dependent quantitative variable.

RESULTS

The distribution of total sample by gender among study and control groups is seen in table (1).

Table (1): The Distribution of Total Sample by gender

Study Group						Control Group					
Male			Female			Male			Female		
N	%		N	%		N	%		N	%	
1	56.		1	43.		1	56.		1	43.	
7	67		3	33		7	67		3	33	

The caries-experience (dmfs) of primary teeth among study and control groups is demonstrated in Table (2). A higher mean value of decayed surface (ds) was found among control compared to study group with statistically highly significant difference ($t=3.974$, $df=58$, $P<0.0001$). Although a higher mean value of missing surface (ms) and filling surface (fs) were noticed among control group, no statistically significant differences were recorded between two groups ($P>0.05$). A lower mean value of dmfs was noticed among study in comparison to control group with statistically highly significant difference ($t=3.646$, $df=58$, $P<0.001$).

Table (2): Caries – Experience (dmfs) of Primary Teeth among Study and Control Groups

Groups	ds	ms	fs	dmfs
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Study	3.50 \pm 3.54	1.33 \pm 3.19	0.00 \pm 0.00	4.83 \pm 4.11
Control	7.76 \pm 4.95	2.16 \pm 4.08	0.13 \pm 0.57	10.05 \pm 6.70

Table (3) illustrates the grades of caries severity for primary teeth among study and control groups. A higher mean values of d_1 , d_2 , d_3 were reported among study group in comparison to control group with no statistically significant differences ($P>0.05$), while a highly significant difference was noticed regarding d_4 as a higher mean value was found among control group ($t=5.480$, $df=58$, $P<0.001$).

Table (3): Decayed Surfaces of Primary Teeth by Grades of Lesion Severity (d₁₋₄) of Study and Control Groups

Groups	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Study	0.03±0.18	0.57±1.13	1.30±1.91	1.60±2.63
Control	0.00±0.00	0.20±0.61	0.86±1.45	6.70±4.36

Table (4) shows the caries-experience (DMFS) of permanent teeth among study and control groups. A higher mean value of (DS, MS, DMFS) were found among study group compared to control group with statistically highly significant difference (DS: $t = 2.904$, $df = 58$, $P < 0.001$; DMFS: $t = 2.813$, $df = 58$, $P < 0.001$). A higher mean value of (FS) was noticed among control group in comparison to study group with no statistical significant difference ($P > 0.05$).

Table (4): Caries – Experience (DMFS) of Permanent Teeth among Study and Control Groups

Groups	DS	MS	FS	DMFS
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Study	2.02±1.71	0.66±1.72	0.00±0.00	2.68±2.42
Control	0.93±1.17	0.16±0.91	0.06±0.36	1.15±1.74

Table (5) represents the grades of caries severity for permanent teeth among study and control groups. Higher mean values of all grades of lesion severity were reported among study group in comparison to control group with no statistically significant differences ($P > 0.05$).

Table (5): Decayed Surfaces of Permanent Teeth by Grades of Lesion Severity (D₁₋₄) of Study and Control Groups

Groups	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Study	0.43±0.77	0.63±1.40	0.63±1.09	0.33±0.60
Control	0.11±0.40	0.46±0.86	0.23±1.09	0.13±0.43

Table (6) illustrates the mean values of salivary vitamins (A, C and E) among study and control groups. A higher mean values of all salivary vitamins were reported among study in comparison to control group with statistically highly significant differences regarding vitamins C and E (vitamin C: $t = 2.937$, $df = 58$, $P < 0.001$; vitamin E: $t = 3.165$, $df = 58$, $P < 0.001$).

Table (6): Mean Values of Salivary Vitamins (mg/dl) among Study and Control Groups

Groups	Vitamin A	Vitamin C	Vitamin E
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Study	0.041±0.030	0.098±0.024	0.065±0.016
Control	0.031±0.010	0.083±0.013	0.052±0.015

Table (7) illustrates the correlation coefficient between caries-experience (ds, dmfs, DS, DMFS) of primary and permanent teeth (respectively) and salivary vitamins in both groups. In study group, only a weak negative non significant correlation was reported regarding vitamin A with dmfs. While other vitamins

recorded a negative correlation with all parts of caries-experience but with no significances.

In control group, the direction of correlations in positive and negative ways, only a significant correlation was found between vitamin C and dmfs in negative direction.

Table (7): Correlation Coefficient between Caries – Experience (ds, dmfs, DS, DMFS) of Primary and Permanent Teeth (Respectively) and Salivary Vitamins (mg/dl) in Study and Control Groups

Group	variable	ds		dmfs		DS		DMFS	
		r	P	r	P	r	P	r	P
Study	Vitamin A	0.03	0.87	-0.02	0.90	0.20	0.27	0.08	0.63
	Vitamin C	-0.15	0.41	-0.17	0.36	-0.12	0.52	-0.02	0.87
	Vitamin E	-0.01	0.94	-0.22	0.23	-0.11	0.55	-0.09	0.62
Control	Vitamin A	-0.06	0.74	-0.02	0.89	0.04	0.80	0.29	0.11
	Vitamin C	0.37	0.04	-0.51	0.004*	-0.37	0.84	0.06	0.57
	Vitamin E	-0.19	0.30	-0.15	0.40	0.06	0.57	0.14	0.43

* Significant

Table (8) illustrates the correlation coefficient between grades of caries severity of primary teeth and salivary vitamins in study and control groups. In study group, only a strong positive highly significant correlation was recorded between d₂ and vitamin A while other correlations were no significant. Among control group a weak negative significant correlations were recorded between d₂ and vitamin A as well as d₄ and vitamin C.

Table (8): Correlation Coefficient between Caries – Experience (Grades of Caries Severity) of Primary Teeth and Salivary Vitamins (mg/dl) in study and Control Groups

Group	Variable	d ₁		d ₂		d ₃		d ₄	
		r	P	r	P	r	P	r	P
Study	Vitamin A	0.22	0.90	0.62	0.000**	-0.13	0.47	-0.13	0.49
	Vitamin C	0.07	0.70	0.12	0.51	-0.08	0.67	-0.20	0.27
	Vitamin E	-0.18	0.32	-0.33	0.06	0.17	0.36	0.01	0.94
Control	Vitamin A	---	---	-0.38	0.03*	-0.20	0.26	0.05	0.67
	Vitamin C	---	---	-0.29	0.87	-0.10	0.59	-0.36	0.04*
	Vitamin E	---	---	-0.07	0.68	-0.07	0.68	-0.14	0.44

* Significant, ** Highly Significant

Table (9) demonstrates the correlation coefficient between grades of caries severity of permanent teeth and salivary vitamins in study and control groups. In study group a weak negative correlation was recorded between vitamin A and D₁, D₄ in addition to vitamin C and E with D₄. While in control group, negative correlations were noticed for vitamins A with D₂ and vitamins C, E with D₃.

Table (9): Correlation Coefficient between Caries – Experience (Grades of Caries Severity) of Permanent Teeth and Salivary Vitamins (mg/dl) in study and Control Groups

Group	Variable	d ₁		d ₂		d ₃		d ₄	
		r	P	r	P	r	P	r	P
Study	Vitamin A	-0.08	0.66	0.40	0.28	-0.06	0.72	-0.11	0.53
	Vitamin C	0.13	0.49	0.02	0.88	0.25	0.17	-0.11	0.54
	Vitamin E	0.12	0.50	-0.20	0.27	0.03	0.85	-0.06	0.72
Control	Vitamin A	0.07	0.69	-0.13	0.46	0.18	0.33	0.11	0.53
	Vitamin C	0.06	0.71	0.01	0.97	-0.15	0.40	0.004	0.98
	Vitamin E	0.02	0.18	0.11	0.54	-0.09	0.60	-0.18	0.33

Table (10) demonstrates the multiple linear regressions of dmfs with salivary vitamins. All vitamins were negatively associated and only significances were achieved with C and E. The model was statistically significant and being able to explain 26% of observed variation in the outcome variable (dmfs).

Table (10): Multiple Linear Regressions of dmfs with Salivary Vitamins

Variables	Partial Regression Coefficient	Standardized Coefficient	P-Value
Vitamin A	-22.997	-0.086	0.465
Vitamin C	-113.439	-0.396	0.001**
Vitamin E	-101.476	-0.287	0.018*

$P(\text{model}) < 0.001$ $R^2 = 0.26$ *Significant, **Highly significant

Table (11) illustrates the multiple linear regressions of DMFS with salivary vitamins. All vitamins were positively associated and the model was statistically not significant and explains 5% of variation.

Table (11): Multiple Linear Regressions of DMFS with Salivary Vitamines

Variables	Partial Regression Coefficient	Standardized Coefficient	P-Value
Vitamin A	18.064	0.185	0.170
Vitamin C	6.394	0.061	0.644
Vitamin E	10.126	0.078	0.561

$P(\text{model}) = 0.42$ $R^2 = 0.05$

DISCUSSION

In disabled individuals, the process of developing oral disease does not differ from non-disabled individuals. There are no differences in prevention of the disease and the treatment modalities between these groups⁽²²⁾. In this study a lower mean value of dmfs of primary teeth was found among blind children while it was significantly higher for permanent teeth than in normal children. The same findings were recorded by previous studies (7, 8, 22-24). Children with disabilities appear to have poorer oral health than their non-disabled counterparts. Variable access to dental care, inadequate oral hygiene (they are often unable to adequately apply the techniques necessary to control plaque) (25) and disability-related factors may account for differences. Vitamin A deficiency which was reported to be the causative factor of blindness in visually impaired children (3,4, 26, 27) and also affected the ameloblastic activity cause enamel defect so the defective teeth were found to be more susceptible to dental caries (28). This may also explain the increasing severity of dental caries in permanent dentition of visually impaired children than primary teeth. Further studies are needed to reveal the defective enamel teeth among blind children.

In the present study, the initial caries of both primary and permanent teeth (d_1 , d_2 , d_3 ; D_1 , D_2 , D_3) respectively were higher among study than control group and this may be related to the chemical composition of teeth.

The present study revealed higher mean values of salivary vitamins (A, C, E) among blind children in comparison to control group with significance regarding vitamins (C, E). No study found among blind children to compare with. This may be attributed to institutional residency that informed children to consume more antioxidants in their diet. Since saliva provides a general protective effect, clinically significant decrease in salivary functions can be considered as an etiologic factor that contributes to the development of dental caries. Salivary antioxidant system serves as an important ingredient in building resistance and might reduce the susceptibility to dental caries because of its free radical scavenging action (29). This may explain the negative correlation between salivary vitamins and caries of primary and permanent teeth. Other Iraqi studies reported the same results among normal people (12-14). These vitamins were found adversely affect the oxidative carbohydrate metabolism within the plaque and this would affect the oxidation-reduction balance within the cell of microorganism thereby affecting bacteria metabolism and energy generation leading to cell death (30). In this study, a positive significant correlation was noticed between d_2 and vitamin A in study group, this may be relating to the protective role of this vitamin against oxidative stress (31).

Evaluating the causative factors in saliva of individual's at risk to dental caries can pay the way to make recommendations that will cater specifically to individual's needs. Many benefits exist for both patients and dentist by introducing saliva testing as part of practice philosophy. The practice can benefit from enhanced diagnostics, early detection of problems, improved patient communication and motivation and an increased dental awareness for patients (32). In conclusion, this study showed that children with impaired vision were found with higher caries-experience. More awareness of the dental care needs of these children is necessary. Health care providers must have unique communication skill to deal with these special needs of visually impaired children.

REFERENCES

1. Peter S. (2008). Essentials of preventive and community dentistry. 3rd Ed. New Delhi.
2. Zainal M.; Ismail SM. and Ropilah AR. (2002). Prevalence of blindness and low vision in Malaysian population: results from the National Eye Survey 1996. Br. J. Ophthalmol. 86:951-956.
3. Whitcher JP.; Srinivasan M. and Upadhyay MP. (2001). Corneal blindness: a global perspective. Bull WHO. 79:214-221.
4. Villamor E. and Fawzi W. (2005). Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. Clin. Microbiol. Rev. 18(3):446-464.
5. Ahmad MS.; Jindal M.; Khan S. and Hashmi S. (2009). Oral health knowledge, practice, oral hygiene status and dental caries prevalence among visually

- impaired students in residential institute of Aligarh. *J. Dent. Oral Hyg.* 1(2):022-026.
6. Dom T.; Omar R.; Malik N.; Saiman K. and Rahmat N. (2010). Self-Reported Oral Hygiene Practices and periodontal status of visually impaired adults. *Global J. Health Sci.* 2(2):184-191.
 7. Diab BS. (1995). Oral health status and treatment needs among group of handicapped children and adolescents in Baghdad-Iraq. Master Thesis, College of Dentistry, University of Baghdad.
 8. Al-Alousi J. (2009). Oral health status and treatment needs among blind children in Iraq. *MDJ.* 6(4):313-324.
 9. Lenander-Lumikari M. and Loimaranta V. (2000). Saliva and Dental Caries. *Adv. Dent. Res.* 14:40-47.
 10. Hicks J.; Garcia-Godoy F. and Flaitz C. (2003). Biological factors in dental caries: Role of Saliva and dental Plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J. Clin. Pediatr. Dent.* 28:47-52.
 11. Gopinath V. and Arzreanne A. (2006). Saliva as a Diagnostic Tool for Assessment of Dental Caries. *Archives of Orofac. Sci.* 1:57-59.
 12. Yas B. (2009). Salivary antioxidants and physicochemical characteristics related to oral health status among a group of old adults. PhD. Thesis, College of Dentistry, University of Baghdad.
 13. Kanan B. (2011) Oral health condition and salivary lipid soluble vitamins among group of women aged 30-39 years with breast cancer. Ms.C. Thesis, College of Dentistry, University of Baghdad.
 14. Radhi N. (2012). Salivary vitamins and total proteins, in relation to caries-experience and gingival health, according to nutritional status of a group of five-year old children. *J. Baghdad College Dent.* 24(3):129-136.
 15. Yammane T. (1973). Statistic and introductory analysis. 3rd Ed. Harper International Edition, Tokyo. Pp: 677-759.
 16. WHO. (1997). Oral health surveys basic methods 4th ed. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
 17. Muhlemann HR. (1976). Oral epidemiology-caries. In: Introduction to oral preventive medicine. Buch-und Zeitschriften- Verlag, Die Quintessenze (Translated in English).
 18. Tenovuo J. and Lagerlöf F. (1996). Saliva In: Textbook of clinical cariology ed. By Thylstrup A and Fejerskov O. 2nd Ed. Munksgaard, Copenhagen, Denmark. Pp:17-44.
 19. Varley H. (1967). Practical clinical biochemistry. 4th ed. The white friars press limited. London and Tonbridge, Great Britain.
 20. Colowick SP. and Kaplan NO. (1979). Methods in enzymology. Vol. 62, part D, Academic press, USA, 7.
 21. Wooton ID. (1974). Microanalysis in medical biochemistry. 5th Ed; Churchill living stone, Edinburgh & London.
 22. Mouradian WE. (2001). The face of a child: Children's oral health and dental education. *J. Dent. Edu.* 65:821-310.
 23. Prashanth ST.; Bhatnagar S.; Das UM. and Gopu H. (2011). Oral health knowledge, practice, oral hygiene status, and dental caries prevalence among visually impaired children in Bangalore. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 29(2):102-105.
 24. Reddy K. and Sharma A. (2011). Prevalence of oral health status in visually impaired children. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 29(1):25-27.
 26. Shetty V.; Hegde AM.; Bhandary S. and Rai K. (2010). Oral health status of the visually impaired individuals—a south Indian study. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 34(3):213-216.
 27. Ajaiyeoba AI.; Isawumi MA.; Adeoye AO. and Oluley TS. (2005). Prevalence and causes of blindness and visual impairment among school children in south-western Nigeria. *Int. Ophthalmol.* 26:121-125.(IVSL)
 28. Ajaiyeoba AI.; Isawumi MA.; Adeoye AO.; Oluley TS. and Tunji S. (2007). Pattern of eye diseases and visual impairment among students in south-western Nigeria. *Int. Ophthalmol.* 27:287-292.(IVSL)
 29. Jalevik B.; Klingberg G.; Barregard L. and Noren JG. (2001). The prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Acta. Odont. Scand.* 59:255-260.
 30. Simonoff M.; Sergeang C.; Gamier N.; Moretto P.; Vlabador Y.; Simonoff G. and Conri C. (1992). Antioxidant status (selenium), vitamins A and E and aging. *EXE.* 62:368-397.
 31. Marques RE. (1995). Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15(3):198-207.
 32. Herbert V. (1996). Prooxidant effects of antioxidant vitamins. *J. Nutr.* 126:197S-200S.

Vehicle Speed Control Using Special Brake System

Salameh A. Sawalha (1) , Jawdat A. Al-Jarrah (1), Abdul – Rahman Bin Ali Malawi (2) and Talal M. Abu-Mansour (3)

(1) Dept. of Mechanical engineering / Faculty of Engineering / Northern Border University/ Arar- KSA

(2) Astronomical Radio Dept. / Faculty of Astronomy / King Abdul Aziz University/ Jeddah- KSA (3)

Faculty of Engineering / King Abdul Aziz University/ Jeddah- KSA

ABSTRACT

The growing number of the traffic accidents in the last decade is considered the most common problems in the world. Traffic accidents lead to more death and money losses. According to the world health organization (WHO), annually about one million people killed, and thirty eight million people injured (five million of them are risky injuries). Exceeding the speed limit is the main reason of traffic accident as reported by different traffic departments around world. According to the statistical reports of Saudi traffic department, 46% of accidents are due to higher speed.

This paper aims to provide vehicles with a system that controls the vehicle speed, based on a special braking system. When the vehicle enters a specific street, its speed directly compared with the allowable speed of the street using GPS. If the vehicle speeds more than allowable, a signal send to the control unit, and brake will be applied to control the speed within the allowable limit.

A simulation for the car speed controller using Proteus software has been done. Experiments that have been conducted in laboratories and workshops of Faculty of Engineering – Northern Border University, show that the stepper motor can provide steps proportional to the braking force needed to run the special braking system.

Key words: Electronic Brake Pedal, Vehicle Speed, Digital retarders, Speed Control, Virtual humps

المخلص باللغة العربية

الازدياد المضطرد في عدد الحوادث المرورية جعل منها معضلة في مختلف دول العالم بغض النظر عن تقدمها، لما قد ينتج عنها من خسائر في الأرواح وأضرار في الممتلكات، واستناداً لمنظمة الصحة العالمية، تحصد الحوادث المرورية أرواح أكثر من مليون شخص سنوياً، وتصيب ثمانية وثلاثون مليون آخرين (خمسة ملايين منهم إصابات خطيرة).

وتشير تقارير المرور إلى أن السبب الرئيس لارتفاع عدد الحوادث هو تجاوز السرعة المحددة. وحسب التقارير الإحصائية لدائرة المرور السعودية فإن 46 % من الحوادث سببها القيادة بسرعات كبيرة.

في هذا البحث تم تصميم وتشغيل نظام للتحكم بالسرعة قسراً باستخدام نظام فرملة خاص، يعمل تلقائياً عند تلقي إشارة من جهاز النظام العالمي لتحديد الموقع (GPS)، لتحديد اسم الشارع وبالتالي السرعة المسموح بها هناك. تصل إشارة إلى وحدة المعالجة لتقوم بدورها بحساب مقدار الكبح اللازم وإرسال ذلك إلى نظام الفرمل الخاص.

تم إجراء محاكاة للنظام باستخدام برنامج بروتوس، وقد بينت التجارب التي أجريت في مختبرات ومشاعل كلية الهندسة – جامعة الحدود الشمالية، أن محرك الخطوة يمكن أن يؤمن عدد خطوات تتناسب و قوة الكبح اللازمة لعمل نظام الفرامل الخاص، بما يضمن تخفيض السرعة إلى الحد المطلوب.

INTRODUCTION

The economic cost of road crashes and injuries is estimated to be 1% of Gross National Product (GNP) in low-income countries, 1.5% in middle-income countries and 2% in high income countries (1). The global cost is estimated to be US\$ 518 billion per year. Low- income and middle income countries account for US\$ 65 billion more than they receive in over all development assistance (1).

In the Gulf countries, specifically in Saudi Arabia, the traffic statistics refer to the high number of accidents every year. More than 484805 accidents happened in 2009, and it raised the number of death and injuries (more than six thousands deaths and about 40 thousand injuries, 50% of them are permanently disabled) (1, 2).

The situation became worse in 2012. The number of accidents reached to 544179 (the estimated cost of crashes is excess of \$3.47 Billion), resulted in sixty eight thousand injured, and more than seven thousands deaths (about twenty deaths per day), which is the highest all over the world (3).

The competent authorities of traffic in all countries, including Saudi Arabia are doing everything in their power to prevent and avoid the traffic accidents, through traffic awareness, legislation and laws, traffic rules and regulations, improvement of roads, traffic services, and the imposition of fines and penalties.

According to the statistical reports of Saudi traffic department, three main factors share in the accident: the driver, the vehicle, and the road, 80% is due to the driver of the vehicle.

Analysis of traffic reports indicates that the main reason of high number of accidents (46% and more) attributed to the driving exceeding the limited speed (2,3).

Mohammed A.Khasawneh *et al.*, suggested a novel approach, relying on intelligent engineering, whereby the maximum speed limit at which vehicles on the road can cruise is controlled from some central or distributed facility (CCF). This approach would decline the rates of speed-related traffic accidents by approximately 65–70% according to existing statistics, as mentioned in this paper (3).

Figure (1) shows the number of reported accidents as a function of posted speed limit (km/h). Note that accident rates increased in zones where the posted speed limits were in the lower speed limit ranges (30–60 km/h) (4-6).

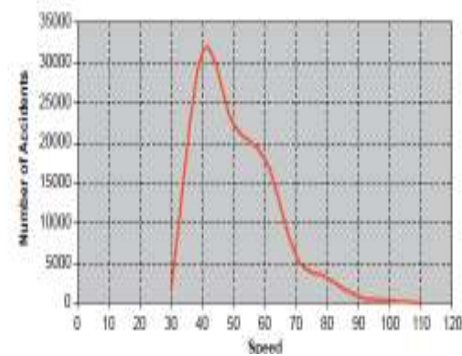


Figure (1): Number of accidents vs. posted speed-limit

Malkawi *et al.*, proposed a mechanism to control the maximum speed limit of a vehicle in a dynamic manner. The widespread use of wireless technology enables the implementation of such a control mechanism (7).

In the recent years, it was noted the growing of the safety devices and specifically related to speed in order to maintain the integrity of the citizen and the national wealth.

Speed humps prevent drivers to drive in a higher speed in specific locations like, building parks and service stations. These humps made in different shapes, sizes, and colors (8).

According to Bowie (9), it was reported that data analysis about the dangers of high speed driving, showed the following main conclusions:

- More than half of fatal accidents have occurred at a speed greater than 55 Km / h.
- An increase equivalent to each 5 Km / h above the speed limit doubled the probability of danger.
- Driving the vehicle at 65 Km / h doubled the risk, and at 70 Km / h, the risk increased four times.

In the same context, the Swiss Nelson draws a conclusion, which is the relationship between speed and fatal collisions. Decrease speeding 3%, reduced the probability of danger at rate 12% (10).

Speed is cited as a related factor in 30% of fatal crashes and 12% of all crashes in the USA (11).

In U.S.A. found that, nearly 50% of drivers believe speeding is a problem on U.S roads, and that the rate of fatal accidents increases 15%, with increased speed at a rate of 1 km/h (12).

In Saudi Arabia, in order to achieve better standards of road traffic safety stakeholders began to pass through the use of latest technologies (Saher System), to control and manage traffic automatically using electronic systems covering major cities in the Kingdom, which is connected with the National Information Center of the Interior Ministry (13).

Ouassila Labbani *et al.*, study the application of a safe design methodology in the case of an automotive system. This methodology is based on a clear separation between control and data parts. It allows to facilitate the specification and to have a better readability (14).

Speed limit management, control and enforcement continue to be a major concern for the safety of

human lives around the globe. Without appropriate action by 2020, road traffic injuries are predicted to be the third leading contributor to the global burden of disease and injury; whereas war related injuries will rank number nine (7).

Lloyd Taylor and Wilhelm Göllner discussed impractically the usage of a hydraulic valve and a hydraulic pump to increase braking energy through a digital electronic circuit. They mentioned: "A vehicle having a hydrostatic drive and a hydraulic control apparatus, in which the hydrostatic drive has a variable displacement hydraulic pump and a hydraulic motor in a closed circuit, an internal combustion engine for driving the hydraulic pump and a variable displacement pump, producing a volumetric output flow, of an open circuit, and a retarder valve arranged in the open circuit and intended for the hydraulic absorption of braking energy (15).

Dipaola *et al* had designed a pre- programmed digital computer installed in the car, which controls the speed. They argued: The control system includes a digital computer, which is programmed to compute a braking pattern for each car or cut of cars which is to pass through the retarder. Taking into account the characteristics of the cut and its velocity in entering the retarder, the computer determines a braking pattern, which will slow the cut of cars down to the desired exit velocity so that the cut will traverse the remaining portion of the classification yard and couple to the preceding cars without excessive speed (16).

METHODOLOGY AND APPLICATIONS

Reducing the vehicle speed can be achieved by controlling the fuel amount entering the engine (through: injection system, throttle valve position, and fuel pump), or by converting the electrical signals to mechanical movements for applying the brake pedal.

The total time needed to stop the vehicle(t_s) consists of many periods such as time of driver reaction(t_r), time of system drive operation(t_{dr}), time for deceleration increase(t_{in}), and time of the braking operation itself(t_{br}), these periods are shown in figure (2).

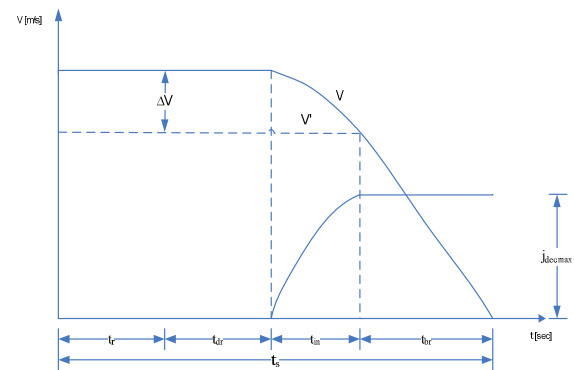


Figure (2): The theoretical relationship between velocity, maximum deceleration vs. time

But in reality, the process of braking may need more time, than the theoretical value. The relationship between the vehicle speed, maximum deceleration and the stopping time is shown in the figure (3), where a comparison between the normal theoretical relationship and the actual relationship using digital retarder .

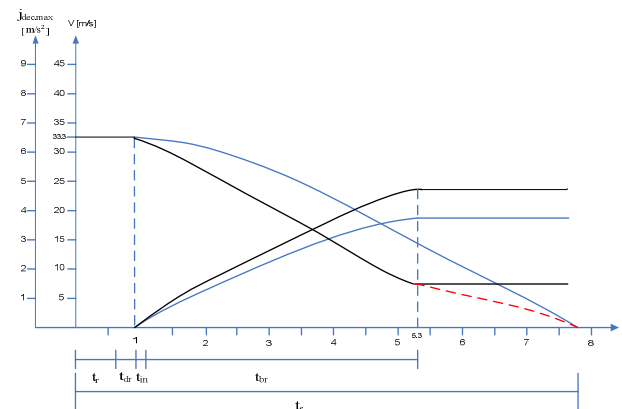


Figure (3): The actual and theoretical relationship between velocity, maximum deceleration verses time

Controlling vehicle speed is not a simple issue, and it is illogically to put a watching camera, traffic man or radar in every street or intersection in the country. In this paper, the braking process will become more efficient because it depends on the transmission of electrical signals and data. That transmission eliminates the involvement of human factor, which in turn terminates the reaction time from the upper mentioned formula; therefore, the whole braking process will not take more than milliseconds to be completed.

System Overview

This system is a design for controlling vehicle's speed when it exceeds the speed limit. The system keeps functioning until it brings the vehicle back to

the borders of the legal speed limits without human intervention.

The system consists of the following parts: GPS (Global Positioning System), PIC (Programmable Integrated Circuit) microcontroller, Stepper motor, N.C (Normally closed) relay Buzzer and its drive circuit, and Peripherals (capacitors, resistances, Crystal oscillator) figure (4).

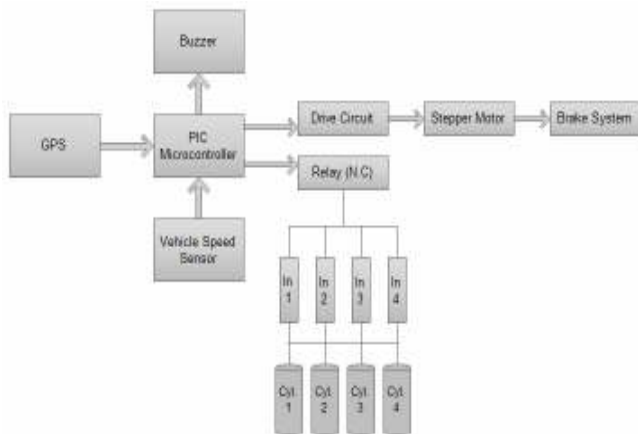


Figure (4): System functional diagram

When the vehicle enters a street with a speed limit of (60Km/hr), the process of determining the street and its speed limit is possible in two ways; either by locating the street through its longitude and altitude or through some other virtual data (virtual humps). GPS receiver provides the location (longitude and latitude) of it and sends a signal to PIC microcontroller (or the GPS in the circuit always monitors the speed of the vehicle at all times and during that it reads the position of the vehicle too. When it does read a digital retarder location which is already programmed in the GPS device).

The speeds of each street are stored in the microcontroller as a database, so it determines the street speed and analyzes data to match it. The speed sensor measures vehicle speed and sends it to the microcontroller to deal with it. For example; if the vehicle speed is 90 KM/hr, the control unit compares actual speed with speed limit stored in it. If the actual speed is greater than speed limit, the injectors will stop the fuel injection through the N.C relay, and the control unit immediately sends a digital signal to a stepper motor, which is connected to the brake system. The digital signal moves the stepper motor through certain number of steps, which are determined by calculating the necessary braking value to reduce the vehicle's speed to the required extent.

Once the system starts functioning, the buzzer gives a sound as a notice to the beginning of that function. On the other hand, if the speed of a vehicle was less than or equal to the speed limit the vehicle's speed remains as it is. Figure (5) shows the system flow chart.

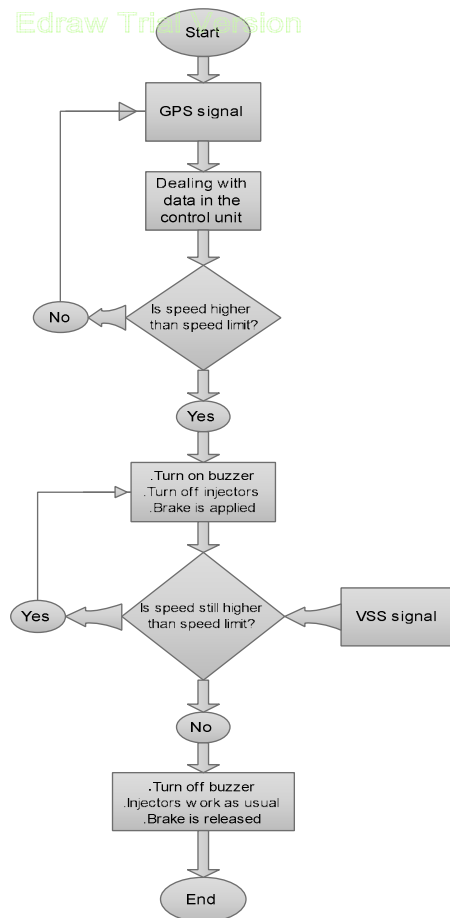


Figure (5): System flow chart

The circuit diagram of system shown in figure (6). It is consisting of many hardware parts: GPS (Global Positioning System) receiver, PIC Microcontroller (PIC 16f877a), Bipolar Stepper Motor, Drive Circuit (ULN2803), Transistors (NPN), Buzzer, Normally Closed Relay, Capacitors (22MF), Resistors (1K, 10K), Crystal Oscillator (4MH), 5 volt Power supply, and 12 volt Power supply.

The GPS is designed to run on 12v vehicle power, which is actually around 13.8v. The drive circuit is an electrical circuit or other electronic component used to control another circuit or other component, such as a high-power transistor.

The drive circuit is usually used to regulate current flowing through a circuit or is used to control the other factors such as other components and some devices in the circuit. It is connected to the stepper motor which is connected to the brake lever. The brake lever is responsible for braking process in the vehicle.

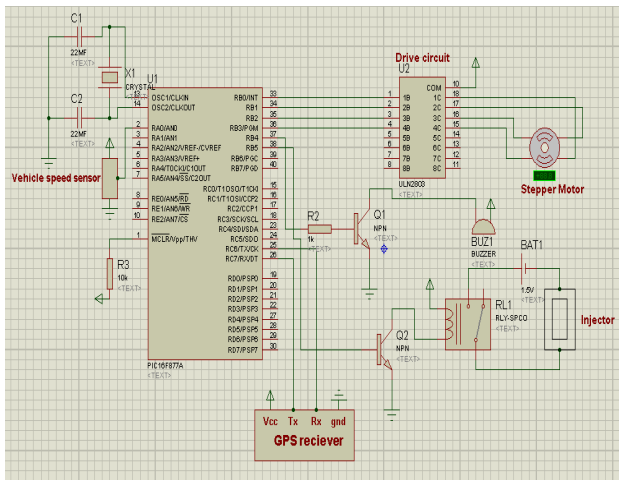


Figure (6): The circuit diagram of the Control system

Connecting Stepper Motor

The stepper motor is the main controller in the breaking system. When the stepper motor operated, it moves 360 steps to either clockwise or counter-clockwise depending on its programming, which varies according to the required application. A reel is connected to the stepper motor and to the break lever by a chain. When the stepper motor moves the chain rotates around the reel. Then the chain pulls the break lever which in turn acts as if been pressed on (figure 7).

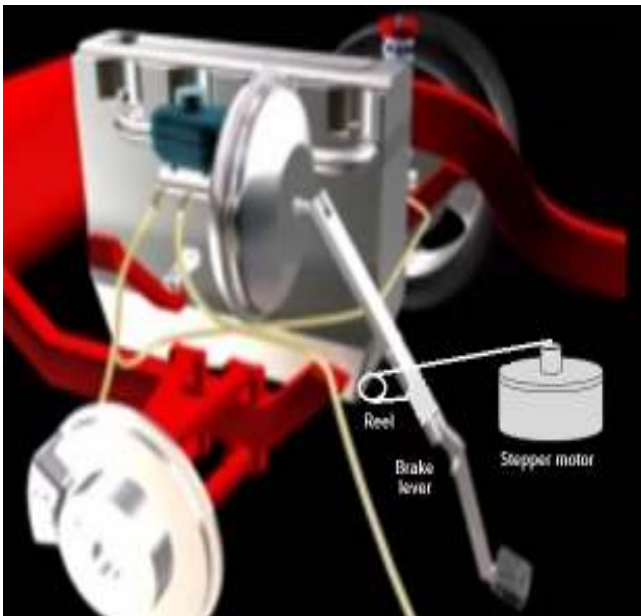


Figure (7): The developed brake system

Calculation

The value of braking is determined upon the moves of the stepper motor (figure 8). Therefore, for every increasing in the steps a simultaneous increasing in the braking value occur. In other words, for every increasing over the allowed speed limit the stepper's movement increases. For example, if the speed limit is 60 and the actual speed of the vehicle is 70 then stepper has to move 30 steps to insure the required braking value, further, if the actual speed is 80 the stepper has to move 60 steps, and so on. That results in 3 movements of the stepper for every one kilometer over the speed limit. However, this is applicable only on big steppers. Smaller steppers on the other hand might need to move more step to insure the required results.

Table (1) shows the steps which stepper motor should move as one as receiving signal from the control unit.



Figure (8): The prototype of the system

Table (1): Steps of stepper motor

No. of Steps	Actual Speed
30	(60-70)Km/hr
60	(70-80)Km/hr
90	(80-90)Km/hr
120	(90-100)Km/hr
.	.
.	.
.	.
360	(170-180)

RESULTS

The system was simulated on Proteus software. In simulation, the system appears in four modes:

The first mode: Figure (9) shows the circuit diagram when the vehicle is turned off, we notice that all pins appear in blue except MCLR pin, this because this pin is supplied by external power supply.

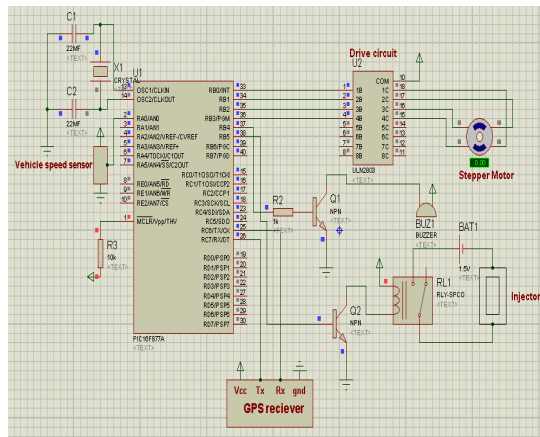


Figure (9): The first mode

The second mode: Figure (10) shows signals in a normal driving. P6, P7 of port(c) and P0 of port (a) appear in red. This means that the GPS receiver always provides latitude and longitude of the region or the street to the microcontroller.

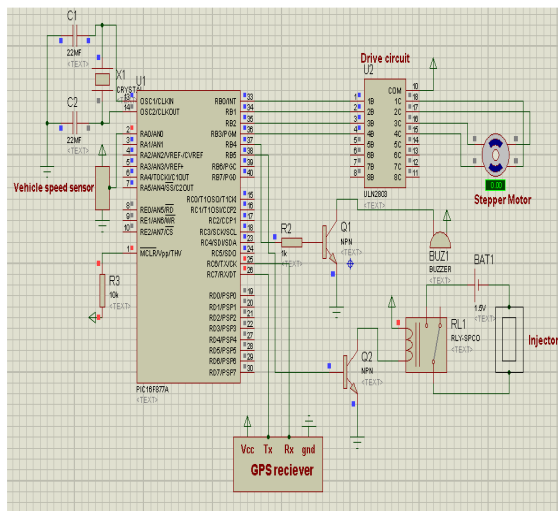


Figure (10): While normal driving

The third mode: After the GPS picks up latitude and longitude and the control unit process data, the speed limit is determined by microcontroller and a decision will be taken. For the purpose of reducing

vehicle speed to the legal speed, the control unit sends signals to turn off injectors as shown in figure (11), at the same time a buzzer gives audio as reminder that the system is working and the brake is applied. The VSS (vehicle Speed Sensor) signal is a very important feedback which to let the microcontroller determine when the speed reaches the required legal speed.

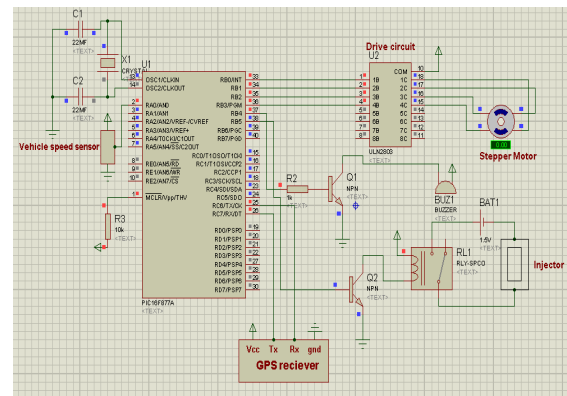


Figure (11): When speed exceeds speed limit

The fourth mode: If the vehicle speed reaches the ideal speed, the buzzer, injectors and brake will be function normally as shown in figure (12).

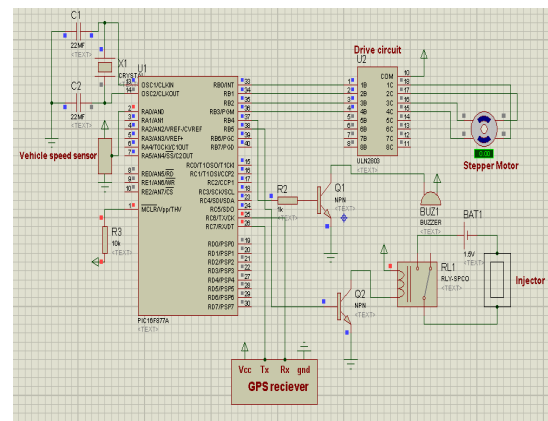


Figure (12): The system back to its normal function

CONCLUSION

The simulation proves the possibility for a technological intervention to reduce the huge number of road accidents, control the inappropriate behavior of reckless drivers, and replace speed control systems used by General Traffic Administration (such as radar system, fix speed control cameras, etc...). It also saves the efforts of

the Traffic Authority and the municipalities in the establishment of infrastructure for speed control.

To achieve the desired goal the most appropriate solution to achieve the desired goal is to change the braking process to an electrical one. This will automatically reduce the speed of the vehicle without the driver's intervention or desire.

REFERENCES

1. United Nations World Health Organization (WHO). (2004). World Report on Road Traffic Injury Prevention, Geneva, Switzerland.
2. Barimah I.; Midhet F. and Sharaf F. (2012). Epidemiology of road traffic injuries in Qassim region, Saudi Arabia: Consistency of police and health Data. *Int. J. health Sci.(IJHS)*. 6(1):31-41
3. Khasawneh MA.; Malkaw MI.; Munzer S.; Sa'ed M.; El-Shyoukh HZ.; Hayajneh SM. and Qasaimh HY. (2009). A security- mbedded infrastructure for Tele-Traffic Speed Control. *J. Franklin Instit.* 346 (5): 431-448.
4. Al-Masaied HR. (2009). Traffic Accidents in Jordan. *Jordan J. Civil Eng.* 3(4): 331-343.
5. Haney JE. and Weber K.(1974). The relationships between speed, speed limits and motor vehicle accidents. Highway Safety Research Institute. University of Michigan.
6. Cirillo JA. (1968). Interstate system accident research study II, Interim Report II, Pub. Roads. 35(3): 71-75.
7. Malkawi MI.; Khasawneh MA. and Malkawi AI.(2004). A wireless infrastructure for Traffic Speed Control. Conference on Information Technology and Organizations in the 21st Century, Amman, Jordan, pp .73-84.
8. Systemax company, Speed Bump. Available at: <http://www.globalindustrial.com/c/outdoor-grounds-maintenance/parking-lot/speed-bumps>
9. Bowie NN. and Waltz JM. (1994). Data Analysis of the Speed-Related Crash Issue. Auto and Traffic Safety, vol. 2, Bureau of Transportation Statistics, U.S. Department of Transportation.
10. Nilsson G. (2004). Traffic Safety Dimensions and the Power Model to Describe the Effect of Speed on Safety, PhD Thesis, Lund Institute of Technology and Society, Traffic Engineering, Lund, Sweden.
11. Tignor SC. and Warren D. (1990). Driver Speed Behavior on U.S. Streets and Highways. Compendium of Technical Papers, Institute of Transportation Engineers, Washington, DC.
12. Naylor N. (2013). Nearly 50% of All Drivers Believes: speeding is a Problem on U.S Roads., National Highway Traffic Administration.
13. The Saudi Interior Ministry, Traffic Department: Traffic Reports[online][accessed 2013],available from www.Saher.gov.sa
14. El- Hillali, Y.; Rivenq A.; Labbani Q. and Rouvaen J. (2007). Study of an Intelligent Cruise Control with GPS and Radar. International ModEasy'07 Workshop (in conjunction with Forum on specification and Design Languages (FDL'07)), Barcelona, Spain.
15. Taylor L. and Göllner W..(2001). Hydrostatically driven vehicle with retarder valve. Patent No. US6202783B1, USPTO.GOV.
16. Dipaola J.; Dobson R. and Morse C. (1974). Car retarder control system, Patent No. US3844514 , USPTO.GOV

Water pollution by aluminized residues free from cooking pots

Kareem K. Jalut, Farqad A. Rashid, and Mohammed A. Ayyash

Ministry of Sciences and Technology / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

The current study aims to determine the transmitted amount of aluminum from cooking pots wall which made of aluminum and coated with a layer of aluminum oxide.

Aluminum concentration was measured in each sample by using an atomic absorption spectrometry (Buck 220 VGP)

The study demonstrated the impact of exposure time on the movement of aluminum ions from the walls to the water pots covariant. The study also demonstrated the impact of the pH to increase the rate of release of aluminum ion walls to water.

Key words: cooking pots, aluminium, free transmission.

الملخص باللغة العربية

سعت الدراسة الحالية إلى تقدير كمية جزيئات الألمونيوم التي يمكن أن تتحرر من أوعية الطبخ المصنوعة من الألمونيوم إلى المياه ، وذلك من خلال دراسة تأثير مجموعة من العوامل الفيزيائية كالحرارة ودرجة التعرض والوقت.

وتم استخدام طيف الامتصاص الذري لقياس محتوى المياه من الألمونيوم ، وقد أظهرت نتائج الدراسة أن جزيئات الألمونيوم عند تعرض أوعية الطبخ المصنوعة من مادتها لفترات طويلة من الحرارة فإنها تطلق تلك الجزيئات مما يشكل مصدر خطر على الصحة العامة للإنسان الذي يستعمل تلك الأوعية والأواني في الطبخ.

INTRODUCTION

Most of Iraqi families use utensils made of aluminum, which covered with a layer of material non-stick treatment to give the aluminum metal necessary strength and rigidity (layer aluminum oxide is one of the reasons that increase the demand to buy pots) (1). As Aluminum is a good conductor of heat so that heat up to all parts of the vessel very quickly, some of the researches indicated that people with Alzheimer's disease have high levels of aluminum, these studies had raised controversy about whether aluminum metal residues at water is one of the reasons for this disease. In addition, there are many medicines that contain aluminum as the disc is one of the antacid containing 50 ml grams or more of aluminum. Not surprising that a person who suffers from pain is delivering a milligram or more of aluminum per day, and the person using daily disposable aluminum coated for cooking and save it could exposed eating about 35 milligrams per day of aluminum (2).

A report issued by the Consumer Protection Agency in Egypt revealed that most of markets and restaurants are using aluminum cooking pots and food preservation, which cause many of the citizens to suffer from kidney diseases and renal failure, as well as pathogenesis of Alzheimer's disease.

Cooking in aluminum pots is not dangerous as long as they are manufactured in a good way, but the danger lies in food preservation, where many studies confirmed that cooking increases the concentration of aluminum in food by 0.24 % while more than save them from 0.1 % to 21.6 micrograms (2).

Reaction of aluminum:

Aluminum reacts with acids such as citric acid exist in acidic fruit juices and vegetables such as found, pomegranates, tomatoes used in the preparation of food dishes, this metal also reacts with carbonate or sodium bicarbonate or sodium baking powder containing them, which are effects of alkaline lead to solute of part of the aluminum cooking pots especially with high heating temperature during the cooking process that helps to increase the speed occurs, also leads the volume of water shortages during the cooking process as a result of its transformation into steam to increase the concentration of aluminum in food may be up to several times.

This means the seriousness of the preparation of concentrates, tomato juice, such as sauce (Molasses) tomatoes, as well as pomegranate molasses in cans made of aluminum as it is known among the public in Iraq, both heated heat direct gas stove or warm rays of the sun during the summer to avoid dissolving this element where the pollution these foods with this item

Aluminum damages to human health :

Lead entering large amounts of aluminum to the human body collects in the bones and nervous system, scientists have discovered a high concentration of this element in the victims of Alzheimer's disease that causes damage to their nervous system, so some of them attributed this occurs as a result of entering large amounts of aluminum to the patient's body

This has increased the attention when linked to many studies the relationship of this metal deterioration of brain disorders, known as senile straying mental illness, known as Alzheimer's disease (Alzheimer's) (1)

Streonica et al noted through their study that some pathological changes do not produce aluminum only, but of complex compounds that result from the interaction of aluminum with fluoride (Alumino-fluoride complexes) as Conclude that regarding the causes of mental illness straying senile (Alzheimer's) the act of fluoride complexes could represent a real risk factor and strong for infection.

There are other health problems coupled with the toxicity of aluminum, including the following (3):

1. neuropsychological testing refer that on the nervous system to function or memory capacity for the short term and attention may be affected in individuals with an increased intake of aluminum in the body
2. neurological diseases
3. damaged skin
4. gastrointestinal disorders.
5. growth inhibition

6. osteoporosis Valolmenyum of may inhibit bone mineralization, the more the rate of exposure to aluminum led to increased likelihood of bone fracture in early.

The Food and Agriculture Organization of the United Nations has identified the amount of aluminum tolerant and required to be absorbed by human weekly estimated (7 mg \ kg of body weight) (4). The World Health Organization (WHO) spotted that the rate of aluminum inside the human body through food in some countries (Australia (1.9 -2.4) and Finland (6.7), Germany (8.11), Japan (4.5), the Netherlands (3.1), Sweden (13), Switzerland (4.4), United Kingdom (3.9), and the United States (7.1- 8.2)). while spotted eating children aged 5-8 years was 0.8 mg / day in Germany and 6.5 mg / day in the United States. and in infants of aluminum in Canada, the United Kingdom, and the United States of America 0.03 to 0.7 mg / day (5).

The World Health Organization spotted that the water contains some concentration of aluminum after treatment (using aluminum sulfate(alum) was different from one country to another , for example, in America 0.01 - 1.3 mg / l (5).

MATERIALS AND METHODS

The samples of the study composed of 10 utensils that were collected from Baghdad markets, 5 of them were of home made, and the other five were of Syrian origin.

The following procedure was applied:

- Measuring the concentration of aluminum in distilled water.
- heat cooking pots until they reached the boiling point..
- Aluminum concentration was measured in distilled water at this temperature and the time considered at this point Time = Zero.
- Aluminum concentration was measured freed from the walls of the pots after (10, 20 , 30, 60 minutes) .
- Collection of 100 ml of each aluminum vessel and concentration of freed aluminum was measured.
- The pH of distilled water which is putted in cooking utensils has been changed and measured the amount of freed aluminum from the walls of the pots (pH: 5 , 4.5 , 4 , 3.5, 9 , 8 , 7 , 6).

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that the concentration of freed aluminum at the time Time = Zero in all the utensils used undetectable while results showed measurable element of aluminum in the times (20, 30, 60) and the presence of concentrations of certain of this element has been freed from the walls of the pots to distilled water. Results showed the differences and disparities in the values of concentrations between the vessel and another from time to time, from this we can deduce that the freed aluminum element from the walls varies from one pot to another and this difference in the behavior of vessels about the freed aluminum from the wall back originally to the degree of purity of the metal which vessels made from, or to the Formation of the alloy which is composed of these vessels .

The results also showed that the continued boiling water in pots for a longer period gives the possibility of greater aluminum emancipation into the water and this seemed obvious , especially after 60 minutes at the start of boiling .

It was also noted that the pH of distilled water (the amount of pH) has the greatest influence in the freed aluminum, whether towards its alkalinity or acidity of water, where it was observed that the amount of freed aluminum increase to double or three times as we move away from the break-even point (PH = 7). The amount of free aluminum when pH = 7 in all the pots are the same at times (10, 20, 30 minutes) in all pots (homemade and Syrian), but note that

there is significant increase after 60 minutes and this shows the duration of exposure increase the amount of free aluminum from walls .

But when a change of the pH occurred(towards acidic or alkaline aqueous medium) , the percentage of aluminum liberation will increase significantly.

REFERENCES

1. Candy A. (1986. Alzheimer's disease. Jon wiley. 2nd Ed. P. 123-153.
2. Struneck A. and Patočka J. (1999). Pharmacological and toxicological effects of aluminofluoride complexes. 32: 230-242.
3. Venugopal B. and Luckey TD. (1987). Metal toxicity in mammals. Chemical toxicity of metals and metalloids. New York, NY: Plenum Press.
4. FAO / Who Expert Committee on Food Additives, 1989. available at: www.fao.org.
5. WHO/HSE/WSH/10.01/13, 1997

A Novel step to transfer transgenic Callus Primordia of carrot, embedded in agar droplets

Amjad A.H. Mohammed (1) and Mozahim K. Al- Mallah (2)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences / Al- Mosul University (2) Dept. of Biology / College of Education / Al- Mosul University / Republic of Iraq

ABSTRACT

This research introduced a novel step to transfer callus primordia derived from cell suspension embedded in agar drops. This is including the transfer of intact agar drops within primordia instead of picking up each primordium individually from agar drops, which probably harmed and contaminated during transfer procedure. The novel step led to obtain more callus and increase its mass rapidly compared with the slow growth of tiny primordium and its mass produced when single primordia transferred separately. One of the characters of this technical step lies in overcoming barriers that faced propagation of transgenic callus and regeneration capability. The results showed the suitability and replicability of this step with transgenic callus primordia of carrot, and it is likely to be successful with other plant species since this step evade primordia the physical damage and microbial contamination during transfer method.

Key words: callus primordia, carrot plants, transgenic cell suspension , novel step

الملخص باللغة العربية

ادخلت الدراسة الحالية خطوة جديدة لنقل بادئات الكالس المشتقة من زراعة المعلقات الخلوية المغمورة في قطرات الاكار، تضمنت نقل قطرة الاكار الكاملة المغمورة فيها بادئات الكالس في خطوة واحدة بدلاً من التقاط كل منها منفردة من مزارعها واحتمالات تعرضها للضرر الفيزيائي وفرص التلوث المحتملة. وحقت هذه الخطوة سرعة الحصول على كتلة من الكالس مقارنة بكتلته الناتجة في حالة النقل المنفرد لهذه البادئات. ومن ميزات هذه الخطوة انها تساعد في تجاوز الصعوبات التي تواجه اكثار الكالس المعدل وراثياً وقدرته على التمايز وتكوين النباتات المحولة وراثياً. اظهرت النتائج ملائمة هذه الخطوة واعتمادها مع بادئات الكالس المعدل وراثياً للجزر. ومن المحتمل ان تكون كفاءة مع الانواع النباتية الاخرى طالما تبعد هذه الخطوة الضرر الفيزيائي والتلوث الميكروبي اثناء عملية النقل.

INTRODUCTION

Transgenic hairy roots cultures obtained by *Agrobacterium rhizogenes* R1601 mediated transformation have been recognized as a suitable source for various aspects (1). Transgenic hairy roots can be excised and grown easily *in vitro* on hormone – free MS medium to use in plant biotechnology applications (2, 3). Such one is the production of transgenic plants (4) and to study secondary metabolic pathways in plant from those transgenic tissues (5, 6). Callus is an essential material for cell suspension preparations when placed into a liquid medium with agitating (7). The important advantages of cell suspension are due to the rapid division of cells producing numerous single cells and their development to cellular colonies followed by callus primordia formation (8, 9). There are different culture methods of cell suspension, which required to be embedded either in agar drops (10) or in agar sector (11). In both cases the small callus primordia need to be picked up individually and transferred to the propagation culture and this is time consuming and may affect viability of these tiny tissues.

This investigation aimed to introduce a novel step in transferring the intact agar drop whereby primordia were embedded instead of single primordium transfer.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic hairy root cultures production

Two cm cotyledonary stem explants were excised from 25 day old axenic carrot seedlings. They were inoculated by direct injection using *Agrobacterium rhizogenes* R1601 harboring Ri plasmid carrying *kana^{Res}* and *Carb^{Res}* genes each at 100 mg L⁻¹. Inoculated samples were placed vertically in 0.8% agar-solidified MSO medium (12) containing 3% sucrose in flasks and maintained at 25 ± 2°C in the dark (13). Young growing hairy roots of 2-3 cm length induced on the inoculated explants were excised aseptically and transferred to the same MS medium supplemented with gradual concentration 100, 200, 300 mg L⁻¹ of cefatoxime to eliminate bacteria (14). They were subcultured every 20 days to produce bacterial-free hairy roots cultures.

Single cluster of bacterial free hairy roots were transferred to the surface of 25 ml of agar-solidified MS medium in which KNO₃ increased to 2000 mg L⁻¹, Thiamine-HCl to 0.5 mg L⁻¹, Pyridoxine-HCl to 1.0 mg L⁻¹ in the presence of 1.0 mg L⁻¹ NAA and 4.0 mg L⁻¹ TDZ contained in 100 ml flask, and kept in culture room at 25 ± 2 °C, 16h light daily at density 1500 lux. Small callus fragments formed were recultured in the same medium every 15 day for callus culture formation.

Agropine test of putative transgenic callus

Samples of 100 mg each of hairy roots, its callus and normal roots (control), were crushed separately in the presence of 100 µl of 0.1N HCL in Eppendorf tube, centrifuged at 6000 rpm for 20 min. Thirty microliter of supernatant of each samples and identical volume of standard agropine (Dr. Y. Dessaux, CNRS, France) were spotted on 15x30 cm chromatography-paper (Whatman No.3). This was laid in the electrophoresis tank (Esselte Studium, S-11285 Stockholm, Sweden Electrophoresis) containing 500 ml of buffer solution consisting of formic acid: acetic acid: water (25:75:400 ml), and 300-400 v for 1h was pass through. The chromatophoretogram was removed, dried in the air, stained with silver nitrate (AgNO₃) solution, dry again. Then submerged in a solution of 2% methanolic NaOH to developed the spots, dry and soaked in solution of 5% Na₂S₂O₃, washed with running water for 30 min and air dried (13, 15).

Preparation of transgenic cell suspension

One gram of agropine - producing friable callus was transferred to 30 ml of liquid MS medium in 100 ml flask placed on shaking incubator (New Brunswick, USA) in conditions of 100 rpm, 25± 2°C in dark. After 24h samples were then sieved through 46 µm sterile plastic sieve (PGMG. Nott. Univ. UK). This is to obtain numerous of single cells which again placed on shaking incubator. Cell suspension densities were determined using 1.0 ml capacity hemocytometer (Paul Marienfeld GmbH and Co. KG, Germany) after 24,48,72,96 h of incubation (10).

Embedding of transgenic cell suspension in agar droplets

Samples of 1.0 ml of different density of cell suspension was each mixed with 1.0 ml of (autoclaved) molten 1.5% agar solution kept at 40°C. The mixture was distributed in 0.2 ml drops in the bottom of 9.0 cm diameter plastic Petri dish (Sterilin, UK). Dishes were kept open for drop solidification, then 2.0 ml of the liquid MS medium was added to each dish (16), and sealed by parafilm strips and maintained at 25± 2°C, 700 Lux, 16h light daily. They were periodically examined by light microscopy to follow up their division.

Transfer of agar drops containing callus primordia

The novel technical step begin with the separation of each intact drop, which containing tiny callus primordia, from the dish bottom. Then each drop was held by sterile stainless spatula and transport to the surface of the same agar-solidified MS medium. In the main time many single tiny primordia were picked up by sterile forceps from the adhesive agar

drop and placed on the surface of agar-solidified MS medium as control samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Production of hairy roots cultures

The first transgenic hairy roots on stem explants were visible after ten days of inoculation (Fig. 1.A), and transformation frequency of these hairy roots approached 49.09%. These transgenic hairy roots when excised and cultured on agar-solidified MSO medium containing cefotaxime bacterial-free hairy roots cultures were produced. They were negatively geotropism, branched and fast growing (Fig. 1.B).

The induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* R1601 harbouring Ri, due to successful transfer of T-DNA genes from bacteria to the plant cell genome, and their expression (3). Workers reported that similar hairy roots were induced by the same strain of bacteria on *Plumbago indica* plants (17) and *Pogostemon cablin* plants (18). This is due to the insertion of T-DNA genes and their expression in plant host (6).

Formation of callus from hairy roots

The results expressed the ability of transgenic hairy roots grown on MS agar medium to form spontaneously a small irregular lump of callus (Fig. 1.C), involved 25 days. Excision of callus lumps and recultured on fresh MS agar medium they produced friable and yellow-green color callus.

The development of callus from hairy roots may due to the important role of NAA and TDZ in cell division, and to the T-DNA genes namely *iaam*, *iaah* and *tmr* genes that transferred into cell genome and causing hormone disturbance in plant cells (19, 20).

Demonstration of genetic transformation by agropine test

Results of paper electrophoresis proved the separation of black spots from hairy roots extract and from hairy roots- derived callus corresponding to the spot of standard agropine with lacking of any spot separation from normal root samples. The formation of this unusual amino acid (agropine) may explained to the transition of Ri T-DNA genes into plant cells genome (21, 13).

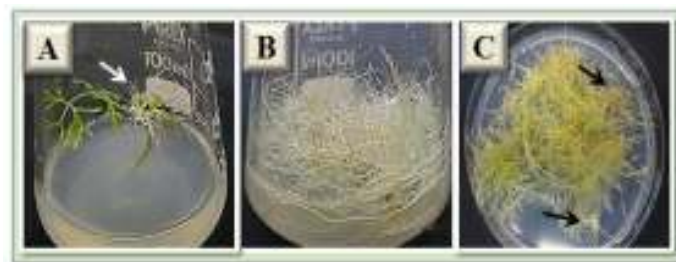


Figure (1): Callus production from transgenic hairy roots developed on *Daucus carota* L. seedling induced by *Agrobacterium rhizogenes* R1601.
(A): Twenty-five days old seedling inoculated by direct injection and development of hairy roots (arrows) of 10 days old at inoculated site
(B): Transgenic hairy roots culture (15 days-old) propagated from excised hairy roots in (A) grown on agar-solidified MSO.
(C): Production of callus aggregation (arrows) from transgenic hairy roots grown on agar-solidified MS after 25 days of culture

Formation of callus primordia in agar drops

The Data in Table (1) expressed the differences in the number of callus primordia produced from culturing various densities of cell suspension by embedding in agar drops. Embedded cells started in division in the third day and continued their divisions producing cellular colonies, which then developed to callus primordia.

The plating densities of the third and fourth day gave 100% callus primordia formation (Fig. 2 . A), and subsequently they enlarged in sizes.

Interestingly in this study, the results showed that the transfer of each intact agar drop-containing primordia to the MS agar medium promoted callus mass formation. This callus was friable, fast growing and green in color (Figure. 2. B). While transfer of each single primordia produce small fragment of callus and required more time. This is due to the probable damage of these primordia during transfer method which perhaps affect their viability. Moreover, it seems likely that primordia lost their synergistic effect as they separated and individually picked up (Fig. 2. C).

Table (1) : Production of transgenic callus primordia from culture of different densities of transgenic cell suspension of *Daucus carota* L. embedded in agar drops

medium	cultured density (x 10 ⁶) cell ml ⁻¹	total number of			callus Primordia production (%)
		cultured drops	drops- derived callus	callus primordia	
MS	1.1	30	24	792	80
	1.3	30	27	945	90
	1.6	30	30	1500	100
	1.4	30	30	1410	100

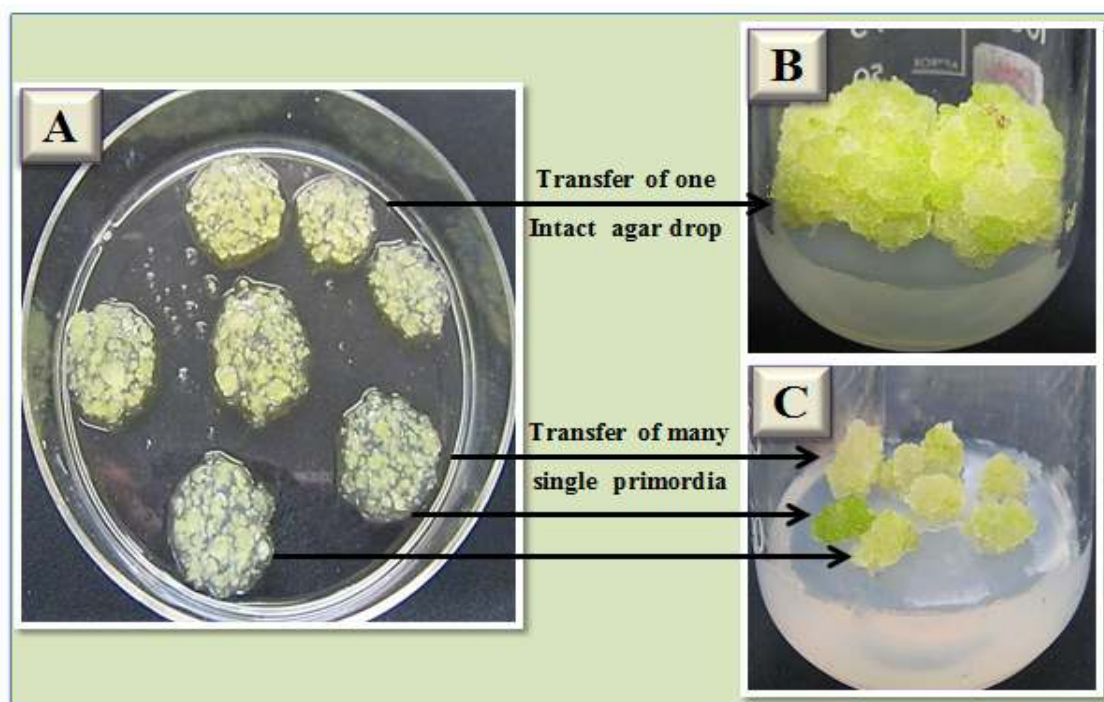


Figure (2): Comparison between the transfer of intact agar drop -containing transgenic primordia and transfer of single primordia on the mass of callus grown on MS

- (A): Transgenic callus primordia (arrows) derived from cell suspension after 20 days of embedding in agar drops
 (B): Large mass of callus produced after 35 days of transfer one intact agar drop in (A)
 (C): Small mass of callus produced after 35 days of transfer eight single primordia in (A).

The successful production of cell suspension cultures was attributed to the friable texture of transgenic callus and to the large number of single cells in cultures (9). This is due to medium composition and to the role of TDZ that induced cell divisions and de novo pathway of auxin synthase (7), and probably to the role of *aux-* gene controlled auxin synthesis (3) which stimulate roots initiation and elongation (22).

The production of callus primordia and development to callus culture may due to the transgenesis process and to the efficiency of TDZ (9). The conclusion is that the novel step described in this investigation seems to be efficient catalyzing factor in handling primordia that reflected on the amount of callus produced. Therefore, the recommendation is to introduce this technical step with various callus primordia produced from cell or protoplast suspension.

REFERENCES

1. Eapen S. and Mitra R. (2001). Plant hairy root cultures: prospects and limitations. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. (PNSA) B67 (3,4):107-120.
2. Giri MA. and Narasu L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotech. Adv. 18: 1–22.
3. Tzfira T. and Citovsky V. (2008). Agrobacterium mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr. Opin. Biotech. 17: 147-154.
4. Al-Mallah MK. and Salih SM. (2001). Agrobacterium as a natural vector for genetic transformation of *Solanum nigrum* L. plants. Proc 1st .Sci. Conf. Nat. Board for Biotech. Res. 18-19 Sept. Baghdad-Iraq.
5. Lima J E.; Benedito VA. ; Figueira A. ; Eustaquio L. and Peres P. (2009). Callus, shoot and hairy root formation in vitro as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. Plant Cell Repts. 28:1169–1177.
6. Sharma P. ; Padh H. and Shrivastava N. (2013). Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. Eng. Life Sci. 13: 62–75.
7. Neumann K. ; Kumar A. and Imani J. (2009). Plant Cell and Tissue Culture– A tool in Biotechnology. Springer-Verlag Berlin, Germany.
8. Lendevai A. ; Nikovics K. ; Bako L. ; Dutits, D. and Gyorgy J. (2002). Synchroization of *Oryza sativa* L. cv. Taipei-309 cell suspension culture. Acta. Biol. 46: 39-41.
9. Gurel S.; Gurel E. and Kaya Z. (2002). Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured in vitro. Turk. J. Bot. 25 : 25-33.
10. Davey MR. and Anthony P. (2010). Plant Cell Culture Essential Methods. Wiley-BlackWell, UK.
11. Al-Mallah MK. and Zeadan SM. (2013). A new method in culture the plant cell suspension by embedding in agar sectors. Patent No. 3674. Office of Standardization and Quality Control. Baghdad, Iraq.
12. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-479.
13. Al-Mallah MK. and Mohammed AA. (2012). Transfer of Ri T-DNA genes of *Agrobacterium rhizogenes* R1601 via direct microinjection and Co_cultivation to Carrot, *Daucus carota* L., tissue and production of transformed hairy root cultures. Iraq J. Biotech., 11:227-239.
14. Rasheed JH. and Abdullah MA. (2013). Recovery of transgenic cowpea, *Vigna radiata* plants from hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Aust. J. Basic. Appl. Sci. 7:192-196
15. Tepfer DA. and Tempe J. (1981). Production of di-agropine par des vaccines formess sous l'action *Agrobacterium rhizogenes*. Acad. Sci. Paris. Ser. III, 292:212-218
16. Dixon RA. (1985). Plant Cell Culture, A Practical approach. IRL. Press. Oxford. U.K
17. Gangopadhyay M; Chakraborty, D.; Bhattacharyya S. and Bhattacharya, S. (2010). Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 102:109-114.
18. He-Ping S. ; Yong-Yue L. and Tie-Shan S.(2011). Induction of hairy roots and plant regeneration from the medicinal plant *Pogostemon Cablin*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 107:251–260
19. Baranski R. (2008). Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other Apiaceae species. Transgenic Plant J. 2:18-38
20. Tzfira T. ; Li J. ; Lacroix B. and Citovsky V. (2004). Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. Trends in Genet. 20:375-383.
21. Hooykass PJJ. and Schilperoort RA. (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19:15-38.
22. Liu P. and Nester EW. (2006). Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 4658-4662.

