

IJST

INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

Vol.(9),No.(2) JUNE 2014

SJIF:3.735 / 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 والتكنولوجيا

Volume 9. No. 2/ June 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 second 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, 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

Dr. Amer Al- Sarraj

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

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 pruning and spraying Grofales and Zeatin on some vegetative characteristics and quality of fig tree cv. "Waziri" (Ficus carica L.)** 7-11
Abbas M.S. Al- Hameedawi, Ali H. Jasim & Nada S. A. Al- Mousawy

BIOCHEMISTRY

- Impact of oxidative stress on global DNA methylation in sperms of infertile men** 12-17
Mayssaa A. Al- Hilaly, Estabraq A. Al-Wasiti & Anam R. Al-Salihi
- Serum iodine and lipid profile in patients with thyroid diseases** 18-21
Samer A. Muhi & Mohammad D. Abdulhuassain

COMMUNICATION ENGINEERING

- Applied DWT Haar Filter to secure FHSS signal** 22-28
Jameela L. Abid

DAIRY SCIENCES

- Isolation of β -lactam resistant *streptococcus pyogenes* (GAS) from soft cheese in Baghdad markets** 29-31
Nadia I. Abdulaal

ENGINEERING

- Stabilized synthesis of nanoparticle Gamma-Alumina at 1200 °C extracted from Iraqi kaolin** 32-37
Fadhil A. Rasin, Intisar A. Hamad & Marwa A.M. Hassan

FOOD SCIENCES

- Heavy Metals in Canned, Fresh and Frozen Fish from local Iraqi Markets** 38-42
Salim Al- Tamimi & Sundus H. Ahmed

MEDICINE

- Awareness regarding self-care practices in type 2 diabetes mellitus patients attending Diabetic center of AL Mustansyria University** 43-49
Maral F. Thabit, Shaimaa H. Mahmood & Yousif Abdul Raheem
- Indications and outcomes of Intra Cytoplasmic sperm injection attempts in Al -Sader Fertility Center in Al-Najaf Governorate during 2012** 50-55
Maral F. Thabit, Ghusoon A. Shaker & Raed Al-Gareawy
- Respiratory distress of newborn infants in Baqubah-Diyala- Iraq** 56-60
Dawood S. H. Al- Azzawi & Nebras G. Jasem

MICROBIOLOGY

- Molecular evaluation of antibiotic resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhi from Iraq** 61-65

Atheer A R. Al- Douri , Harith J. F. Al-Mathkhury, Maha F. Almelan, Modhafar Q. Saber, Kifah A. Jasim & Abdul Jabbar N. Al-Shammari

- Virulence Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic sinusitis** 66-71

Hiba T. Al- Hamashee

PHYSICS

- The effect of Carbon layer thickness on the electrical and optical properties of Si-CNT Junction** 72-76

Anwar M. Ezzat, Bassam M. Mostafa & Mohammed M. Younis

PHYTOCHEMISTRY

- Evaluation of in- vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of cumin seed** 77-80

Salwa Khudadad, Sundus H. Ahmed & Mohammed K. Mousa

ARABIC SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)**الطب البيطري**

- 84-82 دراسة تصنيفية لأنواع القراد المتطفل على الأبقار في محافظة الأنبار
عز الدين عطية البيار

علوم البيئة

- 91-85 تقييم فعالية مستخلصات رايزومات الزنجبيل في إزاحة الجذور الحرة المتولدة عن مادة DPPH
محمد خليل موسى، سندس حميد أحمد، عبد القادر هادي

- 97-92 تلوث المياه المعبأة بالفطريات وتحديد علاقتها بالاستعمال المتكرر للعبوات البلاستيكية
أمير خضير عباس، إيمان عباس خلف، عصام شاكر حمزة، سلمان عبود حمود، فرقد فرحان عبد الحميد،
سارة خطاب إسماعيل

- 102-98 معالجة بعض الفطريات السامة المعزولة من المياه العراقية بالمحتوى الفينولي الكلي لمستخلصات نبات السعد
Cyperus rotundus وبطرق استخلاص متنوعة
صبا رياض خضير الطائي، لبيب أحمد الزبيدي، إنعام نوري علي

العلوم الزراعية

- 108-103 استجابة نبات القرنفل *Dianthus coryophyllus* L. للرش بمستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C
في صفات النمو والإزهار
جمال احمد عباس، مشتاق طالب حمادي الزرفي، صفاء نمير الفتلاوي

الكيمياء الدوائية

- 114 -109 الفعالية التنشيطية للمستخلص الكحولي لقشور وبذور نبات *Cydonia oblonga* السفرجل على نمو بعض
الأنواع البكتيرية الممرضة
رنا علي حسن سلمان

ENGLISH SECTION

Effect of pruning and spraying Grofalcs and Zeatin on some vegetative characteristics and quality of fig tree cv. "Waziri" (Ficus carica L.)

Abbas M.S. Al- Hameedawi (1) Ali H. Jasim (2) and Nada S. A. Al- Mousawy (3)

(1)Faculty of Agriculture / Kufa University (2) Faculty of Agriculture / University of Baylon (3) Teacher Institute of Al- Qadisyah / Republic of Iraq

ABSTRACT

An experiment was conducted in a private Orchard at Abbasyia , Najaf Governorate during the growing seasons of 2011/ 2012 on fig cv. Waziri . The branches aged one year old were pruned at level of (25,50 %) and subjected to spraying Grofalcs and Zeatin at concentrations of 250 mg/L for the two growing seasons .Results showed that pruning treatments, spraying Grofalcs and Zeatin treatments and their interactions caused a significant increase GA3 , IAA , Zeatin, total chlorophyll in leaves, total yield of tree, total soluble solids, vitamin C, and fruit firmness, while caused decrease in fruit fall and fruit cracking percentage compared with control treatment . There were significant effects between treatment . Treatment of pruning of branches aged one year old as 50% + spraying Grofalcs and Zeatin, in concentration 250 mg / L gave a significant effect and the best results for the two years of experiment .

Keywords: pruning , Grofalcs , Zeatin , Fig.

الملخص باللغة العربية

تم إجراء تجربة في أحد البساتين الخاصة في ناحية العباسية في محافظة النجف للموسمين 2011 و 2012 على أشجار التين صنف وزيري حيث قصرت الأفرع بعمر سنة للموسمين بنسبة (25 و 50 %) ، وكذلك تم رش الأشجار بمادة Grofalcs و الزياتين بتركيز 250ملغم/ لتر لكل منهما بصورة مفردة أو مشتركة في منتصف شهر آذار ، وقد أظهرت النتائج أن معاملات التقليم ورش مادة Grofalcs و الزياتين والمعاملات المشتركة بينهما أدت إلى زيادة معنوية في محتوى الأوراق من GA3 و IAA و Zeatin والكلوروفيل الكلي و حاصل الأشجار الكلي وصفاته النوعية التي هي نسبة المواد الصلبة الذاتية الكلية وفيتامين C وصلابة الثمار ، كما لوحظ انخفاض في النسبة المئوية لتساقط الثمار وتشققها قياساً بمعاملة المقارنة . وكانت هناك فروقاً معنوية بين المعاملات التي تفوقت عليها المعاملة (تقليم الأفرع بعمر سنة بنسبة 50% + رش مادة (Zeatin + Grofalcs) بتركيز 250 ملغم/ لتر لكل منهما) في أغلب الصفات بإعطائها أفضل النتائج لموسمي التجربة.

INTRODUCTION

Fig trees are deciduous fruits that belong to genus "Ficus" and related to the Family "Moraceae". It is believed that its origin is Arabian Peninsula and spread to the subtropical regions. Fig fruits are affected 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).

As a result of one conducted study, it was noticed that the spraying of GA3 concentration (50 and 100 ppm) on fig trees cv. Aswad Diyala at depressed period reduced the proportion of fruit cracking and increased the firmness, leaf area, total chlorophyll, and percentage of carbohydrate. These results had matched the results of Byers *et. al.* when apple trees cv. Styman sprayed with GA3 concentration of 200 mg/L, which resulted in reducing cracking rate to 24.35%, while this ratio reached to 50.61% in the fruits of control treatment (2).

Another study resulted that spraying of GA3 at concentrations of (100 and 150 ppm) on pear trees in Egypt had increased the vegetative growth and fruit firmness (3).

Al- Dulaimi observed that pomegranate trees cv. Salami when applied at 200 mg/ liter GA3 increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and reduced percentage of cracking compared with control treatment (4). Al – Noumani found that spraying local apple after 50 days from full bloom with Grofalcs at concentrations of (200, 300 and 400) mg/L resulted in reduction of percentage of fruit dropping and cracking and increased total soluble solids, total sugar, vitamin C and firmness at ripening (5). Al- Hmeedawi *et. al.* noticed that spraying fig trees cv. "Waziri" after one week from rest period of fruits with Zeatin at concentrations of (100 , 150 mg / L) caused a significant increase in the leaf area, content of leaves of total chlorophyll, hormones, IAA, GA₃, and Zeatin compared to control treatment (6). Al- Uajjani noticed that the pruning of fig trees cv. Aswad Diyala at levels (25 and 50)% and spraying fig trees with BA at concentrations (100,150 mg / L) reduced the proportion of fruit cracking, percentage of dropping fruit and increased the total percentage of carbohydrate, total soluble solids, vitamin C and firmness of fruits compared with control treatment (7). Al – Hmeedawi and Al –Numani found that pruning trees of Fig cv. Aswad Diala at percentages (20 ,40 and 60)% 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 (8).

The current study aimed to investigate the effect of using pruning, Grofalcs and Zeatin on vegetative growth and fruits quality during ripening of fig trees cv. "Waziri".

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in a private farm at Abbasiya / Najaf Governorate for years 2011 and 2012 seasons on fig trees cv. Waziri, 36 at same size and growth trees were selected with 10 years old were that planted on (5 x 5 m.). They were watered every five days, and fertilized by Nitrogenous and phosphatic in two periods during March and May of each year at a rate of 500 g. per tree, as well as by manure for the two years. The experiment included 12 treatments with three replicates. The sample was selected according to Randomized Complete Block Design (RCBD), and the results were statistically analyzed according to LSD test at the probability level of 5% (9). The branches at age one year old were pruned at levels of (25 and 50 %) in 15th January 2011 and 2012 and the other trees were subjected to spraying with Grofalcs (discs of GA3 50% from the production of Green river company- India) and Zeatin at concentration of 250 mg/L for each in 15th March for both seasons. Spraying was done at early morning until wetness was full addendum. Tween 20 was added at concentration of 1cm³/L. as spreader material. The experiment involved the following 12 treatments:

- 1- control treatment (was not subjected to pruning or sprayed with tap water).
- 2- Pruning the branches aged one year old were pruned at level of 25 %.
- 3- Pruning the branches aged one year old were pruned at level of 250 %.
- 4- Grofalcs as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 5- Zeatin as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 6- (Grofalcs + Zeatin) as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 7- P 25 % + Grofalcs as foliar sprays at concentration of (205) mg/L.
- 8- P 25 % + Zeatin as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 9- P 50 % + Grofalcs as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 10- P 50 % + Zeatin as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 11- P 25 % +(Grofalcs + Zeatin) as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.
- 12- P 50 % +(Grofalcs + Zeatin) as foliar sprays at concentration of (250) mg/L.

The following measurements were done:

1. GA3, IAA and Zeatin in leaves (mg / Kg dry weight) according to (10).
 2. Total chlorophyll in leaves mg / 100g according to (11).
- Ten normal fruits were selected randomly in the 1st July for both years 2011, 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 of Juice were determined 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 total

cracking was calculated during the July and August for both seasons.

RESULTS AND DISCUSSION

The contents of GA3, IAA, Zeatin, and total chlorophyll in leaves

Tables (1 and 2) show that pruning at levels of (25 , 50 %) and spraying Grofalcs and Zeatin and combination treatments resulted in increase the contents of GA3 , IAA , Zeatin and total chlorophyll in leaves, with the highest rates (31.47, 24.83, 27.22) mg/ Kg dry weight and (23.15, 19.11, 17.37) mg/ Kg dry weight and (122.44 and 121.99) mg / 100 g in the treatment (P 50% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L) in comparison to the lowest values (15.80 , 15.62 , 13.17) mg/ Kg dry weight and (17.36 , 16.47 , 12.96) mg/ Kg dry weight and (113.21 and 151.43) mg / 100 g) in control treatment for the 2011 and 2012 growing seasons respectively . Above mentioned treatments led to the root system in absorption the nutrients elements in which some of them are parts of chlorophyll which led to increase its quantity in comparison control treatment . This process increases photosynthesis an activate plant growth which led to enhance hormones synthesis (12).

The percentages of dropping, total cracking and total yield of fruits fig.

Tables (1 and 2) show that pruning at levels of (25, 50 %) and spraying Grofalcs and Zeatin and combination treatments led to reduce the percentages of dropping and cracking of fruits and increase total yield of trees significantly compared with the control treatment that gave the lowest values (9.33 % , 16.00 % , 17.45 Kg/ tree) , (11.10 % , 13.64 % , 19.45 Kg/ tree) , while the lowest percentages (3.65 % , 5.09 %) , (4.00 % , 4.46 %) , and the highest yield(23.50 Kg/ tree and 24.76 Kg/ tree) in the treatment (P 50% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L) . The pruning and spraying with Grofalcs and Zeatin led to increase in the content of leaves from growth hormones and total chlorophyll , these led to increase the length and number of branches and carbohydrates in fruits .These factors were due to decrease the percentage of dropping and cracking of fruits and then increasing production of trees.

Total soluble solids , vitamin C, and firmness of fig fruits

Pruning and spraying with Grofalcs and Zeatin in single way or combination has led to significantly increase in the percentage of total soluble solids, vitamin C and firmness of fruits for the both seasons compared with the control treatment. The highest significance results were recorded with treatment (P 50% + (Grofalcs + Zeatin) 250 mg/L) , that gave

the highest percentages of total soluble solids, vitamin C and firmness of fruits , they were (19.43 % , 9.03 mg / 100 ml Juice and 0.374 Kg/cm²) and (19.07 % , 8.78 mg / 100 ml Juice and 0.428 Kg/cm²) comparison with (17.23 % , 8.18 mg / 100 ml Juice and 0.361 Kg/cm²) and (16.53 % , 7.50 mg / 100 ml Juice and 0.370 Kg/cm²) in control treatment for the two year of study, respectively . Increasing fruits from total soluble solids, vitamin C and firmness of fruits which results through pruning due to the fact that this compound reduce vegetative growth and thus encourages the accumulation of carbohydrate materials in fruits leading to increase the contents of these materials (13).

CONCLUSION

It could be concluded from this experiment that , pruning and spraying trees with Grofalcs and Zeatin in single way or combination led to increased in the content of leaves from GA3 , IAA , Zeatin , total chlorophyll ,and the content of fruits from total soluble solids , vitamin C , Firmness of fruits and total yield of trees and reducing percentage of dropping and cracking of fruits compared with control treatment for both growing seasons.

Table (1): Effect of pruning and spraying with Grofalcs and Zeatin on vegetative growth and fruits quality of fig fruits cv. Waziri for seasons 2011and 2012

	GA3 in leaves mg/kg Dry weight	IAA in leaves mg/kg Dry weight	Zeatin in leaves mg/kg Dry weight	Total chlorophyll mg / 100g	% dropping fruit	% Total cracking	Total yield Kg/ tree	% Total soluble solids	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²
Control	15.80	15.62	13.17	113.21	9.33	16.00	17.45	17.23	8.18	0.361
P 25%	17.03	18.00	14.71	114.90	8.60	14.23	19.30	17.55	8.29	0.375
P 50%	19.13	18.68	14.89	116.59	7.72	13.64	19.69	17.79	8.35	0.385
Grofalcs 250 mg/L	23.30	20.37	15.56	117.75	5.37	9.58	20.12	18.00	8.50	0.389
Zeatin 250 mg/L	20.48	16.59	25.86	117.43	6.75	10.25	20.87	18.22	8.53	0.382
(Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	22.71	21.16	18.98	119.36	5.13	8.39	22.20	18.15	8.41	0.380
P 25% + Grofalcs 250 mg/L	26.45	21.96	24.67	11818	5.81	8.73	19.90	18.50	8.71	0.385
P 25% + Zeatin 250 mg/L	22.65	17.37	20.29	118.84	5.11	9.43	20.52	18.89	8.54	0.377
P 50% + Grofalcs 250 mg/L	27.92	22.80	21.78	119.93	4.88	7.84	22.63	18.95	8.80	0.384
P 50% + Zeatin 250 mg/L	23.30	19.32	26.95	120.62	4.60	8.69	21.46	19.01	8.69	0.405
P 25% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	28.08	22.71	26.90	119.80	4.18	6.65	22.82	19.19	8.85	0.370
P 50% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	31.47	24.83	27.22	122.44	3.65	5.09	23.50	19.43	9.03	0.374
L . S. D. 0.05	0.66	1.12	0.30	0.49	0.51	0.78	0.61	0.12	0.05	0.009

Table (2): Effect of pruning and spraying with Grofalcs and Zeatin on vegetative growth and fruits quality of fig fruits cv. Waziri for seasons 2011and 2012

	GA3 in leaves mg/kg Dry weight	IAA in leaves mg/kg Dry weight	Zeatin in leaves mg/kg Dry weight	Total chlorophyll mg / 100g	% dropping fruit	% Total cracking	Total yield Kg/ tree	% Total soluble solids	Vitamin C mg / 100 ml Juice	Firmness Kg/cm ²
Control	17.36	16.47	12.96	115.43	11.10	13.64	19.45	16.53	7.50	0.370
P 25%	17.98	17.09	13.48	115.89	9.83	11.20	20.21	16.91	7.89	0.377
P 50%	18.09	17.35	14.09	116.26	8.42	9.42	20.89	17.21	7.94	0.379
Grofalcs 250 mg/L	21.90	18.00	14.46	116.95	6.54	7.34	22.34	17.43	8.00	0.384
Zeatin 250 mg/L	18.83	17.59	15.70	117.05	7.18	9.57	20.52	17.20	8.11	0.388
(Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	22.45	18.16	15.98	118.68	6.00	6.39	22.81	18.00	8.15	0.390
P 25% + Grofalcs 250 mg/L	20.37	18.28	14.64	119.32	6.31	6.23	21.65	17.88	8.36	0.382
P 25% + Zeatin 250 mg/L	19.26	17.71	16.22	119.50	5.87	8.14	20.96	18.52	8.30	0.389
P 50% + Grofalcs 250 mg/L	22.75	18.43	15.48	119.77	5.62	6.81	23.16	17.91	7.99	0.395
P 50% + Zeatin 250 mg/L	20.89	17.90	16.83	119.85	4.13	7.08	23.40	18.67	8.50	0.399
P 25% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	22.89	18.84	17.24	120.48	4.22	5.33	24.28	18.90	8.67	0.415
P 50% + (Grofalcs + Zeatin)250 mg/L	23.15	19.11	17.37	121.99	4.00	4.46	24.76	19.07	8.78	0.428
L . S. D. 0.05	0.21	0.23	0.13	0.36	0.75	0.91	0.84	0.12	0.07	0.011

REFERENCES

1. Ibrahim AM. (1996). Deciduous Fruit, Growth and Production . PhD. Thesis. College of Agriculture, University of Alexandria. Egypt.
2. Byers RE. ; Carbough DH. and Presley CN. (1990). Stayman Fruit cracking as affected by surfactants, plant growth regulators and other chemicals . J. Amer.Soc. Hort. Sci. 115 (3) : 405 – 411.

3. Abo-Zaid AN. (2000). Plant Hormones and Application. Agricultural Arabic Home for Publishing. Cairo. P. 61-72.
4. Al- Dulaimi RM. (1999) . Influence of some Factors effects on the splitting of pomegranate fruits . Ph.D. Thesis . Department of Horticulture, College of Agriculture. University of Baghdad. Iraq.
5. Al-Numani RMH . (2013). Effect of spraying with Salicylic acid and Grofalcs on physical and chemical characteristics of local apple fruits. J. Alphart Agric. Sci . 5 (1) : 34 – 39 .

6. Al- Hmeedawi AM.; Al- Numani R M. and Al-Shemmary WHM. (2012) . Effect of Pruning and spraying Zeatin on vegetative characteristics and biochemical containing of Fig cv. Kadota (*Ficus carica L.*). J. JO. Agric. Sci . 8 (3) : 500 - 510
7. Al- Uajjani ZA . (2011) . Effect of Pruning and spraying of some of regulators on growth and yield of fig trees (*Ficus carica L.*) c . v . Aswad Diala . Ph.D. Thesis . Department of Horticulture. College of Agriculture. Kufa University. Iraq.
8. Al- Hmeedawi 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. Mosul University. Iraq.
10. Nuray E.; Ergon E.; Fatih N. and Atilla Y. (2002). Auxin (Indol-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA₃), Absciscic acid (ABA) and Cytokinin (Ziatin) production by some species of Mosses and Lichens. Turk . J . Bot . 26 : 13- 18.
11. Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C) (1985) . Official Methods of Analysis . 13th ed. APAC . Washington . U. S. A.
12. Jundi H M .(2003). Physiology of tree fruits. Agricultural Arabic Home for Publishing .Cairo. p. 107-123.
13. Ferguson L.; Michailides TJ. and Shorey HH. (1999). The California Fig Industry. University of California. U.S.A. p. 148-156.

Impact of oxidative stress on global DNA methylation in sperms of infertile men

Mayssaa A. Al- Hilaly (1) Estabraq A. Al-Wasiti (1) and Anam R. Al-Salihi (2)

(1) Dept. of Chemistry and Biochemistry/ College of Medicine / Al- Nahrain University/ Baghdad

(2) Dept. of Anatomy / College of Medicine / Al- Nahrain University / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Oxidative stress is one of the potential causes of male infertility. It is responsible for defective sperm functions in 30-80% of infertile cases. While OS is accepted as a significant pathology, there is currently inadequate knowledge for the exact effect and role of oxidative damage on sperm DNA methylation in male infertility. Therefore, our study investigated the effect and role of oxidative damage on DNA methylation by measuring the levels of global DNA methylation in the sperms of infertile men.

Global DNA methylation was estimated by immunocytochemical method in 30 fertile men and 30 infertile patients at The Higher Institute of Infertility Diagnosis and Assisted Reproductive Techniques /Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq, between November 2012 and June 2013. It was found that the mean of global DNA methylation was significantly lower in sperms of infertile men compared to fertile controls ($P < 0.0001$), indicating more DNA damage was observed in sperms of infertile men which reflected the increased OS in that sperms. And there was no statistical significant correlation between global DNA methylation and sperm parameters. Our results suggested that oxidative stress related damage to sperm DNA impedes the process of methylation in infertile men which potentially adversely effecting reproductive outcomes.

Key words: DNA methylation, Male infertility, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Spermatozoa

الملخص باللغة العربية

تعتبر قوة الأكسدة من أحد العوامل المهمة والمسئولة عن ضعف وظائف النطاف في 30-80 % من حالات عقم الرجال ، لكن لا توجد معرفة كافية ودقيقة عن تأثير ودور هذه القوة على تمثيل الحامض النووي في العقم عند الرجال ، وعلى هذا الأساس صممت هذه الدراسة لاستكشاف تأثير ودور زيادة قوة الأكسدة على تمثيل الحامض النووي عن طريق قياس مستوى تمثيل الحامض النووي الشامل في نطاف الرجال العقيمين . تم قياس مستويات تمثيل الحامض النووي الشامل بطريقة الفحص المناعي الخلوي على 30 رجلاً ممن يشكون العقم و 30 رجلاً من الأصحاء، المؤكدة خصوصيتهم . جمعت نماذج النطف من المعهد العالي لتشخيص العقم والتقنيات المساعدة على الإنجاب/ جامعة النهرين في مدينة بغداد للفترة من شهر تشرين الثاني 2012 ولغاية حزيران 2013 .

وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاضاً ملحوظاً عند مستوى دلالة ($P < 0.0001$) في معدل تمثيل الحامض النووي الشامل في نطاف الرجال العقيمين مقارنة مع نطاف مجموعة السيطرة، مما يدل على زيادة تلف الحامض النووي والنتائج من زيادة قوة الأكسدة في نطاف مرضى العقم . كما لم يظهر ارتباط معنوي بين مستوى تمثيل الحامض النووي الشامل ومعلومات النطف . وفي ضوء ما تقدم من نتائج ، يستنتج أن لزيادة قوة الأكسدة دور في تلف الحامض النووي عن طريق تثبيط تمثيل الحامض النووي في نطاف مرضى العقم .

INTRODUCTION

Infertility is inability of a sexually active, non-contracepting couple to achieve pregnancy in one year. Male reproductive function is found to be deficient in 50% of infertile couples. It considers a major contributory factor to infertility (1). One of the important causes of male infertility has been identified is oxidative stress (OS) (2), which can be occurred when the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the inherent antioxidant capacity of any system is distorted (3). ROS are a group of highly reactive chemical molecules consisting of one or more unpaired electrons, which derived from oxygen metabolism. They have ability to react with any molecule leading to structural and functional changes with subsequent cellular damage (4, 5).

Virtually every human ejaculate is considered to be contaminated with potential sources of ROS. Spermatozoa (especially, defective or immature) had been shown to be one of the main sources of ROS (6).

Under physiological conditions, spermatozoa produces small amount of ROS which are needed for sperm maturation, capacitation, acrosome reaction and oocyte fusion (7-9), but excessive ROS leads to sperm dysfunction. It is increasingly recognized that ROS production in semen is of concern because of the potential for pathological effects at high levels on sperm quality and function (7,10).

Spermatozoa is particularly vulnerable to OS due to its capacity to generate ROS and its cytoplasm contains low amounts of antioxidants. The main targets of OS in spermatozoa are the plasma membrane and deoxyribonucleic acid (DNA) (11-13).

Normal sperm development leads to chromatin structure in which DNA is fully resistant to denaturation (14). OS is associated with defects in chromatin structure such as DNA strand breaks and gene mutations which can severely reduce fertility. ROS can modify DNA structure through oxidation, methylation, hydrolysis and mismatch of the DNA bases (15).

Methylation of DNA is one of the major epigenetic mechanisms that regulate genomic activities. In spermatozoa, methylation confined to cytosine bases which mainly occurs at cytosine-phosphate-guanine (CpG) sequences (16,17). It is a biological process in which a methyl group is added to the 5th carbon position of the cytosine (5MC) via methyltransferase enzymes (DNMTs). The addition of methyl group changes the biophysical characteristics of DNA result in inhibiting the recognition of DNA by some proteins and permits the binding of others (16).

This covalent modification of multiple sites on DNA is a heritable and reversible controlling gene expression, maintaining genome integrity (17). It is involved in regulation the development and spermatogenesis in mouse and mammals. In human, abnormalities of DNA methylation would result in

apoptosis and have been linked to infertility, cancer and growing number of diseases (18- 21).

Evidence indicated that infertile men possess more sperm DNA damage than do fertile men and this damage may adversely affect reproductive outcome (22, 23). Oxidative attack is associated with increased DNA damage and alterations in DNA methylation (24). Excess ROS leads to formation of DNA base adducts such as 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and O⁶-methylguanine. These products interfere with the DNA stability to act as substrates for DNMTs. The presence of 8-OHdG in CpG dinucleotide sequences induces alterations in cytosine methylation while O⁶-methylguanine strongly inhibits methylation of adjacent cytosine residue, ultimately leads to global DNA hypomethylation (25, 26).

Hypomethylation of specific chromosomal domains has been linked to chromosomal instability (27). Investigators have reported that aberrant sperm DNA methylation, principally in the form of hypomethylation is more commonly seen in infertile men compared to their fertile counterparts. Also many studies have linked hypomethylation in men with a reduction in IVF pregnancy rates (28, 29).

The aim of the current study was to investigate the link between seminal oxidative stress and methylation of sperm DNA and the subsequent effects on sperm parameters.

MATERIALS AND METHODS

Study design and sample selection

A case-control study was employed. Thirty infertile men and 30 fertile (controls) were studied, their age range from 25-40 years.

The infertile men had unable to conceive despite more than 12 months of unprotected intercourse and had at least one defect in sperm parameters either in concentration, motility or morphology, and consulting for infertility diagnosis and treatment at The Higher Institute of Infertility Diagnosis and Assisted Reproductive Techniques /Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq. All men included in the control group were apparently in general good health with normal sperm parameters and had proven paternity in the last 12 months. Semen samples from all 60 men were collected from that institute between November 2012 and June 2013. Inclusion and exclusion criteria for selecting the study sample were as follows:

Inclusion Criteria: Men of fertile woman couples living together with regular unprotected coitus for a reasonable period of time but not less than one year and without contraception. The smokers and those with testicular varicocele were included in this study.

Exclusion Criteria: Subjects with chronic diseases, genital infections, those currently on any medication or antioxidant supplementation, leukocytospermia and azoospermia were excluded from this study.

Study consent : All participants giving written informed consent for their involvement. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Al-Nahrain University / college of Medicine, Baghdad, Iraq.

Sample collection and preparation

All semen samples were produced by masturbation into sterile cups after 3 days of sexual abstinence. Semen samples were allowed to liquefy at least for 30 min at room temperature before analysis.

Semen analysis was performed according to WHO guidelines (2010) to obtain sperm concentration, motility and morphology. Sperm concentration was expressed as $\times 10^6/\text{ml}$ of semen whereas motility and morphology were expressed as percentage. The total motility results reported as the sum of progressive and non- progressive motility. Sperm morphology was scored using WHO criteria. Sperm sample was classified as normozoospermic if sperm concentration was $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$, sperm total motility was $\geq 40\%$ and sperm normal morphology $\geq 30\%$.

After liquefaction, a portion of semen was centrifuged at 300 rpm for 10 min to enable removal of seminal plasma, followed by washing the sperm twice in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (JRH Biosciences, Kansas, USA). Sperm were then resuspended in 1 ml of PBS and smeared on poly-L-lysine coated slides for fixation and later global DNA methylation analysis.

Assessment of sperm global DNA methylation

Measurement of sperm global DNA methylation was made using the immunocytochemical 5-methylcytosine staining technique (30). After fixation of cells with ice-cold methanol for 10 min at -20°C and permeabilized for 1 min at -20°C in ice-cold acetone. Cells were then incubated with a monoclonal primary specific antibody against 5-methylcytosine (5MC) (5MC-CD, abcam) at a dilution of 1:50 in 1% BSA (bovine serum albumin) (BAS Girona, Spain) in PBS in a humidified chamber for 1 h at room temperature. After rinsing 3 times in PBS, sperms were incubated with Fluorescein polyclonal goat anti-mouse IgG (DyLight® 488, abcam) at a dilution of 1:50 in 1% BSA in PBS for 1 hr at room temperature in the dark. The slides were then rinsed in PBS 3 times in the dark and mounted in aqueous-base mounting medium (DPX) (Syrbio). The degree of global DNA methylation was determined by measuring mean value of the fluorescence and expressed as a percentage of the total methylated DNA assessed on at least 200 cells per slide. The primary antibody step was omitted on the negative control slides. Furthermore, all measurements were conducted on a single microscope (BEL, Italy) at a set fluorescent light exposure intensity.