Antimicrobial activity of kombucha (KH) tea against bacteria isolated from Diabetic foot ulcer

Esam. J. AL-Kalifawi

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

ABSTRACT

A study was conducted from January to March 2012 at Al-Mustansiriya University, National Center for Diabetic (Al-Karkh) and Health Ministry, Baghdad Health Office, Specialist Center for Endocrine glands & Diabetic Diseases (Al-Rusafa) in Baghdad City. In this study colorimetric VITEK-2 Compact system was used to identify isolates and to detect Susceptibility test to several antimicrobial agents. The study also investigated the antibacterial effect of Kombucha tea on isolated bacteria from diabetic foot ulcer. The bacteria isolated were eight gram negative bacteria, namely, *Acinetobacter baumannii* 3 (2%), *Enterobacter cloacae* 5 (4%), *Escherichia coli* 13 (10%), *Klebsiella pneumoniae* 7 (6%), *Citrobacter freundii* 4 (3%), *Proteus mirabilis* 3 (2%), *Proteus vulgaris* 3 (2%) and *Pseudomonas aeruginosa* 44 (35%). Four gram positive bacteria, *Enterococcus faecalis* 6 (5%), *Staphylococcus aureus* 17 (13%), *Staphylococcus haemolyticus* 13 (10%) and *Streptococcus viridans* 9 (8%).

The results of antimicrobial susceptibility test against gram negative and positive bacteria, showed the majority of isolates were resistant to most antimicrobials. The MIC values ranged from ($\leq 0.125 - \leq 320$ µg/mL).

The effect of Kombucha(KH) tea on all isolates was clear at 7days of incubation; the diameter of inhibition zone was 6mm for *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris* and *Enterococcus faecalis*. 7mm for *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Streptococcus viridans* 8mm for *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The maximum activity of fermented tea was recorded at 14days incubation against all isolates, the diameter of inhibition zone was 21mm for *Acinetobacter baumannii*, 24mm for *Enterobacter cloacae*, 23mm for *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Streptococcus viridans*, 16mm for *Klebsiella pneumoniae*, 22mm for *Citrobacter freundii* and *Enterococcus faecalis*, 25mm for *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*, 20mm for *Proteus vulgaris*, 26mm for *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity of Kombucha tea decreased with increasing incubation periods (28 days).

Key words: Diabetic foot ulcer, Vitek-2 compact, Antimicrobials, Kombucha(KH) tea

الملخص باللغة العربية

أجريت الدراسة للفترة من كانون الثاني الى آذار 2012 في الجامعة المستنصرية، المركز الوطني للسكري (الكرخ) وفي وزارة الصحة، دائرة صحة بغداد، المركز التخصصي لأمراض الغدد الصم والسكري (الرصافة) في مدينة بغداد. في هذه الدراسة تم استخدام نظام VITEK-2 Compact وذلك لدقته وسرعته في تشخيص العزلات ولتقدير المقاومة للمضادات الحيوية. الدراسة بحثت كذلك تأثير شاي الكمبوشا على الجراثيم المعزولة من قرح القدم السكري. تم عزل ثمانية جراثيم سالبة جرام هي (*Acinetobacter baumannii* 3 (2%) ، *Enterobacter cloacae* 5 (4%) ، *Escherichia coli* 13 (10%) ، *Klebsiella pneumoniae* 7 (6%) ، *Citrobacter freundii* 4 (3%) ، *Proteus mirabilis* 3 (2%) ، *Proteus vulgaris* 3 (2%) و *Pseudomonas aeruginosa* 44 (35%). أربع جراثيم موجبة جرام هي (*Enterococcus faecalis* 6 (5%) ، *Staphylococcus aureus* 17 (13%) ، *Staphylococcus haemolyticus* 13 (10%) و *Streptococcus viridans* 9 (8%).

أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ضد الجراثيم السالبة جرام والموجبة جرام، أن معظم العزلات مقاومة لمعظم المضادات الحيوية. وكان مدى التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية مابين ($\geq 0.125 - \geq 320$ مايكروغرام/مل). كما تبين بأن تأثير شاي الكمبوشا على جميع العزلات كان واضح بعد سبعة أيام من الحضان، حيث كان قطر التثبيط 6 ملليمتر لجراثيم *Acinetobacter baumannii* ، *Proteus vulgaris* و *Enterococcus faecalis* . 7ملليمتر لجراثيم *Enterobacter cloacae* ، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Citrobacter freundii* ، *Staphylococcus haemolyticus* و *Streptococcus viridans* . 8 ملليمتر لجراثيم *Proteus mirabilis* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* .

إن الفعالية القصوى للشاي المخمر سجل بعد أربعة عشر يوم من حضان الكمبوشا ضد كل العزلات، حيث كان قطر التثبيط 21 ملليمتر لجراثيم *Acinetobacter baumannii* ، 24 ملليمتر لجراثيم *Enterobacter cloacae* ، 23 ملليمتر لجراثيم *Escherichia coli* ، *Staphylococcus haemolyticus* و *Streptococcus viridans* . 16 ملليمتر لجراثيم *Klebsiella pneumoniae* . 22 ملليمتر لجراثيم *Citrobacter freundii* و *Enterococcus faecalis* . 25 ملليمتر لجراثيم *Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus* . 20 ملليمتر لجراثيم *Proteus vulgaris* . 26 ملليمتر لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* . أن الفعالية المضادة للجراثيم لشاي الكمبوشا تقل مع زيادة فترة الحضان (28 يوم).

INTRODUCTION

Diabetic foot ulceration and infections are a major medical, social, economic problem and a leading cause of morbidity and mortality, especially in the developing countries (1-3). Fifteen percent of all diabetics develop a foot ulcer at some point in their lives which is highly susceptible to infections and that spreads rapidly, leading to overwhelming tissue destruction and subsequent amputation (4). The major predisposing factor to foot ulceration leading to infection is usually related to peripheral neuropathy (5). Mostly the diabetic foot infections are mixed bacterial infections (6,7) and the proper management of these infections requires appropriate antibiotic selection based on culture and antimicrobial susceptibility testing. Infection with multidrug resistant organisms may increase the duration of hospital stay, cost of management and may cause additional morbidity and mortality (8). Early diagnosis of microbial infections is aimed to institute the appropriate antibacterial therapy to avoid further complications.

A series of the VITEK systems (BioMeriux, Marcy l'Etoile, France) has been a fully automated instrument that provides species identification (ID) and antimicrobial susceptibility testing (AST) for a variety of clinical isolates, and are presently used in many clinical microbiology laboratories worldwide. During the past 3 decades, several revisions have been introduced to the system, resulting in a stepwise improvement of the system performance. Recently, extensive revisions, including reintroduction of colorimetric reading in lieu of fluorescence technology, and addition of several biochemical substrates and taxa covered by the broadened database comparable with the well-established API series (BioMeriux) are created (9-11). The efforts have been focused upon the accurate ID, in particular, to solve its inherent weakness in the IDs of glucose-nonfermentative Gram-negative rods (GNR) and members of the family Streptococcaceae (12).

Kombucha is a symbiotic association of bacteria (*Acetobacter xylinum* and *Bacterium gluconicum*) and yeast strains (*Zygosaccharomyces kombuchensis*, *Pichia fluxum* and *Saccharomyces sp.*) (13). The variation of its composition could be due to geographic, climatic and cultural conditions as well as diversity of local species of wild yeasts and bacteria (14). These microorganisms are able to grow in culture medium formed of tea infusions (black, mate and green), supplemented with a carbon source. The broth fermented is called "tea fungus" and is originally from the north-east of China (Manchuria). The beverage was introduced in Russia by oriental merchants and then into Eastern Europe and Europe around the turn of this century. This refreshing beverage tasting like sparkling apple cider is often produced at home by fermentation using a tea fungus passed from house to house (15). The fermentation and oxidation processes starts, when the tea fungus is placed in a freshly prepared

infusion of tea and sugar. When grown in sucrose medium, colonies of yeast break the sucrose in glucose and fructose, then produce carbon dioxide and ethanol, which oxidize to acetaldehyde by bacteria of the colonies. The tea fungus produces many other substances, like gluconic acid and vitamins, which with the supply of tea nutrients, give the drink its unusual flavor and healing properties. The glucose is polymerized and produces cellulose and hemicellulose (16,17). A wide range of flavor compounds, including alcohols, aldehydes, ketones, esters and amino acids have been identified from fermented broth (18). The fermentation using Kombucha colonies is composed of two portions, a floating cellulose pellicle layer, formed during the fermentation by *A. xylinum*, and the sour liquid broth (fermented broth) (19). The fermentation using Kombucha as a biological agent is conducted at ambient temperature for up to 7-10 days and produces a carbonated fermented broth, softly acid and with low concentration of ethanol. This broth presents beneficial effects, such as antibiotic properties, regulation of gas-gastric, intestinal and glandular activities, relief of joint rheumatism, gout and hemorrhoids, positive influence on the cholesterol level, arteriosclerosis, toxin excretion and blood cleansing, diabetes, and aging problems, and it has been claimed to be a prophylactic and therapeutic beneficial agent to human health, from weight loss to curing cancer (20, 21). The beneficial effects of Kombucha tea are attributed to the presence of tea polyphenols, gluconic acid, glucuronic acid, lactic acid, vitamins, amino acids, antibiotics and a variety of micronutrients produced during the fermentation (22).

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Identification of Bacteria

Discharge from margins and edges of ulcer was collected with help of two sterile swabs, one for gram stain and one for culture before antiseptic dressing was applied. One hundred and fifty swabs were collected, 50 swabs from patients admitted to Al-Mustansiriyah University, National Center for Diabetic (Al-Karkh). 100 swabs from patients admitted to Health Ministry, Baghdad Health Office, Specialist Center for Endocrine glands and Diabetic Diseases (Al-Rusafa). Then swabs were immediately transported to the laboratory for culture. Samples obtained with swab sticks were streaked onto surface of nutrient agar, Blood agar and MacConkey agar media. The plates were incubated at 37°C for 24-48hrs. All isolates were recultured onto Columbia agar with 5% horse blood (18 to 24 h at 37°C) to ensure purity and viability. Stock strains were subcultured. Microorganisms were tested separately with Compact VITEK 2 instrument, the system was used according to the recommendations of the manufacturer. Bacterial suspensions were made in 0.45% sodium chloride

solution and adjusted to a McFarland standard of 0.50 to 0.63 by using a Densicheck system (bioMérieux). Identical inocula of each strain were tested using colorimetric cards (GN, GP) according to (23).

Antimicrobial susceptibility test

The antimicrobial susceptibility test was performed using several types of AST card, Vitek 2 compact BioMeriux Company (23).

Preparation of Kombucha(KH) Tea

Starter culture of Kombucha (in south Iraq name Khubdat Humza كبدية حمزة) was of unknown origin and was provided by Iraqi citizen. Kombucha was prepared by adding 100g/L (10%) weight/volume sucrose to water that had been just boiling for 15 minutes. Subsequently, black tea (Apple tea, UAE, 0.5% w/v) was added and allowed to steep for 15 minutes and then filtered through a sterile sieve. The tea was then cooled to 25°C, and 400mL of tea was aliquot into a 750mL glass bottle that had been previously sterilized at 121°C for 20 minutes. The tea broth was then inoculated with 5g of freshly grown tea fungus that had been cultured in the same medium for 14 days, and the bottle was covered with sterile tissue paper towels to allow aeration. Fermentation was carried out in a dark incubator at 25°C (16).

Antimicrobial Activity of Kombucha(KH) tea

Antimicrobial activity was demonstrated by agar diffusion assay. Mueller Hilton agar medium (20 mL) was poured into each Petri dish (90 mm diameter). Suspensions (100 μ L) of target strain cultured for 24 h were spread on the plates uniformly, and wells of 9 mm diameter were made with a sterile cork borer. Kombucha samples were centrifuged at 40000g force (Du Pont centrifuge, Sorvall RC-5B) for 15 min to remove cell debris. Sterile supernatant was obtained by filtering the supernatant through a sterile microfilter (Millex-GV filter, 0.22 μ m pore size, Millipore). Sterile samples (100 μ L) were then transferred into the wells of agar plates inoculated with target strains. The plates were then incubated at 37 °C. The diameter of the inhibition zone was measured after 12-15 h. Fermented tea sample was taking after 0, 7, 14, 21 and 28 days of incubation (16).

RESULTS

The bacteria isolated from diabetic foot ulcer samples are shown in Table (1). eight gram negative bacteria, namely, *Acinetobacter baumannii* 3 (2%), *Enterobacter cloacae* 5 (4%), *Escherichia coli* 13 (10%), *Klebsiella pneumoniae* 7 (6%), *Citrobacter freundii* 4 (3%), *Proteus mirabilis* 3 (2%), *Proteus vulgaris* 3 (2%) and *Pseudomonas aeruginosa* 44

(35%), and four gram positive bacteria, *Enterococcus faecalis* 6 (5%), *Staphylococcus aureus* 17 (13%), *Staphylococcus haemolyticus* 13 (10%) and *Streptococcus viridans* 9 (8%) were isolated from the diabetic foot ulcer.

Table (1): Bacteria isolated from diabetic foot ulcer

Isolates	No.	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	4
<i>Escherichia coli</i>	13	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	6
<i>Citrobacter freundii</i>	4	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3	2
<i>Proteus vulgaris</i>	3	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44	35
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	13
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	13	10
<i>Streptococcus viridans</i>	9	8
Total	127	100

The results of antimicrobial susceptibility test against gram negative bacteria table (2) showed most isolates were resistant to Ampicillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Cefazolin, Ceftriaxone, Aztreonam, Gentamicin, Tetracycline and Trimethoprim/Sulfamethoxazole. And sensitive to Piperacillin/Tazobactam, Cefepime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Ciprofloxacin and Levofloxacin.

The antimicrobial susceptibility test against gram positive bacteria showed also the same reaction most isolates were resistant to Cefoxitin Screen, Benzylpenicillin, Ampicillin, Oxacillin, Gentamicin, Erythromycin, Quinupristin/Dalfopristin, Vancomycin, Tetracycline, Rifampicin and Trimethoprim/Sulfamethoxazole. And sensitive to Gentamicin High Level, Streptomycin High Level, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Inducible Clindamycin Resistance, Clindamycin and Tigecycline. Table (3).

The result of Minimum Inhibitory Concentration of antimicrobials against gram negative bacteria Isolates shows that the MIC of Ampicillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Cefazolin, Ceftriaxone, Aztreonam, Gentamicin and Tetracycline were ($\leq 16 - \leq 32$ μ g/mL), the MIC of Trimethoprim/Sulfamethoxazole was ($\leq 160 - \leq 320$ μ g/mL), the MIC of Piperacillin/Tazobactam was ($\leq 4 - \leq 8$ μ g/mL), the MIC of Cefepime was ($\leq 1 - \leq 4$ μ g/mL), the MIC of Ertapenem and Meropenem were ($\leq 0.125 - \leq 1$ μ g/mL), the MIC of Imipenem was ($\leq 1 - \leq 2$ μ g/mL), the MIC of Amikacin was ($\leq 2 - \leq 8$ μ g/mL), the MIC of Ciprofloxacin was ($\leq 0.25 - \leq 2$ μ g/mL), the MIC of Levofloxacin was ($\leq 0.5 - \leq 1$ μ g/mL) table (4).

Table (2): Susceptibility tests of antimicrobials on gram negative bacteria isolated from diabetic foot ulcer

Bacterial isolates	Percentage of Resistance															
	AM	AUC	PPL	CZ	CRO	FEP	AZ	EPM	IPM	MPM	AK	GM	CIP	LEV	T	TRI
<i>Acinetobacter baumannii</i>	87	78	48	80	83	43	73	33	38	31	45	67	42	49	84	83
<i>Enterobacter cloacae</i>	82	74	41	85	87	44	74	35	34	30	40	70	32	29	87	84
<i>Escherichia coli</i>	88	74	50	88	88	40	70	46	40	31	43	77	41	41	79	87
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80	80	43	87	86	42	72	41	39	32	39	80	39	33	81	86
<i>Citrobacter freundii</i>	87	78	46	79	80	41	71	40	37	31	38	67	42	49	84	90
<i>Proteus mirabilis</i>	82	74	48	78	82	43	73	38	41	30	39	70	32	29	77	86
<i>Proteus vulgaris</i>	88	80	49	84	85	44	74	33	40	34	41	77	41	41	79	91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	80	46	82	79	39	71	41	39	32	40	80	39	33	81	89

AM= Ampicillin, AUC= Amoxicillin/Clavulanic Acid, PPL=Piperacillin/Tazobactam, CZ= Cefazolin, CRO = Ceftriaxone, FEP = Cefepime, AZ= Aztreonam, EPM= Ertapenem, IPM= Imipenem, MPM= Meropenem, AK= Amikacin, GM= Gentamicin, CIP= Ciprofloxacin, LEV= Levofloxacin, T= Tetracycline, TRI= Trimethoprim/Sulfamethoxazole

Table (3): Susceptibility tests of antimicrobials on gram positive bacteria isolated from diabetic foot ulcer

Bacterial isolates	Percentage of Resistance									
	CEF	BEP	AM	OX	GMHL	S HL	GM	CIP	LEV	MOF
<i>Enterococcus faecalis</i>	63	70	88	70	40	43	50	30	47	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	70	79	82	44	40	52	35	46	22
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	60	60	80	77	39	41	54	33	43	20
<i>Streptococcus viridans</i>	67	77	78	80	51	46	51	29	42	30

CEF= Cefoxitin Screen, BEP= Benzylpenicillin, AM= Ampicillin, OX= Oxacillin, GMHL= Gentamicin High Level, SHL= Streptomycin High Level, GM= Gentamicin, CIP= Ciprofloxacin, LEV=Levofloxacin, MOF= Moxifloxacin

Bacterial isolates	Percentage of Resistance									
	I CLMR	E	CLM	QUP	V	T	TIG	F	RIP	TRI
<i>Enterococcus faecalis</i>	39	87	43	80	44	79	40	88	44	75
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	85	45	85	54	80	44	85	77	76
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	30	80	49	81	50	81	39	86	75	73
<i>Streptococcus viridans</i>	40	84	47	83	56	79	41	79	76	46

ICLMR=Inducible Clindamycin Resistance, E= Erythromycin, CLM= Clindamycin, QUP=Quinupristin/Dalfopristin, V= Vancomycin, T= Tetracycline, TIG= Tigecycline, F= Nitrofurantoin, RIP= Rifampicin, TRI= Trimethoprim/Sulfamethoxazole

Table (4): Minimum Inhibitory Concentration of antimicrobials against gram negative bacteria Isolates from diabetic foot ulcer

Bacterial isolates	MIC (µg/L)							
	AM	AUC	PPL	CZ	CRO	FEP	AZ	EPM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Enterobacter cloacae</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Escherichia coli</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Citrobacter freundii</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Proteus mirabilis</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Proteus vulgaris</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤16 - ≤32	≤16 - ≤32	≤4 - ≤8	≤32- ≤64	≤32- ≤64	≤1 - ≤4	≤16 - ≤32	≤0.125- ≤1

AM= Ampicillin, AUC= Amoxicillin/Clavulanic Acid, PPL= Piperacillin/Tazobactam, CZ= Cefazolin, CRO = Ceftriaxone, FEP = Cefepime, AZ= Aztreonam, EPM= Ertapenem.

Bacterial isolates	MIC (µg/L)							
	IPM	MPM	AK	GM	CIP	LEV	T	TRI
<i>Acinetobacter baumannii</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Enterobacter cloacae</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Escherichia coli</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Citrobacter freundii</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Proteus mirabilis</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Proteus vulgaris</i>	≤1- ≤ 2	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2- ≤ 1≤	≤0.125 - ≤ 1	≤2 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	≤0.25 - ≤ 2	≤0.5 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤160 - ≤ 320

IPM= Imipenem, MPM= Meropenem, AK= Amikacin, GM= Gentamicin, CIP= Ciprofloxacin, LEV= Levofloxacin, T= Tetracycline, TRI= Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

The results of Minimum Inhibitory Concentration of antimicrobials against gram positive bacteria Isolates showed that the MIC of Cefoxitin Screen was (≤ 8 - ≤ 16 µg/mL), the MIC of Benzylpenicillin, Ampicillin, Oxacillin, Gentamicin, Quinupristin/Dalfopristin, Vancomycin and Rifampicin were (≤ 16 - ≤ 32 µg/mL), the MIC of Gentamicin High Level, Streptomycin High Level and Levofloxacin were (≤ 1- ≤ 4 µg/mL), the MIC of Ciprofloxacin was (≤ 0.5 - ≤ 1 µg/mL), the MIC

of Moxifloxacin was (≤ 0.125 - ≤ 1 µg/mL), the MIC of Inducible Clindamycin Resistance was (≤ 0.5 - ≤ 2 µg/mL), the MIC of Erythromycin and Tetracycline were (≤ 8 - ≤ 16 µg/mL), the MIC of Clindamycin and Tigecycline were (≤ 0.25 - ≤ 1 µg/mL), the MIC of Nitrofurantoin was (≤ 64- ≤ 256 µg/mL), the MIC of Trimethoprim/Sulfamethoxazole was (≤ 160 - ≤ 320 µg/mL) table (5).

Table (5): Minimum Inhibitory Concentration of antimicrobials against gram positive bacteria Isolates from diabetic foot ulcer

I. No.	MIC (µg/L)									
	CEF	BEP	AM	OX	GM HL	S HL	GM	CIP	LEV	MOF
1	≤8 - ≤ 16	≤1 - ≤ 8	≤16 - ≤ 32	- ≤ 164≤	≤1 - ≤ 4	≤1 - ≤ 4	≤16 - ≤ 32	≤0.5- ≤1	≤1- ≤4	≤125- ≤1
2	8 - ≤ 4≤	≤1 - ≤ 8	≤8 - ≤ 16	≤8 - ≤ 16	≤1 - ≤ 4	≤1 - ≤ 4	≤16 - ≤ 32	≤0.5- ≤1	≤1- ≤4	≤125- ≤1
3	≤8 - ≤ 16	≤1- ≤ 4	≤8 - ≤ 16	≤8 - ≤ 16	≤1 - ≤ 4	≤1 - ≤ 4	≤16 - ≤ 32	≤0.5- ≤1	≤1- ≤4	≤125- ≤1
4	≤8 - ≤ 16	≤1 - ≤ 8	≤8 - ≤ 16	≤8 - ≤ 16	≤1 - ≤ 4	≤1 - ≤ 4	≤16 - ≤ 32	≤0.5- ≤1	≤1- ≤4	≤125- ≤1

1= *Enterococcus faecalis*, 2= *Staphylococcus aureus*, 3= *Staphylococcus haemolyticus*, 4= *Streptococcus viridans*
 CEF= Cefoxitin Screen, BEP= Benzylpenicillin, AM= Ampicillin, OX= Oxacillin, GMHL= Gentamicin High Level, SHL= Streptomycin High Level,
 GM= Gentamicin, CIP= Ciprofloxacin, LEV=Levofloxacin, MOF= Moxifloxacin.

I. No.	MIC (µg/L)									
	ICLMR	E	CLM	QUP	V	T	TIG	F	RIP	TRI
1	≤0.5 - ≤ 2	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤0.5 - ≤ 1	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤64 - ≤ 256	≤0.5- ≤ 1	≤160 - ≤ 320
2	≤0.5 - ≤ 2	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤16 - ≤ 32	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤64 - ≤ 256	≤16- ≤ 32	≤160 - ≤ 320
3	≤0.5 - ≤ 2	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤16 - ≤ 32	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤64 - ≤ 256	≤16- ≤ 32	≤160 - ≤ 320
4	≤0.5 - ≤ 2	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤16 - ≤ 32	≤16 - ≤ 32	≤8 - ≤ 16	≤0.25 - ≤ 1	≤64 - ≤ 256	≤16- ≤ 32	≤10 - ≤ 20

1= *Enterococcus faecalis*, 2= *Staphylococcus aureus*, 3= *Staphylococcus haemolyticus*, 4= *Streptococcus viridans*.

ICLMR=Inducible Clindamycin Resistance, E= Erythromycin, CLM= Clindamycin, QUP= Quinupristin/Dalfopristin, V= Vancomycin, T= Tetracycline, TIG= Tigecycline, F= Nitrofurantoin, RIP= Rifampicin, TRI= Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

The data in Table (6) shows that Kombucha(KH) tea has effective antibacterial activities on the diabetic foot ulcer isolates as indicated by the diameter of their zone of inhibition. The effect of Kombucha(KH) tea on all isolates was at 7days of incubation, the diameter of inhibition zone was 6mm for *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris* and *Enterococcus faecalis*. 7mm for *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Streptococcus viridans* 8mm for *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The maximum activity of

fermented tea was recorded at 14days incubation of Kombucha(KH) colony against all isolates, the diameter of inhibition zone was 21mm for *Acinetobacter baumannii*, 24mm for *Enterobacter cloacae*, 23mm for *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Streptococcus viridans*, 16mm for *Klebsiella pneumoniae*, 22mm for *Citrobacter freundii* and *Enterococcus faecalis*, 25mm for *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*, 20mm for *Proteus vulgaris*, 26mm for *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity of Kombucha(KH) tea decrease with increase incubation periods (28 days).

Table (6): Antimicrobial activities of Kombucha(KH) tea on bacteria isolated from diabetic foot ulcer

Bacterial isolates	Incubation Periods of Kombucha colonies				
	0day I.Z.(mm)	7days I.Z.(mm)	14days I.Z.(mm)	21days I.Z.(mm)	28days I.Z.(mm)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.0	6.0	21.0	19.0	10.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	7.0	24.0	20.0	11.0
<i>Escherichia coli</i>	0.0	7.0	23.0	20.0	11.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.0	7.0	16.0	20.0	11.0
<i>Citrobacter freundii</i>	0.0	7.0	22.0	18.0	10.0
<i>Proteus mirabilis</i>	0.0	8.0	25.0	22.0	13.0
<i>Proteus vulgaris</i>	0.0	6.0	20.0	13.0	9.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	8.0	26.0	22.0	13.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0	6.0	22.0	19.0	10.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.0	8.0	25.0	22.0	13.0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.0	7.0	23.0	20.0	12.0
<i>Streptococcus viridans</i>	0.0	7.0	23.0	20.0	12.0

I.Z. = Inhibition Zone

DISCUSSION

The diabetic foot ulcer is considered one of the major health problems in the world, and infection is frequent as severe of complications in patients who have sustained ulcer is quite (1). Our finding concerning *P. aeruginosa* as the most common isolate coincides with many previous reports (2,7), but is in contrast to some other studies especially from developed countries which report *S.aureus* as predominant organism (3).

Prevalence of *Pseudomonas spp.* in the diabetic wards may be due to the fact that organism thrives in a moist environment (8). The second most common isolate was *S.aureus*, which is also similar to other studies (7). *Escherichia coli* was the third most common isolate, followed by *Staphylococcus haemolyticus*. In the present study no isolate of β -haemolytic *Streptococci* was seen which is in agreement with the previous studies (7,8), but contrary to findings in other study (24, 25).

Overall, the evaluation results of the newly redesigned colorimetric VITEK-2 ID was so impressed by the performance because more than 98% of the isolates were correctly identified to the species level without any further additional tests. Also, the present results indicated that the current VITEK-2 has overcome its inherent weakness in IDs of streptococci and glucose-nonfermentative GNR. Until present, API test strips has been long considered as the gold standard Q in ID test (3,4). But the accuracy of the VITEK-2 was finally estimated to be 98.3%, compared with 97.5% by the respective API test strips. Our results were highly consistent with a series of evaluation results recently published for GPC (9), GNR (12).

The antimicrobial activities of commercially prepared antibiotics on the bacterial isolates showed, that all isolates were sensitive to quinolones (Ciprofloxacin, Levofloxacin and Ofloxacin) this agree with many references which showed that most bacteria isolated from diabetic foot ulcer were sensitive to quinolones compounds (26, 27). The resistance to other types of antimicrobials differ with different isolates, these are in agreement with (5). The interpretation of

results due to littleness using of Quinolones in Baghdad hospitals compared with other antimicrobials such as Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Gentamicin and Oxacillin.

The results of this study shows that Kombucha(KH) tea has antimicrobial actions against all bacteria isolated from diabetic foot ulcer. Table (3) shows that all the isolates were sensitive to Kombucha tea even at 7 days of incubation. The interpretation of these results may be due to decreased pH of the Kombucha tea with subsequent fermentation time. During the fermentation process, yeasts and bacteria metabolize sucrose into a number of organic acids, such as acetic acid and gluconic acid. Therefore due to an increased concentration of these organic acids, the pH decreased from 5 to 2.5 within 6 days of fermentation and remained stable thereafter. These observations are in agreement with the findings of other studies (13, 16). The inhibition of bacterial growth caused by acid shock (low pH).

The maximum antimicrobial effect of Kombucha tea noted at 14 days of incubation table (3), in this period the largest inhibition zones were recorded, this agree with several references (14-16), which found a slight secondary growth of bacteria found in Kombucha tea observed after 12 days of fermentation, likely this is due to multiplication of acid-tolerant bacterial strains therefore the produce of inhibine increases in this period. Results also showed that the antibacterial activity of Kombucha tea decrease with the increasing incubation periods (28 days) this agree with several references (17, 18) in which interpretation of the results was due to littleness of Carbone source and other nutrients required for Kombucha growth.

The antimicrobial activity of Kombucha under different incubation periods studied against a number of pathogenic microorganisms which causes diabetic foot ulcer, Kombucha had its strongest antimicrobial effects, and this implies the existence of an antimicrobial component other than acetic acid and large proteins. There are numerous reports indicating that the polyphenols/ tannins extracted from tea inhibit a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Among the catechins tested, epigallocatechin, epicatechin gallate, and epigallocatechin gallate have been found to be inhibitory for the growth of *S. aureus* and *V. cholerae* (16). Other studies (17, 18, 20) reported that the extracts of green and black tea can inhibit *Cm. jejuni*, *E. coli*, and *H. pylori*. Recently, [19] have tested the antimicrobial activity of Kombucha as well as normal tea extracts prepared at different concentrations and found that the inhibitory effects of Kombucha increased with the tea concentration. In our studies, the concentration of tea broth was 0.5% for the preparation of Kombucha. The polyphenol/ tannin level in such low concentration of tea was unlikely to have an inhibitory effect against the target microorganisms. Hence, these findings suggest the presence of an antimicrobial compound other than acetic acid, large proteins, and

catechins in Kombucha. Antimicrobial activity increased with fermentation time until 21days (21). As seen in almost all cases tested. This also implies that the active antimicrobial components are very likely metabolites produced by the bacteria and/or yeasts responsible for the fermentation of Kombucha .At present a characterization of antimicrobial compounds is in progress (22).

CONCLUSION

The present study concluded that Kombucha(KH) tea is the best alternative medicine material has very good antimicrobial activity against pathogenic bacteria. We recommend further studies on the possibility on using Kombucha(KH) tea as biological agent in treatment of diabetic foot ulcer.

REFERENCES

1. Manisha J.; Mitesh P., Nidhi S.; Dhara M. and Vegad M. (2012). Spectrum of Microbial Flora in Diabetic Foot Ulcer and its Antibiotic Sensitivity Pattern in Tertiary Care Hospital in Ahmedabad. Gujarat. National. J. Medic. 2(3): 354-357.
2. Rajalakshmi V. and AmsaveniV. (2012). Antibiotic Susceptibility of Bacterial Pathogens Isolated from Diabetic Patients. Int. J. Microbiol. Res. 3(1): 30-32.
3. Ozer B.; Kalaci A.; Semerci E.; Duran N.; Davul S. and Yanat AN. (2010). Infections and aerobic bacterial pathogens in diabetic foot. Afr. J. Microbiol. Res. 4(20): 2153-2160.
4. Colayco CAS.; Mendoza MT.; Alejandria MM. and Ang CF. (2002). Microbiologic and Clinical Profile of Anaerobic Diabetic Foot Infections. Phil. J. Microbiol. Infect. Dis. 31(4): 151-160.
5. Zubair M.; Malik A. and Ahmad J. (2010). Clinico-bacteriology risk factors for the diabetic foot infection with multidrug resistant microorganisms in north India. Biology and Medicine. 2(4): 22-34.
6. Suresh A.; Muthu G.; Srivani R. and Moses A. (2011). Aerobic Bacterial Resistance in Diabetic Foot Ulcer from Chennai. Intern. J. Phar. Bio Sci; 12(2): 517-528.
7. Pappu AK.; Sinha A. and Johnson A. (2011). Microbiological profile of Diabetic Foot Ulcer. Calicut Med. J. 9(3): 1-4.
8. Hayat AS.; Khan AH.; Masood N. and Shaikh N. (2011). Study for Microbiological Pattern and In vitro Antibiotic Susceptibility in Patients Having Diabetic Foot Infections at Tertiary Care Hospital in Abbottabad. World Appl. Sci. J. 12(2): 123-131.
9. Nakasone I.; Kinjo T.; Yamane N.; Kisanuki K. and Shiohira CM. (2007). Laboratory-based evaluation of colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial

- susceptibility testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 191-198.
10. Shetty N.; Hill G. and Ridgway GL. (1998). The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems, and pitfalls. *J. Clin. Pathol.* 51: 316-323.
11. Sönksen UW.; Christensen JJ.; Nielsen L. and Hesselbjerg A. (2010). Fastidious Gram-Negatives: Identification by the Vitek 2 Neisseria-Haemophilus Card and by Partial 16S rRNA Gene Sequencing Analysis. *The Open Microbiol. J.* 4: 123-131.
12. Sellenriek P.; Holmes J.; Ferrett R.; Drury R. and Storch GA. (2005). Comparison of MicroScan Walk-Away, Phoenix and VITEK-TWO Microbiology Systems Used in the Identification and Susceptibility Testing of Bacteria. *J. Microbiol.* 10: 1-4.
13. Talawat S.; Ahantharik P.; Laohawiwattanukul S.; Premasuk A. and Ratanapo S. (2006). Efficacy of Fermented Teas in Antibacterial Activity. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 40: 925-933.
14. Velicanski AS.; Cvetkovic DD.; Markov SL.; Tumbas VT. and Savatovic SM. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Activity of Lemon Balm Kombucha. *APTEFF.* 38: 165-172.
15. Dufresne C. and Farnworth E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International.* 33: 409-421.
16. Sreeramulu G.; Zhu Y. and Knol W. (2000). Kombucha Fermentation and its Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2589-2594.
17. Santos RJ. Jr MSA. Rodrigues LX. and Lima AS. (2009). Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. *J. Microbiol. Biochem. Technol.* 1: 72-78.
18. Četojević-Simin DD.; Velićanski AS.; Cvetković DD.; Markov SL.; Mrdanović JZ.; Bogdanović VV. and Šolajić SS. (2010). Bioactivity of Lemon Balm Kombucha. *Food Bioprocess Technol.* 10: 1-10.
19. Wu Y.; Chen Q.; Ruan H. and He G. (2013). Optimization of Liquid Fermentation Process for Improved Exo-Polysaccharides Production by Kombucha ZJU1. *Adv. J. Food Sci. Technol.* 5(2): 217-224.
20. Jayabalan R.; Chen PN.; Hsieh YS.; Prabhakaran K.; Pitchai P.; Marimuthu S.; Thangaraj P.; Swaminathan K. and Yun SE. (2011). Effect of solvent fractions of Kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian J. Biotech.* 10: 75-82.
21. Jayabalan R.; Subathradevi P.; Marimuthu S.; Sathishkumar M. and Swaminathan K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation. *Food Chem.* 109: 227-234.
22. Ibrahim NK. (2013). Possible Protective Effect of Kombucha Tea Ferment on Cadmium Chloride Induced Liver and Kidney Damage in Irradiated Rats. *Intern. J. Boil. Life Sci.* 9 (1): 7-12.
23. Frebourg NB.; Nouet D.; Lemee L.; Martin E. and Lemeland GF. (1998). Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in *Staphylococci* possessing *mecA*. *J. of Clinic. Microbiol.* 36: 52-57.
24. Sharma VKI.; Khadka PB.; Joshi A. and Sharma R. (2006). Common pathogens isolated in diabetic foot infection in Bir hospital. *Kathmandu Univ. Med. J.* 4(3): 295-301.
25. Khoharo KH.; Ansari S. and Qureshi F. (2009). Diabetic Foot Ulcers: Common isolated pathogens and in vitro antimicrobial activity. *Prof. Med. J.* 16(1): 53-60.
26. Rao N. and Lipsky BA. (2007). Optimizing antimicrobial therapy in diabetic foot infections. *Drugs.* 67: 651-656.
27. Lipsky BA. (2007). Empirical therapy for diabetic foot infections: are there clinical clues to guide antibiotic selection. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 351-353.

AGT gene and ACE gene polymorphism and Their Association with Type 2 Diabetes in Nineveh Province

Owayes M.H. Al- Hassani (1), Mahmood E. Aljuboory (1), Fatima H. Mahmood (2) and Aumama M. Al- Hassani (1)

(1) College of Sciences / Mosul University (2) College of Education for Girls / Mosul University / Republic of Iraq

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2DM) is the most common subtype of diabetes mellitus. A number of studies have examined the role of genetic polymorphisms on the risk of T2DM, and several variants have been identified as potential susceptibility genes, of those angiotensin-converting enzyme (ACE I/D) and angiotensinogen (AGT M235T). The aim of the current study was to investigate the association between genetic polymorphisms of ACE I/D and AGT M235T genes and T2DM in some Iraqi patients. Design and methods: A case control study was performed on 61 Iraqi subjects, 58 T2DM patients with hypertension, and sex matching unrelated healthy controls. Genotyping of the candidate genes were performed by polymerase chain reaction technique (PCR) for ACE I/D gene and by PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) for AGT M235T gene and the presence or absence of the genotypes was analyzed by gel electrophoresis. Results showed the ACE-DD homotype (42.6 %) in T2DM patients was higher in male (48.1 %) compared to female (41.1%), ACE-ID heterotype and D allele were detected in (47.5 %) of T2DM, (48.1 %) in male compared to (44.1%) of female with no statistically significant difference between the two groups, ACE- II genotype was higher in female T2DM (14.5%) than male T2DM patients (3.8%). Conclusion: These data indicate an evident association between genetic polymorphisms of ACE I/D and T2DM in some Iraqi population, Also the result showed absence allele frequency for AGT M235T gene.

Key words: Type 2 Diabetes, ACE gene, AGT gene

المخلص باللغة العربية

يعد داء السكري النوع الثاني أكثر أنواع مرض السكري انتشاراً، وقد اهتم عدد من الدراسات السابقة بالتباين الوراثي الناتج عن الإصابة بهذا المرض ومنها الجين (angiotensin-converting enzyme (ACE I/D) and angiotensinogen (AGT M235T)، وتهدف هذه الدراسة لتحديد العلاقة بين التباين الوراثي للجين ACE I/D والجين AGT M235T مع الإصابة بداء السكر النوع الثاني في المجتمع العراقي، وقد شملت الدراسة 61 مريض بداء السكر النوع الثاني 58 منهم يعانون من ارتفاع ضغط الدم، وتم الاعتماد على تقنية PCR في تحديد التباين الوراثي للجين ACE، كما تم استخدام تقنية RFLP-PCR لتحديد التباين الوراثي للجين AGT، وقد أظهرت النتائج بأن النمط الوراثي ACE/DD كان بنسبة (42.6 %) لدى عينات الدراسة مع ارتفاع النسبة بالذكور التي بلغت (48.1 %) مقارنة بالإناث التي بلغت (41.1%)، كما تبين بأن النمط الوراثي ACE/ID كان بنسبة (47.5 %) في المرضى وكان بالذكور (48.1 %) مقارنة بالإناث (44.1%) دون أي اختلاف معنوي بين المجموعتين، بينما النمط الوراثي ACE/II كان مرتفعاً لدى الإناث المرضى بنسبة (14.5%) مقارنة بالذكور (3.8%)، في حين لم تظهر الدراسة أي تباين وراثي للجين AGT في الموقع M235T لدى المرضى المصابين بداء السكر النوع الثاني في المجتمع العراقي.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a prevalent, chronic condition associated with extensive morbidity, decreased quality of life, and increased utilization of health services. T2DM is a worldwide epidemic with a prevalence that is expected to double by the year 2025, affecting over 5% of the adult population (1). The polygenic nature of T2DM has been a major challenge to identifying genes involved in the pathogenesis of this disease, knowledge that could give rise to new treatments modalities (2,3). Screening of candidate genes for nucleotide variants that are associated with T2DM is a core component of much diabetes genetics research. Several studies have been analyzed to select the candidate genes because of known or presumed biological or physiological functions. The choice of candidates is inevitably limited by incomplete understanding of the regulation of the processes and the pathophysiology of T2DM (4).

The angiotensinogen (AGT) gene encodes the precursor of the vasoactive hormone angiotensin II, which is the effector peptide of the renin-angiotensin system. The protein encoded by this gene, pre- angiotensinogen or angiotensinogen precursor is expressed in the liver and is cleaved by the enzyme renin in response to lowered blood pressure. The resulting product, angiotensin I, is then cleaved by angiotensin converting enzyme (ACE) primarily within the kidney to generate the physiologically active enzyme angiotensin II. ACE found in other tissues of the body has no physiological role (ACE has a high density in the lung, but activation here promotes no vasoconstriction, angiotensin II is below physiological levels of action). Angiotensin II acts as an endocrine, autocrine/paracrine, and intracrine hormone.

A polymorphism in exon 2 of the AGT gene a threonine to methionine substitution at position 235 (M235T), has been associated with essential hypertension (5), diabetic nephropathy (6) and coronary heart disease (7). The ACE polymorphism was identified in 1990 by Rigat *et al.* (8) as one of the best research polymorphisms. This polymorphism of the ACE gene is based on the presence (insertion) or absence (deletion) of a 287-bp AluI element inside intron 16 of the ACE gene on chromosome 17 producing three genotypes (DD, II homotypes and ID heterotype) (9). Several studies have investigated extent of this effect modification on response to ACE inhibitors for different indications such as hypertension (10), diabetic nephropathy (11) and coronary artery disease (12). The aim of this study was to investigate the association between genetic polymorphisms of ACE I/D and AGT M235T genes and T2DM in some Iraqi population.

PATIENTS AND METHODS

Patients:

A total sample of 61 adult T2DM patients (27 male of 28-60 years ages and 34 female of 33-55 years ages) were recruited from the alwafaa center for diabetes in Mosul city, Information regarding the demographic features such as age, marital history, parity, gestational age, family history, consanguinity Detailed, Weight and height were measured to calculate the body mass index (BMI), systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) was measured in a sitting position using mercury column sphygmomanometer.

Methods:

Venous blood samples were collected from each subject in two separate test tubes: one was use for biochemical analysis. The other was collected on EDTA DNA extraction.

Biochemical measurements:

Serum total cholesterol, Triglyceride, high density lipoprotein, low density lipoprotein and fasting blood sugar were done using analyser Commercial kits (Syrbio).

DNA Extraction:

Genomic DNA was isolated from whole-blood samples of all the patients and control subjects using a method described by (13). DNA concentration and purity were determined by measuring the absorbance of diluted DNA solution at 260 and 280 nm using (Bio drop Thermo scientific, England) and detected the optimum DNA concentration for PCR analysis. The quality of the DNA was determined using agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, samples were stored at -20 °C until further use.

Genotyping:

1- ACE I/D polymorphism by PCR:

100 ng of DNA was amplified using Gene Amp PCR system, The primers used were F- 5'CTGGAGACCA CTCCCATCCT TTCT3' and R- 5'GATGTGGCCATCACATT CGTCAGAT3'. PCR conditions were optimized for initial heating for 3 minutes at 94°C followed by 30 cycles of denaturation for 30 seconds at 94°C, annealing at 58°C for 45 seconds, extension at 72°C for 2 minutes and final extension was done at 72°C for 7 minutes. PCR was carried out in a final volume of 25 µl, with master mix from biolaps (14).

2- AGT M235T polymorphism by RFLP-PCR:

100 ng of DNA was amplified using Gene Amp PCR system. The primers used were F-5'AGA GGT CCC AGC GTG AGT GTC-3'; and R-5'AGC CCA CAG CTC AGT TAC ATC-3', PCR conditions were optimized for initial heating for 94°C for 5 min; then heating at 94°C for 1 min and 64 °C for 1 min and extension at 72°C for 1 min over 30 cycles and final extension was done at 72°C for 7 minutes, The PCR products were then digested with restriction endonucleases *Eco* 0109 I, as for 3 hours at 37°C and were analyzed by electrophoresis through a 2% agarose gel (15).

RESULTS AND DISCUSSION

Demographic data of studied groups and the biochemical parameters are shown in tables (1 ,2) below:

Table (1): demographic data of study participants—T2DM patients

Characteristics	Male (means)	Female (means)
Age (years)	28-60	33-55
Family history	70 %	73 %
Duration of diabetes (years)	5.7	7.25
Systolic blood pressure (mm Hg)	12.5	13.5
Diastolic blood pressure (mm Hg)	8.0	10.5
Weight (Kg)	85.6	83.17

Table (2): Biochemical parameters of study participants—T2DM patients

Biochemical measurement	Male (means ±S.E)	Female (means ±S.E)
Fasting blood sugar (mmol/L)	12.9 ± 1.2	13.2 ±0.87
Cholesterol (mg/dl)	124 ± 8.4	139 ±10.3
Triglycerides (mg/dl)	223 ±13.4	192 ± 17.4
HDL cholesterol (mg/dl)	21.5 ± 2.1	20 ±2.2
LDL cholesterol (mg/dl)	57.9 ± 3.4	80.6 ± 7.3

Type 2 diabetes is a complex disorder accounting for about 90–95% of all diabetes syndromes. Despite numerous reports suggesting a substantial genetic contribution to the susceptibility of type 2 diabetes, no major susceptibility genes have been identified so far (16). The aim of the current study was to investigate the association between genetic

polymorphisms of ACE I/D and AGT M235T genes and T2DM in some Iraqi patients. To achieve this goal, ACE I/D and AGT M235T genotyping was performed by PCR and PCR-RFLP technique respectively.

In the present study, ACE I/D genotyping in T2DM revealed that 47.5 % of patients, ACE DD homotype had 42.6 % and ACE II homotypes had 9.8 % in T2DM.

ACE-DD homotype was higher in male (48.1 %) compared to female (41.1%). Similar results was obtained in previous study on Egyptian population which revealed higher frequency of DD genotype in diabetic patients (68 %) (17).

ACE-ID heterotype and D allele were detected (48.1 %) in male compared to (44.1%) of female with no statistically significant difference between the two groups, these result agreement with the results of (18, 19) who reported that the effect of the ID genotype did not reach a statistically significant level suggesting a recessive effect of the D allele and considering the high frequency of D allele in diabetic group an independent risk factor. Other population studies reported association of ACE I/D polymorphism with T2DM, thereby demonstrating geographical and racial/ethnic variations of ACE I/D polymorphism with T2DM (20,21).

ACE- II genotype was higher in female T2DM (14.5%) than male T2DM patients (3.8%) suggesting a protective role for the ACE gene with decreasing incidence for T2DM. This result goes in accordance with the result of Feng on Chinese population with a frequency of 39.8% in diabetic patients (18). Table (3).

Table (3): The frequency of ACE genotypes in T2DM patients

Genotype	Frequency % in all patients	Freq. in male %	Freq. in female %
ACE \ DD (Homozygous)	42.6 %	48.1 %	41.1%
ACE \ ID (Heterozygous)	47.5 %	48.1 %	44.1%
ACE \ II (Homozygous)	9.8 %	3.8%	14.7%

The positive association of ACE-DD genotype with T2DM was demonstrated in patients with diverse ethnic backgrounds such as Malaysian (22), British Caucasian (21), Arab Tunisians (23, 24) a marginally significant association in a recent meta-analysis of a total of 41 studies (4708 cases and 5368 controls) in a Chinese population (25). In contrast, negative association was found in Turkish (26) and Thailand (20). The DD genotype is associated with twice the normal level of serum ACE activity (23). Renin-angiotensin system (RAS) plays a central role in the regulation of sodium metabolism, vascular tone, blood pressure, renal hemodynamics,

and vascular modeling. In diabetes mellitus, activation of the RAS by hyperglycemia may be the key mechanism and effects seem to be amplified with adverse consequences such as atherosclerosis and occlusive microangiopathy. Suggestive evidence for this notion is the impressive beneficial effect of pharmacological interference with the RAS in large vessel disease as well as in renal and retinal microangiopathy (27).

In the current study regarding AGT/M235T gene polymorphism, AGT/MM homotype was significantly higher in all T2DM patients (100%) raising a protective role against occurrence of diabetes. Our results have shown an association between AGT M235T polymorphism and T2DM. Then, the risk of developing diabetes seems to be higher for TT genotype and T allele compared to MM genotype and M allele. Figure (1)

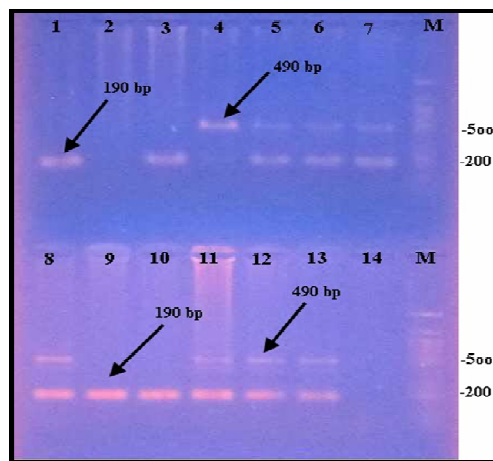


Figure (1): Gel electrophoresis of ACE I/D :
lanes 1,3,9,10 are DD homozygote with single band at 190, lane 4 is II homozygote with one band 490, Lanes 5,6,7,8,11,12,13 are ID heterozygotes with two bands, and lane M is 50 bp marker

AGT M235T polymorphism genotype is caused by replace threonine to methionine substitution at position 235 (M235T) transition was not present in T2DM in some Iraqi patients. Thus it may have a protective role against susceptibility to T2DM. No statistically significant difference. Figure (2).

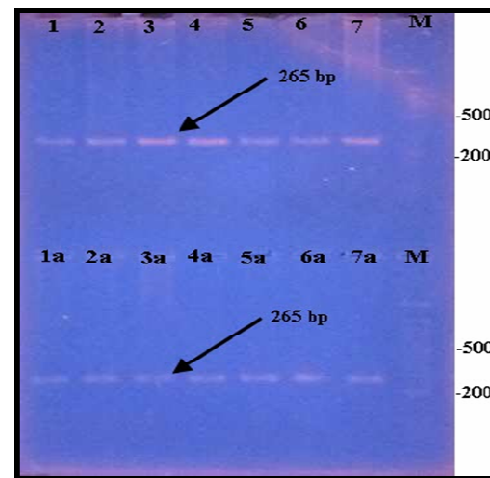


Figure (2): Detection AGT M235T polymorphism by the RFLP – PCR, M ladder, lane (1, 2, 3, 4,5,6,7) undigested PCR product 265 bp and lane (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a) PCR products digested with *Eco 0109 I* enzyme and no M235T mutation

The limitation of our study was the relatively small sample size. The present study could have yielded more consistent results if included more patients and if treatment results were followed in relation to the genotyping. In conclusion, our study provides further evidence of a role for genetic variation in the ACE I/D and AGT M235T polymorphism with risk of T2DM in some Iraqi patients. ACE I/D and AGT M235T polymorphic markers may raise the hope to individualize ACE inhibitor therapy in order to optimize its effectiveness and to reduce adverse effects for genetically different subgroups. Diabetes remains an important focus of investigation.

REFERENCES

1. King H.; Aubert RE. and Herman WH. (1998). Global burden of diabetes 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabet. Care.* 21:1414-31.
2. van Ittersum FJ.; de Man AM. and Thijssen S. (2000). Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:1000-1007.
3. Sameer NS.; El-Atat FA. and Sowers JR. (2004). Pathogenesis of Hypertension in Diabetes. *Rev. End. Metab. Dis.* 5:221-225.
4. Marre M.; Jeunemaitre X. and Gallois Y. (1997). Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-. dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J. Clin. Invest.* 99:1585-1595.

5. Jeunemaitre X.; Soubrier F. and Kotelevtsev YV.(1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 71:169-180.
6. Doria A.; Onuma T.; Gearin G.; Freire BS.; Warram JH. and Krolewski AS. (1996). Angiotensinogen polymorphism M235T, hypertension, and nephropathy in insulin-dependent diabetes. *Hyperten*. 27:1134-1139.
7. Gardemann A.; Stricker J. and Humme J. (1991). Angiotensinogen T174 M and M235T gene polymorphism are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atheros*. 145:309-314.
8. Rigat B.; Hubert C.; Alhencgelas F.; Cambien F.; Corvol P. and Soubrier F.(1990). An Insertion Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels. *J. Clin. Invest*. 86:1343-1346.
9. Tiret L.; Rigat B.; Visvikis S.; Breda C.; Corvol P.; Cambien F. and Soubrier F. (1992). Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am. J. Hum. Genet*. 51:197-205.
10. Nakano Y.; Oshima T.; Watanabe M.; Matsuura H.; Kajiyama G. and Kambe M. (1997). Angiotensin I- converting enzyme gene polymorphism and acute response to captopril in essential hypertension. *Am. J. Hyperten*. 10:1064-1068.
11. Jacobsen P.; Tarnow L.; Carstensen B.; Hovind P.; Poirier O. and Parving HH (2003). Genetic variation in the Renin-Angiotensin system and progression of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol*. 14:2843-2850
12. Zee RYL.; Solomon SD.; Ajani UA.; Pfeffer MA. and Lindpaintner K. (2002). A prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme D/I polymorphism and left ventricular remodeling in the 'Healing and Early Afterload Reducing Therapy' Study. *Clin. Gen*. 61:21-25.
13. Iranpur V. and Esmailzadeh A. (2010). Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4°C for Long Period. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Available at: www.Protocol-online.org.
14. Badr S.; Abd Raboh NR. and Ali S. (2012). Angiotensinogen M235T and angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and their association with type 2 diabetes in Egypt. *Life Sci. J*. 9(2): 1226-1233.
15. Zhang N.; Yang L.; Cui H. and Fu W. (2012). Epidemiological Study of AGT Gene Polymorphism among Chinese Subjects with Primary Hypertension. *Adv. Pharmac. Drug Safety*. 1:2-6.
16. Wang JG. and Staessen JA. (2000). Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur. J. Pharmacol*. 410:289-302.
17. Zarouk WA.; Hussein IR. and Esmaeil NN. (2012). Association of angiotensin converting enzyme gene (I/D) polymorphism with hypertension and type 2 diabetes. *Bratisl. Lek. Listy*. 113(1):14-18.
18. Feng Y.; Niu T. and Xu X. (2002). Insertion/Deletion Polymorphism of the ACE Gene Is Associated With Type 2 Diabetes. *Diabet*. 51(6): 1986-1988.
19. Al-Harbi EM.; Farid EM.; Gumaa KA. and Singh J. (2012). Genotypes and allele frequencies of angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism among Bahraini population with type 2 diabetes mellitus and related diseases. *Mol. Cell. Biochem*. 362:219-223.
20. Nitiyanant W.; Sriussadaporn S.; Ploybutr S.; Watanakejorn P.; Tunlakit M. and Bejrachandra S. (1997). Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in healthy Thais and patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Med. Assoc. Thai*. 80:747-752
21. Stephens JW.; Dhamrait SS.; Cooper JA.; Acharya J.; Miller GJ.; Hurel SJ. and Humphries SE. (2005). The D allele of the ACE I/D common gene variant is associated with Type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. *Mol. Gen. Metabol*. 84:83-89.
22. Ramachandran V.; Ismail P.; Stanslas J.; Shamsudin N.; Moin S. and MohdJas R. (2008). Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst*. 9:208-214
23. Mehri S.; Koubaa N. and Hammami S.(2010). Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes with diabetes type 2 in a Tunisian population. *Life Sci*. 87(1-2):49-54.
24. Hsieh MC.; Lin SR.; Hsieh TJ.; Hsu CH.; Chen HC.; Shin SJ. and Tsai JH. (2000). Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol. Dial. Transplant*. 15:1008-1013.
25. Ding W.; Wang F.; Fang Q.; Zhang M.; Chen J. and Gu Y. (2012). Association between two genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep*. 39(2):1293-303.
26. Degirmenci I.; Kebapci N. and Basaran A. (2005). Frequency of angiotensin- converting enzyme gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients. *Int. J. Clin. Pract*. 59:1137- 1142.
27. Baudin B. (2002). New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin. Chem. Lab. Med*. 40 (3): 256-265.

Cytogenetic and hormonal study for sample of men infertile in Iraq

Mohammad M. F. Al-Halbosi (1), Farah Th. Abdulla (1), Shima Y. Abdulfattah (1), Sabah M. Hussein (2), Baraa A. Abdul Hameed (1), Wathiq Q. Shaker (3) and Fathel A. Hasan (3)

(1) Biotechnology Research Center / Al-Nahrain University / Baghdad (2) Al-Kindy College of Medicine / Baghdad University (3) Higher Institute for the diagnosis of infertility and assisted reproduction techniques / Al-Nahrain University / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The aim of the current study is to analyze the prevalence of chromosomal abnormalities and evaluation of hormonal in a population of Iraqi infertile men. Cytogenetic analysis was performed according to standard methods on cultured cells obtained from the patient peripheral blood. Hormonal assay FSH, LH, PRL and testosterone levels were determined using a non-competitive (sandwich) ELISA. Results showed statically significant ($p \leq 0.05$) increase in FSH level in infertile males with chromosomal aberration when compared with control. Also results revealed significant increase the FSH level in subgroup (Azoospermai) compared with control, while the subgroup (Asthenozoospermai) the results showed statically significant ($p \leq 0.05$) decrease in FSH and LH level comparable with control.

Cytogenetic analysis of the infertile males revealed that chromosomal abnormalities were present in 26 azoospermic and asthenozoospermic cases (52%). Among the chromosomal abnormalities, Numerical abnormalities were present in 2 cases (4%) Klinefelter syndrome 47XXY, and Structural abnormalities were present in 24 cases (48%) most common were breakage and deletion 46XY,Y chromosome 19 cases (38%) and deletion in Y chromosome 5 cases (10%).

The results indicated that hormonal evaluation should be an important part of worked-up in patients with azoospermai and asthenozoospermai also genetic factors and chromosomal abnormalities play a primary role in male infertility and significant etiological factor leading to infertility problems. The overall high prevalence of chromosomal polymorphisms in infertile couples, compared to the normal population, needs to be confirmed with further investigations and larger study populations to delineate the role of "harmless" chromosomal aberrations in the etiology of infertility.

Key words: Chromosomal aberration, hormone, male infertility

الملخص باللغة العربية

هدفت الدراسة الحالية إلى تحليل انتشار الشذوذ الكروموسومي والتقييم الهرموني في عدد من الرجال العراقيين العقيمين. تم إجراء التحليل الوراثي الخلوي وفقاً للأساليب القياسية على الخلايا المزروعة إذ تم الحصول عليها من الدم المحيطي للمريض، وتم قياس مستويات الهرمونات FSH, LH, Prolactin, Testosterone باستخدام فحص الأيلايزا، أظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً في مستوى هرمون FSH في الذكور العقيمين التابعين لمجموعه الانحرافات الكروموسومية Chromosomal aberration مقارنة مع قيم السيطرة وأوضحت النتائج أيضاً ارتفاعاً معنوياً في مستوى هرمون FSH في المجموعه الفرعية Azoospermai مقارنة مع قيم السيطرة في حين أظهرت النتائج للمجموعه الفرعية Asthenozoospermai انخفاضاً معنوي ($P \leq 0.05$) في مستوى هرموني FSH, LH بالمقارنة مع قيم السيطرة. كشف التحليل الوراثي الخلوي للذكور المصابين بالعقم وجود تشوهات كروموسومية لـ 26 حالة حوالي 52% من بين هذه الشذوذ وجود تغيرات عدديه لحالتين (4%) متلازمه كلاينفلتر ذات الطراز الكروموسومي 47XXY كذلك وجود تغييرات تركيبية للكروموسومات في 24 حالة 38% الأكثر شيوعاً وجود كسر وحذف لكروموسوم Y 38% وإيضاً وجود حذف لكروموسوم Y لـ 5 حالات (10%).

INTRODUCTION

Infertility affects an estimated 10-15 % of couples, and male factor infertility represents >50% of cases (1). The fact that chromosomal abnormalities are more prevalent in infertile men compared to fertile men is well established. Several studies reported the prevalence of chromosomal abnormalities in infertile men, from 2% up to 16.6 % with sample range from 72 up to 2600 cases (2, 3). It is estimated that globally, 60–80 million couples suffer from infertility every year; this is an equally important national problem concerning reproductive health. The magnitude of the problem calls for urgent action, particularly when the infertility is avoidable in the majority of cases. The known causes of male infertility are quite numerous but can be grouped into a number of major categories. Male infertility has been associated with several genetic and non-genetic conditions (4).

Genetic abnormalities have been identified in men with unexplained oligozoospermia and azoospermia, including numerical and structural chromosomal abnormalities. Human male infertility is often related to chromosome abnormalities (5). Whereby, chromosomal aberrations have been postulated to be one of the principal genetic factors in male infertility (6). Klinefelter syndrome (XXY) and specific translocations are well-established causes of male infertility (7). The most frequent sperm chromosome anomaly in infertile males is diploidy, originated from either meiotic mutations or by a compromised testicular environment. Genetic factors involved in male infertility manifest as chromosomal disorders, mitochondrial DNA (mtDNA) mutations, monogenic disorders, multifactorial disorders and endocrine disorders of genetic origin(8).

Non-genetic causes of male infertility: Non-genetic causes include hypogonadotrophic hypogonadism, testicular maldescence, structural abnormalities of the male genital tract (obstruction of spermatid ducts, agglutination of sperm), genital infections, impotency, previous scrotal or inguinal surgery, varicoceles, chronic illness, and medication, exposure to chemicals, environmental factors and immunological causes(9).

MATERIALS AND METHODS

A total sample of 50 consecutive infertile males attending the Institute of embryo research and infertility treatment (Infertility clinic) during 2009 to October 2010, were included in this study. The age of these men ranged from 35 - 41 yr with a mean of 39 ± 2.3 yr. of at least 2 years duration of infertility, 20 normospermic males (≥ 20 million sperm/ml) aged 30 - 48 yr with a mean age of 32 ± 1.2 yr were included as control subjects. Relevant information including the patient's age, diagnosis,

sperm count was extracted from the patient's case record. The seminal fluid analysis was done according to the procedure described by the World Health Organization (10). Our subjects were grouped in 2 classes; azoospermia (no spermatozoa) and asthenozoospermia (100% immotile spermatozoa in the ejaculate), all the cases were evaluated cytogenetically.

Cytogenetic analysis:

Chromosomal analysis was performed on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral lymphocyte cultures using standard cytogenetic methods (11, 12). Briefly, blood cells were cultured in RPMI 1640, supplemented by 20% (v/v) fetal bovine serum and 10 μ g/ml phytohaemagglutinin at 37°C. After 68 - 72 hours, colcemid was added to the cells. The cells were incubated at 37°C for about 10 mins. The suspension was centrifuged and the pellets were resuspended in 5 - 10 ml KCl (0.075 M) for about 20 mins at 37°C. After centrifugation, the cells were resuspended in a fixative [methanol: acetic acid, 3:1] and the fixative was replaced for a minimum of three times. Using a Pasteur pipette, drops of the solution were poured onto a slide for morphological studies. The chromosomes were viewed under a phase-contrast microscope to assess metaphase quality and the nuclei. The subjects with abnormalities in their sperm underwent hormonal assessment.

Hormonal assay:

Blood samples were obtained for estimation of testosterone, prolactin (PRL), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Sera were obtained after centrifugation at 1000 g for 10 min. The serum samples were kept at -20 °C until they were analyzed. FSH, LH, PRL and testosterone levels were determined using a non-competitive (sandwich) ELISA kit that manufactured by, with Micro well Strip Reader. The informing consent was signed up by all the patients.

Statistical analysis:

The results obtained were statically analyzed using students t-test and one way ANOVA.

RESULTS

Cytogenetic finding in infertile males:

In 26 out of 50 azoospermic and asthenozoospermic men chromosomal abnormalities were detected .Structural abnormalities was the most common finding, structural aberrations were observed in 24 azoospermic and asthenozoospermic cases; including 5 cases with deletion,19 cases breakage and deletion and Numerical abnormalities were detected in 2

cases azoospermic with 47XXY(Klinefelter syndrome). Table (1).

Table (1): The type of some structural and numerical aberrations in infertile males

No.	Types of aberration	Karyotype
	(Structural)	
No (5)	(a)Deletion	46XY,del (Y)Azoospermia
No (19)	(b)Breakage and deletion	46XY,Ychromosome Azoospermia and asthenozoospermic
	(Numerical)	
No (2)	Klinefelter syndrome	47XXY

Hormonal finding in infertile males:

The results in table (2) showed that the mean level of FSH in infertile males (Patients with chromosomal aberration) with mean age 39 ± 2.3 were 21.1 ± 4.4 . The level showed significant increase ($p \leq 0.05$) against in control 13.8 ± 3.2 with mean age 32 ± 1.2 , also results revealed the mean level of LH, prolactin and testosterone in patients were 8.2 ± 1.7 , 13.1 ± 1.9 , 7.4 ± 1.4 respectively as against 7.5 ± 2.1 , 10.7 ± 1.6 , 7.6 ± 2.3 in control. No significant differences were seen in level of LH, prolactin and testosterone between patients and control ($p \leq 0.05$).

Table (2): FSH, LH, prolactin and testosterone levels between Patients (Chromosomal aberration) and control

Group	Age	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PROLACTIN (mIU/ml)	TESTOSTERON (mIU/ml)
Control	32 ± 1.2	7.5 ± 2.1	13.8 ± 3.2	10.7 ± 1.6	7.6 ± 0.8
Patients (chromosomal aberration)	39 ± 2.3	8.2 ± 1.7	21.1 ± 4.4	13.1 ± 1.9	7.4 ± 1.4

The results on the types of subgroups and mean serum FSH, LH, prolactin and testosterone levels in infertile and control (proven fertile men) groups are presented in table (3). The mean LH and FSH levels (mIU/ml) in azoospermic infertile males were 8.6 ± 0.6 and 19.6 ± 3.2 respectively, whereas in asthenozoospermic, the mean LH and FSH levels were 2.7 ± 0.08 and 4.2 ± 0.9 respectively as against 7.5 ± 2.1 and 13.8 ± 3.2 in controls respectively. FSH levels showed significant increase ($p \leq 0.05$) in azoospermic and significant decrease ($p \leq 0.05$) in asthenozoospermic, while no statistically significant differences in LH level in azoospermic whereas in asthenozoospermic the mean LH significant decrease ($p \leq 0.05$) against control. The mean prolactin values in azoospermic and asthenozoospermic group were 14.7 ± 1.6 ng/ml and 14.8 ± 1.7 ng/ml respectively, while the prolactin level in the fertile control group was 10.7 ± 1.6 , no significant differences observed in both subgroups compared with control.

The mean testosterone values in azoospermic and asthenozoospermic group were 5.7 ± 1.3 ng/ml and 4.8 ± 0.6 ng/ml respectively while the testosterone level in the fertile control group was 7.6 ± 0.8 ng/ml, also in significant differences observed in both subgroups comparable to the control value.

Table (3): Serum FSH, LH, prolactin and testosterone levels in different subgroups of infertile males

Group	Hormonal level (mIU/ml) mean \pm SE			
	LH	FSH	PROLACTIN	TESTOSTERON
Control	7.5 ± 2.1	13.8 ± 3.2	10.7 ± 1.6	7.6 ± 0.8
Patients				
(a)Azoospermic	8.6 ± 0.6	19.6 ± 3.2	14.7 ± 1.6	5.7 ± 1.3
(b)Asthenozoospermic	2.7 ± 0.08	4.2 ± 0.9	14.8 ± 1.7	4.8 ± 0.6

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the evaluation of male infertility, hormonal evaluation is usually done in patients with abnormality in their seminal fluid analysis. Out of 50 patients evaluated, FSH, LH, prolactin and testosterone is useful in management of male infertility (13) for initiation of spermatogenesis and maturation of spermatozoa FSH is necessary. In infertile male higher concentration of FSH is considered a reliable indicator of germinal epithelial damage. Gonadotropin FSH level was significantly elevated in infertile male these results agreements with (14) showed a significant increase in the mean FSH level in infertile male. FSH, LH and testosterone are prime regulators of germ cell development, the quantitative production of spermatozoa generally requires the presence of FSH, LH and testosterone. FSH acts directly on the seminiferous tubules whereas LH stimulates spermatogenesis indirectly via testosterone; FSH plays a key role in stimulating mitotic and meiotic DNA synthesis in spermatogonia (15). Chromosomal abnormalities have also been reported to be as one of genetic factors contributing to male infertility (16). Male infertility may be caused by a variety of chromosomal abnormalities, including aberrations in the sex chromosomes and autosomes, gain or loss of an entire single or more chromosomes, resulting in aneuploidy or structural anomalies, as in balanced and unbalanced translocations. (17-19,5). Some authors who had investigated chromosomal anomalies, specifically among patients with severe oligospermia and azoospermia, have shown higher figures such as 20.86% (20) and 21.1% (21). Sex chromosome aberrations are the most frequent chromosome related cause of infertility (22). Klinefelter syndrome is the most common one and is associated with severe spermatogenic failure causing a marked reduction in testicular size and azoospermia resulting in childlessness. Some researchers have reported male infertility among patients with deletion of chromosome Y (23), with ring chromosome Y and with isochromosome X (24).

Although, some authors have shown male infertility amongst patients with either mos 46, XX/46, XY or mos45, X/46, XY (25). Many researchers have reported a lower frequency of chromosome anomalies among the infertile men. In the present investigation, we found 52% of our referred male patients with chromosome abnormalities. The reason is that our patients were a highly selected group; our patients had passed through many filters. They were physically examined and tested by urologists, endocrinologists, immunologists, and all necessary laboratory tests such as semen analysis, hormonal screening.

REFERENCES

1. Bhasin S.; Krester DM. and Baker H W. (1994). Pathophysiology and natural history of male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1525-1529.
2. Pandiyan N. and Jequier A M.(1996). Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum. Reprod.* 11: 2604-2608.
3. Vincent MC.; Daudin M.; De MP.; Massat G.; Miesusset R.; Pontonnier F.; Calvas P.; Bujan L. and Bourrouillout G.(2002).Cytogenetic investigation of Minireview infertile men with low sperm counts: A25-year Experience. *Androl.* 1: 18-22.
4. Gorduza EV.; Stoica O. and Covic M. (2003). The importance of genetic factors in pathogenesis of central infertility (hypothalamic and pituitary. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 107: 28-34.
5. Akgul M.; Ozkinay F. and Ercal D. (2009). Cytogenetic abnormalities in 179 cases with male infertility in Western Region of Turkey: Report and review. *J. Assist. Reprod. Gen.* 26: 119-122.
6. Azimi C.; Khaleghian M. and Farzanfar F. (2012). Cytogenetic studies among Iranian infertile men: The first 20-year long-term report. *Afr. J. Biotechnol.* 11: 8973-8978.
7. Frouzandeh M.; Saeideh S. and Sanaz M. (2010). Chromosomal Abnormalities in Infertile Men Referred to Iran Blood Transfusion Organization Research Center. *J. Reprod. Infertil.* 11:175-178.
8. Dada R. and Gupta NC. (2004). Yq microdeletions-Azoospermia factor candidate genes and spermatogenetic arrest. *J. Biomolecul. Tech.* 15: 176-183.
9. Khan MS.; Subhan F.; Kazi BM.; Tahir F.; Dil AS. and Ali I. (2004). Semen parameters and hormonal profile of infertile patients. *Hamdard. Med. XLVII:* 48-51.
10. World Health Organization (1992). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction.3rd edition Cambridge: Cambridge University Press.
11. Barch MJ.; Knutsen T. and Spurbeck JL. (1997).The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 3rd Ed. Philadelphia, Lippincott-Raven.
12. Gosden CM.; Davidson C. and Robertson M. (1992). Lymphocyte culture. In: Rooney DE, Czepulkowski BH, editors. *Human Cytogenetics: A Practical Approach*. IRL Press Ltd. Oxford, UK. 31-54.
13. Zabul J.; Mierzejewski W. and Rogoza A. (1994).Usefulness of examination gonadotropin hormones and testosterone in men with abnormal semen. *Ginekolo-pol.* 65: 71-74.
14. Yanam O.; Ozdiler E.; Seckiner I. and Gogus O.(1999). Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int. Urol. Nephrol.* 31: 519-523.
15. Anderson RA.; Wallace EM.; Groom NP.; Bellis AJ. and Wu FC. (1997). Physiological relationships between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Hum. Reprod.* 12: 746-751.
16. Navenkar P.; Desai K.; Hinduja I. and Zaveri K.(2005). Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *Indian J. Med. Res.* 122: 34-42.
17. Vutyavanich T.; Piromlertamorn W.; Sirirungsri W. and Sirisukkasem S. (2007). Frequency of Y chromosome microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azoospermia. *Asian J. Androl.* 9: 68-75.
18. Balkan M.; Tekes S. and Gedik A. (2008). Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with oligozoospermia and azoospermia in Southeast Turkey. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25: 559-565.
19. Riccaboni A.; Lalatta F.; Caliani I.; Bonetti S.; Somigliana E. and Ragni G. (2008). Genetic screening in 2710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *Fertil. Steril.* 89: 800-808.
20. Zhou H.; Zhu JW.; Li HG. and Tang YP. (2009). Genetic defect in Chinese azoospermic patients and their relationship with reproductive hormones. *Zhonghua. Chuan. Zhi.* 26: 427-430.
21. Ng PP.; Tang MH.; Lau ET.; Ng LK.; Ng EH. and Tam PC. (2009). Chromosomal anomalies and Y-microdeletions among Chinese subfertile men in Hong Kong. *Hong Kong Med. J.* 15: 31-38.
22. Rajangam S.; Tilak P.; Aruna N. and Devi R. (2007). Karyotyping and counseling in bad obstetric history and infertility. *Indian J. Reprod. Med.* 5: 7-12.
23. Rosenbusch B. (2010). Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. *J. Gen.* 89: 105-108.
24. Pasinska M.; Haus O.; Skonieczka K.; Slezak R. and Midro AT. (2006). The results of cytogenetic and molecular genetic examinations in 35 couples with primary sterility. *Wiad. Lek.* 59: 38-43.
25. Clementini E.; Palka C.; Iezzi I.; Stuppia L.; Guanciali-Franchi P. and Tiboni GM. (2005). Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 20: 437-442.

HLA Class-I Molecules in Iraqi Thalassaemia Patients

Lazem H. Al- Taei (1), Batool H. Al-Ghurabi (2) and Abid J. Dager (3)

(1) Dept. of microbiology / College of Medicine / Al- Nahrain University (2) College of Dentistry / Baghdad University (3) Lab. of tissue typing / Al- Karama Teaching Hospital / Republic of Iraq

ABSTRACT

Genetic factors were found to play a crucial role in development of thalassemia and several lines of evidence suggest a genetic predisposition and associations have been demonstrated with HLA antigens. This study was established to investigate the relationship between HLA class-I antigens (HLA-A and HLA-B) and major beta-thalassaemia. Microlymphocytotoxicity assay has been used to assess HLA-typing of 150 blood samples of 100 thalassaemic patients and 50 healthy normal control. Comparison between thalassaemic patients and healthy control groups revealed positive significant associations of HLA-A3, B35 and B49 antigens with patients ($P=0.021$, 0.011 and 0.023 respectively). Another interesting finding in this study was the significant low frequency of HLA-A2 in patients when compared with healthy control ($P=0.009$). These findings demonstrate that HLA-A3, B35 and B49 might play a role in major β -thalassaemia susceptibility. Whereas HLA-A2 could be confer protective effects against disease.

Key words: Thalassaemia, Genetic factors, HLA

الملخص باللغة العربية

لقد وجد أن العوامل الوراثية تلعب دوراً حاسماً في تطور الثلاسيميا، وهناك العديد من الدلائل التي تشير إلى أن الاستعداد الوراثي و الارتباط قد تم إثباته مع مستضدات الخلايا البيضاء البشرية. صممت هذه الدراسة للبحث عن وجود ارتباط بين مستضدات الخلايا البيضاء البشرية الصنف الأول (أ و ب) مع البيتا ثلاسيميا. وقد تم استخدام فحص سمية الخلايا لاختبار تنميط التوافق النسيجي لمجموع 150 عينة دم، 100 كانوا مرضى الثلاسيميا و 50 من الأصحاء كمجموعة سيطرة. أظهرت المقارنة بين مجموعة مرضى الثلاسيميا و مجموعة الأصحاء الضابطة ارتباطاً معنوياً موجباً لكل من المستضدات (أ3 و ب35 و ب49) مع مجموعة المرضى (قيمة الاحتمالية أقل من 0.021، 0.011 و 0.023 على التوالي). بينما أظهر المرضى الأكراد زيادة معنوية في تكرار ب 53 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (قيمة الاحتمالية أقل من 0.009). نتيجة أخرى مهمة في هذه الدراسة هي وجود انخفاض معنوي في تكرار (أ2) لدى المرضى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (قيمة الاحتمالية أقل من 0.009). إن الدراسة الحالية تشير إلى أن زيادة تكرار (أ3 و ب35 و ب49) في المرضى ربما يلعب دوراً في خطر التعرض للإصابة بهذا المرض، بينما (أ2) قد يضيف أثراً وقائية ضد الثلاسيميا.

INTRODUCTION

The thalassaemia are a group of genetic (inherited) blood disorders that share in common one feature, the defective production of hemoglobin, the protein that enables red blood cells to carry oxygen (and carbon dioxide). The most familiar type of thalassaemia is beta thalassaemia (1). Major β -thalassaemia, is a genetic defect that causes reduced or absent β -globin synthesis, results in an imbalanced accumulation of α -globin chains and ineffective erythropoiesis with hemolysis (2).

According to several observation, attention has been directed to the belief that a genetic background plays a crucial role in determining susceptibility to major β -thalassaemia. The importance of participating genetic factors in this disease is observed by increase the frequency of specific genetic markers such as certain human leukocyte antigen (HLA) in patients group than in general population (3-5). Several studies in different areas were undertaken to test the possibility of association between this disease and one or several of the HLA-Ags, as suggested by Mohyeddin and colleagues (6). Positive association with the HLA-A2 and B46 was reported in central Thailand thalassaemia patients (7), while other study reported by Pollack *et al.*, revealed that the frequency of HLA-Bw35 was increased among both Caucasian's patients and their parents (8). Moreover, In China, a study conducted by Chow and associates on patients with thalassaemia revealed that HLA-A11 was significantly less frequent in their patients than the normal Chinese population (9).

The present study was conducted to shed light on the possible association of HLA class I antigens (HLA-A and HLA-B) with major β -thalassaemia.

PATIENTS AND METHODS

The present study included 100 Iraqi thalassaemic patients (55 females and 45 males). They were attending to Al-Karama teaching hospital compared with 50 healthy age and sex were matched control group. Typing for HLA-A and B antigens was carried out in the HLA-typing laboratory of Al-Karama teaching hospital. Microlymphocytotoxicity assay has been applied for HLA-typing (Class I positive and negative control antisera, Biotest, Germany) as described by Terasaki and McClelland (10).

Statistical Analysis:

Univariate analysis had been applied for the data depending on logistic regression and the results were reported as odds ratio (ORs), which represented the increased or decreased risk for thalassaemia.

RESULTS

The frequencies of the distribution of class I HLA-Ags (No., %, OR, inverse OR, P) were shown in tables (1 & 2) for thalassaemic patients as compared with health control groups. A survey of the distribution of HLA-A and HLA-B frequencies yielded a significant positive association between class I antigens and thalassaemic patients. For instance HLA-A3, B35 and B49 antigens were observed with increased frequencies in patients (24, 19 and 14% respectively) versus healthy control (12, 8 and 2% respectively), with P-values (0.021, 0.011 and 0.023 respectively). On the contrary, there was significant decrease in the frequency of HLA-A2 in patients when compared with healthy control (P=0.009), as clearly shown in table (1).

Table (1): Antigens frequency of the HLA-A (% , OR, inverse OR) of the thalassaemic patients and healthy control.

HLA antigen	Healthy Control (N=50)		Thalassaemic cases (N=100)		OR	Inverse OR	P	EF	PF
	N	%	N	%					
HLA-A									
1	15	30.0	19	19.0	0.8	1.3	NS	**	0.067
2	29	58.0	38	38.0	0.4	2.6	0.009	**	0.354
3	6	12.0	24	24.0	4.3	**	0.021	0.207	**
9	3	6.0	4	4.0	0.7	1.5	NS	**	0.032
10	1	2.0	3	3.0	1.5	**	NS	0.010	**
11	5	10.0	19	19.0	0.7	1.5	NS	**	0.032
22	0	0.0	1	1.0	1.5	**	NS	0.010	**
23	2	4.0	5	5.0	0.8	1.2	NS	**	0.011
24	10	20.0	15	15.0	0.9	1.1	NS	**	0.011
25	1	2.0	2	2.0	1.0	**	NS	**	**
26	3	6.0	14	14.0	0.9	1.1	NS	**	0.011
28	4	8.0	7	7.0	0.7	1.5	NS	**	0.032
29	3	6.0	2	2.0	0.3	3.1	NS	**	0.041
30	3	6.0	11	11.0	0.9	1.1	NS	**	0.011
31	2	4.0	3	3.0	0.7	1.3	NS	**	0.010
32	2	4.0	7	7.0	1.0	**	NS	**	**
33	2	4.0	7	7.0	1.0	**	NS	**	**
Blank	7		181						

**=Null

Regarding the correlation between the specific HLA-Ags (HLA-A2, A3, B35 and B49) and ABO blood group (A, B, AB and O) in patients, the present study revealed no significant correlation between these specific antigens with blood group in thalassaemia patients (table 3).

Table (2): Antigens frequency of the HLA-B (% , OR, inverse OR) of the thalassaemic patients and healthy control

HLA antigen	Healthy Control (N=50)		Thalassemic cases (N=100)		OR	Inverse OR	P	EF	PF
	N	%	N	%					
HLA-B									
4	0	0.0	8	8.0	3.3	**	NS	0.022	**
5	3	6.0	10	10.0	0.8	1.3	NS	**	0.066
6	0	0.0	10	10.0	1.0	**	NS	**	**
7	0	0.0	3	3.0	3.6	**	NS	0.023	**
8	7	14.0	9	9.0	0.7	1.5	NS	**	0.032
13	0	0.0	5	5.0	6.9	**	NS	0.051	**
14	4	8.0	4	4.0	0.6	1.7	NS	**	0.043
15	1	2.0	5	5.0	2.0	**	NS	0.020	**
16	0	0.0	2	2.0	2.6	**	NS	0.012	**
17	2	4.0	9	9.0	3.3	**	NS	0.022	**
18	5	10.0	11	11.0	3.1	**	NS	0.041	**
21	1	2.0	2	2.0	1.0	**	NS	**	**
27	3	6.0	9	9.0	0.6	1.6	NS	**	0.023
35	4	8.0	19	19.0	3.4	**	0.011	0.207	**
37	3	6.0	1	1.0	0.3	3.1	NS	**	0.041
38	5	10.0	12	12.0	0.9	1.1	NS	**	0.011
39	1	2.0	1	1.0	0.5	2	NS	**	**
40	2	4.0	1	1.0	0.2	4.1	NS	**	0.030
41	3	6.0	1	1.0	0.3	3.1	NS	**	0.041
44	6	12.0	11	11.0	0.9	1.1	NS	**	0.011
45	1	2.0	3	3.0	1.5	**	NS	0.010	**
47	1	2.0	0	0.0	0.2	6.1	NS	**	**
49	1	2.0	14	14.0	10.8	**	0.023	0.163	**
50	1	2.0	3	3.0	1.5	**	NS	0.010	**
51	7	14.0	17	17.0	1.2	**	NS		
52	1	2.0	0	0.0	0.2	6.1	NS	**	**
53	3	6.0	5	5.0	0.8	1.2	NS	**	0.011
54	0	0.0	0	0.0	0.5	2	NS	**	**
55	1	2.0	7	7.0	0.5	1.8	NS		
56	1	2.0	0	0.0	0.2	6.1	NS	**	**
57	1	2.0	4	4.0	2.0	**	NS	0.020	**
60	0	0.0	5	5.0	6.9	**	NS	0.051	**
62	1	2.0	1	1.0	0.5	2	NS	**	**
63	1	0.0	0	0.0	0.2	6.1	NS	**	**
65	0	0.0	3	3.0	3.6	**	NS	0.023	**
67	0	0.0	1	1.0	1.5	**	NS	0.010	**
70	1	2.0	0	0.0	0.2	6.1	NS	**	**
73	0	0.0	1	1.0	1.5	**	NS	0.010	**
Blank	29		3						

**=Null

Table (3): HLA-A and HLA-B allele's frequency according to different blood groups

Major β -Thalassemic cases- Blood group	No.	Total (%)	HLA-A2 antigen No. (%)	P-vlue
A	33	33.0	11 28.9	NS
B	29	29.0	13 34.2	NS
AB	6	6.0	2 5.2	NS
O	32	32.0	12 31.5	NS
Total	100		38	
			HLA-A3 antigen No. (%)	
A	33	33.0	8 33.3	NS
B	29	29.0	4 16.6	NS
AB	6	6.0	2 8.3	NS
O	32	32.0	10 41.6	NS
Total	100		24	
			HLA-B35 antigen No. (%)	
A	33	33.0	6 31.5	NS
B	29	29.0	2 10.5	NS
AB	6	6.0	0 0.0	NS
O	32	32.0	11 57.8	NS
Total	100		19	
			HLA-B49 antigen No. (%)	
A	33	33.0	4 28.5	NS
B	29	29.0	6 42.8	NS
AB	6	6.0	1 7.1	NS
O	32	32.0	3 21.4	NS
Total		100	14	

DISCUSSION

Susceptibility to thalassaemia is partially genetically determined and the HLA genes are candidates for a role in genetic susceptibility to thalassaemia, because their products play a central role in immune response (11).

In the present study, there was a significant association of HLA-A3 with thalassaemia patients ($p=0.021$) as compared with healthy. This result is in agreement with the result of (12) who revealed that HLA-A3 is significantly associated with thalassaemia patient, moreover, they mentioned that patients with high frequency of HLA-A3 have decrease the risk of acute graft-versus-host disease, but increased risk of this disease in thalassaemia patients was associated with high frequency of HLA-A11 and HLA-A26.

Interesting finding of this study was the higher expression of HLA-A2 in healthy controls which account for 58.0% versus 38.0% in patients, this antigen acted as protective against the development of thalassaemia, therefore this antigen present in high frequency in healthy control group. This result is at variance with the result of (7) who found that HLA-A2 is significantly more frequent in central Thailand thalassaemia patients when compared with control group. Other Iranian study showed that HLA-A9 was significantly more frequent in thalassaemia patients compared to the healthy Iranians normal population, as well as this study was observed that the frequencies of HLA-A11 and A19 were significantly less in thalassaemia (6). On the other hand Nikbin and associates showed a significant decrease in the frequency of HLA-A10 in 77 thalassaemia patients compared to 100 healthy Iranians (13).

Regarding the presence of HLA-B antigens and its proposed association with CRC, extensive studies were conducted on HLA-B locus, to give contradicting results. In this study the increasing in frequency of HLA-B35 and B49 were statistically significant in thalassaemia patients [$p=(0.011)$, (0.023)] compared to healthy control. Similarly Nikbin and colleagues noted an increased frequency of HLA-B35 in thalassaemia patients and their family members (13).

This result is at variance with some other studies (6,13), which lack such association between (B35 and B49) and this disease, while reporting positive association with other antigens of HLA-B. For instance, Mohyeddin *et al.*, who studied the differences between thalassaemia and healthy controls using HLA markers and they noticed that B17 was increased while B27 and B41 were decreased in thalassaemic cases, this suggest that this disease may be under genetic control.

Nikbin *et al.* (13) showed a significant increase in the frequency of HLA-B7 and B17 and a decrease in the frequency of HLA-B27 and B51, in 77 thalassaemia patients compared to 100 healthy Iranians. In contrast other study from Italy (14) was carried out on 479 families, each with a proband

affected by homozygous beta-thalassaemia, who were typed for HLA antigens. They did not find any significant differences in HLA allele, haplotypes and genotypes between affected and healthy children. In most of the previous researches done on thalassaemia patients, a lot of focus was devoted to association of MHC antigens with thalassaemia disease. For this reason, different alleles have been reported from various populations. In conclusion these finding demonstrate that HLA-A3, B35 and B49 might play a role in major β -thalassaemia susceptibility, whereas HLA-A2 could be confer protective effects against disease.

REFERENCES

1. Gaziev J. and Lucarelli G. (2005). Stem cell transplantation for thalassaemia. *Reprod. Biomed. Online*. 10: 111–115.
2. La Nasa G.; Giardini C.; Argioli F.; Locatelli F.; Arras M.; De Stefano P. *et al.* (2002). Unrelated donor bone marrow transplantation for thalassaemia: the effect of extended haplotypes. *Blood*. 99: 4350–4356.
3. Bao R.; Chen C.; Fang IP. and Huang SL. (2002). Association of the relationship between HLA-DQB1 alleles and major beta-thalassaemia in 42 Guangdong. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 10(1): 87–88.
4. Kremastinos DT.; Flevari P.; Spyropoulou M.; Vrettou H.; Tsiapras D. and Stavropoulos-Giokas CG. (1999). Association of Heart Failure in Homozygous β -Thalassaemia with the Major Histocompatibility Complex. *Circul*. 100:2074–2078.
5. Sabloff M.; Chandy M.; Wang Z.; Logan BR. and Ghavamzadeh A. (2011). HLA-matched sibling bone marrow transplantation for β -thalassaemia major. *Blood*. 117: 1745–1750.
6. Mohyeddin M.; Alijanipour P.; Alimoghaddam K.; Ghavamzadeh A.; Khosravi F. and Nikbin B. (2004). Is there any Greater Possibility in Finding HLA-identical Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donors among Thalassaemia Families for Transplantation of Thalassaemia Patients? *IJHOBMT*. 1(1): 24–31.
7. Chiewsilp P.; Sujirachato K. and Mongkolsuk T. (2000). Preliminary study of HLA-ABC DR antigens in cml, ANLL, thalassaemia and severe aplastic anemia in Thais. *J. Med. Assoc. Thai*. 83(1): 5130–5136.
8. Pollack MS.; Levine LS.; Oberfield SE. and Markenson AL. (1982). HLA-A, B, C, and DR antigen frequencies in relation to development of diabetes and variations in white cell antibody formation in highly transfused thalassaemia patients. *Transfus*. 22(4):279–282.
9. Chow MP.; Hsu HC.; Yung CH.; Chau WK.; Peng HW. and Tsay SH. (1990). Hemoglobin H disease complicated iron overload and HLA expression in Chinese. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 23(3):248–252.

10. Terasaki P. and McClelland J. (1994). Microdroplet assay of human serum cytotoxines. *Nat.* 204:998-1000.
11. McPherson ME.(2009). HLA Alloimmunization in Pediatric Sickle Cell Disease and Thalassemia Major: Prevalence and Risk factors. Master thesis, Faculty of the Graduate School of Emory University.
12. Bonab MM.; Alimoghaddam K.; Vatandoust S.; Forouzia F. and Ghavamzadeh A. (2004). Are HLA antigens a risk factor for acute GVHD in thalassemic patients receiving HLA-identical stem cell transplantation ?*Transplant.* 36(10): 3190-3193.
13. Nikbin B. and Salamat F. (1992).The relationship between HLA class I and II antigens and major beta-thalassemia in Iran. Master Thesis, Tehran University of Medical Sciences.
14. Contu L.; Arras M. and Mulargia M. (1992).Study of HLA segregation in 479 thalassemic families. *Tissu. Antig.*392: 58-67.

The effect of gender on the high grade vesicoureteric reflux among Kurdish children in Duhok

Nadir A. Garjees, Akrem M. Al- Atrushi, and Kadir M. Salih

College of Medicine / University of Duhok

ABSTRACT

Vesicoureteric reflux (VUR) is the retrograde flow of urine from the bladder into the ureter. It occurs in 1-3% of children and may be associated with 7-17% of end-stage renal disease in children. In 30-40% of children with urinary tract infection (UTI), vesicoureteric reflux is detected. High grade VUR is associated with decreased resolution rate and increased prevalence of renal scar. The recurrence of UTI is especially high in females with high grade VUR. Gender, age and the number of UTIs influence the chance of spontaneous resolution of high grade VUR.

The study aims to describe the characteristics of patients with high grade VUR with special attention to gender-specific differences among Kurdish children in Duhok, North of Iraq.

In the period from June 2008 to September 2011, 117 patients were studied all of whom had recurrent UTIs and high grade (III, IV and V) VUR and they were followed up in Heevi Hospital in Duhok North of Iraq. The patients were classified in terms of sex, age, grade, unilateral/bilateral and the associated bladder dysfunction and urinary tract abnormalities. Comparison of proportions between genders was assessed by statistical analysis using Chi square, Odds ratios and P values to assess gender-specific differences.

Seventy-three (62.39%) were female and 44 (37.61%) were male. Of all the patients studied, 59 (50.42%) had unilateral VUR versus 58 (49.58%) who had bilateral VUR. Male gender was found to be significantly related to unilateral VUR (OR=1.12). Grade III VUR predominated among the studied patients 63 (53.84%) and both grade III and V predominated in the male. The largest age group of patients was that between 5 and 10 years. Male gender is significantly related to the underfive patients while female predominated in the older age groups. Neurogenic bladder and hydronephrosis were detected in 36 patients (30.76%) with significant relation to the male gender. The study concluded that high grade VUR is more common in female with recurrent UTIs. In the male, unilateral high grade VUR predominates in contrast to female where bilateral high grade VUR predominates. Grade III VUR is more common than grades IV and V and both grades III and V are significantly related to male gender. Male predominated in the underfive patients while in the older patients females were more significantly affected. Neurogenic bladder and hydronephrosis are significantly related to male gender.

Key words: Neurogenic bladder, VUR

المخلص باللغة العربية

يقصد بانعكاس البول الرجوع الانعكاسي للبول من المثانة الى الحالب. تحدث هذه الحالة عند 1-3% من الاطفال وتكون مصحوبة بانتهيار وظيفة الكلية في 7-17% من الحالات. يحدث انعكاس البول عند 30-40% من الاطفال المصابين بالالتهابات المتكررة للمجاري البولية. انعكاس البول من الدرجة العالية يكون مصحوبا بارتفاع نسبة ندب الكلية. تكرار التهاب المجاري البولية شائع عند الاناث المصابات بانعكاس البول من الدرجة العالية. امكانية الشفاء الذاتي لانعكاس البولي من الدرجة العالية يتأثر بالعمر و الجنس وعدد التهابات المجاري البولية.

تهدف هذه الدراسة الى وصف خصائص المرضى المصابين بانعكاس البول من الدرجة العالية مع تركيز خاص على الاختلافات المرتبطة بالجنس عند الاطفال الاكراد في مدينة دهوك شمال العراق، في الفترة الواقعة بين حزيران 2008 و ايلول 2011 حيث تمت دراسة 117 مريض مصاب بالتهاب المجاري البولية المتكرر مع انعكاس البول من الدرجات الثالثة و الرابعة و الخامسة وذلك في مستشفى هيفي في دهوك. تم تصنيف المرضى حسب جنس المريض و عمره و درجة الانعكاس و جهته (احادي او ثنائي الجانب) وكذلك وجود او عدم وجود اضطراب وظيفي في المثانة و تشوهات المجاري البولية. تمت مقارنة النتائج بين الجنسين لتحمين الاختلاف بين الجنسين باستخدام Chi-square و Odds ratio.

ثلاث وسبعون من المرضى كانوا من الاناث (62.39%) . من بين جميع المرضى 59 مريضا (50.42%) عندهم انعكاس بولي احادي الجانب والباقي ثنائي الجانب. الجنس الذكري مرتبط بشكل هام بالانعكاس الاحادي الجانب (OR=1.12). الانعكاس من الدرجة الثالثة كان الاكثر شيوعا حيث وجد عند 63 مريض (53.84%). الانعكاس من الدرجتين الثالثة و الخامسة هو السائد عند الذكور. المجموعة العمرية السائدة هي 5-10 سنوات. الجنس الذكري مرتبط بشكل هام بالعمر دون 5 سنوات بينما الجنس الانثوي ارتبط بالاعمار الاكبر. المثانة العصبية و توسع حوض الكلية وجد عند 36 مريض (30.76%) مع ارتباط هام بالجنس الذكري، ويستنتج من ذلك أن الانعكاس البولي من الدرجة العليا اكثر شيوعا عند الاناث المصابات بالتهاب المجاري البولية المتكرر. الانعكاس احادي الجانب من الدرجة العالية هو السائد على عكس الاناث حيث الانعكاس ثنائي الجانب هو السائد. الانعكاس من الدرجة الثالثة اكثر شيوعا من الرابعة و الخامسة. يوجد ارتباط هام بين الانعكاس من الدرجتين الثالثة و الخامسة والجنس الذكري. الجنس الذكري هو السائد عند المرضى دون الخامسة بينما الجنس الانثوي هو السائد عند المرضى الاكبر من 5 سنوات. المثانة العصبية و توسع حوض الكلية مرتبطان بشكل هام بالجنس الذكري.

INTRODUCTION

Vesicoureteric reflux (VUR) is the retrograde flow of urine from the bladder into the ureters. It occurs in approximately 1-3% of children and is associated with 7-17% of children diagnosed with end-stage renal disease world-wide (1-4).

An estimated 30-40% of children under the age of 5 years who develop urinary tract infections (UTI) have VUR (4,5). Primary VUR in children is frequently attributed to an abnormally short intravesical tunnel at the ureterovesical junction (6). High grades of reflux are associated with decreased resolution rates and increased prevalence of renal scars (7,8).

A strong inheritance pattern exists for primary VUR. The chance of a sibling of a child with VUR also having reflux is about 25% and the offspring of affected individual has 27-51% increased risk of having reflux (9). It is found that 10-20% of patients with reflux nephropathy develop hypertension and end stage renal disease and the most severe damage is sustained by recurrent UTIs (10).

Vesicoureteric reflux is an important risk factor for recurrent UTIs especially when it is of high grade (11,12). The rate of recurrence is especially high in female with high grade VUR (13,14). Gender as an isolated variable is a poor predictor of clinical outcome in an unselected series of primary VUR. Although boys had a more severe pattern at a baseline, girls had a greater risk of dysfunctional voiding and recurrent UTI during follow up (14).

It is now evident that there is a sex difference in the development of reflux nephropathy. In most males with reflux nephropathy, the kidneys are congenitally abnormal. In females, it is an acquired condition, the most severe damage being sustained by recurrent UTI (10). Endoscopic treatment is the preferred treatment modality and it is found that there is a direct relation between cure rate after endoscopic treatment of grade III, IV and V and severity of ureteral dilation. Other factors implied in the endoscopic resolution of VUR include the existence of voiding dysfunction, bilateral reflux and renal damage detected by DMSA at the time of diagnosis. Gender, age and number of infections during follow up have to influence the probability of cure of grade III and IV VUR treated with suburethral injection of biocompatible substances (15).

Aim of the study

The aim of this study is to describe the characteristics of high grade vesicoureteric reflux in Kurdish children with recurrent urinary tract infections with special attention to the gender-specific differences among the patients.

PATIENTS AND METHODS

In the period between June 2008 and September 2011, all the patients with high grade vesicoureteric reflux (grade III, IV and V) in Heevi Teaching Hospital in Duhok were studied. Their number was 117 cases. These cases were classified in terms of sex, age, grade of VUR, unilateral/bilateral VUR and the associated neurogenic bladder and hydronephrosis. Comparison of proportion between genders was assessed by statistical analysis of the results using Chi square, P values and Odd ratios to assess gender-specific differences.

RESULTS

A total sample of 117 patients were studied. Forty four (37.61%) were male and 73 (62.39%) were female. All of them had recurrent UTIs and were put on prophylactic Nitrofurantoin. In 59 cases (50.42%), VUR was unilateral while in 58 cases (49.58%) it was bilateral. The sex distribution is shown in table (1).

Table (1): Sex distribution of unilateral and bilateral VUR

	Unilateral VUR	Bilateral VUR
Male	23 (52.27%)	21 (47.73%)
Female	36 (49.32%)	37 (50.68%)

$OR=1.12$, $P=0.04$

This shows that male gender is significantly related to unilateral VUR as compared to female. Among the studied cases, grade III was found in 63 cases (53.84%), grade IV was found in 42 cases (35.89%) while grade V in 12 cases (10.25%). Table (2) shows sex distribution of the grades.

Table (2): Sex distribution of the grades of VUR

	Grade III	Grade IV	Grade V
Male	23 (52.27%)	15 (34.09%)	6 (13.63%)
Female	40 (54.79%)	27 (36.98%)	6 (8.21%)

For grade III, $OR=1.03$, for grade IV $OR=0.96$, for grade V $OR=1.73$

This shows that male gender is significantly associated with grades III and V rather than grade IV. The age of patients at the time of the study was classified into 3 age groups; less than 5 years (37 cases 31.62%) 5 to less than 10 years (49 cases 41.88%) and 10-15 years (31 cases 26.49%). The sex distribution of these age groups is shown in table (3).

Table (3): Sex distribution of age groups of patients with VUR

	Less than 5 years	5 to less than 10 years	10-15 years
Male	17 (38.63%)	15 (34.09%)	12 (27.27%)
Female	19 (26.02%)	34 (46.57%)	20 (27.39%)

For the first age group OR=2.02 while for the second and third groups OR= 0.73 and 0.67 respectively. So the male gender is significantly related with the age of less than 5 years

Among the cases studied, 36 (30.76%) had associated abnormalities of urinary tract; 4 cases (11.11%) had neurogenic bladder, 24 cases (66.66%) had hydronephrosis and 8 cases (22.22%) had both neurogenic bladder and hydronephrosis. Table (4) shows the sex distribution of the associated abnormalities.

Table (4): Sex distribution of the associated neurogenic bladder and hydronephrosis

	With abnormalities	Without abnormalities
Male	18 (40.9%)	26 (29.65%)
Female	18 (59.09%)	55 (75.35%)

OR=2.11 , P=0.02

This shows that male gender is a significant risk factor for the association with neurogenic bladder and hydronephrosis.

DISCUSSION

In this study we found male:female ratio of 0.6:1 which shows significant predominance of female. This ratio differs from what was found in other parts of the world. In Spain male: female ratio was 2.9:1 in one study (15) and 1.25:1 in another (16). In the United Kingdom, the ratio was much lower 0.28:1 (17), while in Sweden, one study found the ratio to be 2.28:1 (18) and another found it 0.58:1 (13). A study in France found male: female ratio to be 0.64:1 (19), which approximates the ratio in our study. From this we can find a great variability in sex ratio and this is mostly due to the variation in the selection of patient samples.

Unilateral high grade VUR in our study is a bit more common than the bilateral one 50.42% vs 49.58%. This is close to the results of a study done in Bangladesh where the result was 53% vs 47% (20), while greatly differs from a Swedish study where the bilateral high grade VUR represented 70% of cases (18) and a Spanish study which also showed bilateral to be more common 55.6% vs 44.4% (15). Statistical analysis of our study revealed that male gender is associated with predominance of unilateral high grade VUR (OR=1.12, P=0.04) while female gender is associated with bilateral high grade VUR. This in contrast to what was found in a Brazilian study

where gender was not significantly associated with this aspect (14).

The severity of high grade VUR in our study varied where the commonest grade is grade III (53.84%). In a Swedish study the result was higher (62%) (13) and even a higher result (72%) was found in a study done in Bangladesh (20). Thus, generally grade III VUR is more common than the higher grades. Gender related analysis of the results showed significant relation of the male gender to grades III and V VUR (OR=1.03, 1.73 respectively) versus predominance of grade IV in female. A similar result was found by a Brazilian study (14), while no significant sex difference in the predominance of grade III VUR was found in a Spanish study (15).

Patients with age between 5 years and less than 10 years predominated in this study while in the study done in Bangladesh the underfives predominated (20) which mostly points to the delay in diagnosis of VUR in our region. Male gender is significantly related to high grade VUR in the age group of underfives (OR=2.02) in contrast to the female predominance in the older age groups indicating that high grade VUR is earlier diagnosed in male underfives in our region. A French study showed a similar result (19), while a Spanish study showed the contrary (16).

Neurogenic bladder and hydronephrosis were found in 36 patients (30.76%). This is similar to what was found in the studies done in France (19), Spain (17) and Sweden (12) and this proves the importance of the association of high grade VUR with these two abnormalities. A gender-specific analysis shows the strong relation of male gender to these abnormalities and a similar relation was proved to be present in other studies (14,15), while in another study female gender was found related to these abnormalities (16).

CONCLUSION

In this study, we concluded that high grade VUR is more common in female. In males unilateral high grade VUR is a bit more common while in female bilateral high grade VUR predominates. Grade III is more common than grades IV and V in the whole studied population while both grade III and V are more common in male. Most affected patients aged 5-10 years while among underfives males predominated. Neurogenic bladder and hydronephrosis were detected in 30.76% of cases predominantly in male.

REFERENCES

1. Cooper CS.; Chung BI.; Kirsch AJ.; Canning DA. and Snyder HM. (2000).The outcome of stopping prophylactic antibiotics in older children with vesicoureteric reflux. J. Urol. 163:269-273.

2. Garin EH. (2006). Clinical significance of primary vesicoureteric reflux and urinary antibiotic prophylaxis after acute pyelonephritis: a multicenter randomized controlled study. *Pediatr.* 117:626-636.
3. Craig JC.; Irwig LM.; Knight JF. and Roy LP. (2000). Does treatment of vesicoureteric reflux in childhood prevent end-stage renal disease attributable to reflux nephropathy? *Pediatr.* 105:1236-1241.
4. Hodson EM.; Wheeler DM.; Smith GH.; Craig LC. and Vimalachandra D. (2007). Interventions for primary vesicoureteric reflux. *Cochrane Database of Systemic Reviews.* Issue 3. Art. No. : CD 001532. doi: 10.1002/14651158. CD 001532. pub.3.
5. Baker R.; Maxted W.; Maylath J. and Shumen I. (1966). Relation of age, sex and infection to reflux: data indicating high spontaneous cure rate in pediatric patients. *J. Urol.* 95: 27-32.
6. Paquin AJ. (1959). Ureterovesical anastomosis. The description and evaluation of technique. *J. Urol.* 82:573-583.
7. Elder JS. (1991). Pediatric vesicoureteric reflux Guidelines Panel Summary report on management of primary vesicoureteric reflux in children. *J. Urol.* 157:1846-1851.
8. Schwab CW. (2002). Spontaneous resolution of vesicoureteric reflux: a 15-year perspective *J. Urol.* 168:2594-2599.
9. Pirker ME.; Colhoun E. and Puri B. (2006). Renal scarring in familial vesicoureteric reflux: Is prevention possible? *J. Urol.* 176:1842-1846.
10. Blumenthal I. (2006). Vesicoureteric reflux and urinary tract infection in children. *Postgrad. Med. J.* 82(963):31-5.
11. Patrick A. Avital C. and Theoklis Z. (2007). Recurrent urinary tract infection in children. *JAMA.* 298(2):179-186.
12. Dias CS.; Silva JM.; Diniz JS.; Lima EM.; Maciano RC. and Trivelato AL. (2010). Risk factors for recurrent urinary tract infection in a cohort of patients with primary vesicoureteric reflux. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29(2):139-144.
13. Brandstram P.; Esbjorner E.; herthelius M.; Swerkerson S. and Hansson S. (2010). The Swedish reflux trial in children III: Urinary tract pattern. *J. Urol.* 184(1):289-291.
14. Silva JM.; Oliveira CA.; Diniz JS.; Cardoso LS.; Vergara RM.; Vasconcelos MA. and Sauto DE. (2006). Gender and vesicoureteric reflux: a multivariate analysis. *Pediatr. Nephrol.* 21(4):510-516.
15. Mendez R.; Somaza I.; Tellado MG.; Liras J.; Sanchez-abuin A.; Pais E. and Vela D. (2006). Vesicoureteric reflux Grade III-IV: Factors involved in the efficacy of endoscopic treatment in pediatric patients. *Arch. Esp. Urol.* 59(2):155-167.
16. Izquierdo RM. and Luque MR. (2008). Evaluation of the lower urinary tract infection in pediatric patients with primary vesicoureteric reflux. *Arch. Esp. Urol.* 61(2):191-207.
17. Smellie JM.; Jodal U. and Lax H. (2001). Outcome at ten years of severe vesicoureteric reflux managed medically: Report of International Reflux Study in Children. *J. Pediatr.* 139(5):656-663.
18. Sjoester S.; Sillen U.; Bachelard M.; Hansson S. and Stokland E. (2004). Spontaneous resolution of high grade infantile vesicoureteric reflux. *J. Urol.* 172(2):694-698.
19. Sandrene L.; Sebastien V.; Anis L.; Hubert D. and Albert B. (2009). Vesicoureteric reflux in children with urinary tract infection: comparison of diagnostic accuracy of renal ultrasound criteria. <http://radiology.rsna.org/content/225/3/890.short.rss>. Received July 25
20. Muinuddin G; Rahman H.; Hussain MM.; Jahan S. and Begum A. (2008). Urinary tract infection and vesicoureteric reflux in children. *Mymensingh. Med. J.* 17(2):528-531.

The Effect of Nano thin film gold on bacteria using cold plasma sputter

Anwar M. E. Al- Faydhi, Hiyam A. Al-Taii and Dilshad S. Ismael

College of Sciences / Mosul University / Republic of Iraq

ABSTRACT

A new and special physical mechanism for Synthesizing Gold Nano particles purely and directly was used to deposit it directly on a bacteria surface to study the effect of the Gold particles in Nano scales on the bacterial behavior according to the effect of antibiotic, pH and temperature on the bacteria and compare it to the effect of the gold without using chemical methods or assisting agents (catalysis) in Synthesis of them. For this purpose, two types of bacteria have been selected, gram negative *Escherichia coli* (*E.coli*), and gram positive *Staphylococcus*. Twelve Types of antibiotics were used. Results shows that the bacterial susceptibility to antibiotics were changed by Gold deposition, but each antibiotics had its manner of activity, on other hand the Gold deposition in Nano scale decrease bacterial activities when grown in different pH value and temperature rates. Concluding that Gold Nano particle have marked effect on bacteria without changing the size of the bacterial cell, and bacterial sensitivity variable to each antibiotic particularly.

Key words: Plasma coating, Gold, bacteria *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, antibiotic, Nano thin film

الملخص باللغة العربية

تم استخدام آلية فيزيائية خاصة و جديدة لتحضير جزيئات الذهب بإبعاد النانو بصورة نقية وترسيبه بشكل مباشر على سطح البكتيريا، لدراسة تأثير جسيمات الذهب النانوية على سلوك البكتيريا من خلال تأثير المضادات الحيوية، و الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة ومقارنة هذه التأثيرات للذهب بدون استخدام الطرق الكيميائية أو العوامل المساعدة (المحفزة) لتحضيرها، ولهذا الغرض تم اختيار نوعين من البكتيريا ، إحداهما سالبة الغرام (*E.coli*) ، وأخرى موجبة الغرام (المكورات العنقودية الذهبية). في هذا البحث استخدم اثنتا عشر نوعا من المضادات الحيوية. ولوحظ من النتائج أن استجابة البكتيريا للمضادات الحيوية قد تغيرت بعد ترسيب الذهب ، و لكن فعالية كل مضاد حيوي اختلفت عن الأخرى ، ومن ناحية أخرى نلاحظ هبوطا في نشاط البكتيريا المرسب عليها الذهب بأبعاد النانو عند زرعها بأوساط زرعية ذات قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني وتحطينها بدرجات حرارة مختلفة. تم الاستنتاج بان جسيمات الذهب النانوية اتسمت بتأثير واضح على البكتيريا دون ان تغيير من حجم الخلية البكتيرية ، وكذلك حساسية البكتيريا تجاه المضادات الحيوية تتغير حسب نوع المضاد الحيوي.

INTRODUCTION

Modern researches are interested in materials that have effective Nano scale such as Gold and Silver because of their natural and chemical characteristic, which led the researchers to investigate and study these elements in a frame called Nano technology, which have favorable applications in many fields like medicine. El-Sayed received a National Medal of Science in chemistry for his work in Nano technology by treating skin cancer in laboratory animals by using very small and ultramicroscopic (Nano rods) bars of gold and Silver in finding cancer cells and attaching to these cells then applying low energy laser ray on the bars, which become hot enough to destroy the diseased cells without causing any damage to the healthy cells of the body (1). The Nano technology researches include all metalloids and crude materials, but Gold and Silver have a medical property in which the body cannot resist them when these Nano particles penetrate the living cells easily. Many researches used a Nano particles on different types of bacteria and bounding it (2-4), so it's used in treating and diagnosing bacteria through specialized protein agent that bind to the cell wall (selective interaction) (5). Because Gold and Silver Nano particles have the ability to breakdown the bacterial cell wall revealing the poisoning effect of the Nano particles on the bacteria such as *E.coli* and *Staphylococcus aureus* through breaking down there cell wall (6).

Most of these studies that have been done in this field are using the chemical methods as a solutions to prepare Nano Gold particles through using assisting agents which bind between the Gold Nano particles and the bacteria, or synthesis of Gold Nano particles by Using Leaf Extract of Tephrosia purpurea (7).

The current study used a special physical mechanism to synthesis Gold Nano particles purely and directly and deposit it directly on the bacteria to study the effect of the Gold particles in Nano scales on the bacteria without using chemical methods or assisting agents (catalysis) in Synthesis. The susceptibility changes against antibiotics and physiological environments such as pH and temperature for two bacterial species were studied. *S.aureus* representative of Gram positive and *E.coli* for Gram negative.

MATERIALS AND METHODS

The bacterial isolates have been obtained from laboratories of biology department, section of Microbiology, college of science, university of Mosul, in pure culture and retested to confirm its purity and cultural characteristics. The deposition of Gold Nano particles on bacteria is performed, by using cold plasma deposition device (Sample Preparation System, Quorum Technology, made in UK. Model:Q150R, for different deposition thickness (1 to 15 nm) with limited pressure which

the devise works at it (1×10^{-1} mBar) and constant depositing current.

Drop of recently growing bacteria in nutrient broth (CFU/ml) Loaded on small Petri dish (3.5X1.2 cm) in aseptic condition, the dish placed in the depositing device. So that the Gold Nano particles deposit on it in different circumstances.

The bacteria that filmed with Gold nanoparticles were swapped by sterilized cotton swap and inoculated in nutrient broth, the growth of bacteria was judged by turbidity after incubation at 37C for 24hrs.

The susceptibility of examined bacteria for antibiotics were tested according to NCCLS (8). Table (1) shows the antibiotics and their concentrations.

Table (1) : Antibiotics

No	Name	Symbol	Concentration
1	AMOXICILLIN	AX	25 mcg
2	Ampicillin/oxacillin	APX	(25/5) mcg
3	CARBENICILLIN	PY	25 mcg
4	CEFOTAXIME	CTX	10 mcg
5	CEFTRIAXONE	CRO	10 mcg
6	CEPHALOTHIN	KF	30 mcg
7	IMIPENEM	IPM	10 mcg
8	METHICILLIN	ME	10 mcg
9	OXACILLIN	OX	10 mcg
10	PENICILLIN G	PY	10 U
11	PIPERACILLIN	PRL	30 mcg
12	Vancomycin	VA	10 mcg

The test organisms were screened against 12 antibiotics, before and after deposition of Gold nano particles, according to NCCLS Document M100-S17 (8).

The sizes of the zones of inhibition were interpreted by referring to standards of the NCCLS M100-S17. The organisms were reported as either susceptible or resistant to the agents that have been tested. In order to investigate the effects of pH value and temperature rates turbidity test were used. Table (2).

Table (2): The effects of pH and temperture

Group	Temp./ C ⁰	pH
1	37	3
2	37	9
3	37	7
4	45	7
5	45	7

Then, the tubes are placed in the incubator for 24h. Measuring bacterial growth rate through turbidity degree of the medium, which is measured by using visible spectroscopy (Libra S4-seril No. 114908 - manufactured by Biochrom Ltd, Cambering CB4 OFJ England), from its absorption rate the growth rate is measured and the results are compared. All used culture mediums are production of (Lab M Limited 1 Quest Park, Moss Hall Road, Heywood, Lancashire BL9 7JJ, United Kingdom) company.

Sputter Coating:

Deposition of Gold Nano particles on bacteria by using a device made for preparing samples in form of metal slide with Nano size by cold plasma deposition system in the presence of Argon gas, in which Nano particles is generated and placed on the target as shown in figure(1).

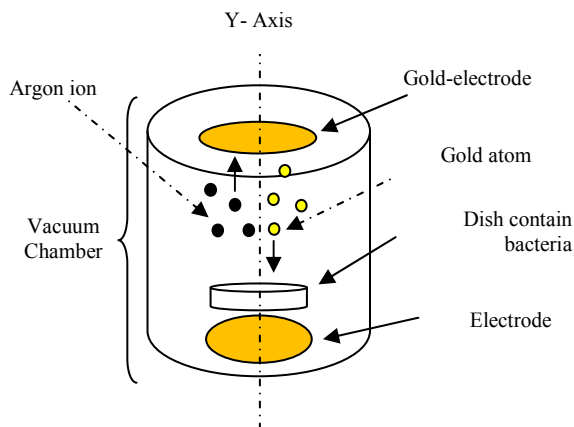


Figure (1): deposition chamber

The system composed of a cylinder vacuum room contain two vertical electrical electrodes the upper electrode covered by a layer of pure Gold sheet which represent the cathode electrode, and the lower electrode represent the anode electrode. When applying potential between these two electrodes the inert Argon gas (heavy atoms) is entered to the vacuum room become ionized to produce cold plasma. The Argon ions accelerated toward the Gold sheet and by hitting it, Gold atoms ejected to deposit on to the surface of bacteria within coating unit. A major disadvantage of simple sputter coaters is the excessive amount of heat generated in the sample. To overcome this problem, permanent magnets are utilized to deflect the high energy electrons generated in the glow discharge away from the sample. The magnetic lines of force cause enclosed loops at the cathode surface, increasing the interaction path length of the high energy electrons in the discharge (13). Deflection and retardation of electrons result in increased ion yield and sputtering efficiency. The bacteria is placed in a dish between the two electrodes as a target for Gold atoms to deposit on it, at room temperature in low plasma

current (50 mA) in order to form well regulated Gold grains in Nano scale. The thickness of deposited Gold atoms can be measured by using specialized crystal detector in Nano scale, called Film Thickness Monitor (FTM). This device is made to measure and control deposition thickness from 1 to 2000 nm (*Quorum Technology*).

RESULTS AND DISCUSSION

Gold particles have been deposited on two types of recently grown bacteria by cold plasma in different Nano scales from (1 to 15 nm), under pressure (1×10^{-1} mBar), and to test the effect of the Gold particles on the bacteria, sensitivity change of bacteria against antibiotics is used, for this purpose 12 types of antibiotics is used as we mentioned previously, and observed the bacteria grows at three specific temperature degrees (4, 37, 45 °C) and three specific pH rates (3, 7, 9).

Antibiotic test:

It has been noted that sensitivity of the 12 antibiotics to the bacteria *Staphylococcus aureus* after deposition of Gold Nano particles revealed different behavior, generally its divided to three group according to how its change inhibition zone with increasing Gold deposition thickness on the bacteria, first group includes (AX, KF, PRL, PY) second group includes (OX, P, AX, ME) and third group includes (IPM, VA, CTX, CRO).

In figure (2), the inhibition zone area of the first antibiotic group increased by increasing Gold deposition thickness. The inhibition zone area of the third antibiotic group decrease by increasing gold deposition thickness as in figure (3).

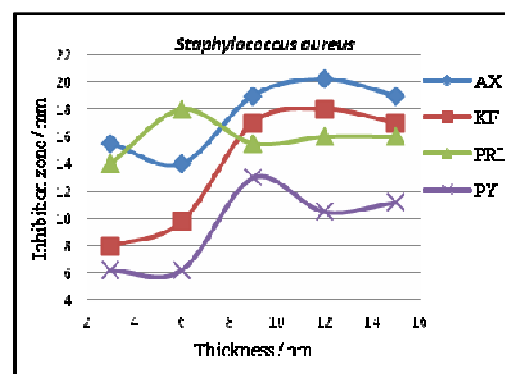


Figure (2): change in sensitivity of *Staphylococcus aureus* with first antibiotic group by increasing Gold deposition thickness

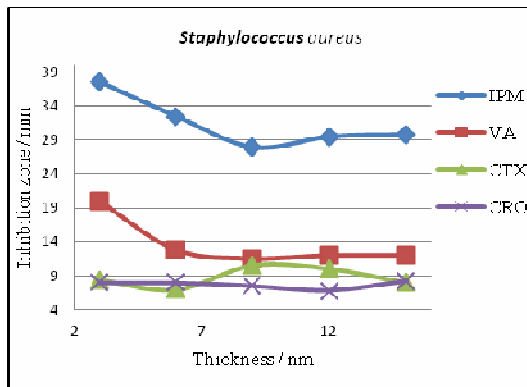


Figure (3): change in sensitivity of *Staphylococcus aureus* with third antibiotic group by increasing Gold deposition thickness

For the sensitivity of *E-coli* bacteria of three types of antibiotics only (IPM, CTX, CRO) and the resistance of the other (9) antibiotics, the activity of the bacteria did not changed by the other 9 antibiotic after deposition of Gold. As shown in figure (4) in which inhibition zone area of (IPM, CTX, CRO) antibiotics increased by increasing Gold deposition thickness from (1 to 6 nm) then decreased from (9 to 15 nm).

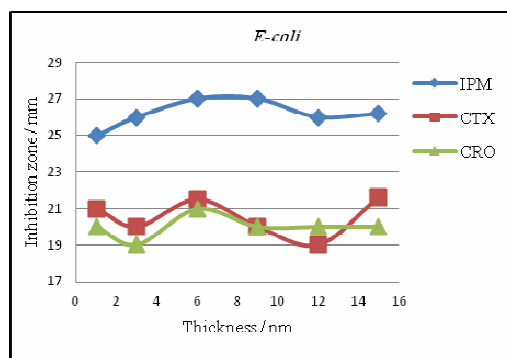


Figure (4): change in sensitivity of *E-coli* with antibiotics by increasing Gold deposition thickness

The reason of this bacterial behavior may due to the existence of Nano Gold particles across the negatively charged cell wall to the cell or the attachment of the particles to the cell wall that change the reactions of the antibiotics to the bacteria due to changes in the cell wall composition (10), this factor appear according to the type of antibiotic used so the effect of any antibiotic must be studied on many types of bacteria after deposition of the particles as a result of a chemical reaction between the antibiotic and the bacterial cell wall on the other hand the chemical composition of the antibiotic and presence of subgroups such as presence of Sulfate and Nitrogen that combined with Gold (14).

Bacterial resistance to heavy metals (Au) (appeared sometimes) is due to some genes on plasmid DNA where there is a relationship between resistance to antibiotics and heavy metals as in reference (15).

Figure (5) shows changes in inhibition zone of the antibiotics of the three groups with four situation of *Staphylococcus aureus* circumstances (control, bacteria under vacuum condition, bacteria under gold deposition circumstances, and deposition of Gold on bacteria with thickness 9nm) the effect of Gold deposition on bacteria is obvious when compared with the control, and the other two situations have effect on the bacteria but we do not mention its effect on bacteria at Gold deposition in different scales because the pressure and deposition circumstances in terms of waves and presence of Argon gas is stable (constant) during deposition process. Generally, Gold Nano particles deposition lead to slightly decreasing bacterial activity as a result of attachment or entrance of Gold particles to negatively charged cell wall that lead to decreasing potency of the cell wall for the transmission of substances between the bacterial cell and its surrounding.

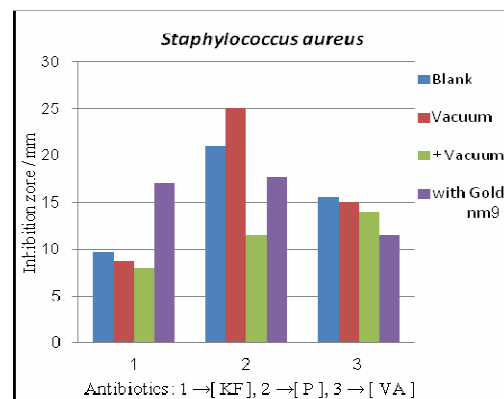


Figure (5): changes in inhibition zone of the antibiotics of the three groups with four situations of *Staphylococcus aureus* circumstances

Figure (6) shows change in inhibition zone of the antibiotics on *E-coli* for circumstances control and deposition of Gold atoms. We note that Gold Nano particles deposition lead to slightly decreasing *E-coli* activity as a result of close encounter of Gold particles to negatively charged cell wall that lead to decreasing potency of the cell wall for the transmission of substances between the bacterial cell and its surrounding (16). This observation agreement with Chatterjee, which showed that the Gold Nano particle nontoxic nature on *E. coli*. Chatterjee noted the length of *E-coli* increase when add gold and iron oxide Nano particles (17). But in this research the size of *E-coli* not changes because of adding the Gold atoms is done directly without using any chemical agents as shown in figure(7).

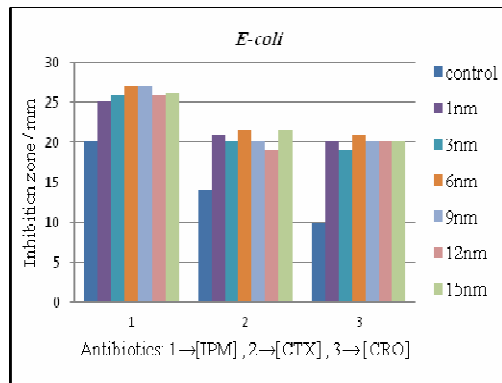


Figure (6): changes in inhibition zone of the antibiotics for E-coli by deposition of Gold Nano layer

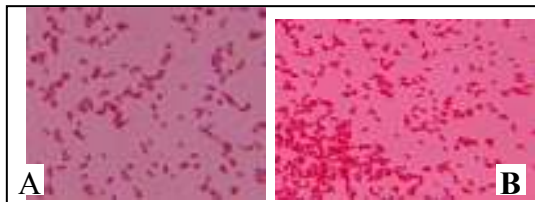


Figure (7): E-coli bacteria a-before gold Nano layer deposition b-after gold Nano layer deposition (9 nm). (Magnification, 100X).

pH test:

After gold deposition on bacteria that have been grown in three different pH rates, acidic, neutral, alkaline (3, 7, 9).

From figure (8) we note that they grow best at pH degree 7, also we note that when the deposition thickness increased, the absorption (representing bacteria growth) decreased. The bacterial growth is decreased means the Gold decrease the bacterial activity as a result of attachment or entrance of Gold particles to negatively charged cell wall (18), and decreasing potency of the cell wall for the transmission of substances between the bacterial cell and its surrounding (19).

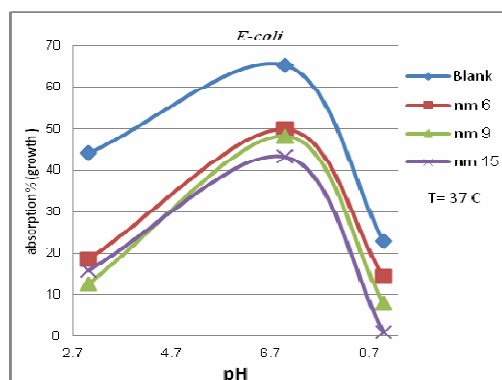


Figure (8): growth of E-coli in different pH rate and Gold deposition

Temperature test:

The effect of grown temperature was also studied in three different temperature degrees (4, 37 and 45 C⁰). Figures (9 and 10) of both types of bacteria revealed that the best grow was at 37 C⁰, also that increasing the deposition thickness may result in decreasing absorption, i.e. the decrease of the bacterial activity.

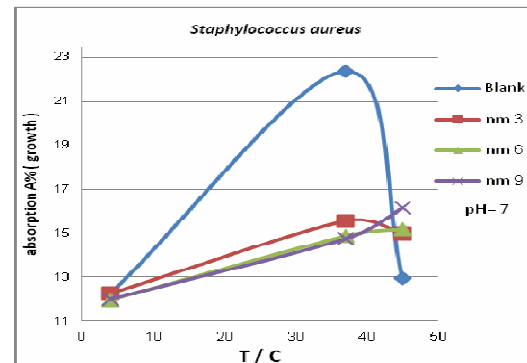


Figure (9): growth of Staphylococcus aureus in different temperature and Gold deposition

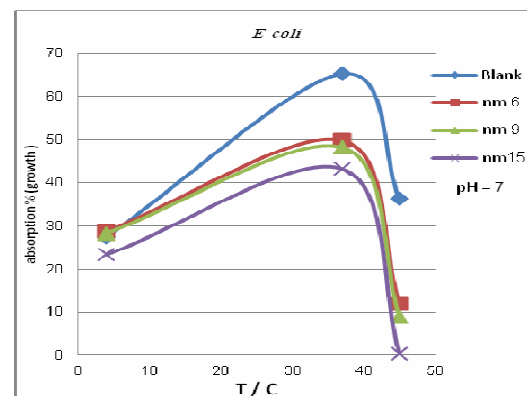


Figure (10): growth of E-coli in different temperature and Gold deposition

CONCLUSION

Plasma sputter coating could be used as a special physical mechanism to Synthesis Gold Nano particles purely and directly and deposit it directly on some bacteria's surface to study the effect of the Gold particles in Nano scales on the bacteria without using chemical methods or assisting agents (catalysis) in Synthesizing them. This Nano layer yields changes in bacteria's growing activity according to some applied physical parameters. Gold Nano particle have marked effect on bacteria without changing the size of the bacterial cell, and bacteria sensitivity change to each antibiotic particularly.

Acknowledgment

The authors would like to thank the University of Mosul, college of Science for the support of this project. Many thanks go also to the anonymous reviewers.

REFERENCES

1. El-Sayed H. and El-Sayed MS.(2006). Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 239: 129–135.
2. Cardoso VH.; Goncalves DL.; Angioletto E.; Pizzol F. and Streck EL. (2007). Microwave disinfection of gauze contaminated with bacteria and fungi. *Indian J. Med. Microbiol.* 25(4):428-429.
3. Zawrah MF. and Abd El-Moez SI. (2011). Antimicrobial Activities of Gold Nanoparticles against Major Foodborne Pathogens. *Life Sci. J.* 8(4): 37-44.
4. Ferraro MJ. (2003). Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6TH Ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards. Volume 23 Number 2.
5. Zharov VP. (2006). Photo thermal Nano therapeutics and Nano diagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nano particles. *Biophys. J.* 90:619- 627.
6. Zhou Y. (2012). Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and bacillus Calmette. *J. Nano biotechnol.* 12: 10-19.
7. Jisha ER. (2012). Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of Tephrosia purpurea And Study of Their Antibacterial Effect. *Int. J. Pharm.Tech. Res.* 4(3): 1323-1331.
8. Chatterjee S.; Bandyopadhyay B. and Sarkar A. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *J. Nano biotechnol.* 10: 9-34.
9. Madigan TM. (2012). Brock Biology of Microorganisms. 13TH Ed., Benjamin Cummings.
10. Prema P and Thangapandiyan S. (2013). *In-vitro* antibacterial activity of gold nanoparticles capped with polysaccharide stabilizing agents. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(1): 310- 314.
11. Baker FJ.; Breach MR.; Leighton I. and Taylor P. (1980). Medical Microbiological Techniques. Butterworth and Co. UK.
12. Benson HJ. (2002). Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 8th Ed., McGraw-Hill, USA.
13. Kellyand PJ. and Arnell RD. (2000). Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum* 56 . pp 159-172.
14. Sabine L B. and Peter S. (1996). Gold Drugs: Mechanism of Action and Toxicity. *Gold Bulletin.* 29(3): 87-93.
15. Mohamad BG. Al-Dabbagh S. and Al-Chalaby A. (2013). A Study on Antibiotics and Heavy Metals Resistance in Staphylococcus aureus Isolated from Mastitis in cows. *J. Al-Raffedden Sci.* 24 (1): 9-18.
16. Azam A. (2009). One step synthesis and characterization of gold nanoparticles and their antibacterial activities against E. coli (ATCC 25922 strain). *Int. J. Theor. Appl. Sci.* 1(2): 1-4.
17. Dal Koser S. (1924). Correlation of citrate utilization by members of the habitat colon-aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. *J. Bacteriol.* 9: 59.
18. McQuillan J. (2010). Bacterial-Nanoparticle Interactions. PhD Thesis, University of Exeter.
19. Kim JS. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanotechnology. Biol. Med.* 3:95–101.

Fabrication and testing of CuS nanofilm as ammonia gas sensor

AbdulHussain Kh. Elttayef (1) and Muneer H. J. Al-Zubaidy (2)

(1) Ministry of Sciences and Technology / Baghdad (2) College of Sciences / Wasit University / Republic of Iraq

ABSTRACT

Copper sulfide (CuS) thin films were prepared by Successive Ionic Layer and Reaction (SILAR) method from solution of CuCl_2 and Na_2S on the glass substrate heated at 45°C . The films were characterized by X-ray diffraction (XRD). The crystallite size was evaluated to be (93.5) nm by using the Scherer's equation. Atomic force microscope (AFM) was taken to examine the surface morphology of CuS films. These films were tested in ammonia (NH_3) gas at room temperature. The sensitivity was 95% after 55 sec from exposed to NH_3 gas. The response and recovery time are (10) sec and (80) receptivity.

Key words: Cus, gas sensor.

الملخص باللغة العربية

تم تحضير اغشية كبريتيد النحاس (CuS) الرقيقة من المحاليل CuCl_2 و Na_2S بواسطة الطبقة الايونية المتعاقبة وبطريقة تفاعل سايلر على قاعدة من الزجاج سخنت عند درجة حرارة 45°C . وصفت الاغشية بواسطة حيود الاشعة السينية (XRD) و باستخدام معادلة شرر تم تقدير الحجم البلوري ليكون 93.5 نانومتر. استخدم مجهر القوة الذرية (AFM) لدراسة شكل السطح لاغشية CuS و تم اختبار هذه الاغشية بواسطة غاز الامونيا (NH_3) بدرجة حرارة الغرفة حيث بلغت الحساسية % 95 بعد 55 ثانية من التعرض لغاز الامونيا كما و بلغ زمن الاستجابة و زمن الاسترداد 10 و 80 ثانية على التوالي.

INTRODUCTION

Copper sulfides, commonly formulated as Cu_xS ($1 \leq x \leq 2$), are known as attractive materials due to their interesting properties and wide application potentials (1). In recent years, thin films of CuS have attracted much attention for the photovoltaic applications due to the high absorption coefficient (2,3) and high conductivity. In search of new semi-conducting materials for solar energy conversion through photoelectron chemical cells, metal chalcogenide thin films are increasingly studied. Thin films have been prepared by various techniques such as spray pyrolysis (4), pulsed laser deposition (5), vacuum evaporation (5), electro-deposition method (6), electron beam evaporation (7), and chemical bath deposition (8). The constituent elements are inexpensive, easy to prepare and its necessary vessels can be found in an ordinary chemistry laboratory. Therefore, the SILAR method has many advantages over others used to grow semiconductor thin films. Nontoxic and abundant in nature leading to the development of devices that are environmentally safe and have public acceptability.