Statistical Analysis

Data were analyzed by statistical packages of SPSS 18.0 (statistical packages for social sciences-version 18.0, LED Technology, USA). Data of both groups (fertile and infertile) were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Student-t-test was used to compare values from both groups. Spearman correlation was used to correlate percentages of global DNA methylation with sperm parameters and the r (correlation coefficient) was calculated with its p value. P values < 0.05 considered statistically significant.

RESULTS

The basic anthropometric parameters of sample are shown in table (1). No statistical significant differences were observed in terms of age and body mass index (BMI) between infertile and fertile study groups.

Table (1): Basic anthropometric parameters of studied men; All values are expressed as mean \pm standard error of mean, (minimum-maximum) and analyzed using the student t-test.

Parameter	Infertile n=30	Fertile n=30	P value
Age (years)	30.97 \pm 0.87 (25 - 40)	32.03 \pm 0.84 (25 - 40)	0.832
BMI* (kg/m ²)	27.34 \pm 1.07 (18.6 – 42.9)	26.29 \pm 0.77 (21.2 – 40.4)	0.356

* BMI= body mass index

Table (2) depicts sperm quality parameters for both the fertile and infertile groups. As men with male factor infertility were recruited into the study, it was expected that the infertile group would have lower sperm quality than the fertile controls. The mean of percentages of DNA methylation was significantly lower in sperms of infertile men compared with fertile group ($p < 0.0001$). No statistical significant correlation was observed between the percentages of global DNA methylation and sperm parameters (concentration, total motility and normal morphology). Table (3).

Table (2): Comparison of sperm quality between the infertile and fertile study men groups. All values are expressed as mean \pm standard error of mean, (minimum-maximum) and analyzed using the student t-test

Sperm quality parameters	Infertile n=30	Fertile n=30	P value
Sperm concentration (10^6 /ml)	42.13 \pm 5.95 (4.0 - 120.0)	56.20 \pm 5.80 (25.0 - 151.0)	0.096
Sperm total motility (%)	37.57 \pm 3.23 (0 - 75.0)	70.07 \pm 1.13 (55.0 - 85.0)	<0.0001
Sperm morphology (normal forms, %)	20.13 \pm 1.78 (0 - 38.0)	37.53 \pm 1.20 (30.0 - 66.0)	<0.0001
Sperm global DNA methylation (%)	8.9 \pm 0.4 (4.2-12.1)	22.4 \pm 1.6 (12.5-40.3)	<0.0001

Total motility= progressive and non-progressive motile sperms, $p \leq 0.05$ significant

Table (3): The value of Pearson's correlation coefficients calculated between percentages of DNA methylation and sperm parameters

Sperm parameter	DNA Methylation (%)
Sperm concentration (10^6 /ml)	0.195
Sperm total motility (%)	-0.310
Sperm morphology (normal forms, %)	-0.101

Total motility= progressive and non-progressive motile sperms

DISCUSSION

Sperm DNA integrity is an essential requirement to achieve fertilization. The methylation pattern of cytosine residues at CpG sites is crucial for maintaining the epigenetic code in human cells (16, 31). Several studies had suggested that ROS attack DNA in sperm nucleus causing modification at CpG sequence, altering the site selectivity of cytosine methylation induced by maintenance DNMTs enzyme. Furthermore, the sperms of infertile men are more likely to express aberrant DNA methylation patterns (29, 32).

The results of this study had showed that oxidative damage inhibited methylation in the sperms of infertile men, while abnormalities in the methyl donor pathway in the sperms of fertile controls did not appear to play a significant role in DNA methylation. Our results were in accordance with many studies that showed a decreased DNA methylation in the sperms of infertile men in comparison to that controls (29, 33, 34), but were in contradiction with Manning et al. who did not find any difference in the methylation pattern according to sperm characteristics (35).

Also our results were consistent with reports that found a statistically significant negative correlation between sperm DNA fragmentation and sperm DNA methylation (28, 36). Interestingly, Tavalaei et al. explained their results by suggesting that hypomethylated sperms may be more prone to DNA damage, while normally methylated DNA may be less susceptible to the damage (36). We are unaware of any evidence supporting the concept that the methylation protects DNA from apoptosis or oxidative damage; the two principal mechanisms of sperm DNA damage and infertility (37, 38).

Oxidative stress (OS) affects a significant proportion of infertile men and is widely believed to be the primary cause of sperm DNA fragmentation, so it is likely that oxidative DNA damage played some role in DNA hypomethylation reported in the earlier studies (37, 39, 40). However, the link between sperm oxidative DNA damage and hypomethylation may best be confirmed by studies correlating the generation of 8-OHdG with sperm DNA methylation (37).

The clinical implications of impaired sperm DNA methylation are presently uncertain. Animal studies have been shown that chemically blocking sperm DNA methylation results in reduced sperm fertilizing capacity, altered embryonic gene expression and an increase in pre-implantation embryonic loss (41). Aitken and De Luliis had speculated that aberrant sperm DNA methylation may lead to epigenetic defects that adversely affecting the health of next generation of children (39). Also Houshdaran et al. had suggested that if erasing the initial methylation pattern in epigenetic reprogramming does not occur correctly; there is a possibility of epigenetic defects in the sperm that would ultimately affect male fertility (42).

The results of this study showed that there was no statistical significant correlation between global DNA methylation level and sperm parameters which were consistent with Ankolkar et al. results (43), but were inconsistent with Jouannet et al. who identified a significant positive correlation between sperm concentration, motility and morphology with sperm DNA methylation (44). The effect of methylation factor in male infertility was more evident if did not consider the methylation level by itself. And it seems the male prognostic factor important for an in vitro fertilization (IVF) attempt. Therefore, the measurement of DNA methylation level could be a new approach to appreciate the ability of spermatozoa to fertilize and develop a normal embryo (37).

CONCLUSION

Oxidative stress related damage to sperm DNA impedes the process of methylation in infertile men which potentially adversely effecting reproductive outcomes.

REFERENCES

1. Dohle GR.; Jungwirth A.; Colpi G.; Giwercman A.; Diemer T. and Hargreave TB. (2007). Guidelines on male Infertility. European Association of Urology. Pages: 6, 27, 51.
2. Bucak MN.; Sariozkan S. and Tuncer PB. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Res.* 89(1): 24–30.
3. Kefer JC.; Agarwal A. and Sabanegh E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility: a review. *Int. J. Urol.* 16:449–457.
4. Kumar R.(2007). Necessity of nuclear and mitochondrial genome analysis prior to ART/ICSI. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 44: 437–442.
5. Kothari S.; Thompson A.; Agarwal A. and Du Plessis SS. (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J. Exp. Biol.* 48: 425-435.
6. Choudhary R.; Chawala VK.; Soni ND.; Kumar J. and Vyas RK. (2010). Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility: a review. *Pak. J. Physiol.* 6(2): 54-59.
7. O'Flaherty C.; De Lamirande E. and Gagnon C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Rad. Biol. Med.* 41:528-540.
8. De Lamirande E. and O'Flaherty C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784:106–115.
9. Gonc FA.; Barretto LSS.; Arruda RP.; Perri SHV. and Mingoti GZ. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod. Dom. Anim.* 45(1): 129–135.
10. Chaudhari AR.; Das P. and Singh R. (2008). Study of oxidative stress and reduced glutathione levels in seminal plasma of human subjects with different fertility potential. *Biomed. Res.* 19(3): 207-210.
11. Prabhakaran SA. and Sikka SC. (2007). Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence-based analysis. *AUA. Upd. Ser.* 26: 1–12.
12. Agarwal A.; Makker K. and Sharma R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59: 2–11.
13. Hesham N.; Moemen LA. and Abu Elela MH. (2008). Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 2:773-778.
14. Gillan L.; Evans G. and Maxwell WM. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenol.* 63: 445-457.
15. Sharma RK.; Said T. and Agarwal A. (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Androl.* 6:139–148.
16. Klose RJ. and Bird AP. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators: a review. *TRENDS Biochem. Sci.* 31(2): 89–97.
17. Schaefer CB. (2007). Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Sci.* 316(5823): 398–399.
18. Jackson L. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.* 27: 31–39.
19. Li JY.; Lees-Murdock DJ.; Xu GL. and Walsh CP. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genom.* 84:952-960.
20. Baylin SB. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Prac. Oncol.* 2 (1): 4–11.
21. Damelin M. and Bestor TH. (2007). Biological functions of DNA methyltransferase 1 require its methyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.* 27: 3891–3899.
22. Zini A.; Boman JM.; Belzile E. and Ciampi A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 23: 26638.
23. Sigman M. and Zini A. (2009). Semen analysis and sperm functions assays: What do they mean? *Semin. Reprod. Med.* 27:115–123.
24. Lim SO.; Gu JM. and Kim MS. (2008). Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterol.* 135 (6): 2128–2140.
25. Valinluck V. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 32(14): 4100–4108.
26. Franco R. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266 (1): 6–11.
27. Ogino S.; Kawasaki T. and Noshio K. (2008). LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* 122(12): 2767–2773.
28. Benchaib M. (2005). Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum. Reprod.* 20(3): 768–773.
29. Marques CJ. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* 14(2): 67–74.
30. Sano H. (1988). Detection of heavy methylation in human repetitive DNA subsets by a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Biochim. Biophys. Acta.* 951:157-165.
31. Cocuzza M.; Sikka SC.; Athayde KS. and Agarwal A. (2007). Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: An evidence based analysis. *International Braz. J. Urol.* 33(5): 603-621.
32. Valinluck V. and Sowers LC. (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* 67: 946–950.
33. Benchaib M.; Ajina M.; Lornage J.; Niveleau A.; Durand P. and Guerin JF. (2003). Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human

spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. *Fertil. Steril.* 80 (4): 947-953.

34. Kobayashi H. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum. Mol. Genet.* 16(21): 2542-2551.

35. Manning M.; Lissens W.; Liebaers I.; Van Steirteghem A. and Weidner W. (2001). Imprinting analysis in spermatozoa prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int. J. Androl.* 24: 87-94.

36. Tavalae M.; Razavi S. and Nasr-Esfahani MH. (2009). Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil. Steril.* 91(4): 1119-1126.

37. Tunc O. and Tremellen K. (2009). Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26:537-544.

38. Asbagh FA. (2010). Relation of serum and semen malondialdehyde and total anti-oxidants with sperm parameters in infertile men. *Am. J. Immunol.* 6 (3): 43-49.

39. Aitken RJ. and De Iuliis GN. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed.* 14(6): 727-733.

40. Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. *Hum. Reprod.* 14: 243-258.

41. Pathak K. (2008). Effect of tamoxifen treatment on global and insulin like growth factor 2-H19 locus-specific DNA methylation in rat spermatozoa and its association with embryo loss. *Fertil. Steril.* 91(5): 2253-2263.

42. Houshdaran S.; Cortessis VK.; Siegmund K.; Yang A.; Laird PW. and Sokol RZ. (2007). Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One.* 2: e1289.

43. Ankolkar MM.; Warke H.; Salvi V.; Mokashi NK. and Balasinor NH. (2013). DNA methylation analysis at imprinted locus and global methylation in spermatozoa of normozoospermic individuals of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Epigenet. Chromatin: Interactions and processes.* 6(1): 12-15.

44. Jouannet P.; Chalas C. and Jammes H. (2008). IGF2 and H19 methylation in sperm of infertile men. *Inserm. Institut. Cochin. U567, CNRS UMR 8104. Epigenetics in ART, Eshre Campus, Lisbon.*

Serum iodine and lipid profile in patients with thyroid diseases

Samer A. Muhi and Mohammad D. Abdulhuassain

Al- Yarmouk Teaching Hospital / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

Serum iodine is an important trace element in synthesis of thyroid hormone .Many thyroid diseases were shown to be associated with changes in serum iodine. Furthermore, lipids have been showed to change in thyroid disorders. The current study is conducted to evaluate the level of iodine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in sera of patients with thyroid dysfunction to find relationship between these parameters and thyroid diseases.

The study sample was composed of 48 patients with newly diagnosed hypothyroidism, 52 patients with newly diagnosed hyperthyroidism and 50 healthy individuals as pathological control who are attending Al-Yarmouk Teaching Hospital/ Baghdad during the period between October 2010 to April 2013 .T3, T4, TSH, cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol tests were done for the groups of the sample.

Results showed that there were significantly increase in total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL – cholesterol in patients with hypothyroidism while there were significantly decrease in patients with hyperthyroidism. Serum iodine was significantly decreased in both hypothyroidism and hyperthyroidism.

The study concluded that thyroid dysfunctions alter the levels of lipid profile and serum iodine.

Key words: Serum iodine, lipid profile, thyroid disease

المخلص باللغة العربية

يعد اليود من العناصر الضئيلة المهمة في تكوين هرمون الغدة الدرقية، إذ إن هناك العديد من أمراض الغدة الدرقية يصاحبها تغيرات في مستوى اليود، كما أن مستويات الدهون تتغير في حالات اضطرابات الغدة الدرقية.

سعت الدراسة الحالية إلى تقييم مستوى كل من: اليود، الكولسترول، الدهون الثلاثية، الدهن البروتيني عالي الكثافة والدهن البروتيني منخفض الكثافة في أمصال المرضى المصابين باضطراب الغدة الدرقية للكشف عن العلاقة بين هذه الدلائل الكيميائية واضطرابات الغدة الدرقية.

شملت عينة الدراسة 48 مريضاً من المصابين بهبوط الدرقية و 52 مريضاً من المصابين بفرط الدرقية جميعهم من المشخصين حديثاً بالإضافة إلى 50 من الأشخاص الأصحاء كمجموعة سيطرة. جميعهم من المراجعين لمستشفى اليرموك التعليمي في مدينة بغداد للفترة من تشرين الأول 2010 ولغاية نيسان 2013. تم قياس كل من هرمونات الغدة الدرقية، الكولسترول، الدهون الثلاثية، الدهن البروتيني عالي الكثافة والدهن البروتيني منخفض الكثافة لمجموعات الدراسة.

أظهرت نتائج الدراسة بأن هناك زيادة يعتد بها في مستويات كل من الكولسترول، الدهون الثلاثية، كوليسترول الدهن البروتيني عالي الكثافة والدهن البروتيني منخفض الكثافة لدى المرضى المصابين بهبوط الدرقية بينما كان هناك انخفاض يعتد به في الدلائل أعلاه لدى المرضى المصابين بفرط الدرقية، كما وجد أن مستويات اليود منخفضة في حالتي فرط وهبوط الدرقية، وبهذا تستنتج الدراسة أن مستويات الدهون تكون منخفضة في فرط الدرقية وتزداد في هبوط الدرقية، أما مستويات اليود فتقل في كلتا الحالتين.

INTRODUCTION

Thyroid gland is the largest pure endocrine gland in the body, it is the most important gland for metabolism regulation (1). Thyroid gland is a butterfly-shaped organ composed of two cone like lobes or wings connected by isthmus (1). Thyroid gland situated on the anterior side of the neck lying against and around the larynx, trachea extend inferiorly to the fourth –sixth tracheal ring (2). Thyroid gland is weighting 2-3 grams in the neonate and 16-18 grams in adults (3).

Cholesterol is unsaturated steroid alcohol containing four rings (A, B, C and D), cholesterol has single side chain C-H side chain similar to fatty acid in its physical properties (4).

Triglyceride contain three fatty acids attached to glycerol molecule by ester bonds, there were no charge group or polar hydrophilic group making it very hydrophobic and virtually water insoluble (5). HDL is the smallest and most dense lipoprotein particle, synthesized by both liver and intestine. The function of HDL is transfer of cholesterol from tissue to the liver (6).

LDL primarily contains apo B-100, and more cholesterol rich than other lipoprotein. LDL are the major lipoprotein responsible for the delivery of exogenous cholesterol to peripheral cell (7).

Thyroid disorder known to influence lipid metabolism, alteration in thyroid function result in changing in composition and transport of lipoprotein (8).

Iodine is a trace element that are essential for life, required in the body for synthesis of thyroid hormone in thyroid gland (9). Thyroid stimulating hormone (TSH) stimulate thyroid gland to increase uptake of the iodine from the blood by active process (10).

PATIENTS AND METHODS

Patients: the study sample was composed of 48 patients with newly diagnosed hypothyroidism, 52 patients with newly diagnosed hyperthyroidism and 50 healthy individuals as pathological control, who were attending AL-Yarmouk Teaching Hospital during October 2010 to April 2013. The patients were diagnosed clinically and by hormonal studies. Tests of T3, T4, TSH, total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL and serum iodine were done for all those groups.

Blood Sampling: blood was allowed to coagulate at room temperature and then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. The resulting sera were separated and placed in a test tube, which was then stored in refrigerator to be kept for use.

Methods: for measuring T4, T3, and TSH by vidas instrument, using ELFA technique (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Triglyceride, total cholesterol, HDL and LDL were determined colorimetry. Serum iodine measurement

was done by using HPLC device (high performance liquid chromatography).

Statistical analysis

Data expressed as mean \pm SD. Unpaired Student's t-test used to evaluate differences between the groups. For all tests, a two-tailed $p \leq 0.05$ considered statistically significant. All calculations were made using Excel 2003 program for Windows.

RESULTS

The serum cholesterol values were significantly increased in hypothyroidism (282 ± 28.5 mg/dl) and significantly decrease in hyperthyroidism (98.8 ± 12.9 mg/dl) when compared with the result of healthy individuals (130 ± 15.6 mg/dl) as shown in table (1).

**Table (1): The comparison of cholesterol of sera of hypothyroidism, hyperthyroidism and healthy individuals.
(Mean \pm SD)**

Group	No.	Serum cholesterol mg/dl
Healthy individuals	50	98.8 ± 12.9
Hyperthyroidism	52	$130 \pm 15.6^*$
Hypothyroidism	48	$286 \pm 28.5^{**}$

* $P = 0.001$ for comparison between hyperthyroidism and healthy individuals.

** $P = 0.001$ for comparison between hypothyroidism and healthy individuals

The serum triglyceride values were significantly increased in hypothyroidism (393 ± 20.4)mg/dl and significantly decreased in hyperthyroidism (70 ± 26.4)mg/dl when compared with the result of healthy individuals (120 ± 25)mg/dl as shown in table (2).

**Table (2): The comparison of triglyceride in sera of hypothyroidism, hyperthyroidism and healthy individuals
(Mean \pm SD)**

Group	No.	Serum triglyceride mg/dl
Healthy individuals	50	120 ± 25
Hyperthyroidism	52	$70 \pm 26.4^*$
Hypothyroidism	48	$393 \pm 20.4^{**}$

* $P = 0.001$ for comparison between hyperthyroidism and healthy individuals

** $P = 0.001$ for comparison between hypothyroidism and healthy individuals.

The serum HDL values were significantly increased in hypothyroidism (64.4 ± 12.8) mg/dl and significantly decreased in hyperthyroidism (32.8 ± 3.9) mg/dl when compared with healthy individuals (43.5 ± 5.6) mg/dl as shown in table (3).

Table (3): The Comparison of serum HDL in the sera hypothyroidism, hyperthyroidism and healthy individuals (Mean \pm SD)

Group	No.	Serum HDL mg/dl
Healthy individuals	50	43.5 ± 5.6
Hyperthyroidism	52	$32.8 \pm 3.9^*$
Hypothyroidism	48	$64.4 \pm 12.8^{**}$

* $P=0.001$ for comparison between hyperthyroidism and healthy individuals

** $P=0.001$ for comparison between hypothyroidism and healthy

The serum LDL value were significantly increased in hypothyroidism (135 ± 25.2) mg/dl and significantly decreased in hyperthyroidism (44.5 ± 8.5) mg/dl when compared to the value of healthy individuals (70 ± 15.2) mg/dl as shown in table (4).

Table (4): The Comparison of LDL in the sera for hypothyroidism, hyperthyroidism and healthy individuals (Mean \pm SD)

Group	No.	Serum LDL mg/dl
Healthy individuals	50	70.5 ± 15.2
Hyperthyroidism	52	$44.5 \pm 8.5^*$
Hypothyroidism	48	$135 \pm 25.2^{**}$

* $P=0.001$ for comparison between hyperthyroidism and healthy individuals

** $P=0.001$ for comparison between hypothyroidism and healthy individuals.

The serum iodine values were significantly decreased in hypothyroidism (40 ± 13.8) ng/ml and significantly decreased in hyperthyroidism (45 ± 7.5) ng/ml when compared to the result of healthy individuals (80 ± 12.6) ng/ml as shown in table (5).

Table (5): Show the Comparison of serum iodine in the sera hypothyroidism, hyperthyroidism and healthy individuals (Mean \pm SD)

Group	No.	Serum iodine (ng/ml)
Healthy individuals	50	80 ± 12.6
Hyperthyroidism	52	$45 \pm 7.5^*$
Hypothyroidism	48	$40.7 \pm 13.8^{**}$

* $P=0.001$ for comparison between hyperthyroidism and healthy individuals

** $P=0.001$ for comparison between hypothyroidism and healthy individual.

DISCUSSION

Iodine is essential element in human life, without sufficient amount of iodine in the diet, the body unable to synthesize thyroid hormone (11). These hormones regulate metabolism in every cells of the body and play a role in virtually all physiological function (11). Dietary iodine is converted into iodide ion before its absorption, the iodide is bio-available and absorbed totally from food and water (11).

The iodide is used by thyroid gland for synthesis thyroid hormones and kidney excrete iodine in the urine, therefore the excretion of iodine in the urine is good measure of iodine intake (12).

In the current study, the serum iodine was decreased in hypothyroidism and hyperthyroidism. The reason for decrease iodine might be due to changing in secretion of thyroid stimulating hormone (TSH) from the anterior pituitary, which plays a role in transport of iodine from serum to thyroid gland against concentration gradient by active process (13).

Hypothyroidism is a common metabolic disorder in the general population especially in older women (14). Level of total cholesterol and LDL-cholesterol tend to increase as the thyroid function decline and hypothyroidism is constituent cause of secondary dyslipidemia (15).

Decreased thyroid function is accompanied by reduced activity of hydroxyl methyl glutarate-CoA reductase (HMG-CoA) which is rate-limiting enzyme in synthesis of cholesterol (16).

Total cholesterol, triglyceride and LDL were increased in patients with hypothyroidism, this may due to decreased LDL-receptor activity, resulting in decrease catabolism of LDL and IDL (17).

Despite increased activity of HMG CoA-reductase level of cholesterol tends to decrease in patients with hyperthyroidism due to increase bile excretion and mainly due to increase LDL receptor gene expression resulting in enhanced LDL receptor-mediated catabolism of LDL (18). Furthermore, HDL are also decrease in patient with hyperthyroidism due to increase transfer cholesterol ester from HDL to VLDL and increased HDL mediated catabolism (19).

CONCLUSION

Thyroid dysfunctions alter the levels of lipid profile and serum iodine.

Lipid profile affected indirectly with the activity of thyroid gland while serum iodine level was low in thyroid dysfunctions

REFERENCES

1. Cunningham JC. (2002). Textbook of veterinary physiology . 3rd ed. P. 230-235.
2. Shan Z Y. (2005). Effect of iodine intake on school children thyroid disease and intelligence in the rural area .Clin. Med. J. 116:1518-1522.
3. The thyroid gland in endocrinology: An integral approach by Stephan Nussey and SAFFRON white head 920010.
4. Sergest JP.(2000). Structure and function of apolipoprotein A-1 and HDL. Curr. Opin. lipidol. 11:105-115.
5. Mead JR.; Irvin SA. and Ramj DP. (2002). Lipoprotein :structure, function ,regulation and role in disease. J. Mol. Med. 80:753-769.
6. Morgan J.; Carey C. and Licoff R. (2004). HDL ;subfraction and risk in coronary artery diseases. Curr. Atherosc. Rep . 6:359-365.
7. Warnick GR.; McNamara GR. and Bogges CA. (2006). Polyacrimide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses .Clin. Lab. Med. 26:803-846.
8. Duntas LH. (2001). Thyroid disease and lipid .Thyr. 12:288-293.
9. Dunn JT. and Dunn AD. (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyr. 11:407-414.
10. Spitzweg C . (2000). Thyroid iodine transport .Thyr. 1094:321-330.
11. Xiaochun T.; Zhongyan S. and Yanyan C. (2011). More than adequate intake iodine increase subclinical hypothyroidism. Europ. J. Endocrinol. 164:943-950.
12. Zimmermann MB.; Jooste PL. and Pandav CS.(2008). Iodine deficiency disorder Lancet. 372 :1251-1262.
13. Shomon M. (2014). Iodine and thyroid disease. Literature Review. Available at: <http://fwgnfl.com/2014/04/>
14. Rizos CV.; Elisaf MS. and Liberopoulos EN. (2011). Effects of thyroid dysfunction on lipid profile. Open Cardiovas. Med. J. 5:78-84.
15. Sunada V.; Sangeeta S. and Prabhakar B. (2012). Study of lipid profile in hypothyroidism. Int J. Bio. Med. Res. 3(1):1373-1376.
16. Melpomeni P.; Grigoria B. and George D. (2011). Lipid abnormalities and cardiovascular risk in patients with overt and subclinical thyroid disease. J. Lipids. 9-15.
17. Soliman GA. (2013). Effects of hyperthyroidism on lipid profile, adiponectin and liver function tests. Biochem. 9:14-17.
18. Guffat D.; Durand D. and Graulet B. (2006). Regulation of VLDL synthesis and secretion. Liver Rep. Nut. 36:375-389.
19. Jansen J.; Friessemen EC. and Milici C. (2005). Thyroid hormone transport in health and disease. Thyr. 15 :757-768.

Applied DWT Haar Filter to secure FHSS signal

Jameela L. Abid

Al- Mansour Medical Technical Institute / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

As known in wireless LANs, the frequency hopping spread spectrum (FHSS) systems have traditionally been applied in low data rate applications where needs to secure the transmitted/received signals. In this paper we have discussed a synchronous coherently detected FHSS signal. The sequence generator has been implemented to select the frequencies for transmission or reception. We have implement a one of wavelet family filter (Haar) in both transmitter and receiver sides, in the receiver inverse wavelet is used.

Key words: Spread Spectrum, FHSS, Discrete Wavelet, Haar Wavelet, inverse Wavelet

الملخص باللغة العربية

كما هو معروف في الشبكات المحلية اللاسلكية، وباستخدام أنظمة الطيف الترددي وتحديدًا في إشارة القفز فإن التطبيقات لإشارات نقل البيانات تحتاج إلى حماية في الأنظمة المرسل والمستقبل. تسعى الدراسة الحالية إلى مناقشة توليد إشارة القفز للطيف الترددي المتمثلة في حالة الإرسال، وقد تم تطبيق احد مرشحات الموجات والتي تسمى بـ (Haar) لتغيير صفات الإشارة الباعثة، ولعكس الإشارة الباعثة تم استخدام الموجات العكسية في الأنظمة المستقبلية.

INTRODUCTION

Most of the wireless local area networks (WLANs) used optical or radio technologies to transmit and receive signals through the air. One of the wireless radio technologies known as Spread Spectrum modulation has its origins and used especially in the military field. There are a lot of advantages of Spread Spectrum technologies, one of the advantage is transmission security, resistance to interference from other radio sources, redundancy, resistance to multi-path and fading effects, etc. In addition, the Spread Spectrum systems can coexist with other radio systems, without need to be disturbed by their presence and without disturbing their activity. In the security, the encoding and decoding of the signal is an important. There are two popular types of Spread Spectrum modulation techniques: Frequency Hopping (FHSS) and Direct Sequence (DSSS) (1). The current paper suggests using one of filters of Wavelet "Haar" in the transmitter, and inverse the signal which has been implemented with wavelet in receiver side.

METHODS AND APPLICATIONS

Implementation of Spread Spectrum

The main goal of proposed application is to secure signals in synchronous coherently FHSS signal. Spread spectrum is used to modulate the signals digitally, which increases the transmit signal bandwidth to a value much larger than is needed to transmit the underlying information bits. However, there are many signaling techniques that are used to increase the transmit bandwidth such as coding and frequency modulation.

The modulation of the spread spectrum is done by using spreading code and this based on the data of signal, on other hand, the despreading in receiver side is done by correlating the received signal with a synchronized copy of the spreading code (2,3).

Frequency Hopping Spread Spectrum

In frequency hopping spread spectrum, the carrier frequency of data that has been modulated sinusoidal carrier considered as periodically changed over bandwidth. The hopping frequency is increased by the factor of N , and hopping is typically done based on pseudo random manner. One of the important applications based on frequency hopping which makes interception and jamming more difficult in military fields, besides that, in commercial applications, has applied to reduce the impact of particular co-channel which has interferer. The hopping signal can be represented as:

$$h(t) = \sum_{i=-\infty}^{\infty} p(t - iT_c) \cos(2\pi f_i t + \phi_i) \dots (1)$$

where $p(t)$ is the pulse shape used for the hopping waveform (typically assumed to be a square pulse

$f_i \in \{f_1, f_2, \dots, f_N\}$ are the N hop frequencies, T_c is the

hop period. Some times, it is called the chip period), and ϕ_i are the phases of each oscillator. Note that unlike in DS/SS systems, the chip period (or hop period) does not impact the bandwidth expansion. Bandwidth expansion is completely determined by the number of hop frequencies. The resulting frequency hopped transmit signal is then,

$$s(t) = [s_d(t)h(t)]_{BPF} \\ = \left[s_d(t) \sum_{i=-\infty}^{\infty} p(t - iT_c) \cos(2\pi f_i t + \phi_i) \right]_{BPF} \dots (2)$$

where $s_d(t)$ is the bandpass data signal that depends on the modulation form which employed and the bandpass filter as its designed to transmit the sum frequencies. The fundamental of frequency hopping work is shown in Figure (1). The figure shows the frequency before and after spreading in addition shows the average time of spectrum. As time advances the signal occupies a separate frequency band as determined by the pseudorandom hopping sequence. On average the power spectral density is spread over the entire band.

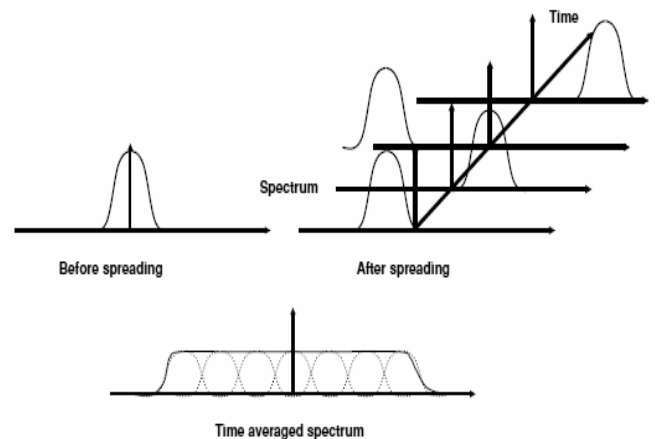


Figure (1): Illustration of Spectrum Spreading through Frequency Hopping

Each frequency band is used $(1/N)$ of the time (4), and the spectrum be similar to DS/SS systems when averaged over a sufficiently long time period. The implementation of typical transmitter and receiver are shown in Figure (2), where any modulation scheme can theoretically be used as in DS/SS the frequency hopping is ideally transparent to the data demodulator.

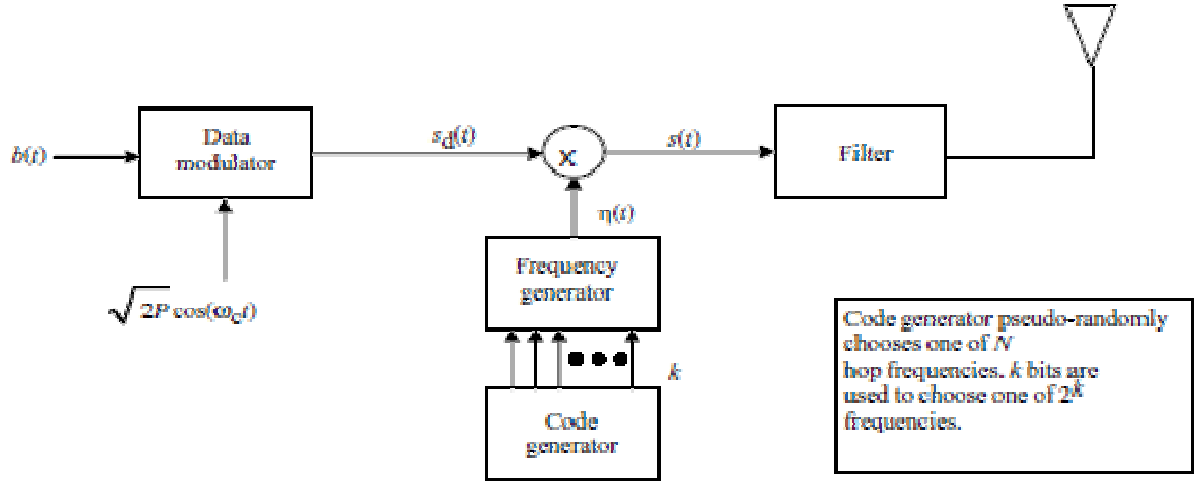


Figure (2): Typical Frequency Hopping Transmitter Architecture

The data modulated carrier is hopped to one of N carrier frequencies every period T_c , which may be longer or shorter than the data symbol period T_s . At the receiver the same pseudorandom hopping pattern is generated such that the received signal is ideally mixed back down to the original carrier frequency. Data demodulation is then accomplished as in standard digital communications. Note that the bandwidth expansion factor is equal to N the number of hop frequencies. Unlike in DS/SS, the bandwidth expansion is not dependent on the chip period T_c . In fact, as mentioned, the chip period can be greater than the symbol period. In other words, the hopping may be slower than the symbol rate (5).

DWT and Haar Wavelet

The discrete wavelet transform (DWT) has computed as the pyramid algorithm. In addition, the resulting of wavelet and scaling coefficients are computed to make changes to the original series of the pyramid algorithm that treats X as if it is circular.

The wavelet and scaling coefficients are then computed by using a periodic boundary condition

on the reflected series, resulting in twice as many wavelet and scaling coefficients at each level (6).

The mother wavelet is formulated as:

$$\psi(x) = \begin{cases} +1 & \text{if } x \in \left[\frac{0,1}{2}\right] \\ -1 & \text{if } x \in \left[\frac{1}{2},1\right] \\ 0 & \text{else} \end{cases} \dots (3)$$

Scaled and translated version:

$$\psi_{m,n}(x) = 2^{\frac{m}{2}} \psi(2^m x - n) \dots (4)$$

The wavelet series are described in equation:

$$f(t) = \sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} d_m(n) \psi_{m,n}(t) \dots (5)$$

and by consider the following,

$$x_{n,i} = \{10,13,25,26,29,21,7,15\} \dots (6)$$

And the transform that replaces the original sequence with its pair wise average $x_{n-1,i}$ and difference $d_{n-1,i}$ defined as follows:

$$x_{n-1,i} = \frac{x_{n,2i} + x_{n,2i+1}}{2} \quad d_{n-1,i} = \frac{x_{n,2i} - x_{n,2i+1}}{2} \dots (7)$$

The previous two equations implement the Forward Discrete Wavelet Transform of the Haar-wavelet transform.

The averages and differences are applied only on consecutive pairs of input sequences whose first element has an even index. Therefore, the number of elements in each set $\{x_{n-1,i}\}$ and $\{d_{n-1,i}\}$ is exactly half of the number of elements in the original sequence.

Form a new sequence having length equal to that of the original sequence by concatenating the two sequences $\{x_{n-1,i}\}$ and $\{d_{n-1,i}\}$. The resulting sequence is:

$$\{x_{n-1,i}, d_{n-1,i}\} = \{11.5, 25.5, 25.1, -1.5, -0.5, 4, -4\} \dots (8)$$

This sequence has exactly the same number of elements as the input sequence - the transform did not increase the amount of data.

Since the first half of the above sequence contain averages from the original sequence, we can view it as a coarser approximation to the original signal. The second half of this sequence can be viewed as the details or approximation errors of the first half.

It is easily verified that the original sequence can be reconstructed from the transformed sequence using the relations:

$$x_{n,2i} = x_{n-1,i} + d_{n-1,i} \quad x_{n,2i+1} = x_{n-1,i} - d_{n-1,i} \dots (9)$$

The above two equations implement the Inverse Discrete Wavelet Transform (IDWT) of the Haar-wavelet transform (7).

RESULTS AND DISCUSSION

The transformation method which has been applied is Wavelet and its determined of the popular of Fourier Transform. The wavelet has ability to analyze a signal in the time domain for its frequency content. In this paper, Haar wavelet is applied in both sides (transmitter and receiver). Before transmitted, wavelet used to forming a signal to other shape, which give more secured and unknown for interferences. The transform works by first translating a function in the time domain into a function in the frequency domain. In receiver side, will receive the wavelet signal, and will inverse the wavelet to get same of the frequency content before has been changed. The wavelet coefficients of the transformed function represent the contribution of each sine and cosine function at each frequency.

Simulation has been carried out by using Matlab first of all data sequence has been generated by using random function as in the following equation:

$$x_0 = \text{given}, \quad x_{n+1} = P_1 x_n + P_2 \pmod{N} \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

Noise had been added to the original bit sequence as shown in figure (3).

When we plot time-domain signals as shown in Fig.4, the time amplitude representation of the signal is given as:

$$x(t) = 30 \sin(8t)$$

This representation is not always the best representation of the signal for most signal processing related applications. In many cases, the most distinguished information is hidden in the frequency content of the signal. The frequency spectrum of a signal is basically the frequency components (spectral components) of that signal. The frequency spectrum of a signal shows what frequencies exist in the signal. If the FT of a signal in time domain is taken, the frequency-amplitude representation of that signal is obtained as described in equation below.

$$X(k) = \sum_{j=1}^N x(t) \omega_N^{j-1} k-1$$

Where

$$\omega_N = e^{\frac{(-2\pi i)}{N}}$$

We have a plot modulated BPSK as shown in figure (4). Figure (5) plots the modulated FHSS, with one axis being the frequency and the other being the amplitude. These plots tell us how much of each frequency exists in our signal and from these results it clearly depicted that FHSS overcomes the other ordinary modulation. Equation below has applied a BPSK signal in FHSS frequency module.

$$h(t) = \sum_{i=k-1}^k X(k) \cos(2\pi f_i t + \phi_i)$$

While in FH the information is left unchanged and directly modulates has been applied Haar wavelet which has been plotted in figure (6). This is showing the graphical display of Haar wavelet frequency in both transmitted and received. Equation below has return a Haar wavelet by applying $h(t)$ which represents a frequency hopping signal. $\psi_{m,n}(t)$ represents a wavelet transform form.

$$haar(t) = \sum_{m,n=k-1}^k h(t) \psi_{m,n}(t) \dots (5)$$

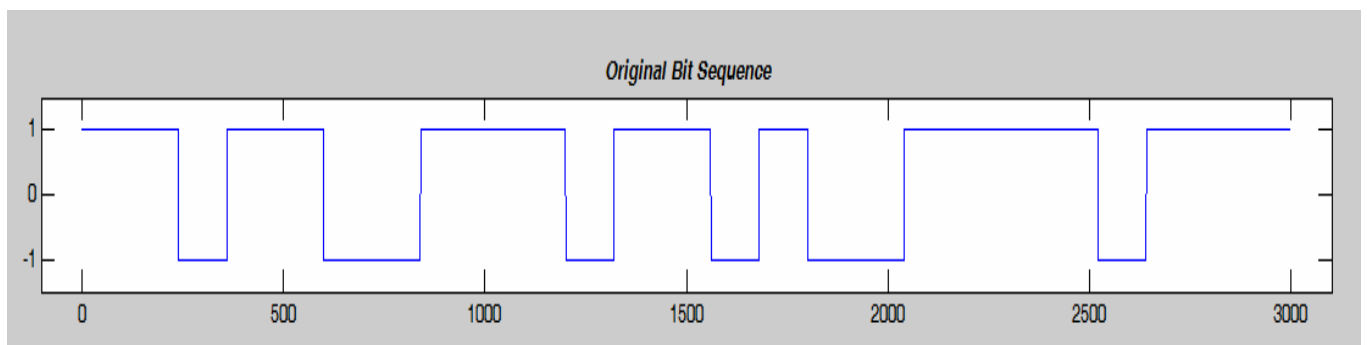


Figure (3): Binary data stream to generated signal

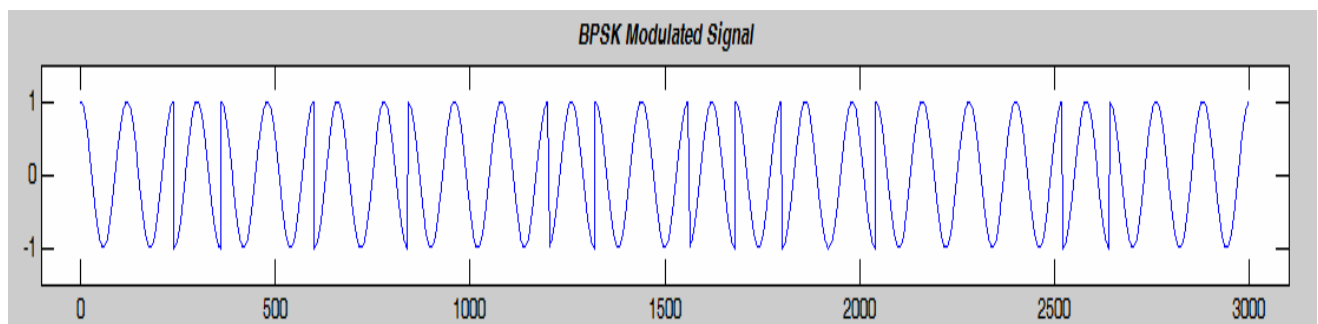


Figure (4): BPSK modulation of original

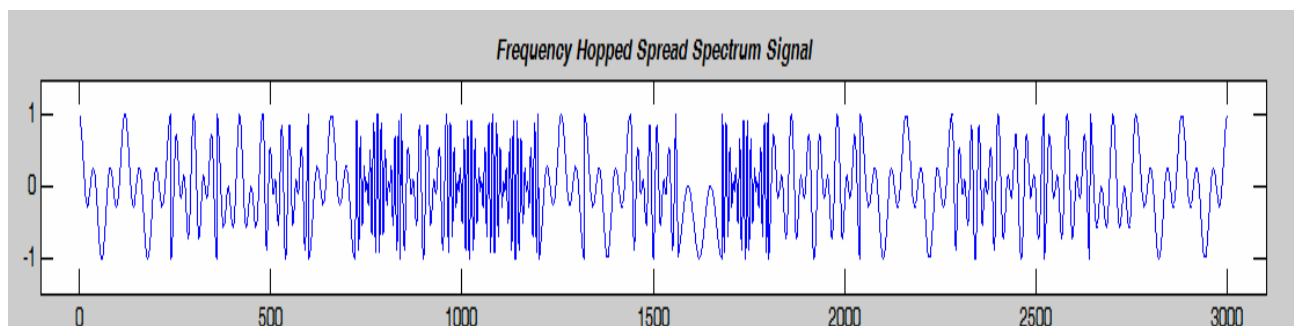


Figure (5): FHSS modulation of original

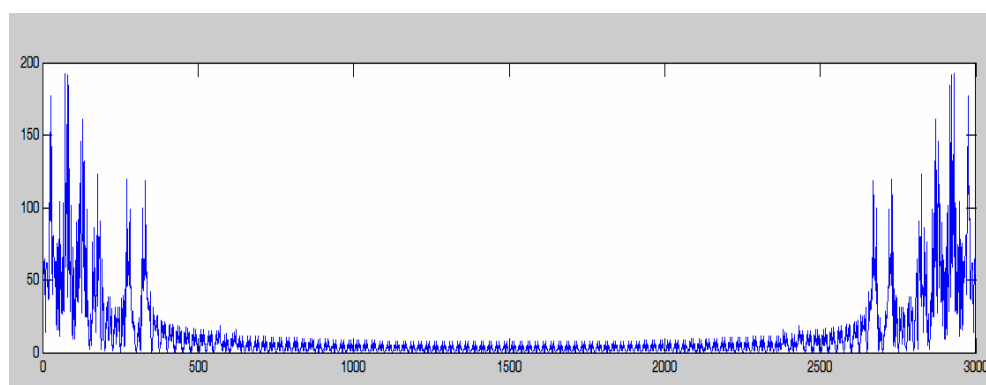


Figure (6): Haar wavelet signal of FHSS

In addition to that, we've calculated a histogram for spread spectrum that has been generated as shown in figure (3), the histogram is shown in figure (7). Finally, we've found that the histogram of signal of Haar filter of wavelet, as shown in figure (8).

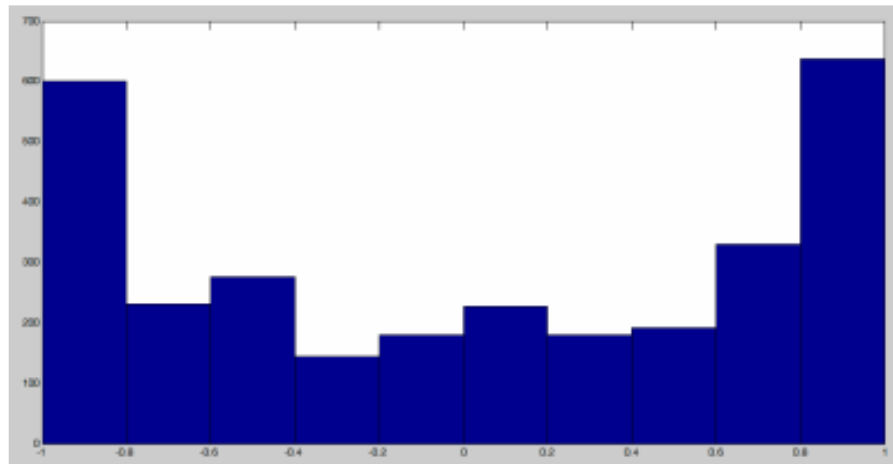


Figure (7): Spread Spectrum Histogram

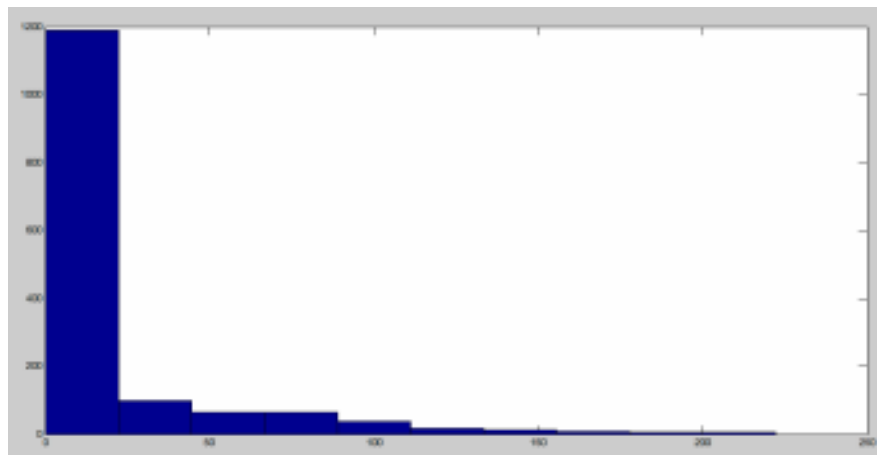


Figure (8): Haar filter Histogram of FHSS

In addition, two of a quality metrics has been used to perform our proposed method, for different signals represented as tests as shown in table (1). Figures (9 and 10) display charts of both quality metrics for four tests.

Table (1): use of MSE and PSNR metrics to perform the proposed method for different signals

Tests	MSE	PSNR
Test 1	0.000206	139.696
Test 2	0.000246	138.922
Test 3	0.000233	139.159
Test 4	0.000264	138.618

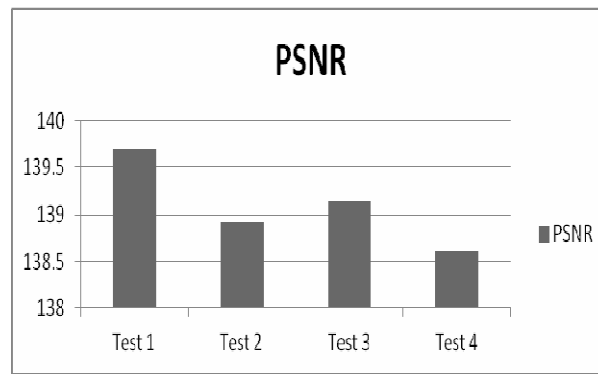


Figure (9): Peak to signal noise ratio of four tests

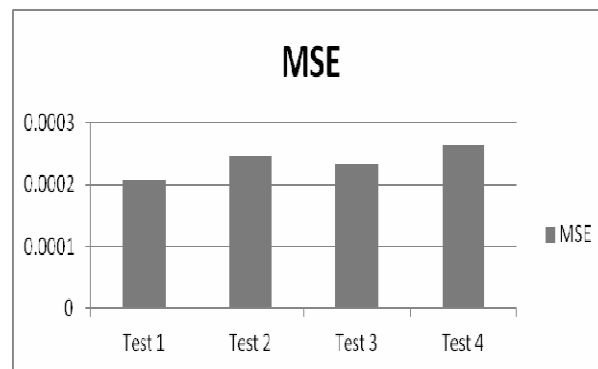


Figure (10): mean square error of four tests

CONCLUSION

The performance of a securing communications system depends on system design (hardware, cipher and decipher algorithms) and environmental parameters. The relationship between these parameters and performance metrics of interest is usually complex and a small change in design parameter tends to impact all performance metrics of interest. In order to achieve the specific performance levels of securing of signal in FHSS, emphasis has been given on the design parameters. We have investigated the spectral characteristics of both spread and non-spread BPSK waveforms. We have analyzed and simulated these systems with several variations by taking the Haar wavelet in FHSS with original binary sequence. The simulated results have shown that a signal lingering at a predefined frequency for a short period of time limits the possibility of interference from another signal source generating radiated power at a specific hop frequency.

REFERENCES

1. Jan De N. (1999). Spread Spectrum (SS). P. 230.
2. Klassen R. (2003). Spread Spectrum - A Brief Tutorial. OMNEX Control Systems Inc.
3. Goldsmith A. (2005). Wireless Communications. Cambridge University Press. P. 96-108.
4. Buehrer RM. (2006). Code Division Multiple Access(CDMA). Morgan & Claypool Publishers series.
5. Ziemer R. and Peterson R. (2001). Introduction to Digital Communications. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 2nd ed.
6. Stoffel A. (2011). Wavelets Course slides. Institute of Nachrichtentechnik. P.208-318.
7. Chun-Lin L. (2010). A Tutorial of the Wavelet Transform. P. 63

Isolation of β -lactam resistant *Streptococcus pyogenes* (GAS) from soft cheese in Baghdad markets

Nadia I. Abdulaal

Veterinary Public Health /College of Veterinary Medicine /Baghdad University / Republic of Iraq

ABSTRACT

The current study aimed to investigate the occurrence of β -lactam resistant *Streptococcus pyogenes* in locally produced soft cheese. Fifty samples were collected randomly from different markets in Baghdad between January-March 2014. The samples were analyzed and processed according to food microbiological protocols, in which they diluted and macerated in a stomacher for (3-5) minutes by 2% buffered sodium citrate (10g sample to 90ml diluent), then double-enriched in peptone water and brain heart infusion broth for (18-24) hrs. at 37 C. The mixtures were modified streptococcal selective medium of sheep blood agar containing sodium azide and were incubated for 18-72 hrs at 37C. Presumptive small white β -haemolytic colonies were checked by catalase test. Bacitracin susceptibility test was done to differentiate *S. pyogenes* from other *Streptococci*, then antibiotic susceptibility test by Muller Hinton agar with penicillin and cephalixin to differentiate resistant isolates. Results showed that 7 out of 50 samples were identified as *S. pyogenes*, three isolates were resistant to β -lactam group antibiotics.

In conclusion, monitoring of soft cheese must be done to exclude the pathogenic *S. pyogenes*.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, β -lactam antibiotics, soft cheese

الملخص باللغة العربية

من أجل التحقق في انتشار المصبحيات المقيحة المقاومة للمضادات الحيوية البيتا لاكتام في الجبن الطري، جمعت خمسين أنموذج عشوائيا من أسواق بغداد خلال المدة من يناير حتى مارس 2014. عوملت النماذج وفقا لبروتوكولات ميكروبيولوجيا الغذاء حيث هرست وخلطت مع محلول 2% منظم سترات الصوديوم (10غم من الأنموذج لكل 90 مل من المحلول المخفف) داخل الهاضم لمدة (3-5) دقائق ثم أنعشت بشكل مزدوج في ماء البيبتون ومرق نقيع القلب والدماغ لمدة (18-24) ساعة بدرجة حرارة 37 م°، ثم زرعت على الوسط الانتقائي المحور أجار دم الأغنام المضاف له الصوديوم أزايد لمدة (18-72) ساعة بدرجة حرارة 37 م°. شخصت المستعمرات الصغيرة البيضاء المحللة للدم نوع بيتا وأجري لها اختبار تحلل بيروكسيد الهيدروجين للتأكد من نقاوتها. أجري اختبار الحساسية للباسيتراسين لتمييز العزلة المقيحة عن باقي المصبحيات، ثم اختبار المقاومة للمضادات الحيوية البنسلين والسيفالوكسين لتمييز العزلة المقاومة من الحساسية على وسط أجار مولر هنتون. أظهرت النتائج عزل 20 (40%) عزلة من المصبحيات كان منها 7 (14%) عزلات من نوع المقيحة منها 3 (42.85%) عزلات مقاومة للمضادات الحيوية البيتا لاكتام. أوصت الدراسة برصد ومتابعة هذه المنتجات بشكل دوري لضمان الصحة العامة.

INTRODUCTION

Streptococcus pyogenes is a spherical, Gram-positive Lancefield group A bacterium belonging to the phylum Firmicutes and the lactic acid bacteria group that is the cause of group A Streptococcal infections (1-3). *S. pyogenes* typically produces large zones of beta-hemolysis when cultured on blood agar plates, and are therefore also called Group A (beta-hemolytic) *Streptococcus* (abbreviated GAS). *Streptococci* are catalase-negative and not able to synthesize cytochromes (no oxidative phosphorylation). In ideal conditions, *S. pyogenes* has an incubation period of approximately 1–3 days (1). It is an infrequent, but usually pathogenic, part of the skin flora. It is estimated that there are more than 700 million infections worldwide each year and over 650,000 cases of severe, invasive infections that have a mortality rate of 25% (4-6). Early recognition and treatment are critical; diagnostic failure can result in sepsis and death (4-6). *S. pyogenes* has several virulence factors that enable it to attach to host tissues, evade the immune response, and spread by penetrating host tissue layers (1). GAS Infections ranging from mild, self-limiting pharyngitis and scarlet fever to invasive and potentially life threatening Streptococcal toxic shock syndrome (STSS) and necrotizing fasciitis (4-6). It is also responsible for the post infection immune sequel rheumatic fever and glomerulonephritis. *Streptococcus pyogenes* was the principal cause of an outbreak of mastitis (7). This bacterium remains acutely sensitive to penicillin. Failure of treatment with penicillin is generally attributed to other local commensal organisms producing β -lactamase, or failure to achieve adequate tissue levels in the pharynx (7). Certain strains have developed resistance to macrolides, tetracycline and clindamycin (7). The natural sources of *Streptococci* are broad (8). They have been found to inhabit humans as well as a number of diverse animals, and are often found colonizing the mucosal surfaces of the mouth, intestinal tract, nares and pharynx. In drinking water, *Streptococcus* is an indicator of faecal contamination (8). Food sources with high risk of contamination include milk and dairy products, eggs, steamed lobster, ground ham, potato salad, custard, rice pudding, and shrimp salad. In most cases, the food items have been exposed at room temperature for several hours between preparation and consumption. The contamination of the food is the result of poor hygiene, contact with infected humans, or the use of unpasteurized milk. Cheese has been made and consumed by people worldwide for thousands of years (9). Cheeses are perishable products that can potentially harbor bacterial pathogens that can cause severe illness or even death. Some types of cheese, in particular soft cheeses made from raw milk have been implicated in outbreaks more often than others (9). The goal of this research was to investigate the contamination of soft cheese in Baghdad markets with β -lactam resistant *Streptococcus pyogenes*.

MATERIALS AND METHODS

Collection and Processing of Cheese Samples

Fifty soft cheese samples were collected randomly from different markets of Baghdad between January-March 2014. Each sample was processed according to the food microbiological protocols (10-13), in which it's diluted and macerated in a stomacher for (3-5) minutes by 2% buffered sodium citrate (10g sample to 90ml diluent), then double-enriched in peptone water for (18-24) hrs. at 37°C. The mixtures were modified streptococcal selective medium of sheep blood agar containing sodium azide and were incubated for 18-72 hrs at 37C.

Isolation and Identification procedure

Routine staining with Gram stain and identification of characteristic features of presumptive GAS colonies on modified streptococcal selective medium sodium-azide Sheep blood agar was done (10). Biochemical tests such as the catalase test was used to differentiate *Streptococci* from *Staphylococcus aureus* (10). Bacitracin susceptibility test was done (10,14) to differentiate *S. pyogenes* from other *Streptococci*, in which a 0.5 McFarland standardized overnight inoculated brain heart infusion broth of GAS isolates (5×10^5 cfu/ml) were cultured on nutrient agar by sterile cotton swabs, then bacitracin discs were dispensed onto the surface of the inoculated agar plate. The plates are inverted and placed in an incubator set to 35°C within 15 minutes after the discs are applied. After (18-24) hours of incubation, each plate is examined. If the plate was satisfactorily streaked, and the inoculum was correct, the resulting zones of inhibition may indicate and differentiate susceptible GAS isolates. Antibiotic susceptibility test by Muller Hinton agar with penicillin and cephalixin, to differentiate resistant GAS isolates (15-18). Tested the Susceptibility of isolates to antibiotics in the manner standard practice in the U.S.A. by the USDA and approved by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI.1990, MA-A4) and according to the instructions of the standard method of Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. Standardized 0.5 McFarland growth of GAS isolates (5×10^5 cfu/ml) were inoculated and streaked on the surface of Mueller-Hinton agar, then dispensed with penicillin and cephalixin discs. Resulting zones of inhibition uniformly circular confluent lawn of growth.

RESULTS AND DISCUSSION

This brief study was done to evaluate the microbiological safety of soft cheeses selected from Baghdad markets. Results showed in table (1) isolation of *Streptococci* from 20 (40%) samples in which *S. pyogenes* was evident in 7 (14%) of samples as 3 (42.85%) of them were resistant to β -lactam group (zone of inhibition less than 10mm). presumptive GAS was purple Gram positive, non-spore forming cocci that occurs in chains or in pairs of cells after routine staining. The colonies were white, circular, small and glistening with characteristic β -hemolytic feature of GAS on modified streptococcal selective medium

sodium-azide Sheep blood agar. Catalase test was negative for all isolates. Seven isolates showed bacitracin positive, while other isolates were negative (table 1).

Table (1): Occurrence of GAS in soft cheese in Baghdad markets

Type of sample	Collected number	<i>Streptococci</i> %	Bacitracin Susceptible <i>Streptococcus pyogenes</i> %	
			7 (14%)	
			β-lactam Resistant	β-lactam Susceptible
Soft cheese	50	20 (40%)	3 (42.85%)	4 (57.15%)

Generally, there were multi-interconnected and complex factors (direct and indirect) for percentages of isolation, distribution and frequency of β-lactam Resistant *Streptococcus pyogenes* (GAS) populations in Iraqi environment due to poor or insufficient hygienic measurements and post processing contamination in food chain especially after 2003. All these complex events lead to development of emerging outbreaks of multidrug resistant microbes in man and animals primarily via foods / feeds mediators resulting in a disease or asymptomatic carriers. Dairy products, including cheeses, are perishable products known to be potential carriers of pathogenic bacteria when care is not taken to prevent contamination with such bacteria (2,9). Lack of efficient tools to combat infections promotes the emergence of strains that are more pathogenic, more difficult and expensive to eradicate (6,7). GAS can be shed in the milk of animals infected with this organism, and because GAS is destroyed by pasteurization, raw milk and cheeses made from raw milk are more likely than products made from pasteurized milk to be contaminated with GAS. However, pasteurized products can become contaminated with GAS through post-pasteurization contamination. Because GAS is resistant to most commonly used antibiotics and infections with it can consequently be difficult to treat, cheese makers should take steps to control the presence in their products (2,9). There has been a global resurgence of hyper-virulent strains that cause invasive infection (7). A corresponding increase in academic research has accompanied these changes and points to the need for more effective antibiotics and ideally the development of a vaccine protective against dominant invasive serotypes (7). These findings suggest presence of GAS in locally produced soft cheeses in Baghdad markets thus recommended to monitoring these products periodically by verified hazard analyses and critical control points programs (HACCP) to ensure public health.