Semiconductors are used as gas sensors based on the principle of the variability of resistivity of metal when exposed to these gases (9). These properties can be utilized to detect NO_2 , H_2 , CO_2 , O_2 and NH_3 , etc. (10, 11). Since the last decade there has been a great deal of interest in the preparation of inexpensive thin films of CuS. This is because copper sulfide based thin films with large band gap ($E_g > 2$ eV) n-type semiconductors are attractive from the scientific and technological point of view (12). Some recent studies on the sensing properties of pure nano crystalline CuS thin films toward H_2S , H_2 and NH_3 (13) seemed to contradict the general trend that higher sensitivity is to be expected for smaller crystals, and it was, therefore, concluded that small size of crystals was an essential but not sufficient condition for the achievement of maximum gas sensitivity and fast response.

In this paper, we report the synthesis of CuS films by SILAR method and study the physical and sensing to ammonia gas properties of these films.

MATERIALS AND METHODS

Copper sulfide (CuS) thin films were prepared by Successive Ionic Layer And Reaction (SILAR) method from solution of $CuCl_2$ and Na_2S on the glass substrate heated at $45^\circ C$.

A detailed procedure of this technique which used for thin film growth has been reported (14). Different molarities (0.03 M and 0.06 M) of solutions of $CuCl_2$ (cation) have been used, while, the anionic solution was freshly prepared from

sodium sulfide (Na_2S). The cationic and anionic precursor solutions characteristics: adsorption, reaction and rinsing times were detailed in literature for these thin films (15). One SILAR cycle contained four steps:

(a) The substrate was immersed into first reaction containing the aqueous ($CuCl_2$) cation precursor.

(b) Rinsed with water at $80^\circ C$.

(c) Immersed into the Na_2S anion solution.

(d) Rinsed with water at $80^\circ C$

The deposited films were subsequently annealed in air at $300^\circ C$ for 45 minutes. Films thicknesses which determined by (MINITEST – 3000) devices were $0.55 \mu m$ and $0.82 \mu m$ for the solution molarities of 0.03 and 0.06M respectively.

X-Ray diffraction (XRD)

The X-ray diffraction (XRD) of CuS thin film with different molarity 0.03M and 0.06 M are displayed in figures (1.a, b). The films showed only the CuS phase with a strong (103) preferred orientation.

The patterns appear the presence of traces of other phases along with predominant CuS phase. The intense and sharp peaks in the X-ray diffraction pattern reveal the crystalline of the films, which also confirm the stoichiometric nature of the CuS films. The degree of crystallization in the film was improved by a sufficient thermal crystallization ($300^\circ C$). The intensity of the peaks is found to decrease with less molarity (0.03 M) which means that the crystalline nature of the film is decreased.

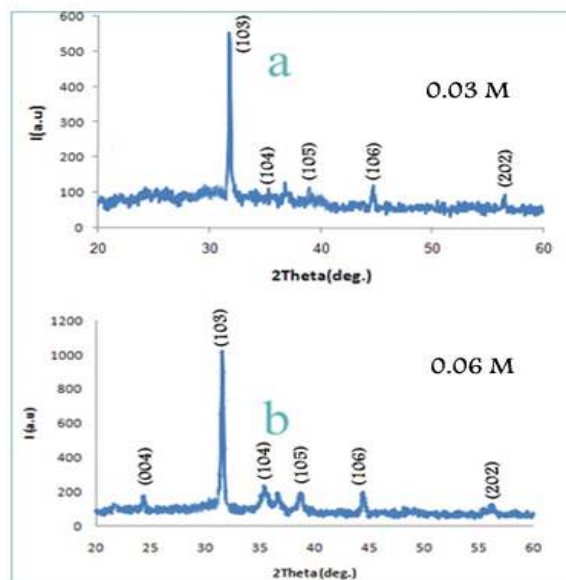


Figure (1: a and b) XRD patterns of CuS thin films

Grain size was calculated by compensation values that were obtained from the X-ray diffraction results of the previous figures in the equation of Sherrer (1):

$$D = 0.94\lambda / (\beta \cos\theta) \dots\dots\dots(1)$$

Where β is the FWHM intensity in radians. The mean size of Crystallization calculated using Scherrer formula for 0.03M and 0.06M of CuS is found to be 93.5nm and 121.5 nm.

Atomic Force Microscope (AFM)

Typical AFM images for CuS films with two different molarities which were taken to support the XRD observations. Figure (2a,b) shows the surface topography of the deposited films. The film 0.06 M of precursor solution have particle size about (120 nm) while the film of 0.03M have a particle size of (90 nm) . The size of the grains increased as the morality of the precursor solution increases In general, the grain size depends on the chemical composition of the starting solution and the post annealing process.

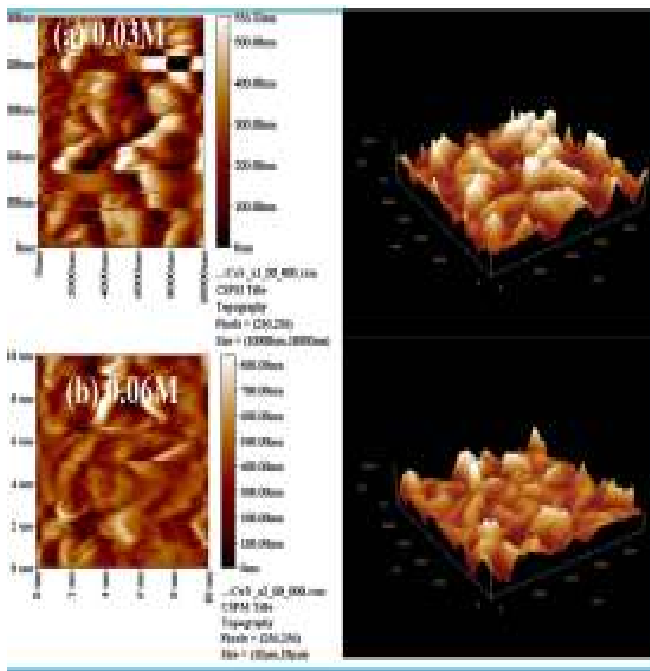


Figure (2a,b): the surface topography of the deposited films

RESULTS AND DISCUSSION

Sensing properties:

To improve the gas- sensing properties, it is necessary to prepare very thin sensing layers with high surface to volume ratio. In the large number of grains which leads to high porosity and large

effective surface area available for adsorption of gas species.

When reducing gas ammonia (NH_3) adsorbed on the CuS surface .The surface resistivity will increase due to decreasing the charge carriers (hole) by reducing gas.

The sensitivity of CuS for ammonia gas has been calculated according to the following equation is shown in Figure (3).

$$S = (R_{\text{gas}} - R_{\text{air}}) / R_{\text{air}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

For NH_3 gas, the response was observed to increase with time and reach the maximum about 95% after 55 sec from exposed to ammonia gas. After that, the gas sensitivity decreases with increasing time. The observed increase and decrease in the sensitivity indicates the adsorption and desorption phenomenon of the gas.

The response time was defined as the time taken for sensor to attain 90% of maximum change in resistance or conductance upon exposure to ammonia gas .While, the time taken by the sensors to get back 90% of original resistance or conductance is the recovery time (16).

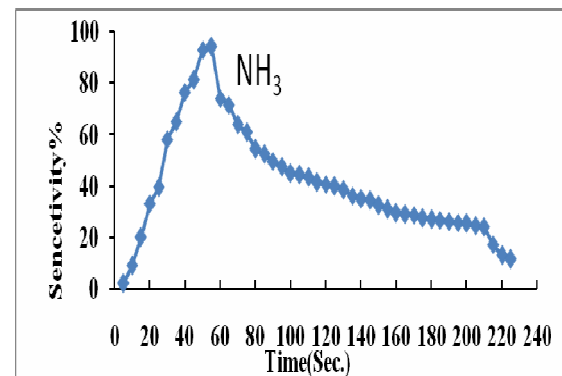


Figure (3): Variation of sensitivity with time of CuS thin film for ammonia and 10 bias volt.

The typical change in response with time measurement of the CuS thin film sensors are shown in figure (4).

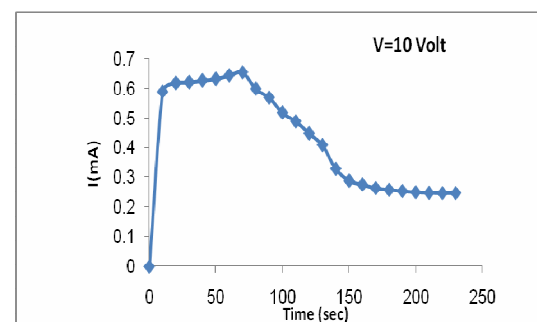


Figure (4): Response and recovery times of the CuS film exposed to ammonia gas

The response time is approximately 10 sec after the sensor comes in contact with ammonia gas. While, the recovery is obtained just by removing the chamber and it was 80 sec.

CONCLUSION

We have successfully prepared CuS films by Successive Ionic Layer and Reaction (SILAR) method from solution of CuCl_2 and Na_2S on the glass substrate. The resulting CuS films were characterized by XRD measurements and AFM. The maximum sensitivity about 95% was obtained after 55 sec. from exposed to ammonia gas. The results of the ammonia sensing studies reveal that the CuS films prepared by (SILAR) method are a suitable material for the fabrication of the ammonia sensor.

REFERENCES

1. Greyson EC.; Barton JE. and Odom TW. (2006). Tetrahedral Zinc Blende Tin Sulfide Nano-and Microcrystals. *Small*. 2(3): 368–371.
2. Johnson JB.; Jones H.; Latham BS.; Parker JD.; Engelken RD. and Barber C. (1999). Optimization of Photoconductivity in Vacuum-Evaporated Tin Sulfide Thin Films. *Semicond. Sci. Technol.* 14(6): 501.
3. Badera N.; Godbole B.; Srivastava SB.; Vishwakarma PN.; Chandra LSS.; Jain D.; Sathé VG. and Ganesan V. (2008). Photoconductivity in $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$ thin films prepared by spray pyrolysis technique. *Solar Ener. Mater. Solar Cells*. 92: 1646-1651.
4. Shen Y.; Xu N.; Hu W.; Xu X.; Sun J.; Ying Z. and Wu J. (2008). Bismuth doped ZnSe films fabricated on silicon substrates by pulsed laser deposition. *Solid-State Electron*. 52: 1833-1836.
5. Murali KR.; Srinivasan K. and Trivedi DC. (2004). Structural and photoelectron chemical properties of CdSe thin films deposited by the vacuum evaporation technique. *Mater. Sci. Eng. B*:111: 1-4.
6. Moses ER.; Delphine ASM.; Sanjeeviraja C. and Jayachandran M. (2010). Growth of ZnSe thin layers on different substrates and their structural consequences with bath temperature. *Physica B. Condensed Matter*. 405: 2485-2491.
7. Ahamed MG.; Basheer S.; Balu AR.; Nagarethiam VS.; Thayumanavan A.; Murali KR.; Sanjeeviraja C. and Jayachandran M. (2010). Structural, optical and electrical properties of electron beam evaporated CdSe thin films. *Crys. Res. Technol.* 45: 387-392.
8. Lindroos A. (1997). The Successive Ionic Layer Adsorption and Reaction _SILAR. Growth and Characterization of ZnS and ZnS: Mn Thin Films. PhD thesis, University of Helsinki, Helsinki.
9. Capone S.; Forleo A.; Francioso L.; Rella R.; Siciliano P.; Spadavecchia J.; Presicce DS. and Taurino AM. (2003). Solid-state gas sensors: state of the art and future activities, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 5:1335-1348.
10. Zhao J.; Huo LH.; Gao S.; Zhao H. and Zhao JG. (2006). Alcohols and acetone sensing properties of SnO_2 thin films deposited by dip-coating [J]. *Sens. Actuators B: Chem.* 115:460-464.
11. Mandayo GG.; Castano E.; Gracia FJ.; Cirera A. and Morante JR. (2003). Strategies to enhance the carbon monoxide sensitivity of tin oxide thin film. *Sens. Actuators. B: Chem.* 95:90-96.
12. Hartnagel HL. (1995). Semiconducting transparent thin films. Bristol and Philadelphia: Institute of Physics Publishing.
13. Korotcenkov G.; Macsanov V.; Tolstoy V.; Brinzari V.; Johannes W S. and Faglia G. (2003). Structural and gas response characterization of nano-size SnO_2 films deposited by SILD method. *Sens. Actuators. B: Chem.* 96(3): 602-609.
14. Kannianen T.; Lindroos S.; Ihanus J. and Leskela M. (1996). Growth of lead selenide thin films by successive ionic layer reaction and reaction (SILAR) technique. *J. Mater. Chem.* 6: 161- 169.
15. Ates MA.; Saglam M.; Güzelir B.; Yıldırım MA. and Astam A. (2010). The electrical characteristics of Cu/CuS/p-Si/Al structure. *J. Opt. Adv. Mater.* 12:1466- 1475.
16. Jain GH.; Patil LA. and Gaikwad VB. (2007). Studies on gas sensing performance of $(\text{Ba}_{0.8}\text{Sr}_{0.2})(\text{Sn}_{0.8}\text{Ti}_{0.2})\text{O}_3$ thick film resistors. *Sens. Actuators. B*. 122: 605-612.

The Study of properties of AFM image of CdTe thin films using FCM and Marker-Controlled Watershed Segmentation

Ziad M. Abood (1), Raad M. S. Al- Haddad (2) and Suha H. Ibraheem (3)

(1) College of Education / Al- Mustansiryah University/ Baghdad (2) College of Sciences / Baghdad Univerversity (3) College of Sciences / Al- Mustansiryah University/ Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The aims of the present work are to study the atomic force microscopy (AFM) images of Cadmium Tellurid (CdTe) thin films and to calculate the grain size. Image processing techniques have been applied to AFM images (Fuzzy C-means -FCM- and Marker-Controlled Watershed segmentation).

Grain size was calculated by applying FCM method directly on thin films prepared, and calculated by applying Marker-Controlled Watershed segmentation with FCM method. The present experimental results were compared with that obtained originally from AFM images.

Key words: CdTe thin films, AFM images, Fuzzy C-means, Marker-Controlled Watershed Segmentation, grain size

الملخص باللغة العربية

يهدف البحث الحالي، إلى دراسة صور مجهر القوة الذرية (AFM) التي تمثل أغشية التيلورايد الكاديوم (CdTe) الرقيقة وحساب الحجم الحبيبي لهذه الأغشية. تم تطبيق تقنيتين من تقنيات معالجة الصور (FCM و watershed للتجزئة) على صور AFM. تم حساب حجم الحبيبي من خلال تطبيق طريقة FCM مباشرة على الأغشية الرقيقة المحضرة، وكذلك تم حسابها عن طريق تطبيق (FCM و Marker-Controlled Watershed) معاً. تمت مقارنة النتائج العملية في العمل الحالي مع النتائج التي تم الحصول عليها أصلاً من صور AFM.

INTRODUCTION

Thin films of II-VI semiconductors are currently used in many semiconductor devices such as photo-electrochemical cells, field effect transistors, detectors, photodiodes, photoconductors and photovoltaic solar cells (1). Cadmium telluride (CdTe) is an important group II-VI semiconductor with a direct band gap about 1.5 eV at 300K, and it is a good absorber for sunlight with high optical absorption coefficient ($\alpha > 10^4 \text{ cm}^{-1}$) i.e., less than the optical absorption edge (2). Among variety of CdTe thin film preparation techniques, thermal evaporation is the only method which gives contradictory results compared to other techniques, which was understood from early works (3,4). Both p-type and n-type CdTe intrinsic semiconductor can be deposited by means of this technique, by varying the deposition parameters.

Digital Image Processing

Low cost high computational power microcomputers and digital cameras, image digitizers and processing boards allowed a major development of image processing and its applications (5).

Digital image processing can be successfully applied to different types of microscopy images but also together with other characterization methods like micro topography spectroscopy or lifetime measurements (6).

The interest of the application of image processing in surface science seems obvious. Dependent on the scale, direct or indirect visual evaluation of the surface structure is always sought. In micro and nano science and technology this is also true.

In some materials, it can be difficult to reveal the grains by conventional grain size analysis where it complications arise when the grain size are indistinct or incomplete. It is possible that the etchant has not attacked these boundaries because they are low angle boundaries or they do not have small particles decorating them. In this case, conventional mean linear intercept measurements would overestimate the grain size because some grains would be combined together and appear to be larger than they really are (7).

Digital Image Definition:

A digital image $I[m, l]$ described in a 2D discrete space is derived from an analog image $I(x,y)$ in a 2D continuous space through a sampling process that is frequently referred to as digitization (5).

The 2D continuous image $I(x,y)$ is divided into N rows and M columns. The intersection of a row and a column is termed a picture element, pixel, or pel..

The value assigned to the integer coordinates $[l, m]$ with $\{l=0, 1, 2, \dots, M-1\}$ and $\{m=0, 1, 2, \dots,$

$N-1\}$ is $I[l, m]$. In fact, in most cases $a(x,y)$ -which we might consider to be the physical signal that impinges on the face of a 2D sensor- is actually a function of many variables including depth, color, and time (5).

$$I(x,y) = \begin{bmatrix} I(0,0) & \dots & \dots & I(0,M-1) \\ M & O & & M \\ M & & O & M \\ I(N-1,0) & \dots & \dots & I(N-1,M-1) \end{bmatrix} \dots (4)$$

The value assigned to every pixel is the average brightness in the pixel rounded to the nearest integer value. The process of representing the amplitude of the 2D signal at a given coordinate as an integer value with different gray levels is usually referred to as amplitude quantization or simply quantization (8).

Fuzzy C-Means Segmentation:

Whilst the conventional FCM algorithm works well on noise-free images, it is very sensitive to local irregularities, which occur very often in real images. This sensitivity is due to the absence of consideration of the spatial context of each pixel. In [9], Ahmed et al. modify the original objective function by adding a penalty term that allows the memberships of each pixel to be influenced by its neighborhood. The new objective function is defined as:

$$J_S = J_m \frac{\alpha}{N_R} \sum_{f=1}^1 \sum_{i=1}^c u_{if}^m \sum_{r \in N_f} \|x_r - v_i\|^2 \dots (2)$$

Where N_R is the cardinality of N_f , which stands for the set of neighbors in a window around the pixel x_f .

The balance parameter α allows controlling the effect of neighboring terms. However, computing the neighboring terms in each iteration is computationally expensive. Moreover, tuning α is not easy, because a slight variation of α produces very different segmentations. This algorithm is denoted FCM in the sequel.

In (10), the authors proposed another objective function where the relationship between neighboring pixels is taken into account. The usual Euclidean distance between pixels and centers by a weighted mean distance of the pixel and its neighbors to each center is taken. However, here again, in each iteration, all the pixels of the image are considered, leading to a large computation time. In (11), the authors propose to reduce the computation time of the solutions derived from (2) by computing in advance the mean value of the pixel within :

$$J_{S1} = J_m + \alpha \sum_{f=1}^1 \sum_{i=1}^c u_{if}^m \|\bar{X}_f - V_i\|^2 \quad (3)$$

Where \bar{X}_f is the mean of neighboring pixels in the window around x_f . Additionally, they propose another objective function J_{S2} where \bar{X}_f is the median value of the neighboring pixels. Then, they introduce the use of kernel-induced distances instead of the usual Euclidean one.

Fuzzy C-Means Clustering Algorithm:

This algorithm works by assigning membership to each data point corresponding to each cluster center on the basis of distance between the cluster center and the data point. More the data is near to the cluster center more is its membership towards the particular cluster center. Clearly, summation of membership of each data point should be equal to one. This method is frequently used in pattern recognition. It is based on minimization of the following objective function:

$$J_m = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^c (\mu_{ij})^m \|x_i - c_j\|^2 \quad 1 \leq m < \infty \quad (4)$$

where m is any real number greater than 1, u_{ij} is the degree of membership of x_i in the cluster j , x_i is the i th of d -dimensional measured data, c_j is the d -dimension center of the cluster, and $\|*\|$ is any norm expressing the similarity between any measured data and the center.

Fuzzy partitioning is carried out through an iterative optimization of the objective function shown above, with the update of membership u_{ij} and the cluster centers c_j by:

$$\mu_{ij} = \frac{1}{\sum_{k=1}^c \left(\frac{\|x_i - c_j\|}{\|x_i - c_k\|} \right)^{\frac{2}{m-1}}} \quad \dots (5)$$

$$c_j = \frac{\sum_{i=1}^N \mu_{ij}^m x_i}{\sum_{i=1}^N \mu_{ij}^m} \quad \dots (6)$$

This iteration will stop when:

$$\max_{ij} \left\{ \left| \mu_{ij}^{(k+1)} - \mu_{ij}^{(k)} \right| \right\} < \beta$$

where β is a termination criterion between 0 and 1, whereas k are the iteration steps. This procedure converges to a local minimum or a saddle point of J_m . figure (1).

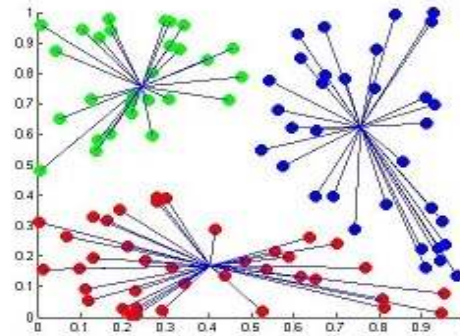


Figure (1): Result of FCM clustering (13)

Marker-Controlled Watershed Segmentation

Separating touching objects in an image is one of the more difficult image processing operations. The watershed transform is often applied to this problem. The watershed transform finds "catchment basins" and "watershed ridge lines" in an image by treating it as a surface where light pixels are high and dark pixels are low (15).

Segmentation using the watershed transforms works better if you can identify, or "mark," foreground objects and background locations. Figure (2). Marker-controlled watershed segmentation follows this basic procedure:

1. Compute a segmentation function. This is an image whose dark regions are the objects you are trying to segment.
2. Compute foreground markers. These are connected blobs of pixels within each of the objects.
3. Compute background markers. These are pixels that are not part of any object.
4. Modify the segmentation function so that it only has minima at the foreground and background marker locations.
5. Compute the watershed transform of the modified segmentation function.

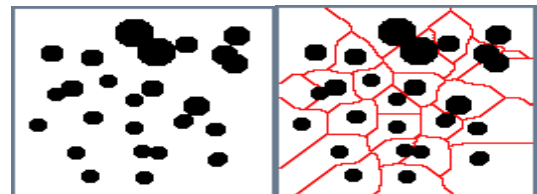


Figure (2): The image on the left represents the type of result obtained from the thresholding of classical images where Watershed segmentation is efficient.

Statistics

In image processing it is quite common to use simple statistical descriptions of images and sub-images. The notion of a statistic is intimately connected to the concept of a probability distribution, generally the distribution of signal amplitudes.

For a given region-which could conceivably be an entire image-we can define the probability distribution function of the brightness in that region and the probability density function of the brightness in that region. We will assume in the discussion that follows that we are dealing with a digitized image $I [l, m]$. (14).

Statistical Operations:

Mean: The average of a values by:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m I(i, j)}{l * m} \dots (7a)$$

where $I(i, j)$ Image element, (l, m) dimensions of the image can be of the same equation (7a) calculate the rate of colors {red (R), blue (B) green (G)} as follows:

$$I_i = \frac{\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m I_i(x, y)}{l * m} \dots (7b)$$

i: one of the three colors (R, B and G).

Standard deviation: The standard deviation (σ), is a statistical measure of the precision for a series of repetitive measurements. The advantage of using σ to quote uncertainty in a result is: that it has the same units as the mean value. It is calculated from:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{l * m} \sum_i \sum_j (I(i, j) - \bar{X})^2} \dots (8)$$

Variance: Average total square deviations of the values from the middle of the arithmetic:

$$\sigma^2 = \frac{1}{l * m} \sum_i \sum_j (I(i, j) - \bar{X})^2 \dots (9)$$

Energy :Energy is used to describe a measure of "information" when formulating an operation under a probability framework. Average energy E_b in each signal was then calculated:

$$E_t = \sum_{i=1}^N R_b^2(I) \dots (10)$$

where $p_b(I)$ is the intensity of the filtered pixel in the I^{th} image for filter b divided by its mean value and N is the total number of images.

Homogeneity: We can calculate it from the following equation:

$$\text{Homogeneity} = \sum_{i,j} \frac{I(i,j)}{1 + |i - j|} \dots (11)$$

Round object: Are intended to calculate the area of regions which are separated (in one of ways segmentation) which is the important areas in the study (ROI) can thus calculate the perimeter and diameter using the functions in MATLAB. So area can be calculated from the equation:

$$I_i(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{if } I(i, j) = l^{th} \text{ object number} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \dots (12)$$

Then calculate the area of the n regions or one region by the equation:

$$A_n = \sum_{x \in cell} I(x), \quad A_n = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M I_n(i, j) \dots (13)$$

And we can calculate Object Perimeter by counting the number of pixels that belongs to the edge of the region and as follows:

$$A_p = \sum_{x \in edge} I(x) \dots (14)$$

$$\text{and } R_o = \frac{A_n}{A_p} \dots (15)$$

Where R_o is Round Objects

METHODS AND APPLICATIONS

CdTe films were obtained on glass substrates from CdTe alloy which is prepared by fusing the mixture of the appropriate quantities of the elements of high purity (99.999 %) in evacuated fused quartz ampoules at 1073 K. The ampoules were kept at this temperature for 8 hours from the optimum temperature, then the ampoules quenched rapidly in cold water.

These films were prepared by Edward E306A vacuum system under high vacuum of about 10-5mbar on 7059 corning glass slides substrate kept at room temperature. Molybdenum boat has been used as a source. Before the deposition on glass substrates, they cleaned ultrasonically with acetone, deionized water, and finally dried by air blower. The CdTe films prepared with different thicknesses 400 ± 20 , 500 ± 20 , 600 ± 20 and 1000 ± 20 nm. The

prepared CdTe film thickness was measured using a Profilometer.

The CdTe films was annealed at two annealing temperatures Ta (373 and 473) through 30 min. Surface morphology of the deposited films was observed using atomic force microscopy (AFM).

The implementation of image processing algorithms is to extract some the important statistics in the AFM images of thin film.

Digital Image Processing Analysis:

Current section includes presentation and discussion of the results of image processing by using the program (Matlab2012) for CdTe thin films, with different thickness, annealing and their impact on the porous surfaces of these thin films, and the most important conclusions that have been reached.

FCM and Watershed Flowcharts:

Figure (3) shows the Flowcharts of FCM and Marker-Controlled Watershed methods that were using in present paper.

FCM Segmentation:

This program illustrates the Fuzzy c-means segmentation of an AFM image at figure (4). Where the program converts an input image into two segments using Fuzzy k-means algorithm. This program can be generalized to get "n" segments from an image by means of slightly modifying the given code.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure (5) shows Stages Watershed Segmentation technique application on AFM images of CdTe thin films deposited at room temperature and annealed at two annealing temperatures (373 and 473) K. We applied Fuzzy C-Means clustering algorithm on output images from Watershed Segmentation

technique as shown in Figure (6). And them can be extracted some the important statistics such as mean intensity, area of grain, perimeter of grain, roundness, energy and homogeneity.

In this method also we found from Table (1) increase the grain size with increased thickness, annealing and substrate temperature.

From the Table (1), we note that the grain size increases with increasing the film thickness, and annealing temperatures.

Comparing the results of calculating the grain size by image processing techniques with the results that we have obtained from atomic force microscopy (AFM) instrument in (2D) of the CdTe surface as a function of the film thickness and temperature as deposited at room temperature of 300 K are indicated in Figure (7) respectively. We found in all techniques a linear increase with annealing temperature, and thickness, but we note that the results of the AFM and image processing techniques be close with some differences. The differences in grain size between two techniques are attributed to sampling deficiencies in earlier methods, that's where in some materials, it can be difficult to reveal the grains by conventional grain size analysis where it complications arise when the grain size are indistinct or incomplete. It is possible that the etchant has not attacked these boundaries because they are low angle boundaries or they do not have small particles decorating them. In this case, conventional mean linear intercept measurements would overestimate the grain size because some grains would be combined together and appear to be larger than they really are. The new techniques offer the advantages of greater accuracy and the ability to determine individual components of the microstructure, which have important applications in thin film analysis.

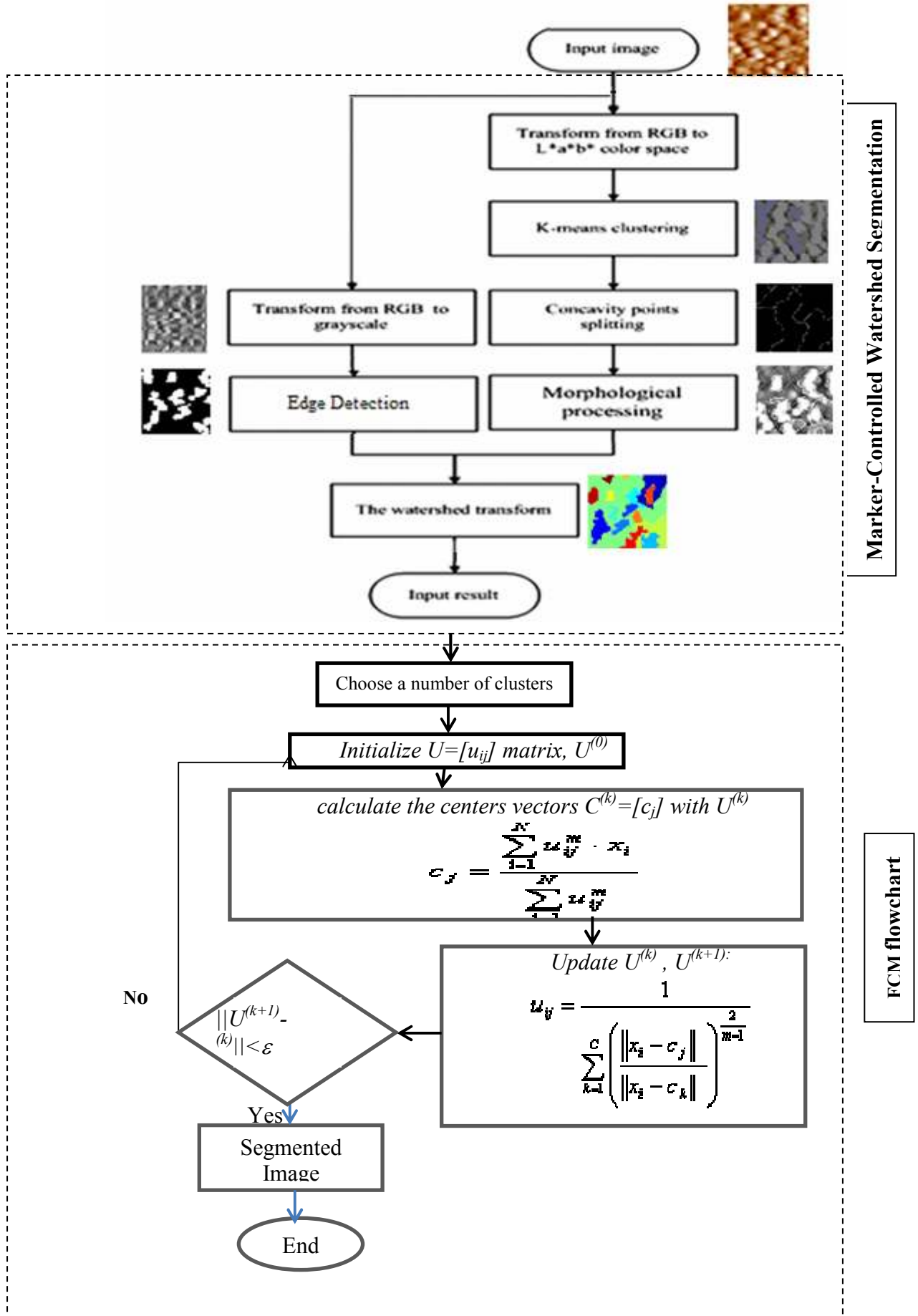


Figure (3): Shows the flowchart of FCM and Marker-Controlled Watershed methods

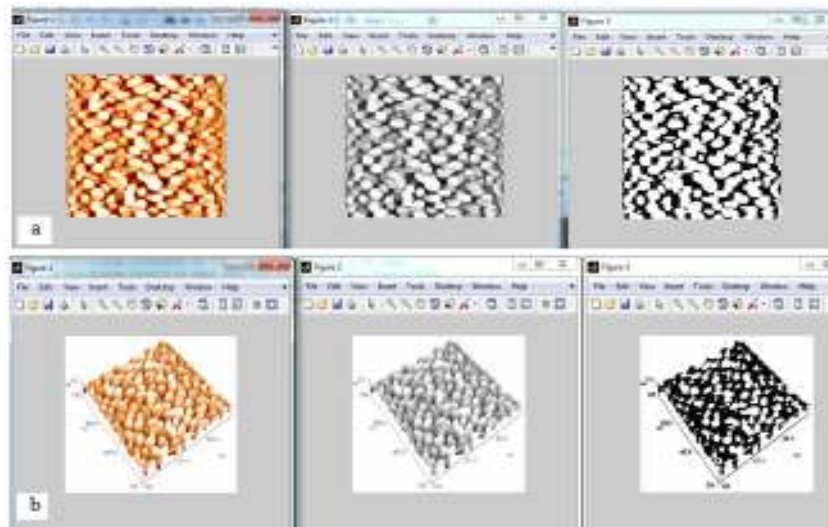


Figure (4): The interface of FCM software to calculate the grain size average by using AFM images (a) 2D (b) 3D

Table (1): the results of grain size average of CdTe thin films deposited at room temperature and annealed (T_a) at two temperatures by Fuzzy c-means segmentation

Thickness (nm)	T_a (K)	Average Grain size (nm)		
		By AFM Technique	By Fuzzy c-means segmentation	FCM and Marker-Controlled Watershed methods
		2D	2D	2D
400	as deposited	60.83	56.5	55.3
	373	63.98	60.7	58.4
	473	69.86	63.4	62.8
500	as deposited	76.29	72.7	70.7
	373	76.35	73.2	71.9
	473	77.22	76.4	74.7
600	as deposited	82.74	77.5	76.7
	373	86.24	81.6	79.3
	473	90.45	84.2	83.8
1000	as deposited	90.03	84.5	83.5
	373	92.33	86.5	82.5
	473	95.64	91.3	91.3

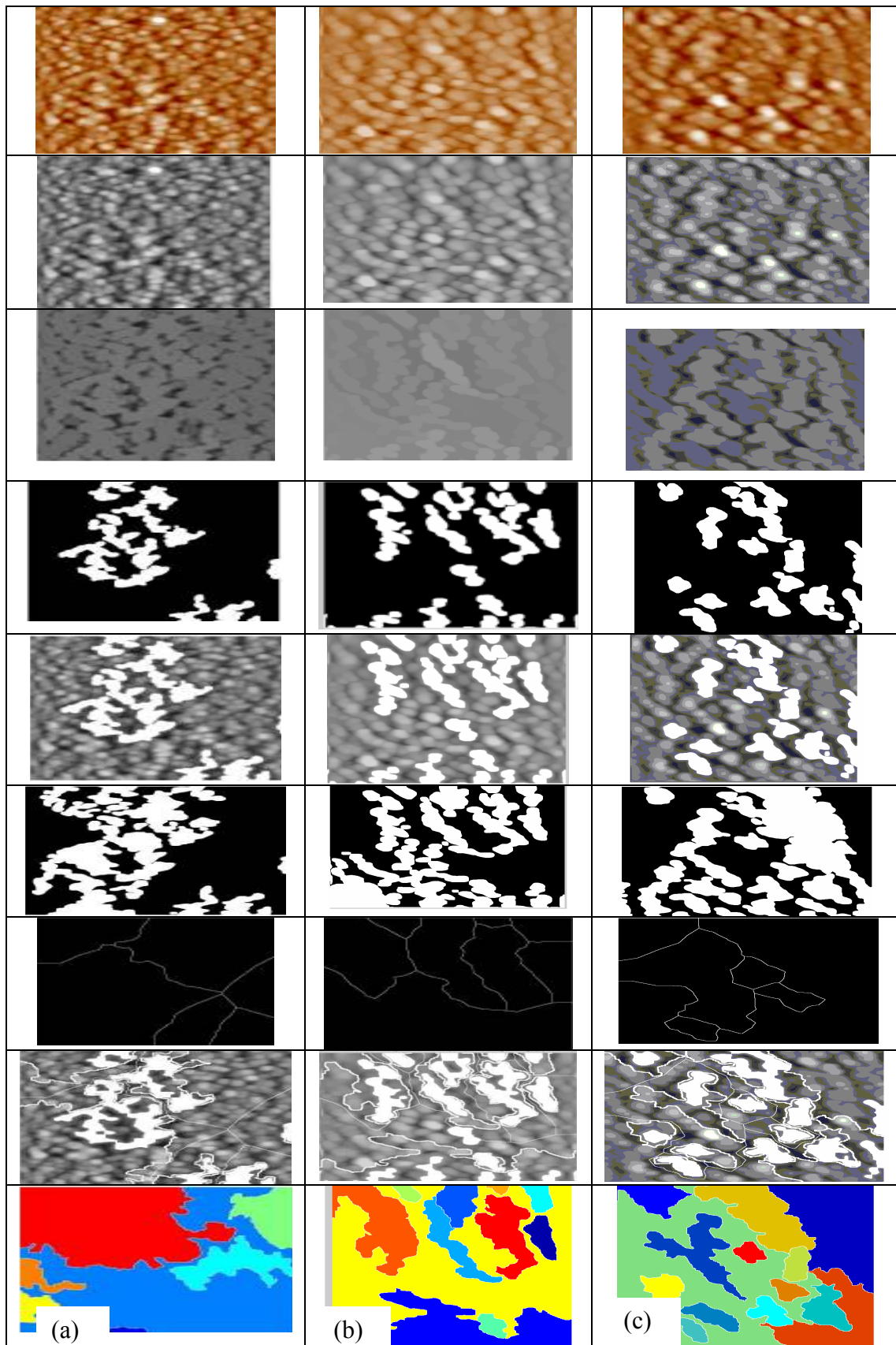


Figure (5): Stages of the application of the Watershed Segmentation technique on AFM images of CdTe thin films deposited at room temperature with thickness 400nm, (a) as deposited (b) annealing at 373K (C) annealing at 473K

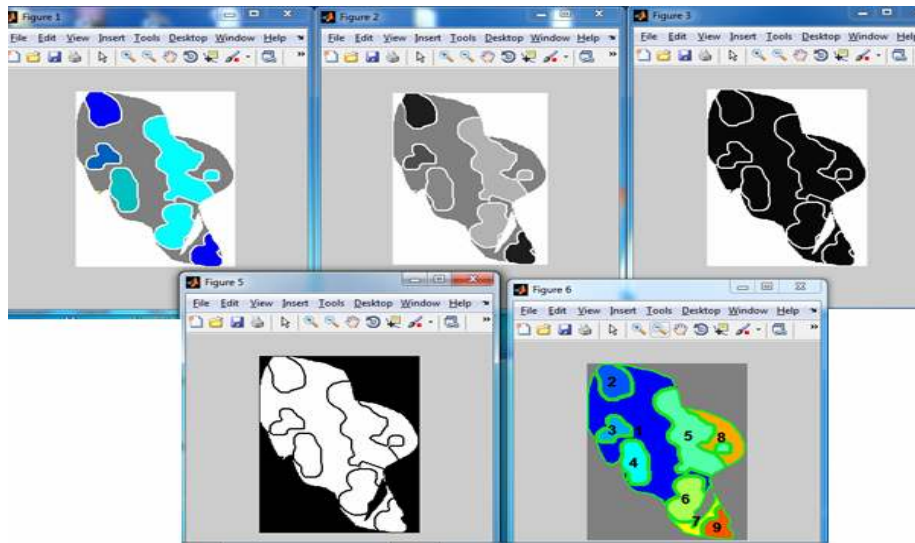


Figure (6): Apply Fuzzy C-Means clustering on output images from Watershed Segmentation technique

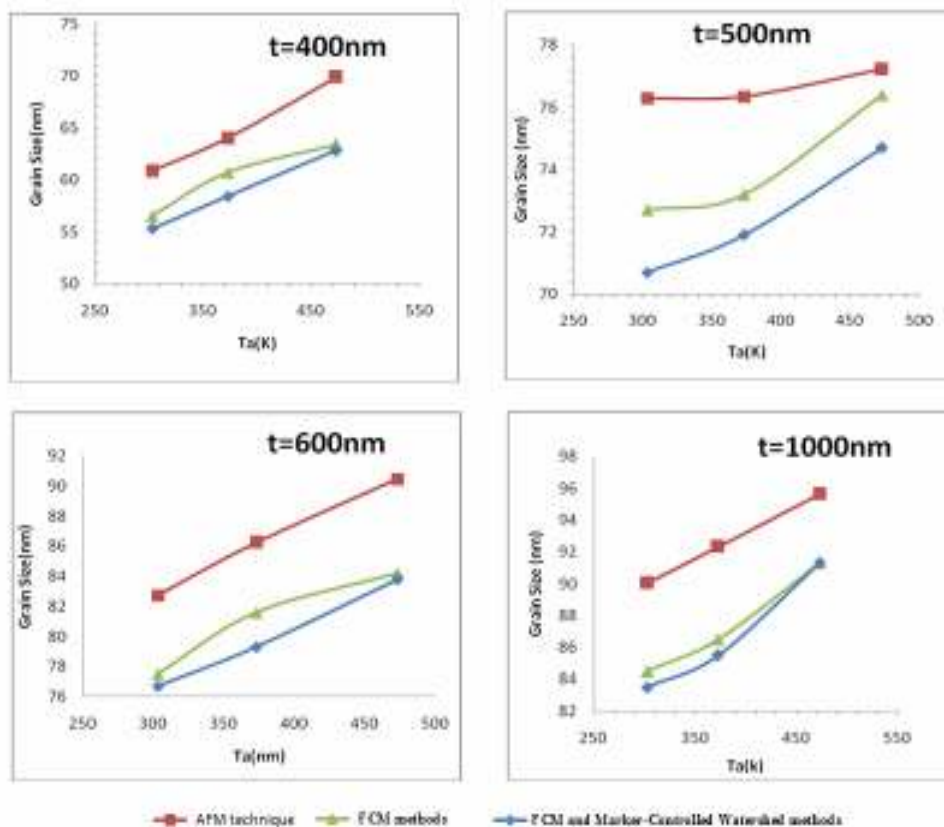


Figure (7): Grain size values versus thickness of CdTe thin films deposited at room temperature with different annealing temperature for both techniques

Table (2) shows the some statistics extracted from those images such as mean intensity, area of grain size, perimeter of grain, roundness, energy, and homogeneity. We can see from this Table that the grain area, grain perimeter increase with increasing thickness and annealing temperature these results attributed to the increase of the grain size. We note that the roundness decrease slightly with increasing annealing temperature for each thickness, while the roundness increases with increasing thickness of the films, this means that asymmetric grain growth with increasing the annealing temperature i.e., spherical grains at room temperature to elongated needle/rod shaped grains at high temperatures were observed from microscopic images and become more symmetric with increasing thickness. Our

results are in a good agreement with the result obtained by Chowdhury *et al.* (16). Also we note from table (2) that the energy of the image increases with increasing thickness of the films, while the homogeneity of the image increases slightly with increasing annealing temperature for each film, and generally decreases with increasing films thickness, which indicates the improvement of the distribution of information in the image. Thus improve the quality of the image after annealing, but upon increase thickness lose homogeneity. This may be due to the increase grain size of the films.

Table (2): Mean intensity, Area, Perimeter, Roundness, Energy, Homogeneity of CdTe thin films deposited at room temperature and annealed (T_a) at two temperatures

t (nm)	T_a (K)	Mean Intensity	Perimeter (nm)	roundness	Energy	Homogeneity
400	as deposited	111.23	70.1	0.788	0.00107	0.0188
	373	116.11	75.9	0.769	0.00112	0.0190
	473	120.79	83.5	0.752	0.00114	0.0193
500	as deposited	123.20	88.3	0.800	0.00131	0.0159
	373	130.00	89.9	0.799	0.00142	0.0160
	473	133.24	93.8	0.796	0.00142	0.0163
600	as deposited	139.27	92.7	0.827	0.00154	0.0148
	373	140.23	96.9	0.818	0.00155	0.0150
	473	141.23	104.1	0.804	0.00160	0.0155
1000	as deposited	145.23	99	0.843	0.00167	0.0140
	373	146.30	98.3	0.839	0.00167	0.0142
	473	146.52	105.3	0.820	0.00170	0.0142

REFERENCES

1. Ray B. (1969). II-VI Compounds. Pergamon Press, 1st Ed. Neil and Co. Ltd. of Edinburgh. P. 162.
2. McCandless BE. and James R. (2003). Sites, Cadmium Telluride Solar Cells. Handbook of Photovoltaic Science and Engineering, John Wiley & Sons .pp.617-657.
3. Al-Douri AJ.; Al-Shakily FW.; Alnajjar AA. and Alias MFA. (2011). The Role of Dopant Concentration on Conductivity and Mobility of CdTe Thin Films. Adv. Cond. Matt. Phys. 21: 1-6.
4. Singh S.; Kumar R. and Sood KN.(2010). Thin Solid Films. pp. 1078- 1081.

5. Russ JC.(1995). The Image Processing Handbook (Boca Raton, CRC Press).
6. Costa M FM. (2000). An overview on NDT of composite coatings. Proc. Int. Conf. on Composite Eng. 157-158.
7. Austin D. (1998). Grain Size Analysis – Electron Backscatter Diffraction, Channeling Contrast Imaging and Other Techniques. Mater. World. 6(1): 8-10
8. Khireddine A. and Benmahammed K. (1999). Application of intelligent matching to automatic speech recognition. IEE (ISH); II-5:2. 67: 6.
9. Ahmed MN.; Yamany SM.; Mohamed N. and Faragant AAT. (2002). A modified fuzzy c-means algorithm for bias field estimation and segmentation of mri data. Transac. Med. Imag. 21(3): 193– 199.
10. Liew A.; Leung SH. and Lau WH. (2003). Segmentation of color lip images by spatial fuzzy clustering. Transac. Fuzzy Sys. 11(4): 542–549.
11. Chen S. and Zhang D. (2004). Robust image segmentation using FCM with spatial constraints based on new kernel-induced distance measure. Transac. Sys. Man. Cyber. Part B. 34(4): 1907– 1916.
12. Weiling C.; Chen S. and Daoqiang Z. (2007). Fast and robust fuzzy c-means clustering algorithms incorporating local information for image segmentation. Patt. Recog. 40: 825–838.
13. www.sites.google.com/site/dataclusteringalgorithms/fuzzy-c-means-clustering-algorithm.
14. Schalko RJ. (19889). Digital Image Processing and Computer Vision. John Wiley and Sons.
15. Moga AN.(1998). Parallel Marker-Based Image Segmentation with Watershed Transformation. J. Parallel Distrib. Comput. 51: 27-45.
16. Chowdhury A.; Biswas B. and Mallik B. (2013). Effects of Substrate on the Asymmetric Grain Growth and Observation of Conductivity Anisotropy in Nanostructured Organic Thin Films. Sci. Adv. Mater. 5(9):1297-1306.

Effect of *Lactobacillus acidophilus* in immune response to Infections Bursal disease and Newcastle disease vaccines in broilers exposed to heat stress

Balqees H. Ali

College of Veterinary Medicine / Baghdad University / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effect of *Lactobacillus* bacteria on the immune response in vaccinated broiler chicks under stressful environmental conditions. For this purpose, 180 broiler chicks (day-old) were randomly divided into 2 rooms [(90 chicks for each room were separated to 3 groups), each group contains 30 chicks]. The first room was exposed to heat stress (38-40 °C) on 3 weeks old for a period of 10 days for 3 hours daily: first group (G1) received *Lactobacillus acidophilus* 1×10^8 cfu ml⁻¹ via crop inoculation one day old; the second group (G2) received the same dose for G1 but at three weeks of age; third group (G3) was considered the control group (without any treatment). The second room also divided into 3 groups (G4, G5 and G6). This room was kept under natural condition; G4 received *L. acidophilus* 1×10^8 cfu ml⁻¹ via crop inoculation one day old; G5 received the same dose for G4 but at three weeks of age; G6 was considered the control group. G1, G2, G4 and G5 were immunized against Newcastle (ND) and Infections Bursal (IBD) diseases on 14 and 16 days old respectively. Antibody titers against Newcastle, and IBD were measured by ELISA after 48, 120 and 240 hours for all treated groups. Bursal index, spleen index, Heterophil:lymphocyte ratio (H/L ratio) and histopathological changes of lymphoid organs. were also examined. Results showed high level of antibody titer against IBD in G1, G5 and G4. In contrast, antibody titer was significantly higher ($P < 0.05$) against Newcastle disease in G1 and G4. Bursal index showed significant increased in G4 and G5 compared with other groups. In contrast, spleen index exhibited significant increased ($P < 0.05$) in G5 after 48 hours of heat stress exposure in comparison with other groups, while G1, G2, G4 and G5 were significantly increased ($P < 0.05$) after 120 and 240 hours of heat stress exposure compared to control groups (G3, G6). H/L ratio registered significantly increased ($P < 0.05$) after 48, 120 and 2400 hours of heat stress exposure. Histopathological changes revealed severe depletion of lymphocytes the bursa of fabricia in G2 and G3; spleen showed lymphocytes depletion with hemorrhage and congestion. In contrast, G4 and G5 exhibited depletion of lymphocytes in both bursa of fabricia and spleen tissues. In conclusion, the results indicated that *Lactobacillus* under natural and stressful conditions could induce favorable influences on immune responses under heat stress to give it at one day of age or at 3 weeks of age.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, Bursal disease, Newcastle disease

الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة لبيان تأثير استخدام بكتيريا العصيات اللبنية على الاستجابة المناعية لأفراخ دجاج اللحم للقاحات المختلفة في الأجواء الحارة وتحت الظروف البيئية المجهدة. اشتملت الدراسة على 180 فرخ دجاج لحم عمر يوم واحد قسمت عشوائياً بغرفتين بواقع 90 فرخ بكل غرفة وقسمت الأفراخ بكل غرفة إلى ثلاثة مجاميع متساوية كل مجموعة احتوت على 30 فرخ حيث احتوت الغرفة الأولى على المجموعة الأولى (G1) والتي أعطيت العصيات اللبنية عند عمر يوم واحد وبجرعة قدرها 1×10^8 cfu/ml عن طريق التجريع بالحوصلة فيما أعطيت المجموعة الثانية (G2) نفس الجرعة ونفس الطريقة ولكن عند عمر ثلاثة أسابيع أما المجموعة الثالثة (G3) لم يعامل بأي معاملة واعتبرت مجموعة سيطرة وتم تعريض هذه الغرفة للأجهاد الحراري (38-40°C) بعمر 3 أسابيع لمدة 3 ساعات مستمرة ولفترة 10 أيام أما الغرفة الثانية فقد احتوت أيضاً على 3 مجاميع، المجموعة الرابعة (G4) والتي أعطيت العصيات اللبنية عند عمر يوم واحد وبجرعة عن طريق التجريع بالحوصلة أما المجموعة الخامسة (G5) أعطيت نفس الجرعة ونفس الطريقة ولكن عند عمر ثلاثة أسابيع والمجموعة السادسة (G6) والتي لم تعامل بأية معاملة واعتبرت مجموعة سيطرة، ولم تعرض هذه الغرفة لأي أجهاد حراري. تم تلقيح المجاميع G1, G2, G4, G5 بلقاح مرض التهاب جراب فايريشيا الخمجي بعمر 16 يوم ولقاح مرض نيوكاسل بعمر 14 يوم. بعد 48 و 120 و 240 ساعة من التعرض للأجهاد الحراري (للمجاميع المعرضة للأجهاد الحراري وللغير معرضة للأجهاد الحراري) تم قياس مناعة الأفراخ باستخدام فحص الأليزا وقياس مناعة مرض التهاب فايريشيا الخمجي ومرض نيوكاسل وأيضا إجراء فحص منسب جراب فايريشيا ومنسب الطحال قياس نسبة الخلايا المتغايرة. الخلايا اللمفية (H/L ratio) وإجراء الفحص النسيجي للأعضاء (جراب فايريشيا والطحال).

أظهرت نتائج ارتفاع معدل معيار الاضداد ضد مرض التهاب جراب فايريشيا الخمجي في المجاميع G1, G5, G4 بينما ارتفع معدل معيار الاضداد مرض نيوكاسل وبشكل معنوي في المجاميع G1, G4. وسجل منسب جراب فايريشيا زيادة معنوية في مجموعة G5, G4 مقارنة بالمجاميع الأخرى أما منسب الطحال فقد أظهرت النتائج زيادة معنوية في مجموعة G5 بعد 48 ساعة من التعرض للأجهاد الحراري مقارنة ببقية المجاميع في حين سجلت مجموعة G5, G4, G2, G1 ارتفاعاً معنوياً بعد 120 و 240 ساعة من التعرض للأجهاد الحراري مقارنة بمجموعتي السيطرة G3 و G6. بينما سجلت مجموعة السيطرة المعرضة للأجهاد الحراري G3 ارتفاعاً معنوياً بدليل H/L بعد 48 و 120 و 240 ساعة من التعرض للأجهاد الحراري. أما نتائج الفحص النسيجي للأعضاء المتغايرة جراب فايريشيا والطحال فقد أظهرت المجاميع المعرضة للأجهاد الحراري G3, G2, G1 ظهور آفات نسيجية تميزت بالنضوب الشديد للخلايا المتغايرة في نسيج جراب فايريشيا ونضوب للخلايا المتغايرة مع نزف واحتقان في نسيج الطحال، أما المجاميع التي لم تتعرض للأجهاد الحراري G5, G4, G6 فقد سجلت مجموعة G5, G4 نضوب بالخلايا المتغايرة بنسب جراب فايريشيا والطحال أما مجموعة G6 فلم تظهر أي تغيير بالنسيج. نستنتج من هذه الدراسة أن العصيات اللبنية تلعب دوراً كبيراً في تحسين الأداء المناعي للطير في حالة الظروف الطبيعية والظروف الأجهادية كالتعرض للأجهاد الحراري حيث تعمل على تقليل الأجهاد الحراري في حالة إعطائها بعمر مبكر (يوم واحد من عمر الفرخ) أو بعمر ثلاثة أسابيع من عمر الأفراخ.

INTRODUCTION

The control of infections and the enhancement of life performance through an non-antibiotic approach are urgently required because increase in microbial resistance to antibiotics and residues in chicken meat products can be harmful to consumers, probiotics have been used in poultry management not only to enhance production performance (1-3) and to reduce mortality (4) but also to develop and stimulate the immune response (3,5). The manipulation of gut microbial via the administration of probiotics influences the development of the immune response (6). In poultry, the probiotics can modulate the systemic antibody response changes in haematological and cholesterol profiles. Probiotic microorganism (nonpathogenic bacteria and / or yeast) are one of the alternatives for growth promotion in poultry (9,10). The bacteria are most often used as probiotics are lactobacilli and bifidobacteria although other groups are also represented (11). Immediately prior and during transportation birds may exposed to a wide range of potential stressors, these include catching, handling, loading, motion, acceleration, impact (12) and heat stress, bad ventilation and diseases, so these stress factors effects on the intestinal microbial balance (13). The live microorganisms (probiotics), which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host through improvements to the intestinal microbial balance (14) and that improve immunity, productive performance and mortality of broiler in the stressed environmental condition (15). The present study, for statement the affecting used the probiotics on the immune response of broiler chicks to infectious bursal disease and Newcastle disease vaccines in heat stress or in the stressed environmental condition. The outcome of current study would be helpful to know which perfect age that can give the probiotics to improving the immune response in the broiler chicks in the heat stress.

MATERIALS AND METHODS

Poultry house:

The experiment was done in poultry house of pathology and avian diseases at the college of veterinary medicine / Baghdad University. Poultry house was cleaned and disinfected before chicks admittance.

Experimental animals:

One hundred and eighty –day old Rose broiler chicks, from a commercial broiler breed (Rose, Jordan origin) were divided randomly into 6 groups 30 chicks each, and each 3 groups were put in a separate room, the first room contained group one

(G1) which was given *Lactobacillus acidophilus* bacteria (1×10^8 cfu/ml) at one day old by oral inoculation, group two (G2) was given *Lactobacillus acidophilus* bacteria (1×10^8 cfu/ml) at 3 weeks old by oral inoculation and group three (G3) as control group. This room was exposed to heat stress (38-40 C) for 3 hours continuously in for days at starting from the 3rd week old. The second room contained group four (G4) which was inoculated *Lactobacillus acidophilus* bacteria (1×10^8 cfu/ml) at one day old by oral inoculation, group five (G5) which was given *Lactobacillus acidophilus* bacteria (1×10^8 cfu/ml) at 3 weeks old by oral inoculation and group six (G6) as a control group, this room was in a normal temperature.

Collection of blood samples and vaccination:

Blood samples were collected from 20 chicks randomly at 2 days old for assessment of maternal immunity against infectious bursal disease (IBD) and Newcastle disease (ND), 10 blood samples from each group were aspirated from jugular vein and to determine the age of vaccination, was ELISA test determined the age of (IBD) vaccine at 16 day of chicks age and were vaccinated with (Nobil is/D78) vaccine via drinking water (crop inoculation). The (ND) was vaccine determined at 14 day and were vaccinated with (Avipro/lasota) vaccine via drinking water (crop inoculation).

Serological and Heterophil to lymphocyte (H/L) ratios:

After 48, 120 and 240 hours of heat stress exposure 10 blood samples were aspirated from each group (heat and heat stress exposure) from jugular vein to determine antibody titers against (IBD) and (ND) in blood serum by using ELISA test (Synbiotics-USA) the procedure used in this test was performed according to the manufacture instructions listed in the ProFLOK ELISA kit (Synbiotics-USA). The heterophil to lymphocyte (H/L) ratio was used an index of stress status, after 48, 120, and 240 hr. from heat stress in all groups (heat and non-heat stress) by using method of (16).

Bursa and spleen index:

From each group (heat and non- heat stress) five specimens were taken after 48, 120 and 240 hr. from exposure to heat stress, bursa of fabricus and spleen were taken to measure the bursa index (17) and spleen index (18).

Histological test:

Specimens were taken from internal organs chicks includes, Bursa of fabricius and spleen from each group after 48,120 and 240hr. from exposed to heat

stress (heat and heat stress group). The tissue were fixed in 10% buffer formaldehyde solution immediately after removed, the processing was routinely done and then slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) stain and histopathological changes were observed under light microscope (19, 20).

Statistical analysis:

The data were analyzed by using SPSS (21). To calculated the difference between means Duncan-multiple test was used (22).

RESULTS AND DISCUSSION

The antibody titer (AB) against IBD showed in table (1) significant differences ($P \leq 0.01$) between groups (exposed to heat stress and non-exposed to heat stress group) after 48, 120, 240 hours the high level of antibody titer was at 48, 120 and 240 hours in G4, G5 and G1 and the low level was in G2 and G6 (control non exposed to heat stress), the lower titers of Ab in the G3 and non-vaccine (control exposed to heat stress and non – vaccine) .

Table (1): Antibody titer against IBD before treatment (mean \pm SE)

Group Time (hr)	Heat stress			Non- heat stress		
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
48 hr.	1625.00 \pm 444.94 a	997.20 \pm 365.98 b	742.60 \pm 248.61 c	1552.4 \pm 227.23 a	1358.40 \pm 606.92 a	797.40 \pm 290.66 b
120 hr.	1984.60 \pm 791.52 b	886.20 \pm 308.84 c	458.00 \pm 263.28 d	2271.60 \pm 1334.74 a	1346.70 \pm 606.92 b	725.80 \pm 139.81 c
240 hr.	929.60 \pm 235.19 c	807.20 \pm 236.94 c	436.80 \pm 225.11 c	3054.40 \pm 417.03 a	1496.00 \pm 676.54 b	492.60 \pm 140.06 d

Small letters between groups (row) denoted significant differences ($P \leq 0.01$).

The effects of probiotics on the immune response of poultry are interesting and complicated. In this study these results showed that high serum IgG levels in the group receiving *Lactobacillus acidophilus* bacteria in one – day old of chick (G4 & G1) and in 3 wks old of chick (G5) with heat stress and non-heat stress compared with other groups. Several studies have showed significant improvements on the immune response of commercial broiler chicks (23,24) and the common probiotic strains such as *Lactobacillus* species used in broiler nutrition have a beneficial immunomodulatory effect (8) which may be due to their ability to induce cytokine production, which leads to regulation of innate and adaptive immune responses (25). It has been demonstrated that some species and strains of *Lactobacillus* induce cytokines that promote T-helper cell 1 effector functions, such as interleukin 12 (IL-12) (26,27). Especial that *Lactobacillus acidophilus* is more effective at inducing T-helper -1 cytokines (24).

The results of antibody titer against NDV. are presented in table (2). There was significant differences ($P \leq 0.01$) in antibody titer between all groups after 48, 120 and 240hr. The high significant ($P \leq 0.01$) level of Ab titer at 48, 120 and 240 hr. was in G4 and in G1 at 48 and 120hr. only. The low level in G2, G5, G6 all the times, but G1 at 240hr. only, the lower titers of Abs were in G3 in G3 (control – espoused to heat stress and non-vaccinated) in all the times. These results are in agreement with the work of (28) which reported that the antibody titers against ND in broilers fed with diets supplemented with probiotic microorganism

was significantly higher at 10 days post-immunization compared to the control birds. Similarly, (29) found that supplementation of *Lactobacillus acidophilus* increased the antibody titer against NDV. significantly ($P \leq 0.01$) during 19, 29 and 39 day from vaccination. The highly difference in antibody production in G4 and G1 compared with G5 and G2 could be attributed to the time of administration it is obvious that probiotics could be important in populations where the immune response is immature or weak during the life span (30) also this result agreed with (31) which found the administration of probiotics in broiler chickens via the drinking water starting on the second day of life, had beneficial effects, these effects were more pronounced at a young age during the growing period as can be seen by the higher antibody titers, it is then suggested that giving probiotics after the development period may have no further benefit.

The lower of antibody titers in G3 after 48, 120 and 240 hr. from heat stress compered wit G6 (control non-heat stress) because heat stress has effect on the antibody titers and causes highest gradually decreased in the titer (31).

Table (3) shows the result of bursal index (gm), the increase was determined in bursal index in group 4 (G4) all the times and in the G5 at 48 hr. and 120 hr. with only non- significant increase at 240 hr. ($P \leq 0.01$) while other groups (G1, G2, G3 and G6) showed lower results .

Table (2): The means of antibody titer against NDV (mean \pm SE)

Group Time (hr)	Heat stress			Non- heat stress		
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
48 hr.	539.60 \pm 302.80a	304.20 \pm 82.44b	78.40 \pm 45.28c	539.60 \pm 302.80a	337.80 \pm 45.57b	294.20 \pm 101.19b
120 hr.	626.80 \pm 284.68a	306.80 \pm 148.78 b	72.00 \pm 24.52 c	634.20 \pm 236.59 a	348.40 \pm 125.31 b	294.00 \pm 107.97 b
240 hr.	663.00 \pm 396.20b	443.80 \pm 127.69b	52.80 \pm 20.80 d	2773.60 \pm 671.74 a	503.80 \pm 116.07 b	248.40 \pm 106.70 c

Small letters between groups (raw) denoted significant differences ($P \leq 0.01$)

Table (3): The means of bursal index (gm) of the chicks (mean \pm SE)

Group Time (hr)	Heat stress			Non- heat stress		
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
48 hr.	0.17 \pm 0.02 b	0.18 \pm 0.02 b	0.11 \pm 0.03c	0.20 \pm 0.02 a	0.20 \pm 0.01 a	0.17 \pm 0.03 b
120 hr.	0.18 \pm 0.02 b	0.16 \pm 0.02 bc	0.13 \pm 0.03 c	0.22 \pm 0.01 a	0.22 \pm 0.01 a	0.15 \pm 0.02 c
240 hr.	0.16 \pm 0.02b	0.14 \pm 0.02 c	0.14 \pm 0.02 c	0.21 \pm 0.03 a	0.17 \pm 0.03 b	0.15 \pm 0.02 bc

Small letters between groups (raw) denoted significant differences ($P \leq 0.01$)

When the gland index exceeds the value of the control treatment, means a significant improvement in the immune response to the fact that fabricia gland is directly responsible for the humoral immunity (32), this result agreed with (33) and (34) who proved that the bacillus probiotics are better to improve development of immune organs, strengthen immune function and significant improvement in the index of bursa of fabricius.

The significant decrease in the G1 and G2 compared with G4 and G5 in spite of the four groups have been given lactobacillus, due to exposure of groups 1 and 2 to the heat stress, as the heat stress leads to shrunk of bursa of fabricius and become a trophid (35), due to increased cortex area of the bursa while the medulla area decrease. Therefore, the ratio between the cortex and medulla area of the bursa of fabricius in heat stressed broilers increased and the number of lymphocytes in both cortex and medulla of the bursa in broilers were decreased under heat stress (36). This applied to the group of control as the G3 decreased significantly from G6 as a result of exposure to heat stress and for the same reason that mentioned earlier.

Table (4) shows the result of spleen index (gm) of the chicks, These results showed increase significant at 48 hr. ($P \leq 0.05$) in G5 (G5) than other groups and they showed significant increase at 120hr. and 240 hr. ($P \leq 0.05$) in G1, G2, G4 and G5 compared to the control groups G3 (exposed to the heat stress) and G6 (non – exposed to the heat stress).

The significant increase of the spleen index in the G5, G4, G1 and G2 compared with control groups G3 and G6 in case of exposed to heat stress and non- heat stress is in agreement with the findings of (37) who found that feeding broilers probiotic

caused increase in the relative weights of spleen treatment group, also in agreement with (38) who found a significant increase in the relative weight of spleen at 42 days of age in all probiotic treatment groups as compared to the control group. Following stimulation by antigen, post bursal B cells were able to generate somatic variants in splenic germinal centers, the size of these germinal centers was maximized by day 7 of the primary response and had begun to wane by 14 day (39) and this indicates an enhancement effect of probiotic on the immune system of broilers and the relative weights of immune organs (38).

The results of H/L ratio (table 5) showed significant differences ($P \leq 0.01$) between groups after 48, 120 and 240 hr. The high significant ($P \leq 0.01$) means of H/L ratio in G3 and after that in G1 and G2 at 48, 120 and 240 hr the low means were in G4, G5 and G6 at 48, 120 and 240 hrs.

Table (4): The means of spleen index (gm) of the chicks (mean \pm SE)

Group Time (hr)	Heat stress			Non- heat stress		
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
48 hr.*	1.13 \pm 0.02 b	0.10 \pm 0.03 b	0.15 \pm 0.66 b	0.10 \pm 0.02 b	2.9 \pm 0.02 a	0.10 \pm 0.02 b
120 hr.*	2.17 \pm 0.02 b	8.14 \pm 0.03 a	1.05 \pm 0.02 b	9.50 \pm 1.12 a	8.94 \pm 1.03 a	0.11 \pm 0.02 b
240 hr.**	9.64 \pm 1.52 a	8.25 \pm 0.03 a	0.16 \pm 0.02 b	8.88 \pm 0.02 a	8.16 \pm 0.03 a	0.11 \pm 1.64 b

*Small letters between groups (row) denoted significant differences ($P \leq 0.05$)

**Small letters between groups (row) denoted significant differences ($P \leq 0.01$)

Table (5): The means of H/L ratio of the chicks (means \pm SE)

Group Time (hr)	Heat stress			Non- heat stress		
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
48 hr.	1.62 \pm 3.74 b	1.48 \pm 3.74 b	3.45 \pm 0.16a	0.31 \pm 2.08 c	0.42 \pm 1.90 a	0.50 \pm 1.35 c
120 hr.	1.98 \pm 2.00 b	1.52 \pm 8.60 c	3.18 \pm 0.10 a	0.34 \pm 1.31 d	0.36 \pm 4.27 d	0.50 \pm 8.36 d
240 hr.	1.70 \pm 7.07 b	1.36 \pm 0.11 c	2.94 \pm 0.10 a	0.44 \pm 1.63 d	0.39 \pm 1.98 d	0.50 \pm 9.27 d

Small letters between groups (row) denoted significant differences ($P \leq 0.01$)

The heterophil: lymphocyte ratio (H/L ratio) was used as an index of stress (40). It was shown that both heat stress and feed restriction increase the H/L ratio in broilers (41) and these are agreement with the results of this study, which showed the significant increase in the H/L ratio in G1, G2 and G3 these exposed to the heat stress compared with G4, G5 and G6 which were non – exposed to the heat stress, so when compared plasma corticosterone concentration and H/L ration responses to various stress and concluded that the H/L ratio is better indicator of stress in poultry (42). The significant increase in the H/L ratio of G3 (control group that exposed to the heat stress) compared with G1 and G2 and G3 (treatment groups with lactobacillus acidophilus were exposed to heat stress), these results are in agreement with the work of (43) who suggested that dietary supplementation of poultry with *E.coli* (1917) probiotic prevented the increase in H/L ratio in both cold stressed and transported stressed birds and prevented the decrease of L counts in cold stressed birds. Similarly, (44) found supplementating of diet with 0.1% probiotic for broiler under heat stress had increased the differential leucocytic counts and decreased the H/L ratio which is important in reducing the harmful effect of heat stress.