REFERENCES

1. Todar K. (2014). *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcal* Disease. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. Todar's Online Textbook of Bacteriology <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
2. Jay JM.; Loessner MJ. and Golden DA. (2005). Modern Food Microbiology, 7th ed., Aspen Pub. Gathersburg, MD, USA.
3. Quinn PJ.; Markey BK.; Carter ME.; Donnelly WJ. and Leonard FC. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd.
4. Lynskey NN.; Lawrenson RA. and Sriskandan S. (2011). New understandings in *Streptococcus pyogenes*. Curr. Opin. Infect. Dis. 24:196–202
5. Lamagni TL.; Neal S.; Keshishian C.; Powell D.; Potz N.; Pebody R.; George R.; Duckworth G.; Varkila JV. and Efstratiou A. (2009). Predictors of Death after Severe *Streptococcus pyogenes* Infection. Emerg. Infect. Dis. (15)8: 1304-1307.
6. Siljander T. (2009). Molecular and Epidemiological Aspects of *Streptococcus pyogenes* Disease in Finland. PhD. Thesis. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland.
7. Tamayo J.; Trallero EP.; Go'mez-Garce's JL. and Alo's JI. (2005). Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain. J. Antimicrob. Chemother. 56: 780–782.
8. Sitkiewicz I. and Hryniewicz W. (2010). Pyogenic *Streptococci*. Danger of Re-emerging Pathogens. Polish J. Microbiol. 59(4): 219-226.
9. Almeida G.; Figueiredo A.; Rola M.; Barros RM.; Gibbs P.; Hogg T. and Teixeira P. (2007). Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. J. Food Prot. 70:1710–1716.
10. Quinn PJ.; Carter ME.; Markey B. and Carter GR. (2004). Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed., Mosby Int., USA.
11. Siegrist J. (2011). Detection, identification, differentiation and cultivation of *Streptococci*. In: Microbiology focus: Methods and Techniques for Detection of *Coliforms* and *Streptococci*. Sigma-Aldrich. 3(2): 2-7.
12. Centre for Food Security and Public Health (CFSPH). *Streptococcus*. (2005). Iowa State University, USA. PP. 1-11.
13. MacFaddin JF. (1988). Media for isolation-cultivation-identification maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
14. Murray PR.; Baron EJ.; Jorgensen JJ.; Pfaller MA. and Tenover FC. (2003). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press: Washington, DC. P1-68.
15. Bauer AW.; Kirby WMM.; Sherris J C. and Tenckhoff M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
16. Clinical Laboratory Standards Institute. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
17. Lalitha MK. (2004). Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. (Under the auspices of Indian Association of Medical Microbiologists) <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Approved Standard Fifth Edition (M7-A5). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Stabilized synthesis of nanoparticle Gamma-Alumina at 1200 °C extracted from Iraqi kaolin

Fadhil A. Rasin (1) Intisar A. Hamad (2) and Marwa A.M. Hassan (2)

(1) Dept. of Engineering Materials / University of Technology/ Baghdad (2) Dept. of Physics / College of Sciences / Al- Mustansirya University / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

The current study was conducted to report the synthesis of gamma-Al₂O₃ nanoparticles from Iraqi kaolin. The kaolin was transformed to meta-kaolin by calcination at 750°C and 850 °C for 3 hrs. Results were investigated by XRD. Then the calcinated kaolin was treated with different molar ratios of H₂SO₄ for 8 hrs. to form Al₂(SO₄)₃.18H₂O solution, which doped with BaO and precipitated by ethanol. The precipitate was dried and calcined at (1100, 1150, and 1200) °C for 2 hrs., which resulted in formation of stabilized γ-alumina at high temperature. The structure was confirmed by XRD and the mean particle size was determined by SEM to be 35-55 nm.

Key words: γ-A₂O₃, Aluminum Sulfate, Calcination

الملخص باللغة العربية

تهدف الدراسة الحالية إلى عملية تصنيع جسيمات نانوية لكاما الومينا من اطيان الكاولين العراقية. تم تحويل الكاولين الى ميتا كاولين بواسطة التحميص بدرجة 750°C و 850°C لمدة ثلاث ساعات حيث تم التحقق من النتائج بواسطة حيود الاشعة السينية. تم معالجة الكاولين المكلسن بحامض الكبريتيك وبتراكيز مختلفة لمدة ثمانية ساعات للحصول على محلول كبريتات الالمنيوم المائية والتي تم تشويبها بواسطة BaO وترسيبها بالايثانول. تم تجفيف الراسب وتحميصه بدرجات 1100, 1150, and 1200 °C لمدة ساعتين وكانت النتيجة تشكل كاما الومينا مستقرة حتى عند درجات الحرارة العالية. تم التحقق من البنية التركيبية بواسطة XRD ومعدل الحجم الحبيبي من خلال SEM والذي كان بحدود 35-55 nm.

INTRODUCTION

Alumina has of many industrial applications and exists in a variety of stable structures including γ , β , δ and its stable phase is α -alumina phase (1). Alumina has been widely extracted from bauxites using Bayer process. Meanwhile, the bauxite resources in many countries are less abundant than nonbauxite materials which have been processed to develop alternative technologies for producing alumina (2-4). Some examples of these nonbauxite raw materials are mica, fly ash, kyanite and kaolin. To obtain high purity of alumina, significant progress have been achieved using materials such as nitrites, sulfates and chlorides (5-8). Gamma alumina is one kind extremely important nano sized materials, the high surface area in nano particles and other factors such as mechanical strength and low cost are responsible to the wide applications of γ - Al_2O_3 such as catalyst and catalyst substrate in automotive industry and petroleum industries, abrasive and thermal wear coatings (9). Recent studies have shown that when a critical surface area is achieved, the γ -alumina is relative to α -alumina feature in stabilizing in thermodynamics (10). Until now, large variety of methods such as sol-gel synthesis from calcination of boehmite (9), hydrolysis of phosphide aluminum (10), laser ablation of an aluminum target in an oxygen atmosphere (11), hydrolysis of alumina alkoxide (12), thermal decomposition of aluminum sulfate (13), metal organic chemical vapor deposition with $\text{Al}_3(\text{OH})_3$ (14) have been used to prepare γ -alumina.

Kaolinite [$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$] is a layered silicate clay mineral which is part of industrial minerals group and it represents the main mineral in the kaolin clay (15). Because of the kaolin abundance and the weight percentage of alumina existing in the kaolin structure, it can be suitable material for production of γ -alumina.

MATERIALS AND METHODS

Kaolin powder with particle size $<45\mu\text{m}$ and $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (as stabilizing material) were used as starting materials. Table (1) shows the chemical analysis of raw and treated kaolin. The kaolin powder was calcined at 750°C and 850°C for 3 hrs. in an electrical muffle furnace to lose the alumina components. The XRD patterns of the raw and calcined kaolin is showed in the figure (1) using a Labx XRD 6000 SHIMADZU XR – Diffractometer with Cu K α radiation of voltage 30 Kv. Current 15 mA, scanning speed = $4^\circ/\text{min}$. Then 7.7 gm of calcined kaolin was dispersed in H_2SO_4 solution with (1M and 1.5M respectively) in 500 ml reaction flask, maintained at 80°C for 8 hrs. The mixture of the powder and acid (256.63 ml) was stirred at 500 rpm with magnetic stirrer then cooled to room temperature. After the reaction, the slurry was filtered to obtain aluminum sulfate solution, which mixed with barium chloride (barium chloride diluted

by few drops of ethanol) to achieve the thermal stability of BaO doped alumina at 1200°C . In this process the BaO content was (5 wt %) based on the ($\text{Al}_2\text{O}_3 = 100$) and molar ratio ($\text{BaO} : 30 \text{ Al}_2\text{O}_3$) according to the best result achieved in the experimental work (16). Then 250 ml of the mixed solution was added at the rate of $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ into 600 ml of ethanol while stirring at 500 rpm with a magnetic stirrer. The precipitate were washed again with ethanol then dried at 80°C for 8 hrs. and calcined at (1100, 1150 and 1200°C).

Table (1): Chemical compositions of raw and treated kaolin

Deposition condition	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	Na ₂ O	MgO	L.O.I
kaolin	57.86	32.37	1.97	0.24	0.28	0.14	1.37
T= 750°C , 1M and undoped	2.02	76.82	----	----	----	----	----
T= 750°C , 1M and doped	4.76	77.42	----	----	----	----	----
T= 750°C , 1.5 M and undoped	1.38	74.86	----	----	----	----	----
T= 750°C , 1.5 M and doped	4.52	86.36	----	----	----	----	----
T= 850°C , 1M and undoped	1.5	65.78	----	----	----	----	----
T= 850°C , 1 M and doped	4.06	76.92	----	----	----	----	----
T= 850°C , 1.5 M and undoped	1.68	83.33	----	----	----	----	----
T= 850°C , 1.5 M and doped	1.09	95.54	----	----	----	----	----

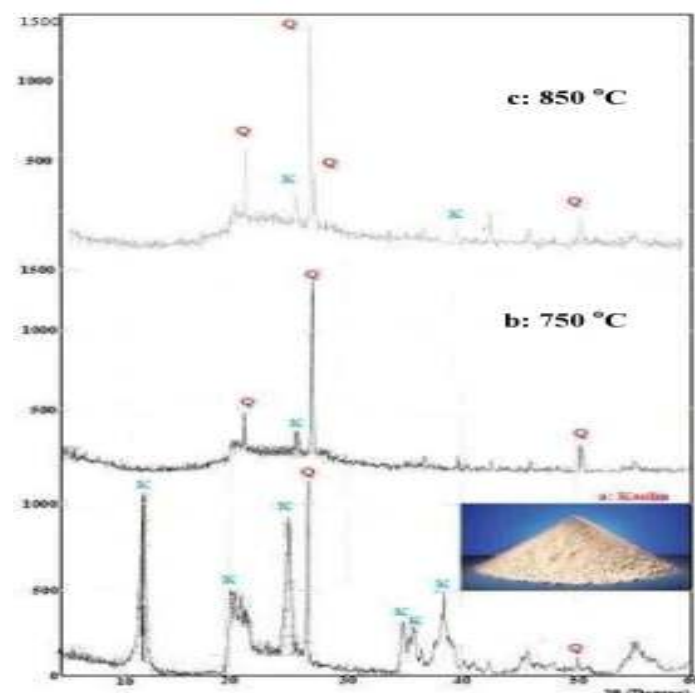


Figure (1): XRD patterns of (a) kaolin, (b) calcined kaolin at (750°C) and (c) calcined kaolin at (850°C) for 3hrs.

RESULTS AND DISCUSSION

The first step of tests to extract alumina was carried out on clay samples that had been calcined at 750 °C and 850 °C for 3 hrs. The effect of calcination temperature, acid concentration and the addition of BaO on alumina extraction are shown in table (1). Generally, this table indicates that the percentage of alumina extraction increases as acid concentration increases and the addition of BaO.

Figure (1) (a, b, c) shows the XRD patterns of kaolin and calcined kaolin at (750 °C and 850 °C). These patterns indicate that the kaolinite of the raw tested clay is of a well crystalline at 2θ (12°- 40°). Order as it can be seen at this range in the calcinated samples marked a change in the crystallinity. These peaks disappear giving a band of amorphous phase of meta-kaolin, which is transient and more active reacts than kaolin (17).

Figures (2, 3) show the peaks in X-Ray models for synthesized precipitate, which represent the crystalline nature of the hydrate aluminum sulphate. The effect of treatment by barium chloride can be observed on the intensity of the peaks of the prepared samples. Figure (4) and figure (5) show the XRD results for precipitate powder calcined at various temperatures for 3 hrs. The thermal stability of BaO doped alumina powder can be observed by the peak intensity at all different temperature and acid concentrations. It is can also note from these two figures that the samples with 5 wt% BaO and acid concentration (1.5 M) showed an XRD pattern which closely corresponded to the γ - Al_2O_3 phase. Sample (calcined at 750 °C and treated with 1.5 M, for firing temperature 1200 °C) was therefore chosen for further study.

Figure (6) (a, b) identifies the morphologies of the powders prepared by the two calcination temperatures. The particle size of synthesized gamma alumina were determined by scanning electron microscopy which are in the range of 35-55 nanometers. It is clearly observed from the micrograph that nano road are extra-fine, with an average diameter of γ - Al_2O_3 found to be (25 nm) as shown in figure (6) (b).

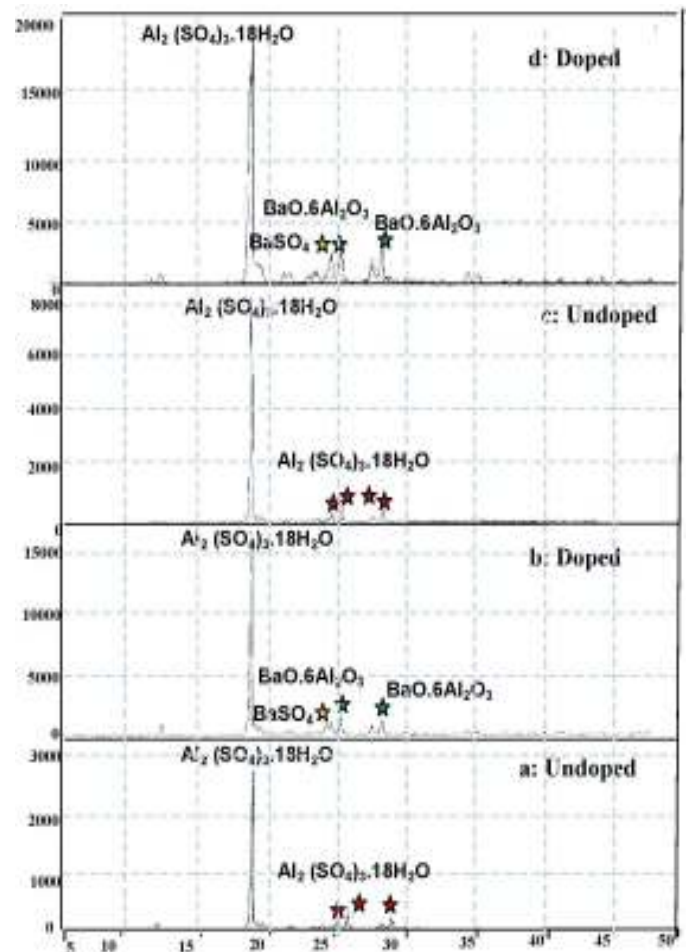


Figure (2): XRD models for synthesized precipitate which represent the crystalline nature of the aluminum sulphate hydrate for sample calcined at 750 °C for 3 hrs.

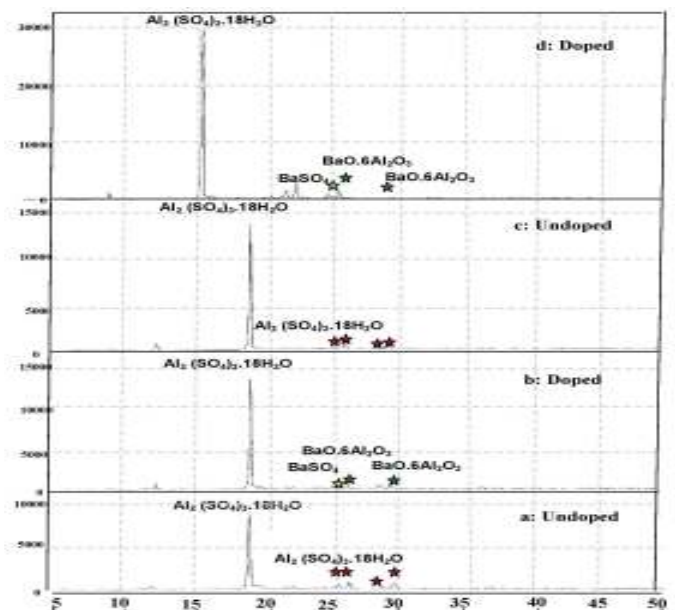


Figure (3): XRD models for synthesized precipitate which represent the crystalline nature of the aluminum sulphate hydrate for sample calcined at 850 °C for 3 hrs.

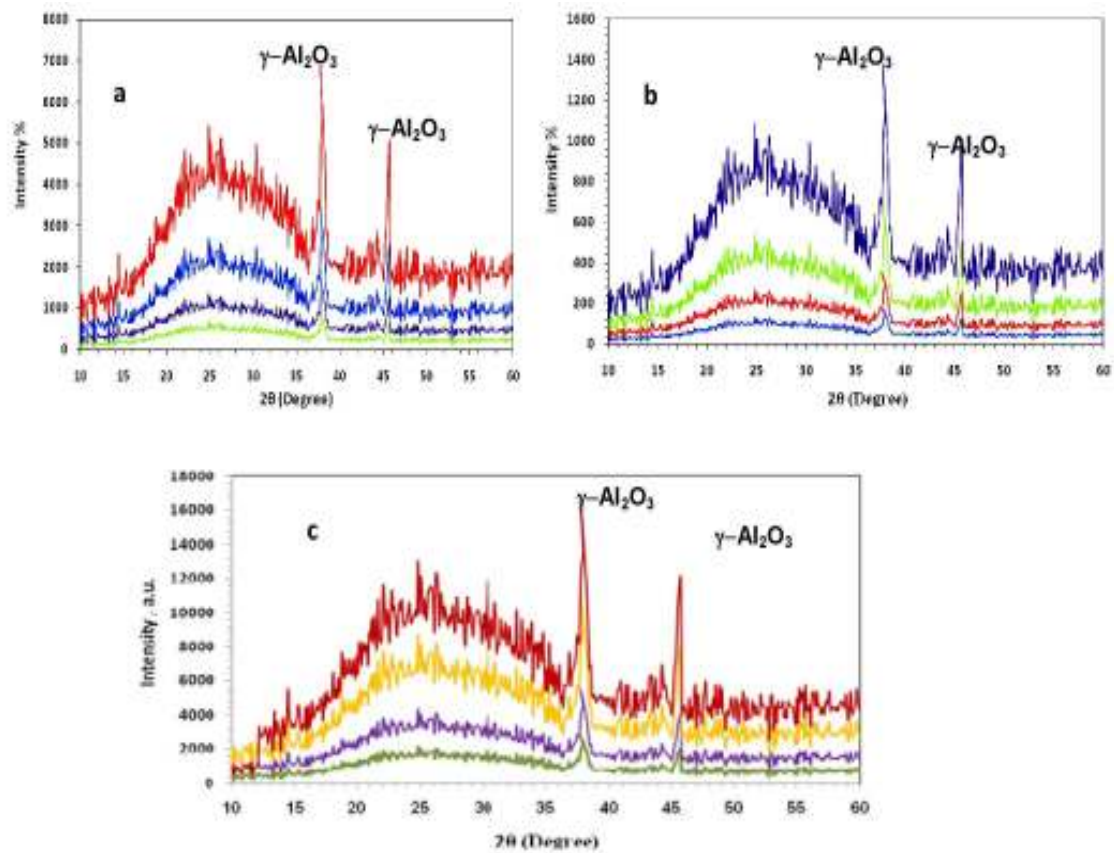
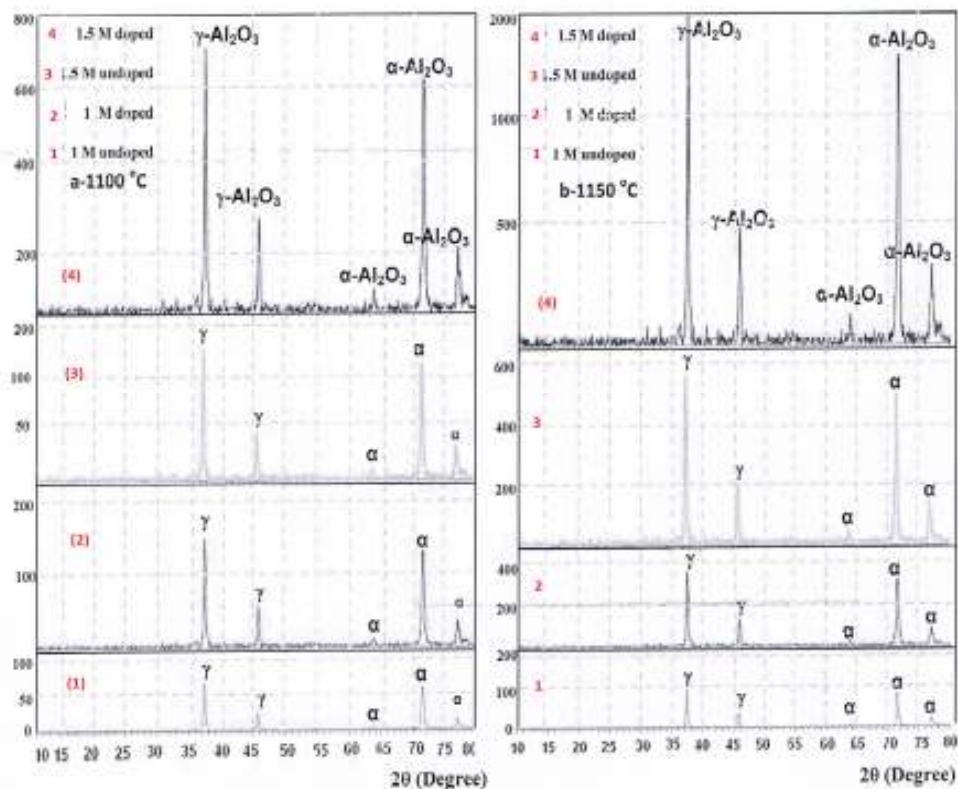


Figure (4,a ,b, c): XRD results for precipitate powder calcined at 750 °C for 3 hrs.



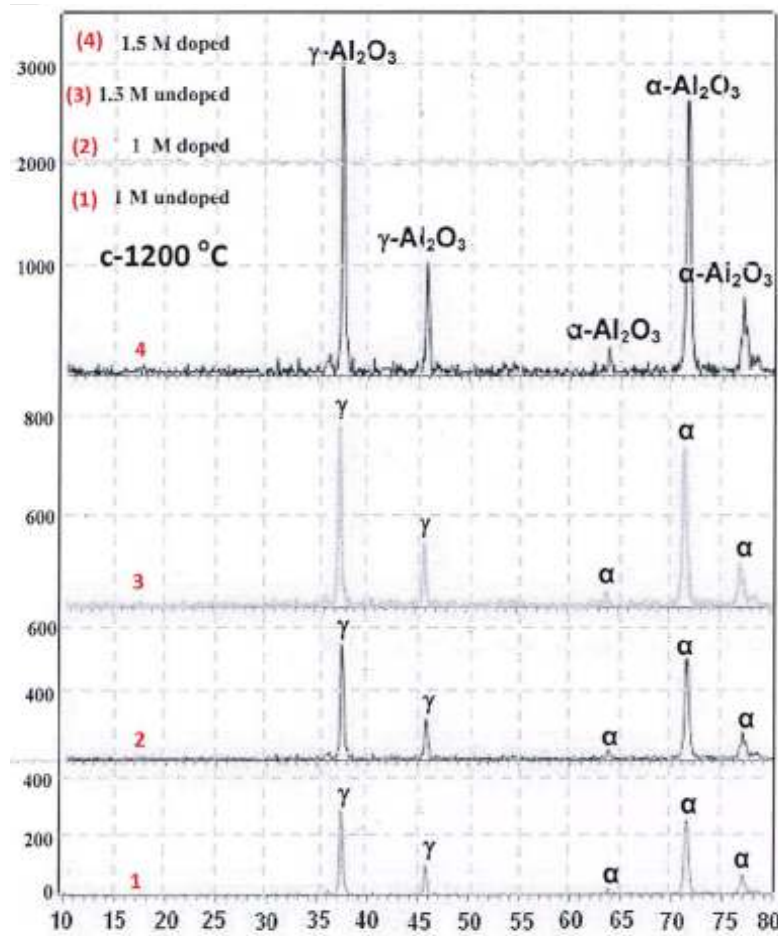


Figure (5 ,a ,b, c): XRD results for precipitate powder calcined at 850 °C for 3 hrs.

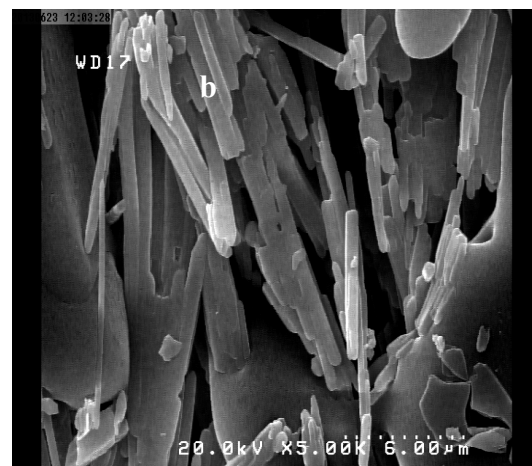
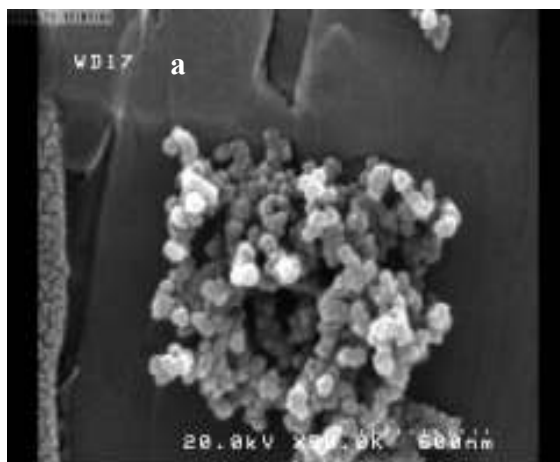


Figure (6): SEM image of synthesized gamma-alumina at (a) 750 °C and (b) 850 °C for 3hrs.

CONCLUSION

1. γ - Alumina powder has been obtained using kaolin as raw material. It is prepared to be thermally stable at a temperature of 1200 °C from Iraqi kaolin clay. Percentage of synthesized found to be (87%-95%).
2. By using the precipitated mixing method and with the addition of BaO, the alumina powder can be thermally stabilized at the temperature of 1200 °C i.e. increase the transformation temperature of gamma alumina by about 1200 °C.
3. From the result of XRD, the sample (kaolin calcined at 750 °C, treated with 1.5 M acid doped with 5% BaO), gives stable and pure γ - alumina, but the sample (kaolin calcined at 850 °C, treated with 1.5 M acid doped with 5% BaO), gives stable γ -alumina and α - alumina at 1200 °C.
4. The intensity of γ - alumina peak at 1200 °C for the sample (kaolin calcined at 750 °C; 1.5 M acid) represents high degree of the crystalline of γ -alumina.

REFERENCES

1. Wang S.; Li Y. and Zhai Y. (2009). Synthesis of Gamma-Alumina via Precipitation in Ethanol. *Mat. Lett.* 62(20): 3552-3554.
2. Gitzen W. (1970). *Aluminas as Ceramic Material*. American Ceramic Society, Columbus.
3. McColm J. (1983). *Ceramic Science for Materials Technologist*. Chapman and Hall, New York.
4. Murray H H. (2000). Traditional and New applications for Kaolin, Smectite, and Palygorskite: A General Overview. *App. Clay Sci.* 17(5-6): 207-211.
5. Zhao R H.; Guo F.; Hu Y Q. and Zhao H Q. (2006). Self- Assembly Synthesis of Organized Mesoporous Alumina by Precipitation Method in Aqueous Solution. *Micro-por. Mesopor. Mat.* 93(1-3): 212-216.
6. Kato E.; Daimon K. and Nanbu M. (1981). Decomposition of Two Aluminum Sulfates and Characterization of the Resultant Alumina. *J. Am. Cer. Soc.* 64(8): 436-443.
7. Blendell J E.; Bowen H K. and Coble R L. (1984). Effects of Particle Distribution on Transformation-Induced Toughening in an MgO-PSZ. *Am. Cer. Soc. Bulletin.* 63: 799-804.
8. Dynys F W. and Halloran J W. (1982). Alpha Alumina Formation in Alum-Derived Gamma Alumina. *J. Am. Cer. Soc.* 65(9): 442-448.
9. Paglia G.; Buckley C E. ;Rohl A L.; Hart R D.; Winter K. and Studer A J. (2004). Boehmite Derived γ -Alumina System. 1. Structural Evolution with Temperature, with the Identification and Structural Determination of a New Transition Phase, γ -Alumina. *Chem. Mat.* 16(2): 423-429.
10. Wang Y H.; Wang J.; Shen M Q. and Wang W L. (2009). Synthesis and Properties of Thermostable γ -Alumina Prepared by Hydrolysis of Phosphide Aluminum. *J. Alloys Comp.* 467(1-2): 405-412.
11. Johnston G P.; Muenchausen R.; Smith DM.; Fahrenholtz W. and Foltyn S. (1992). Reactive Laser Ablation Synthesis of Nanosize Alumina Powder. *J. Am. Cer. Soc.* 75(12): 3293-3298.
12. Ogihara T.; Nakagawa H.; Yanagawa T.; Ogata N. and Yoshida K. (1991). Preparation of Monodisperse, Spherical Alumina Powders from Alkoxides. *J. Am.Cer. Soc.* 74: 2263.
13. Kato E.; Daimon K. and Nanbu M. (1981). Decomposition of Two Aluminum Sulfates and Characterization of the Resultant Alumina. *J. Am. Cer. Soc.* 64: 436.
14. Noda H.; Muramoto K. and Kim H. (2003). Preparation of Nano Structured Ceramics Using Nanosized Al_2O_3 Particles. *J. Mat. Sci.* 38(9): 2043-2047.
15. Deer W A.; Howie R A. and Zussman J. (1992). *An Introduction to the Rock-Forming Minerals*. 2 Edition, Longman. Harlow.
16. Karim A S. (2006). The Investigation of the γ -alumina powder extracted from Iraqi kaolin. Ph.D. Thesis. University of Technology, Baghdad. Iraq.
17. Abdul Wahab A. and Al-Sindy S I.(2006). Alumina recovery from Iraqi kaolinitic clay by hydrochloric acid route. *Iraqi Bull. Geol. Min.* 2(1):67 – 76.

Heavy Metals in Canned, Fresh and Frozen Fish from local Iraqi Markets

Salim Al- Tamimi (1) and Sundus H. Ahmed (2)

(1) Market and consumer protection Center/ Baghdad University (2) Ministry of Sciences and Technology / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

Contamination of fish with heavy metals had gained a particular interest because of the potential risk to humans who consume them. The edible muscles of twenty three of different samples of fish canned, frozen and fresh fish were taken and analyzed by (atomic Spectroscopy). Twenty three samples of fish, canned, frozen and fresh collected from several Markets in Iraq were analyzed for heavy metals. The concentrations of heavy metals Cr, Cd, Pb, Ni, and Fe, varied between 0.005- 0.066, 0.001-0.047, 0.004- 0.045, 0.0009- 0.03, 0.007-1.881ppm. respectively. In all samples, the concentrations of Cd and Pb exceeded the maximum allowable level.

Key words: Heavy metals, Canned fish, fresh fish, frozen fish

الملخص باللغة العربية

حظي تلوث السمك بالمعادن الثقيلة باهتمام خاص بسبب المخاطر المحتملة على البشر الذين يستهلكون الأسماك الملوثة. في هذه الدراسة، تم تحليل المعادن الثقيلة للعضلات الصالحة للأكل لثلاثة وعشرين عينة من الأسماك المعلبة والمجمدة والطازجة التي جمعت من الاسواق في العراق، باستخدام (المطياف الذري)، وقد كانت تراكيز العناصر الثقيلة Cr، Cd، Pb، Ni، و Fe يتراوح بين 0.005- 0.066، 0.001-0.047، 0.004- 0.045، 0.0009- 0.03، 0.007-1.881 جزءا بالمليون، على التوالي، وان تركيز Pb، Cd تجاوز الحد الأقصى للمستوى المسموح به.

INTRODUCTION

Heavy metals are natural components of the Earth's crust. They can not be degraded or destroyed. To a small extent, they enter our bodies via food, drinking water and air. As trace elements, some heavy metals (e.g. copper, selenium, iron, manganese, zinc) are essential to maintain the metabolism of the human body. At higher concentrations, these heavy metals can lead to poisoning. Heavy metal poisoning could result, for instance, from drinking-water contamination (e.g. from lead pipes), high ambient air concentrations near emission sources, or intake via the food chain. A group of heavy metals are classified as non-essential, because they have no biological, chemical and physiological importance in man e.g. Cadmium (Cd), Mercury (Hg), Lead (Pb), Iken and Egiebor (1). Fish is widely consumed in many parts of the world by humans because it has high protein content, low saturated fat and also contains omega 3 fatty acids known to support good health (2). Fish is a major source of iron for adults and children. Iron deficiency causes anemia (3). Lead poisoning is generally ranked as the most common environmental health hazard (4). Apart from threat from polluted environment, canned fish is subjected to lead contamination during canning process. Solder used in manufacture of cans has been recognized as a source of lead contamination during canning (5). The toxic nonessential metals—cadmium and lead are characterized as having no demonstrated biological requirement in humans, and exposure is associated with recognizable toxicity. Also, severity of toxicity increases with increases in dosage. Although there may be some lower limit of exposure at which toxicity may not be detected (threshold), there may be no level at the molecular level that does not have an adverse effect (4). In natural waters the concentration of Cr is low and is within the range of between 1 and 2 mg/l dissolved Cr (5). Cr is used in industry for electroplating, steelmaking alloys, in chrome plating, rubber manufacturing, leather tanning and for fertilizers (6). Excessive amount of chromium (III) may cause adverse health effects (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004) (7). There are four states in which the Cr ion is found: Cr²⁺, Cr³⁺, Cr⁵⁺ and Cr⁶⁺. It is in the hexavalent form where Cr is allowed to cross biological membranes of aquatic organisms. The hexavalent Cr behaves toxicologically in a manner quite different from most heavy metals (8). Because hexavalent Cr can readily penetrate gill membranes by passive diffusion and concentrate at higher levels in various organs and tissues, it can manifest its toxic action internally as well as on the gill surface (9). Cr is particularly dangerous as it can accumulate in many organisms, sometimes as much as 4000 times above the level of the surrounding environment as was noted in aquatic algae (10). Iron (Fe), the form of Fe frequently found in solution in groundwater is the ferrous (Fe²⁺) ion (11), with ferrous

compounds, which is believed to be toxic. The availability of Fe for aqueous solution is affected by environmental conditions, particularly changes in the degree of oxidation or reduction (11), which is dependent primarily on pH, redox potential and temperature (12). Fe is readily oxidized by dissolved oxygen to the ferric form in the neutral to slightly acidic pH range, while the ferrous ion is stable under these conditions (13).

This study reports the concentrations of heavy metals in canned fish Fresh and frozen samples purchased from local markets in Iraq.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Samples were collected from local markets in Iraq. Fifteen canned fish samples labeled as A1, A2.....A15, two frozen samples labeled as B1, B2, and six fresh samples labeled as C1, C2.....C6, as shown in tables (1, 2).

Table (1): General description of canned fish selected samples

N	Type of canned fish	Origin	Ingredients
A1	Tuna	Thailand	Tuna, sun flower oil, salt
A2	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A3	Sardine	Thailand	Sardine, Soya oil, salt
A4	Tuna	Thailand	Tuna, salt
A5	Tuna	Thailand	Tuna, Soya oil, salt
A6	Sardine	Thailand	Sardine, oil, salt
A7	Sardine	Tunis	Sardine, oil, salt
A8	Tuna	Thailand	Tuna, salt
A9	Tuna	Thailand	Tuna, sun flower oil, salt
A10	Sardine	Thailand	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A11	Sardine	Morocco	Sardine, pepper, vegetable oil, salt
A12	Sardine	Morocco	Sardine, pepper, plant oil, salt
A13	Sardine	Thailand	Sardine, Salsa
A14	Sardine	Thailand	sardine, vegetable oil
A15	Smoked Sardine	Thailand	Sardine, salt, vegetable oil

Table (2): General description of fresh fish selected samples

N	Fresh fish (Species)	Origin
C1	<i>Barbus luteus</i>	Local
C2	<i>Hypophthalmic thyesmolotrix</i>	Local
C3	<i>Alburnus mossulensis</i>	Local
C4	<i>Mugilishni misra</i>	Local
C5	<i>Aspiusvorax heckel</i>	Local
C6	<i>Barbus grybus</i>	Local
B1	Frozen boneless	Al-Sultan-company
B2	Frozen boneless	Al Fakher company

The stability of calibration was checked periodically by analyzing the standard solution. Blank samples made from only reagents without sample were analyzed to get rid of any background concentration metals in the system (14). The selected heavy metals were then determined using Atomic Absorption spectrophotometer.

Recovery analysis for all the metals determined Pb, Cd, Fe, Ni, and Cr showed results above 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Fifteen brands of canned fish, six fresh fish sample and two brand frozen fish samples were analyzed for Pb, Cr, Fe, Cd and Ni. Good recoveries of samples demonstrate the accuracy of the method used. The concentrations of Pb, Cr, Fe, Cd and Ni in all samples are presented in tables (1,2). Chromium (III) is an essential nutrient that potentiates insulin action and thus influences carbohydrate, lipid and protein metabolism. However, Chromium (VI) is carcinogenic. The results indicate that the concentration varied between all brands of fish samples (canned, fresh and frozen). In this study, chromium concentration in ppm was found to be in canned fish 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, (0.0051, 0.0153, 0.0204, 0.0663, 0.0102, 0.0102, 0.0306, 0.0357, 0.0459, 0.0102, 0.0306, 0.0459, 0.0255, 0.0306, 0.0204ppm), respectively, in the tow brands of frozen fish1B and 2B (0.035, 0.017 ppm), respectively, while in the type of local fish 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C,(0.03, 0.0166, 0.0147, 0.0184, 0.0498, 0.0166, ppm), respectively, According to (14), Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition, Dietary Reference Values for trivalent chromium lies above 0.025 ppm/day for adults and, between 0.0001 and 0.001 ppm/day for children and adolescents (14). also noted that no adverse effects were observed at intakes of 1000-2000 ppm/day of trivalent chromium. The US National Research Council (NRC specified an Estimated Safe and Adequate Daily Dietary Intake (ESADDI) of 0.05-0.2 ppm/day for adults and 0.01-0.04 ppm/day infants (0-0.5 years), (14). The fact that toxic

metals are present in fishes is of particular importance in relation to the FAO/ WHO (15) standards for Pb as a toxic metal. In this study, lead concentration in ppm was found to be in canned fish 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A,(0.1217, 0.0609, 0.0152, 0.0304, 0.0076, 0.0152, 0.0076, 0.0533, 0.4565, 0.0076, 0.0152, 0.0076, 0.0913, 0.0457, 0.0837, ppm.) , respectively, in the tow brands of frozen fish1B and 2B, (0.042, 0.05 ppm.), respectively, while fresh fish 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C,(0.03, 0.04, 0.023, 0.015, 0.042, 0.023, ppm.), respectively. The experimental data shows that the concentration of Pb in all samples were highest than the allowable level reported by FDA as shown in (Table 3), (16). From the results we found the concentration of lead metal in canned fish samples was as shown: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A(0.08862, 1.4146, 0.6247, 1.2548, 0.4449, 1.1386, 1.3347, 1.0732, 1.8814, 1.5962, 1.3220, 1.1695, 1.2966, 1.7506) respectively, in the tow brands of frozen fish, 1B and 2B, (0.035, 0.007 ppm.) while fresh fish1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C ,(0.031, 0.017, 0.015, 0.018, 0.05, 0.017, ppm.) , respectively, This shows that all samples lies below minimum Fe levels and as such, supplements through other foods be ingested daily. However from, the results we found that the canned fish sample contained nickel in ppm. As shown: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A(0.0394, 0.0045, 0.0091, 0.0136, 0.0061, 0.0136, 0.0167, 0.0197, 0.0076, 0.0136, 0.0303, 0.0061, 0.0227, 0.0045, 0.0061) respectively, in the tow brands of frozen fish1B and 2B, (0.25, 0.17 ppm.) while fresh fish1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C ,(0.006, 0.003, 0.004, 0.0009, 0.002, 0.004, ppm.), respectively, This levels sure lies below the WHO/FEPA Nickel limits in foods and as such, supplements through other foods should be ingested daily.

The maximum level of Cd permitted by FAO/WHO (15) is 0.003ppm. Cadmium may accumulate in the human body and may induce kidney dysfunction, skeletal damage and reproductive deficiencies US EPA (2004) (2).Table(3) showed that canned fish contained of Cd in ppm as shown: 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8 A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A(0.0394, 0.0045, 0.0091, 0.0136, 0.0061,0.0136, 0.0167, 0.0197, 0.0076, 0.0136, 0.0303, 0.0061, 0.0227, 0.0045, 0.0061), respectively, in the tow brands of frozen fish, 1B and 2B, (0.035, 0.007 ppm.) while fresh fish, 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C ,(0.031, 0.017, 0.015, 0.018, 0.05, 0.017 ppm.), respectively, the concentration of Cd were found to be above the standard which permitted by FAO/WHO (15) in all samples. Cadmium interacts with the calcium metabolism, and in fish it causes abnormally low calcium levels (hypocalcaemia), probably by inhibiting calcium uptake from the water. However, high calcium concentrations in the water protect fish from cadmium uptake by competing at uptake sites. Effects of long-term exposure can include larval mortality and temporary

reduction in growth (16). The variation of metal concentration in the different fish samples analyzed could be attributed to the fact that some fish are older in age than others. The level of contaminants in fish is influenced by the duration of exposure of fish to contaminants in water, feeding habit of fish,

concentrations of contaminants in water column, water chemistry, contamination of fish during handling and processing, quality of canned fish and shelf life of canned fish(17).

Table (3): Concentrations in mg/kg of heavy metals in selected fish samples

N.	Cr (PPM)	Cd (PPM)	Pb (PPM)	Ni (PPM)	Fe (PPM)
1A	0.0051	0.0061	0.1217	0.0394	0.8862
2A	0.0153	0.0011	0.0609	0.0045	1.4146
3A	0.0204	0.0050	0.0152	0.0091	0.6247
4A	0.0663	0.0055	0.0304	0.0136	1.2548
5A	0.0102	0.0042	0.0076	0.0061	0.4449
6A	0.0102	0.0040	0.0152	0.0136	1.1386
7A	0.0306	0.0095	0.0076	0.0167	1.3347
8A	0.0357	0.0045	0.0533	0.0197	1.0732
9A	0.0459	0.0040	0.4565	0.0076	1.8814
10A	0.0102	0.0071	0.0076	0.0136	1.5962
11A	0.0306	0.0034	0.0152	0.0303	1.3220
12A	0.0459	0.0061	0.0076	0.0061	1.1695
13A	0.0255	0.0198	0.0913	0.0227	1.9140
14A	0.0306	0.0040	0.0457	0.0045	1.2966
15A	0.0204	0.0119	0.0837	0.0061	1.7506
1B	0.035	0.0065	0.042	0.035	0.035
2B	0.007	0.0082	0.057	0.007	0.007
1C	0.0313	0.0470	0.03	0.006	0.031
2C	0.0166	0.0055	0.004	0.003	0.017
3C	0.0147	0.0076	0.023	0.004	0.015
4C	0.0184	0.0065	0.015	0.0009	0.018
5C	0.0498	0.0082	0.042	0.002	0.05
6C	0.0166	0.0065	0.023	0.004	0.017

CONCLUSION

From the results obtained of this study, it can be found that samples are not in the ranged of maximum acceptable limits as per WHO. The probable sources of the heavy metals in the aquatic environment may be due to various industries outlet, which come to the water.

REFERENCES

1. Ikem A. and Egiebor NO. (2005). Assessment of Trace Elements in Canned Fishes marketed in Georgia and Alabama (United States of America). J. Food. Comp. Anal. 18: 771-787.
2. US EPA (2004). What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-F-04-009, 2pp. available at: <http://www.epa.gov/waterscience/fish/MethylmercuryBrochure.pdf>.
3. Institute of Medicine. (2003). Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Planning. Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Institute of Medicine of the National Academies. The National Academies Press, Washington, DC, p: 248.
4. Goyer RA. (1994). Biology and nutrition of essential elements. In *Risk Assessment of Essential*

Elements, Washington, DC: Int. Life Sci. Inst. 13–19.

5. MAFF. (1995). Monitoring and surveillance of non radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of wastes at sea, 1993. Aquatic Environment Monitoring Report No. 44. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft.

6. Celik U.; Cakli S. and Oehlenschlaeger J. (2007). High Contents of Cadmium, Lead, Zinc and Copper in Popular Fishery Products sold in Turkish Supermarkets. *Food Contr.* 18: 258-261.

7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2004). A survey of mercury and methyl mercury in edible fish and invertebrates.

8. Holdway DA. (1988). The toxicity of Cr to fish, in chromium in the natural and human environments. John Wiley and Sons. New York. P: 369-397.

9. Bratakos MS.; Lazos ES. and Bratakos SM. (2002). Chromium content of selected Greek Foods. *Sci. Total Environ.* 290:47–58.

10. Buhler DR.; Stokes RM. and Caldwell RS. (1977). Tissue accumulation and enzymatic effects of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 9-18.

11. Duffus JH. (1980). *Environmental Toxicology*. Edward Arnold (publishers) Ltd. London. UK. p. 164.

12. Hem ID. (1989). *Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water* (3rd ed.) United States Geological Survey Water- Supply Paper 2254. United States Government Printing Office, Washington DC, USA. 264.

13. Wetzel RG. (1983). *Limnology* (2nd ed.) Saunders College Publishing, New York, USA. P.767.

14. Forstner U. and Prosi F. (1979). Heavy metal pollution in freshwater ecosystems. In: Ravera O (ed.) *Biological Aspects of Freshwater Pollution*. Pergamon Press, Oxford. UK. P. 129-161.

15. FAO / WHO Codex Alimentarius Commission (2001). Food Additives And Contaminants. Joint FAO/WHO Food Standards Program, 01/12a, pp. 1-289.

16. Assessment report. Arctic pollution issues (Arctic Monitoring and Assessment Program Oslo. 1998.

17. Ray S. (1994). Analysis of contaminants in edible aquatic resources. *Food Contr.* 3(3): 357-364

Awareness regarding self-care practices in type 2 diabetes mellitus patients attending Diabetic center of Al- Mustansyria University

Maral F. Thabit (1) Shaimaa H. Mahmood (2) and Yousif Abdul Raheem (3)

(1) Institute of Medical Technology / Baghdad (2) Baghdad Teaching Hospital (3) Al- Kindi Medical College / Baghdad /Republic of Iraq

ABSTRACT

This study aims to determine and assess the level of awareness regarding self care practices in a sample of type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients to avoid complications of the disease. Cross-sectional study was conducted over a period of two months extending from 1st of March to 30th of April 2013 and included 400 patients of (T2DM) at the Diabetic centre of Al-Mustansyria university who completed a comprehensive self structured questionnaire covering socio-demographic, behavioral and clinical characteristic and 26 questions related to self care practices. All participants were also subjected to height and weight and random blood sugar (RBS) measurements. Patients' responses were analyzed statistically and the percent score of self care practices was calculated. The included patients were with mean age (54.5 ± 11.3) years, over weight with a mean body mass index (29.1 ± 4.7), mean duration of the disease was (8.6 ± 5.7) years, the highest proportion of patients (47.25%) were on oral medication and with mean RBS (212 ± 72) mg/dl.

The percent score of self care practices was good 74.8% for dietary habits, adherence to treatment 71.3%, blood glucose monitoring 78.5%, prevention of cardio-vascular diseases 72.2%, foot care 86.3% and oral hygiene 71.6%. While it was fair 65.7% for regular physical activity practice, annual renal function 61.5% and ophthalmic examination 68.3% and it was poor 53.3% for annual visit to neurologist, taking vaccination 43.8% and trial to stop smoking 58.2%. The overall percent score of all patients for all self care practices was fair.

Key words: self care practices, type 2 diabetes mellitus patients

المخلص باللغة العربية

تهدف الدراسة الى تحديد وتقدير مستوى الوعي بالنسبة الى ممارسات العناية الذاتية لعينة من مرضى النوع الثاني من داء السكري لتفادي حدوث مضاعفات المرض. انجزت دراسة مقطعية خلال فتره شهرين ممتدة من اول اذار الى 30 نيسان من عام 2013 شملت 400 مريضاً بداء السكري النوع الثاني في مركز أمراض السكري في الجامعة المستنصرية الذين أكملوا ذاتياً استمارة استبيان شاملة تغطي السلوك الديموغرافي الاجتماعي والخصائص السريرية و 26 سؤالاً تتعلق بممارسات العناية الذاتية كذلك كل المشاركين خضعوا لقياس الطول والوزن وتحليل السكري العشوائي بالدم ومن ثم تم تحليل استجابات المرضى احصائياً و تم حساب معدل النتائج بالمئة لممارسات العناية الذاتية.

كانت أعمار المرضى المشمولين بمعدل 54.5 ± 11.3 سنة، و زيادة وزن بمعدل معامل كتلة الجسم 29.1 ± 4.7 كغم /متر²، معدل مدة المرض 8.6 ± 5.7 سنة ، وكانت النسبة الأعلى للمرضى الذين يتناولون العلاج عن طريق الفم % 47.25 مع معدل السكر العشوائي 212 ± 72 ملغم /ديسيلتر، وقد أظهرت النتائج أن ممارسات العناية الذاتية كانت جيدة بنسبة % 74.8 وللعناية بالغذاء % 71.3 وللتزام بالعلاج % 78.5 ولمراقبة نسبة السكر بالدم % 72.2 وللوقاية من أمراض القلب والشرابيين % 86.3 وللعناية بالقدمين % 71.6 وللعناية بالفم % 65.7 ولممارسة الفعاليات الرياضية المنتظمة % 61.5 ولفحص وظائف الكلى السنوي ولفحص العينين % 68.3 وكانت ضعيفه % 53.3 للزيارة السنوية لأخصائي الأعصاب، وأخذ اللقاحات % 43.8 ومحاولة التوقف عن التدخين % 58.2 ، و بصورة عامة كانت النسبة المتوسطة الكلية لجميع المرضى لكل ممارسات العناية الذاتية معتدلة.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus is a type of diabetes mellitus characterized by insulin resistance, inappropriate hepatic glucose production and impaired insulin secretion (1). Onset is usually after 40 years of age but can occur at any age, including during childhood and adolescence. Familial aggregation implies that genetic factors and environmental factors, such as obesity and a sedentary lifestyle, superimposed on genetic susceptibility are involved in the onset (2).

Over the past three decades, the number of people with diabetes mellitus has more than doubled globally, making it one of the most important public health challenges to all nations (3). Almost 80% of diabetes deaths occur in low and middle-income countries (4).

The majority of persons with type 2 diabetes (T2DM) are obese; glucose tolerance is often improved by modest weight loss and increased activity. Persons with T2DM can manage their disorder with a meal plan, increased activity, oral anti diabetes agents such as insulin secretagogues, biguanides, alpha glucosidase inhibitors and insulin sensitizers, and insulin (3).

If diabetes is not treated, it can lead to a number of different health problems. High glucose levels can damage blood vessels, nerves and organs even a mildly raised glucose level that does not cause any symptoms can have damaging effects in the long-term.

The most common complications of diabetes include: Damage to the large blood vessels of the heart, brain and legs (macrovascular complications). Damage to the small blood vessels causing problems in the eyes, kidneys, feet and nerves (microvascular complications). Other parts of the body can also be affected by diabetes, including the digestive system, the skin, sexual organs, teeth and gums, and the immune system. The complications of diabetes mellitus are far less common and less severe in people who have well-controlled blood sugar levels (5).

The majority of patients with diabetes can significantly reduce the chance of developing long-term complications by improving self-care activities (6).

Self care of diabetes is essential for control of disease and improvement of quality of patient's life (7).

Despite the importance of self care practices in controlling diabetic adverse outcomes, there is limited information available on the self-care practices of Iraqi type 2 diabetic patients (8).

Aim of the study

To determine and assess the level of awareness regarding self care measures to avoid complications of (T2DM) of the studied sample.

PATIENTS AND METHODS

Cross-sectional survey by convenient sampling was conducted over a period of two months extending from 1st of March to 30th of April 2013. The sample included 400 patients, 200 males and 200 females at the Diabetic centre of Al-Mustansirya University.

Type 2 diabetes patients were randomly selected above the age of 30 years, with at least 2 years duration of disease, they were registered and attended the above center regularly for check up and receive treatment. Mentally impaired patients and illiterates were not being taken into account. Patients were invited after clarifying the purpose of the study, assuring high confidentiality and willing participants gave verbal consents and they completed a comprehensive previously prepared, self-structured, close-ended questionnaire covering socio-demographic, behavioral and clinical characteristic and 26 questions related to self-care practices.

All participants were subjected to examinations using the same equipments and following a standard method of examinations recommended by (WHO) (9) for weight and height measurement.

Body Mass Index (BMI) was measured by using Quetlet Index:

$BMI = \text{weight (kg)} / \text{height (m)}^2$ and classified as: Normal 20-24.9, overweight 25-29.9, obese 30-39, and morbid obese 40+.also all patients were subjected to venous RBS measurement as routine in each visit (10).

Data management and analysis were conducted by using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) computerized software for windows, version 20. Descriptive statistics were presented as means for continuous variables and as frequencies and percentages (%) for categorical variables and responses of patients toward the questionnaire items were categorized into three categories (never, sometimes and always), these responses scored as for never = 1, sometimes = 2, and always = 3.

The percent score for patients' responses in each specific item was calculated according to the following equation:

Total scores for all participants in the item X 100 / maximum possible score for all participants in the same item. Where total scores for all participants in the item = [(No. of never x 1) + (No. of sometimes x 2) + (No. of always x 3)]. And maximum possible scores for all participants in the same item = [No. of total patients x 3], based on Triple Likert Scale⁽¹¹⁾ and after approximation, the cutoff point of percent score of self care measures categorized as patients who had score less than 60% considered as poor, 60% to 69% as fair, while those with 70% or more were considered as good self care.

RESULTS

Total sample of 400 patients with type 2 diabetes were enrolled in this study, 200 (50%) were males and 200 (50%) were females. The highest percentage of patients (34.5%) were unemployed, (28.3%) had college or higher level education. Current smokers were (25.5%) patients, alcohol consumers were just (3.5%) patients and family history of DM was positive in (59.8%) patients.

The mean age of the patients was (54.5 ± 11.3) years, BMI was (29.1 ± 4.7) kg/m^2 , duration of disease (years) was (8.6 ± 5.7), last measurement of RBS (mg/dl) was (212 ± 72) mg/dl. as shown in table (1).

Table (1): Distribution of age, BMI, duration of disease and last measurement value blood sugar of the study sample (N=400)

Variable	Mean \pm SD
Age (years)	54.5 ± 11.3
BMI (kg/m^2)	29.1 ± 4.7
Duration of disease (years)	8.6 ± 5.7
Last measurement of RBS (mg/dl)	212 ± 72

The patients controlled their DM by diet only (3.25%), on oral hypoglycemic medications (47.25%) patients used insulin alone; (32.5%) patients, and using both oral hypoglycemic medications and insulin (17%) as shown in table (2).

Table (2): Distribution of type of treatment in the study sample (N=400)

Variable	N	%
Treatment used for DM		
Diet	13	3.25
Oral hypoglycaemic drugs	189	47.25
Insulin	130	32.50
Oral & insulin	68	17.0

The responses of patients regarding each item and domain of the study questionnaire were summarized as follows:

- (48.25%) patients tried healthy diet consumption always. Regular physical activity experience at least (15-30 min/3-5 days) in (29.25%) patients. Patients who regularly taking the treatment were (86.5%), HbA1c test every 6 months was performed always by (54.75%) patients, Only 189 patients had blood glucose monitoring device, of them (43.39%) said that always used it daily.

- For the prevention of CVD, ECG was always performed every year by (34%) patients, blood pressure was always measured regularly by (55.75%) patients, Aspirin (100 mg), when

prescribed by a doctor, was always taken by (45.25%) patients, Lipid profile test performed every year performed always by (41.25%) patients.

- Renal function test was always performed yearly by (29.25%) patients and ophthalmic examination was always done every year in (34.75%) patients, (19.5%) patients had always visited a neurophysician yearly.

- Daily care and observation of feet was always done by (70.25%) patients, more than three quarters of the patients (79.25%) never took the vaccinations regularly, For oral and dental hygiene, (53.75%) patients were always washing their teeth twice/day, out of the 102 smoker patients, (12.75%) always tried to stop smoking. as shown in table (3).

According to the calculation of percent scores of items in each domain of the questionnaire. The overall percent score of each domain showed that the percent score for the self-care practice was good for dietary habits 74.8%, adherence to treatment 71.3%, blood glucose monitoring 78.5%, prevention of CVD 72.2%, foot care 86.3% and oral hygiene 71.6%. While it was fair for regular physical activity practice 65.7%, annual renal function 61.5% and ophthalmic examination 68.3% and it was poor for annual visit to neurologist 53.3%, taking vaccination 43.8% and trial to stop smoking 58.2%.

However, the overall percent score of all patients for all domains was (67.1%), indicating that the study group had fair self-care in dealing with their disease as shown in table (4).

Table (3): Frequency distribution of patients' responses about study questionnaire items

Questions	Always		Sometimes		Never	
	n	%	n	%	n	%
Dietary habits						
Reducing food intake	165	41.25	182	45.50	53	13.25
Healthy diet consumption	193	48.25	165	41.25	42	10.50
Consumption of sugar free drinks	149	37.25	172	43.00	79	19.75
Consult a doctor about food	145	36.25	165	41.25	90	22.50
Regular physical activity experience	117	29.25	154	38.50	129	32.25
Treatment						
Taking treatment regularly	346	86.50	45	11.25	9	2.25
Using herbal medicine	21	5.25	132	33.00	247	61.75
Blood glucose monitoring						
HbA1c test every 6 months	219	54.75	96	24.00	85	21.25
Daily checking (device owners)	82	43.39	75	39.68	32	16.93
Visiting a doctor every 3 months	248	62.00	97	24.25	55	13.75
Prevention of CVD						
ECG performed every year	136	34.00	144	36.00	120	30.00
Measure blood pressure regularly	223	55.75	125	31.25	50	12.50
take aspirin (100mg) daily	181	45.25	83	20.75	136	34.00
Lipid profile test performed every year	165	41.25	105	26.25	130	32.50
Renal function monitoring/ RFT performed yearly	117	29.25	104	26.00	179	44.75
Ophthalmic examination	136	34.00	144	36.00	120	30.00
Visiting neurologist at least yearly	223	55.75	125	31.25	50	12.50
Caring and of feet	181	45.25	83	20.75	136	34.00
Washing and drying the feet	279	69.75	91	22.75	30	7.50
Daily care and observation of feet	281	70.25	96	24.00	23	5.75
Wearing suitable shoes	293	73.25	75	18.75	32	8.00
Caring of your nails regularly	344	86.00	32	8.00	24	6.00
Avoidance of using hot water and close to heaters	158	39.50	172	43.00	70	17.50
Taking vaccinations regularly	42	10.50	41	10.25	317	79.25
Oral and dental hygiene						
Washing the teeth twice/day	215	53.75	120	30.00	65	16.25
Visiting a dentist every 6 months	112	28.00	145	36.25	143	35.75
Try to stop smoking or decrease number of cigarette	13	12.75	50	49.0	39	38.25

Table (4): Distribution of self care percent score of patients by domains

Domain	Domain score	Self care description
Dietary habits	74.8%	Good
Regular physical activity experience	65.7%	Fair
Treatment adherence	71.3%	Good
Blood glucose monitoring	78.5%	Good
Prevention of CVD	72.2%	Good
Renal function monitoring	61.5%	Fair
Ophthalmic examination	68.3%	Fair
Visiting neurologist at least yearly	53.3%	Poor
Caring of feet	86.3%	Good
Taking vaccinations regularly such as influenza vaccine	43.8%	Poor
Oral and dental hygiene	71.6%	Good
Try to stop smoking or decrease number of cigarette smoking	58.2%	Poor
Over all per cent score	67.1%	Fair

DISCUSSION

The current study explored how patients with (T2DM) experienced their everyday life with disease following self-care activities. The mean age of all patients was 54.5 ± 11.3 years, this is compatible to the mean age of patients which was 56.64 ± 11.38 in India and 54.7 ± 10.9 years in Malaysia respectively (12,13) is reflective of the fact that (T2DM) usually has onset after 40 years (14).

Higher proportion of the included patients with college education, this is inconsistent with the findings of studies conducted at Canada (2003) that revealed people with less than high school diploma were almost twice as likely to report having diabetes as those with higher degrees, and illiterate also excluded (15) and a study of the National Health Interview Survey in United States (2006) found that educational attainment was inversely associated with diabetes prevalence and may have a different effect on diabetes health among different racial/ethnic groups (16).

The mean BMI of patients in the current study was (29.1) kg /m² which lies within the overweight range. It is one point higher than that reported in Iraq in 2006, according to chronic non

communicable disease risk factors survey in Iraq, the mean BMI was 28.1 kg/m² (17). This difference might be attributed to the changes in the lifestyle of Iraqi population since 2006, however, sample of this study could be different compared to that of general population because it was restricted to specified area and health center in addition it included (T2DM) patients only and not healthy subjects.

Many studies had reported that increased BMI is a strong risk factor for (T2DM). In a study on randomly selected Northern European population, from Denmark (2008), a strong positive association between BMI and (T2DM) is found both in men and women (18). In Asian countries (T2DM) occurred with lower BMI and younger age than in other countries (19).

Diet control is the foundation of all therapy for (T2DM), and is also the most natural and safe control mechanism. The overall self care score for healthy dietary habits domain was 74.8% reflecting good self care. This finding agrees with that reported in a Malaysian study that the majority of respondents (67.0%) were knowledgeable about dietary habits and exercise modifications (20), while 80% of Nepalese diabetic patients participants were strict regarding their diet therapy (21). In contrast, Malathy R. and colleague (India, 2011) reported that majority of respondents (83.3%) had poor knowledge and practices regarding the benefits of exercise, weight loss and healthy diet. Low level of education among majority of respondents and lack of a well-organized medical nutrition therapy program within the hospital may have attributed to this result (22).