The microscopic examination to the bursa of fabricius and spleen after 48 hrs., 120hrs. and 240 hrs. from exposed to the heat stress to all groups of this study. In bursa of fabricue of G1 after 48 hrs. showed early signs of apoptosis with depletion of lymphocytes, while after 120 hrs. and 240 hrs. showed severe depletion of lymphocytes in the follicles (fig. 1). In spleen of G1 after 48 hrs. from exposed to the heat stress showed very dilation of blood vessels with hyperplasia of lymphoid tissue, and after 120 hrs. showed dilated blood vessel with

depletion of lymphoid tissue, after 240 hrs. there was very dilated blood vessels with multiple focal hyperplasia of lymphoid tissue. In the G2 there was intensive depletion of lymphocytes within the follicle of bursa of fabricius after 48 hrs. from exposed to the heat stress and after 120 hrs. and 240 hrs.

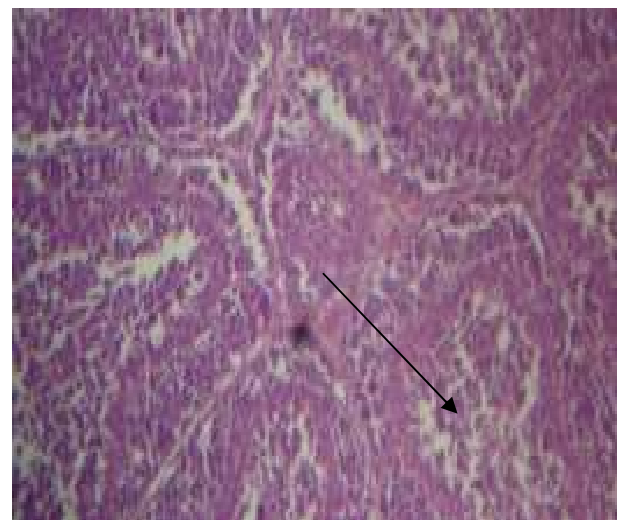


Figure (1): Histological section in the bursa of fabricius of G1 at (120hr) from exposed to heat stress shows sever depletion of lymphocytes in the Follicles (↗). (H&E stain 40X).

In spleen of G2 after 48 hrs. from exposed to the heat stress there was focal lymphoid follicle hyperplasia with dilation of blood vessel and hemolytic changes, after 120 hrs. and 240 showed severe blood vessel dilation with hyperplasia of lymphoid tissue (fig. 2). In the G3 (control group) there were destructive changes with vacillation in the lymphoid follicles of the bursa of fabricius after 48 hrs. , 120 hrs. and 240 hrs. from exposure to the heat stress. In spleen of control group (G3) showed thickening of blood vessel wall after 120 hrs. 25 and 240 hrs. from exposed to the heat stress.

Bursa of fabricius of G4 showed depletion of lymphocytes after 48hrs. (non-exposed to heat stress) and after 120 hrs. showed severe depletion of lymphocytes and vacillation of lymphoid follicles, and the same lesions were found after 240 hrs. After 48hrs. in the spleen of G4 showed increased blood vessel dilation and depletion of lymphocytes and the same lesions were found after 120 hrs. but after 240 hrs. showed depletion of lymphoid tissue and apoptosis in the lymphocytes.



Figure (2):Histological section in the spleen of G2 at (240 hr.)from exposed to the heat stress shows severe blood vessel dilation with hyperplasia of lymphoid tissue.(H&E stain 40X).

The bursa of fabricius of G5 after 48 hrs. showed severe depletion of lymphocytes and follicles with edema between follicles (fig.3). After 120 hrs. and 240 hrs. was there severe depletion of lymphocytes in the lymphoid follicles. In spleen of G5 after 48 hrs., 120 hrs. and 240 hrs. showed severe depletion of lymphocytes and dilated blood vessels (fig. 4).

The control group (G6) non-exposed to the heat stress in bursa of fabricia showed no clear lesion after 48 hrs, 120hrs, and 240 hrs. In spleen of G6 after 48hrs, 120hrs. and 240hrs. showed no clear lesion .

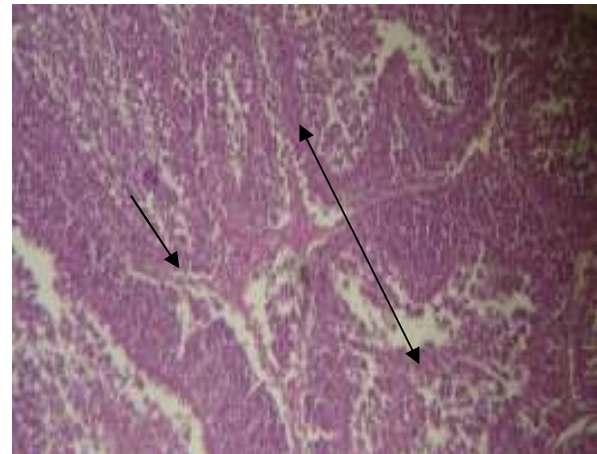


Figure (3):Histological section in the bursa of fabricius of G5 at (48 hr.) non- exposed to heat stress shows severe depletion of lymphocytes follicles() with edema between follicles (▲).(H&E stain 10X).

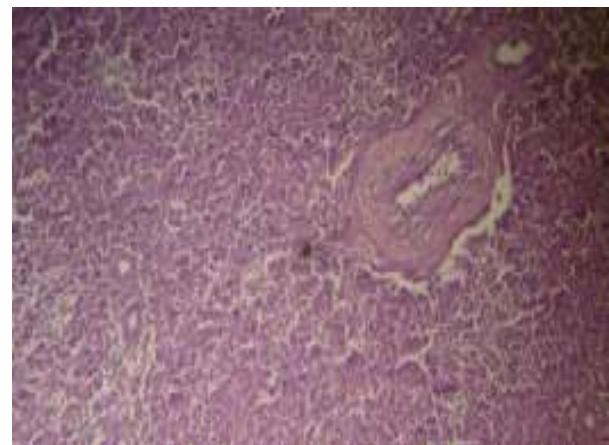


Figure (4):Histological section in the spleen of G5 at (120 hr.) non- exposed to heat stress shows severe depletion of lymphocytes and dilated of blood vessel with R.B.C. (H&E stain 10X)

The results of histological examination of the bursa of fabricius and the spleen of the groups exposed to heat stress that were given lactobacillus bacteria (G1) , (G2) and control group that did not give bacteria lactobacillus (G3), have indicated the lesion after 48, 120 and 240 hours of exposed to heat stress in bursa of fabricius and in the spleen G1,G2and (G3) which was characterized by obtaining of severe damage to lymphoid tissue of the bursa of fabricius and spleen, is due to the effect of heat stress on the lymphatic organs, it was reported to cause a reduction in antibody production and reduced lymphoid organ weights have also been reported in broilers under heat stress condition (45), and this result agreed with (46) who found that increase of the apoptosis of spleen and bursa cells by heat stress and that lead to severe depletion in the lymphoid tissue. The influence of G1and G2, which

were exposed to heat stress was less than control group (G3) and due to the fact the lactobacillus play a role in improving the performance of lymphoid organs and reduce the impact of stress on the birds and this is consistent with (15) who found the probiotics reduced the deleterious effects of heat stress and increase of relative weight of lymphoid organs.

The histologic changes in the bursa of fabricius and spleen of the G4 and G5 not exposed to heat stress as characterized by histopathological lesions after 48, 120 and 240 hours, the histologic changes in the bursa of fabricius and spleen are similar to that present in both G1 and G2 compared with control group (G6), which did not treat and were not exposed to heat stress, as shown sections of tissue of bursa of fabricius and spleen for this group (G6) the absence of any changes in these tissues.

The reason for histologic changes in bursa of fabricius and spleen of the groups G1, G2, G4 and G5 is due to the fact that these groups were vaccinated by infectious bursal disease vaccine type D78, this vaccine strain is intermediate live vaccine and (46) has been found that the D78 strain may caused the occurrence of severe depletion of lymphocytes in the bursa of fabricius in the 24 hours after vaccination, and even after 120 hours after vaccination to reach of the percentage of damage in bursa of fabricius to 5%. And also agreed with the results of histological changes occurring in bursa of fabricius as a result of vaccination by intermediate live vaccine of infectious bursal disease vaccine (D78 strain) with the finding of researcher (47 and 48).

D78 strain had less effect on spleen than bursa of fabricius because the bursa of fabricius is the target organ for infectious bursal disease virus also spleen heal from injury faster than bursa of fabricius (49). This result is in agreement with (46) who referred to the influence of vaccine strain D78 on the spleen after 24 hours from vaccination characterized by the emergence of simple hemorrhage and congestion and infiltration of inflammatory cells has indicated the results after 120 hours of vaccination after that the healing was very fast.

In conclusion, the results indicated that *Lactobacillus* under natural and stressful conditions could induce favorable influences on immune responses under heat stress to give it at one day of age or at 3 weeks of age.

REFERENCES

1. Mohan B.; Kadirvel R.; Natarajan A. and Bhaskaran M. (1996). Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. Br. Poult. Sci. 37: 395-401.
2. Yeo J. and Kim K. (1997). Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poult. Sci. 76: 381-385.
3. Jin I Z.; Ho Yw.; Abdullah N. and Jalatudin S. (1998). Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broiler diet containing lactobacillus cultures. Poult. Sci. 77:1259-1265.
4. Vicente JL.; Avina L.; Torres – Rodriguez A.; Hargis B. and Tellez G. (2007). Effect of a lactobacillus spp. Based probiotic culture product on broiler chick performance under commercial conditions. Int. J. Poult. Sci. 6: 154-156.
5. Rolfe RD. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr. 130:396s-402s.
6. Isolauri E.; Sutas Y.; Kankaanpaa H.; Arvilommi H. and Salminen S. (2001). Probiotics, effects on immunity. Am.J.Clin. Nutr.73:444s-450s.
7. Huang MK.; Choi YJ.; Houde R.; Lee JW. and Zhao X. (2004). Effects of lactobacilli and on acidophilus fungus on the production performance and immune responses in broiler chicken. Poult. Sci. 83: 788-795.
8. Koenen ME.; Kramer J.; Van der Hulst R.; Heres L.; Jeurissen SHM. and Boersma WJA. (2004). Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer and meat type chickens. Br. Poult. Sci. 45:355-366.
9. Abdulrahim SM.; Haddadin MSY.; Hashlamoun EAR. and Robinson R K. (1996). The influence of lactobacillus acidophilus and bacitracin on the layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. Br. Poult. Sci. 37: 341-346.
10. Santin E.; Maiorka A.; Macari M.; Grecco M.; Sanchez JC.; Okada TM. and Myasaka AM. (2001). Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing saccharomyces. Br. Poult. Sci. 42: 301-316.
11. Patterson JA. and Burkholder KM. (2003). Application of prebiotics in poultry production. Poult. Sci. 82: 627-663.
12. Ghareeb K. ; Auad WA. ; Nitsch S.; Abdel Rahem A. and Bohm J. (2008). Effects of transportation on stress and fear responses of Growing Broiler supplemented with prebiotic or probiotic. Int. J. Poult. Sci. 7 (4): 678-685.
13. Boyliss PA. and Hinton MH. (1990). Transportation of broilers with special reference to mortality rates. Appl. Anim. Behav. Sci. 28:93-118.
14. Food and Agriculture Organization of the United Nations and WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
15. Tollba AAH. and Mohmoud RM. (2009). How to control the Broiler pathogenic intestinal flora under normal or heat stress conditions. Egypt. Poult. Sci. Vol. (29) (II): 565-587.
16. Campbell TW. (1988). Avian Hematology and cytology. 1stEd. Iowa state University Press, USA. Pp.: 3-17.
17. Lucio B. and Hitchner SB. (1979). Infectious bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing antibody level in the dam and

- subsequent protection of the progeny. Avian Dis. 23:466-478.
18. Kim I.; Gagic M. and Sharima JM.(1999). Recovery of antibody producing ability and lymphocyte repopulation of bursa follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. Avian Dis. 43:401-413.
 19. Luna LG. (1968). Manual of Histologic staining Methods of the Armed force Institute of pathology. 3rd Ed. McGraw-Hill, New York.
 20. Aiken I. and Suvashe B. (1976). A procedure for location and removal of the lacrimal and Harderian glands of avian species. Biochem. physiol. 53: 193-195.
 21. SPSS for windows. (2008). Base system Users. Guide, Chicago, USA.
 22. Duncan DB. (1955). Multiple range and multiple F test. Biometrika. 11:1-42.
 23. Rahman AU.; Khan S.; Khan D.; Chand N.; Hussain M.; Ahmed S.; Shoail SM.; Ali M.; Ahmed N.; Ahmed I.; HaQ IU and Ahmed I. (2009). Probiotics as an Immune enhancer in broilers. Sarhad J. Agric. 25(3): 457-462.
 24. Brisbin JT.; Gong J.;Parvizi P. and Sharif S. (2010). Effects of lactobacilli on cytokine Expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. CLIV. Vaccine Immunol. 17(9): 1337-1343.
 25. Corthesy HR.; Gaskins HR. and Mercenier A. (2007). Cross- talk between probiotic bacteria and the host immune system. J. Nutr.137:7815-7905.
 26. Christensen HR.; Frokiar H. and Pestka JJ. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J. Immunol. 168:171-178.
 27. Hesse C.; Andersson B. and Wold AE. (2000). Gram positive bacteria are potent inducers of monocyticinterleukin. 12 (IL-12) while gram – negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. Infect. Immune. 68:3581-3586.
 28. Khaksefidi A. and Ghoorchi T. (2006). Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. Poult. Sci. 43:295-300.
 29. Al-Abaydi EJ.(2001). The Experiment study of probiotic in broiler chicks. Master thesis in veterinary Medicine – Poultry disease. The College of Veterinary Medicine at University of Baghdad.
 30. Fooks J. and Gibson G R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. Br. J. Nutr. 88: s39-s49.
 31. Thongsong SK.; Thongsong B. and Chavananikul V. (2008). Blood haematological cholesterol profile and antibody titer response of broilers with added probiotic containing both bacteria and yeast or antibiotic in drinking water. Thai. J. Vet. Med. 38(4): 45-56.
 32. Abdul Ahad IE. (1996). Pathogenesis and immune bacteria *Borrelia*Ansirna in chickens. Master thesis, College of Veterinary Medicine at University of Baghdad.
 33. Tahir KN.; abdellattif FH. and Al-husseiny YS. (2001). A comparative study the effect of using antibiotic (oxytetracycline), Iraqi probiotic and their mixture as feed additives in broiler diets on II: Some biochemical and immunological parameters. Qadisiyah J. Agri. Sci. 1 :1-10.
 34. Hui J E.; Yao-Xing C.; Qun W.; En-Mei Q.; Guo-zhoug W. and sheng- he L. (2013). Effect of Bacillus probiotics on blood cells and structure of immune organs in broilers. Acta Vet. Et. Zootechnica. Sinica. 44(5): 778-787.
 35. Moqbool A.; Khan SA.; Khan K.; Aslam A . and Anwar B. (2004). Effect of ascorbic acid and acetylsalicylic acid supplementation on performance of broiler chicks exposed to heat stress. Pak. Vet. J. 24:109-112.
 36. Aengwanich W. (2008). Pathological changes and the effects of Ascorbic acid on lesion scores of Bursa of fabricius in broilers under chronic heat stress. Research. J. of Vet. Sci. 1(1): 62-66.
 37. Willis WL.; Isikhuemhen OS. and Ibrahim SA. (2007). Performance assessment of broiler chickens given mushroom extract alone or in combination with probiotics. Poult. Sci. 86:1856-1860.
 38. Alkhalf A.; Alhaj A. and Homidan I. (2010). Influence of probiotic supplementation on immune response of broiler chicks. Egypt. Poult. Sci. 30(1): 271-280.
 39. Arakawa H.; Furusawa S.; Ekino S. and Yamagishi H.(1996). Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. EMBO J. 15: 2540-2549.
 40. Zulkifi I.; CheNorma MT.; Chong CH. and Loh TC. (2000). Heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility reactions to preslaughter handling in broiler chicken treated with ascorbic acid. Poult. Sci. 79: 402-406.
 41. Khajavi M.; Rahimi S.;Hassan ZM.; Kamail MA . and Mousavi T. (2003). Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular of two commercial broiler strains under heat stress condition. Br. Poult. Sci. 44:490-497.
 42. Gross WB. and Siegel HS. (1983). Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian. Dis. 27:972-979.
 43. Huff GR.; Huff WE.; Enders C.;Sonnenhorn U.;Farnell MB.; Solis Del Los SF. and Donoghue AM. (2006). Oral treatment with the probiotic *Escherichia coli*Nissle 1917 improves body weight and modulates the stress response of poultry in respiratory challenges with avian pathogenic *E.coli*. In: proceeding of the XII European Poultry Conference: 10-14.
 44. Rahimi S. and Khaksefidi A.(2006). A comparison between the effects of a probiotic (Bioplus 2B) and an antibiotic (Virginiamycin) on the performance of broiler chickens under heat stress conditions. Iranian J. Vet. Res. 7: 23-28.
 45. Lora LL. and Rostagno MH. (2013). Impact of heat stress on poultry production. Anim. J. 3:356-369.

46. Al-Hashimi BHA. (2007). Comparative study of pathologic and Immunologic changes associated with application of five Gumboro disease vaccines. PhD. thesis Veterinary medicine / Poultry disease. University of Baghdad.
47. Awaad D. and Schwarzer K. (2005). Modulating the immunosuppressive effect. International Poult. Prod. 13 (1):20-25.
48. Schroder A.; Vanloon AAWM.; Goovaerts D.; Teifke JP . and Mundt E. (2001). VP5 and the Nterminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. J. Gen. Virol. 82: 159-169.
49. Lukert PD. And Saif Y M. (2003). Infectious bursal disease. In: Disease of poultry, edited by Saif, Y. M., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R. and Yoder, H.W., 11th ed., Fowa state University Press, Ames, Iowa, U.S. A. Pp. 161-179.

Situation of Chicken Pox in Iraq: A retrospective study(2007-2011)

Maral F. Thabit, Sabah J. Ameen and Abdul- Kareem Falih

Institute of Medical Technique / Community Health Department / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Chicken pox (CP) is a highly contagious illness and one of the classic diseases of childhood. The disease is endemic to all countries world-wide including Iraq.

Aim of the study is to throw the light on the epidemiology of the disease in Iraq per 5 year analysis (2007-2011).

A retrospective descriptive study was carried during November and December 2012 at the Center of Communicable Disease Control (CDC), Baghdad city by reviewing the registered (CP) cases from the monthly reports of different Iraqi governorates and then statistically analyzed.

The total number of registered (CP) cases per 5 years of the study was 237,000. The highest proportion (31.30%) was during the year (2011), with two outbreaks first in 2008(25.11%) and the second at 2011(31.30%). People at risk (65.31%) were mainly at the age group (5-15) years, with male predominance (54.46%). The highest proportion (19.13%) of (CP) were mainly at Baghdad city, mainly at Al-Rusafa (53.85%) compared to Al Karch district(46.13%) also the monthly distribution showed its peak occurrence during April and May (19.17% , 19.18%) respectively. From these results, it is concluded that chicken pox represents a persistent health problem in Iraq.

Key words: chicken pox.

الملخص باللغة العربية

جدري الماء هو مرض شديد العدوى ومصنف كأحد امراض الطفولة . المرض هو متوطن في كافة دول العالم ومن ضمنها العراق. هدفت الدراسة الحالية إلى تسليط الضوء على وبائية المرض في العراق من خلال تحليل البيانات على مدى خمس سنوات (2007 – 2011). انجزت دراسة وصفية استرجاعية خلال تشرين الثاني وكانون الاول عام 2012 في مركز السيطرة على الامراض الانتقالية في محافظة بغداد عن طريق مراجعة البيانات الموثقة لمرض جدري الماء من خلال الاحصائيات الشهرية لكل محافظات العراق ومن ثم تحليلها احصائيا . العدد الكلي لكافة حالات جدري الماء المسجلة خلال الخمس سنوات من الدراسة 237,000 . النسبة الاكبر (31ر11 %) كانت خلال عام 2011 مع وجود موجتين وبائيتين الاولى في عام 2008 (25ر11 %) والثانية في عام 2011 (31ر30 %) . ان الاشخاص المرشحين للاصابة (65ر31 %) ضمن الفئة العمرية (5 – 15) سنة باغلبية الذكور (54ر46 %) كما كانت النسبة الاكبر (19ر13 %) للحالات في محافظة بغداد , خصوصا في قطاع الرصافة (53ر85 %) مقارنة بالكرخ (46ر13 %) كما ظهر التوزيع الشهري للحالات ذروة حدوثه في شهر نيسان ومايس (19ر17 % , 19ر18 %) بالتتابع، وبذلك تستنتج الدراسة أن مرض جدري الماء يشكل مشكلة صحية وقائمة بصورة مستمرة في العراق.

INTRODUCTION

Chicken pox (CP) or varicella is a highly contagious illness caused by primary infection with Varicella Zoster Virus (VZV) (1). It usually starts with vesicular skin rash mainly on the body and head rather than the periphery and become itchy, raw pock marks which mostly heal without scarring (2).

Chicken pox virus was first identified by Persian scientist Muhammad Iba Zakariya or Razi (865-925) (3), it is highly infectious disease that spreads from person to person by direct contact or by air from an infected persons coughing or sneezing. Touching the fluid blisters can also spread the disease (4). It has, a 10-21 days incubation period and the contagious period continues until all blisters have formed scales, which takes 5 to 10 days (5).

Primary varicella is a disease that is endemic to all countries worldwide.

Varicella has a prevalence that is stable from generation to generation (6).

Cases of (CP) are seen throughout the year but more commonly in winter and early Spring (7).

Varicella is one of the classic diseases of childhood with the highest prevalence in the 4-10 years old age group (8,9). Infection in healthy adults leads to the more severe and active; though the incidence is much less common. Infection in adults is associated with greater morbidity and mortality (10).

In Iraq, the number of verified varicella cases varied from year to year with marked Spring seasonality and in the past, the disease usually occurred in pediatric population, but in these days, the epidemiology of disease changes and the disease also hits the higher age groups.

Aim of the study

To throw a light on the epidemiology of (CP) infection in Iraq per 5-years (2007-2011).

PATIENTS AND METHODS

A retrospective descriptive study was carried during November and December 2012 in the Epidemiological Investigation unit of Center of Communicable Disease Control (CDC) in Baghdad city. The data was collected and reviewed from the registered monthly reports of (CP) cases attended in different Iraqi governorates primary health care centers during the period of 1st January 2007 to 31st December 2011. The data pertaining to patients were studied regarding their gender, residency, number of cases per month and year along the studied period. Choosing 5 years of data for analysis that would supply sufficient event number, to make it possible to sniff out any seasonal variation in the occurrence of (CP) cases. All data obtained were subsequently stored in a personal computer and statistically analyzed by using tests for frequencies, percentages and figures.

RESULTS

The total number of registered (CP) cases per 5-years of the study was 237,000 distributed as 129091(54.46%) males and 107909(45.53%) females as shown in figure (1).

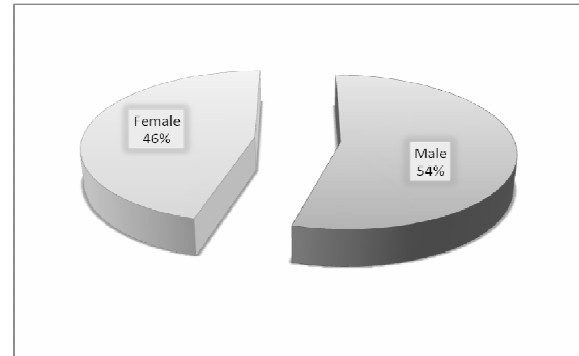


Figure (1): Distribution of total (CP) cases per 5-years of study according to gender

People at risk were mainly (65.31%) in the age group 5-15 years as shown in table (1).

Table (1): Distribution of total (CP) cases regarding age

Age groups (years)	Number	%
>1	6857	2.89
1-4	45837	19.34
5-15	154802	65.31
15-45	26517	11.18
45>	2987	1.26
Total	237000	100

The highest number of varicella cases per 5-years of the study was during 2011 (31.30%) with evident two outbreaks first in 2008 and second at 2011 as shown in table (2).

Table (2): Distribution of total (CP) cases per 5-years of study

Year	Number	%
2007	21788	9.19
2008	59520	25.11
2009	38817	16.37
2010	42680	18
2011	74195	31.30
Total	237000	100

The monthly distribution of (CP) cases per 5-years of study showed their peaks during April (19.17%) and May (19.18%), as shown in table (3).

Table (3): Monthly distribution of total (CP) cases per 5- years of study

Monthly distribution	Number	%
January	20029	8.45
February	17202	7.25
March	22808	9.62
April	45436	19.17
May	45476	19.18
June	27829	11.74
July	12989	5.48
August	8153	3.44
September	4605	1.94
October	5527	2.33
November	9626	4.06
December	17320	7.30
Total	237000	100

The highest number of (CP) cases per 5-years of study was in Baghdad city 45359(19.13%) as shown in table (4).

Table (4): Governorate distribution of total (CP) cases per 5- years of study

Governorate distribution	Number	%
Baghdad	45359	19.13
Anbar	6429	2.71
AL-Najaf	14187	5.98
Babil	3604	1.52
Diyala	6031	2.54
Salah-Edin	7060	2.97
Karbala	12656	5.34
Kirkuk	4869	3.57
Misan	3204	1.35
Naynawa	26720	11.27
Wasit	4237	1.78
Arbil	10207	4.30
Basrah	19841	8.37
Duhok	23756	10.02
Sulemaniya	18713	7.89
Diwaniya	6170	2.60
Muthana	5363	2.26
Dhi-Qar	14994	6.32
Total	237000	100

The distribution of CP cases in Baghdad city was higher at Rusafa district (53.86%) compared to Al Karkh district (46.13%) per 5-years of the study as shown in figure(2).

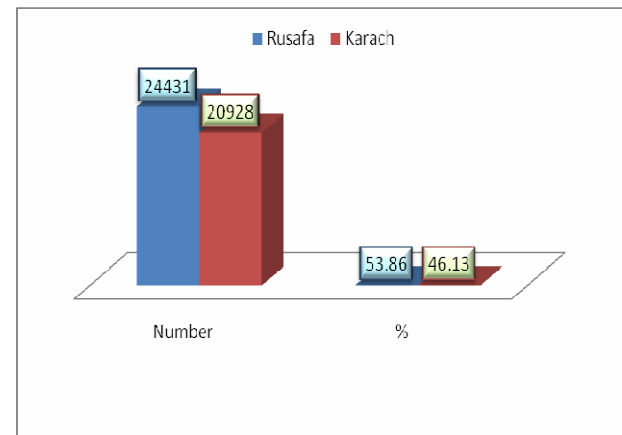


Figure (2): Distribution of (CP) cases at Baghdad city

DISCUSSION

In this retrospective study, information on the status of (CP) over 5 years of the study (2007-2011) is presented and the total number of registered cases was 237,000 and the real number is more because of a number of people do not seek medical advice also the lack of standard reporting in Iraq, makes accurate estimate of the exact incidence of (CP) in this study is difficult.

The epidemiological profile of (CP) cases revealed that males(54.46%) were affected more than females (46.53%) , this is compatible to the findings of Uduman et al (UAE) , who conducted 5-year descriptive study to characterize the epidemiology of varicella , a higher proportion of reported varicella cases were in males than females (58% versus 42%) (11).

People at risk in this study were mainly in the age group (5- 15) years, this could be explained due to classification of Iraq as one of the temperate countries in which (CP) is primarily a disease of children and most cases occurring due to school contact (12), also in the United Kingdom and Canada (13), England and Wales (14). The results illustrated that school and preschool conduct patterns play an important role in the dynamics of varicella.

In Australia, 83% of all 10-14 year olds were estimated to have contracted (CP) at some stage of their lives, before the vaccine was introduced (15).

In temperate climates , epidemics of varicella have been reported to occur every 2-5 years (16), and in this study it is clear that 2 outbreaks of (CP) were documented between (2007- 2011) , with two peaks 1st in 2008 (25,11%) and 2011 (31,30%) of the total registered cases , similarly in the Cauca Valley region of Colombia , the distribution of varicella outbreak was bimodal , with two peaks : in 2004 and the second in 2007 (17).

Annual variation in climate can therefore result in an annual or more complex peak in disease incidence, depending on the influence of climatic variables such as

rainfall or cloud over on the environment (18). The predominance of varicella cases in Baghdad among different Iraqi governorates, mainly at Al-Rusafa district, could be explained due to atmospheric pollution in association with population density. Many studies (19-21) also suggested that the epidemiology of varicella appears to vary among different geographic regions, climatic belts, population densities and degrees of socio-economic development.

It is clear that varicella occurred throughout the year with peak in the Months of April and May. Factors such as heat, viral interference infection with cross-protecting virus, have been suggested as possible causes of the epidemiological differences (22). A number of studies (23-25) conducted at Hong Kong, Taiwan, Japan respectively, and found an association between varicella occurrence and various environmental factors such as temperature, rainfall and humidity. In United Arab Emirates, a significant difference in the monthly rate of varicella cases reported during the 5 year study during Mars-May (11).

CONCLUSION

The registered and included (CP) cases in Iraq per 5 years of the study (2007-2011) showed the following:

- The persistence of (CP) disease as public health problem in Iraq..
- The total number of registered cases was relatively high.
- The highest proportion of (CP) cases was during the year (2011), with two outbreaks 1st in 2008 and second at 2011.
- The predominance of male cases compared to females..
- 'People at risk were mainly in the age group (5-15) year.
- The predominance of (CP) cases at Baghdad city among Iraqi governorates and mainly at Al-Rusafa district..
- The (CP) disease occurred throughout the year with peak the months of April and May.

RECOMMENDATIONS

- 1- Active surveillance studies are required to determine the true disease burden.
- 2- Strengthening PHC services and policies.
- 3- Initiation of vaccination programs of (CP) for children before school entry.
- 4- Health education to enhance public awareness regarding the importance of the problem of the disease in Iraq.
- 5- Improving registration of (CP) cases through training and solving administrative obstacles.

REFERENCES

1. Leung AKC.; Kellner JD. and Davies HD. (2009). Chicken pox : An update. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 4(4): 343-350.
2. Yoshzo A. (2003). Chicken pox. *Clin. All Round. J.* 52(3): 839- 884.
3. Sherifi Z. and Gharjin SE. (2005). The sero epidemiology of Varicella Zoster Virus (VZV) in different age groups in Tehran, Iran. *Iranian J. Aller. Asth. Immunol.* 4(2): 95-98.
4. Lecuyer A.; Levy C.; Gandelus J.; Floret D.; Soubeyrand B. and Coulin E. (2007). Hospitalization of newborns and young infants for chicken pox in France. *Europ. J. Pediatr.* 169(10): 1293-1297.
5. Amro K. and Dinger J. (2011). Unusual presentations of Varicella : Case Report. *South Asian J. Family Care Res. Net.* 2(8): 78- 91.
6. Albendroth A. and Arvin AM. (2001). Immune evasion as a pathogenic mechanism of varicella zoster virus. *Semin. Immunol.* 13 (1) : 27-29.
7. Galil K.; Brown C. and Lin S J. (2002). Hospitalizations for varicella in the United States: 1988 to 1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21:931-935.
8. Lee BW. and Tan AY. (1995). Chicken pox in the tropics. *BMJ.* 310 : 941.
9. Gershon AA. (2008). Varicella Zoster Virus infections. *Pediatr. Rev.* 29 : 5-10.
10. Alborz P. (2011). Chicken pox in adults. *Shiraz E. Med. J.* 2(3): 128- 139.
11. Uduman SA.; Sheek Hussein M.; Bakir M.; Trad D. and AL-Hussani M. (2009). Pattern of varicella and associated complications in United Arab Emirates : 5-year descriptive study. *EMH J.* 15(4): 1089- 1100.
12. Wharton M. (1996). The epidemiology of varicella zoster infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10 (3) : 71-81.
13. Brisson M.; Edmund WJ.; Law B.; Gay NJ.; Walld R.; Brownell M. and De Serres G. (2001). Epidemiology of Varicella-zoster virus infection in Canada and the United kingdom. *Epidemiol. Infect.* 127 (2) : 305-314.
14. Finkcnstadt BF. and Grenfell BT. (2000). Time series modeling of childhood diseases : a dynamical systems approach. *Appl. State.* 49: 182-205.
15. Menzies R.; Tumour C.; Chin C. and McIntyre P. (2008). Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Aboriginal and Torres Strait Islander people. *Australia 2003 to 2006. Comm. Intel.* 32 (Suppl) : S2- S7.
16. Singh MP.; Singh G.; Kumar A. and Singh A. (2011). Epidemiological lessons : Children pox outbreak investigation in a rural community around Chandigarh, North India. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 54(4): 772- 774.
17. Idrovo AJ.; Albavera-Hernandez C. and Rodriguez-Hernandez JM. (2011). Social epidemiology of a large outbreak of chicken pox in the Colombian sugar cane producer region : a set theory-based analysis. *Cad. Saude. Publica.* 27 (7) : 1393-1402.
18. Grassly N. and Fraser C. (2006). Seasonal infectious disease Epidemiology. *Proceeding of the Royal Society. Biol. Sci.* 273:2541-2550.
19. Liyanage NPN.; Sirimali F. and Malavige GN.

- (2007). Seroprevalence of varicella zoster virus infections in Colombo districts — Sri Lanka. *Indian J. Med. Sci.* 128-134.
20. Fairley CK. and Miller E. (1996). Varicella-zoster virus epidemiology : a changing scene. *J. Infect. Dis.* 174 (Suppl 3) : 5314-5319.
21. Yawn B.; Yawn R. and Lydick E. (1997). Community impact of childhood varicella infection. *J. pediatr.* 130 : 759- 765.
22. Garnett GP.; Cox MJ.; Bundy DA.; ;Didier JM. and Catharine J.(1993). The age of infection with varicella — zoster virus in St Lucia , West Indies . *Epidemiol. Infect.* 361-372.
23. Chan JYC.; Tian I.; Kwan YW.; Chan WM. and Leung CW. (2011). Hospitalizations for varicella in children and adolescents in a referral hospital in Hong Kong : A time series study . *MBC. Pub. Health.* 11(1): 366.
24. Wu PY.; LI YC. and Wu HD. (2007). Risk factors for chicken pox in Taiwan from a large-scale computerized data base. *Int. J. Dermatol.* 46 : 362-366.
25. Kokase A.; Yoshida M.; Sekine Y.; Ishikawa M.; Kurokuchi T.; Yochida Y.; Matsunaga N. and Takashima Y. (2001). The magnitude of variations of chicken pox incidence in Japan. *Epidemiol. Infect.* 126: 269 — 277.

قسم الدراسات العربية

ARABIC SECTION

مقارنة كيموحيوية وجينية للسلالات المحلية للنوع *Pseudomonas aeruginosa* مع مثيلاتها القياسية

سهير عماد عبد الرزاق الصفار، إسراء غاتم حازم السماك

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

اظهرت اغلب عزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* قدرتها على تحليل الدم في حين اظهرت جميع العزلات التابعة لهذا النوع هالة زرقاء وهي النتيجة الموجبة على اكار Cetyltrimethyl ammonium bromide وهو الاكثر كفاءة في التشخيص الاولي لانتاج الرامنوليد. تم التحري عن كفاءة الانتاجية لعوامل الفعالية السطحية الحيوية باستخدام راشح المزرعة البكتيرية النامية في الوسط الخاص بالانتاجية حيث اظهرت طريقة تشتت النفط كفاءتها وسهولتها في التشخيص الكمي لهذه المركبات مقارنة مع طريقة انهيار القطرة المحورة ومعامل الاستحلاب. ان استخدام زيت الزيتون كمصدر للكربون هو الاكفاء في انتاج الرامنوليد من الكليسيرول، كما ان طريقة الترسيب بالطرد المركزي المبرد اكفاء مقارنة باستخدام المذيبات العضوية (الكلوروفورم، الميثانول) لاستخلاص الرامنوليد. شخص الرامنوليد المنتج للسلالات الثلاث الى رامنوليد احادي للسلالتين 1، 3، واحادي وثنائي للسلالة 2 باستخدام تقنية الفصل بالطبقة الرقيقة وتأكيد التشخيص باستخدام الاشعة تحت الحمراء، وتم تحليل تنابعات القواعد النيتروجينية لجين 16s rDNA لـ (9) عزلات تابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* والتي اظهرت ثمان منها نسبة تشابه تراوحت بين (96-97%) مع السلالة *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 والتي ارتبطت مع بعضها عند نسبة تشابه (99.7%) ضمن العنقود A في الشجرة التطورية في حين تعقدت عزلة واحدة والتي اظهرت نسبة تشابه (98%) مع السلالة *Pseudomonas aeruginosa* SCV20265 بنسبة ارتباط (90%) مع المجموعة A. وجد الجين *rhlB* في جميع العزلات قيد الدراسة عند الموقع 226bp. ظهر تغاير في ترتيب القواعد النيتروجينية و الاحماض الامينية المكونة لانزيم Rhamnosyltransferase B عند استخدام برنامج Clustal W ضمن برنامج Mega 0.5 باستخدام طريقة Maximum Likelihood بشكل طفرات اضافة أو نقصان أو استبدال والتي لم تؤثر على الفعالية الانتاجية للانزيم.

الكلمات المفتاحية: *rhlB*, 16s rDNA, Rhamnolipid

Biochemical and genotyping comparative between native strains of *Pseudomonas aeruginosa* with identical standard strains

Suheer E. Al- Safar and Essra Gh. Al- Sammak

Dept. of Biology / College of Sciences / Mosul University/ Republic of Iraq

ABSTRACT

Using of primary screening tests showed that most of isolates have the ability to produced bio-surfactant, that showed blood hemolysis, the isolates belong to *Pseudomonas aeruginosa* appeared blue halos as positive result on CetylTrimethyl Ammonium Bromide medium, it's the more efficiency medium for primary identification of Rhamnolipid production.

By using supernatant of special production bacterial culture productive efficiency were investigated for biosurfactant production, where the oil dispersion method showed its efficiency and simplicity in quantitative diagnosis of biosurfactant compared with modified drop collapse method and emulsifying test. Using of olive oil as a carbon source was very efficiency for produced Rhamnolipid than glycerol.

Identification of Rhamnolipid produced from three strains belongs to *Pseudomonas aeruginosa* to mono-Rhamnolipid for strains 1,3 and mono and di-Rhamnolipid for strain 2 when were used Thin Layer Chromatography (TLC) technique and infrared (IR).

The nucleotide sequence of the 16s rDNA gene identified 9 isolates that belong to *Pseudomonas aeruginosa*, eight of them appeared similarity between (96-98%) with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain, which bind in (99.7 %) similarity in cluster A of evolutionary tree, whereas one isolate show 98% to *Pseudomonas aeruginosa* SCV20265 was clustered in similarly level (90%) with cluster A.

The *rhlB* gene was founded in all isolates under study where extent in 226 bp., which responsible for production of rhamnosyltransferase B. Compare of nucleotide bases and amino acids sequence by used clustal W program in Mega 0.5 program and maximum likelihood method for eight strains belongs to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 observed changed appeared as insertion or deleted mutation, which is not affected on enzyme activity produced Rhamnolipid.

المقدمة

المواد وطرق العمل

عزلت 29 عزلة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر بيئية ومرضية شخصت اعتماداً على صبغة كرام، انتاج انزيم سايتوكروموكسيداز، انزيم الكاتالاز انتاج الصبغات الخارجية على الوسط الانتخابي، كما تم استخدام شريط API:E20 والمجهز من شركة BioMérieux.

التحري الأولي عن انتاج عوامل الفعالية السطحية الحيوية: النمو على وسط Cetyl - TrimethylAmmonium Bromide agar [CTAB] (11)، الزرع على وسط اكار الدم (12).

وسط الانتاجية: حضر اللقاح بتتمة الجرثومة في 5 سم³ من المرق المغذي المجهز من شركة Oxoid لمدة 18 ساعة وحضنت بدرجة 28م° للعزلات البيئية و 37م° للعزلات المرضية واضيف اللقاح بنسبة 2% (حجم/حجم) الى وسط انتاج عوامل الفعالية السطحية Mineral Salt Medium (MSM)، اضيف زيت الزيتون بنسبة 2% (حجم/حجم) كمصدر للكربون ونترات الصوديوم بنسبة 1 غم/لتر كمصدر للنيتروجين ضبط الأس الهيدروجيني للوسط عند pH = 7 ، برد الوسط واضيف اللقاح الى دورق زجاجي بحجم 250 سم³ والحاوي على 50 سم³ من وسط الانتاجية السابق الذكر، حضن في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة في ظروف هوائية ولمدة 48 ساعة (13).

تم التحري عن كفاءة المنتج باستخدام : طريقة انهيار القطرة المحورة (14)، طريقة انتشار او تشتت النفط (15)، معامل الاستحلاب لمدة 24 ساعة (16).

استخلاص عامل الفعالية السطحية الـ Rhamnolipid المنتج: الطريقة الأولى: طريقة محورة عن (17)، أخذت المزرعة السائلة النامية لمدة 48 ساعة في وسط الانتاجية، اجري طرد مركزي مبرد بسرعة 4000 xg/دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم التخلص من الراشح وأخذ الراشح وحض عند pH=2 بحامض الهايروكلوريك المركز HCl، وضع بدرجة 4م° لمدة ليلة كاملة ثم اجري طرد مركزي للراشح بدرجة 4م° وبسرعة xg12000 /دقيقة لمدة 30 دقيقة، تم التخلص من الراشح، اخذ الراشح وغسل بماء مقطر منزوع الايونات DDW ثم جفف.

الطريقة الثانية: أخذت المزرعة السائلة النامية لمدة 48 ساعة واجري لها طرد مركزي بسرعة 10000 xg/دقيقة ولمدة 10 دقائق. أخذ الراشح وحض عند pH=2 ، وضع بالتلاجة بدرجة 4م° ولمدة ليلة كاملة ثم اجري له استخلاص وذلك بمزج الراشح مع نفع نفيس الكميّة من المذيبات 2 كلوروفورم : 1 ميثانول (حجم/حجم)، بخر المزيج بواسطة جهاز التبخير بدرجة حرارة 60م°، تم الحصول على مادة جافة حفظت في التلاجة لحين الاستخدام (18).

فصل وشخص المستخلص الناتج باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة (19)، كما استخدم طيف الأشعة تحت الحمراء لتشخيص المنتج: تم استخدام جهاز IR spectra لتشخيص الاواصر الكيميائية (المجاميع الفعالة) الموجودة في المستخلصات اذ تم كبس المستخلص باستخدام KBr ومن ثم قيس النماذج . كذلك تم قسط البقع المفصولة على صفيحة الطبقة الرقيقة واذابتها في محلول مكون من 2 كلوروفورم : 1 ميثانول (حجم/حجم) ثم قيس بجهاز IR وعند طيف موجي 400-4000cm⁻¹ وبوضوحية 4 و Scan 32.

تنتج العديد من الكائنات البدائية والحقيقية النواة جزيئات حيوية فعالة سطحياً والتي تعرف بصورة عامة بعوامل الفعالية السطحية الحيوية biosurfactant . تمتلك هذه المركبات ادوار طبيعية مختلفة في نمو الكائنات الدقيقة المنتجة لها ، حيث تساعد على أخذ المواد الكارهة للماء ، تنظيم الالتصاق والابتعاد من وإلى الأسطح ، امراضية البكتريا ، تكوين الغشاء الحيوي ، الارتباط بالمعادن الثقيلة ، فعالية مضادة للبكتريا والفطريات (1) ، أيضاً تستخدم في الصناعات اذ تعمل كمستحلبات ممتازة ، مستحلبات ، عوامل رغوة ، عوامل نشر ، مرطبات وفي استخلاص النفط والمعادن وغيرها (2) . تمتلك مركبات الفعالية السطحية الحيوية عدة محاسن او مزايا تفوق تلك المواد المصنعة كيميائياً منها كونها عالية التخصص في عملها ، منخفضة السمية ، طبيعتها الصديقة للبيئة ، سرعة تحليلها من قبل الكائنات الدقيقة ، تنوع تركيبها مما جعلها قابلة للتحوير بواسطة التقانات الاحيائية والهندسة الوراثية ، متحملة للظروف المتطرفة من حرارة وملوحة وأس هيدروجيني، قابلة للتحلل الحيوي إذ بدأ الانجذاب لها في السنين الاخيرة أكثر فأكثر نتيجة لتلك الصفات (3 ، 4).

يعتبر الـ Rhamnolipids (RLs) أحد أنواع الدهون السكرية، ينتج بصورة رئيسة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* إلا انه ينتج أيضاً من *Burkholderia sp.* و *Pseudomonas sp.* إذ يوجد بتركيز عالية في قشع المرضى المصابين بالتليف الكيسي إذ يتداخل RL مع وظيفة الاهداب الطبيعية في القصبات الهوائية ويثبط استجابة الخلايا البلعمية لعملية البلعمة الخلوية ويعمل كمحلل دموي خارج خلوي مقاوم للحرارة (5,6)، ويتركب الـ RL من جزيئة واحدة او اثنتين من سكر الـ Rhamnose مرتبطة مع جزيئة واحدة او اثنتين من الحامض الدهني β -hydroxydecanoic acid. اذ عندما ترتبط جزيئة واحدة من سكر الـ Rhamnose مع الحامض الدهني يتكون ما يدعى mono-rhamnolipid ، أما اذا ارتبطت جزيئتين من سكر الـ Rhamnose مع الحامض الدهني فينتج ما يدعى di-rhamnolipid. أن سلسلة الحامض الدهني معظمها تكون مشبعة وقليلاً ما تحتوي على اصرة مزدوجة او متعددة ، ويتراوح طول السلسلة بين C₈-C₁₆، يكون السكر هو الجزء المحب للماء والحامض الدهني هو الجزء الكاره للماء (7). تعدد السلسلة PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* الأكثر إنتشاراً وهي واحدة من الثلاث مسببات الرئيسة لاصابات الانسان الانتهازية عزلت لأول مرة من الجروح في إسرائيل عام 1954 (8) وبسبب مقاومتها الفعالية للمضادات الحيوية والمطهرات تم تحليل تنابعات القواعد النيتروجينية للجينوم الكامل لهذه السلالة وتعد السلالة المرجعية لأي دراسة عن هذا النوع، حجم جينومها 6.5 مليون زوج قاعدي يعتبر اكبر جينوم بكتيري تم تحليل تنابعاته وهذا يساعد في تحديد اسباب مقاومتها للعلاج وأن كبر حجم جينومها ينسجم مع تكيفها البيئي (9). هناك عدة عوامل تؤثر على نوع وكمية المركبات المنتجة من قبل الكائنات الدقيقة والتي تشمل طبيعة مصدر الكربون ، مصدر النيتروجين ، نسبة الكربون : النيتروجين ، التهوية ، الأس الهيدروجيني كذلك نوع السلالة المنتجة (10) ومن هنا جاءت فكرة الدراسة التي هدفت الى ما يأتي :

1. عزل وانتقاء العزلات البكتيرية التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* ذات الانتاجية العالية لعوامل الفعالية السطحية من عينات بيئية ومرضية .
2. تشخيص السلالات المنتجة للـ Rhamnolipid اعتماداً على تحديد تنابعات جين rDNA 16s.
3. تشخيص جين *rhlB* وهو أحد الجينات المسؤولة عن انتاج الـ Rhamnolipid.
4. التحري عن مدى حدوث التغيرات او الطفرات في جين *rhlB* ومدى تأثير هذه الطفرات على انتاج الـ Rhamnolipid من خلال تحديد تنابعات القواعد النيتروجينية للجين وكذلك تتابع الاحماض الامينية للانزيم.

50 لمدة 75 دقيقة ، ومن ثم فحص الهلام بعد تصبغها بصبغة الإيثيديوم مايد لمدة 45 دقيقة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية للتحري عن وجود جين *rhlB* عند الموقع 227 bp.

تحديد تتابعات القواعد النروجينية لجين *rDNA* 16s و *rhlB*: تم إجراء تحديد التتابعات الوراثية لجين *16srDNA* لـ 9 عزلات منتجة تابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* و 8 عزلات تابعة لنفس البكتيريا للتحري عن تتابعات جين *rhlB*. أنجز الفحص في شركة (Macro gen , USA) تم التحري عن التطابق الجيني باستخدام برنامج (Basic Local (BLAST Alignment Search Tool والمتوفر في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيائية (NCBI) Biotechnology Information وعلى الموقع (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) تم ترجمة النيوكليوتيدات لجين الانتاجية *rhlB* الى أحماض امينية باستخدام Clustal W ضمن برنامج (Mega 0.5 Molecular Evolutionary Genetic Analysis).

العلاقة التطورية للسلاسل المشخصة: تم الحصول على العلاقة التطورية بين السلاسل التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* البالغ عددها 9 باستخدام Clustal W ضمن برنامج Mega 0.5 باستخدام طريقة Maximum likelihood اعتماداً على طريقة (22).

النتائج والمناقشة

تم التحري الأولي عن قدرة النوع *Pseudomonas aeruginosa* المعزول من مصادر مختلفة على إنتاج عوامل السطحية باستخدام أوساط زرعية مختلفة حيث تم إنتقاء 29 عزلة تابعة لهذا النوع وكما موضح في الجدول (3). أظهرت أغلب عزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* والمعزولة من عينات بيئية ومرضية تحللاً دموياً كاملاً، استخدام هذا الاختبار كان على أساس أن عوامل الفعالية السطحية الحيوية ممكن أن تسبب تحلل كريات الدم الحمراء إلا أن هذه الطريقة لا تعتبر طريقة كشف أولية بمفردها، وذلك لكون هذا الاختبار قد يعطي الكثير من النتائج الموجبة الكاذبة (11) وذلك لامتلاك البكتيريا أنزيمات تحلل الدم (23) أو قد تكون عوامل الفعالية السطحية الحيوية قليلة الانتشار وبالتالي لا تحلل خلايا الدم أو أنها بالأصل لا تؤدي إلى تحلل الدم وبالتالي سوف تعطي نتيجة سالبة كاذبة (2).

أظهرت جميع عزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* نتيجة موجبة على وسط CTAB agar إذ ظهرت المستعمرات محاطة بهالة زرقاء داكنة دليل على إنتاجها للرامنوليد Rhamnolipid وكما موضح في الصورة (1) ويعتبر هذا الاختبار طريقة نوعية متخصصة في الكشف عن عوامل الفعالية السطحية الحيوية الأيونية الخارج خلوية فقط ، ومنها الدهون السكرية الأيونية Ionic glycolipids الخارج خلوية ، كذلك فإن مادة Ctrimide المضافة إلى الوسط هي أيضاً من عوامل الفعالية السطحية المصنعة كيميائياً والتي لها قابلية على تثبيط نمو بعض البكتيريا لذلك لا تستخدم هذه الطريقة في التحري عن كل الأنواع البكتيرية المنتجة لعوامل الفعالية السطحية الحيوية (24).

عزل الدنا: استخدمت طريقة Colony PCR المحورة: تم اخذ مستعمرة فنية واحدة وإضافتها الى eppendorf tube معقمة تحتوي على 50 مايكروليتر ماء مقطر معقم منزوع الايونات. حضنت بدرجة 30م لمدة 3 دقائق. وضعت الانبوبة في المضخم الحراري PCR او حمام مائي بدرجة حرارة 95م لمدة 15 دقيقة. أجري طرد مركزي بسرعة 13000 دورة/دقيقة وبدرجة 4م لمدة 15 دقيقة (20).

عدة عمل الـ PCR للتحري عن جين *rDNA* 16s: استخدم بوائى عامة Universal Primers اعتماداً على (21) للتحري عن جين *16srDNA* والمجهز من شركة promega وبتركيز نهائي 10 pmol كما موضح في الجدول (1)

الجدول (1): تسلسل البوائى المستخدمة للتحري عن جين *16s rDNA*

البائى	5' → 3'	اسم الجين المستخدم
27f Upstream	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16srDNA
1392r Downstream	GACGGGCGGTGTGTAC	

عدة عمل الـ PCR للتحري عن جين *Rhamnosyltransferase B (rhlB)*: تم استخدام بوائى اعتماداً على (20) مجهزة من شركة promega وبتركيز نهائي 10 pmol كما موضح في الجدول (2).

الجدول (2): تسلسل البوائى المستخدمة للتحري عن جين *rhlB*

البائى	5' → 3'	اسم الجين المستخدم
Upstream	GCCCACGACCAGTTCGAC	<i>rhlB</i>
Downstream	CATCCCCCTCCCTATGAC	

تفاعلات PCR للتحري عن جين *16s rDNA*: حضر المزيج الرئيس بحجم 50 مايكروليتر لجميع العينات أدخلت الانابيب في جهاز المضخم الحراري PCR لانجاز التضاعف وباستعمال البرنامج التالي:

5 دقائق بدرجة حرارة 94م لدورة واحدة، (35 ثانية بدرجة 94م، 1.35 دقيقة بدرجة 58م، 1.35 دقيقة بدرجة 72م) تكرر 35 دورة واخيراً 10 دقائق بدرجة 72م لدورة واحدة. تم ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي بفولتية 50 لمدة 75 دقيقة ومن ثم فحص الهلام باستخدام الأشعة فوق البنفسجية بعد تصبغه لمدة 45 دقيقة بصبغة الإيثيديوم مايد للتحري عن وجود جين *16s rDNA* عند الموقع 1350 bp.

تفاعلات PCR للتحري عن جين *rhlB*: حضر المزيج الرئيس بحجم 25 مايكروليتر وذلك بمزج (25) مايكروليتر من Green master mix ، و (1) مايكروليتر من كل بوائى ، و (4) مايكروليتر من DNA المستخلص بتركيز 50 نانوغرام/مايكروليتر، و (7) مايكروليتر من ماء مقطر منزوع الايونات في انبوبة eppendorf سعة 0.2 سم³ ، أدخلت الانابيب في جهاز المضخم الحراري Thermo cycler بحذر وعناية لانجاز التضاعف وباستعمال البرنامج التالي: 5 دقائق بدرجة حرارة 94م لدورة واحدة، (35 ثانية بدرجة 94م، 95 ثانية بدرجة 58م، 45 دقيقة بدرجة 72م) تكرر 35 دورة واخيراً 10 دقائق بدرجة 72م لدورة واحدة. تم ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي بفولتية

الجدول (3): التحري الأولي عن العزلات البكتيرية المنتجة لعوامل الفعالية السطحية الحيوية

الأوساط الزرعية				عدد العزلات	البكتريا المعزولة
عدد العزلات الموجبة	وسط CTAB agar	عدد العزلات الموجبة	وسط أكار الدم		
29	هالة زرقاء داكنة بعد 48 ساعة	26	تحلل كامل للدم بعد 48 ساعة	29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

وسط الانتاجية الحاوي على زيت الزيتون كمصدر كاربوني معاملاً استحلاب عالي بينما أظهرت بعض العزلات النامية باستخدام الكليسيروول كمصدر كاربون معاملاً استحلاب عالي وهذا مشابه لما جاء به (30)، يعتبر هذا الاختبار هو الأكثر ثقة في الحساب الكمي، مركبات الفعالية السطحية الحيوية الذائبة في الوسط الزرع (29)، هناك علاقة مباشرة بين الفعالية السطحية وفعالية الإستحلاب (23) إذ أظهرت العزلات البيئية إنتاجية أكثر بقليل من المرضية.

تعد طريقة الفصل باستخدام الطبقة الرقيقة TLC مرحلة أولية في فصل وتشخيص الـ rhamnolipid المنتج، إذ تم الكشف عن وجود الـ RL المستخلص من العزلات البكتيرية الثلاثة، وذلك من خلال تحديد البقع المفصولة من العينات المثبتة على صفيحة الـ TLC كما موضح في الصورة (2) وتم الحصول على معدلات جريان R_f كما موضح في الجدول (5).

أن قيمة R_f للعزلة رقم 1 مطابق لما جاء به كل من (28, 31)، إذ حصل على قيمة R_f 0.72 للرامنوليبيد الأحادي mono-rhamnolipid ولكن باستخدام نظام مذيب مختلف قليلاً وهو كلوروفورم 65 : ميثانول 15 : حامض الخليك 2 بدلاً من كلوروفورم 65 : ميثانول 15 : ماء 2، أما العزلة رقم 2 فإن قيمة R_f للبقعة الأولى 0.42 فإنها تعود إلى الرامنوليبيد الثنائي di-rhamnolipid إذ أن تصنيع الأخير يتطلب وجود جين *rhlC* وقيمة R_f للبقعة الثانية 0.70 فإنها تعود إلى الرامنوليبيد الأحادي وهذا مشابه لما جاء به (20) باستخدام نظام مذيب يختلف بنسب المكونات قليلاً وهو كلوروفورم 65 : ميثانول 25 : ماء 4، إذ كانت قيمة R_f الأولى التي حصل عليها 0.46 والثانية 0.72 وهذا مقارب جداً للقيمة التي حصلنا عليها، في حين قيمة R_f للعزلة 3 كانت 0.48، ونلاحظ أن قيم R_f الرامنوليبيد الأحادي المنتج من العزلاتين 1 و 2 متقاربة ويوجد اختلاف بسيط قد يعود إلى اختلاف السلالة المنتجة كذلك اختلاف مصدر الكربون المستخدم في تنمية البكتيريا وهما (الكليسيروول - زيت الزيتون) أدى إلى اختلاف التركيب الكيميائي للـ R_f من ناحية عدد ذرات الكربون و الأواصر المزدوجة وهذا ما ظهر في اختلاف قيمة R_f للعزلة 1 عن كل من 2 و 3 بسبب اختلاف مصدر الكربون وهذا مشابه للنتيجة التي حصل عليها (30) إذ استخدم مصادر كاربونية متنوعة لتنمية البكتريا وإنتاج الـ RL حصل على قيم R_f مختلفة قليلاً فيما بينها. كذلك يعتمد تركيب عوامل الفعالية السطحية الحيوية على الظروف المتبعة في التنمية (32)، يعد RL من أكثر أنواع مركبات الفعالية السطحية الحيوية المدروسة ولسببها الأول أنه يعرض فعالية سطحية عالية ويكون الناتج عالي نسبياً بعد فترة تحضين قصيرة مع سهولة تنمية الكائن المنتج. والسبب الثاني أنه يعتبر من أحد عوامل الضراوة التي تساهم في أمراضية بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (33).

الصورة (1): النتيجة الموجبة لعزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* على وسط CTAB agar

يوضح الجدول (4) أن جميع عزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* موجبة لطريقة انهيار القطرة المحورة، وتعتبر هذه الطريقة اختبار كمي سهل وسريع وغير متخصص لنوع معين من مركبات الفعالية السطحية الحيوية ويحتاج إلى كمية قليلة من العينة (25)، قد تعود النتائج السالبة إلى كون الاختبار قليل الحساسية أي يجب أن يكون تركيز مركبات الفعالية السطحية الحيوية عالي نوعاً ما في الراشح ليسبب انهيار القطرة (24, 26).

أن لقطر المنطقة الرائقة لطريقة تشتت النفط علاقة طردية مع فعالية مركبات الفعالية السطحية الحيوية، و تبين النتائج في الجدول (4) بأن المصدر الكربوني غير الذائب في الوسط وهو زيت الزيتون قد أعطى زيادة في الإنتاجية أكثر من المصدر الكربوني الذائب في الماء وهو الكليسيروول من خلال ملاحظة أحجام الأقطار لاختبار تشتت النفط وهذا يتفق مع ما توصل إليه كل من (13, 27). ربما يعود السبب في ذلك إلى استغلال البكتريا للوسط الذائب بسرعة عالية في إنتاج الطاقة والكتلة الحيوية وعدم الحاجة إلى إنتاج مركبات محللة للمصدر الكربوني أما في حالة زيت الزيتون فإن البكتريا تعمل على إنتاج عوامل الفعالية السطحية الحيوية لغرض تحليل المواد الدهنية وجعلها أكثر قطبية والتي تدخل في تركيب منتجات الأيض الثانوية وإنتاج الطاقة إضافة إلى زيادة مساحة التصاق البكتريا مع زيت الزيتون في الوسط وهذه الفائدة الثانية (28).

تبين مما سبق أن اختبار تشتت النفط أكثر حساسية من طريقة اختبار انهيار القطرة المحورة في الكشف عن وجود عوامل الفعالية السطحية الحيوية في رايح المزرعة البكتيرية وهذا مشابه لما حصل عليه (29) يعتبر هذا الاختبار طريقة سهلة وغير متخصصة لنوع معين من مركبات الفعالية السطحية الحيوية ويحتاج إلى كمية قليلة من العينة إذ يستخدم هذا الاختبار حتى عندما تكون كمية وفعالية هذه المركبات واطئة (24).

يوضح الجدول (4) أيضاً نتائج معاملاً الاستحلاب إذ أظهرت أغلب عزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* النامية في

الجدول (4): اختبار تشتت النفط وانتهيار القطرة المحور ومعامل الاستحلاب للتحري عن انتاج عوامل الفعالية السطحية الحيوية لعزلات النوع *Pseudomonas aeruginosa* النامية باستخدام مصدرين للكربون

معامل الاستحلاب E ₂₄		تشتت النفط حجم المنطقة الرائقة/سم ³		انهيار القطرة المحور / ملم		مصدر العزل	تسلسل العزلات
الكليسرو	زيت الزيتون	الكليسرو	زيت الزيتون	الكليسرو	زيت الزيتون		
64	56.6	3	7.3	++	+++	تربة حقائق منزلية	1
50	64	6	8	++	+++	تربة حقائق عامة	2
-	10	2.5	4	++	++	إدرار	3
50	66	4	5	++	++	مجري الدم	4
39	60	2	6.8	++	++	مجري الدم	5
60	58	2.2	5.6	+	+	تربة حقائق عامة	6
43	29	7	8	++	++	إدرار	7
17	31	1	3	+	+	تربة حقائق منزلية	8
62	16	4.5	6.8	++	+++	تربة ملوثة بالهيدروكربونات	9
58	61	3.6	7.3	+	+++	تربة حقائق منزلية	10
58	63	3.8	7	++	++	تربة حقائق منزلية	11
53	53	3.6	5.8	+	+	تربة حقائق منزلية	12
29	64	3.1	7.1	++	+++	تربة ملوثة بالهيدروكربونات	13
53	54	7.5	8.5	+	+	تربة حقائق منزلية	14
60	48	7	7.2	+	+	تربة حقائق منزلية	15
62	60	1.5	5.3	+	+	تربة حقائق منزلية	16
56	60	2.3	5.5	+	++	تربة حقائق منزلية	17
56	60	1.7	6.1	+	++	تربة حقائق منزلية	18
64	73	2.5	8	+	+++	إدرار	19
60	62	7	8.3	+	++	حروق	20
3	15	0.9	6.5	+	+	حروق	21
40	32	2.2	7.8	+	+	حروق	22
33	46	2	5.6	+	+	حروق	23
3	44	1.2	3.4	+	+	حروق	24
64	62	3	8	+	+	حروق	25
57	57	2	5	+	+	حروق	26
53	13	4.5	8	+	+	حروق	27
15	56	5.5	7.3	+	+	تربة ملوثة بالهيدروكربونات	28
56	65	7.4	8.5	++	++	تربة ملوثة بالهيدروكربونات	29

الجدول (5): معدل الجريان للـ RL المفصول باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة

رقم العزلة	مصدر الكربون	نوع الرامنوليد	معدل الجريان R _f
1	كليسرو	أحادي	0.73
2	زيت الزيتون	ثنائي	البقعة الأولى 0.42
		أحادي	البقعة الثانية 0.70
3	زيت الزيتون	أحادي	0.48

بشكل مفصل نظرا لانتشارها الواسع وامتلاكها عوامل ضراوة ومقاومة للمضادات والمعادن الثقيلة والظروف المختلفة التي مكنتها من الانتشار خاصة في أجواء المستشفيات، وهي متقاربة جدا في صفاتها والاختلاف البسيط فيما بينها يظهر من خلال اختلاف في بعض الصفات الزرعية حيث ظهرت بعضاً منها شفافة أو معتمة أو ذات لمعان معدني. أيضا هناك تفاوت بسيط في أحجام المستعمرات واختلاف مستويات إنتاج صبغة البايوسيانين والذي يعكس تدرج اللون الصبغات في الوسط الزرعي الخاص بعزلها والذي تراوح بين (الأصفر - الأخضر الداكن والأخضر المزرق) كذلك ظهر اختلاف في كفاءة تحليلها للدم وفي بعض الاختبارات الكيموحيوية كما موضح عند استخدام الـ API إذ أظهرت بعض السلالات قدرتها على أكسدة الكلوكوز (34).

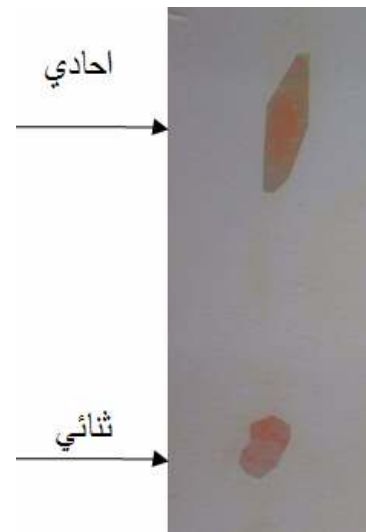
الجدول (6): التحري عن المجاميع الفعالة للـ RL المنتج من النوع *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء IR

رقم العزلة	نوع الرامنوليد	المجاميع الفعالة			
		O-H cm ⁻¹	C-H cm ⁻¹	C-O-C cm ⁻¹	O -C- cm ⁻¹
1	احادي	3315	2924	2856	1732
2	احادي، ثنائي	3000+3384	2925	2854	1743
3	احادي	3410	2925	2856	1726

تم استخدام جين rDNA 16s لتحخيص سلالات النوع *Pseudomonas aeruginosa* والحصول على العلاقة التطورية بين السلالات قيد الدراسة وذلك باستخدام برنامج Clustal W ضمن برنامج (MEGA 0.5) باستخدام طريقة Maximum likelihood اعتماداً على (22) كما موضح في الشكل (1).

ارتبطت 8 سلالات معزولة من مصادر بيئية ومراضية مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 عند مستوى تشابه 99.7% مما يؤكد درجة التقارب الكبيرة بين السلالات مع وجود تغيرات بسيطة فيما بينها كما ذكر سابقاً، وإنفصلت سلالة واحدة وارتبطت عند مستوى تشابه 90% والتي تعود للسلالة رقم 4 والمُتشابهة للسلالة *Pseudomonas aeruginosa* SCV20265 والمعزولة من البيئة. وكما موضح في الشكل (1) الذي يبين طبيعة التغيرات في ترتيب القواعد النيتروجينية في السلالة رقم 4 من خلال مطابقتها مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 باستخدام ClustalW.

تم إجراء عملية تضخيم جين *rlhB* لجميع سلالات النوع *Pseudomonas aeruginosa* قيد الدراسة. أظهرت السلالات المنتجة للـ RL احتوائها على هذا الجين من خلال ملاحظة موقع الحزمة ووزنها الجزيئي عند الموقع 226 bp مقارنة مع المقياس الجيني DNA Ladder كما موضح في الصورة (4) وهذا مطابق لما أشار إليه (20).