About one third of patients (29.2%) had regular physical activity experience, with fair (average) self care of the patients. This finding is inconsistent to those of (23) and (24) in either study, 60% were positively engaged in regular physical activity.

The current study found that vast majority (86.5%) of patients used their medication regularly with good score for self care regarding treatment, this finding consistent with a Malaysian study (2011) (25), (26) in a nationwide survey of Individuals with diabetes, found 90% reported always taking their medications regularly.

Blood glucose monitoring by patients was with overall good score, in comparison, a study from Pakistan found that patients' awareness about diabetes was low. Sixty-one percent of the patients regularly checked blood sugar but only few knew target blood glucose values (27). Also similar finding was also revealed in a study from United Arab Emirates (UAE), that found that 76.1% of the patients were regularly testing and monitoring their blood glucose (28).

In this study, it was found that the mean RBS was high and the patients had poor glycemic control, this

could be explained due to inadequate self-care practices, while the result of a study conducted by Jeanette M *et al* (USA, 2009) reported that participants were under regular contact with health care providers, reported the highest performance adherence in taking their medications, and self monitoring of their blood glucose in 96% of the time and those participants had lower HbA1c (29).

Patients percent score was fair regarding ophthalmic examination, similar findings revealed by study at Germany that found not more than one-half of all diabetic were regularly seen by an ophthalmologist (30). Also in population of 4438 T2DM patients (46%) had one annual eye examination in 1997 in Danish country (31). Regarding fair renal function monitoring and poor annual visit to neurologist in this study could be due to their perception that these examinations are part of the routine check during doctor visits. Poor percent score in trying to stop smoking is in agreement with that in rural India, (14%) of 342 (T2DM) patients had stopped smoking on the advice of their doctors after being diagnosed as diabetics (32).

The patients had very good caring of their feet, in this study, which is the highest among other domains, this high score might be attributed to the good knowledge and education of the patients towards the complications of DM related to poor foot care in addition, most patients were possibly afraid to have the dangerous complication such as amputated limb. This finding was inconsistent with that of Iranian study (2007) (33), which highlight inadequate knowledge of self-care about their foot and lack of optimal podiatry service in Iran.

Also the results of Malaysian study (2012) found only (28.4%) patients had practiced good foot care (34). This difference might be attributed to the ethnic variation, different study design and criteria adopted for measuring the practice scores.

It was found that in spite of (T2DM) is a chronic depilating disease that lowers the immunity of patients and predisposes them to many infectious diseases, yet the self care practices toward vaccination was poor in this study while patients had good self care scores toward oral and dental hygiene domains, that disagree with a study in Finland that revealed that oral self care among adults was inadequate and poor oral hygiene was observed in more than (80%) of the patients (35). However, the overall percent score of all patients for all domains was (61.1%), indicating that the study group had fair self care in dealing with their disease, this goes in line with that reported in the Middle East and Gulf countries (36).

CONCLUSION

1. The main self care practices was related to food and dietary habits, blood glucose monitoring ,prevention of CVD,caring of feet,renal,neurological and ophthalmic examination, regular vaccination, oral hygiene and cessation of smoking.
2. The overall percent score of all patients for all self care domains was fair.It was good for dietary habits, adherence to treatment, blood glucose monitoring, prevention of CVD,foot care and oral hygiene.It was fair for regular physical activity practice, annual renal function and ophthalmic examination and it was poor for annual visit to neurologist, taking vaccination and trial to stop smoking.

RECOMMENDATIONS

1. There is a need for good diabetes self-management education programs at the primary care level with emphasis on motivating good self-care behaviors especially lifestyle modification.
2. Health care providers taking more time to evaluate their patients' perceptions and make realistic and specific recommendations for self-care activities.
3. The requirements or modifications need to be specific for each patient and should be altered depending on the patients' response.
4. Conformation of the finding on larger multicenter population residing in different Iraqi governorates.

REFERENCES

1. Maori L, Ezekiel D, Bilal J(2012). Prevalence of Diabetes in Zambuk General Hospital. Rep. Opin. 4(10):54-57.
2. Hartayu TS.; Mohamed I. and Suryawati S. (2012). Improving of type 2 diabetic patients knowledge, attitude and practices towards diabetes self –care by implementing Community –Based Interactive Approach –Diabetes Mellitus Strategy .BMC Res. Notes (5):315-318.
3. Ruiz R M.; Escolar P A.; Mayoral S E.; Corral SLF. and Fernández F. (2006). Diabetes mellitus in Spain: death rates, prevalence, impact, costs and inequalities.NCBI. Mar;20 Suppl 1:15-24.
4. World Health Organization. (2012). Diabetes-Factsheet. Available at: from:www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/
5. Brandle M.; Zhou H.; Smith BR.; Marriott D.; Burke R.; Tabaei BP. *et al.*(2003).The direct medical cost of type 2 diabetes. Diab. Care. 26(8):2300-2304.
6. Marrero DG.; Kraft SK.; Wheeler ML. and Fineberg N. (2000). Nutrition Management of Type 2 Diabetes by Primary Care Physicians. J. Gen. Intern-Med. 15(11):818-821.
7. Yekta Z.; Pourali R.; Aghassi MR.; Ashragh N.; Ravanyor L. and Pour MYR.(2011). Assessment of self care practices and its associated factors among diabetic patients in Iran.JRHS. 11(1):33-38.
8. Mansour AA. and Al-Jazairi MI. (2007). Cut-off Values for Anthropometric variables That Confer Increased Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and Hypertension in Iraq. Arch. Med. Res. 38(2): 253-258.
9. Maitra A. and Abbas AK. (2005). The Endocrine System. In: Kumar V.; Abbas AK.; Fausto N.; Alpers CE.; Anthony DC.; Aster JC.; Crawford JM. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.7th ed.; 1194–1195
10. Gregg EW.; Engelgau MM. and Narayan V. (2002). Complications of diabetes in elderly people. BMJ. 325(7370): 916–917.
11. The global challenge of diabetes (2008). Lancet. May 24 (cited 2013 June12,5.24pm);371:1723.Available at: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60733-3/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60733-3/fulltext)
12. Priyanka-Raj CK. and Angadi MM.(2010).Hospital-based KAP study on Diabetes in Bijaur, Karnatoka. Indian J. Med. Special.;1(2):80-83.
13. Mastura I.; Mimi O.; Piterman L.; Teng CI. and Wijesinha S.(2007). Self monitoring of blood glucose among patients attending government health clinics. Med. J. Malays. 62(2):147-151.
14. Stumvoll M.; Goldstein BJ. and Van Haeften TW.(2005). Type 2 Diabetes: Principles of Pathogenesis and Therapy .Lancet. 36:1333-1346.
15. Tang M.; Chen Y. and Krewski D.(2003). Gender related differences in the association between socioeconomic status and self-reported diabetes. Int. J Epidemiol. 32(3):381-385.
16. Borrell LN.; Dallo FJ. and White K. (2006). Education and diabetes in a racially and ethnically diverse population. Am. J. Pub. Health.96(9): 1637-1642.
17. Ministry of Health. Directorate of Public Health and Primary Health Care. Ministry of Planning and Development Cooperation, Central Organization for Medicine(2006). 24, 451-463 Statistics & Information Technology, in collaboration with World Health Organization. Chronic Non communicable disease risk factors survey in Iraq; p:42.
18. Almdal T.; Scharling H.; Jensen JS. and Vestergaard H. (2008). Higher prevalence of risk factors for type 2 diabetes mellitus and subsequent higher incidence in men. Eur. J. Intern. Med. 19(1):40-45.
19. Chan JC.; Malik V.; Jia W.; Kadowaki T.;Yajmk CS.; Yoon KH. *et al.*(2009). Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. JAMA. 301:2129-2140.

20. Ambigapathy R.; Ambigapathy S . Ling HM.(2003). A knowledge attitude and practice (kap) study of diabetes mellitus among patients attending klinik kesihatan seri manjung. NCD Malaysia . (2), No.2.
21. Shrestha L. and Nagra JS.(2005). Knowledge attitude and practice (KAP) study on diabetes mellitus among Nepalese diabetic patients. Nepal Med. J. 1(7):51-53.
22. Malathy R.; Narmadha MP.; Ramesh S.; Jose M A. and Dinesh BN.(2011). Effect of a diabetes counseling program on knowledge, attitude and practice among diabetic patients in Erode district of South India. J. Young. Pharm. 3(1): 65-72.
23. Upadhyay DK.; Palaian S.; Shankar R. and Mishra P. (2008). Knowledge attitude and practice about diabetes among diabetes patients in western Nepal. Rawal. Med. J. 33:1
24. Khan RMA.; Saeed T CH.; Ahmad M. and Alam Pasha MM. (2007). Assessment of awareness about diabetes mellitus among adult populace of Lahore: A preventive required approach to combat the disease in Pakistan.
25. Al-Qazaz HKh.; Sulaiman SA.; Hassali MA.; Shafie AA.; Sundram S.; Al-Nuri R. and Saleem F. (2011). Treatment Diabetes knowledge medication adherence and glycemic control among patients with type 2 diabetes. Int. J. Clin. Pharm, 33(6):1028-1035.
26. Ruggiero L.; Glasgow R.; Dryfoos JM.; Rossi JS.; Prochaska JO.; Orleans CT. *et al.* (1997). Diabetes self-management. Self reported recommendations and patterns in large population. Diab.Care. 20:568-576.
27. Padma K.; Bele SD.; Bodhare TN. and Valsangkar S. (2012). Evaluation of knowledge and self- care practices in diabetic patients and their role in disease management. Nat. J. Comm. Med. 3 (1):3-6.
28. Al-Maskari F.; El-Sadig M.; Al-Kaabi JM.; Afendi B.; Nagelkerke N. *et al.* (2013). Knowledge, Attitude and Practices of Diabetic Patients in the United Arab Emirates. PLUS ONE. 8(1):857
29. Jeanette M.; Yinghui Xu.; John W. and Barcey T. (2012). A Randomized Colorectal Cancer Screening Intervention Trial in the Iowa Research Network. (IRENE): Study Recruitment Methods and Baseline Results. J. Am. Board. Fam. Med. 25:63-72.
30. Bischoff P. (1993). Ophthalmologic follow-up of diabetic retinopathy. NCBI. 202(5):443-446.
31. Kristensen JK.; Sandbaek A.; Bro F.; Lassen JF. and Lauritzen T. (2004). Routine screening for diabetic eye complications in a population based cohort of 4438 persons with type 2 diabetes in a Danish county. Danish Medical Bulletin.;51(1):104-107.
32. Majra JP. and Acharya D. (2009).Awareness Regarding Self Care among Diabetics in Rural India. Mid. East j. Family Med. 7(6):101-105.
33. Khamseh ME.; Vatankhah N. and Baradaran HR (2007). Knowledge and practice of foot care in Iranian people with type 2 diabetes. Int. Wound J.NCBI. 4(4):298-302
34. Hamidah H.; Santhna LP.; Ruth Packiavathy RD.; Surava AM.; Yap WC.; Samsiah M. *et al.* (2012). Foot care strategy for the newly diagnosed DM Type 2 patients with low educational and socio-economic background: a step towards future. Clin Ter. 163(6):473-478.
35. Bakhshandeh S. (2011). Periodontal and dental health and oral self care among adults with diabetes mellitus. Ph.D. Thesis. Faculty of Medicine. University of Helsinki, Finland.
36. Al-Adsani AM.; Moussa MA.; Al-Jasem LI.; Abdella NA. and Al-Hamad NM.(2009). The levels and determinants of diabetes knowledge in Kuwaiti adults with type 2 diabetes. Diab. Metab. 35 (2) 121-129.

Indications and outcomes of Intra Cytoplasmic sperm injection attempts in Al - Sader Fertility Center in Al-Najaf Governorate during 2012

Maral F. Thabit (1) Ghusoon A. Shaker (2) and Raed Al-Gareawy (3)

(1) Institute of Medical Technology/Baghdad (2) Baghdad Teaching hospital (3) Fertility center / Al-Najaf Governorate / Republic of Iraq

ABSTRACT

Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) is laboratory procedure that involves the injection of single sperm directly to cytoplasm of mature oocyte using glass needle. This technique used at first to help infertile couple due to severe male factor, after that this procedure used in all types of infertility.

The study aims to determine the main indications and outcomes among ICSI attempts in Al-Najaf governorate and to identify some factors that might be associated with success rate of these attempts.

A cross-sectional study including 300 couples underwent (ICSI) at Al-Sader Fertility center in Al Najaf governorate during 2012. The study extended from 1st of November 2012 to 31th of March 2013. The data collected from case files of the couples included (age of both males and females, type of infertility, number of trials and the indications and outcomes of these trials).

The overall success rate of total ICSI trials was (17.3%) and mainly due to female factor (25%). Regarding the success rate among male factor was highest in oligospermia (19.3%), while in female factor the success rate was highest (28%) in tubal obstruction. Most couples presented with primary infertility, but the success rate was highest in secondary infertility (18.8%). The success rate was highest in lower age of females, males and lower mean duration of infertility. The overall success rate of ICSI was relatively low.

Key words: ICSI attempts, success and failure rate

الملخص باللغة العربية

حقن الحيامن المنوية داخل الهيولي (حقن الحيامن المجهري) هو اجراء مختبري يتضمن على حقن حيوان مجهري واحد داخل هيولي البويضة الناضجة باستخدام ابرة زجاجية. هذه التقنية كانت تستخدم في البداية لمساعدة الأزواج الذين يعانون من العقم بسبب العامل الذكري وبعد ذلك استخدمت هذه العملية في جميع انواع العقم.

تهدف الدراسة إلى تحديد الدواعي الرئيسية ونتائج محاولات حقن الحيامن المجهري في محافظة النجف، ولتحديد بعض العوامل التي تترافق مع نسبة نجاح هذه التجارب.

تم عمل دراسة مقطعية شملت 300 زوجا خضعوا لعملية حقن الحيامن المجهري في مدينة الصدر الطبية مركز الخصوبة في محافظة النجف خلال عام 2012 وقد انجزت الدراسة في الفترة الممتدة من 1 تشرين الثاني 2012 إلى 31 آذار 2013. جمعت البيانات من الملفات الطبية للأزواج وتضمنت (العمر للذكور والإناث على حد سواء، انواع العقم وعدد التجارب ودواعي ونتائج كل التجارب).

كان المعدل العام لنجاح المحاولات (17.3%) وأعلى نسبة كانت في عامل الإناث (25%) فيما يتعلق بمعدل النجاح في عامل الذكور كانت في قلة النطاف (19.3%) أما أعلى نسبة نجاح في عامل الإناث كانت في حالات انسداد الأنابيب (28%). معظم الأزواج كانوا يعانون من حالات العقم الأولي ولكن كانت نسبة النجاح أعلى في حالات العقم الثانوي (18.8%) وكانت نسبة النجاح أعلى لدى الإناث والذكور الأصغر سناً وانخفاض متوسط مدة العقم، وقد كان المعدل العام لنجاح عملية حقن الحيامن المجهري منخفضاً نسبياً.

INTRODUCTION

Infertility is defined as the inability of the couples to achieve pregnancy after 12 months of unprotected intercourse. This condition affects 13-15% of the couples worldwide. However, the prevalence of such problem differs between countries being higher in the underdeveloped ones (1).

Infertility is either primary, when no pregnancy has ever occurred, or secondary, when there has been a pregnancy regardless of the outcome. About 67–71% and 29–33% of patients have primary and secondary infertility, respectively (2). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a laboratory procedure developed to help infertile couples undergoing in vitro fertilization (IVF) due to male factor infertility. Intracytoplasmic sperm injection is a form of micromanipulation, involves the injection of a single sperm directly into the cytoplasm of a mature oocyte using a glass needle (3). It is very soon became apparent that this technique produced superior results to Partial Zona Dissection (PTD) or Subzonal Insemination (SUZI). Indeed, such has been the success of ICSI that commentators have been moved to suggest that it might be considered the treatment of choice for all cases where in vitro conception is indicated (4).

The world-wide experience of ICSI, noted that over the 3 year period (1993-1995), the number of centers undertaking ICSI in Europe increased from 35 to 101, and the total number of ICSI cycles per year rose from 3157 to 23,932. The incidence of oocytes damaged by the procedure was low (< 10%), and the fertilization rates obtained with ejaculated, epididymal, and testicular spermatozoa for 1995 were 64%, 62%, and 52 respectively, success rate was 21% for ejaculated, 22% for epididymal, and 19% for testicular sperm, with an incidence of multiple gestations of 29%, 30% and 38%, respectively (5).

There are many factors effect on outcome of ICSI procedure include duration of infertility, result of seminal fluid analysis, and age of male and female partner (6).

The aim of study:

- 1- To determine the main indications and outcomes of ICSI attempts in Al Sader Fertility Center in Najaf Governorate during 2012.
- 2- To identify some factors that might be associated with success rate of these attempts.

PATIENTS AND METHODS

A cross-sectional retrospective study carried out during the period extending from 1st of November 2012 to 31 of March 2013 at Al-Sader center Fertility in Al-Najaf governorate. 300 couples with complete data who underwent ICSI trial in above center during 2012. 15 couples were excluded from the whole sample due to incomplete data.

Patients reports were reviewed and data collected from the case files of the patients, including (age of both male and female partners, types of infertility, number of trials, the indication and outcome of each trial. Successful rate according to an evidence of an intrauterine gestation sac in ultrasound scan (7). All statistical analysis was done by using (Statistical Package of Social Sciences (SPSS) program, version 17, by using the following:

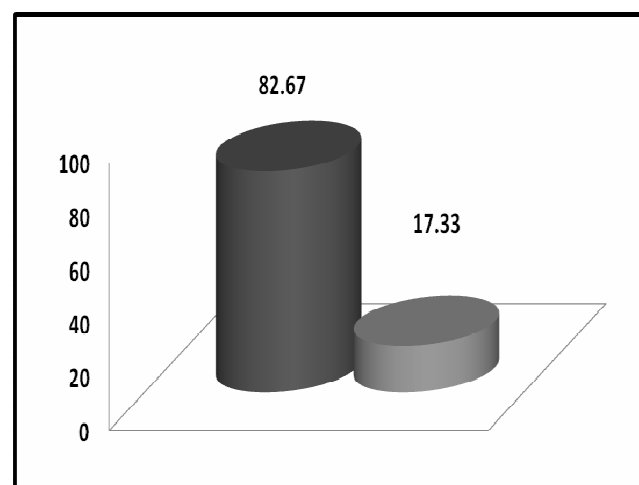
1. Descriptive statistics:
 - a. Statistical tables including observed frequencies with their percentages.
 - b. Summary statistics of the reading distribution (mean, standard deviation)
 - c. Graphical presentation by using (pie and bar charts).
2. Inferential statistics:
 - a. T test for equality of means.
 - b. Chi square test to assess the association between two categorical variables.

The comparison of significance (p value) in any test significant differences (p value < 0.05) (8).

RESULTS

The sample:

The study comprised 300 couples (males and females) who underwent ICSI attempts in Al-Sader Fertility center during 2012, The mean age of males 34.6 ± 7 years, females 29.4 ± 5.8 years, and the mean duration of infertility was 8.1 ± 3.9 years. The majority of ICSI outcomes (248, 82.67%) had failed and only (52, 17.33%) had succeeded as shown in figure (1).



Figure(1): Distribution of studied sample according to the success and failure rate

The distribution of studied sample according to the causes of infertility was highest in male factor (194,64.66%) followed by female factor (92, 30 %) as shown in figure (2).

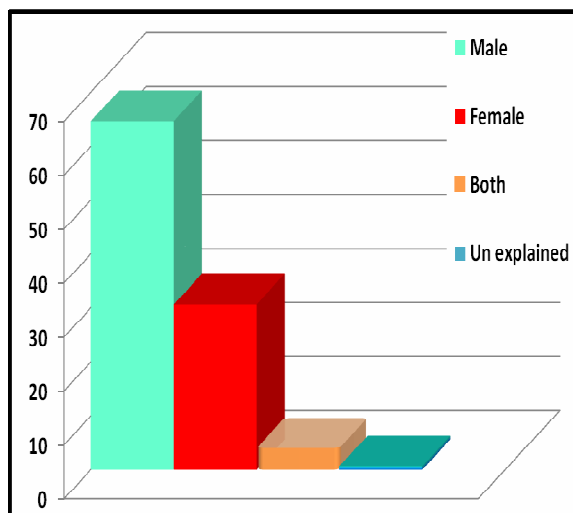


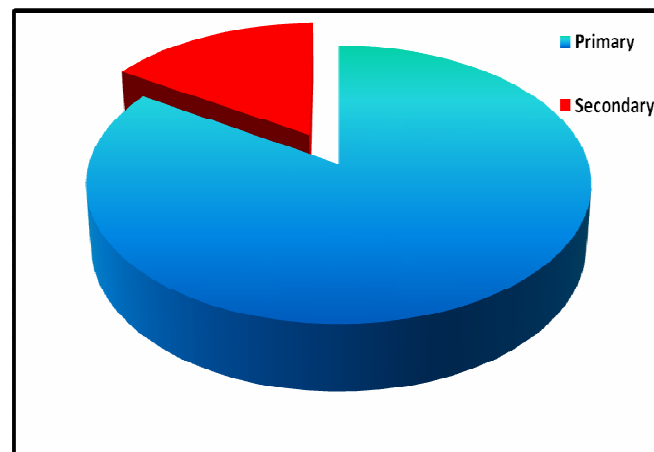
Figure (2): Distribution of study sample according to the causes of infertility

The overall success rate of the total ICSI trials was (52, 17.3%) and mainly due to female factors (23, 25%) with no statistically significant (p value>0.05) differences. as shown in table (1).

Table (1): Relation between the overall causes of infertility and outcomes

Study Sample		outcome		Total	P value
		success	failure		
cause	male factor	27	167	194	0.123
		13.9%	86.1%	100.0%	
	female factor	23	69	92	
		25.0%	75.0%	100.0%	
	both	0	2	2	
		.0%	100.0%	100.0%	
	unexplained	2	10	12	
		16.7%	83.3%	100.0%	
Total		52	248	300	
		17.3%	82.7%	100.0%	

They are distributed as 252 (84%) with primary infertility, 48 (16%) with secondary infertility as shown in figure(3).



Figure(3): The distribution of studied sample according to the type of infertility.

The success rate was higher (9, 18.8%) in secondary type compared to primary type (43, 17.1%) with no statistically significant (p value >0.05) differences as shown in table (2) .

Table (2): Relation between type of infertility and outcomes

Study Sample			Outcome		Total	P value
			Success	Failure		
Type of infertility	Primary	n	43	209	252	0.777
		%	17.1%	82.9%	100.0%	
	Secondary	n	9	39	48	
		%	18.8%	81.3%	100.0%	
Total		n	52	248	300	
		%	17.3%	82.7%	100.0%	

Regarding the male factor successful rate was highest in oligospermia (19.3%) followed by asthenospermia (11.5%) and azoospermia (8.3%) respectively with statistically no significant (p value>0.05) differences as shown in table (3).

Table (3): Relation between pathological cause and outcome for male factor infertility

Pathological Cause		Outcome		Total	P value
		Success	Failure		
Azoospermia	n	3	33	36	0.221
	%	8.3%	91.7%	100.0 %	
Oligospermia	n	17	71	88	
	%	19.3%	80.7%	100.0 %	
Asthenospermia	n	7	54	61	
	%	11.5%	88.5%	100.0 %	
Teratospermia	n	0	9	9	
	%	0%	100.0%	100.0 %	

The main causes of female factor was polycystic ovaries followed by tubal obstruction and hypogonadotropic hypogonadism respectively. The success rate was highest 28.2% due to tubal obstruction, followed by polycystic ovaries 23.1% with no statistically significant differences ($p > 0.05$) as shown in table (4)

Table (4): relation between pathological cause and outcome for female factors infertility

Pathological Cause		Outcome		Total	P value
		Success	Failure		
Poly cystic ovary	n	12	40	52	0.221
	%	23.1%	76.9%	100.0 %	
Tubal obstruction	n	11	28	39	
	%	28.2%	71.8%	100.0 %	
Hypogonadotrophic Hypogonadism	n	0	1	1	
	%	.0%	100.0%	100.0 %	

The remaining indication of ICSI trials showed successful rate (16.7 %) in unexplained pathological causes. While the successful rate in both gender type was 0%. Statistically there was no significant ($p > 0.05$) differences as shown in table (5)

Table (5): Relation between pathological cause and outcome for both gender type of infertility

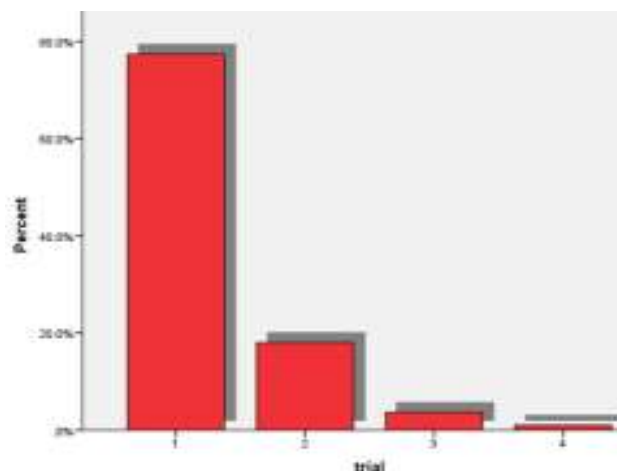
Pathological Cause		Outcome		Total	P value
		Success	Failure		
unexplained	n	2	10	12	0.221
	%	16.7%	83.3%	100.0%	
more than one cause	n	0	2	2	
	%	.0%	100.0%	100.0%	
Total	n	52	248	300	
	%	17.3%	82.7%	100.0%	

The success rate of ICSI trials showed statistically significant ($p < 0.05$) differences with lower mean age of both male and female partners also with lower duration of infertility although statistically not significant. as shown in table (6) .

Table (6): Mean and standard deviation of age male, female and duration of infertility of those with success and failure of pregnancy

Variable	Success	Failure	P value
	mean \pm SD	mean \pm SD	
Age of male	31.9808 \pm 5.37420	34.7581 \pm 7.03763	0.008
Age of female	26.6923 \pm 5.39258	30.2782 \pm 6.26920	<0.001
Duration of infertility	7.4808 \pm 3.26893	8.3266 \pm 4.07050	0.161

The majority of couples had first trial (232. 77.33%), followed by second trial (54. 18%), third trial (11.3.66%) and 4th trial (3.0.01%) consequently as shown in figure (4).

**Figure (4): Distribution of studied sample according to the number of trials**

DISCUSSION

Although ICSI has overcome the most difficult male factor infertility cases, poor fertilization and total failure of fertilization still occur (9,10). In this study 300 couples who underwent ICSI in Al-Sader Fertility center during 2012.

The overall success rate was (17.33%), this result is lower than success rate in study document at UK in 2007 (52.8%) (11), Lebanon 2009 (12), and in Iran in (35%) (13). This might be attributed to some technique error related to deficiency to cryoembryonic preserver instrument which used to keep embryos and oocyte after hyper stimulation to another attempt.

In the current study, the main indication of ICSI was the male factor (64.67%) , but the success rate was more in female factor 25%. This finding agrees with result of study in Netherland in 2007 (success rate in female factor 22%) (14). The semen parameters include quantity and quality of sperm had effective on fertilization and pregnancy rate in ICSI. Sperm parameter usually is normal in couple underwent ICSI due to female factor infertility ,also the majority of female factor due to PCO and tubal obstruction which had normal oocyte production and PCO which produce more follicle and oocyte response to ovarian hyper stimulation (15).

The primary type of infertility was higher than the secondary type (84%) ,(16%) respectively, but the secondary type is higher success rate than the primary type. This result is compatible with the outcomes of study that was conducted in Egypt in 2009 (16), the success rate in secondary type (56%) while in primary type (16,3%) That could be explained as in our study we found that in primary infertility most couples present with sever fertility problem such as azoospermia and sever teratospermia, while in secondary infertility the problem was lesser severity and more treatable such as tubal obstruction and mild oligospermia .

The main causes of male factor were oligospermia, followed by Asthenospermia, Azoospermia and Teratospermia. The success rate was highest in Oligospermia with success rate (19.3%) . This result agrees with study made in study made in UK in 2007 (11). The sperm morphology and progressive motility most important parameter effective in fertilization and pregnancy rate more than sperm concentration in ICSI .The normal sperm morphology is important for sperm adherence to aid penetration of the zonapellucida. male with oligospermia had <20 million per ml ,which had less sperm concentration ,but had sperm better in motility and morphology compared with sperm obtained from male sever from asthenospermia or teratospermia (17).

The main causes of female factor were polycystic ovaries followed by tubal obstruction and hypo gonadotropic hypogonadsm respectively. The success rate was highest 28.2% due to tubal obstruction, followed by polycystic ovaries 23.1%,

this result is compatible with study made in Netherland (14).

A success rate of ICSI depends on ovarian stimulation; women with tubal obstruction had normal ovaries which had good response to ovarian stimulation (18).

Women become less fertile as these get older. The success rate of ICSI in this study showed statistically significant differences with lower age of female similar result also obtain at Netherland in 2007 (14) and at UK 2007 (11), the highest success rate was at age 30 and sharply drop after age of 35 years (19,20). It is believed that women are born with a fixed number of oocytes arrested in the first meiotic division and the numbers subsequently decline during their lives (21).

Although the age of male partner doesn't appear to matter much when it comes to fertility, the success rate of ICSI trial in this study statistically significant differences with lower mean age if males. This result agreed with in UK 2007 (11). This could be explained sperm from older male can have reduced in fertilization potential as compared to younger men. Longitudinal studies show a decrease in testosterone starting in the early 40 years in men and gradually worsening through the remainder of life. Semen volume, total sperm production, and normal sperm morphology were all found to be lower in men 52–79 years as compared to a control group younger than 52 years (17).

The success rate of ICSI trial showed higher result with lower mean duration of infertility. This result agreed with study made in Netherland 2007 (14).

It is believed that women may had low ovarian response are in the early stages of ovarian ageing, even if have regular menstrual cycle. Because of individual variation, low ovarian response can occur even in women of young age (22).

CONCLUSION

1. The main indications of ICSI trials were male factor, female factor, unexplained infertility and both gender respectively.
2. The main indications of male factor were oligospermia followed by asthenospermia and teratospermia respectively. While the main indications of female factor were polycystic ovaries followed by tubal obstruction and hypogonadotropic hypogonadism respectively.
3. The overall successful rate was relatively low.
4. The highest percentage of couples underwent ICSI was due to male factor but the success rate was more among female factor although it is not statistically significant.
5. The highest percentage of couples was with primary infertility, but success rate was higher in secondary infertility although statistically not significant.
6. The success rate was higher with lower mean duration of infertility.

7. There was a significant association between the successful rate of ICSI trials and lower mean age of both partners. While no significant association of success rate and the type of male and female factors, both gender type. Unexplained infertility causes and number of trials.

RECOMMENDATIONS

1. Advice infertile couples who want to get pregnancy to undergo ICSI procedure in early age and lesser duration of infertility.
2. Enhance many fertility centers in Iraq to use ICSI procedure for the treatment of severe infertility cases, and provide them with new instruments in all Iraq regions.
3. Suggest for further researches to study the relation between other variables such as obesity, smoking, hormonal assay and alcohol intake with outcomes of ICSI procedure.
4. Perform further studies concerning the risk of congenital anomalies among babies delivered by ICSI procedure.
5. The current study needs to be repeated in other centers in Iraq for comparative studies and to have a base line data.

REFERENCES

1. Hamada A.; Sandro C. and Agarwal A. (2011). The Role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility. *Open Reprod. Sci.* J.4:27-41.
2. Seshagiri P.(2001). Molecular insights into the causes of male infertility. *J. Biosci.* 26(4): Suppl. 429-435.
3. American Society For Reproductive Medicine. (2001). Patients fact sheet. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI).
4. Campbell AI. (2000). Male infertility and intracytoplasmic sperm Injection (ICSI). *Brit. Med. Bullet.* 56(3): 616-623.
5. Tarlatzis BC. and Bill H. (2000). Intracytoplasmic sperm injection. Survey of world results. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 900: 336-344.
6. Palermo G.; Jons H.; Devroey P. and Van-Steirteghem C. (2004). Pregnancies after Intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 336- 340.
7. Devroey P.; Liu J.; Nagy Z.; Tournaye H. and Silber S.(1994). Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 62(3):639-641.
8. Wayne WD. (1998). Biostatistics. A foundation for analysis in health sciences 7thed. Chapter 12, p571-600.
9. Vander I.; Helmerhost f. and Diaben S. (2005). Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 83(3):612-617.
10. Halttunen M.; Kamarainen M. and Koistinen H.(2005). Glycodelin: a reproduction related lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482(1-2): 149-156.
11. Oakley L.; Doyle P. and Maconochie N. (2007). Lifetime prevalence of infertility and infertility treatment in the UK. *Hum. Reprod.* 23(2): 447-450.
12. Marcia C.; Inhorn D.; Kobeissi L.; Nassar Z. and Lakkis A. (2009). Consanguinity and family clustering of male factor infertility in Lebanon. *Fertil. Steril.* 91:1114-1116.
13. Arefi S.; Soltanghorae H.; Zarnani A.; Sadeghpour A. and Ghaffari M. (2008). Repeated IVF/ICSI-ETs failures and impact of hysteroscopy. *Iran. J. Reprod. Med* 6(1): 19-24.
14. Lintsen A.; Eijkemans M.; Hunault C.; Bouwmans L. and Hakkaart J. (2007). Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. *Hum. Reprod.* 22(9): 2455-2462.
15. Esinler I.; Bayar U. and Bazdag G. (2005). Outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries. *Fertil. Steril.* 84(4): 101-106.
16. Mansour R.; Fahmy I.; Nevine A.; Tawab B. and Kamal A. (2009). Electrical activation of oocytes after intra cytoplasmic sperm injection: a controlled randomized study. *Fertil. Steril.* 91(1): 133-136.
17. Karpman E.; Danial H. and Lorry I. (2005). IVF and ICSI in male infertility : update on outcome, risk, and costs. *Sci. Wor. J.* 5: 922-932.
18. Advanced Fertility center of Chango by Richard Sharban. (2010). Our success rate, IVF Cost Options.
19. Gleicher N. and Barad D.(2006). Unexplained infertility: does it really exist? *Hum. Reprod.* 21:1951-1955.
20. Anick D. (2000). Intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 15(Suppl. 4):59-64.
21. Nikolaou D. and Templeton A. (2003). Early ovarian ageing: a hypothesis: Detection and clinical relevance. *Hum. Reprod.* 18(6): 1137-1139.
22. Faddy M.; Gosden R.; Gougeon A. and Richardson S. (2002). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 7(10): 1342-1346.

Respiratory distress of newborn infants in Baqubah-Diyala- Iraq

Dawood S. H. Al- Azzawi and Nebras G. Jasem

College of Medicine / Diyala University /Republic of Iraq

ABSTRACT

Respiratory distress is a common problem in the newborn period with considerable mortality. It accounts for nearly half of all deaths. It is a heterogeneous group of illnesses with varying prevalence, underlying etiology, clinical course and outcome. Our study is to determine the prevalence and etiology of respiratory distress in the newborns in Al-Batool teaching hospital Baqubah- Diyala-Iraq. This study was conducted in Al-Batool hospital in Baqubah \Diyala province over a period of six months (July 2013 to December 2013). Two hundred newborns were chosen randomly and each one was subjected for measurement of body weight and any newborn showing one or more of signs of respiratory distress (Tachypnoea , retraction ,noisy respiration) for more than two hours was considered to have respiratory distress.

The aim of this study was to determine the prevalence and etiology of respiratory distress in the newborn. Prevalence was 88.5% in preterm , 5% in full term and 6.5% in post term .The rate of respiratory distress among males was 60% and among females was 40%. Respiratory distress was found to be common among those delivered by caesarean section(65%). Furthermore, the rate among twins was 9% and among singletons was 91%.Mortality rate was 13%.

Respiratory distress is a common neonatal problem with significant morbidity and mortality. It was conducted that the main causes are preterm delivery and low birth weight and increasing mortality rate need to be studied extensively and thoroughly regarding causes and health services availability.

The study suggests that significant respiratory morbidity in term cesarean deliveries may be the result of badly dated operations .Betamethasone given immediately before elective caesarean section reduces respiratory distress .The rate falls with increasing gestation , supporting the recommendation to delay elective caesarean section until the 39th week. Plans for changing clinical management should take all risk factors into account. Labor and delivery enhance neonatal lung adaptation.

Key words: low birth weight infants , caesarean section , respiratory distress and preterm delivery

الملخص باللغة العربية

يمثل عسر التنفس مشكلة شائعة لدى الأطفال حديثي الولادة ، حيث يؤدي ارتفاع حالات الوفيات خلال هذه الفترة من العمر . سعت الدراسة الحالية إلى تحديد معدل حالات عسر التنفس والعوامل المسببة له لدى الأطفال حديثي الولادة، وقد أجريت الدراسة في مستشفى البتول /بغوبة/ محافظة ديالى خلال الفترة من شهر تموز إلى كانون الأول لعام 2013. تم اختيار مائتي طفل حديث الولادة عشوائيا كما تم قياس أوزانهم ، وقد كان كل طفل يعاني من أعراض لمدة تزيد عن ساعتين (زيادة عدد مرات التنفس أكثر من 60 في الدقيقة الواحدة وانكماش عضلات الصدر مع إصدار أصوات (نخير ، صرير ، صفير) . أظهرت النتائج أن الأطفال الذين ولدوا في مستشفى البتول للفترة مابين شهر تموز إلى شهر كانون الأول 2013 يحدث لديهم عسر تنفس بنسبة أعلى لدى الأطفال الذين ولدوا بعمر حمل يقل عن 37 أسبوع وكانت (88.5%)، كما أن نسبته لدى الذكور هي 60% ولدى الإناث هي 40%، ويحدث عسر التنفس بنسبة عالية لدى الأطفال الذين ولدوا بعملية قيصرية (65%). كما أن نسبته لدى التوائم هي 9% . و نسبة الوفيات هي 13% وهذه النتائج تدل على أن عسر التنفس هو مشكلة شائعة لدى الأطفال حديثي الولادة ويؤدي إلى زيادة عدد الوفيات ولقد وجد أن الأسباب الرئيسية هي الولادة المبكرة وزيادة نسبة الوفيات والتي يجب دراستها والبحث في أسبابها.

INTRODUCTION

Neonatal respiratory disorders account for most admissions to neonatal intensive care units in the immediate newborn periods (1). It accounts for nearly half of all deaths. It is a heterogeneous group of illnesses with varying prevalence, underlying etiology, clinical course and outcome (2). Respiratory distress may be due to either medical or surgical cause (3). Respiratory distress is a common emergency responsible for 30-40% of admissions in the neonatal units. A working diagnosis should be made in the first few minutes of seeing the baby and immediate life saving measures should be undertaken (4). The aim of initial assessment of the infant in respiratory distress is to identify life threatening conditions that require prompt support, such as inadequate or obstructed airway (gaspings, choking, stridor), apnea or poor respiratory efforts, cyanosis, and circulatory collapse (bradycardia, hypotension, poor perfusion). The physician should manage these infants promptly with immediate oxygen support and possibly bag and mask ventilation. Therefore, resuscitation equipment and supplies should always be available for immediate use in the delivery room (1). The most common etiology of neonatal respiratory distress is transient tachypnea of the newborn; this is triggered by excessive lung fluids, and symptoms usually resolve spontaneously (5). Infants born by caesarean section at term are at increased risk for developing respiratory disorders compared with those born by vaginal delivery (6). Over the past 20 years, there has been an increase in the rates of elective caesarean delivery at term in the western world, largely due to the management of previous caesarean section and breech presentation (7). The prevalence of respiratory distress in infants admitted to the hospital increases due to increased rate of caesarean section (8). Hyaline Membrane Disease is the commonest cause of respiratory distress in the newborn, particularly, in preterm infants. It carries a high mortality rate and the prevalence is more than that documented in the Western world (9). The respiratory distress syndrome can occur in premature infants as a result of surfactant deficiency and under-developed lung anatomy. Intervention with oxygenation, ventilation, and surfactant replacement is often necessary. Prenatal administration of corticosteroids between 24 and 34 weeks gestation reduces the risk of respiratory distress syndrome of the newborn when the risk of premature delivery is high (5). The mortality can be reduced by the use of preventive measures such as antenatal steroids, appropriate intra-partum care and attention to early stabilization after birth (10). The more widespread availability of the basic intervention of oxygen and Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) would have the greatest impact of decreasing HMD specific mortality around the world (11). Preterm babies at increased risk of HMD should be delivered in centers where appropriate facilities and expertise for its

management are available (12). Meconium aspiration syndrome is thought to occur in utero as a result of fetal distress by hypoxia. Treatment options are resuscitation, oxygenation, surfactant replacement, and ventilation. Other etiologies include pneumonia, sepsis, pneumothorax, persistent pulmonary hypertension, and congenital malformations; treatment is disease specific (5).

PATIENTS AND METHODS

This study was conducted in Al-Batool teaching hospital in Baaqubah-Diyala province over a period of six months (July 2013 to December 2013). Two hundred newborns were chosen randomly and each one was subjected for measurement of body weight. Any newborn showing one or more of the following signs for more than two hours was considered to have respiratory distress. Tachypnoea or respiratory rate of more than 60/minute, retraction or increased chest in-drawing on respirations (subcostal, intercostal, sternal, and suprasternal) and noisy respiration in the form of grunt, stridor or wheeze. After the initial assessment and cardio respiratory management, a history was obtained. Maternal and obstetrical histories were taken. Intra-partum details with special reference to the fetal well being, duration of rupture of membranes, quantity and quality of liquor, drugs especially analgesics and sedatives given to the mother were recorded. Apgar score, resuscitation details, sex, and gestational age based on last menstrual period date and clinical examination, birth weight and findings suggestive of respiratory distress were also noted. All babies with respiratory distress were treated in the neonatal intensive care unit. All babies with RD received standard care with monitoring of vital signs and oxygen saturation. Most of the newborns especially the premature babies received therapy, mechanical ventilation and were weaned off successfully.

RESULTS

The results showed that of total number of 200 newborns, 177 of them are premature, 10 of them are full term babies and 13 of them are post term. Table (1).

The results also revealed that the percentage of respiratory distress among newborns weighing less than 1 kg was 1%, those weighing (1-1.5) kg was 7.5%, those weighing (1.5-2) kg was 13.5%, those weighing (2-2.5) kg was 23%, those weighing (2.5-3) kg was 35% and those weighing more than 3 kg was 20%. Table (2).

Table (1): Distribution of the percentage of respiratory distress according to gestational age

Gestational age (weeks)	Number	Percentage %
Less than 28	14	7
28-32	52	26
32-36	111	55.5
36-42	10	5
>42	13	6.5
Total	200	100

Table (2): Distribution of the percentage of respiratory distress according to birth weight

Birth weight (kg)	Number	Percentage %
Less than 1 kg	2	1
1-1.5 kg	15	7.5
1.5-2 kg	27	13.5
2-2.5 kg	46	23
2.5-3 kg	70	35
>3 kg	40	20
Total	200	100

It was also found that the percentage of respiratory distress among males was 60% and among females was 40%. Table (3).

Table (3): Distribution of the percentage of respiratory distress according to sex

Sex	Number	Percentage %
Male	120	60
Female	80	40
Total	200	100

The percentage of respiratory distress in those infants delivered by caesarean section was 65% and those delivered vaginally was 35%. Table (4).

Table (4): Distribution of the percentage of respiratory distress according to type of delivery

Type of delivery	Number	Percentage %
Caesarean section	130	65
Vaginal delivery	70	35
Total	200	100

The study also revealed that the mortality rate among newborns with respiratory rate was 13%. Table (5).

Table (5): Distribution of the percentage of the mortality rate and birth weight

Body weight (kg)	Number	Percentage %
Less than 1 kg	4	2
1-1.5	14	7
1.5-2	2	1
2-2.5	2	1
2.5-3	3	1.5
>3	1	0.5
Total	26	13

The study also revealed predisposing factors for development of respiratory distress. Table (6).

Table (6): Distribution of the percentage of predisposing factors

Predisposing factor	Number	Percentage %
Twins	18	9
Maternal age	<20 years =17, >35 years =23	20
Smoking	/	/
Congenital anomalies	3	1.5
Sepsis	4	2
History of low birth weight	11	5.5
Maternal disease	Diabetic mother= 3, Asthmatic mother=1	2
Total	80	40

DISCUSSION

The significantly high prevalence of respiratory distress in our study can be explained by increased rates of premature deliveries, low birth weight, malnutrition, psychological, socioeconomic condition during these years of loss of security, unstable and irritable circumstances, these sorrowful conditions which affect all the essential services for life especially the health services. Other risk factors including smoking (although it is hidden but now it increased in frequency even among females), maternal age and disease, congenital anomalies, history of low birth weight all predispose to respiratory distress. In our study, the incidence of respiratory morbidity following elective cesarean section increased significantly compared with

vaginal delivery. These results are in agreement with previous findings (13,14). Previous studies suggested that significant respiratory morbidity in term cesarean deliveries may be the result of wrongly dated caesarean section c/s (15). Betamethasone given immediately before elective caesarean section ECS reduces respiratory distress and admission to a special care baby unit. The rate falls with increasing gestation, supporting the recommendation to delay elective caesarean section until the 39th week (16). Nevertheless, the benefits of antenatal steroids persist until 39 weeks. However, many clinical factors influence the timing of elective caesareans. There may be uncertainty regarding gestation, medical indications for earlier delivery, and concerns about spontaneous onset of labor resulting in emergency caesareans with risks for mother and baby (17). Plans for changing clinical management should take all these factors into account. Labor and delivery enhance neonatal lung adaptation. An explanation for this finding is possibly that labor and delivery induce a surge of catecholamines in the fetus which is important for postnatal lung adaptation (18). Infants born vaginally have higher catecholamine concentration at birth than infants born by ECS (18). Catecholamines stimulate the absorption of fetal lung fluid, inhibit secretion of fetal lung fluid, and increase the release of surfactant (19). Infants born by elective cesarean section has a less pronounced perinatal catecholamine surge than infants born vaginally, possible cause being the absence of labor (20).

CONCLUSION

Respiratory distress is a common neonatal problem with significant morbidity and mortality. It was concluded that the main causes are preterm delivery and low birth weight and increasing mortality rate need to be studied extensively and thoroughly regarding causes and health services availability.

RECOMMENDATIONS

The study suggests that significant respiratory morbidity in term cesarean deliveries may be the result of badly dated prematurity. Betamethasone given immediately before elective caesarean section reduces respiratory distress. The rate falls with increasing gestation, supporting the recommendation to delay elective caesarean section until the 39th week. Plans for changing clinical management should take all risk factors into account. Labor and delivery enhance neonatal lung adaptation.

REFERENCES

1. Aly H. (2004). Respiratory disorders in the newborn: identification and diagnosis. *Pediatr. Rev.* 25:201-208.
2. Kumar A. and Bhat BV. (1996). Epidemiology of respiratory distress of newborns. *Indian J. Pediatr.* 63:93-98.
3. Kumar A. and Bhatnagar V. (2005). Respiratory distress in neonates. *Indian J. Pediatr.* 72: 425-428.
4. Mathai SS.; Raju U. and Kanitkar M. (2007). Management of Respiratory Distress in the Newborn. *MJAFI.* 63:269-272.
5. Hermansen CL. and Lorah KN. (2007). Respiratory distress in the newborn. *Am. Fam. Physician.* 76:987-994.
6. Kolas T.; Saugstad OD.; Daltveit AK.; Nilsen ST. and Oian P. (2006). Planned cesarean versus planned vaginal delivery at term: comparison of newborn infant outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195:1538-1543.
7. Zanardo V.; Simbi AK.; Franzoi M.; Solda G.; Salvadori A. and Travisanuto D. (2004). Neonatal respiratory morbidity risk and mode of delivery at term: influence of timing of elective caesarean delivery. *Acta. Paediatr.* 93:643-647.
8. Ersch J.; Roth-Kleiner M.; Baeckert P. and Bucher HU. (2007). Increasing incidence of respiratory distress in neonates. *Acta. Paediatr.* 96:1577-1581.
9. Ghafoor T.; Mahmud S.; Ali S. and Dogar SA. (2003). Incidence of respiratory distress syndrome. *J. Coll. Physicians. Surg. Pak.* 13:271-273.
10. Bhutta ZA.; Yusuf K. and Khan IA. (1999). Is management of neonatal respiratory distress syndrome feasible in developing countries? Experience from Karachi (Pakistan). *Pediatr. Pulmonol.* 27:305-311.
11. Kamath BD.; Macguire ER.; McClure EM.; Goldenberg RL. and Jobe AH. (2011). Neonatal mortality from respiratory distress syndrome: lessons for low-resource countries. *Pediatr.* 127:1139-1146.
12. Haque KN. and Waheed KAI. (2010). Evidence based guidelines for the management of neonatal respiratory distress syndrome (RDS) in Pakistan: Personal Observations and Pragmatic Opinion. *Pak. Paed. J.* 34(4):169-179.
13. Beydoun H.; Yunis KA.; Khogali M.; Usta I. and Tamim H. (2003). Cesarean route of delivery and hyaline membrane disease. A Hospital based Case-control study in Greater Beirut. *Pediatr. Perin. Epidemiol.* 17 (4):308-363.
14. Gerten KA.; Coonrod DV.; Boy CR.; Curtis Bay. and Chambliss LR. (2005). Cesarean delivery and respiratory distress syndrome. Does labor make a difference? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193(3):1061-1064.
15. Yang JY.; Fang LJ. and TsouYau KH. (1997). Labor pain before elective cesarean section reduces neonatal respiratory distress. *Zhonghua Min Guo Xiao ErKe Yi XueHuiZaZhi.* 38(1):38-43.

16. Levine EM.; Ghai V.; Barton JJ. and Storm CM. (2001). Mode of delivery and risk of respiratory disease in newborns. *Obstet. Gynecol.* 97(3):439-445.
17. Graziosi GC.; Bakker CM.; Brouwers HA. and Bruinse HW. (1998). Elective Cesarean Section is preferred after the completion of a minimum of 38 weeks of Pregnancy. *Ned TijdschrGeneesk.*(17):142:2300-2303.
18. Kauffman KS.; Seidler FJ. and Slotkin TA. (1994). Prenatal dexamethasone exposure causes loss of neonatal hypoxia tolerance: cellular mechanisms. *Pediatr. Res.* (3595):515-522.
19. Wang L.; Zhang W. and Zhao Y. (1999). The study of maternal and fetal plasma catecholamine levels during pregnancy and delivery. *J. Pediatr. Med.* 27(3):195-198.
20. Lines A.; Nardo L.; Phillips ID.; Possmayer F. and Hooper SB. (1999). Alteration in lung expansion affect surfactant protein A, B and cm RNA level in fetal sheep. *AM. J. Physiol.* 276(2 pt 1): 1239-1245.

Molecular evaluation of antibiotic resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhi from Iraq

Atheer A R. Al- Douri (1) Harith J. F. Al-Mathkhury (2) Maha F. Almelan (3) Modhafar Q. Saber (4) Kifah A. Jasim (4) and Abdul Jabbar N. Al-Shammari (5)

(1) College of Veterinary Medicine, Baghdad University (2) Dept. of Biology / College of Science / Baghdad University (3) Dept. of Basic Science/ College of Dentistry/ Baghdad University (4) Central Public Health Laboratory / Baghdad / Republic of Iraq (5) Faculty of Pharmacy/ Royal University for Medical Sciences / Jordan

ABSTRACT

Forty-seven isolates of *S. enterica* serovar Typhi were isolated from blood specimens collected from patients attending hospitals of Kirkuk, Iraq. Even though all isolates developed resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol, but *sul2* and *tem* genes were not detected. Nonetheless, only ten isolates were positive for *gyrA* and *catP*. Such findings highlight a contribution of other genes or mechanisms permit these multidrug isolates to overcome the antibiotics under investigation.

Key words: *Salmonella enterica* serovar (ser.) Typhi, typhoid fever

الملخص باللغة العربية

عزلت سبع و أربعون عزلة من *S. enterica* serovar Typhi من عينات دم لمرضى رافدين في مستشفيات كركوك، العراق. على الرغم من أن جميع العزلات أظهرت مقاومة لمضاد التتراميثوبريم – سلفاميثوكسازول و الكلورامفينيكول، إلا أنه لم يتم الكشف عن جيني *tem* و *sul2* في هذه العزلات. كما أنه تم الكشف عن وجود جيني *gyrA* و *catP* في عشرة عزلات فقط. عليه فإن نتائج هذه الدراسة تسلط الضوء على احتمالية اشتراك جينات أو آليات أخرى في مقاومة المضادات قيد الدراسة.

INTRODUCTION

Salmonella enterica serovar (ser.) Typhi (*S.typhi*), the etiologic agent of typhoid fever, is known to be amongst some of the most resistant of pathogens (1, 2). Typhoid fever causes 20 million cases annually with at least 700,000 deaths. However, it is endemic in many countries and if not treated appropriately has a mortality rate of 30%. Appropriate treatment reduces the mortality rate to as low as 0.5% (1).

Typhoid fever caused by *S. enterica* ser. Typhi (*S.typhi*) remains a major health problem in the developing countries (3). Treatment with appropriate antimicrobial drugs has become hampered by gradual plasmid-mediated resistance to ampicillin, chloramphenicol, and cotrimoxazole, particularly in southern and South East Asia (4).

The occurrence of multidrug resistance (MDR) (to amoxicillin, chloramphenicol, sulfonamides, streptomycin, tetracycline, and trimethoprim) in *S. enterica* ser. Typhi has been increasing and MDR strains have been responsible for numerous outbreaks on the Asian continent (5). Multidrug-resistant (MDR) *S. enterica* ser. Typhi have been reported from different parts of world such as Pakistan (6), India (7), Bangladesh (8), Canada (9), UK (10) and Iraq (11, 12).

Limited data is available on the prevalence of genes responsible for antibiotic resistance in Iraq. Therefore the present study aimed to investigate the antimicrobial resistance at genetic level in local isolates of *S. enterica* ser. Typhi.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Identification

Forty - seven isolates of *S. enterica* ser. Typhi were isolated from blood specimens collected from patients attending Kirkuk hospital-Iraq, using routine culture, morphological and Biochemical analysis according to Holt *et al.*, (13). Furthermore, API20E system was performed to confirm the isolates.

Antibiotic susceptibility

The susceptibility of the forty seven *S. enterica* ser. typhi isolates against nine antimicrobial agents ciprofloxacin, imipenem, ceftriaxone, azithromycin, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline were determined by means of disc diffusion method (14). The results were interpreted according to CLSI (15). *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 25922) was used as a quality control in susceptibility determination.

Amplification of *sul2*, *gyrA*, *catP* and *tem* genes in multiplex PCR:

Reagents:

The multiplex PCR assays were performed targeting 4 genes *catP*, *sul2*, *tem*, and *gyrA* associated with resistance to the chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, and ciprofloxacin, respectively, using previously reported primers (Table 1).

Table (1): List of primers sequences used in study

Primer name	Primer sequences (5' – 3')	Targeted gene	Antibiotic	Amplicon size (bp)	Reference
ASRCF	ATGGAGAAAAAATCACTGG	<i>catP</i>	Chloramphenicol	623	15
ASRCR	AATTCATTAAGCATCTGCGGAC				
sulF	GATGAAGTCAGCTCCACCT	<i>sul2</i>	Trimethoprim-sulfamethoxazole	707	16
sulR	GCACGAGTGGGTTACATCGA				
A F	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	<i>tem</i>	Ampicillin	311	17
A R	TACCCTCATACTTATCCACCA				
Cip F	GTACTTTACGCCATGAACGT	<i>gyrA</i>	Ciprofloxacin	313	18
Cip R	GATGAAGTCAGCTCCACCT				

The reaction mixture contained 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 10 pmol of each primer, 95 nmol of each dNTP, 1 unit of Taq DNA polymerase, 50 ng of template and DNA free distilled water to make up the volume. Amplification was performed with PXE 0.2 thermocycler as follows: 1 cycle of 94°C for 4 minutes, 30 cycles each at 94°C (1.5 min), 45°C (1 min) and 72°C (2 min) followed by 5 min at 72°C (16).

The PCR amplification products were electrophoresed by using 2% (w/v) agarose gel at 5V/cm for 1 hr. stained with ethidium bromide and observed under UV light (16).

RESULTS AND DISCUSSION

In the light of emergence and recurrent rise in the multi-drug resistance, detection of antibiotic resistance pattern alongside with appropriate diagnosis of typhoid has become an issue of crucial significance. In this regard, multidrug resistance is strongly accompanying the severity of typhoid. Such link has been attributed to improper initial treatment and consequently promotes progression of the disease and future admission to hospital (17-20).

Patients of this study were from Kirkuk Governorate (north of Iraq), similar finding was described by Pfeifer *et al.* (21), when they found that a 30-year-old Iraqi woman was hospitalized in Cologne/Germany suffered from typhoid came from Sulaymaniya, Governorate in the northeastern Iraqi Kurdistan region, close to Kirkuk Governorate. The interview indicated that the same symptoms had developed in other family members in Iraq. The isolated strain was identified as *S. enterica* ser. Typhi, and the patient was treated successfully with meropenem, and no relapse was observed in a follow-up period of 6 months. The isolate contained *bal-CTX-IS* and *qnrB2* genes, resistance to cephalosporins as well the reduced quinolone susceptibility (21), that indicated there is another set of genes in addition to that we described in current study, and that may describe the MDR for typhoid fever in Iraq.

Results of antibiotic sensitivity revealed that all isolates were sensitive to imipenem, ceftriaxone and azithromycin. While 46 isolates were resistant to ciprofloxacin, ampicillin, chloramphenicol, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Moreover, twenty isolates developed resistance towards tetracycline. For that reason *catP*, *sul2*, *tem*, and *gyrA* related with resistance to the chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, and ciprofloxacin, respectively, were investigated.

Although all isolates developed resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol, *sul2* and *tem* were not detected in these isolates. While, *gyrA* and *catP* were detected in only nine isolates (Table 2, Figure 1).

Such findings highly emphasize a participation of other genes or mechanisms permit these isolates to overcome the antibiotics under investigation.

Table (2): Distribution of *gyrA*, *catP*, *sul2* and *tem* genes among local *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates

Isolate code	<i>gyrA</i>	<i>catP</i>	<i>sul2</i>	<i>tem</i>	Isolate code	<i>gyrA</i>	<i>catP</i>	<i>sul2</i>	<i>tem</i>
S1	+	+	-	-	S25	-	-	-	-
S2	+	+	-	-	S26	-	-	-	-
S3	+	+	-	-	S27	-	-	-	-
S4	+	+	-	-	S28	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	S29	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	S30	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	S31	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	S32	-	-	-	-
S9	+	+	-	-	S33	-	-	-	-
S10	+	+	-	-	S34	-	-	-	-
S11	+	+	-	-	S35	-	-	-	-
S12	+	+	-	-	S36	-	-	-	-
S13	-	-	-	-	S37	-	-	-	-
S14	-	-	-	-	S38	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	S39	-	-	-	-
S16	+	+	-	-	S40	-	-	-	-
S17	-	-	-	-	S41	-	-	-	-
S18	-	-	-	-	S42	-	-	-	-
S19	-	-	-	-	S43	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	S44	-	-	-	-
S21	-	-	-	-	S45	-	-	-	-
S22	-	-	-	-	S46	-	-	-	-
S23	-	-	-	-	S47	-	-	-	-
S24	-	-	-	-					

(+) denotes the presence of the gene; while (-) denotes the absence of the gene

Huovinen was stated that bacterial resistance to TMP and to sulfonamides is mediated by the following mechanisms: (a) the permeability barrier and/or efflux pumps, (b) naturally insensitive target enzymes, (c) regulational changes in the target enzymes, (d) mutational or recombinational changes in the target enzymes, and (e) acquired resistance by drug-resistant target enzymes (22).

In *Salmonella*, β -lactamase resistance is often conferred by the presence of the *bla_{TEM}* (10). Interestingly, none of the testes isolates harbored this gene, a matter stresses a role of other genes or mechanisms could be responsible for this resistance.