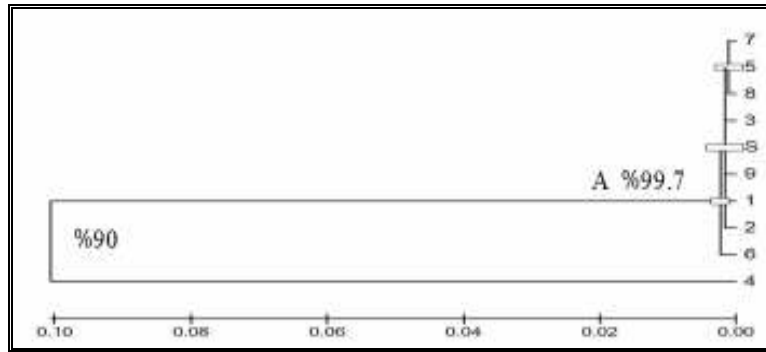
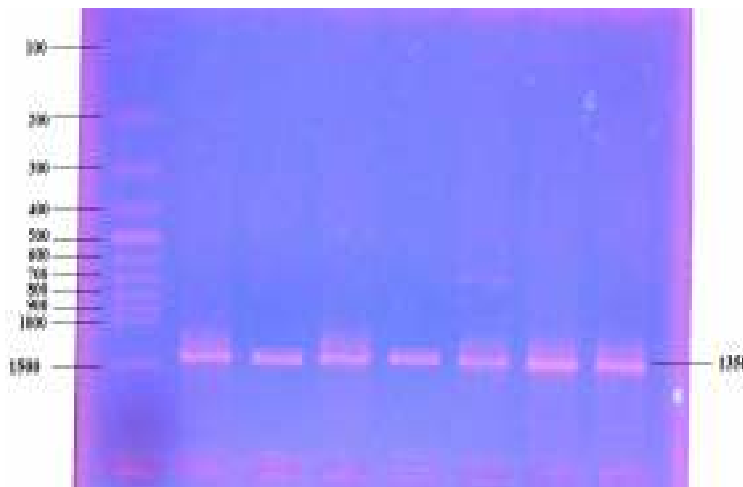
الصورة (2): مواقع انفصال الـ RL الاحادي والثنائي المنتج من النوع *Pseudomonas aeruginosa*

تم تشخيص الـ RL المنتج من العزلات الثلاثة باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء IR spectra وقد ظهرت حزم الامتصاص عند اطوال موجية مختلفة وكما موضح في الجدول (6). لوحظ وجود حزمة عريضة لنواتج العزلة رقم (1) عند الموقع (3315cm⁻¹) والتي تعود الى مجموعة (O-H) في كل من السكر ومجموعة الكربوكسيل الحامضي في الدهن وكذلك وجود حزمة عند الموقع (2924cm⁻¹) وهي (C-H) التي تعود الى مجموعة المط غير المتناظر والتي تعود الى كل من مجموعة CH₂ و CH₃ ووجود حزمة عند الموقع 2856 cm⁻¹ وهي (C-H) تعود الى مجموعة المط المتناظر والتي تعود الى كل من مجموعة CH₂ و CH₃ ، هذا بالإضافة الى الحزمة عند الموقع (1732cm⁻¹) وهي مجموعة الكربوكسيل والتي تعود الى مجموعة الكربوكسيل الحامضي في الدهن أو مجموعة الاستر في الدهن ويلاحظ من خلال هذا الطيف وجود حزمة عند الموقع (1053cm⁻¹) وهي مجموعة ليثرتعود الى كل من السكر والدهن وهذا مشابه لما جاء به (31) ، مما يؤكد تركيب الـ RL المكون من الدهون والسكريات.

تم إجراء تضخيم لجين 16s rDNA والذي ظهر عند الموقع (bp) 1350 عند استخدام البادئ العام 27f و 1392r المجهز من شركة Promega للدنا الكروموسومي وذلك لتحخيص سلالات النوع *Pseudomonas aeruginosa* كما موضح في الصورة (3). استخدم الجين 16s rDNA المضخم كقالب لتحليل وتحديد تتابع القواعد النيتروجينية، تم مقارنة نتائج نتائج تتابعات القواعد النيتروجينية للسلسلة الامامية والخلفية لجين 16s rDNA للسلالات قيد الدراسة مع السلالات ضمن المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية NCBI وذلك باستخدام برنامج BLAST والتي أظهرت نسب تشابه عالية مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 إذ تراوحت بين (96-97%) كما موضح في الجدول (7) ما عدا السلالة رقم 4 أظهرت تشابه مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* SCV 20265. تعد السلالة *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 هي السلالة الشائعة عالمياً وكذلك أثبتت شيوعها في محافظة نينوى سواء أن كانت من مصدر بيئي أو مرضي وهي من السلالات المدروسة

الجدول (7): نتيجة تطابق تتابعات جزء 16s rDNA مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 باستخدام NCBI

ت	رقم السلالة	مصدر العزل	اسم السلالة المفحوصة	نسبة التشابه مع السلالة القياسية <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	صفات المستعمرة
1	1	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات لماعة معتمة وذات حافات مسطحة، متوسطة الحجم، ذات لون اخضر مصفر
2	2	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات لماعة، معتمة مسطحة، متوسطة الحجم، ذات لون اخضر مخضر
3	3	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 97	مستعمرات كبيرة ومعتمة ومسطحة ذات حوافي ممتدة وشاحبة ، ذات لون اخضر داكن
4	4	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات لماعة معتمة ومسطحة ، ذات حواف ممتدة متوسطة الحجم، ذات لون اخضر مخضر
5	5	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات لماعة معتمة ومسطحة ، ذات حواف ممتدة متوسطة الحجم، ذات لون اخضر مخضر
6	6	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 97	مستعمرات معتمة، ذات حافات مسطحة متوسطة الحجم، ذات لون اخضر مصفر
7	7	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات صغيرة الحجم مرتفعة قليلا ذات حافات مسطحة وذات لمعان معنني شاحب، ذات لون اخضر داكن.
8	9	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 96	مستعمرات متوسطة الحجم، مسطحة، مرتفعة قليلا، وذات لون اخضر مصفر
9	28	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCV 20265	% 97	لماعة معتمة وذات حافات مسطحة متوسطة الحجم ، ذات لون اخضر مخضر .

الشكل (1): العلاقة التطورية للسلالات التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام برنامج Clustal W وطريقة (Maximum Likelihood S) تمثل السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1الصورة (3): موقع الحزم لجين 16s rDNA عند 1350 bp للسلالات التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa*



الصورة (4): موقع الحزم لجين *rhIB* عند 226 bp للسلاسل المنتجة للـ RL التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa*

وخصوصاً العينات المأخوذة من الحروق. حيث تنتشر السلالة *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 في أجواء المستشفيات وتسبب عدوى المستشفيات Nosocomial infection لمرضى الحروق خاصة، وهي من أكثر السلالات المدروسة والمنتشرة عالمياً (35).

الاستنتاجات

1. أظهرت طريقة تشتت النفط كفاءتها وسهولتها في التشخيص الكمي للرامنوليبيد مقارنة مع طريقة انهيار القطرة المحورة ومعامل الاستحلاب.
2. تعد السلالة *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 الأكثر انتشاراً في أجواء المستشفيات خاصة مرضى الحروق والبيئة ضمن محافظة نينوى.
3. إن الطفرة لم تؤثر على المواقع الفعالة active side في انزيم B rhamnosyltransferase من خلال مقارنة النتائج للأحماض النووية لجين *rhIB* والأحماض الأمينية ضمن السلالات قيد الدراسة مع السلالة القياسية.

تم استخدام جين *rhIB* المضخم كقالب لتحليل وتحديد تتابع القواعد النروجينية ثم مقارنة نتائج تتابعات القواعد النروجينية للجين ضمن الـ NCBI وذلك باستخدام برنامج BLAST والتي أظهرت نسب تشابه عالية مع الجين *rhIB* للسلالات قيد الدراسة (المرضية والبيئية) مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 إذ تراوحت النسب بين (97-99%) كما موضح في الجدول (8).

تم مقارنة النتائج لجين *rhIB* ضمن السلالات قيد الدراسة مع السلالة القياسية باستخدام Clustal W ضمن برنامج MEGA 0.5 حيث ظهر تغير بسيط في بعض القواعد مع وجود مناطق تدل على وجود طفرة زيادة أو نقصان أو استبدال في بعض القواعد النروجينية.

تم ترجمة نتائج تتابعات القواعد النروجينية لجين *rhIB* قيد الدراسة إلى أحماض أمينية وذلك باستخدام Clustal W ضمن برنامج MEGA 0.5 ومن ثم مقارنة ومطابقة نتائج الأحماض الأمينية لانزيم B rhamnosyltransferase للسلالات قيد الدراسة مع بعضها ومع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1، حيث تبين من الشكل (2) وجود تغير في تتابعات الأحماض الأمينية والتي أدت إلى تغير في نسب التشابه بين السلالات والتي سببها وجود طفرات من نوع انتقال Transition أي تغير قاعدة بيورين ← بيورين أو طفرة من نوع تحول Transversion أي تغير في نوع القاعدة من بيورين ← بيريميدين أو بيريميدين ← بيورين أو طفرة من نوع إضافة قاعدة نروجينية واحدة أو زوج من القواعد frame shift أو طفرة من نوع نقصان هذه الطفرات إما ناتجة عن طفرة ذاتية spontaneous Mutation أو عن حدوث خطأ أثناء تضاعف الدنا أو تكون توتميرات للقواعد النروجينية وربما قد تكون هذه الطفرات من نوع missense أي أن الطفرة أدت إلى تكوين حامض أميني جديد لكنه غير وظيفي أو أن الطفرة لم تؤثر على المواقع الفعالة active side في انزيم B rhamnosyltransferase الذي يعمل على ربط جزئية سكر الرامنوز مع مركب β -hydroxyalkanoic acid لذلك لم تتأثر فعالية الشد السطحي للمركب بصورة كبيرة. هذه الطفرة قد تكون ناتجة عن طفرة فيزيائية بتأثير الحرارة أو الأشعة فوق البنفسجية أو قد تكون ناتجة عن مواد كيميائية كتناول العقاقير بالنسبة للعزلات المرضية

الجدول (8): نتيجة تطابق تتابعات جين *rhlB* مع السلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 باستخدام الـ NCBI

ت	رقم السلالة	مصدر العزل	اسم السلالة المفحوصة	نسبة التشابه مع السلالة القياسية <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
1	1	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 99
2	2	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 98
3	4	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 99
4	5	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 97
5	6	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 99
6	7	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 97
7	8	بيئي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 97
8	9	مرضي	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	% 99

1_F_PhLP	-CQLGCGMRL GVPLR?AG?C AGRCGACSRTPWRRPVGVS WNCHNRTVSL AVKRPRWSNV VIGEGD?
2_F_PhLP	-M*?.....E..S.....V?..?
5_F_PhLP	-L*?.....?..S.....M..?..G
6_F_PhLP	-R*?..??E.Q.....?..?.....M....?
7_F_PhLP	?MKA...?...?..?.....?..?..G
8_F_PhLP	?S.....E..S.....K...V-
9_F_PhLP	?MS.....E..S.....T...VW
10_F_PhLP	ATS.....?..?.....M....G
Sequence_9	----,.....?..?.....?..?

الشكل (2): مقارنة تتابع الاحماض الامينية لانزيم *Ramnosyltransferase* المشارك في انتاج الـ *Rhamnolipid* ضمن سلالات *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام *Clustal W* مقارنة بالسلالة القياسية *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (مشار إليها Sequence 9). علامة . تدل على تشابه الاحماض الامينية ؟ مفقود _ طفرة زيادة او نقصان .

bioengineering of production. (ed. Soberón- Chávez, G.) Biosurfactants: From Gene to Application. Vol. 20, pp. 13- 43. Springer, Verly Berlin, Heidelberg.

6. Déziel E.; Lépine F.; Milot S. and Villemur R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3(3 hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. J. Microbiol. 149: 2005-2013.

7. Abalos A.; Pinaso A.; Infante MR. and Casals M. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 17(5):1367-1371.

8. Klockgether J.; Munder A.; Neugebauer J. and Davenport CF.(2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Laboratory strains. J. Bacteriol. 1113- 1121.

المصادر

1. Thavasi R.; Nambaru VR.; Jayalakshmi S. and Balasubramanian T. (2011). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources . Indian J. Microbiol. 51(1): 30-36.
2. Ron EZ. and Rosenberg E.(2001). Natural roles of biosurfactant. Environ. Microbiol. 3(4): 229-236.
3. Rodrigues L.; Banat IM.; Teixeira J, and Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential application in medicine. J. Antimicrob. Chemother. 57: 609-618.
4. Salihu A.; Abdulkadir I. and Almustapha MN.(2009). An investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnol. Molec. Biol. Rev. 3(5): 111-117,
5. Abdel-Mawgoud AM.; Hausmann R.; Lépine F. and Müller MM.(2011). Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and

24. Walter V.; Syldatk C. and Hausmann R. (2010). Screening Concept for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. Ed : Sen, R. Biosurfactants. Landes Bioscience and Springer Science & Business Media. Pp. 1-11.
25. Khopade A.; Ren B.; Liu XY. and Mahadik K.(2012). Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. J. Coll. Inter. Sci. 367: 311-318.
26. Youssef N.; Duncan K.; Nagle D. and Nagle D.(2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Methods. 56(3) : 339-347.
27. Wei YH.; Chou CL. and Chang JS. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa*J14 originating from petrochemical waste water. Biochem. Eng. J. 27: 146-154
28. سوادى ، وائل علي ، غضبان ، آمال كاظم ، مجيد ، غيث أحمد . (2013). دراسة الظروف المثلى لإنتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي (الرامنولييد) من العزلة المحلية P.a. ليكتريا *Pseudomonas aeruginosa*. مجلة أبحاث البصرة. 1 (39): 60-72
29. Hamzah A.; Sabturani N. and Radiman S. (2013). Screening optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon- degrading bacteria. SainsMalaysiana. 42 (5): 615- 623.
30. Priya T. and Usharani G. (2009). Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Botan. Res. Int. 2(4): 284-287.
31. Christova N.; Tuleva B.; Lalchev Z. and Jordanova A. (2004). Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacteriumsalmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. Verlag der Zeitschrift für Nathrforschung. 29c. 70-74.
32. Giagkas DC.; Choli-Papadopoulou T. and Pantazaki AA.(2013). Development of antibody for detection of rhamnolipid characterized as a major bacterial virulence factor. Antibod. 2(3): 501-516.
33. Haba E.; Pinazo A.; Jauregui O. and Espuny MJ.(2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. Biotechnol. Bioeng. 81(3) : 316-322.
34. Winn WC.; Allen SDJ; Janda WU. and Koneman EW. (2006). Koneman's color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A. pp.318-321.
35. Japoni A.; Farshad S. and Alborzi A. (2009): *Pseudomonas aeruginosa*: burn inflection, treatment and antibacterial resistance.Iranian Red Crescent Med. J. IRCMJ. 11 (3): 244- 253.
9. Stover CK.; Pham XQ.; Erwin AL. and Mizoguchi SD.(2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nat. 406: 959- 964.
10. Okoliegbe IN. and Agarry OO. (2012). Application of microbial surfactant. J. Biotechnol. 1(1): 15-32.
11. Siegmund I. and Wagner F. (1991). New method for detection rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnol. Techn. 5(4): 265-268.
12. Carrillo PG.; Mardaraz C.; Pitta-Alvarez SI. and Giuliett AM. (1996). Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. World J. Microbiol. Bioterchnol. 12 (1): 82-84.
13. Abouseoud M.; Maachi R. and Amrane A. (2007). Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. Communicating Current Research and Education Topics and Trends in Applied Microbiology. 340-347.
14. Bodour AA. and Miller – Maier R.(1998). Application of a modified drops collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant producing microorganisms. J. Microbiol. Meth. 32: 273-280.
15. Morikawa M.; Hirata Y. and Imanaka T.(2000). A study on the structure function relationship of the lipopeptide biosurfactants. Biochem. Biophys. Acta. 1488: 211-218.
16. Sarubbo LA. (2006). Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a strain of *Candida glabrata* UCP 1002. J. Biotechnol. 9: 400-406.
17. Nie M.; Yin X.; Ren C.; Wang Y. and Xu F.(2010). Novel rhamnolipid biosurfactant produce by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa*strain NY3. Biotechnol. Adv. 1-9.
18. Tahzibi A.; Kamal F. and Assadi MM. (2004). Improved production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*mutant. Iranian Biomed. J. 8(1): 25-31
19. Zhang X.; Xu D.; Yang G. and Zhang H. (2012). Isolation and characterization of rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa*strains from waste edible oils. Afr. J. Microbiol. Res. 6(7): 1466-1471.
20. Bodour AA.; Drees KP. and Mair RM. (2003). Distribution of biosurfactant – producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69(6): 3280-3287.
21. Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing , nucleic acid techniques in bacterial systematic. Ed : Stackebrandt E, GoodfellowM . Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley & Sons, Chichester. pp. 115-147.
22. Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molec. Biol. Evaluat. 10: 512-526.
23. Karthik L.; Kumar G. and Rao KV. (2010). Comparison of methods and screening of biosurfactant producing marine Actinobacteria isolated from nicobar marine sediment . IIOAB J. (1): 34-38.

تقدير بعض المركبات الفعالة لمستخلصات بذور العنب *Vitis venifera* وتقييم فعاليتها ضد أنواع من البكتيريا المرضية

زينة هاشم شهاب، بشرى محمد جابر، ميسم بلاسم نعيم، ميسم غسان حليم

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لبذور العنب *Vitisvenifera* في نمو بعض أنواع البكتيريا المرضية والتي شملت *Salmonellatyphi*, *ProteusEscherichiacoli*, *spp.Pseudomonasaeruginosa* وبكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcusaureus* بطريقة الانتشار بالحفر، لوحظ إن الفعالية التثبيطية للمستخلصات تنوعت باختلاف مذيب الاستخلاص والكائن الدقيق، وكان المستخلص الأيثانولي لبذور العنب أكثر فعالية في تثبيط البكتيريا السالبة لصبغة غرام بمعدل أقطار تثبيط أعلى من بكتيريا المكورات العنقودية الموجبة لصبغة غرام وسجل أعلى معدل تثبيط لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus spp.* تليها بكتيريا *Salmonellatyphi* ثم *Escherichiacoli*. حيث بينت الكشوفات الكيميائية النوعية وجود المركبات الفعالة التالية: القلويدات، الصابونينات، الفينولات، التانينات و الفلافونيدات وكانت جميعها موجبة للمستخلص الكحولي أما المائي فكان سالب لفحص القلويدات، وعند إجراء تحليل (HPLC) للتحري عن بعض المركبات الفينولية المتعددة وهي وكانت (Gallic acid, Procynidin acid Epigallocatechin, Procynidin C, Epicatechin, Catechin, Procynidin B2, Procynidin C) حيث أظهر المستخلص الكحولي تفوقاً لجميع نسب المركبات الفينولية ماعدا مركب Procynidin C كانت نسبته أعلى في المستخلص المائي.

الكلمات المفتاحية: بذور العنب *Vitisvenifera*، HPLC

Estimation some active compounds of grape seed extract *Vitisvenifera* and evaluate their effectiveness against types of pathogenic bacteria

Zina H. Shehab, Bushra M. Jabir, Maisam B. Naeem, and Maisam Gh. Haleem

Dept. of Biology / College of Sciences for Women / Baghdad University / Republic of Iraq

ABSTRACT

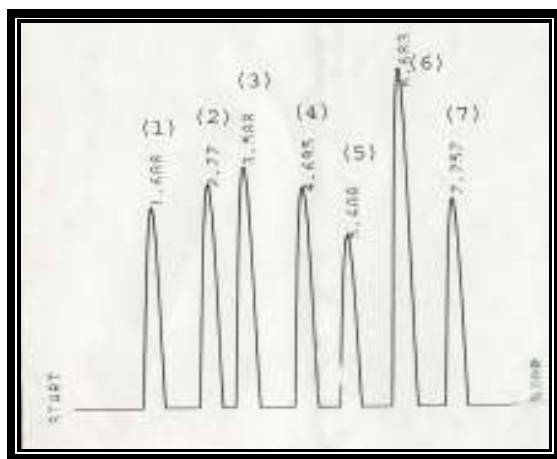
The active inhibitory was examined for aqueous and ethanolic extract of *Vitisvenifera* seeds in the growth of some types of the Enterobacteriaceae bacteria included *Salmonella typhi*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* and staph bacteria included *Staphylococcus aureus*, by using well diffusion method. The active inhibitory of extracts was differ according to type of solvent extract and microorganisms, ethanolic extracts have highly effective for inhibition in Enterobacteriaceae staph bacteria, it recorded the highest for *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus spp.* followed *Salmonellatyphi* then *E.coli*. The qualitative detection of some active compounds was show that the seeds containing: Alkaloids, Saponins, Phenols, Tannins and Flavonoids in ethanolic extract and aqueous extract, except Alkaloids are absent in aqueous extract. By using HPLC technique (High Performance Liquid Chromatography) for detection of some polyphenolic compounds was found (Gallic Acid, Procynidin Acid, Catechin, Procynidin B2, Epigallocatechin, Epicatechin & Procynidin C) in ethanolic extract was higher than aqueous extract except Procynidin C.

تم وزن 30 غم من مسحوق بذور نبات العنب ووضعت في Thumble tube بجهاز السوكسلت وباستخدام 200 مل من الكحول الايثيلي 80% لغرض الاستخلاص وعلى درجة حرارة 45

وكذلك تم إجراء تحليل (HPLC) باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة وذلك لتشخيص بعض المركبات الفينولية المتعددة الموجودة في المستخلص المائي والكحولي لنبات *V. venifera* لكونها طريقة ناجحة للتحري النوعي والكمي للمركبات الفعالة. وكانت (Gallic acid, Procynidin acid, Catechin, Procynidin, Procynidin B2, Epigallocatechin, C&E) حيث أظهر الجدول (2) والأشكال (1، 2، 3) تفوق تراكيز المركبات الفينولية المتعددة جميعها للمستخلص الكحولي عما هو عليه في المستخلص المائي ماعدا مركب Procynidin C. حيث اتفقت نتائج المركبات الفينولية لمستخلصات العنب مع ما توصلت إليه (10) وكذلك تتفق مع ما توصل إليه (18) لتقدير نسب المركبات الفينولية، حيث أكدت نتائج الباحثين (19، 20) أن الفعالية التثبيطية للميكروبات هي بفعل المركبات الفينولية لبذور العنب.

الجدول (2): مقارنة محتوى مستخلصات بذور العنب لبعض المركبات الفينولية المتعددة بتحليل HPLC

المركبات الفينولية المتعددة	التركيز مايكرو غرام ١ مل	
	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
Gallic acid	150.658	184.849
Procynidin acid	42.633	134.933
Catechin	94.078	137.098
Procynidin B2	49.735	98.072
Epigallocatechin	137.279	143.981
Epicatechin	69.588	109.485
Procynidin C	110.207	32.623



شكل (1): وقت الاحتجاز المركبات الفعالة (**) للعينة القياسية المحللة بتحليل HPLC

دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا:

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar well diffusion method لدراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لبذور العنب على العزلات البكتيرية المذكورة أعلاه. وتم ذلك بنقل (0.1) مل من العالق البكتيري الذي يحتوي 1.5×10^8 خلية / مل. إلى أطباق تحتوي وسط أكار مولر - هنتون - Mueller-Hinton Agar ونشر على سطح الوسط ألزري بواسطة ماسحة قطنية معقمة وترك الأطباق ليحفظ العالق، بعدها عملت حفر بقطر 6 ملم على سطح الوسط ألزري الصلب وباستخدام الناقل الفليني cork borer المعقم. ونقلت المستخلصات المحضرة إلى الحفر وبجسم (50) مايكرو لتر في كل حفرة مع بقاء حفرة واحد كسيطرة نقل إليها المذيب (DMSO) (10%)، حضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة وحددت فعالية المستخلصات النباتية بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition zone حول الحفر مقاسه بالمليمتر مطروحا منه قطر الحفرة (15).

التحليل الإحصائي :

استخدم البرنامج الإحصائي statistical analysis (2010) (SAS) system وفورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي Least significant differences LSD وتحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ لتجارب قياس الفعالية التثبيطية لمستخلصات بذور نبات العنب على البكتريا المعوية والمكورات العنقودية (16).

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) نتائج الكشف الكيميائي النوعي للمجموعات الفعالة لمستخلصات بذور العنب المائي والكحولي على احتواء هذه البذور على كل من القلويدات و الصابونينات والفينولات والتانينات والفلافونيدات ماعدا عدم ظهور ايجابية الكشف للقلويدات في المستخلص المائي وتعد المركبات المذكورة أعلاه من نواتج الأيض الثانوي التي لها أهمية دفاعية للنباتات تجاه الأحياء الدقيقة وكذلك استفاد منها الإنسان في مجالات الغذاء والدواء المتعددة (17).

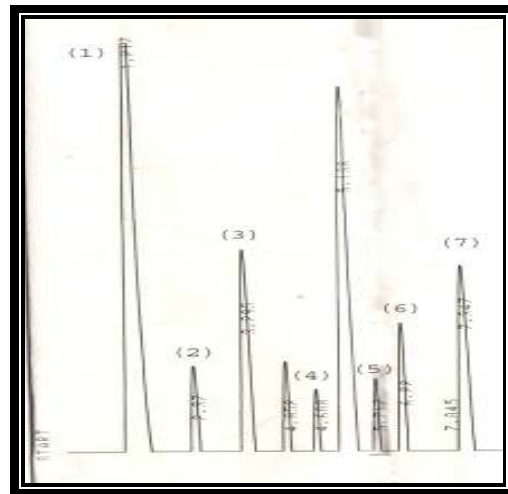
الجدول (1): نتائج الكشف الكيميائي عن بعض المركبات الفعالة لمستخلصات بذور العنب

المركبات الفعالة	الكشفات	نوع المستخلصات	
		المائي	الكحولي
القلويدات Alkaloids	واكثر مايز	-	++
الصابونينات Saponins	HgCl 2 الرغوة	+	+
الفينولات Phenols	خلات الرصاص 9.5 %	+	+
التانينات Tannins	كلوريد الحديدك 1% ترسيب القلويدات	+	+
الفلافونيدات Flavonoids	HCl + Mg H2SO4	+	+

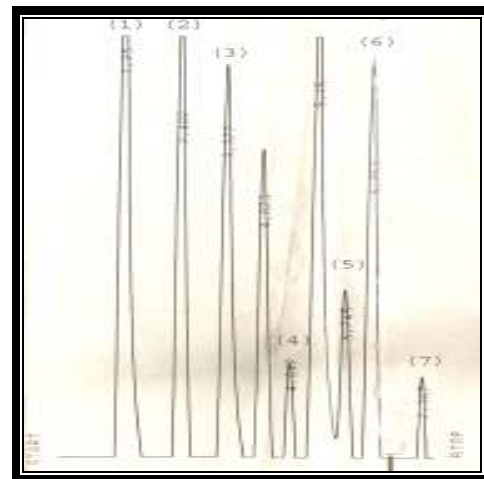
وكانت بكتريا *Proteus sp.* و *E. coli* سجلت أعلى قطر تثبيط 18,19 ملم على التوالي ثم بكتريا *Salmonella typhi* و *P. aeruginosa* بمعدل أقطار 15 ملم مقارنة ببكتريا المكورات العنقودية بقطر تثبيط 13 ملم و هذا لا يتفق مع نتائج بحث كل من (10، 19) الذين أشاروا إلى تأثير البكتريا الموجبة لصبغة غرام بمعدلات أقطار تثبيط أعلى من تأثير البكتريا السالبة لصبغة غرام لمستخلصات العنب .

يتضح مما سبق إن لكلا المستخلصين القابلة على تثبيط البكتريا ولكن بنسب متفاوتة وذلك يعود لتباين طرائق الاستخلاص المستعملة والمحاليل المذيبة مما أدى إلى اختلاف محتوى المركبات لفعالة (13)، وربما يعود السبب في ذلك إلى اختلاف صنف بذور العنب المستعملة قيد البحث التي اعتمدت في تحضير المستخلصات حيث استخدمت بذور صنف الحلواني عن الأصناف المستعملة في البحوث أخرى وبالتالي تؤثر على نسب تراكيز المجاميع الفعالة . حيث بينت النتائج إن الفعالية المضادة للميكروبات للمركبات الطبيعية لنبات العنب بصورة رئيسية تعود إلى احتواءها نسب عالية من Gallic acid وهو احد المركبات التانيينية الذائبة بالماء hydrolysable tannins فضلا عن مركبات العفص الكثيف Condensed tannins مثل (Procynidin acid, Procynidin B2, Procynidin C) حيث تمتلك التانيينات القدرة على تحفيز الخلايا البلعمية وكذلك لها دور مضاد للعدوى (21)، حيث تميل للارتباط بالبروتين عبر قنوات غير محددة من خلال ارتباطها بالأصرة الهيدروجينية مما له أهمية في تثبيط الأحياء المجهرية (22)، أما بالنسبة للعفص الكثيف فهي ترتبط بجدران الخلايا البكتيرية وتعمل على منع فعالية أنزيم *protease* فتثبط الميكروب (23) ، أما بالنسبة لمركبات Catechol الفينولية المتعددة التي تمتلك مجموعتين منالهيدروكسيل التي يعود لها الأثر السمي للأحياء المجهرية (22). وكذلك المركبات الفلافونيدية وأهمها Catechin التي لها فعالية واسعة الطيف ضد الجراثيم من خلال قدرتها على الارتباط مع المركبات الخارج خلوية وإذابة البروتينات وكذلك الارتباط مع جدار الخلية البكتيرية ، فالفلافونيدات مركبات محبة للدهون Lipophilic فهي تمنع تصنيع الأغشية البكتيرية (24). وأشار الباحثون لكون Catechin له تأثير مضاد للبكتريا السالبة لصبغة غرام مثل بكتريا الكوليرا والشيكلا.

(25) وهذا يتفق مع نتائجنا في كون البكتريا السالبة لصبغة غرام أكثر تحسسا من البكتريا الموجبة للصبغة. فضلا عن وجود القلويدات والصابونينات التي لها نشاط مضاد للميكروبات من خلال التأثير على تخليق البروتين البكتيري (15). ومما سبق تتضح عظمة الخالق في احتواء النبات على مركبات فعالة واسعة الطيف الذي ينتج عنه تأثير تآزري أعلى لكل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام من خلال تأثيرها على الجدار وتخليق البروتين . واعتمادا على النتائج أنفة الذكر نوصي باستخدام مطحون بذور العنب كإضافة للأطعمة أو ممكن عمل أكياس معبأة من مطحون البذور وتستخدم كشاي بذور العنب.



شكل (2): ** وقت الاحتجاز المركبات الفعالة (**) للمستخلص المائي لبذور العنب بتحليل HPLC



شكل (3): ** وقت الاحتجاز المركبات الفعالة (**) للمستخلص الكحولي لبذور العنب بتحليل HPLC

(**) 1= Gallic acid , 2=Procynidin acid , 3= Catechin , 4= Procynidin B2 , 5= Epigallocatechin 6= Epicatechin, 7= Procynidin C

وللتحري عن الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لبذور العنب تجاه العزلات قيد الدراسة حيث بينت نتائج الجدولين (3، 4) وجود فروق فوق معنوية في تأثير هذه المستخلصات تجاه العزلات الاختيارية التي أشارت إلى تفوق المستخلص الكحولي في تثبيط البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام بمعدل أقطار أعلى مما هو عليه للمستخلص المائي وعند إيجاد معامل الارتباط r بين فعالية المستخلصين كان 0.84 تحت مستوى احتمالية ($P < 0.01$). حيث كانت معدل أقطار تثبيط البكتريا تزداد بزيادة التركيز وكانت البكتريا المعوية أكثر تحسسا للمستخلصات الكحولية من بكتريا المكورات العنقودية وكانت بكتريا *Proteus sp.* و *P. aeruginosa* قد سجلت أعلى معدل تثبيط بقطر 22 ملم تلتها بكتريا *S. typhi* ثم بكتريا *E. coli* بمعدل أقطار 21، 18 ملم على التوالي بتركيز 280 ملغم/مل، مقارنة بمعدل تثبيط أقطار بكتريا المكورات العنقودية التي كانت 12 ملم . أما بالنسبة لمعدل أقطار تثبيط البكتريا بالمستخلص المائي للتركيز 200 ملغم/مل وكانت كذلك البكتريا المعوية أكثر تحسسا للمستخلص المائي

الجدول (3): الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لبذور العنب تجاه البكتيريا المدروسة

قيمة LSD	متوسط أقطار التثبيط بالملم					البكتيريا التراكيز
	12.5	25	50	100	200	
* 6.74	0	0	0	15	18	<i>E. coli</i>
* 5.17	0	0	0	9	15	<i>Salmonella typhi</i>
* 6.93	0	0	4	9	19	<i>Proteus sp.</i>
* 6.15	0	0	3	13	15	<i>P. aeruginosa</i>
* 4.79	0	0	0	5	13	<i>Staph. aureus</i>
---	NS	NS	NS	* 6.91	* 4.02	قيمة LSD
*(P<0.05).						

الجدول (4): الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لبذور العنب تجاه البكتيريا المدروسة

قيمة LSD	التركيز					البكتيريا التراكيز
	17.5	35	70	140	280	
* 6.24	3	5	8	9	18	<i>E. coli</i>
* 7.72	3	6	10	16	21	<i>Salmonella typhi</i>
* 7.89	4	11	15	16	22	<i>Proteus sp.</i>
* 7.14	4	5	9	17	22	<i>P. aeruginosa</i>
* 5.63	4	7	10	10	12	<i>Staph. aureus</i>
---	NS	* 3.96	* 4.28	* 4.61	* 4.53	قيمة LSD
*(P<0.05).						

biochemistry and functionality. J. Med. Food. 6(4):291-9.

10. Binit Shrestha ML.; Srithavaj T. ; Sroisiri T. and Boonyanit T. (2012). *In vitro* antimicrobial effects of grape seed extract on peri implantitis microflora in craniofacial implants. Asian Pacific J. Trop. Biomed. 822 825.

11. Hala AHK. ; Inas ZAA. and Gehan MK. (2010). Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. J. Am. Sci. 6(12): <http://www.americanscience.org>.

12. Rani I.; Akhund SH.; Suhail M. and Abro H.(2010).Antimicrobial potential of seed *Eruca sativa* .Pak. J. Bot. 42(4):2949-2953

13. حمدان ، عامر حسين؛ الشيخ ظاهر، عامر عبد الرحمن والقيسي، مهدي ضمد (2009). مقارنة الكفاءة التثبيطية لمستخلصات بذور الخردل الأبيض تجاه بعض عزلات البكتيريا الاختبارية . مجلة الزراعة العراقية: 47-40(9)14.

14. عبد ، هدى سهيل (2009). تأثير المستخلص الكحولي لنبات القرنفل (*Eugenia caryophyllus*) في نمو بعض الأنواع البكتيرية المرضية. مجلة بحوث التقنيات الإحيائية. 78-72:3(1).

15. القيسي ، صفاء الدين احمد شنتر و محمد علي، هيثم ، هالة.(2009). تأثير مستخلصات أوراق نبات الدوراتا *Durantarepens* في نمو وفعالية بعض الأنواع البكتيرية المرضية وبعض الفطريات. مجلة أم مسلمة. 41-29:(1)6.

16. SAS. (2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1 Ed. SAS.Inst. Inc. Cary.N.C. USA.

17. Jayaprakasha GK. ; Selvi T. and Sakariah KK.(2003). Antibacterial and antioxidant activities

المصادر

1. Zachary LF.; Karan S.; John CP.; Amy J. and Mattheos AG. (2011). Development of Non-Natural Flavanones as Antimicrobial Agents. PLoS One. 6(10): e25681.

2. Kaefer CM. and Milner JA. (2008). The role of herbs and spices in cancer prevention. J. Nutr Biochem. 19:347-361.

3. Forkmann G. and Martens S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. Current Opinion in Biotechnol. 12:155-160.

4. Robinson J. (2001). Concise Wine Companion. Oxford University Press.

5. Baliga MS. and Katiyar SK. (2006). Chemoprevention of photo carcinogenesis by selected dietary botanicals .Photochem. Photobiol. Sci. 5 (2):243-253 .

6. Su X. and d'Souza DH. (2011).Grape seed extract for control of human enteric viruses. Appl. Environ. Microbiol. 77(12): 3982-3987.

7. Joseph CB. ; Guohui H. ; Vivian H. and Xiuping J. (2008). Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. Appl. Environ. Microbiol. 75(3): 848-852.

8. En-Qin X.; Gui-Fang D.; Ya-Jun G. and Hua-Bin Li. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. Int. J. Mol. Sci. 11:622-646.

9. Shi J. ; Yu J. ; Pohorly JE. And Kakuda Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds-

of grape (*Vitisvinifera*) seed extracts. Food Res. Int.36(2):117-122.

18. Hua L.; Xiaoyu W.; Peihong L.; Yong L. and Hua W. (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitisvinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. J. Food Drug Anal. 16(6):1-7.

19. Ana Teresa S.; Ana AM.; Ana VMN.; Leitão MC. ;DulceB. ; BronzeB.; Sandra S. ; Antonio P.; Crespo MT.; San Romão MV. And Duarte CM. (2008). *In vitro* evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 9: 311–319.

20. Marjorie MC.(1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol.Rev. 12(4):564-582.

21. Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J. Nat. Prod. 59:205–215.

22. Marjorie MC.(1999).Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4) : 582- 589.

23. Muir D. and Cheng KJ. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychisviciifoliascop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of luminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 60:1374–1378.

24. Tsuchiya H.; Sato H.; Miyazaki T.; Fujiwara S.; Tanigaki M.; Ohyama T. and Iinuma M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of photochemicalflavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 50:27–34

25. Borris RP. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. J. Ethnopharmacol. 51:29–38.

تأثير الخزن المبرد لبيض أسد المن (*Chrysoperla carnea* (Stephens) على المعالم الحياتية

باسم شهاب حمد (1)، سحر عبد خضير (2)، أحمد غربي عبد (1)، أحمد مشتاق عبد اللطيف (1)

(1) مركز مكافحة المتكاملة للآفات/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد (2) قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

يعد المفترس *Chrysoperla carnea* (Stephens) احد اهم عوامل مكافحة الاحيائية , يعتمد نجاح استعمالها بشكل كبير على فاعلية الانتاج الكمي والتعامل بأقل الخسائر اثناء الجمع والخزن والنقل الى الحقل. ويعد الخزن المبرد احدى العمليات المهمة الشائعة في نقل الحشرات والحصول على الاعداد المطلوبة وقت الحاجة اليها. قصد البحث دراسة تأثير مدة ودرجة حرارة الخزن المبرد على المعالم الحياتية للمفترس لاعتماد الافضل منها في الانتاج الكمي للمفترس قيد الدراسة . نفذت تجارب خزن البيض تحت درجات حرارية منخفضة (5 و 8 و 10 °سليزية) لفترات زمنية مختلفة (7 و 14 و 21 و 28 يوم) ، بلغت نسبة الفقس عند الخزن لمدة اسبوع تحت الدرجة الحرارية 5 °سليزية 51% باختلاف معنوي عن الدرجتين الحراريتين 8 و 10 °سليزية اذ بلغت نسبة الفقس فيهما 64 و 66 % على التوالي ، واختلفت جميع المعاملات عن المقارنة اذ بلغت نسبة الفقس فيها 94.5% . تزايد معدل الانخفاض في نسبة فقس البيض مع زيادة مدة الخزن حتى وصلت الى صفر % بمدة خزن اربعة اسابيع للدرجة 5 °سليزية . وعن تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لبيض المفترس على الادوار الحياتية اللاحقة بينت النتائج في حالة الخزن لمدة اسبوعين كان الانخفاض معنوي في النسبة المئوية لبقاء اليرقات عند الدرجة 8 سيليزية مقارنة مع الخزن عند الدرجة 10 سيليزية والمقارنة ، كانت نسبة بزوغ البالغات عالية نسبيا ومماثلة لمعاملة المقارنة لاسيما عند الخزن لمدة اسبوع فيما ظهر الاختلاف المعنوي عن المقارنة في الاسبوعين الثاني والثالث عند الدرجتين 8 و 10 سيليزية وشمل الفارق المعنوي الدرجة 10 سيليزية عند الخزن لمدة اربعة اسابيع. لم تظهر فروقات معنوية في الانتاجية بين الدرجات رغم تناقصها ولكن الفارق كان معنوي عن معاملة المقارنة. تبعاً للنتائج يكون الخزن على الدرجة الحرارية 10 °سليزية افضل النتائج ضمن الدراسة الحالية والتي يمكن اعتمادها في الخزن المؤقت لتوفير الاعداد المطلوبة لعملية الاطلاق اثناء الموسم.

الكلمات المفتاحية: الخزن المبرد ، بيض أسد المن ، المعالم الحياتية.

Effect of eggs cold storage of *Chrysoperla carnea* (Stephens) on some biological parameters

Bassim Sh. Hamad (1), Sahar A. Khathiar (2), Ahmed G. Abed (1) and Ahmed M. Abdullatif (1)

(1) Agricultural Research Directorate /Ministry of Sciences and Technology / Baghdad (2) Dept. of Biology/ College of Science for Women / Baghdad University

ABSTRACT

The common green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) is one of the useful agents in agricultural pests control which their success depends largely on the effectiveness of mass production with minimum losses during collection, storage and transport to the field . Cold storage of insects is a common practice used when transporting insects or to assist with efforts to increase the size of a colony at time of release. The study was investigated the effect of period and temperature of storage on biological aspect of the predator. The impact of cold stored eggs of *C.carnea* at 5, 8 and 10° C for 1 to 4 weeks on some biological parameters was studied, the results showed that the percentage of egg hatch was declined with decrease temperature and increased of storage duration, the hatchability was 51% for storage at 5° C compared with 64, 66% at 8 , 10° C respectively , viability of eggs was decreased with increasing of storage period . The effect of cold storage on the next stages was significant reduction in larvae survival at 8°C compared with 10°C and the control; and non-significant difference in the fecundity among all degrees that were different with the control. Depending on this results the cold storage at 10 ° Celsius is the best within the current study and that can be adopted in the temporary storage to provide the numbers required to release during the season.

المقدمة

اسبابغ التي بلغت نسبة الفقس فيها 64 و 60 و 55.5% ولم تظهر فروقات معنوية بين مدد الخزن عند الدرجة 10 سيليزية.

الجدول (1): تأثير مدة ودرجة حرارة الخزن على النسبة المئوية لفقس بيض المفترس الحشري *Chrysoperla carnea* (المعدل \pm الخطأ القياسي)

مدة الخزن (يوم)				درجة الحرارة (سيليزية)
28	21	14	7	
B 0.0 c	B 1.1 \pm 2 c	A 6.6 \pm 41 c	A 2.5 \pm 51 c	5 \pm 1
B 2.6 \pm 50 c	AB3.57 \pm 55.5b	AB4.47 \pm 60b	A 5.56 \pm 64b	8 \pm 1
A 0.1 \pm 60 b	A 4.16 \pm 58 b	A 9.6 \pm 65 b	A 5.2 V 66 b	10 \pm 1
1.19 \pm 94.5 a	1.19 \pm 94.5 a	1.19 \pm 94.5 a	1.19 \pm 94.5 a	2 \pm 25

المعدلات المتبوعة بنفس الحروف الصغيرة في العمود الواحد والحروف الكبيرة في الصف الواحد لا تختلف معنويا حسب اختبار دانكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05

وعن تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لبيض المفترس على الادوار الحياتية اللاحقة بينت النتائج في الجدول (2) الى حدوث انخفاض غير معنوي في النسبة المئوية لبقاء البرقات اذ بلغت 91.3 و 88.25 و 89.75. اما في حالة الخزن لمدة اسبوعين فقد كان الانخفاض معنوي عند الدرجة 8 سيليزية مقارنة مع الخزن عند الدرجة 10 سيليزية والمقارنة ، فيما كان الفارق معنوي بين جميع الدرجات عند الخزن لثلاثة اسابيع. كانت نسبة بزوغ البالغات عالية نسبيا ومماثلة لمعاملة المقارنة لاسيما عند الخزن لمدة اسبوع (جدول 3) فيما ظهر الاختلاف المعنوي عن المقارنة في الاسبوعين الثاني والثالث عند الدرجتين 8 و 10 سيليزية وشمل الفارق المعنوي الدرجة 10 سيليزية عند الخزن لمدة اربعة اسابيع.

لم تظهر فروقات معنوية في الانتاجية بين الدرجات رغم تناقصها عند مدة الخزن اسبوع (جدول 4) ولكن الفارق معنوي عن معاملة المقارنة الامر الذي تكرر مع المدد الاخرى.

اشار (7) الى اهمية الخزن المبرد لاسد المن من النوع *C.carnea* كونه يلتقي مع ذروة الطلب الموسمي للبيض والبرقات الحديثة

درس (3) خزن البيض لثلاث انواع من اسد المن *Chrysoperla* و *C. smithi* و *Ceraeochrysa cubana externa* وبين امكانية الاحتفاظ بها دون فقس لمدة اسبوعين تحت درجة 15.6 سيليزية وان خزن بيض النوع *C.externa* يمكن ان يمتد الى ثلاث اسابيع تحت درجة حرارة 12.8 سيليزية وان هذه الدرجات توفر قدرات خزن جيدة النوعية .

وحصلت (4) على 72 و 67 % بيضا حيويا بعد الخزن تحت درجة 11 سيليزية لمدة اسبوع واسبوعين على التوالي.

اشار (8) ان الخزن المبرد لعذارى *Choristoneura occidentalis* تحت 2 \pm 0.5 سيليزية اثر سلبي على نسبة بزوغ البالغات ومعدل عدد البيض/ انثى وطول عمر البالغات وحيوية البيض الا ان التأثير لم يكن معنويا بالمقارنة مع التي لم تعامل عند الخزن لمدة اسبوع واصبح التأثير معنويا بعد اسبوعين من الخزن. وفي دراسة (10) وجد انخفاضا تدريجيا في نسبة فقس بيض *Homalodisca coagulata* بعد الخزن تحت 10 سيليزية من المدة 1- 6 يوم واصبح صفرا بعد 8 ايام خزن . في حين حصل (9) على 67 و 16 و 1 % فقس بيض بعد 1 و 2 و 3 يوم خزن على التوالي تحت درجة 1 سيليزية.

يعد المفترس *Chrysoperla carnea* احد اهم المفترسات الحشرية للعديد من الافات بما في ذلك الحشرات والعناكب والحلم وكذلك بيض ويرقات العديد من حشرات حرشفية الاجنحة وغمدية الاجنحة. يربى هذا المفترس بشكل تجاريا كأحد عوامل مكافحة الاحيائية للافات في الحقول المفتوحة والبيوت المحمية (4 و 5 و 6). يعتمد نجاح مكافحة البيولوجية بشكل كبير على فاعلية الانتاج الكمي لمعامل مكافحة الاحيائي المقصود والتعامل معه بأقل الخسائر اثناء الجمع والخزن والنقل الى الحقل وبعد الخزن المبرد احدى العمليات المهمة في نقل الحشرات والحصول على الاعداد المطلوبة وقت الحاجة اليها (2) لذا يهدف البحث الى دراسة تأثير مدة ودرجة حرارة الخزن المبرد على المعالم الحياتية للمفترس قيد الدراسة.

المواد وطرق العمل

تربية المفترس:

تم الحصول على ادوار الحشرة المطلوبة في الدراسة من المزرعة الحشرية المرباة في مركز مكافحة المتكاملة للافات /دائرة البحوث الزراعية/وزارة العلوم والتكنولوجيا (1)

الخزن المبرد لبيض المفترس:

نفذت تجارب خزن بيض المفترس تحت ثلاث درجات حرارية هي 1 \pm 5 و 1 \pm 8 و 1 \pm 10 سيليزية ولاربعة مدد خزن (اسبوع، اسبوعان، ثلاثة اسابيع ، اربعة اسابيع) بواقع 25 بيضة للمكرر وباربعة مكررات للمعاملة. بعد اكتمال مدة الخزن وضع البيض تحت الظروف المستخدمة في التربية (27 \pm 2 سيليزية و 16 ساعة ضوء يوميا) لدراسة تأثير الخزن على حيوية البيض وعلى بعض المعالم الحياتية للادوار اللاحقة . حسبت نسبة الفقس ومعدل بقاء البرقات الناتجة ونسبة بزوغ البالغات وانتاجيتها. حلت النتائج احصائيا وفق التصميم العشوائي الكامل للتجارب العاملة.

النتائج والمناقشة

الخزن المبرد للبيض:

أظهرت النتائج (جدول 1) أن لكل من درجة الحرارة ومدة الخزن تأثيرا في نسبة فقس البيض ، اذ انخفضت نسبة فقس البيض مع انخفاض الدرجة الحرارية التي خزن فيها فعند الدرجة 10 سيليزية كانت نسبة الفقس 66% بعد خزنها لمدة اسبوع وكانت النسبة 64% عند الدرجة 8 سيليزية وكان الانخفاض معنوي عن هاتين الدرجتين عند الخزن تحت الدرجة 5 سيليزية (51%)، جميعها اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة (25 سيليزية) اذ بلغت نسبة الفقس فيها 94.5%.

وعلى نفس الوتيرة كان الفارق المعنوي بين الدرجات الحرارية المختلفة لمدتي الخزن اسبوعين وثلاثة اسابيع اما الاسبوع الرابع فاختلقت جميع الدرجات معنويا اذ بلغت نسبة الفقس فيها 0.0 و 50 و 60 % للدرجات 5 و 8 و 10 سيليزية على التوالي.

اما عن تأثير مدة الخزن فقد اظهرت النتائج انخفاضا في نسبة الفقس مع زيادة مدة الخزن، فعند الدرجة 5 سيليزية تناقصت نسبة الفقس من 51% بالخزن لمدة اسبوع الى 0.0% عند الخزن لمدة اربعة اسابيع وظهر الانخفاض المعنوي عند الخزن لمدة ثلاثة اسابيع (2%) .

وعند الدرجة 8 سيليزية كان انخفاض معنويا في الاسبوع الرابع للخزن (50%) بالمقارنة مع مدد الخزن اسبوع واسبوعين وثلاثة

الجدول(2): تأثير درجة الحرارة ومدة خزن البيض على نسبة بقاء اليرقات للمفترس *Chrysoperla carnea* (المعدل \pm الخطأ القياسي)

درجة الحرارة (سيلييزية)				مدة الخزن (اسبوع)	المعالم الحياتية
2 \pm 25	1 \pm 10	1 \pm 8	1 \pm 5		
1.93 \pm 94.5 a	A 2.02 \pm 91.3 a	A 1.65 \pm 88.25 a	A 0.85 \pm 89.75 a	1	نسبة بقاء اليرقات
1.93 \pm 94.5 a	AB 0.57 \pm 89 a	B 2.04 \pm 84 b	B 0.65 \pm 84.5 ab	2	
1.93 \pm 94.5 a	A 0.64 \pm 89.6 b	BC 2.3 \pm 82 c	C 1.2 \pm 78 d	3	
1.93 \pm 94.5 a	B 4.5 \pm 86 b	C 1.84 \pm 79.5 b	-----	4	

المعدلات المتبوعة بنفس الحروف الكبيرة في العمود الواحد والحروف الصغيرة في الصف الواحد لا تختلف معنويًا حسب اختبار دانكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05

الاستنتاج

تبعًا للنتائج يكون الخزن على الدرجة الحرارية 10 °سيلييزية أفضل النتائج ضمن الدراسة الحالية والتي يمكن اعتمادها في الخزن المؤقت لتوفير الأعداد المطلوبة لعملية الإطلاق أثناء الموسم.

المصادر

- LI SY. and OTVOS IS.(1998). Effects of cold storage on adult emergence and fecundity of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae) Entomol. Soc. Brit. Columbia 95 3-7.
- Andress E.; Staten RT.; Luvisi D.; Wendel LE.; Bartels DW, and Ciomperlik MA. (2002). Risk assessment for transport of the glassy-winged sharpshooter in grape shipments. Unpublished report (August, September and October) USDA APHIS, PPQ.
- Leopold RA.; Yocum GD.; Morgan DJW.; Chen W. and Lauziere I. (2002). Host selection and low temperature storage of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. pp. 90-92. In Proceedings, Pierce's Disease Research Symposium, M. Athar Tariq, S. Oswalt, P. Blincoe, and T. Esser (eds.), December 2002, San Diego, CA, California Department of Food and Agriculture, Sacramento, CA.

- AL-Shammary HBS. ; Okaily RA.; Abed AG. And Yousif GSB> (2012). Effect Of different prey species on biology of *chrysoperlla carnea* . Iraqi J. Agr. Sci. 43(3): (Special Issue): 66-70.
- Leopold R.; Rojas R. and Atkinson P. (1998). Post pupariation cold storage of three species of flies: increasing chilling tolerance by acclimation and recurrent recovery periods. Cryobiol. 36:213-224.
- Lo'pez-Arroyo JI.; Tauber CA. and Tauber MJ. (2000). Storage of lacewing eggs: Post-storage hatching and quality of subsequent larvae and adults. Biol. Control. 18: 165-171.
- Sattar M. (2010). Investigations on *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) as a biological control agent against cotton pests in Pakistan. PhD. Thesis. Sindh Agriculture University, Tando Jam.
- Tauber MJ. and Tauber CA. (2000). Commercialization of predators: recent lessons from green lacewings (Neuroptera : Chrysopidae : *Chrysoperla*). Am. Entomol. 46(1): 26-38.
- Tauber MJ. and Tauber CA. (1975). Criteria for selecting *Chrysopa carnea* biotypes for biological control: Adult dietary requirements. Can. Entomol. 107: 589-595.
- Tauber MJ.; Tauber CA. and Gardescu S. (1993). Prolonged storage of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environ. Entomol. 22: 843-848.

تأثير عاثي بكتريا *Rhizobium leguminosarum* في بعض معايير النمو لنبات الباقلاء (*Vicia faba* L.)

أمير خضير عباس (1) ، سندس علي جاسم (1) ، علي هاشم الموسوي (2)، فرقد فرحان عبد الحميد (1)
وزارة

(1) وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد (2) كلية العلوم للنبات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

يهدف البحث الى دراسة تأثير عاثي الرايزوبيوم في بعض معايير النمو لنبات الباقلاء باستعمال عزلات محلية من بكتريا *R.leguminosarum* الحساسة والمقاومة للعاثي في البيت البلاستيكي من خلال مجموعة من المعاملات التي شملت (معاملة A = بذور الباقلاء فقط ، معاملة B = بذور الباقلاء + البكتريا الحساسة للعاثي RL5 ، معاملة C = بذور الباقلاء + البكتريا الحساسة للعاثي RL5 + العاثي SA ، معاملة D = بذور الباقلاء + البكتريا المقاومة للعاثي RL6 + العاثي SA).

بينت النتائج ان هنالك فروقات معنوية ($P < 0.05$) في معدل اطوال النبات بأختلاف المعاملات اذ حققت المعاملة D اقصى طول للنبات 48.7 سم تلتها المعاملة A,C,B بطول 32.9 , 34.7, 45.3 سم على التوالي ، تمايزت المعاملة B بأكثر معدل لعدد العقد الجذرية بلغ 120 عقدة وتلتها المعاملة D بمعدل 113 عقدة في حين أدنى عدد كان في المعاملة C وبواقع 50 عقدة وبينت المعاملة A خلوها من أي عقدة جذرية ، اما فيما يخص الاوزان الطرية للعقد الجذرية فكانت 0.589, 0.172, 1.367 غم للمعاملات D,C,B على التوالي بينما كان معدل الاوزان الجافة للعقد الجذرية 0.0952, 0.0289, 0.2556 غم للمعاملات D,C,B على التوالي ، وبخصوص الاوزان الطرية للمجموع الخضري حققت فروقات معنوية بأختلاف المعاملات اذ حصلت المعاملة B على اقصى وزن 32.54 غم تلتها المعاملات A,C,D وبمعدل اوزان 9.92, 27.99, 7.18 غم على التوالي اما معدل الاوزان الطرية للمجموع الجذري فقد تمايزت المعاملة B بوزن 50.96 غم في حين كانت معدل الاوزان للمعاملات A,C,D بوزن 20.78, 22.79, 45.47 غم على التوالي ، ومعدل الاوزان الجافة للمجموع الجذري 0.97, 4.25, 1.32, 3.86 غم للمعاملات D,C,B,A على التوالي ، ومعدل الاوزان الجافة للمجموع الجذري 6.01, 5.14, 3.47, 2.03 غم للمعاملات C,A,D,B على التوالي ، بينت النتائج ان هنالك فروقات معنوية في معدل الكلوروفيل الكلي اذ حققت المعاملة D اقصى معدل للكلوروفيل 0.863 ملغم/غم تلتها المعاملات A,C,B بمعدل 0.255, 0.650, 0.801 ملغم/غم على التوالي وكانت النتيجة نفسها عند قياس نسبة البروتين اذ حققت المعاملة D اعلى نسبة للبروتين 14.83% تلتها المعاملات A,C,B بمعدل 10.14%, 13%, 14.41% على التوالي .

الكلمات المفتاحية: عاثي الرايزوبيوم ، نبات الباقلاء ، بكتريا الرايزوبيوم لكيومونوزايم

The effect of rhizobiophage of *Rhizobium leguminosarum* on some growth parameters of *Vicia faba* L.

Ameer Kh. Abbas (1), Sundus A. Jassim (1), Ali H. Al- Mousawi (2) and Farqad F. Abdul-Hameed(1)

ABSTRACT

The aim of this study included the effect of rhizobiophage in some growth parameters of *Vicia faba* L. by using local isolates of *R. leguminosarum* sensitive and resistance to phage, at greenhouse according to the following treatments (Treatment A = only the seeds of *Vicia faba* L., Treatment B = the seeds + the phage sensitive bacteria (RL5) , Treatment C = the seeds + the phage sensitive bacteria (RL5) + SA phage , Treatment D = the seeds + the phage resistance bacteria (RL6) + SA phage). The results showed a significant difference ($P < 0.05$) among the average length 48.7 cm was in the treatment D while the length of plant in treatments B,C and A were 45.3, 34.7, 23.9 cm respectively. Treatment B was characterized by the largest number of root nodules 120 nodules, followed by treatment D were 113 nodules while the smallest number in treatment C were 50 nodules. The fresh weight for the root nodules were 0.589, 0.172, 1.367 gram for the treatments B,C and D respectively while the dry weight for the root nodules were 0.0952, 0.0289, 0.2556 gram for the treatments B,C and D respectively. The fresh weight (shoot) showed a significant difference ($P < 0.05$) among the weight for each treatment. Treatment B showed the highest fresh weight 32.54 gram while the weight of treatments D,C and A were 27.99, 9.92, 7.18 gram respectively. The fresh weight (root) of treatment B showed the highest fresh weight 50.96 gram while the average weights for treatments D,C and A were 45.47, 22.79, 20.78 gram respectively. The results showed a significant difference among the average dry weight shoot and root. The dry weights for shoot were 0.97, 4.25, 1.32, 3.86 gram for the treatments A,B,C and D respectively while the dry weights for root were 6.01, 5.14, 3.47, 2.03 gram for the treatments B,D,A and C . The data also showed a significant difference in the average of total chlorophyll among the different treatments. Treatment D showed the highest chlorophyll contained 0.863 mg/gm followed by treatments B,C and A were 0.801, 0.650, 0.255 mg/gm respectively. The results also showed a significant difference among the percentage of protein for each treatment. The highest percentage 14.83% was in the treatment D followed by treatments B,C and A were 14.41%, 13%, 10.14% respectively.

المقدمة

الأوساط الزرعية:

استعمل الوسط مستخلص خميرة - المانيتول الصلب (Yeast extract Mannitol Agar-YMA) والسائل في عزل وتنمية البكتريا والمحضر بحسب (13)، كما استعمل وسط خميرة المانيتول الصلب (Bottom agar) في تنمية البكتريا أثناء تحضير العائي ومعايرته، أما وسط المانيتول نصف صلب (Top agar) تم تحضيره بحسب (4).

تحضير التربة:

استعملت لغرض الزراعة تربة تم الحصول عليها من احد المشاتل في منطقة الجادرية/بغداد، قدر بعض صفاتها الكيميائية والفيزيائية في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البيئة والمياه بحسب (14)، جدول (1)، تم غربلة التربة بغريال بقطر 2 ملم للتخلص من الشوائب، ثم عقت التربة مرتين بجهاز المؤصدة لمدة عشرين دقيقة لكل مرة بعد 24 ساعة بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/ انج2 (15).

الجدول (1): بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المستعملة في التجربة

الكميات	الصفات
773 غم/كغم	الرمل
140 غم/كغم	الغرين
87 غم/كغم	الطين
مزيجية رملية	النسجة
3.0 غم/كغم	المادة العضوية
7.5	الرقم الهيدروجيني
6.0 ملغم/كغم	الفسفور الجاهز
0.18 غم/كغم	النيتروجين الكلي
250 غم/كغم	كربونات الكالسيوم (الكلس)
11.4 ملغم/كغم	الحديد
1.2 ديسيمنز/ م	التوصيلية الكهربائية في عجينة التربة المشبعة

تحضير البذور وزراعتها:

عقت بذور نبات الباقلاء بحسب البرهاوي وآخرون (16)، إذ غسلت البذور جيداً بالماء المقطر المعقم ثم غمرت بالكحول الايثيلي بتركيز 95 % لمدة اربع دقائق للتخلص من المواد الدهنية والشحمية وللتخلص من الفقاعات الهوائية عند منطقة ندبة السرة (Hilum scar)، ثم غسلت البذور خمس مرات بالماء المقطر المعقم بعدها غمرت البذور بمحلول هايپوكلورات الصوديوم بتركيز 3 % لمدة 4 دقائق مع التحريك المستمر، غسلت بعدها البذور بالماء المقطر المعقم سبع مرات لازالة اي تأثير للمادة المعقمة، زرعت البذور في أصص بلاستيكية سعة 5 كغم، تم تعقيمها بمحلول هايپوكلورات الصوديوم وغسلها وتجفيفها جيداً قبل الاستعمال بمعدل اربع بذور لكل أصيص التي تحتوي على 4 كغم من التربة المعقمة وبعد الانبات تم إزالة ثلاث بادرات والابقاء على بادرة واحدة في كل أصيص.

تأثير عائي الرايزوبيوم في نمو نبات الباقلاء باستعمال بكتريا الرايزوبيوم الحساسة والمقاومة للعائي تم تصميم التجربة إذ اختيرت اربع معاملات اعطيت لها الرموز A و B و C و D، وكل معاملة تتكون من ثلاثة مكررات. معاملة A = بذور الباقلاء فقط.

تعتبر بكتريا الرايزوبيوم من اهم انواع البكتريا المثبتة للنيتروجين الجوي وتتم هذه العملية من خلال العلاقة التعايشية بين البكتريا والنباتات البقولية (1) هذا بالإضافة ان لهذه البكتريا دورا مهما في نمو النباتات البقولية من خلال انتاجها للعديد من المواد منها الهورمونات النباتية فقد وجد ان 74% من بكتريا الرايزوبيوم تنتج هورمون Indol Acetic Acid (IAA) وقدرة البكتريا على انتاج العديد من المضادات الحيوية التي تعمل على قتل مسببات المرضية للنبات فضلا على ان للبكتريا دورا مهما في اعادة تدوير واذابة المعادن المغذية (2).

تتأثر مجتمعات بكتريا الرايزوبيوم في التربة بالعديد من العوامل البيولوجية التي تتضمن المفترسات (Predators) والعائيات (Phages) التي تعد من اهم العوامل البيولوجية المؤثرة في اعداد وانواع بكتريا الرايزوبيوم في الترب الزراعية وان وجود عائيات الرايزوبيوم في التربة يؤدي الى انتخاب وتحديد (Selection and Elimination) لبعض انواع بكتريا الرايزوبيوم كما ان الدور الكبير الذي تؤديه عائيات الرايزوبيوم هو السيطرة والتحكم في مجتمعات بكتريا الرايزوبيوم في الترب المختلفة (3). ان وجود عائيات الرايزوبيوم بصورة شائعة في التربة يؤثر في العلاقة التعايشية بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات البقلي مؤدياً الى قلة الانتاج (4)، وذلك من خلال تقليل اعداد العقد الجذرية نتيجة لانخفاض اعداد بكتريا الرايزوبيوم في التربة (5).

نبات الباقلاء من النباتات البقولية ذات القيمة الاقتصادية الكبيرة إذ تتم زراعته سنوياً بمساحة أرض تبلغ $10^6 \times 2.5$ هكتار ويمعدل انتاج من البذور يصل الى 4.1 مليون طن (6) ويحتل هذا النبات المرتبة الثالثة في العالم من بين انتاج المحاصيل البقولية (7). وعلى الرغم من استهلاك الباقلاء بكميات قليلة في البلدان الغربية الا انه يعد واحداً من أهم مصادر البروتين والطاقة في بلدان افريقيا، اسيا وامريكا اللاتينية وهو بديل جيد للبروتين الحيواني والاسماك (8). إذ تحتوي بذور الباقلاء على البروتين، النشا، السليولوز، الفيتامينات والمعادن (9، 10).

تتراوح كمية البروتين في الباقلاء بين 30-40% وهذه النسبة اكثر مما تحتويه الحبوب بمرتتين، ويحتوي بروتين الباقلاء على الاحماض الامينية الاساسية التي لا يستطيع جسم الانسان تصنيعها (11).

وبالنظر لعدم وجود دراسات عن تأثير عائيات بكتريا الرايزوبيوم فقد هدف البحث الى دراسة تأثير عائي الرايزوبيوم في بعض معايير النمو كاطوال النبات، عدد العقد الجذرية، الوزن الطري والجاف للعقد الجذرية، الوزن الطري والوزن الجاف للنبات، مقدار الكلوروفيل الكلي وحساب نسبة النتروجين والبروتين وباستعمال عزلات محلية من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* الحساسة والمقاومة للعائي.

المواد وطرق العمل

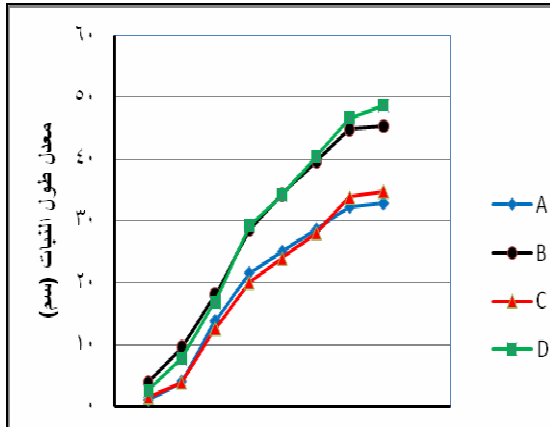
العزلات البكتيرية والعائي:

استعملت عزلتان محليتان من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* عزلت من العقد الجذرية لنبات الباقلاء احدهما حساسة للعائي (RL5) والاخرى مقاومة للعائي (RL6) واستعمل عائي البكتريا (SA) المعزول من العقد الجذرية لنبات الباقلاء من قبل (جاسم وآخرون) (12).

النبات العائل المستعمل:

استعملت بذور نبات الباقلاء (*Vicia faba* L.) التي تم الحصول عليها من الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور/ وزارة الزراعة.

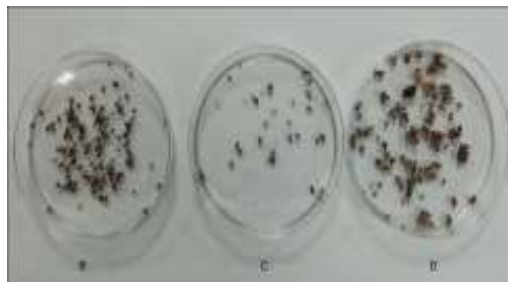
النبات مقارنة بالمعاملتين A و C (شكل 2)، ويعود ذلك الى تأثير عائي SA في اعداد بكتريا الرايزوبيوم RL5 الحساسة له في المعاملة C والذي احدث انخفاض في اعدادها مما تسبب في قصر النبات مقارنة بالمعاملة D التي لم تتأثر.



الشكل (2): معدل اطوال النبات مقاسة بالسنتيمتر

وقد حققت المعاملة D اقصى طول للنبات (48.7) سم تلتها المعاملة B بطول (45.3) سم في حين كان معدل الطول (32.9) سم للمعاملة A والمعاملة C بمعدل (34.7) سم ، تمايزت المعاملتين D و B في اطوال النبات مقارنة بالمعاملتين A و C ويعود ذلك الى تأثير عائي SA في اعداد بكتريا الرايزوبيوم RL5 الحساسة له في المعاملة C والذي احدث في انخفاض اعدادها مما تسبب في قصر النبات مقارنة بالمعاملة D التي لم تتأثر .
بخصوص معدل عدد العقد كان اقصاه 120 عقدة في المعاملة B وتلتها المعاملة 113 عقدة في D في حين ادنى عدد كان في المعاملة C وبواقع 50 عقدة وبينت المعاملة A خلوها من اي عقدة جذرية.

ان قلة عدد العقد الجذرية في المعاملة C يعود الى انخفاض اعداد بكتريا RL5 بسبب تحللها من قبل العائي SA في حين لم تتأثر البكتريا RL5 و RL6 في المعاملتين D و B مما ادى الى ارتفاع في عدد العقد كما لوحظ بان حجم العقد في المعاملة B كان اصغر من حجم العقد في المعاملة D (شكل 2)، ويظهر الجدول (2) ان معدل الاوزان الطرية للعقد اختلفت معنوياً ($P < 0.05$) باختلاف المعاملات وقد بلغ معدل الاوزان الطرية 0.5892 و 0.1723 و 1.367 غرام للعقد الجذرية للمعاملات B , C , D على التوالي اي هنالك تمايز للمعاملة D وهذا يعود الى حجم العقد الجذرية المتكونة من البكتريا RL6 التي تمايزت بكون حجمها والذي انعكس ايضا في معدل الاوزان الجافة للعقد التي تأثرت معنوياً بالمعاملات المدروسة وقد بلغ معدل الاوزان الجافة للعقد الجذرية (0.0952 ، 0.0289 ، 0.2556) غرام للمعاملات D , B , C جدول (2) (24).



الشكل (2): اختلاف حجم العقد الجذرية للمعاملات B , C , D. يلاحظ كبر حجم العقد في المعاملة D مقارنة بالمعاملتين B و C (x5) (قطر الطبق 9 سم).

معاملة B = بذور الباقلاء + بكتريا الرايزوبيوم الحساسة للعائي (RL5).

معاملة C = بذور الباقلاء + بكتريا الرايزوبيوم الحساسة للعائي (RL5) + عائي الرايزوبيوم .

معاملة D = بذور الباقلاء + بكتريا الرايزوبيوم المقاومة للعائي (RL6) + عائي الرايزوبيوم .

تم تنمية العزلات البكتيرية الحساسة والمقاومة للعائي حتى تصل الى الطور اللوغارتمي وبمعيار 10^{10} CFU/ml .

مزجت كميات متساوية من البكتريا والعائي وبمعيار 10^{10} PFU/ml بحسب (17)، وفي المعاملتين C و D فقط، ترك المزيج لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة قبل اجراء عملية تلقح البذور، اذ تم اضافة 20 مليلتر من كل معاملة الى 100 غرام من السماد (بنموس) المعقم وبحسب تصميم المعاملات السابقة ولوثت بذور الباقلاء لكل معاملة بالبنموس وتركت مدة نصف ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم تم زراعة اربع بذور لكل أصيص وبعد انبات البذور تم الابقاء على بادرة واحدة لكل أصيص.

ظروف نمو النبات:

وضعت الاصص في البيت البلاستيكي، زرعت البذور بتاريخ 2013/1/10 وكانت درجة الحرارة 25-28 م وساعات الاضاءة من (11 - 13) ساعة، وتم متابعة النبات لأجراء عمليات السقي كل 48 ساعة بـ 200 مليلتر ماء مقطر (ربع السعة الحقلية للتربة) وحصدت بعد مرور شهرين من زراعتها .

تقدير اطوال النبات:

تم قياس اطوال النبات اسبوعياً لكل معاملة من المعاملات خلال مدة النمو البالغة 8 اسابيع.

حساب عدد العقد الجذرية وتقدير اوزانها الطرية والجافة:

تم حساب عدد العقد الجذرية للمعاملات B و C و D وتم تقدير الوزن الطري للعقد الجذرية وتقدير الوزن الجاف بعد وضعها في فرن حراري بدرجة حرارة 60 م مدة 48 ساعة (18).

تقدير نسبة الكلوروفيل الكلي في النبات:

تم تقدير نسبة الكلوروفيل الكلي للنبات في كل معاملة بحسب طريقة (19) باستعمال الاسيتون بتركيز 80% وتم حساب تركيز الكلوروفيل الكلي وفقاً للمعادلة الاتية:

$$\text{الكلوروفيل الكلي} = \text{مقدراً ملغم/غرام وزن طري} = (A660 \times 7.12) + (A642.5 \times 6.18) \times 0.25 \times 100/1000$$

تقدير نسبة النتروجين والبروتين في النبات:

بعد ان حصد النبات وجفف تم طحن الجزء الخضري لكل نبتة بصورة جيدة (20) قدرت نسبة النتروجين حسب طريقة كدال (21) و قدرت نسبة البروتين بضرب نسبة النتروجين في 6.25 (22).

التحليل الاحصائي:

استعمل البرنامج Statistical analysis system (23) في التحليل الاحصائي للبيانات لدراسة تأثير المعاملات المدروسة في الصفات المختلفة وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD).

النتائج والمناقشة

بينت النتائج ان هنالك تبايناً معنوياً ($P < 0.05$) في معدل اطوال النباتات باختلاف المعاملات المدروسة ، اذ حققت المعاملة D اقصى طول للنبات (48.7) سم تلتها المعاملة B بطول (45.3) سم في حين كان معدل الطول (32.9) سم للمعاملة A والمعاملة C بمعدل (34.7) سم ، تمايزت المعاملتين D و B في اطوال

الجدول (2): معدل الأعداد والأوزان الطرية والجافة للعقد الجذرية

معدل الأوزان الجافة للعقد (غرام)	معدل الأوزان الطرية للعقد (غرام)	معدل عدد العقد	المعاملات
—	—	صفر	A
b 0.0952	b 0.5892	a 120.0	B
b 0.0289	b 0.1723	b 50.0	C
a 0.2556	a 1.367	a 113.0	D
* 0.088	* 0.571	* 18.92	قيمة أ.ف.م (LSD)
المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها. * (P<0.05).			



الشكل (3): المجموع الخضري والجذري لنبات الباقلاء للمعاملات D , C , B , A

بلغ معدل الأوزان الجافة للمجموع الخضري 0.97 و 4.25 و 1.23 و 3.86 غرام للمعاملات A , B , C , D على التوالي (جدول 4) ، أما فيما يخص معدل الأوزان الجافة للمجموع الجذري فقد بلغ أقصى وزن 6.01 غرام للمعاملة B ومن ثم 5.14 غرام للمعاملة D بينما كانت أدنى من ذلك في المعاملة A 3.47 غرام و المعاملة C 2.03 غرام وان تأثير المعاملات المدروسة في كلتا الصفتين معنوياً (P<0.05) (جدول 4) ويعود الفروقات المعنوية في معدل الأوزان الطرية والجافة للمجموع الخضري والجذري للمعاملات إلى تأثير عائلي SA في المعاملة C وغياب هذا التأثير في المعاملتين B و D وذلك من خلال تأثير العائلي في بكتريا الرايزوبيوم وتكوين العقد الجذرية التي تنعكس سلباً على أوزان الجزء الخضري والجذري للنبات.

الجدول (4): معدل الأوزان الجافة (غرام) للمجموع الخضري والجذري

معدل الأوزان الجافة للمجموع الجذري	معدل الأوزان الجافة للمجموع الخضري	المعاملات
b 3.47	b 0.97	A
a 6.01	a 4.25	B
b 2.03	b 1.23	C
a 5.14	a 3.86	D
* 2.08	* 1.16	قيمة أ.ف.م (LSD)
المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها. * (P<0.05).		

معدل الأوزان الطرية للمجموع الخضري والجذري:

أظهرت نتائج معدل الأوزان الطرية للمجموع الخضري للنبات تأثير معنوياً (P<0.05) باختلاف المعاملات المدروسة كما هو موضح في الجدول (3) ، إذ حققت المعاملة B أقصى وزن (32.54 غرام) ومن ثم المعاملة Δ (27.99 غرام) في حين كان معدل الوزن الطري للمجموع الخضري أدنى من ذلك في المعاملتين A (7.18 غرام) و X (9.92 غرام) ويعود ذلك إلى تأثير العائلي SA في المعاملة X مقارنة بالمعاملتين Δ و B اللتين لم تتأثرا بالعائلي.

وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان هنالك فروقات معنوية (P<0.05) في معدل الأوزان الطرية للمجموع الجذري وقد تمايزت المعاملة B (50.96 غرام) و المعاملة D (45.47 غرام) في حين كانت أدنى أوزان طرية للمجموع الجذري قد سجلت في المعاملتين A و C وواقع 20.78 و 22.79 غرام على التوالي (جدول 3) و(شكل 3).

الجدول (3) : معدل الأوزان الطرية (غرام) للمجموع الخضري والجذري

معدل الأوزان الطرية للمجموع الجذري	معدل الأوزان الطرية للمجموع الخضري	المعاملات
b 20.78	b 7.18	A
a 50.96	a 32.54	B
b 22.79	b 9.92	C
a 45.47	a 27.99	D
* 8.15	* 6.37	قيمة أ.ف.م (LSD)
المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها. * (P<0.05).		

يتبين من النتائج السابقة ان العاثي SA يؤثر سلباً في نمو نبات الباقلاء من خلال تأثيره في اطوال النبات ، اعداد العقد الجذرية ، الاوزان الطرية والجافة للعقد ، الاوزان الطرية والجافة للنبات ، كمية الكلوروفيل الكلي والنسبة المئوية للبروتين وتتفق النتائج مع ما توصل اليه الباحثان (Hashem and Angle) (18) في الولايات المتحدة الامريكية عند دراسة تأثير العاثي USDA117 في بكتريا *Bradyrhizopium japonicum* USDA117 الحساسة للعاثي وبكتريا *Bradyrhizopium japonicum* USDA110 المقاومة للعاثي على تكوين العقد وتثبيت النترجين ونمو وانتاج نبات فول الصويا (Soy bean) لاحظ الباحثان ان هنالك فروقات معنوية للعاثي في عدد العقد الجذرية واوزانها والاوزان الخضرية ونسبة النترجين وانتاج البذور عند مزج العاثي مع البكتريا الحساسة ومثل هذه التأثيرات لم تلاحظ عند استعمال البكتريا المقاومة للعاثي.

تتفق النتائج التي تم التوصل اليها مع الدراسة التي قام بها الباحثان (Ahmed and Morgan) (17) والتي تم فيها دراسة تأثير عاثي JRW3 المعزول من التربة في جامايكا وباستعمال بكتريا *Bradyrhizobium sp.* strain JRW 3 الحساسة للعاثي على تكوين العقد الجذرية ونمو نبات اللوبياء. بينت نتائج الدراسة ان العاثي JRW3 يؤثر بصورة معنوية في تقليل عدد العقد الجذرية والوزن الجاف للجزء الخضرية لنبات اللوبياء.

وتتفق النتائج ايضاً مع ما توصل اليه الباحثان (Appunu and Dhar) (24) في الهند عند دراسة تأثير عاثيات الرايزوبيوم في نبات فول الصويا باستعمال بكتريا JS335 *Bradyrhizobium* حيث وجد ان هناك فروقات معنوية للعاثي في عدد العقد الجذرية والوزن الجاف للعقد والوزن الجاف للنبات ونسبة النترجين.

المصادر

1. Mohammad J.; Mehdipour M.; Majid B. and Giti E. (2008). Isolation and identification of *Rhizobium* bacteriophages in Guilan and Isfahan provinces. Iran. Res. J. Biol. Sci. 3(9):1097-1101.
2. Sahasrabude MM. (2011). Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Annal. Biol. Res. 2 (4):460-468.
3. Mohammadi K.; Sohrabi Y.; Heidari G.; Khaledro S. and Majidi M. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. Afr. J. Agr. Res. 7 (12):1782-1788.
4. Appunu C. and Dhar B. (2006). Existence and characteristics of rhizobiophages in soybean grown fields in India. Asian J. Plant. Sci. 5(5):818-821.
5. Basit HA.; Angle JS.; Salem S. and Gewaily EM. (1992). Phage coating of soybean seed reduces nodulation by indigenous soil *bradyrhizobia*. Can. J. Microbiol. 38:1264-1269.
6. FAO. (2009). FAOSTAT data, 2009 – last updated 20 December, 2008. Food and Agriculture Organization, Rome.
7. Torres AM.; Roman B.; Avila CM.; Satovic Z.; Rubiales D.; Sillero JC.; Cubero JI. and Moreno MT. (2006). Faba bean breeding for resistance against biotic stresses. Towards application of marker technology. Euphytica. 147:67-80.
8. Ibrahim ME.; Bekheta MA.; El-Moursi A. and Gaafar NA. (2007). Improvement of Growth and Seed Yield Quality of *Vicia faba* L. Plants as Affected by Application of Some Bioregulators. Aust. J. Bas. Appl. 7(2): 201-209.
9. Daur I. and Sepetoglu H. (2012). Changes in Conserved Field Conditions by Growing Faba bean

أما بخصوص معدل الكلوروفيل الكلي فوجد هنالك فروقات معنوية ($P<0.05$) اذ حققت المعاملة D اقصى معدل للكلوروفيل بلغ 0.863 ملغرام / غرام تلتها المعاملة B وبواقع 0.801 ملغرام / غرام وسجلت المعاملة C معدل كلوروفيل بلغ 0.650 ملغرام / غرام بينما كان اقل معدل للكلوروفيل في المعاملة A 0.255 ملغرام / غرام . جدول (5).

ان انخفاض معدل الكلوروفيل في المعاملة C مقارنة بالمعاملتين B و D يعود الى تأثير العاثي SA في اعداد بكتريا RL5 الحساسة للعاثي والذي بدوره ادى الى انخفاض عدد العقد الجذرية ومن ثم كمية النترجين المثبتة ومن المعروف ان الكلوروفيل يحتاج الى اربع ذرات من النترجين في تركيبه وقد لوحظ اصفرار في الأوراق للمعاملتين C و A مقارنة بالمعاملتين D و B اللتين كانت فيهما الأوراق أكثر اخضراراً .

الجدول (5): تأثير المعاملات المدروسة في معدل الكلوروفيل الكلي (ملغرام/غرام)

المعاملات	معدل الكلوروفيل الكلي (ملغرام/غرام)
A	b 0.255
B	a 0.801
C	a 0.650
D	a 0.863
قيمة أ.ف.م (LSD)	* 0.297
المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها. ($P<0.05$) *	

يتضح من حساب النسبة المئوية للبروتين ان هنالك فروقات معنوية ($P<0.05$) وقد حققت المعاملة D اقصى نسبة للبروتين 14.83% تلتها المعاملة B 14.41% بينما سجلت المعاملة C نسبة بروتين بلغت 13% اما ادنى نسبة والبالغة 10.14% فقد سجلت في المعاملة A . جدول (6).

ان الاختلاف في نسب البروتين يعود الى الاختلاف في نسبة النترجين المثبتة من بكتريا الرايزوبيوم RL5 ، RL6 ، للمعاملتين B و D وتأثير عاثي SA الذي سبب انخفاضاً في العقد الجذرية في المعاملة C ومن ثم ادى الى انخفاض في نسبة النترجين ومن ثم البروتين.

الجدول (6): تأثير المعاملات المدروسة في النسبة المئوية للبروتين

المعاملات	النسبة المئوية للبروتين
A	b 10.14
B	a 14.41
C	a 13.00
D	a 14.83
قيمة أ.ف.م (LSD)	* 2.09
المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً فيما بينها. ($P<0.05$) *	

- (*Vicia faba* L.) during two varied meteorological years. Pak. J. Bot. 44:239-243.
10. Hamilton D. (2005). Broad bean. Available from [http:// www. Selfsufficientdsh.com](http://www.Selfsufficientdsh.com).
11. ARSO. (2012). Faba beans-Specification. Reference No. ARS 873:2012(E) ICS 67 .060.
12. جاسم ، سندس علي، الموسوي ، علي هاشم، عباس، أمير خضير. (2013). توصيف عائي الرايزوبيوم المعزول من العقد الجذرية لنبات الباقلاء. المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا. 8 (2):98-104.
13. Vincent JM. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria .I.B.P. Handbook No.15. Blackwell Scientific Publication Ltd. Oxford.
14. حسين ، عباس جاسم ، المولى ، نهلة مهدي ، القيسي ، وفاق امجد . (2003) . تأثير مستويات مختلفة من البيكاربونات في النمو ومحتوى عنصر الحديد لأربعة أصناف من الحنطة . مجلة جامعة كربلاء، 1 (2) : 67 .
15. Sinegani AAS. and Hosseinpour A. (2010). Evaluation of effect of different sterilization methods on soil biomass phosphorus extracted with NaHCO₃. Plant. Soil. Environ. 56 (4):156-162.
16. البرهاوي ، نجوى ابراهيم ،الكاتب ، مراد اسامة ، الصفار ، فوز عبدالسلام . (2010). تأثير مستخلص كالس نبات السذاب على نمو بكتريا *Sinorhizobium meliloti* وعلاقتها التعايشية مع نبات الجت *Medicago sativa* . مجلة علوم الرافدين، 21 (4) : 78-86 .
17. Ahmad MH. and Morgan V. (1994). Characterization of a cowpea (*Vigna unguiculata*) rhizobiophage and its effects on cowpea nodulation and growth. Biol. Fertil. Soil. 18:297-301.
18. Hashem FM. and Angle JS. (1990). Rhizobiophage effects on nodulation, nitrogen fixation, and yield of field-grown soybeans (*Glycine max* L. Merr.). Biol. Fertil. Soil. 9:330-334
19. Al-Temimi HN. (2013). Screening of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes for drought tolerance under field conditions. Master Thesis, College of science, University of Baghdad.
- 20- Gresser MS. and Parson JW. (1979). Sulphuric perchloric acid digestion of plant material for the determination of Nitrogen , Phosphorus , Calcium and Magnesium. Anal. Chem. Acat. 109:431-436.
21. Chapman HD. and Pratt FP. (1961). Methods of analysis for soils, Plant and Water. Univ. Calif. Dir. Agr. Sci. Sciences. 1 (4):657-666.
22. Schaffelen AGA. and Vanschawenbury JCH. (1960). Quick testes for soil and plant analysis used by small laboratories. Neth. J. Agr. Sci. 9:2-16.
23. SAS. (2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
24. Appunu C. and Dhar B. (2006). Existence and characteristics of rhizobiophages in soybean grown fields in India. Asian J. Plant Sci. 5(5):818-821.

تقييم النوعية الميكروبية والكيميائية للشرايت والعصائر الأكثر استهلاكاً في بغداد

مريم مال الله غزال، علياء سعد الحافظ

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

الملخص باللغة العربية

من خلال استمارات استبانة تم التعرف على نوع العصير والشرايت الأكثر استهلاكاً من قبل 2500 عائلة عراقية في محافظة بغداد. أخذت عينات من العصائر بواقع ثلاثة نماذج لكل صنف من السوق وصنفت على وفق ما جاء في المواصفة القياسية العراقية 2001 وأجريت عليها الفحوصات الميكروبية والتحليل الكيميائية. والمتضمنة طريقة الزرع بالأطباق (APC) والكشف عن بكتريا القولون Coliforms وعد الخمائر والأعفان Mold & Yeasts ومقارنة النتائج مع الحدود الميكروبية الواردة في المواصفة القياسية العراقية. وشملت الفحوصات الكيميائية تقدير العناصر (الزرنخ As، الرصاص Pb، النحاس Cu، الخارصين Zn، الحديد Fe، القصدير Sn، السليكون Si). باستخدام جهاز الامتصاص الذري Atomic Absorption /flame Emission Spectrophotometer. ظهر من النتائج إن الأنواع ميزو وتانك بالنسبة للعصائر الطبيعية، وداليا والشمس ودارينا للعصائر الصناعية جاءت مطابقة للمواصفة القياسية العراقية في حين بقية الأنواع كانت بعيدة عن المواصفة لكنها تعتبر مقبولة.

إن تعرض العصائر والشرايت لأنواع من التلف البكتريولوجي بفعل الخمائر والفطريات والتي تعمل على تخميره وزيادة الحموضة فيه بفعل بعض أنواع البكتريا مكسبة لآه صفات غير مرغوبة فضلاً عن تعرضه للتلف الكيميائي بفعل الانزيمات المؤكسدة والمحللة، أو تفاعل مكوناته مع العبوات التي تحفظه وتلوثه ببعض العناصر الملوثة يجعله غير صالح، الأمر الذي يحتم على المستهلك اختيار النماذج والنوعيات ذات السمعة الجيدة تصنيعاً وتقبلاً وإن يتم الاقتناء من الأماكن المعروفة بطرق الحفظ الصحيح للمنتجات الغذائية.

الكلمات المفتاحية: المواصفة القياسية العراقية 2001، طريقة الزرع بالأطباق (APC)

Assessment the microbial and chemical quality for natural juices and industrial that most consumed in

Maryam M. Ghazal and Alia S. A.R. Al-Hafud

Dept. of Home Economics/College of Education for Women/Baghdad University/ Republic of Iraq

ABSTRACT

By applying questionnaire forms, the type of natural juices and industrial, that most consumed by the 2500 Iraqi family in Baghdad were identified. Three samples of juices for each type in market were sampled and classified according to Iraqi standard 2001, made the microbial and chemical analysis, involved the implant dishes method (APC) and the detection of Coliforms, Count Mold & Yeasts. Compare the results with the limits of microbial contained in the standard specification of Iraq. Chemical tests Included estimate the elements (As, Pb, Cu, Zn, Fe, Sn, Si), Use Atomic Absorption /flame Emission Spectro- photometer. Appeared from the results that the sample Mizo and Tank for natural juices, and Dalia, Sun and Darina of industrial juices were identical to the standard Iraqi while the rest of the samples were far from standard but they are acceptable.

Exposure of juices types to damage was due to bacteriological yeasts and fungi, which work to increase the acidity and fermented it by some types of bacteria profitable undesirable qualities as well as exposure to chemical damage by oxidative enzymes and analyzed, Or interaction with components of packages and reservations contamination contaminated with some elements makes it invalid, which makes it imperative for the consumer to choose the samples and brands with a good reputation industrialized and receptive and that is the acquisition of well-known places in ways that proper conservation of food products.

المقدمة

المواد وطرق العمل

وزعت استمارات استبانة على 2500 عائلة عراقية في محافظة بغداد بواقع (1250) لجانبي الكرخ والرصافة ، وتضمنت الاستمارة نوع العصير والشرب الأكثر استهلاكاً من قبل العائلة ، وبعد فرز الأجابات تم اقتناء تلك الأنواع وشراءها من السوق المحلي للعام 2013 وصنفت الأنواع على وفق ما جاء في الموصفة العراقية 2001 وكما يلي:

- 1- شربت الفاكهة والذي يسوق بشكل معد للأستهلاك المباشر أو مركز يستهلك بعد تخفيفه في الماء
 - 2- الشربت الصناعي ويسوق على شكل شربت معد للأستهلاك المباشر أو يستهلك بعد التخفيف في الماء ويكون على نوعين:
 - أ- مسحوق الشربت المحلي أو الغير محلي .
 - ب - عصير وشراب الفواكه التي تخفف عند الشرب أو تشرب دون تخفيف كعصائر مختلف أنواع الفاكهة.(7)
- وقد أخذت عينات البحث من العصائر بواقع ثلاثة نماذج لكل صنف والتي سجلت أعلى تكرار . (الجدول 1).
- بعد ذلك أخذت النماذج السابقة وأجريت عليها الفحوصات الميكروبية والتحاليل الكيميائية وتمثلت بالجدولين (2)، (3).

الجدول (1): أنواع العصائر والشرايب الشائعة الاستهلاك في عينات البحث

الناحية	عصائر الفاكهة الطبيعية		الشرايب الصناعية	
	سائلة	مجففة	معدة للشرايب	مركزة تخفف بالماء
الكرخ	ميزو / راني / سانكوك	تانك / ليفانس / التونسا	داليا / أوليفر / الواحة / اورجنال	الشمس / توب ريف
الرصافة	ميزو / راني	تانك / التونسا	اورجنال / داليا / الواحة	توب ريف

أجريت الفحوص الميكروبية كما ورد في الموصفة القياسية العراقية (8) وتضمنت طريقة الزرع بالاطباق (APC) والكشف عن بكتريا القولون Coliforms وعد الخمائر والأعفن Mold & Yeasts ومقارنة النتائج مع الحدود الميكروبية الواردة في الموصفة. (جدول 2).

أما الفحوصات الخاصة بالتحاليل الكيميائية والمتمثلة بحساب العناصر (الزرنخ As، الرصاص Pb، النحاس Cu، الخارصين Zn، الحديد Fe، القصدير Sn، السليكون Si) الجدول 3. وكان العمل باستخدام جهاز الأمتصاص الذري اللهب Atomic Absorption / flame Emission Spectro- photometer ياباني المنشأ موديل 1990 ويستعمل لقياس العناصر ذات التراكيز القليلة الموجودة في المياه والأغذية وكذلك الدم ومصل الدم والطين حيث يتحسس الجهاز للتراكيز التي هي أقل من 2ppm وحتى 0.01ppm حيث تحقق كمية بين (10⁻⁶ - 50⁻⁶) داخل القرن الموجود داخل الحاضنة الرقم الذي يظهر على شاشة الحاسبة يمثل الأمتصاص ABS.

المشروبات منتوجات تؤخذ من قبل المستهلك أما كمصدر لبعض المواد الغذائية كعصير الفواكه لما تحتويه من أحماض عضوية وسكريات وأملاح معدنية ضرورية ، فالعصير هو السائل الطبيعي الناتج من عصر ثمار الفاكهة الخالي من البذور والقشور والالياف الخشنة والمحتظة بأكبر قدر من صفات وخواص الثمار الطازجة ، وشراب الفاكهة الطبيعي Natural Fruit Syrup سائل لزج يحتوي على (10-30%) عصير فاكهة مركز حتى 60% مواد صلبة ذائبة كلية (بالتجميد أو الحرارة أو الاسموزية العكسية Reverse Osmosis ومضاف إليه سكر وحامض ستريك ومواد منكهة ومواد ملونة ومادة حافظة (بنزويك أو ثاني أوكسيد الكبريت) حتى درجة تركيز تتراوح من 65-68% وتتراوح النسبة بين الحامض والسكر : 12-25 ويخفف عادة بالماء قبل استهلاكه (1-3).

أما الشرب فهو تعبير يطلق في العراق على خليط متجانس من عصير الفاكهة والسكر ويتميز بلزوجة عالية لأحتوائه على نسبة مرتفعة من المواد الصلبة الذائبة تصل الى 65-68%، ويتكون من الماء ، السكر ، الحامض ، مادة حافظة ، مواد نكهة ، مواد ملونة ومعبأ في قناني زجاجية أو بلاستيكية ، أو يستعمل الشربت بعد تخفيفه بالماء وهناك العديد من الأنواع التجارية للشرايب بعضها رائق وبعضها معتم ، ويباع تحت أسماء تجارية عديدة بعضها محلي ، وبعضها مستورد وأكثرها شيوعاً هو شربت البرتقال والليمون .(3،4)

إن الهدف من استهلاك المشروبات Beverages كونها مواد منعشة لإرواء الضمأ ولطعمها الخاص، ويكثر استهلاكها بعد الإفطار مباشرة في شهر رمضان الكريم ، وكثرة إستيراد وتصنيع أنواع عديدة منها ، ولما لها من أهمية تغذوية يجب تثبيت حدود مايكروبية لها حفاظاً على صحة وسلامة المستهلك وضمان نوعية أجود ، وقد حددت الموصفة العراقية للعام 2001 المتطلبات العامة للشربت بأنواعها ومساحيق الشرايب الصناعية المعدة للإستهلاك البشري .(5،6)

وتصنف العصائر على الاسس الآتية:(7)

- 1- المواد الخام الداخلة : فاكهة أو خضر .
- 2- المادة الخام مع أنسجتها (عصير نسيجي Nectar) أو بدونها.
- 3- إضافة السكر أو بدون .
- 4- النوع الواحد (الصنف الواحد) من الفاكهة أو الخضر ، أو عصير لعدد من الفواكه.
- 5- طريقة الحفظ (البسترة ، التعليب ، مواد حافظة) .
- 6- ثبات نوعية العصير: درجة أولى أو ثانية .
- 7- أما مواد النكهة والرائحة فتصنف وتنقسم إلى أربع مجاميع :
 - 1- متخصصة أو مواد نكهة جوهريّة أو مصنعة : وهي مواد لها خاصية لنوع الفاكهة مثلاً مثل أثير لتمثيل حامض البروبيونك وكمية 1 ملغم/ كغم يعطي نكهة الأناناس .
 - 2- غير متخصصة : نكهة معبرة : وهي مواد تحتوي على نكهة بدون أن تؤثر على العصير ، وهي صعبة الطيران وكذلك الإذابة بالماء وليست لها رائحة قوية ومن هذه أسيتل الديهايد .
 - 3- مواد متعادلة النكهة : وتحمل صفة نكهة الفاكهة والمثال عليها أثيل الكحول .

4- مواد غير مرغوبة غير محبذة أو رديئة) : وهذه تؤدي دور غير محبذ في العصير والمثال عليها داي أسيتيت. وتعد عملية إنتخاب الفاكهة من أهم العوامل في صناعة العصير ويجب أن تتصف وتتميز بالنضج الكامل والتي يمكن معرفتها من صفات وخواص الفاكهة مثل اللون ، نسبة الحموضة ، أو من علاقة نسبة السكر للحامض ، كذلك يستدل من الصفات الفيزيائية للثمرة كصلابة الثمرة ، وتفضل لصناعة العصير أصناف الفواكه الغنية بالفيتامينات ومواد النكهة واللون، الخالية من أي تلف ميكانيكي أو كيميائي أو مايكروبي .(7) .

هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على أكثر أنواع الشرايب والعصائر استهلاكاً من قبل العوائل العراقية في بغداد ، والتحري عن خصائصها الميكروبية والصحية ومدى مطابقتها للموصفة القياسية العراقية، لتسليط الضوء على هذا الجانب وضمان السلامة الغذائية .

الجدول (2): الفحوصات الميكروبية لعينات البحث

العينات الفحوصات	العناصر الطبيعية		العناصر الصناعية	
	سائلة	مجففة	معدة للشراب	مركزة تخفف بالماء
	ميزو / راني / سان كويك	تاتك / ليقانس / التونسا	داليا / اورجنال / الواحة	الشمس / توب ريف
العدد الاحتمالي لليكتريا القولونية / 100 مل	$10^9/10^1$ $10^8/$	$10^1/10^4$ $10^3/$	$10^3/10^2$ $10^9/$	$10^4/10^1$ 10^3
الخمائر والأعفان مستعمرة / مل	* سالب / 10^1 $10^2/$	$10^1/10^1$ $10^7/$	سالب / 10^7 $10^5/$	$10^5/10^2$ سالب

* لا يوجد نمو

الجدول (3): التحليل الكيمائي لنماذج العناصر والشراب في عينات البحث

العناصر PPB	العناصر الطبيعية		الشراب الصناعية	
	سائلة	مجففة	معدة للشراب	مركزة تخفف بالماء
	ميزو / راني / سان كويك	تاتك / ليقانس / التونسا	داليا / اورجنال / الواحة	الشمس / توب ريف
AS	Nil**	Nil	Nil	Nil
Pb	0,002 / 0,002 / 0.0001	0,0002 / 0,0002 / 0.0001	0,0002 / 0,0001 0,0002	0,0002 / 0,0001
Cu	0,24 / 0,32 / 0,22	0,42 / 0,42 / 0,3	0,24 / 0,22 / 0,22	0,33 / 0,32
Zn	1,14 / 0,9 / 0,4	2,81 / 0,1 / 0,98	1,45 / 1,14 / 0,44	2,15 / 2,86
Fe	5,21 / 9,54 / 13,45	4,15 / 5,44 / 9,54	7,31 / 6,42 / 8,45	4,15 / 7,44
Sn	Nil	Nil	Nil	Nil
Si	Nil	Nil	Nil	Nil

* PPB جزء بالليون

** كميات ضئيلة

الجيدة بحدود ميكروبية (10^5) وبينت أن النوع المقبول هو بحدود ميكروبية (10^4).

وحصلت نماذج الشرايت الصناعية المعدة للشراب (داليا) والمركزة التي تخفف في الماء (الشمس) والشراب بشكل مسحوق (دارينا) على أفضل نتيجة على وفق ما جاء في الموصافة السابقة حيث بلغت 10^2 و 10^1 و 10^3 مستعمرة/مل على التوالي.

أما فحوصات الخمائر والأعفان فقد سجلت نفس النماذج أفضل نتيجة على وفق ما جاء في الجدول الخاص بالحدود المايكروبية ونوع الفحوصات للعناصر والشراب والتي لم يلاحظ أي نمو في نماذج (ميزو وداليا ودارينا) في حين نموذج تاتك بلغ 10^1 مستعمرة/مل والشمس 10^2 مستعمرة/مل. والتي تشير فيه الموصافة القياسية (6) أن النوع الجيد تبلغ حدوده الميكروبية للخمائر والأعفان 10^1 والنوعية المقبولة بحدود ميكروبية 10^1 .

نتائج الجدول (3) توضح نسب العناصر الملوثة والتي تتمثل بعنصر الزرنيخ والرصاص والنحاس والخرصين والحديد والقصدير والسليكون. وبالمقارنة نجد أن نموذج العناصر السائلة (ميزو) سجل (Nil / Nil / 13,45 / 0,4 / 0,22 / 0,0001 / Nil) لعناصر الزرنيخ والرصاص والنحاس والخرصين والحديد والقصدير والسليكون على التوالي.

ويتفق ذلك مع ما ذكر في الموصافة العراقية (6) والتي تشير إلى الحد الأقصى المسموح به من تلك العناصر ملغم / كغم : الزرنيخ $0,3$ / الرصاص $0,3$ / النحاس 5 / الخرصين 5 / الحديد 15 / القصدير 150 . وبالنسبة للنماذج المجففة من العناصر فقد كانت أفضل نتيجة لنوع (تاتك) مسجلا نسب بلغت (الزرنيخ Nil / الرصاص $0,0001$ / النحاس $0,3$ / الخرصين $0,98$ / الحديد $9,54$ / القصدير Nil / السليكون Nil PPB).

بعد أن يتم حقن الـ St المعلوم التركيز وأخذ الأمصاصية له ، وحقن النموذج مجهول التركيز وأخذ الأمصاصية له نستخدم المعادلة التالية :

$$\text{تركيز الـ St} \times \text{امتصاصية النموذج ABS} = \text{تركيز النموذج امتصاصية الـ St}$$

ومن أجل التعرف على محتوى النماذج من فيتامين C فقد أستخدم جهاز Shimadzu l-c-2010ATH بمعدل جريان Flow rate=1.5ml/min وطول موجي = 254 nm وطور ناقل Inj10μ= 60% Acetonitril و 40% Methanol حجم الحقن C18(250*4.6mm)5microon (العمود) وكذلك قياس الـ pH للعينات .

النتائج والمناقشة

من خلال النتائج في الجدول (2) والتي تتمثل بالحدود الميكروبية ليكتريا القولون والخاصة بالفحص بالعد بطريقة الزرع بالأطباق (APC) يتضح من خلالها أن أفضل نتيجة كانت لعينة العناصر الطبيعية السائلة (ميزو) والتي بلغت 10^1 مستعمرة/100مل، أما النوع المجفف فقد حصلت نوعية (تاتك) على أفضل نتيجة والبالغة 10^1 مستعمرة/100مل.

وهذا يتطابق مع ما جاء في الموصافة العراقية بالرقم 2270 / 6 والخاصة بالحدود الميكروبية في الأغذية للمشروبات الغذائية الجزء السادس للعام 2007 (9) إذ تشير تلك الموصافة أن النوعية

الاستنتاجات والتوصيات

ظهر أن أفضل المنتجات من ناحية مطابقتها للمواصفة القياسية كانت ميزو وتانك بالنسبة للعناصر الطبيعية، وداليا والشمس ودارينا للعناصر الصناعية من حيث الفحوصات الميكروبية والعناصر الملوث، في حين بقية الأنواع كانت بعيدة عن المواصفة لكنها تعتبر ضمن الحدود المقبولة.

على ضوء الدراسة نوصي بما يلي:

- 1- إجراء مسح ميداني لأنواع العناصر والشراب ومحتواها من المواد الحافظة والملونة.
- 2- نوعية المستهلك بفوائد تحضير العصير الطبيعي مباشرة من الفاكهة الطازجة لأنه أفضل من الناحية الميكروبية والقيمة الغذائية بدلا من الاعتماد على المنتجات الجاهزة.

المصادر

1. المواصفة القياسية العراقية رقم 1258 (2001). الشراب المعدة للاستهلاك البشري، التحديث الأول: الجهاز المركزي للتحقيق والسيطرة النوعية، العراق.
2. البيلائي، شمعون كوركيس صانو (1988). السيطرة النوعية والمواصفات القياسية للاغذية. كلية الزراعة والغابات، الطبعة الأولى، الموصل.
3. Potter NN. and Hotchkiss JH. (1995). Food science. 5thEd., New York, Chapman & Hall.
4. الاسود، ماجد بشير (1993). مبادئ الصناعات الغذائية، دار الكتب للطباعة والنشر، الموصل- العراق.
5. المواصفة القياسية رقم (1258) (2001). التعديل الأول لسنة 2011 الخاص بالشراب المعدة للاستهلاك البشري، الجهاز المركزي للتحقيق والسيطرة النوعية. العراق.
6. المواصفة القياسية العراقية رقم (2270 / 6) (2006). الحدود المايكروبية في الاغذية الجزء السادس، الحدود المايكروبية للمشروبات الغذائية، الجهاز المركزي للتحقيق والسيطرة النوعية. العراق.
7. الاتحاد العربي للصناعات الغذائية (1982). واقع وأفاق صناعة المعلبات الغذائية في الوطن العربي، المنظمة العربية للتنمية الصناعية، بغداد- العراق.
8. المواصفة القياسية العراقية رقم (2270 / 3) (2006). الحدود المايكروبية في الاغذية الجزء الثالث، عد وتشخيص المجاميع المايكروبية في الاغذية للعام. وزارة التخطيط والتعاون الانمائي الجهاز المركزي للتحقيق والسيطرة النوعية، العراق.
9. المواصفة القياسية العراقية رقم 2270 / ج 6 لسنة (2007). تعديل رقم (1) لسنة 2011. الحدود المايكروبية في الاغذية، وزارة التخطيط والتعاون الانمائي الجهاز المركزي للتحقيق والسيطرة النوعية. العراق.

أما النتيجة الأفضل فقد كانت للشراب الصناعية المعدة للشراب لنوع داليا والبالغة (الزرنين Nil / والرصاص 0,0001 / والنحاس 0,22 / الخارصين 0,44 / والحديد 8,45 / القصدير Nil / السليكون Nil)

أما الشراب بشكل مركز يخفف بالماء فقد كانت الأفضل لنموذج (الشمس) والتي بلغت (الزرنين Nil / والرصاص 0,0001 / النحاس 0,32 / الخارصين 1,11 / الحديد 2,86 / القصدير Nil / السليكون PPB Nil) على التوالي

وشراب بشكل مسحوق كانت أفضل نتيجة لنوع دارينا والتي كانت نسبها على التوالي (الزرنين Nil / والرصاص 0,0002 / النحاس 0,33 / الخارصين 1,11 / الحديد 7,34 / القصدير Nil / السليكون PPB Nil) .

وبين الجدول رقم (4) ورقم (5) مقدار فيتامين C ملغم/100مل و رقم الـ pH لنماذج عينات البحث والتي كانت أفضلها وأقرب إلى ما تضمنته المواصفة العراقية القياسية كما يلي:

- 1- نموذج العناصر الطبيعية السائلة أ- (ميزو) بنسبة فيتامين C 2,79 ملغم و pH 3,03
- ب- المجففة (تانك) بنسبة فيتامين C 1,03 و pH 2,91
- 2- نموذج الشراب الصناعية أ- المعدة للشراب (داليا) بنسبة فيتامين C 1,04 و pH 3,1
- ب- الشراب المركزة التي تخفف بالماء (الشمس) بنسبة فيتامين C 1,1 و pH 3,01
- ج- الشراب بشكل مسحوق (دارينا) بنسبة فيتامين C 0,07 و pH 2,33

إن النسب أعلاه لفيتامين C وقيم الـ pH وعلى وفق المواصفة القياسية العراقية (5) الخاصة بالشراب المعدة للاستهلاك البشري ووفق التعديل رقم 3 لسنة 2012 الفقرة الخاصة بفيتامين C أن لاتقل الكمية عن 3ملغم / 100مل . أما الأس الهيدروجيني للمنتج يكون ما بين (2,5- 4) .

الجدول(4):محتوى فيتامين C وقيم pH في عينات البحث للعناصر الطبيعية

محتوى فيتامين C (ملغم/ 100 مل) وقيم الـ pH في العناصر الطبيعية					
عناصر طبيعية جافة			عناصر طبيعية سائلة		
التوزن	ليفانيس	تانك	سان كويك	راني	ميزو
فيتامين C	0,81	1,48	1,03	0,79	1,47
Ph	2,3	2,8	2,91	2,9	3,03

جدول (5):محتوى فيتامين C وقيم pH في عينات البحث للعناصر الصناعية

محتوى فيتامين C (ملغم/ 100 مل) وقيم الـ pH في العناصر الصناعية					
معدة للشراب			مركزة تخفف بالماء		
مسحوق مجفف	داليا	أورجنال	الواحة	الشمس	توب ريف
فيتامين C	1,04	1,42	0,09	1,1	0,01
pH	3,1	2,91	2,01	3,01	2,92

طيف فصل السائل بواسطة ليزر CO₂

أحمد ذنون، أنور مصطفى عزت الفيضي

قسم الفيزياء / كلية العلوم / جامعة الموصل / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

يمثل هذا البحث دراسة تأثير الفصل الضوئي لليزر ثاني أكسيد الكربون (CO₂) المستمر على خليط برمنغنات البوتاسيوم (KMNO₄) ودايكرامات البوتاسيوم (K₂Cr₂O₇) من خلال التحكم بمتغيرات الخرج الليزري (Laser output) وزمن التشعيع للسائل وقد لوحظ إن الطبقة العليا للسائل قد اختلفت في خصائصها الفيزيائية والكيميائية عن الطبقة السفلى للسائل، مع وجود عامل التبريد المستمر للسائل الذي يساهم في تسريع عملية الفصل الضوئي.

الكلمات المفتاحية: الخرج الليزري (Laser output)، ليزر CO₂

Spectrometry of Liquid Separation by Laser CO₂

Ahmed E. Thanon and Anwar M. Ezzat

Physics Dept. / College of sciences/ Mosul University / Republic of Iraq

ABSTRACT

This research represents the effect of photo separation of CW laser CO₂ on the mixture of (KMNO₄) Bermnkenat potassium and (K₂Cr₂O₇) Daekeramata potassium through output laser variables and irradiating time . It was noticed that the upper level of the liquid had a different chemical and physical properties from the lower sample down from the bottom through continuous cooling.

المقدمة

المواد وطرائق العمل

تتكون منظومة الفصل الضوئي المستخدمة في هذا البحث من الخلية الضوئية والتي تتكون من أنبوبين اسطوانيين مجوفين متحدتي المركز يبلغ قياس قطر الأنبوب الداخلي (1cm) وقطر الأنبوب الخارجي (2.5cm) ويبلغ طول الخلية الضوئية (10cm). إذ يمثل الأنبوب الداخلي (الخلية الضوئية) والأنبوب الخارجي (أنبوب التبريد). ويتم تشجيع النماذج بواسطة (ليزر ثاني أوكسيد الكربون) (د.أنور) (CO₂) المستمر مصنع من قبل شركة "Phywe" الألمانية، موجود في قسم الفيزياء /كلية العلوم/جامعة الموصل. ويتكون الجهاز من الأجزاء الآتية:

1. أنبوب التفريغ الكهربائي: وهو أنبوب زجاجي مزدوج (double jacket) يبلغ طوله (50 cm) وقطره (2 cm) وهو أنبوب سريان خليط الغازات المتكون من غازات (CO₂:N₂:He) والأنبوب الخارجي المغلف للأنبوب الداخلي يمر فيه ماء التبريد للمنظومة يوجد على أطراف الأنبوب الأقطاب الموجبة والمسافة بينها (34 cm) وفي مركز الأنبوب يوجد القطب السالب إذ تكون المسافة بينه وبين الأقطاب الموجبة (17 cm) والأنبوب مزود بفحات جانبية لدخول وخروج الماء والغازات، ولغلق الأنبوب استخدمت نوافذ بروستر (Brewster windows) المصنوعة من مادة (ZnSe).

2. المرنان: ويتألف المرنان من مرآتين الأمامية (الخارج) وهي مرآة مقعرة مصنوعة من (ZnSe) انعكاسيتها (95%) إما المرآة الخلفية وهي عبارة عن مرآة مستوية مصنوعة من السيلكون (Si-Plano mirror) تأمة الانعكاسية ويفضل استخدام المرايا المعدنية كمرآيا خلفية بسبب الانعكاسية العالية للمعادن للأطوال الموجية تحت الحمراء حيث يصل إلى حوالي (99.8%).

3. مجهز القدرة العالية (H.V-DC- power supply) يقوم بتحويل التيار الكهربائي من تيار متناوب (AC) (220V) إلى تيار مستمر (60 mA) /5 (kV) .

4. صندوق من المقاومات الكابحة

5. منظومة التفريغ (vacuum system) :تستخدم للتخلص من نواتج تحلل الغازات داخل أنبوب التفريغ الكهربائي

6. منظومة دوران الماء :تستخدم لتبريد أنبوب التفريغ الكهربائي وهي عبارة عن خزان مائي مصنوع من البلاستيك ومزود بمضخة ماء

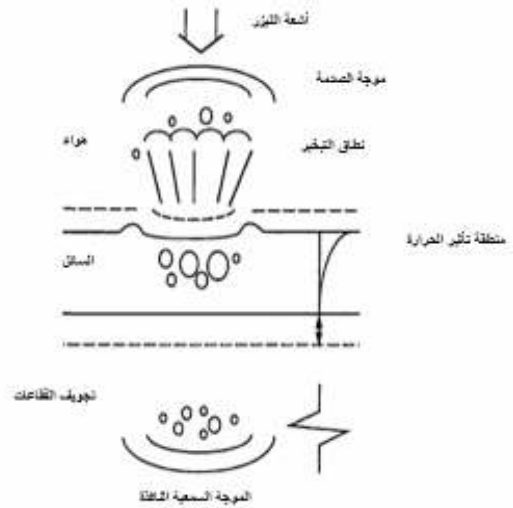
7. لوحة سيطرة :مثبت عليها مقياس لسرعة جريان الماء والغاز وعدد رقمي لقياس ضغط الغاز ،كذلك مقياس درجة حرارة أنبوب التفريغ الكهربائي (thermometer)

8. اسطوانة غاز (50(L)/200(bar)) تحتوي على خليط غازات (CO₂:N₂:He) مخلوطة بنسبة ثابتة (4.5:13.5:82%) على التوالي. الشكل (2).

وقد تم معايرة وتصريف الجهاز للحصول على الظروف التشغيلية المثلى لليزر عند فرق جهد (5.6 (KVolt)) و تيار كهربائي مقداره (30 (mA)) وضغط غاز يقدر بحوالي (38(mbar)) وسرعة جريان سائل التبريد (0.45 (L/min)) من خلال قياسات متكررة لأفضل الظروف التشغيلية (6).

تغطي التطبيقات الليزرية مجالات مختلفة في العلوم والتكنولوجيا بما فيها الفيزياء والكيمياء والأحياء والالكترونيات والطب وتعد أنواع الليزر الوسيلة الدقيقة والفعالة في جراحات الأمراض الجلدية والتجميلية (1) ،وهي نتيجة للمميزات الخاصة للضوء الليزري (أحادي الطول الموجي ، التشابه الزمني والمكاني والاتجاهية والسطوح) إضافة لكونها نتيجة مباشرة لفهم تفاعل أشعة الليزر مع المادة باختلاف أنواعها باعتباره أهم عامل في تطوير التطبيقات الليزرية (2).

هذا مادفع العلماء إلى دراسة تفاعل أشعة الليزر مع أنواع المواد من ضمنها الحالة السائلة ، وترجع بوادر البحوث المتخصصة في الحالة السائلة للعام 1975 عن طريق كل من العالمين (Geekem & Straaijer) اللذين قاما بدراسة تأثير موجة الصدمة (shock wave) لأشعة الليزر على سطح السائل شكل (1) (3)، ثم أعقبها بحوث كثيرة في دراسة تأثير الموجة السعوية -البصرية الناتجة من تفاعل الأشعة الليزرية مع السوائل وكذلك بحوث في آلية الفصل الضوئي (يعرف أحيانا بالانفجار اللوني) للسوائل ناتجة عن تسليط موجة ليزرية ذات طاقات مختلفة.

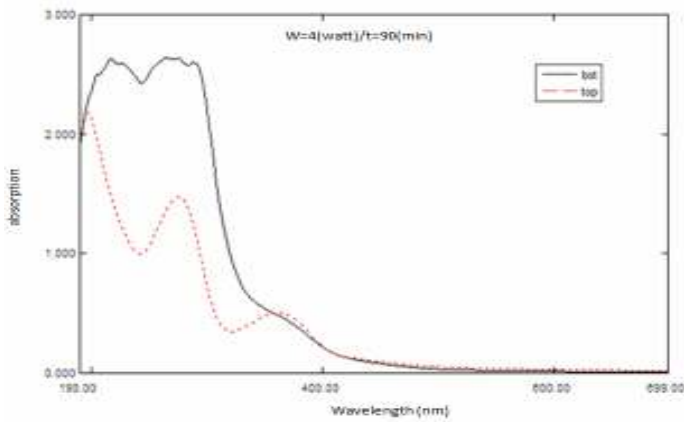
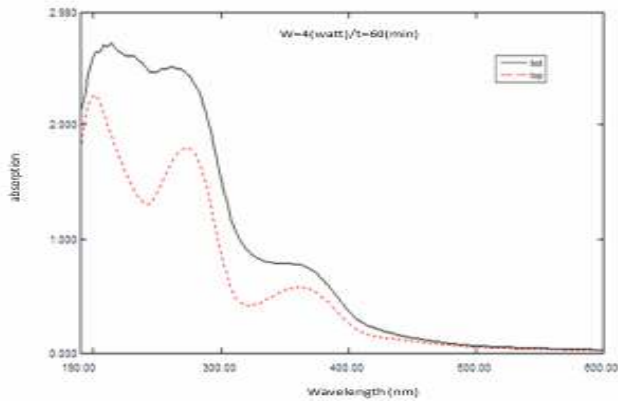
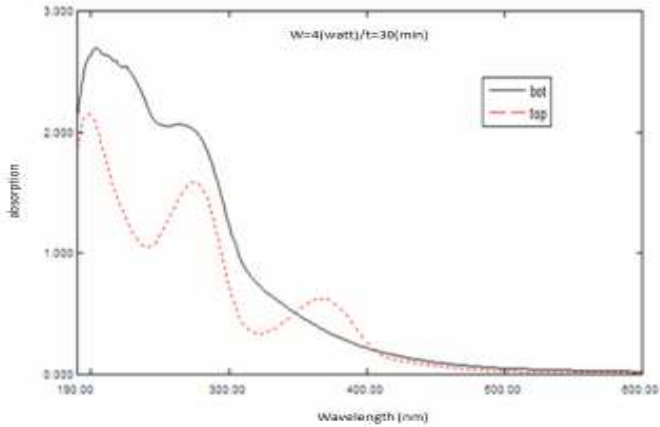


الشكل (1): موجة الصدمة لأشعة الليزر في السائل (3)

يعتمد تفاعل أشعة الليزر مع السوائل والمحاليل "الفصل الضوئي للسوائل" على عدة عوامل أهمها إن تكون طاقة نبضة الليزر أكبر من طاقة حد العتبة للأوصار الكيميائية التي تربط جزيئات السائل مع بعضها البعض وكذلك الخصائص الفيزيائية والكيميائية للسائل المعرض لأشعة الليزر (التركيز "مخفف"، مركز"، ونوع الأوصار التي تربط جزيئات السائل مع بعضها البعض، نوع السائل إذا كان خليط مكون من مادتين أو أكثر). وكذلك فترة التشجيع والطول الموجي للنبضة الليزرية ونوعها في ما إذا كانت مستمرة أم نبضية.

إن ظاهرة الانتشار الحراري (Thermal diffusion) من الوسائل المهمة في فصل محتويات خليط من الغازات أو السوائل وهذا الموضوع ذو تطبيقات واسعة وخير مثال على ذلك هو استخدام ظاهرة الانتشار الحراري في فصل نظائر اليورانيوم (4). هنالك عدة عوامل تؤثر على الانتشار الحراري مثل درجة غليان السائل والوزن الجزيئي للسائل وكذلك اختلاف درجة الحرارة بين الجدران العموديان لأنبوبية والتي تؤثر في درجة الفصل وكذلك طول العمود لأنبوبية الفصل (5).

النموذج حيث كانت نتائجها تدل على حدوث فصل للخليط الذي تم استخدامه في هذا البحث (7).
من خلال قياس نسبة طيف الامتصاص (بدون وحدات) لكل نموذج لوحظ ان هناك اختلاف واضح بين طيف الامتصاص للنموذج السفلي عنه في النموذج العلوي. حيث ان معلم الامتصاصية في النموذج السفلي كان اكبر منه في النموذج العلوي مما يدل على تكوين مركبات ذات امتصاصية أعلى في النموذج السفلي منها في النموذج العلوي , كما موضح في الأشكال (4), (5).

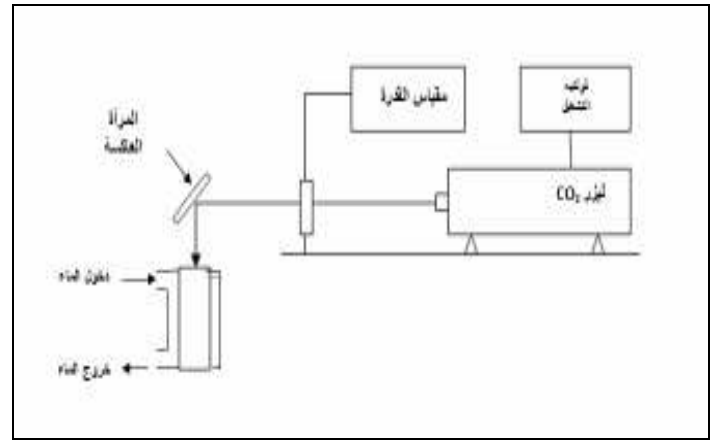


الشكل (4): طيف الامتصاص للمحلول عند قدرة (4 watt) وزمن (30,60,90 min)



الشكل (2): جهاز الليزر CO₂ المستمر المستخدم

إن تصميم جهاز ليزر CO₂ المستخدم في هذا البحث يسلط شعاع الليزر بشكل أفقي و عليه لغرض تسليط شعاع الليزر بشكل عمودي على سطح السائل فإنه تم تصنيع مرآة من الفولاذ مطلية بطبقة رقيقة من مادة الكروم لزيادة قدرتها الانعكاسية إلى ما يقارب (92%) بحيث تستطيع تحمل أشعة الليزر و لا تحترق، وكذلك استخدمنا منظومة لتبريد السائل للمساعدة في زيادة سرعة فصل السائل، حيث يوضح الشكل (3) منظومة الفصل الضوئي المستخدمة في البحث.



الشكل (3): منظومة الفصل الضوئية

ويتكون السائل المستخدم في هذا البحث من مزيج متساوي المقدار من برمنغنات البوتاسيوم ($KMnO_4$) دايكرامات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) وبتركيز مقداره (17.072×10^{-5}) .
وقد تم تشعيع الخليط خلال فترات زمنية مختلفة (30,60,90 min) وبقدرات خرج مختلفة (2,4 watt) وبعد كل فترة تشعيع التي يتعرض لها النموذج يتم اخذ كمية متساوية من أعلى نقطة من المحلول المشع وكذلك نفس الكمية من أسفل نقطة من قعر النموذج.

القياسات والنتائج

لغرض التأكد من حدوث الفصل الضوئي كان لابد من إجراء عدد من القياسات على النماذج المسحوبة من الأنبوبة وقد استخدم معلمين من اجل ذلك وهما طيف الامتصاص الضوئي وكثافة

و لقد استخدمت الكثافة المقاسة للنماذج لحساب عامل الفصل (separation factor) للنماذج من خلال قياس قيمة كثافة السائل قبل التشعيع ($\rho =$) والتي كانت تساوي

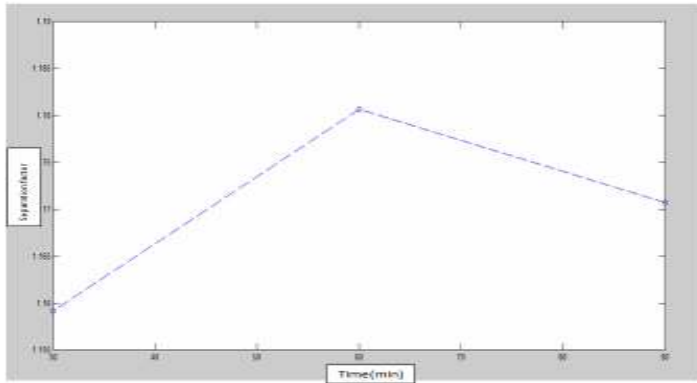
$$\rho = 1.2728 \frac{gm}{ml^2}$$

و تم حساب عامل الفصل (Q) (separation factor) (7) من المعادلة (1) للنماذج المفصلة ولفترات زمنية محددة وكما هو موضح في الشكل (6، 7).

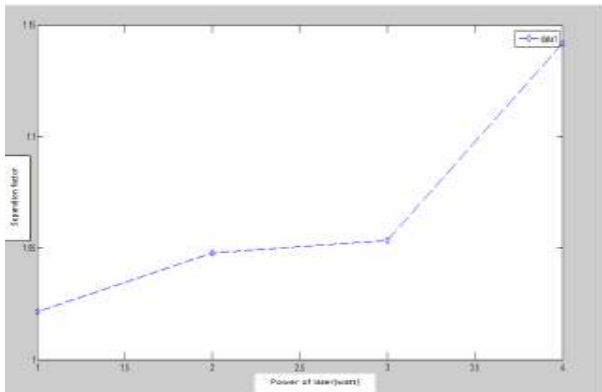
$$Q = \frac{(\rho_T - \rho_2)(\rho_1 - \rho_B)}{(\rho_1 - \rho_T)(\rho_B - \rho_2)} \dots\dots 1$$

حيث إن:

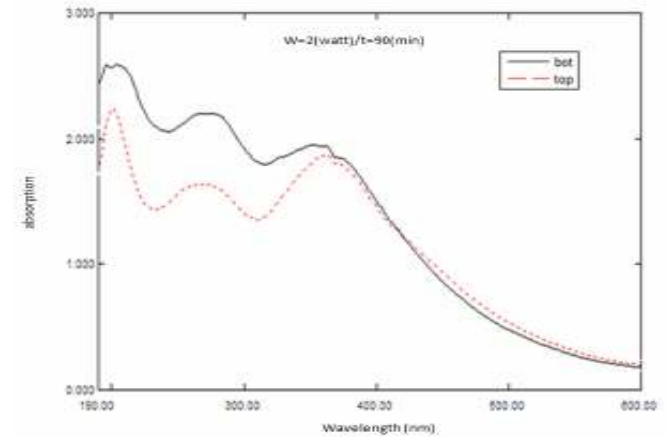
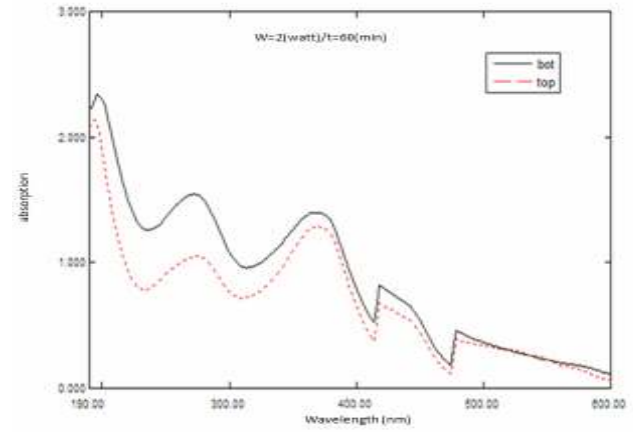
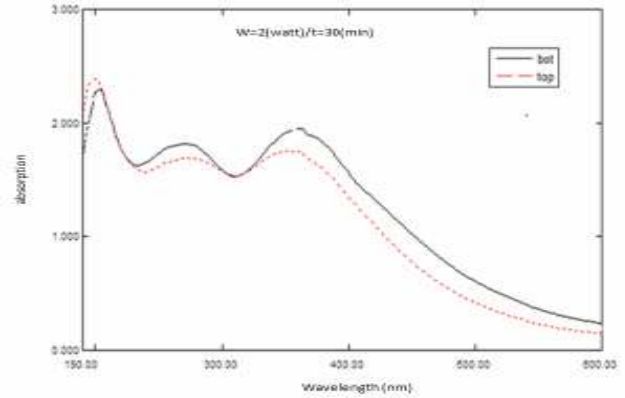
ρ_T = كثافة السائل العلوي (المسحوب من الأعلى) المشع
 ρ_B = كثافة السائل السفلي (المسحوب من الأسفل) المشع
 ρ_1 = كثافة سائل الديكرامات البوتاسيوم قبل التشعيع (0.6364)
 ρ_2 = كثافة سائل البرمكتات البوتاسيوم قبل التشعيع (1.9092)



الشكل (6): العلاقة بين زمن التشعيع (30,60,90min) وعامل الفصل (Q) عند قدرة التشغيل الليزري (4 watt)



الشكل (7): العلاقة بين عامل الفصل (Q) وقدرات الليزر المحددة خلال زمن تشعيع (30 min)



الشكل (5): يمثل طيف الامتصاص للمحلول عند قدرة (2 watt) وزمن (30,60,90 (min))

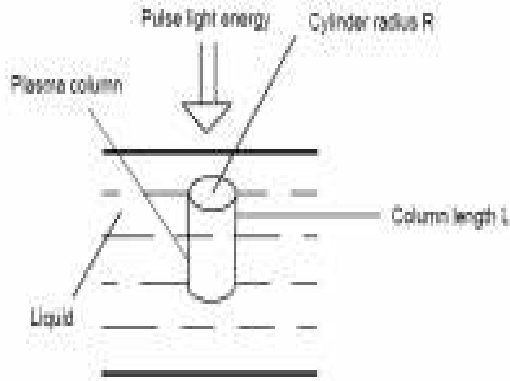
تعد الكثافة معلما ثانيا مهما للتأكد من حدوث الفصل من عدمه إذ أنها (أي الكثافة) تسيطر على اتجاه الفصل لذلك قيست كثافة النماذج العلوية والسفلية بعد كل فترة تشعيع وقد تبين إن هناك فروقات واضحة في كثافة النماذج العلوية والسفلية. حيث إن المركبات ذات الكثافة العالية تركزت في الجزء السفلي من النموذج والمركبات ذات الكثافة الواطنة تركزت في الجزء العلوي للنموذج.

المناقشة

عند سقوط أشعة الليزر على سطح السائل تتكون في البداية موجة صدمة وبعد ذلك يتم امتصاص أشعة الليزر وتحويلها بسرعة إلى حرارة فعندما يكون عامل الامتصاصية للنموذج المشع صغير وطاقة الليزر غير كبيرة فإن الانتشار الحراري يمثل الميكانيكية الرئيسية لعملية الفصل، إما عندما تكون طاقة الليزر أكبر من طاقة الأواصر التي تربط جزيئات السائل مع بعضها البعض فإن الميكانيكية الرئيسية لسير التفاعل هي الانهيار اللوني (8).

وبعد ذلك تتكون موجة الضغط إذ تؤدي موجة الضغط هذه إلى حدوث ما يسمى ظاهرة السمية-البصرية والتي تحدث نتيجة الطاقة المتحررة من جزيئات السائل المتهيجة بواسطة أشعة الليزر الساقطة عليها (9).

بعد فترة زمنية من تشيع السائل سوف يتكون داخل السائل عمود من البلازما (plasma column model) مكون من الأيونات الموجبة والسالبة للسائل كما في الشكل (10) (7).



الشكل (10): نموذج عمود البلازما (7).

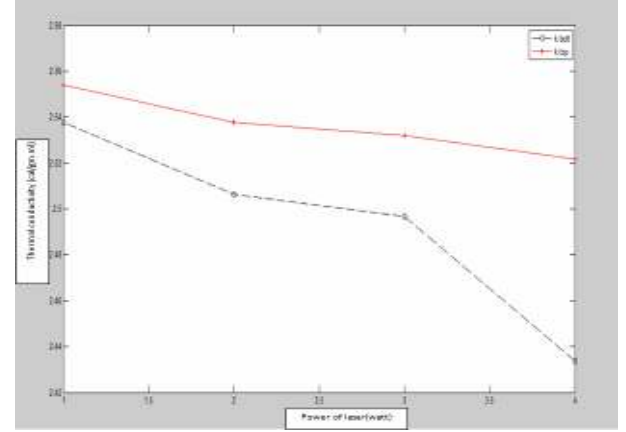
بما أن موجة الليزر هي موجة كهرومغناطيسية فإن هنالك مجالان يؤثران على تفاعل الليزر مع السائل حيث إن المجال الكهربائي يؤدي إلى فصل الأيونات الموجبة الثقيلة عن الأيونات السالبة وكذلك فإن المجال المغناطيسي سوف يؤدي إلى توليد تيارات الحمل داخل السائل المشع، أي إن الزيادة في فترة التشيع سوف تزيد من تأثير المجال المغناطيسي وبالتالي زيادة تأثير تيارات الحمل والتي تؤثر عكسياً على آلية الفصل (أي قد تحدث عملية عكسية تؤدي إلى المزج وليس الفصل) (10).

ولقد تبين في الشكل (7) زيادة عامل الفصل (separation factor) بزيادة القدرة المستخدمة لإشعاع الليزر وكما لوحظ الزيادة المفاجئة في عامل الفصل عند القدرة (3 watt) أي أنه أفضل قيمة في عامل الفصل كان عند القدرة (3 watt) وكذلك في الشكل (6) يزداد عامل الفصل مع زيادة الزمن ومن ثم يبدأ بالانخفاض عند زمن تشيع مقداره (60 minutes) والسبب في ذلك إن الفصل لا يستمر بشكل متواصل كونه تبدأ التأثيرات العكسية التي تم ذكرها سابقاً وتؤدي إلى عكس عملية الفصل (7). إن التحليل بالمطاف الضوئي وقياس الكثافة والتوصيلية أثبتت حدوث عملية الاختزال للأوكسجين في الخليط وينسب مختلفة حسب عملية الفصل.

شكر وتقدير

الشكل (9): يمثل العلاقة بين فترات التشيع المختلفة مع التوصيلية الحرارية عند قدرة تشغيل الليزر (4 watt) (4 watt) (شكر المؤلفان كلية العلوم في جامعة الموصل لدعمها هذا المشروع و الشكر موصول للسادة المقيمين).

لغرض تحديد العلاقة بين عامل الفصل (Q) و قدرة النبضة الليزرية المستخدمة خلال زمن تشيع محدد (30 min) فقد تم رسم العلاقة في الشكل (8).



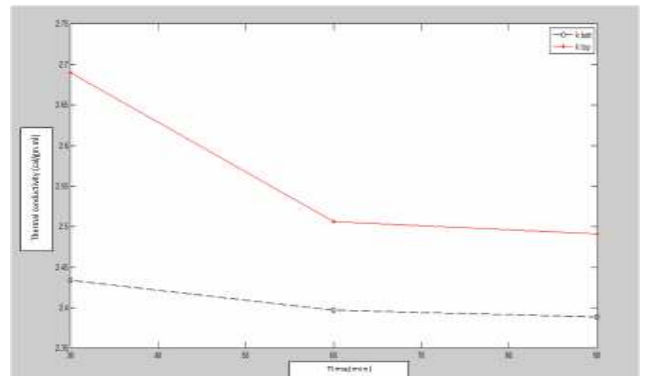
الشكل (8): يمثل العلاقة بين قدرات التشيع مع التوصيلية الحرارية خلال فترة تشيع (30 min)

كما يمكننا من خلال معلم الكثافة حساب التوصيلية الحرارية ($thermal conductivity$) (7) للنماذج المفصولة العلوية والسفلية وللترات زمنية محددة من خلال المعادلة الآتية:

$$K = \frac{0.28}{\rho} (1 - 5.4 \times 10^{-7}) \quad \dots\dots\dots 2$$

حيث: K = التوصيلية الحرارية و ρ = كثافة النموذج

من خلال الشكلين (8) و (9) نلاحظ إن هناك اختلاف في قيم التوصيلية الحرارية للنماذج العلوية والسفلية المفصولة إذ كانت قيمها للنماذج العلوية أعلى من قيم التوصيلية الحرارية للنماذج السفلية. إن سبب اختلاف التوصيلية الحرارية يعزى إلى اختلاف الكثافة للنماذج من المناطق المسحوبة منها (أعلى الأنبوبة وأسفل الأنبوبة) وحسب المعادلة (2).



الشكل (9): يمثل العلاقة بين فترات التشيع المختلفة مع التوصيلية الحرارية عند قدرة تشغيل الليزر (4 watt) (4 watt)

المصادر

1. الشريف ، صبيحة، مشكور، منعم. (1988). مبادئ الليزر. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. العراق.
2. Jakubczka K. (2010). Lasers-applications in science and industry. John Wiley.& Sons. p111.
3. Geer BM. and Straaijer A. (1976). The Interaction of 10.6 μm laser radiation with liquids. Infra. Phys. 16:87-92.
4. Kobayashi N. and Yamamoto I. (1996). Comparison of definitions of ordinary diffusion coefficients in multi component mixture. J. Nucl. Sci. Technol. 33:663-667.
5. Ecenarro OJ.; Madariaga A. and Navarro JL.(1991).Direction of separation and dependents of feed concentration in liquid thermo gravitational columns. Sep. Sci. Technol.1065-1066.
6. محمود، لطفي علي، جاسم، عواطف صابر، احمد، هاني هادي. (2002). تشغيل ودراسة خواص ليزر ثاني اوكسيد الكربون المستمر. مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية. جامعة تكريت. 5(3): 72-91.
7. رجب، جاسم محمد، عزوز، عاصم، الفيضي، أنور. (2006). حساب عامل الانتشار الحراري لسائل عضوي متعدد المركبات بطريقة عمود الانتشار الحراري. مجلة علوم الرافدين. 17(1): 46-58.
8. Hui CAO. and Limin GOA. (2010). Research on sound fields generated by laser -induced liquid break down. Optica.Appl. XI(4): 29-36.
9. Harilal SS. and Vallabhan CP. (1996). Study of laser ablation in liquids using pulsed photo acoustic technique. Mod. Phys. Lett. 10(21): 1105- 1112.
10. Hassanov HG. (2003). A theory for the separation of liquid mixtures by laser radiation. Phys. Sep. Sci. Eng. 12(3): 179-187.

أثر الربح الاقتصادي للعمارة المؤسساتية على الناتج المعماري : دراسة في مجالات الاستثمار الخاص في مدينة بغداد

هشام علاء علوان السعدي

قسم الهندسة المعمارية / كلية الهندسة / جامعة بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

تمثل مرحلة ما بعد العام 1990 ولغاية يومنا هذا ما يعرف بظاهرة النظام الاقتصادي النابع من مفهوم الرأسمالية الغربية و التي هيمنت على الاقتصاد العالمي واصبحت السمة البارزة لرؤوس الاموال والمؤسسات الأكثر فاعلية في المجتمعات. و في ظل هذا النظام و الانفتاح و الانفجار الاقتصادي في العالم الحديث، و حاجة الدول الى مواكبة هذا الانفتاح ظهرت العمارة كاحدى المجالات الأكثر تعبيراً عن مدى تطور البلد و مجتمعه. وبعد دخول العراق الى مرحلة جديدة من الانفتاح السياسي والاقتصادي بعد احداث العام 2003 ظهرت الحاجة الى وجود رؤوس الاموال و المؤسسات الاستثمارية للاسهام في تحقيق سرعة الانجاز المعماري و الهندسي لغرض مواكبة ركب الحداثه والتعبير و التقدم خصوصا بعد المصاعب السياسية الاقتصادية التي مر بها البلد بين في الثلاثين عاما ما قبل العام 2003 تمثلت بحربي الخليج الاولى والثانية و الحصار الاقتصادي و سياسة التصنيع العسكري مما جعل من السياسات الاعماريه تتجه اما الى اعادة الاعمار اما الى تشييد الابنية الحكوميه السيادية مما جعل فكرة الانفتاح الى دعم المؤسسات الاستثمارية ضعيفة جدا، كل هذا جعل من العراق ارضا خصبة امام مؤسسات وشركات الاستثمارات بمجالاتها المختلفة. يهدف البحث الى الوصول الى تأثير المؤسسات الاستثمارية على العمارة من خلال المفاهيم المعمارية والعلاقات الشكلية التي تقدمها مشاريعها في العراق وفي مدينة بغداد خصوصا، عن طريق طرح تساؤلات: هل تحمل المشاريع طابع الجدة والابتكار ام هي اشكال مقبولة بصريا ومربحه عمليا و سهلة الطرح من خلال ارتباطها بروح العصر الدارج لدى المجتمع المتلقي لهذه المشاريع؟ وما هو اثر مفهوم الترويج الاقتصادي على سماء مدينة بغداد مستقبلا.

الكلمات المفتاحية: النظام الاقتصادي، المؤسسات الاستثمارية، العمارة المؤسساتية

The effect of architecture enterprise economical profit on the architectural product: Study in private investment fields in Baghdad city

Hisham A. H. Al- Saady

Architectural Dept. / College of Engineering / Baghdad University/ Republic of Iraq

ABSTRACT

The period between (1990-till now) represents the economical phenomenon that arouse from the western capitalism which dominates the global economy and became the most prominent trait for most capital enterprises in societies.

Because of the new era that Iraq is entering after the year 2003, the need of capitalism and investment enterprises rises to contribute in the production speed for both engineering and architectural achievements to ride the wheel of modernism especially after the years of political and economic difficulties for about 30 years before the year 2003 resembled by the two gulf wars and economic sanctions and the military industries politics, all above made the architectural strategies goes either for rebuilding plans or the product of governmental projects which makes the concept of investment enterprises role very weak. This makes Iraq a fertile ground for varies and different investment enterprises and all fields.

The research aims to reach the role and the effect of investment enterprises on the architectural concepts and form relations through its investment projects in Iraq especially Baghdad city, by answering the following: does their projects holds the novelty and innovation or they represents visually acceptable forms and practical profitable and easy to introduce by link itself to common Zeitgeist? And what is the effect of Architecture Enterprise on future Bagdad sky line.

المقدمة

معظم الاقتصاديين الى اعتبار الربح عائدا اقتصاديا على المخاطرة (4).

وبسبب حداثة قانون الاستثمار العراقي والذي سن في العام 2006 و تحديد صلاحية الهيئة الوطنية للاستثمار بالتنسيق والادارة والتحقق من التزامات المستثمرين والمتعلقة بالدرجة الاساس بانجاز العمل وفق الضوابط المهنية والادارية، يكون دور هيئات المحافظات والاقاليم لها الاثر الاكبر في اعطاء الضوء الاخضر للتصاميم المقدمة ومناقشة الافكار المقدمة من قبل المستثمرين مما يجعل هذه الهيئات هي هدف اقناع المستثمر الاجنبي او العراقي (5).

1-2. مجالات الاستثمار:

ولتحديد مجال دراسة العينات ضمن مفهوم الاستثمار، فلابد من مجالات للتطبيق و يقصد بمجال الاستثمار نوع او طبيعة النشاط الاقتصادي الذي يوظف فيه المستثمر امواله بقصد الحصول على عائد، ويقسم الى نوعين (4):

1. **الاستثمار العام:** فهو لسد الاحتياجات الاجتماعية و تتمثل في الاتفاق على الخدمات العامة مثل التعليم والصحة و المواصلات وما غير ذلك، وهو ما تتفقه الدولة لاقامة المشاريع تستهدف زيادة التكوين الرأسمالي في المجتمع وهي تهدف بالدرجة الاساس زيادة الطاقة الانتاجية للدولة و تحقيق الاهداف الاجتماعية و الاقتصادية والسياسية لا يستطيع الاستثمار الخاص القيام بها.

2. **الاستثمار الخاص:** والذي يقوم على دوافع الربح بشكل منفرد ومما يصب في مصلحة المؤسسة الاستثمارية والمستثمر. هو "الاضافة الى الطاقة الانتاجية للمجتمع و تقوم بها وحدة تنظيمية خاصة سواء كانت وطنية او اجنبية او مشروع مشترك ويطلق عليها مشروع استثماري خاص بهدف تحقيق الربح خلال فترة زمنية مستقبلية"

ولكون البحث يتعلق بنتائج الاستثمار الخاص فان من المهم معرفة اهداف الاستثمار الخاص، اذ يسعى المستثمر في البلاد النامية الى تحقيق الاتي (4):

- **تحقيق العائد الملائم:** هدف المستثمر من توظيف امواله هو تحقيق عائد ملائم و ربحية مناسبة يعملان على استمرار المشروع.
- **الحفاظة على رأس المال الاصلي:**و ذلك من خلال المفاضلة بين المشروعات و التركيز على اقلها مخاطرة لان توقع الربح والخسارة و ارد.
- **استمرارية الدخل و زيادته:** يهدف المستثمر الى تحقيق دخل مستقر بوتيرة معينة بعيدا عن الاضطراب و التراجع في ظل المخاطرة حفاظا على استمرارية النشاط الاستثماري.
- **ضمان السيولة اللازمة:** الحاجة الى التمويل والسيولة الجاهزة لمواجهة متطلبات العمل. ايجاد اسواق جديدة لمنتجات وبضائع الشركات الأجنبية.

وفق هذا الانفتاح الاقتصادي والمتغيرات المتسارعة و المتنامية في المجالات الاستثمارية المتلازمة مع هذا الانفتاح، ظهر تأثير هذه المعطيات اعلاه جليا على العمارة والمهنة المعمارية والنتاج المعماري، ولهم اثر هذه المتغيرات على الشكل المعماري في قطاع الاستثمار الخاص علينا ان نفهم دور هذه المؤسسات في العملية التصميمية من خلال تقديم نفسها في الساحة المعمارية بعنوان و اهداف و رغبات عنوانها العمارة المؤسساتية

"المشاريع الخاصة الأكثر نجاحا في تحقيق الثروة" (1)

يمر العراق بفترة واضحة من الانفتاح الاقتصادي على جميع المستويات المدنية، و فتح باب الاستثمار امام الشركات الاجنبية والاقليمية من خلال تملك الاراضي او طرحها عن طريق المساح و الاستفادة في الاجل هي واحدة من تلك الانفتاحات، هذا الانفتاح فتح المجال امام شركات الاستثمار العقارية للبدء بمجموعه من المشاريع تعود بالفائدة الربحية لها وتكون بذرة البدايه لها في ارض العراق الخصبة لهكذا نوع من المشاريع، تقابل هذه الرغبة التسهيلات المقدمة من الحكومة العراقية و مؤسساتها المعنية لتسهيل بعض المحددات التخطيطية التي وضعتها (كما سنرى في مثال الاميرات حيث اعطيت الموافقة لتصميم برج بسنة وعشرون طابقا ضمن نسيج سكني)، كل هذه الرغبات تصب في هدف الوصول الى تعبير معماري معاصر لمدينة بغداد يتمشى والتنامي المتزايد في دول العالم المتقدمة. و لمدينة بغداد اهميتها السياسية والتاريخية في الوطن العربي و على خارطة الثقافات والحضارات، و اعطاء الضوء الاخضر للمشاريع الاستثمارية الخاصة للانطلاق في هذا المجال يجعل المدينة اما تحدي المعاصرة و ركوب موجة الحدائث بحسب وجهة نظر هذه المؤسسات الاستثمارية، مما ق يجعل العمارة المنتجة من قبلها عمارة مؤسساتية تخضع لمؤثراتها الربحية والاقتصادية.

المشكلة العامة: عدم وضوح الاهداف و العوامل البراغمية الخاصة للمستثمر والمؤسسة الاستثمارية في القطاع الخاص لمعرفة دورها في اتخاذ القرار الخاص بالمشروع المزمع انشاؤه و ما هو دور الربح الاقتصادي في قبولية هذه القرارات.

المشكلة الخاصة: عدم وجود قواعد و مراجع معمارية يحتكم لها المستثمرون في تصميم مشاريعهم في بغداد العريقة بحضارتها وتاريخها في مواجهة الاهداف الربحية للمستثمر مما يجعل من التجارب المعمارية المطروحة في الارض العراقية محكومة الى قرارات المؤسسة الاستثمارية.

هدف البحث: تشخيص دوافع المستثمرين في القطاع الخاص و اهدافهم و ارتباطها بالمجتمع المعاصر و المقيم الذي سيصمم المشروع في زمن الانفتاح الاقتصادي للوصول الى اطار نظري يحلل من خلاله مجموعته من العينات المختارة من مشاريع استثمارية خاصة في مدينة بغداد بمواقع استراتيجية مهمة. لاجل اية عن تساؤل: هل ان المعاصرة المطروحة في زمن الاستثمار الخاص بعد العام 2003 كمفهوم تحمل قيما معمارية تنافسية جديدة تمثل مرحله جديده تستحق الاشادة بهاء دراستها، ام انها مجرد نتاجات متعددة علاقات وقواعد شكلية مكرره مرتبطه بقم سطحه تعتبر مفاتيح نجاح المشروع في المجتمعات المعاصرة و المنفتحة حديثا بعد زمن من الانغلاق و الانقطاع و تمثل بدورها نجاحا لدى المستثمر كاستمرار لمرودده الربحي.

المحور الاول: الاستثمار في العراق

1-1. الاستثمار والاقتصاد:

لفهم العملية الاستثمارية فمن المهم معرفة ما هو الاقتصاد لارتباط المستوى الاستثماري و تسهلاته بالدول بمدى الانفتاح الاقتصادي الذي تعيشه و بذلك تشكل واحدة من اهم المؤثرات التي تشكل مدى تقدم العملية الاستثمارية. الاقتصاد هو "العلم الذي يهتم بمدى كفاءة استغلال الموارد الاقتصادية المتاحة في المجتمع، اي ما اذا كان يتم استغلالها الاستغلال الامثل و توظيفها التوظيف الكامل"، كذلك هو "العلم الذي يهتم بدراسة ذلك الجزء من النشاط الفردي و الاجتماعي الذي نكرسه للوصول الى احسن الظروف المادية لتحقيق الرفاهية" (2)، اما الاستثمار عموما يعرف بأنه "توظيف المال بهدف تحقيق العائد او الدخل او الربح و المال عموما" (3).

ويمكن القول ان الدافع الرئيسي لاي استثمار هو تحقيق اقصى قدر ممكن من الارباح وعادة ما يكون الهدف في المدى الطويل، ويميل

2-2. الهندسة المعمارية و الانفتاح الاقتصادي:

العمارة هي الفعاليه المركبه التي تحتضن الثقافه والتقنيه والاقتصادو بغض النظر عن حجم المشروع هي تمثل الابداع الانساني (10). وفسر بعض الباحثين النتاج المعماري من خلال ثلاثة مفاهيم: (1)

- **المكان** : هويه قويه تقرأ من خلال التفاصيل الرمزية
- **الشكل**: كينونه مشكله من كتله و حجم تربطها العلاقات و التفاصيل
- **التقنيه**: مدفوعه من قبل ذهنيه و نمط حياة ورغبات المستهلك.

ان الغرض من التعاريف هنا هو التركيز على ثقافة المجتمع و رموزها كعامل اساسي في تعبيرها عن نفسها بصيغه عمارة عصرها.

من جهة اخرى يقدم التنظيم الاقتصادي الحديث "الرأسمالي" نفسه كنظام يقوم على الذهن الحسابي المتكامل، ويتوقع من الفرد نمطا معيناً من الاتجاهات السلوكية، وتغيرت غاية هذا النظام و اهدافه في الوقت الذي تغيرت معه اساليب و وسائل تحقيق الاهداف و الغايات، و هكذا ترك الاكتفاء الذاتي محله الى السعي خلف زيادة الدخل النقدي. وبهذا المعنى يمكن النظر الى الاقتصادية كمحرك للدينامية الثقافية التي تشجع على تغيير الاتجاهات السلوكية وخلق وابتكار الانماط تعتبر الشرط الاساسي للتكيف مع النظام الاقتصادي الرأسمالي (7). و في تحليل Gutenschwager للعمارة في العصر الرأسمالي الحديث : " كرمزية ، تعبر الهندسة المعمارية عن العلاقات الاجتماعية ، ولا سيما الهرمية منها، و تتقاطع مع العالم الاجتماعي في كل من المعاني السياسية والاقتصادية و الحس الاخلاقي، و انها لا يمكن معرفه ما اذا كانت ستقود الى حل وسط من التاريخية او تقود الى شكله صرفه تكون عبارة عن اشكال تحوم بمعانيها في سماء محليه ممكن او توضع به (1).

في ظل المفهوم الاقتصادي الحديث و الانفتاح الرأسمالي للبلد و دخول المؤسسات الاستثمارية العقارية و الدافع الربحي الذي تؤمن به، هل تبرز اهمية تحقيق العامل الثقافي و التكامل مع النسيج المحيطه من المحددات الثقافية و التاريخيه و المناخيه لا يمكن ان يلاؤمها كل "معاصر" ام اصبح تحقيق البناءة "الاكثر معاصرة" و موائمة لحيثيات المؤسسة و التي تجعل المتلقي (يقع في حب الناتج!) هو الاهم ضمن استثمار اقتصادي يبحث عن الحلول السريعه و الجذابه و العمليه.

2-3. العمارة المؤسسية والتأثير على المتلقي:

يصمم المشروع بالنتيجة الى المتلقي، هذا المتلقي هو من سيتفاعل والمشروع وهو من سيعطيه الضوء الاخضر للانطلاق ويكون نقط البداية لعديد المشاريع الاستثمارية القادمة والتي "احبها" هذا المتلقي، و لان المؤسسة الاستثمارية تصمم ضمن مجتمع حديث فعلياً ان نبحت في اهم المؤثرات التي تستند اليها المؤسسات الاستثمارية في التأثير على المجتمع الذي سيصمم ضمن محيطه البناءة.

و بما ان عملية التأثير على المتلقي تبدأ بالاتصال و هي العمليه التي يتم بها انتقال الافكار، ولنجاح التواصل لا بد معرفة من سيقوم، وفي حال العمارة تعتبر البناءة الرسالة الى المجتمع يتلقاها و يقيمه كونه مستخدم لها او مشاهد لهد يرغب باستخدامها او الانتفاع منها، و مؤثرات ثقيل المجتمع للافكار و التواصل معها هي (10):

- **مفعول الجماعه**: التعايش الحيوي بين الفرد و جماعته ومحيطه، لذا فان تغيير سلوك الفرد اسهل بتغيير سلوك جماعته. وان قابلية الاستهواء و الثقيل و التقليد لدى الفرد تزداد طردياً مع ازدياد عدد الجماعه الموجود هو ضمنها.
- **الراي العام**: الراي السائد بين اغلب المجتمع و يمثل موضوع نقاش وجدل في فترات زمنييه، و هو مفهوم متغير بتغير الزمن.
- **التأثير بالدعايه والاعلام**: الدعايه هو الاستخدام المقصود و المخطط لرموز عن طريق الايحاء، و يرمي الى تسيير

المحور الثاني: العمارة المؤسسية Enterprise (Architecture):

1-2. العمارة المؤسسية:

يمكن القول ان العمارة المؤسسية هي "التنظيم المنطقي للعمليه التجارية و البنية التحتية لتكنولوجيا المعلومات التي تعكس متطلبات التكامل و توحيد النموذج التشغيلي للمؤسسة، للوصول الى نموذج التشغيل الامثل الذي يمثل كلا من تكامل و معايير هذه المؤسسة" و هي تقوم بتطبيق مبادئ و ممارسات الهندسة المعمارية لتوجيه المؤسسة او المنظمة خلال الاعمال التجارية و المعلومات و المسار و التغييرات التكنولوجية المطلوبة لتحقيق الاستراتيجية المرجوة (6)، و يمكن ان نسميها ايضاً العمارة المؤسسية كونها تتبع المؤسسة الاستثمارية المعينة لذلك فان مصطلح العمارة المؤسسية في البحث هنا هو اي شكل من اشكال التمثيل للمؤسسة الاستثمارية سواء كشركة او مؤسسة عقارية او مجموعة افراد كلهم يمثلون القطاع الخاص من مجال الاستثمار.

عملية تأسيس بنية المؤسسة تأخذ وقتاً طويلاً تجعل منها عديمة الفائدة، لذلك ظهر ما يسمى "كل شي بالانحياز" لدى هذه المؤسسات وهو مبدأ قائم على تحقيق موائمة الاعمال من خلال "الندرجية، الأمن، العمل المشترك، الصيانه، انخفاض التكلفة و الموثوقية" (7) ، ووفق هذا التعريف و اطلاقاً على تعريف الاستثمار و الاستثمار الخاص خصوصاً و التزامات المستثمر واهدافه سنبحث كيف تؤثر هذه العوامل في تحديد الاشكال المعمارية المصممة ضمن مشاريع الاستثمار الخاص.

العمارة المؤسسية وظيفة اساسية، والاستثمار فيه يمثل اولوية عليا. هذه الاولويات تنظم المؤسسات الاستثمارية نفسها في السوق المتغير و المتنامي بشكل سريع مما يولد جواً من التنافس الذي يتطلب من هذه المؤسسات الوصول الى اسرع طريقة و اكثرها كفاءة في تحقيق المطلوب و المريح و العملي، هذه المتطلبات يمكن ان تلخص من خلال ثلاث عوامل و مجالات رئيسية (7):

- **الكفاءة و العمليات السهلة**: تحقيق الانضباط و توحيد المسارات الانتاجية و تكنولوجيا المعلومات المستخدمة كل هذا يقاس من خلال معايير التكلفة و الدخل و كم العمليات المنجزة.
- **خدمة العملاء**: التنافس يعتمد على تحقيق المنتج الذي يقدم التجربة المثالية للعميل و تحسين مستوى الخدمات المقدمة لهم ضمن خطط المؤسسات و الحدود الجغرافية للاستثمار.
- **خفة الحركة و الابتكار**: ويمكن تسميته بالعامل الاهم، وهي تتلخص بان قيمة الابتكار لا تكمن في الابتكار بحد ذاته، بل في القدرة على تحقيقه بسرعة. وبالتالي تقديم المنتجات الى سوق العمل بسرعة اكبر.

بمعنى ان كل العوامل اعلاه تصب في مجال السرعة و انجاز ما هو مخطط باكفاً الطرق و اسرعها و بما هو متوافر من تكنولوجيا معلومات او المعتمد من قبل المؤسسة الاستثمارية. افكار سرعة الانجاز و التطبيق العملي تواجبت في عمارة الحداثة انما ضمنتمبادئ و نظر لها، انما السؤال الكامن هنا هل توضع كل المبادئ و الافكار الاقتصادية اعلاه في هذه المؤسسات ضمن قواعد فكرية او مبادئ معمارية رصينه ام هي ممارسات شكلية مألوفة تتفاوت بين مؤسسة و اخرى انما تشترك بسمه "عملي و مريح" (الشكل رقم 1) يوضح مفهوم العمارة المؤسسية وفق تأثير الاستثمار و الانفتاح الاقتصادي.

3-3. مفردات مؤثرات العمارة المؤسساتية:

اما في الجانب الاخر من المعادلة فان المفردات التي سيستند اليها العمارة المؤسساتية في الترويج و التقليل من قبل المتلقي فتم تلخيصها الى الثلاثة الاكثر تأثيرا، وهي:

- **مفعول الجماعة/الذوق العام:** الذوق هو تقدير النوعية الجمالية، و يطبق بشكل ملحوظ وواضح على الجودة الثقافية حيث يستعمل المصطلح مجازيا للإشارة إلى درجة معينة من الكفاءة الثقافية.

- **الرأي العام/روح العصر:** هو المناخ الفكري المميز لتقافة حقبة معينة من الزمن، والمؤثر عليها هنا تحدد العلاقات الشكلية و الفكرية السائدة في المجتمع الخطوط العريضة للنتائج المعمارية

- **الدعاية و الخصائص و الوسيلة/ المطابقة و الخبرة الاجنبية:** تعني التقليل الاسرع عن طريق الترويج والاشادة و التعزيز للامثلة الاكثر حداثة، و ايضا من مطابقة الحلول المطروقة والتي لاقت التقليل من المجتمع. و اعتبار ما ينجز عن طريق الشركات الاستثمارية الاجنبية هو افضل خدمة ممكن ان تقدم كونها تسبق الخبرة المحلية باشواط في مجال الاعمار.

كل هذه المفردات تلعب دورها على التصميم الذي يتأثر بهذه العوامل و بالاتي تؤثر على تشكيل المنتج المعماري النهائي في ظل دخول العمارة المؤسساتية على الساحة الذي وان كان عبارة عن نتاجات فردية في نطاقات متفرقة الى انها تؤسس بلا شك بداية التشكيل البصري لما يمكن ان تكون عليه مستقبل الابنية المعمارية في مدينة بغداد وذلك لقيمتها العقارية و الاقتصادية وتماسها مع شريحة كبرى من المواطنين ضمن المجتمع الواحد، تحليل الامثلة ادناه هو خطوه في التنبؤ بمستقبل الاشكال المعمارية للابنية مستقبلا في خط سماء بغداد تحت تأثير "العمارة المؤسساتية".

(الشكل رقم 3) وضع من قبل الباحث لاجل تحليل العينات التطبيقية الاتية، و يبين الجدول ان تحقق كل مفردة من المفردات اعلاه في المشروع فان المبدأ الربحي يكون هو العامل الاساسي في تصميم البنايه بعيدا عن اي قيم جديدة كان بالامكان ان يطرحها المشروع، و من ثم طرح تحليل عام لنتيجة هذه المفردات.

وتغيير الاراء والافكار والقيم والاتجاهات، والقيام بالاعمال بالاتجاه المدير له.

- **التأثير بسبب خصائص المرسِل:** سمعة المصمم و الانطباع المتشكل حوله وحول سلوكه وممارسته المهنية و للخدمات التي يقدمها للمجتمع.

- **التأثير بالوسيلة:** لحدوث التأثير لا بد من وسيلة لاحتائه، وهي وسيلة نقل الافكار الى الآخرين.

و لكي توفر العمارة المؤسساتية الارضية المناسبة لعوامل تنافسها فهي تحتاج الى الاستناد على رغبة المجتمعات الى مواكبة العصر في المجتمعات المتقدمة للتأثير على مدى تقبل المجتمع وافراده للافكار و من ثم سهولة انتقال هذه الافكار و وروجها مما يشكل عاملا اضافيا في دعم المردود الربحي لهذه المؤسسات من خلال نجاح مبانيتها. لذا ينطلق البحث من هذه النقطة الى بحث تأثير العمارة المؤسساتية بدوافعها على ما يتقبله المجتمع المعاصر و يقيمه، فالمستثمر يسعى الى بناية مربحة معاصرة و ومقبولة من المجتمع كونه يخدم هذا الاخير وفقا الى نوع الفعالية، المجتمع بدوره ضمن المتغيرات المعاصرة و السعي نوع الالتحاق بركب الدول المتقدمة وكل ما يماثل تجارب الدول المجاورة و تحقيقين الصورة للماعة عن التطور و الحدائه.

المحور الثالث: تشكيل مفردات الاطار النظري

1-3. تشكيل المفردات:

يهدف البحث وفق الدراسات والمعطيات اعلاه الى تشكيل اطار نظري يتم من خلاله تطبيق مفرداته على الامثلة المنتقاة، حيث يتم ترجمة اهداف و مؤثرات (العمارة المؤسساتية) الى عدة مفردات معمارية و شكلية تؤسس قوام هذا الاطار (الشكل رقم 2).

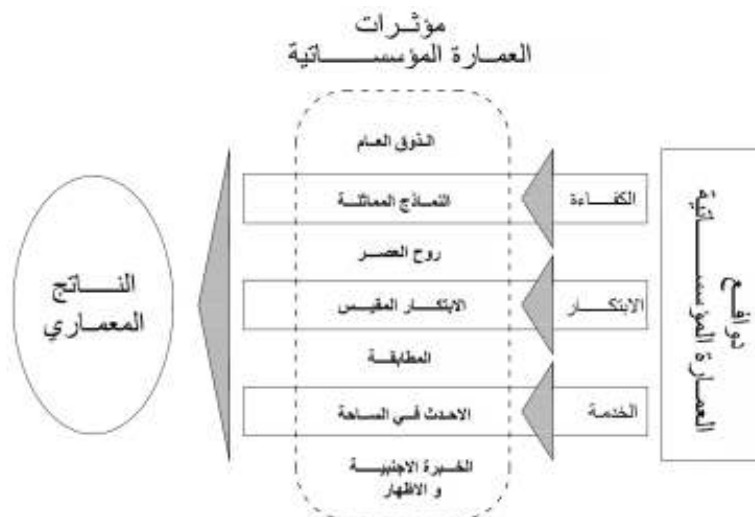
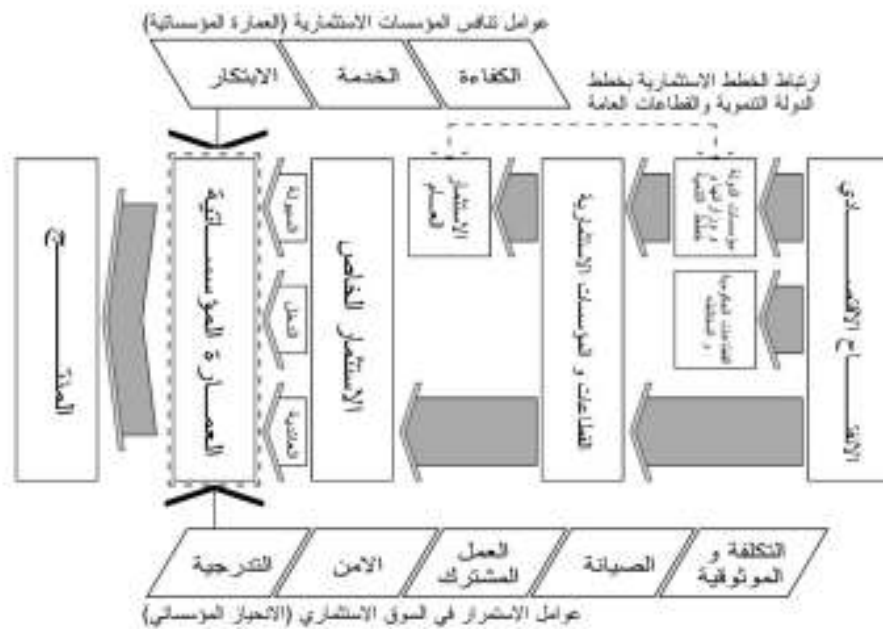
2-3. مفردات دوافع العمارة المؤسساتية:

كما استخلصنا فان هدف المستثمر الاول هو الربح والعائد المادي، و لغرض تشكيل اطار نظري معماري لتحليل العينات، يمكن ترجمة مفردات تنافس المستثمر (الابتكار، الكفاءة و الخدمة) الى المفردات الاتية:

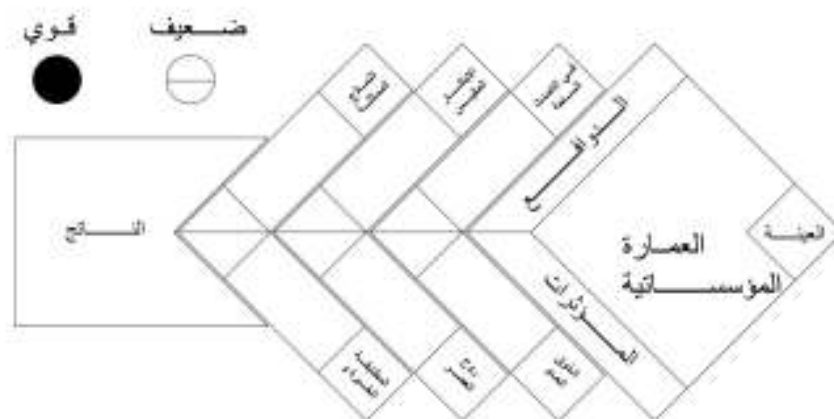
- **الخدمة /الاحداث في الساحة:** فالافكار غير متوقعة و الجديدة تنثير فضول الشخص. بدت نماذج الحدائث المبكرة غريبة إلى ناس تعودت على هندسة القرن التاسع عشر المعمارية، "فقد اذهلت العالم بأفكارها المتطرفة و الجديدة" (1) يمثل دخول المواد الجديدة و الاشكال الزجاجية في الواجهات المعمارية على سبيل المثال ابتكارا في مجتمعات لم تتعود هذا النوع من الواجهات.

- **الابتكار/الابتكار المقيس:** اللجوء الى التراكيب تجريدية بدون الحاجة للقلق حول نوعية الهيكل أو مجاملة حاجات فسلجية ونفسية إنسانية. أي أسلوب معماري بسيط بشكل بصري يعرض منفعة تجارية عن طريق المنفعة الذي يعتبر عامل رئيسي في تشكيل هذا النموذج، الارخص والاسرع في التنفيذ وبما يطابق معايير المؤسسات الاستثمارية هو الحل الامثل لانجاز المشروع وفق الفتره الزمنية المحدده.

- **الكفاءة/ النماذج المماثلة:** الاعتماد على الامثلة المنفذه سابقا من قبل المؤسسه المعنيه او ما يماثل المشروع المزمع انجازه، فيسبب الجداول الزمنية و الرغبة في تقليص المصاريف يتم الاعتماد على امثله مشابيهه منفذه لنفس المؤسسه مع التحويرات البسيطة لهذا السبب و لان الموارد البشرية والانتاجية مهيأة و مدربة وفقا ما نفذ عليه المثال المشابه.



الشكل (2): دوافع و مؤثرات العمارة المؤسساتية على الشكل الناتج. المصدر (الباحث)



الشكل (3): نموذج تحليل العينات. المصدر (الباحث)

المحور الرابع: الأطار العملي

1-4. معايير الاختيار:

اعتمد معيار اختيار البحث للأمتلة على محددتين أساسيتين:

الأول: وقوع المثل في المراكز عالية القيمة العقارية من مدينة بغداد، كون علو قيمة العقار يفرض واقعا ربحيا حول المردود المادي وقيمة المنشأ المزمع تشييده و كذلك القيمة المعنوية للمنطقة وارتباطها الذهني لدى المجتمع.

الثاني: واختيار الأمتلة متعددة الطوابق (إبراج السكن أو الإدارية و التجارية) لأهميتها ضمن اجندة الاستثمار الخاص، و باعتبارها ستشكل ملحا بصريا واضحا في سماء بغداد و تمتلك من المساحة و الكتل ما تجعلها أرضا خصبة للعديد من الأفكار والتشكيلات الكتلية التي من الممكن توظيفها في المشروع.

1-1-4. العينة (A) برج داماك السكني -2- / بغداد/ المنصور- الاميرت:

وصف المشروع/ سكني

يقع المشروع في منطقة الاميرت في بغداد ضمن نسيج سكني ويتبع الى شركة داماك العقارية و مقرها الرئيسي دبي بعد استحصال الموافقات الخاصة في امانة بغداد في العام 2012، تبلغ مساحة قطعة الأرض 1000 متر مربع و استغلال مساحة أرضيه بمقدار 750 متر مربع، يتكون المشروع من 26 طابقا مرتبه كالآتي، (الشكل 4):

• الأرضي: مداخل بسيطة المساحة مع كامل الخدمات الميكانيكه و التشغيلية موزعة في الطابق الأرضي. اعتماد هذا التوزيع جاء نتيجة محاولة الشركة تجنب توزيع الخدمات في السرداب لأسباب اقتصادية و فنية.

• الأول الى الخامس: مواقف سيارات سكان المبنى.

• السادس الى الخامس والعشرين: شقق سكنيه بواقع اربع شقق للطابق كاملة الموصفات، بهو الطابق كالأرضي صغير ومختزل المساحة دون اضافات طبيعيه

• السطح: نادي رياضي و منازل ومسبح صغير الحجم كخدمات مرفهه لسكاني البنايه.

اما الواجهات(الشكل 5) يتبين بها استخدام العناصر المتكررة و التقطيعات الاقيه المميزه للمفهوم الشكلي للإبراج السكنيه المتعددة الطوابق مع استخدام مباشر وشكلي للعناصر التقليدية والإسلامية المألوفة لدى المتلقي "قبة و اقواس اسلامية" في اعلى البنايه كنوع من التعريف في اعلى نقطة.

عند تحليل المشروع نجد ان الشركة المستثمره هنا اعتمدت على ما هو مألوف من معالجات و علاقات شكلية لبناء ما يمكن ان نسميه واحده من اول التجارب السكنيه الاستثماريه المرفهه في مدينة بغداد، الا ان البنايه يمكن وضعها في اي دولة او مدينة دون وجود احساس التواصل مع النسيج او تاريخ المدينة حالها حال اي مشروع استثماري اخر، (الشكل 6) يوضح مقارنة المبنى مع مجموعة من الابنيه المماثله في منطقة الخليج العربي.

اكتضاض العلاقات الشكلية و عموديتها جاء من صغر المساحة المستثمره لهذا مشروع مع اختزال كل الخدمات التكميلية و الاهتمام بمفردات الشقه كونها الغرض الاساسي من التسويق، فالمستثمر يريد الوحدة السكنيه الافضل ضمن المساحة المعطاة له. وكانت احدي المشكلات الرئيسية عند استحصال الموافقات النهائيه من اللجنة المعمارية هو تغيير الواجهات للتلائم المشهد الحضري و روح مدينة بغداد، جاء اعتراض الشركة المستثمره من منطلق "ان التصميم النهائي و التفصيليه منتهيه وجاهزه اساسا من المقرر الرئيسي في دبي (12)، يوضح هذا السبب ان الشركة تعتمد على معاييرها ومشاريعها السابقه والتي تلائم فرق العمل التنفيذي الخاصه بهم لتوفير كلا من الوقت وكلف التصميم و جهود الانتاج وفق معايير جديد.

النتيجة: مشروع يمثل الامتداد المنطقي والعملي في تصميم الإبراج السكنيه من خلال تعميم النموذج العمودي المقيس و المتكرر باستعارات منقوله يمكن وضعها في اي رقعه جغرافية.

1-1-4. العينة (B) الادارة العامة لمصرف الشرق الاوسط -2- / بغداد/ الكرادة- عرصات الهندية:

وصف المشروع/ اداري

يقع المشروع في منطقة عرصات الهندية قرب الشارع الرئيسي في بغداد ضمن نسيج تجاري مختلط ويتبع مجموعه مصارف الشرق الاوسط و شركة ابداع الشرق الاوسط للاستثمار العقاري و مقرها الرئيسي بغداد، صمم المشروع مكتب المهندس المعماري عدنان اسود في ابو ظبي في العام 2009 و هو قيد الانشاء حاليا. تبلغ مساحة قطعة الأرض 1500 متر مربع و استغلال مساحة أرضيه بمقدار 1050 متر مربع، يتكون المشروع من سبعة طوابق متضمنة الأرضي مرتبه كالآتي، (الشكل 7) وتتوزع الفعاليات الادارية على جميع الطوابق. مر المشروع بمرحلتين:

الأولى: صممت البنايه على اربعة طوابق فقط بتصميم بسيط للواجهات مكون من واجهات زجاجيه مسطحة و مقسمه الى مربعات تحدد قطع التغليف مع تقسيم افقي واضح لكل طابق تمثل التمثيل الاكثر مباشره للمباني الزجاجيه دون اي تفاصيل معماريه اخرى ملفته للنباه او الاشارة اليها. (الشكل 8)

الثانية: قرار المؤسسة الاستثماريه بسبب ارتفاع قيمة الأرض وخطة التوسع المستقبليه الى اللجوء الى مكتب محلي للتحويل على التصميم، التحويل حدد بشكل مباشر بزيادة عدد الطوابق الى ثلاثة اضافيه ليصبح المجموع الكلي سبعة طوابق مع الاحتفاظ على الشكل المعماري المصمم في المقترح الاول "لاعجابهم الشديد بجدائة وبساطه الفكرة و ارتباطها بالمعمارة المعاصره في الخارج" (13) (الشكل 8)

النتيجة: رغم ان المشروع هو لمنفعه المؤسسة الشخصية الا انها لم تطرح رؤيتها المؤسساتيه بطروحات معماريه مبتكره و اختصرتها بفهوم الزجاج العاكس المعاصر النمطي.

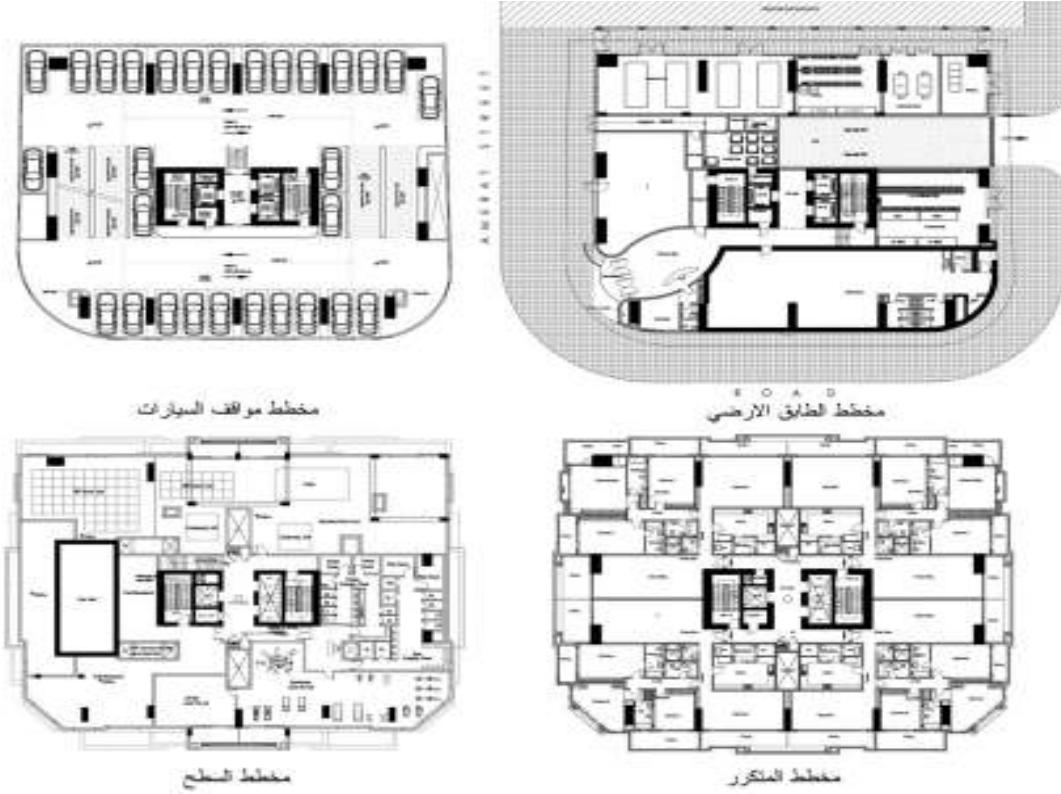
1-1-4. العينة (C) مول بغداد / بغداد/ الحارثية:

وصف المشروع/ طبي-تجاري-ترفيهي-فندقي

هي واحدة من ابرز المشاريع المؤمل انجازها قريبا في منطقة الحارثية و تمتاز بشمولية خدماتها و موقعها الاستراتيجي المميز في مركز بغداد عند ركن شارع الكندي و يقابل معرض بغداد الدولي، و يجاور منتزه الزوراء السياحي مما يجعلها مرشحا قويا كواحدة من اقوى نقاط الجذب الاستثماري في المنطقة. ينفذ المشروع الذي من قبل شركة (تيفروم) التركية بمساحة (15850) م² يضم مجمعا طبيا و الجزء التجاري و التسويقي و مبنى طوابق سيارات متعدد الطوابق برج فندق مكون من ثلاثين طابقا. (14).

يمثل الشكل العام للمبنى هو البرج الزجاجي الاسطواني والذي يمثل كتلة الفندق المكسو بالواح الزجاج الخضراء و و التقسيمات الطولية في الواجهة الاخرى و التي تمثل الامتداد العقليلمفهوم الإبراج الزجاجيه الحديثه من استثماريه وبساطه التفصيل والاعتماد على التقييس العقلاني في تقسيم الزجاج الطوابق، (الشكل 9)، كتل المركز التجاري والمرآب والعيادات اعتمدت على التقسيم الافقي للوجهات واعتماد التفاصيل الحديثة من كاسرات و تغليف الواح الالمنيوم و الاعتماد على كتلة بشكل قطاع اسطواني مكسو بنفس مادة البرج لتعريف المدخل في ركن الموقع، (الشكل 10)، ومخطط الموقع يوضح استغلال الشركة المستمرة بشكل كفاء الأرض المخصصه لهم من حيث تقسيم المشروع الى فعاليتين رئيسيتين، الجزء الجنوبي الغربي خصص لمواقف السيارات لحل مشكلة مواقف السيارات وضمان مردود مادي ثابت من هذه الخدمة، و الجزء الشمالي الشرقي خصص للمركز التجاري و المدخل الرئيسي يمكن تشخيص احتواء المخطط على مفاهيم المراكز التجارية الحديثه من تكامل الخدمات و ووضوحها و التنوع في تصميم انماط الارضيات والحدائق، الشكل (11).

النتيجة: استغلال المساحة و توفير كافة الخدمات مع تصميم كتلة الركن , رافقها اعتماد التغليف بالزجاج العاكس والبرج الزجاجي مع تغليف الألمنيوم المقيس و الكتل الضخمة و المسطحة, المشروع امتداد للمراكز التجارية المعاصره بدون اي سمه معماريه مبتكرة.



شكل (4) مخططات برج الاميرات 2/ المصدر (12)

شكل (5) مقترحات برج الاميرات 2/
المصدر (12)



شكل (6) من اليمين الى اليسار/ برج الاميرات
في بغداد-برج تجاري في دبي/ ابراج سكنيه في
دبي (الباحث)





شكل (7) مخططات مقر مصرف الشرق الأوسط / المصدر (13)



شكل (8) مراحل تصميم مقر مصرف الشرق الأوسط / المصدر (13)



شكل (9) منظر جوي لمول بغداد، برج الفندق الزجاجي.
المصدر (16)



شكل (10) منظور للمنطقة الفاصلة بين
المواقف والمبنى الرئيسي. المصدر (16)

الاستنتاجات

- تعتبر مدة الاستثمار واحدة من أهم الالتزامات المؤثرة في قرارات المستثمر، فهو يريد أن تعمل بنايته لمدة خمسة وعشرون أو ثلاثون سنة دون أن تفقد بريقها أو تقبلها من قبل المجتمع ومما يعني له ضمان استمرار الأرباح من مشروعه الاستثماري. هذه الدوافع تلعب دوراً قوياً مع مفاهيم الموضه و الصرعه في جعل المصمم المعين من قبل المستثمر يستخدم الأفكار الأكثر قبولاً وانتشاراً التي تضمن له قبول المشروع من قبل المؤسسة الاستثمارية واعطاؤه الضوء الأخضر للاستمرار.
- من الممكن أن تكون التكوينات الناتجة جديدة ومبهرة، وإن عصرية هذه الممارسة شيء جيد بالمقابل في هذه السوق المتنامية. ولكنها في النطاق المحلي تدعني التحول (و من الممكن الإزالة) للعلاقات التقليدية من خلال زرع هذه الأشكال و التي من غرضها التسويق، وبذلك فإنه يسبب خسارة هائلة من معنى النسيج الثقافي للمدينة.
- الوضوح في العلاقات والبساطة في التفاصيل و المبالغة في تسطيح الكتل و الاستعارات المباشرة كلها سمات اشتركت بها العينات مع العديد من الأمثلة التي نشهدها يومياً على الساحة المعمارية والتي من الممكن أن تؤثر باستمرار إنتاجها من قبل قطاع الاستثمار الخاص على قطاع الاستثمار العام وبالنتيجة على رؤية الدولة المستقبلية حول النهج المعماري المتبع مستقبلاً و خطط التنمية العمرانية للحكومة، كون هذه المشاريع تعتبر لدى الهيئات المسؤولة عن إقرارها "مشاريع ناجحة!".
- الاعتماد على الخبرات المبتدأة و التصاميم المصممة سابقاً هي نتيجة رغبة المؤسسات الاستثمارية إلى توفير وقت التصميم و التقديم مما سبب فجوة بين طبيعة المشاريع المقدمة و نسيج موقع المشروع، يسبب هذا الحل عدم وجود البديل أو جرأة الطرح أو المقيم الخبير مما يؤدي بدوره إلى اتخاذ القرارات المعمارية الآمنة للجهات المصممة لأجل تحقيق تقبل الفكرة و سيولة المردود المادي وانجاز العمل بأقل العقبات و الانسجام مع خط الذوق العام.
- انعدام طرح الرؤى الجديدة و الأفكار المقدمة في المشاريع المقدمة يؤدي بدوره إلى انعدام كلا من التنافس على المستوى الشكلي والتصميمي "التنافس الذي يؤدي إلى إنتاج عمارة متجددة" و بالنتيجة انعدام الأمثلة التي يمكن أن تدرس و تحلل مستقبلاً و تصبح جزءاً هاماً من نسيج المدينة يعبر عن مدينة بغداد في مرحلة ما بعد العام 2003 ، و حيثيتها تغدو عمارتنا نسخه ممسوخه من تجارب اجنبيه لا تشكل اي اضافة تذكر على المشهد المعماري العراقي و النسيج البغدادي المعاصر .
- يكاد يكون دور المصمم كشخصية فردية في التصميم ضائعاً في مقررات المؤسسة الاستثمارية، فالمشروع يصمم تحت عنوان المستثمر و هو عنوان تطلعه، ضياع الشخصية المعمارية و اللامسه الشخصية يجعل من الناتج المعماري حصيلة نتاج اداري اقتصادي ربحي يمثل تطلعات المستثمر .

4-1-4. العينة (D) مول الاميرات / بغداد/المنصور-حي الاميرات:

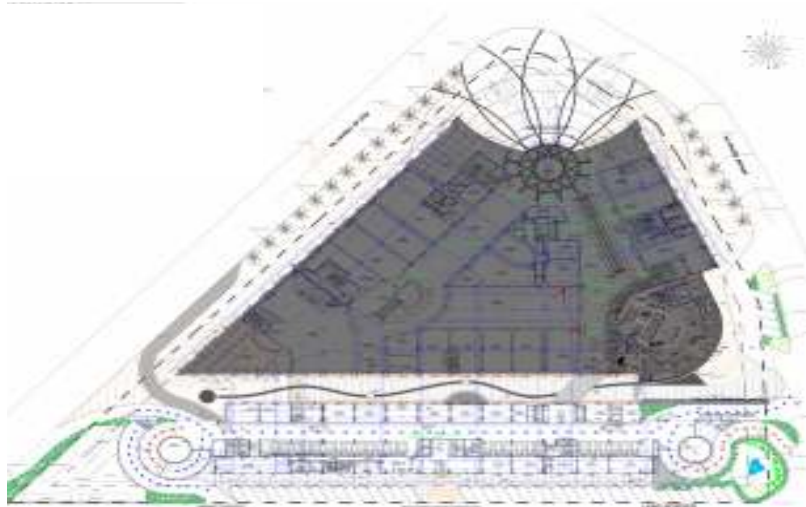
وصف المشروع/ تجاري-ترفيهي

يقع المشروع في منطقة الاميرات في المنصور مقابلاً لمشروع جامع الرحمن على الشارع الرابط بين المنصور و المأمون، يقع على قطعة ارض مساحتها 18290 متر مربع و بمساحة بناائية تبلغ تقريباً (17500) متر مربع، غرض المشروع انشاء مركز تسوق تجاري كمشروع استثماري بعد منح مصرف الاقتصاد في العام 2007-2008 قطعة الارض من قبل أمانة بغداد كمساحته لمدة خمس و عشرون سنة. يتكون المشروع من ثلاث مكونات رئيسية (الجزء التسوقي و جزء الكافتريات والسينما) (الشكل 11). اما الطابق الاخير فخصصت لتأجيرها كمكاتب تجارية وادارية. اعتمدت الشركة المصممة على مخططات مشروع مصمم مسبقاً ارسل اليهم من مدينة دبي بالتنسيق مع الشركة المصممة شركة الاقتصاد و التنمية للاستثمارات العقارية المحدودة" بحجة قلة خبرة المكاتب المحلية في مجال تصميم المراكز التسوقية ولتوفير الوقت لغرض استحصال الموافقات ضمن مدة المساطحة المعطاة (15). يمتاز التصميم بالانغلاق و اعتماد تركيب بين الشكل الدائري و المستطيل مع توفير مساحات خارجية للحدائق و مواقف السيارات فرضت من قبل الامانة. الشكل النهائي لمبنى جاء بسيطاً اعتمد على رفع الكتل كما هي وتغليفها بمادة الالمنيوم الفضي مع تقسيمات افقيه للشبابيك في الطوابق العليا. الشكل (12).

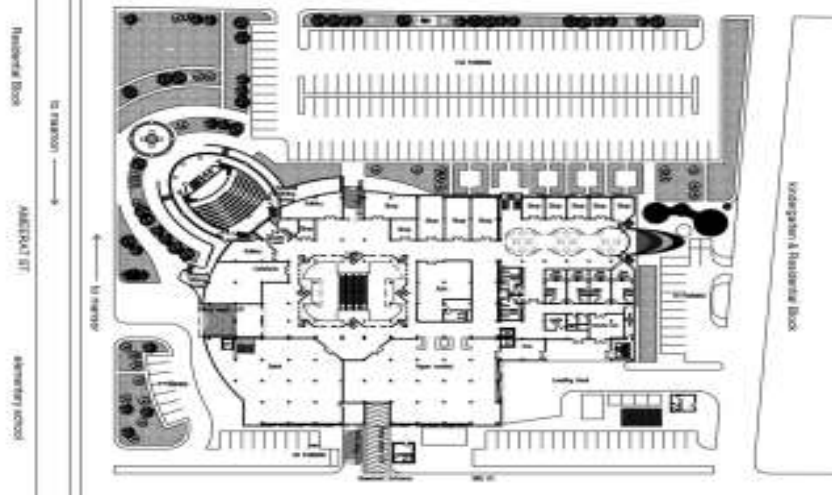
النتيجة: بنايه مسطحه و مغلقه في تعبيرها الاقتصادي و الوظيفي اعتمد مفهوم الحدائث على دخول مادة الالمنيوم كمادة جديدة على الساحة العراقية المعمارية كمادة تغليف، كان من الممكن للتصميم ان يكون البذرة الاولى في انشاء اول مول تجاري حديث في مدينة بغداد.

4-2. تحليل العينات

- بعد استعراض العينات و تحليل اهم مميزاتها يتجلى واضحا الاتي:
- بساطة العلاقات الشكلية و انحصار الافكار في مرحلة الابهار الجمالي و الاعتماد على مفردات روح العصر من زجاج عاكس و تقسيمات افقيه
 - التناظر و الضخامة في المقياس و الاعتماد على تفاصيل المقيسه من كاسرات الافقيه و العناصر الهيكلية الحديدية.
 - الاستعارات الشكلية السطحية في بعض الاحيان من قبب او اقواس اسلاميه يمكن لها ان تعمل في اي جو يحمل نفس المعايير الاقليمية.
 - في المقابل، اختفاء توظيف العناصر المعمارية المستعارة من القيم التاريخية لمدينة بغداد و بافكار تمتاز و الحدائث ترتبط ارتباطاً وثيقاً بمدينة بغداد و مردودها الثقافي والتاريخي.
 - توظيف العناصر الزجاجيه وباسلوب سطحي و تقليدي المعالجه التكنولوجيه، صرعه لا تلائم الاجواء المناخيه المتطرفة للعاصمه في ظل التقلبات المناخيه الواضحه.
 - اعتماد النماذج السابقه و المصممة لتوفير جهود الوقت وكلفة التصاميم. (16، 17).
- بروز الاهداف الربحيه للمؤسسات العقاريه استندت على رغبة المجتمع الحثيثة في اللحق بركب التطور في الخارج، هذا التطور الممثل لهم ببضع كتل زجاجيه و انيقه لا تمثل اي اضافة على سماء المدينة، هذا الاستناد عزز تحقيق المتطلبات الاقتصادية والربحيه في تسويق المؤسسة المستثمره لمنتوجها المعماري والذي سيكون نقطة بدايه للعديد من النتائج اللاحقه عند نجاح استثماراتها العقارية، تشكل لاحقاً بدايات مفهوم العمارة المؤسسيه المقليل لمدينة بغداد. والشكل (14) يوضح اشكال تحليل العينات بالتسلسل.



شكل (11) مخطط الطابق الارضى – مول بغداد.المصدر (14) الشكل (1): الاستثمار و العمارة المؤسسية. المصدر (الباحث)



شكل (12) مخطط الطابق الارضى- مول الاميرت/ المصدر (15)



شكل (13) الواجهات الخارجية- مول الاميرت/ المصدر (15)



شكل (14) تحليل العينات / (الباحث)

10. الجسار، إشراق نضال داود (2001). الفروقات الشخصية للزبون و اقتناعه بتصميم المشروع المعماري. رسالة ماجستير، كلية الهندسة، الجامعة التكنولوجية.
11. بانهام، رينر. (1989). عصر أساطين العمارة، وجهة نظر خاصة في العمارة الحديثة. ترجمة: سعاد عبد علي مهدي، دار المأمون للترجمة و النشر، بغداد. ص7.
12. داماك العقارية، فرع بغداد، لقاء شخصي.
13. ابداع الشرق الاوسط العقارية، بغداد/العراق، لقاء شخصي.
14. أمانة بغداد، الموقع الالكتروني الرسمي:

<http://www.amanatbaghdad.gov.iq/ArticleShow.aspx?ID=3179>

15. الاقتصاد والتنمية للاستثمارات العقارية المحدودة، لقاء شخصي.

16. <http://www.tefirom.com.tr/?lang=en>

17. موقع انشاء مول الحارثية، المهندس المقيم

التوصيات

- علينا أن نفهم كدوي اختصاص قدرات البناء لدينا والقواعد والقوانين التي تحكم مهنتنا. الا ان التحدي في ظل المتغيرات الاقتصادية و النظام الرأسمالي للمؤسسات الاستثمارية تواجه العمارة هي الحاجة الى المعرفة الوافية لمنتجات المؤسسات الاستثمارية واهدافها الخاصة، و التكنولوجيا ذات الصلة وعمليات التنمية . و حتى في مجال التقنية، والأنشطة الرئيسية الخاصة، وتشمل الأنشطة توضيح الرؤية والعمارة، وتصور وتجريب أساليب معمارية بديلة.
- يواجه المعماري في مواجهة دوافع العمارة المؤسسية الربحية، عدد من التحديات تخدم التي ترتبط اغلبها بما يخدم مصالح المؤسسة و اهدافها الربحية، لذلك فالمهندس عليه دور في توضيح الرؤية المعمارية، وتصور وتجريب أساليب معمارية بديلة، وخلق نماذج ومكونات ومواصفات واجهة المستندات والتحقق من صحة العمارة ضد متطلبات المؤسساتو افتراضاتها.
- لا يقتصر دور مهندس من ذوي الخبرة على الأنشطة الفنية فقط، ولكن ايضا يتضمن ادارة المسارات السياسية والاستراتيجية من جهة، و التواصل مع الخبراء الاستشاريين، من جهة أخرى.
- على الجهات الحكومية المسؤولة عن اعطاء الضوء الاخضر للمشاريع الاستثمارية العودة الى ذوي الاختصاص من المماريين ذوي الخبرة والتجارب الرصينة في تقييم المشاريع المقدمة و ووضع منهج تصميمي معماري سليم القواعد يحد و ظاهرة تجريد العمارة من قيمها بحجج الاعتماد والخبرة الاجنبية وسرعة تحقيق التقدم العمراني.

المصادر

1. Erbay M. and SengulOymen G. (2010). Universal “memes” of the global style in architecture and the problems of identity and place. Sci. Res. Ess. 5(11): 1357-1369.
2. راتب، نجلاء عبد الحميد. (2010). الاقتصاد والمجتمع. مقرر دراسي، استاذ مساعد علم الاجتماع، كلية الاداب، جامعة بنها.
3. جردان، طاهر حيدر (1997). مبادئ الاستثمار. دار المستقبل للنشر والتوزيع. الاردن. ص13.
4. الحمود، غدير بنت سعد. (2004) العلاقة بين الاستثمار العام والخاص في اطار التنمية الاقتصادية السعودية. رسالة ماجستير، كلية العلوم الادارية، جامعة الملك سعود.
5. قانون الاستثمار العراقي، قانون الاستثمار رقم (13) لسنة 2006.
6. Enterprise architecture http://en.wikipedia.org/wiki/Enterprise_architecture
7. Booz&co. Building Value through Enterprise Architecture,a Global Study. http://www.booz.com/media/uploads/Building_Valu_e_through_Enterprise_Architecture.pdf
8. Paralle Nipon-Contemporary Japanese Architecture 1996-2006. (2007). Shinkenchiu-SHA Co., LTD,p:18.
9. ابراهيم، عبدالله (2010). علم الاجتماع(الموسولوجيا). المركز الثقافي العربي، الطبعة الثالثة. ص20.

INTERNATIONAL JOURNAL of Science and Technology (IJST)**Aims and Scope**

International Journal of Sciences and Technology (IJST) is an international scope journal. The journal is edited by an international recognized Editorial Board. It is published online and printing hard copies every three months.

IJST publishes original research papers on all aspects of science and technology including scientific disciplines of Microbiology, biotechnology, cell biology, ecology, entomology, environmental science, forestry, genomics, horticulture, animal science, plant sciences, proteomics, agricultural and food science, biostatistics, biological sciences and bioengineering, computer science and engineering and water resources.

Authors are required to sign a Copyright Form granting the publishing rights for all papers accepted for publication. Production will not start until we have received of a signed Copyright Form available at <http://www.icast-jo.com>

General Instructions

IJST will publish original full papers, short research communications, and letters to the editor. Full papers should be concise without compromising clarity and completeness, and should generally occupy no more than 10 published pages. Short research communications should not be more than 5 printed pages (excluding references and abstract). Results and Discussion section should be combined followed by conclusion. Materials and Methods will remain as a separate section.

Submission of Manuscripts

Authors are required to submit their articles to IJST online for quick and more efficient processing at <http://www.ijst-jo.com>

Prior to submission, Authors may contact the EDITORIAL BOARD SECRETARY to inquire about the suitability of their work at: ijst.jordan@yahoo.com

Preparation of Manuscripts**Language**

Papers must be written in English and in Arabic, in both cases abstract in second language require. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Manuscripts that are deficient in this respect may be returned to the author for revision before scientific review.

Presentation of Manuscripts

- * Title
- * Author names and addresses
- * Abstracts (Not more than 250 words)
- * Key words
- * Introduction
- * Materials and Methods
- * Results and Discussions
- * References (Use numbering in the text instead of full references.
Give full references at the end of the manuscript
- * The photographs should be of high quality resolution
- * Graphs should be in clearly visible form so that it may become easy to redraw

The manuscript should be prepared using Microsoft Word with the following layout.

1. Manuscript should contain title page, abstract, main body, and references.
2. Tables should be added after references and each new table should be on a separate page.
3. Figures should follow the tables, putting each figure on a separate page ensuring that the figure is at least the size it will be in the final printed document. Number each figure outside the boundary of figure. Resolution of the figures should be at least 400 pixels/cm (1000 pixels/in).
4. Number manuscript pages consecutively and activate line numbering.
5. The manuscript should be double-spaced. The beginning of each new paragraph must be clearly indicated by indentation. Left-justify the text and turn off automatic hyphenation. Use carriage returns only to end headings and paragraphs. Artificial word breaks at the end of lines must be avoided. Do not insert spaces before punctuation.
6. Please use standard fonts such as Normal Arial. Use consistent notations and spellings
7. Please follow internationally accepted rules and conventions for gene and protein names, units, for symbols, and for capitalization in text, tables, and figures.

Title Page

The title page should include a concise and informative title, author names in full, and affiliations. The name of the corresponding author as well as his/her mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address should be provided.

Abstract

The abstract should be one paragraph, no longer than 250 words. No references should be cited in the abstract. Abbreviations should be avoided, but if they have to be used, they must be defined the first time they appear. A list of keywords (up to six) must be included after the abstract for indexing purposes. Words that appear in the title should not be repeated in the keywords.

General Arrangement of Text

The text should be divided into sections with the headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Subheadings within sections except introduction can be used to clarify their contents. Introduction and Discussion sections may contain present tense to convey generally accepted information. Materials and Methods and Results are normally written in the past tense.

1. Introduction

The introduction should define the problem and provide sufficient information to explain the background but there is usually no need for a comprehensive literature survey. The objectives should be stated but it should not contain a summary of the results.

2. Materials and Methods

Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. This section should contain the experimental protocols and the origin of materials, tissue, cell lines, or organisms.

3. Results

The Results section should be in logical order presenting the experimental results. Please do not include any interpretations, inferences, arguments or speculations in this section.

4. Discussion

The authors should interpret their results clearly and suggest what they might mean in a larger context. Please do not repeat the information provided in the Results section.

Acknowledgements

Assistance received from funding agencies and colleagues should be acknowledged in this section.

References

Published or “in press” articles may be included in the reference list. Unpublished studies should be referred to as such or as a personal communication in the text. Citations of references should be between brackets, e.g. (1,3,5-7). The lists of references, tables or figures should be numbered consecutively starting from 1. The references should contain the last names and initials of up to four authors, year of publication, title of the paper, and the title of the journal. These should be followed by the volume and page numbers. References to books should include the title of the book, the year of publication between brackets, the publishing company and the place of publication. Some examples are given below.

Smith PF.; Patel KR. and Al-Shammari AJN. (1980). An Alde hydro-Phosphoglycolipid from Acholeplasma granularum. Biochem.Biophys. Acta 617: 419-429

Sambrook J. and Russell DW. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

McCarthy AJ. (1989). Thermomonospora. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ed. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG), Vol. 4, pp. 2552-2572. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

If web site references are used, the URL should be included next to information in the text. Please check the references carefully for accuracy, missing information, and punctuations.

Example

Department of Health: The Interdepartmental Working Group on Tuberculosis 1999. The Prevention and Control of Tuberculosis in the United Kingdom [Online] [accessed 2000 September]. Available from URL <http://www.doh.gov.uk/tbguide1.htm>

Tables and Figures

Tabulation and illustration should not be used for points that can be adequately and concisely described in the text. Tables and figures should be understandable on their own without reference to the text. Explanatory footnotes should be related to the legend or table using superscript lower-case letters. All abbreviations should be defined after the footnotes below the table or by reference to a previous table in the same paper.

Review Process

The Journals aim at rapid publication of research results while maintaining a rigorous peer review process. The editors will provide an initial response to all pre-submission enquiries within a week. In addition, they will make every effort to give authors a decision following peer review within four to eight weeks of an article's submission. If the review process takes longer due to special circumstances, authors will be notified promptly by e-mail. Accepted articles will be published online within two weeks. Suggestions by the editors about revision do not imply that a revised version will necessarily be accepted. If minor revision is required, authors should return a revised version in two weeks. If major revision is required, authors should return a revised version within three months. You must clearly indicate the changes that have been made. Revised manuscripts that are not resubmitted within the indicated time frames will be treated as a newly submitted manuscript. Authors who disagree with Editor's decisions may contact the Chief Editor for final decision. The Editor and the Publisher are not responsible for the scientific content and statements of the authors of accepted papers.

Proofs

Manuscripts should be checked carefully before submission since substantial alterations will not be permitted at the 'proof' stage. The editors reserve the right to make minor alterations to the text without altering the scientific content. Corrections should be sent to publisher in one communication. If corrections are not received within 48 hours, publisher reserves the right to proceed with publication.

Reprints

Reprints may be ordered in quantities of 30 using the form supplied with the proofs.

Publication Charges

Because the IJST is auto- self dependent, we will ask the author to pay US\$200.00 as publication charge.

Ethical Issues

It is assumed all authors have approved the submitted manuscript, which is the responsibility of corresponding author. If accepted, the article must not be published elsewhere in any form, without the consent of the editors and publisher.

Reproducing Published Articles

Individuals wishing to reproduce figures, tables and excerpts of text from articles published in IJST for non-commercial purposes may do so providing the original publication is acknowledged accordingly and the authors' approval is obtained, and in this case no special permission is needed from either the publisher or the editors. Authors may also include the article in a thesis without special permission. In all other cases, permissions may be sought directly from IJST.

N.B The views expressed in this issue are of the authors and do not necessarily reflect the views of the Editorial Board or the policies of the International Centre.

Copyright © 2014 by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or copied in any form or by any means without prior written permission from the Editor-in-Chief of the Journal.