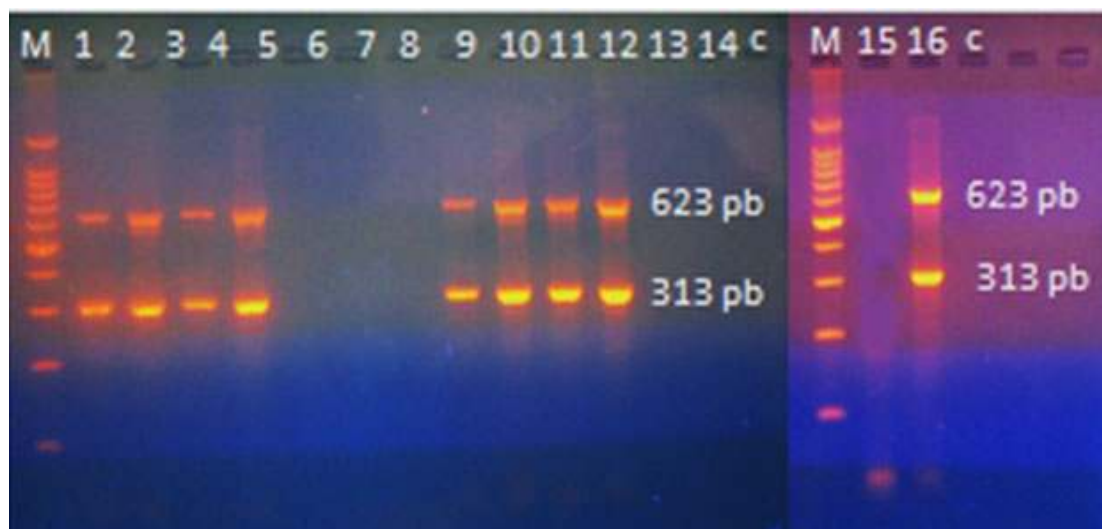


Figure (1): Analysis of genomic DNA of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates shows a presence of two genes; *gyrA* (313 pb) and *catP* (623 pb) separated on agarose gel (0.8%) at 5 V/cm for 1 hour, stained with ethidium bromide and visualized on a UV trans-illuminator documentation system. Lane M, 100 bp DNA ladder, Lane 1-16: DNA of different *Salmonella enterica* ser. Typhi isolates. Lane C, Negative control (had all PCR mixture including water instead of DNA template).

All isolates developed resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol, but *sul2* and *tem* genes were not detected. Nonetheless, only ten isolates were positive for *gyrA* and *catP*. Such findings highlight a contribution of other genes or mechanisms permit these multidrug isolates to overcome the antibiotics under investigation. In our isolates that contained *gyrA* and *catP* resistance to Ciprofloxacin and chloramphenicol were detected in only in ten isolates, which easily transferable by conjugation into *E.coli* (23).

In a conclusion, the Iraqi *S. enterica* ser. Typhi are Multi drug resistant isolates owing their resistance to various genes and resistance mechanisms. This occurrence is alarming because the dissemination of such isolates with acquired resistances will further limit the typhoid fever treatment.

REFERENCES

1. Cooke FJ. and Wain J. (2004). The Emergence of Antibiotic Resistance in Typhoid Fever. *Travel. Med. Inf. Dis.* 2: 67-74.
2. Parry CM.; Hein TT.; Dougan G.; White NJ. and Farrar JJ. (2002). Typhoid Fever. *N. Eng. J. Med.* 347(22):1770-1782.
3. Crump JA. and Mintz ED. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Infect. Dis.* 50:241–246.
4. Wain J. and Kidgell C. (2004). The emergence of multidrug resistance to antimicrobial agents for the treatment of typhoid fever. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 98: 423-430.
5. Ploy M.; Chainier D.; Thi N.; Poilane I.; Cruaud P.; Denis F.; Collignon A. and Lambert T. (2003). Integron-Associated Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhi from Asia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(4): 1427–1429.
6. Thong K.; Bhutta Z. and Pang T. (2000). Multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhi are genetically homogenous and coexist with antibiotic-sensitive strains as distinct, independent clones. *Int. J. Inf. Dis.* 4 (4): 194-197.
7. Sen B.; Dutta S.; Sur D.; Manna B.; Deb A.; Bhattacharya S. and Niyogi S. (2007). Phage typing, biotyping & antimicrobial resistance profile of *Salmonella enterica* serotype Typhi from Kolkata. *Indian J Med Res.* 125 (5): 685-688.
8. Alam A.; Zaman S.; Chaiti F.; Sheikh N. and Kundu G. (2010). A Reappraisal of Clinical Characteristics of Typhoid Fever. *Ban J Child Health*; 34 (3): 80-85.
9. Comeau J.; Tran T.; Moore D.; Phi C. and Quach C. (2013). *Salmonella enterica* serotype Typhi infections in a Canadian pediatric hospital: a retrospective case series. *CMAJ Open*. DOI:10.9778/cmajo.20120012.

10. Randall L.; Cooles S.; Osborn M., Piddock L. and Woodward M. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 208-216.
11. Faik A.; Salih W. and Latif K. (2012). Conventional and Molecular Typing of *Salmonella enterica* serotype Typhi Locally Isolated in Baghdad. *J. Baghdad for Sci.* 9(4): 632-639.
12. Salih S. (2012). The Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of *Thymus vulgaris* on *Salmonella typhi* in Rabbits. *British J. Pharmacol. Toxicol.* 3(4): 147-150.
13. Holt J. Krieg N, Sneath P, Staley J and Williams S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins. Maryland, USA.
14. Bauer A, Kirby W, Scherris J, and Torch M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single methods. *AM. J. eli. Path.* 45:493-496.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. CLSI, Wayne, PA.
16. Haque A. (2005). Molecular detection of *Salmonella typhi* strains and their drug resistance pattern. Ph. D. thesis, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan.
17. Chu C.; Chiu C.; Wu W.; Chu C.; Liu P. and Ou J. (2001). Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(8): 2299-2303.
18. Carlson S.; Bolton L.; Briggs C.; Hurd H.; Sharma V.; Fedorka-Cray P. and Jones B. (1999). Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. *Mol. Cell. Probes.* 13: 213-222.
19. Molbak K. (1999). An outbreak of multidrug resistant, quinolone resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infection in the United States. *New Eng. J. Med.* 341: 1420-1425.
20. Brunelle B.; Bearson S. and Bearson B. (2013). Tetracycline accelerates the temporally-regulated invasion response in specific isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *BMC Microbiol.* 13:202.
21. Pfeifer Y.; Matten J. and Rabsch W. (2009). *Salmonella enterica* Serovar Typhi with CTX-M β -Lactamase, Germany. *Emerg Infect Dis.* 15(9): 1533-1535.
22. Huovinen P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Inf Dis.* 32:1608-1614.
23. Capoor MR.; Nair D.; Walia NS.; Routela RS.; Grover SS. and Deb M. (2009). Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi and *S. Paratyphi A*: need to expand the QRDR region? *Epidemiol. Infect.* 137:871-878.

Virulence Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic sinusitis

Hiba T. Al- Hamashee

Dept. of Biology /College of Sciences / Wasit University /Republic of Iraq

ABSTRACT

This study included sixty *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic sinusitis . These isolates were identified morphologically and biochemically by catalase,gram stain test, growth and fermentation of mannitol sugar on mannitol salt agar,and production of coagulase. All of these isolates,were catalase positive, grew on mannitol salt agar and fermented mannitol, and were coagulase positive. Detected virulence factors were protease, lipase, hemolysin and biofilm production for which 88.33%, 88.33%, 86.66% and 98.33% respectively,of the isolates were positive of these isolates,31(51.6%) were positive for hemolysin only,42(70%) and 55(91.6%) were positive for protease only and lipase only, respectively .Proteolytic activity occurred in 31 (51.6%), hemolytic and lipolytic activity in 37(61.6%), lipolytic and proteolytic in 39(65%) and hemolytic, proteolytic and lipolytic activities in 27(45%) of the isolates. We concluded that, for this study included factors, the virulence of *S.aureus* isolates from cases of chronic sinusitis are potential pathogen ? So that then can be opportunistic pathogens in this case rather than mere contaminants.

Key words: *Staphylococcus aureus*, sinusitis

المخلص باللغة العربية

تضمنت هذه الدراسة 60 عزلة من المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* من أشخاص مصابين بالتهاب الجيوب الأنفية المزمن، وتم تشخيصها مظهرها على وسط mannitol salt agar وكيموحيويا، وعمل فحص التلألؤ من خلال فحص إنتاج كواكبوليز في أنابيب الاختبار وأعطت جميعها نتيجة موجبة ، بينما اختلفت النتيجة بين الموجبة والسالبة وإعطاء نتيجة التلألؤ الذاتي ، وتم إجراء فحص الكاتليز وأعطت كل العزلات نتائج موجبة ، وتم التحري عن وجود عوامل الضراوة من الإنزيمات ، إنتاج إنزيم البروتيز بنسبة (88.33%) وإنتاج إنزيم اللايبيز (88.33%) على أوساط التحري الخاصة وإنتاج الغلاف الحيوي على وسط الخاص للتحري عن إنتاج الغلاف الحيوي بنسبة(98.33%) والتحري عن قدرة العزلات على تحليل الدم بنسبة (86.66%) ، وقد أظهرت العزلات *S.aureus* النسب لكل من عوامل الضراوة على حدة ابتداء من الفعالية التحليلية للدم ، وفعالية إنزيم البروتيز ، وفعالية إنزيم اللايبيز وعلى التوالي 31(51.6%) ، 42(70%) ، 55 (91.6%) . وكانت نسبة التعبير المشترك لكل من عوامل الضراوة تحليل الدم وفعالية البروتيز 31 (51.6%)، وفعالية تحليل الدم واللايبيز 37(61.6%) ، ونسبة التعبير المشترك لإنزيم البروتيز وإنزيم اللايبيز 39(65%)، والفعالية المشتركة للتعبير لكل من إنزيم البروتيز واللايبيز وفعالية التحلل للدم 27 (45%). لذلك فإن عزلات *S. aureus* التي تعد ممرضا ضاريا في تلك الحالة يمكن أن تعد ممرضا انتهازيا في هذه الحالات وليس مجرد ملوثات.

INTRODUCTION

Sinusitis simply means the sinuses are inflamed red and swollen because of an infection or another problem. There are several types of sinusitis, acute, which lasts up to 4 weeks, subacute, which lasts 4 to 12 weeks, chronic sinusitis, which lasts more than 12 weeks and can continue for months or even years and recurrent, with several attacks within a year. The sinuses specifically, paranasal sinuses are four pairs of cavities located within the skull or bones of the head surrounding the nose. In chronic sinusitis the membranes of both the paranasal sinuses and the nose thicken because they are constant inflamed. (1).

Sinusitis is a very common chronic illness with a substantial health care impact. The factors contributing to sinusitis pathogenesis and chronicity including anatomic factors, disturbances in mucociliary clearance and microbial pathogens (2).

Staphylococcus aureus is the most common microorganism in chronic sinusitis, which colonize the skin and mucosa of human beings and several animal species (3).

The most common pathogens in acute sinusitis include *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. Pathogens that found in chronic sinusitis are usually a mixture of aerobic and anaerobic bacteria, including *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. Reports of the prevalence of anaerobic species differ widely, and range from as high as 80% to 100% in children, or to as low as 0% to 25% in adults (3). Although primary *S. aureus* infections are not common, a great deal of the virulence from this organism occurs through cross-infection by spread from patient to patient in hospitals and other institutional settings. In contrast, healthy individuals have a small risk of contracting an invasive infection caused by *S. aureus*, but they can be carriers of the organism. Because its primary habitat is moist squamous epithelium of the anterior nares, most invasive *S. aureus* infections are assumed to arise from nasal carriage (4).

Nearly all strains of *S. aureus* secrete a group of exo proteins such as exotoxins and enzymes, including nucleases, proteases, lipases, hyaluronidase, and collagenase. The main function of these proteins may be to convert local host tissue into nutrients required for bacterial growth (5). The aim of this study is to detect the virulence factors of *S. aureus* from chronic sinusitis patients due to the rare studies based on this case.

PATIENTS AND METHODS

Patients:

This study included 60 patients clinically diagnosed with symptomatic chronic sinusitis, aged 6 to 65 years, attending private Ear, Nose and Throat Clinic in Al-Kut/Wassit Province/Iraq.

Specimen Collection and Processing:

Specimens were collected during March 2013 to January 2014. nasal swabs were collected and streaked immediately after collection on mannitol salt agar. The mannitol salt agar plates were incubated for 24 to 48 h at 35°C and examined for growth (6).

Identification of the Isolates:

Strains that produced yellow colonies on mannitol salt agar screen were primarily identified as *Staphylococcus* spp. by colony morphology and pigmentation on tryptic soy agar, Gram stain, susceptibility to 0.04U, and catalase and bacitracin test. Biochemical identification of *Staphylococcus aureus* was based on coagulase and hemolysin production (7).

Detection of hemolytic, lipolytic and proteolytic activity:

These experiments were carried out according to Michelim *et al.* (8). For the evaluation of enzymatic activities, the isolates were initially grown on tryptic soy agar (TSA) at 37°C for 24 hrs. All the enzymatic experiments were repeated twice with three replications per experiment.

Hemolytic activity of the isolates was assessed after 48 h incubation at 37°C on TSA supplemented with 5% (v/v) human blood.

Lipolytic activity was assessed by streaking the isolates onto Tween 20 (T20) agar and incubating the plates at 37°C for 72 hrs. Lipase activity was determined by measuring the halos of precipitated Tween around the streaks.

Proteolytic activity was measured by inoculating the isolates onto modified TSA medium (8). After incubation the plates were flooded with a saturated solution of ammonium sulfate to precipitate the proteins in the medium, isolates being classified according to the size of the halo of protein hydrolysis.

Phenotype analysis of biofilm production on CRA:

Biofilm forming colony morphology was detected for the isolates on Congo red agar (CRA) plates (9). Bacteria were cultured in 10 ml tryptic soy broth at 35°C for 24 h without shaking, then plated onto (CRA) plates. Incubation was carried out at 35°C for 24 hrs. and an additional 24 hrs. at room temperature before recording the colony morphology. Crusty black colonies with dry filamentous appearance were recorded as biofilm producers, smooth pink colonies as non-producers and intermediate colony morphology (pink with dark centers resembling bull's eyes) as potential biofilm producers (10).

RESULTS AND DISCUSSION

The choice of virulence factors:

This study included 60 isolates of *S. aureus* from patients with symptomatic chronic sinusitis. Phenotypic virulence characterization of the isolates is shown in table (1).

Table (1): Virulence Phenotypes of *S. aureus* isolates from patients with chronic sinusitis

Virulence factor	Number of positive isolates (%)
Hemolytic activity	52(86.66%)
Protease production	53(88.33%)
Lipase production	53(88.33%)
Biofilm formation	59(98.33%)

Biofilm formation, hemolytic activity, lipase, and protease, production were the principal pathogenicity factors of *S. aureus* as shown in previous studies (11-15). So that these factors we considered in this study as an attempt to determine the pathogenic potential.

Hemolytic activity of the isolates:

Hemolytic activity was observed in 53(88.33%) of isolates. This is a good indication of virulence of these bacteria as hemolysis is strongly correlated with bacterial virulence especially in *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* is pathogenic to animals and humans and produce many virulence factors such as hemolysins, which include alpha-, beta-, gamma- and delta-hemolysin. These agents play a very important role in staphylococcal pathogenesis. Hemolysins are cytolytic to a variety of host cells. Toxicity to immune cells makes them a good means for *Staphylococcus aureus* to avoid phagocytosis and other forms of immune response (17,18). *Staphylococcus aureus* α -toxin can have lethal effects, damages membranes (resulting in, among other things, hemolysis), and is responsible for a form of dermonecrosis (16).

Proteolytic activity of the isolates:

Protease was produced by 53(88.33%) of *S. aureus* isolates. Figure (1). The role of protease in pathogenesis of *S. aureus* is not well defined. It seems likely that protease may participate in distribution of infection by degrading proteins. Goguen *et al.* (20) demonstrated that proteases, like lipases, have been shown to be involved in tissue damage and the inflammatory response of the host as well as in the degradation of signal peptides altering the immune response (21). *Staphylococcus aureus* proteases role in human disease pathogenesis is unknown (19). Human strains of *Staphylococcus aureus* secrete two papain-like proteases, staphopain A and B. Avian strains produce another homologous enzyme, staphopain C. Animal studies suggest that staphopains B and C contribute to bacterial virulence, in contrast to staphopain A, which seems

to have a virulence unrelated function (22). It is not known if the *S. epidermidis* proteases contribute to virulence by degrading host tissues, however this is to be expected. The serine protease is preferentially expressed in adherent culture, suggesting a possible role in biofilm formation. In another study, most likely the same protease has been reported to be able to degrade fibrinogen, complement protein C5, and several other proteins, suggesting a role in the escape from the immune defense system (11).

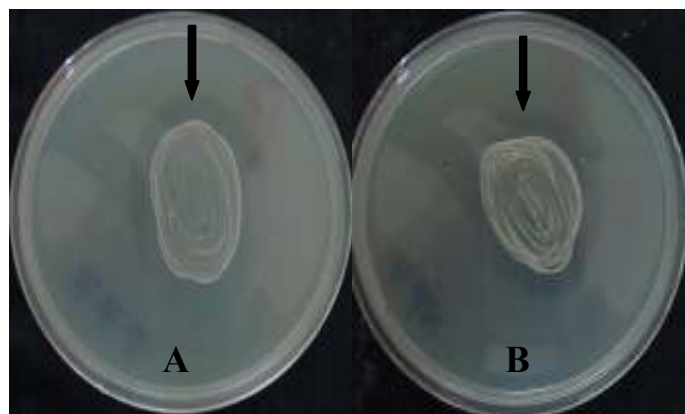


Figure (1): Protease production by *S. aureus* isolates on modified tryptic soy agar. Protein hydrolysis occurs as transparent halos around bacterial growth (arrows).

Lipolytic activity:

Lipase was produced by 88.33% of *S. aureus* isolates. The production of lipases is a common property of staphylococci. The contribution of these enzymes to virulence, however, is not clearly understood, although it has been suggested that lipases may be important for colonization and persistence of resident organisms on the skin (22,23). Lipases have been implicated as possible virulence determinants in the pathogenesis of a number of localized infections, such as boils or abscesses (24,25), and studies utilizing *in vitro* expression technology have also indicated that lipases are produced during infections in a murine abscess model (26). Lipases may contribute to persistence of the microorganisms by providing a source of energy or by facilitating adherence (11, 23). It has also been suggested that lipase lowers the concentration of lipids that inhibit another staphylococcal enzymes (27). The recent finding that lipase of *S. epidermidis* can bind to collagen might constitute a novel role for lipase in virulence (11).

Biofilm formation:

This study included isolates were biofilm formers (98.33%). This very high percentage of isolates with this characteristic indicates the critical importance of biofilm formation for colonization of respiratory tract mucous membranes especially if we know that most of the isolates were potential producers. Figure (2).

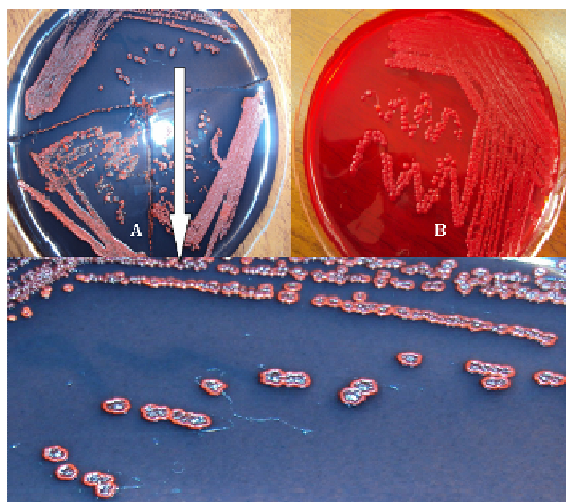


Figure (2): Biofilm-positive CNS isolates (A) and biofilm-negative isolate (B) on CRA medium

Biofilm formation is an important contributing factor for the establishment of chronic infection by the opportunistic pathogen *S. aureus*. *Staphylococcus aureus* readily forms biofilms on host surfaces such as bone, cartilage, and heart valves, as well as on foreign body implants, including catheters and orthopedic devices. The mature biofilm is composed of a community of cells encased in an extracellular matrix. This structure provides inherent resistance to the innate immune system and other antimicrobials and thereby promotes bacterial persistence (23). Several factors contribute to biofilm recalcitrance. For one, the extracellular matrix provides a protective barrier against antimicrobials, reducing their permeability into the biofilm. Components of the immune system such as macrophages and large molecule immunoglobulins and superoxides have limited capacity to invade biofilms (34).

By reviewing literatures, the pathogenic importance of this factor is not clear. Michelim *et al.* (8) showed that biofilm formation was found to occur with a significant difference between the clinical isolates of *S. epidermidis* collected at neonatal, pediatric and adult ICUs, (38.8%) and the community isolates (20%). Also Christensen *et al.* (28) reported that the frequency of adherent growth was significantly higher (63%) in strains associated with clinical signs of infection than in strains not associated with such

signs (37%). In contrast to these researchers, Eftekhari and Mirmohamadi (29), found that 64% of patients (nosocomial infections, different cases: blood, urine, surgical wounds, exudates) and 68% of normal skin flora isolates had the potential to form biofilm, suggesting no difference between the two categories.

Co-expression of virulence factors and the seriousness of these infections:

Co-expression of virulence factors by *S. aureus* isolates are shown in tables (2,3).

Table (2): Co-expression of virulence factors by *S. aureus* isolates from patients with chronic sinusitis

Combined virulence factors	No. of positive isolates (%) (n = 60)
All four factors	27 (45%)
Three factors	41 (68.33%)
Two factors	21 (35%)
One factor	None
Null	None

Table (3): Co-expression of hemolytic, proteolytic and lipolytic activity by *S. aureus* isolates from patients with chronic sinusitis

Virulence factors	No. of positive isolates (%) (n = 60)
Only hemolytic	31 (51.6%)
Only proteolytic	42 (70%)
Only lipolytic	55 (91.6%)
Hemolytic and proteolytic	31 (51.6%)
Hemolytic and lipolytic	37 (61.6%)
lipolytic and Proteolytic	39 (65%)
Hemolytic, proteolytic and lipolytic	27 (45%)

This co-expression of virulence factors indicates the important role of these factors together in pathogenesis of chronic sinusitis. After colonization, *Staphylococci* replicate at the initial site of infection, elaborating enzymes that include serine protease, hyaluronidase, thermonuclease, and lipase. These enzymes facilitate bacterial survival and local spread across tissue surfaces, although their specific role in infections is still not well defined (30). In addition to mechanisms surrounding device-associated infection, *S. aureus* are also known to express an increasing number of other virulence factors to varying degrees. These include hemolysins, phosphatases, thermonucleases, lipases, galactosidases, pyrrolidonyl arylamidases and various decarboxylases (11, 31).

REFERENCES

1. Roxanne S.; Leung MD. and Rohit KMD. (2008). The Diagnosis and Management of Acute and Chronic Sinusitis. Prim. Care Clin. Office .Pract. 35:11-24.
2. Peacock SJ.; De Silva I. and Lowy FD. (2001). What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Trends. Microbiol. 9:605-610.
3. Von Eiff C.; Becker K.; Machka K.; Stammer H. and Peters G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia.. Engl. J Med. 344:11-16.
4. Foster TJ. (2004). The *Staphylococcus aureus*. superbug. J. Clin. Invest. 114:1693-1696.
5. Dinges MM.; Orwin PM. and Schlievert PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13:16-34.
6. David KW.; Robert SL.; Liana RM.; Michael E. and Michael D.(2004). Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Nasal Swab Specimens by a Real-Time PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 42(12):5578
7. Forbes BA.; Sahm DF. and Weissfeld AS. (2002). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology (11th ed.). USA: Mosby, Inc.
8. Michelim L.; Lahude M.; Araújo PR.; Giovanaz DSH.; Müller G.; Delamare APL.; Da Costa SOP. and Echeverrigaray S. (2005). Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. Braz. J. Microbiol. 36 (1):17-23.
9. Handke LD.; Conlon KM.; Slater SR.; Elbaruni S.; Fitzpatrick F.; Humphreys H.; Giles WP.; Rupp ME.; Fey PD. and O'Gara JP. (2004). Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* strains. J. Med. Microbiol. 53:367-374.
10. Aricola CR.; Compoccia D.; Baldassarri L.; Donati ME.; Pirini V.; Gamberini S. and Montanaro L. (2005). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. J. Biomed. Mat. Res.. 76A (2): 425-430.
11. Otto M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative Staphylococci. Front. Biosci. 9: 841-863.
12. Pei L. and Flock JI. (2001). Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen-coated surfaces. Microb. Pathog. 31:185-193.
13. Vuong C. and Otta M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. Microb. Infect. 4:481-489.
14. Hebert GA. and Hancock GA. (1985). Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J. Clin. Microbiol. 22:409-415.
15. Gemmell GC. (1996). Virulence characteristics of *Staphylococcus epidermidis*. J. Med. Microbiol. 22:287-289
16. Kayser FH.; Bienz KA.; Eckert J. and Zinkernagel RM. (2005). Med. Microbiol. 229-234.
17. Bownik A. and Siwicki AK. (2008). Effects of staphylococcal hemolysins on the immune system of vertebrates. Centr. Eur. J. Immunol. 33 (2):87-90.
18. Devriese A.; Vancanneyt M.; Baele M.; Vaneechoutte M.; Graef ED.; Snauwaert C.; Cleenwerck I.; Dawyndt P.; Swings J.; Decostere A. and Haesebrouck F. (2005). *Staphylococcus pseudointermedius* spp. a coagulase-positive species from animals. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:15.
19. Gillespie SH. and Hawkey PM. (2006). Principles and Practical Clini. Bacteriol. (2nd ed.). John Wiley & Sons, Ltd, Londom, pp 73-111.
20. Goguen JD.; Hole NP. and Subrahmanyam YV. (1995). Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. Infect. Agents. Dis. 4:47-54.
21. Rao MB.; Tanksale AM.; Ghatge MS. and Deshpande VV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:597-635.
22. Juørgens D.; Huser H. and Fehrenbach FJ. (1981). Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* lipase. FEMS Microbiol. Lett. 12:195-199.
23. Gribbon EM.; Cunliffe WJ. and Holland KT. (1993). Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids *in vitro*. J. Gen. Microbiol. 139:1745-1751.
24. Hedström SA. and Nilsson-Ehle P. (1983). Triacylglycerol lipolysis by *Staphylococcus aureus* strains from furunculosis, pyomyositis, impetigo and osteomyelitis. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 91:169-173.
25. Rollof J. Hedström SA. and Nilsson-Ehle P. (1987). Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains from disseminated and localized infections. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. 95:109-113.
26. Lowe AM.; Beattie DT. and Deresiewicz RL. (1998). Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. Mol. Microbiol. 27:967-976.
27. Smith KFAS. and Lal D. (1992). The esterification of fatty acids by *Staphylococcus aureus* fatty acid modifying enzyme (FAME) and its inhibition by glycerides. J. Med. Microbiol. 37:235-237.
28. Christensen G.; Simpson W. A.; Bisno AL. and Beachey EH. (1982). Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. Infect. Immun. 37(1): 318-326.
29. Eftekhari F. and Mirmohamadi Z. (2009). Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. Internat. J. Med. Medic.Sci. 1(10):438-441.
30. Kasper DL.; Braunwald E.; Fauci AS.; Hauser SL.; Longo DL. and Jameson JL. (2005). Harrison's

principles of internal medicine (16th ed.). McGraw-Hill, New York, pp. 814-823.

31. Longauerova A. (2006). Coagulase negative *Staphylococci* and their participation in pathogenesis of human infections. Bratisl Lek Listy. 107 (11-12):448-452.

32. Brook I.; Yocum P. and Shah K. (2000). Aerobic and anaerobic bacteriology of concurrent chronic otitis media with effusion and chronic sinusitis in children. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 126(2):174-176.

33. Magdalena K.; Tomasz K.; Doron G.; Katrine L.; Benedykt W.; Abeer J.; Matthew B.; Patrick D. *et. al.* (2012). Substrate specificity of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases e Staphopains A, B and C. Biochem. 94:318-327.

34. Joe MM. (2013). Regulation and function of *Staphylococcus aureus* secreted proteases on biofilm integrity. University of Iowa.

The effect of Carbon layer thickness on the electrical and optical properties of Si-CNT Junction

Anwar M. Ezzat (1) Bassam M. Mostafa (2) and Mohammed M. Younis (2)

(1) Dept. of Physics/ Al- Mosul University (2) Dept. of Renewable Energy / Al- Mosul University /Republic of Iraq

ABSTRACT

The aim of this study is to fabricate Si-C junction by plasma sputtering of Carbon from graphite rods without catalysts for different thicknesses through Scanning electron microscope images (SEM) , X-ray and Raman spectra we conclude that the Carbon are in the form of carbon nanotube of diameters of about 25-30 nanometer . X-ray spectrum shows peaks characteristics of the carbon nanotubes, Raman spectra of the samples show the disorder induced D band at $1350\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ and the tangential G band at $1550\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ for all thicknesses which indicating free of defect carbon nanotubes because D/G ratio is with in the range of good purity of Carbon nanotube . I-V measurements shows semiconducting behavior for all thickness and TEM investigations shows Si-C junction thickness increase with increasing Carbon layer thickness.

Key words: Si-C junction, nanotubes

الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى تحضير وصلة Si-C بواسطة التريز بالبلازما لقضبان كرافيت الكربون و بدون عامل مساعد و لعدة أسمك مختلفة، من خلال استخدام المجهر الالكتروني و الأشعة السينية و طيف رامان ، وبينت النتائج بأن الكربون ترسب على شكل أنابيب نانوية (دقيقة جدا) و بأقطار 25-30 نانومتر ، وأظهر طيف الأشعة السينية ما يميز وجود الأنابيب الكربونية النانوية ، في حين أظهر طيف رامان الحزمة اللانظامية D بالترددات $1350\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ و حزمة التماس G بالترددات $1550\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ و لكافة الأسمك مبينة أنابيب كربونية نانوية خالية من العيوب من خلال النسبة D/G في مدى النقاوة الجيدة ، كما أظهرت قياسات تيار -فولتية تصرف الوصلة كشبه موصل و كذلك الفحص بالمجهر الالكتروني النافذ أظهر تناسبا طرديا عند زيادة السمك لوصلة Si-C .

INTRODUCTION

Because of the great importance of applications in various scientific fields, Carbon nanotubes have attracted much attention in the world due to their outstanding physical and chemical properties such as gas storage media, high strength composite materials, sensors, actuators, catalyst supports, field emission displays, nanoprobe, and as molecular wires for the next generation electronic devices (1-3).

The synthesized nanotube samples are characterized by means of Raman, electronic, and optical spectroscopies. Atomic force microscope (AFM) and Raman spectroscopy are an excellent tools for multiwall nanotube characterization and treatment.

Due to the specific combination of strong Van Hove singularities of the phonon density of states and Raman resonance effects it is possible to measure Raman scattering spectra of a small bundle of carbon nanotubes (1-5).

Nowadays, MWNTs and SWNTs are produced mainly by three techniques: arc-discharge, laser-ablation, and catalytic growth (6-8).

In this paper, we report a new method that enables growth of Carbon nanotubes on silicon wafers without catalyst of large aspect ratios by plasma sputtering that allow the deposited Carbon to grow into graphitic tubules (8). This junction may be of importance in electronic applications so that we didn't use catalysts in order that the junction will have less impurities and defects.

We investigated the effects of the carbon layer thickness on the electrical and optical properties of Si-CNT junction. The nanotubes are characterized using field emission scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction, Raman spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM).

METHODS AND APPLICATIONS

Deposition of the Carbon layer is done using plasma coating automatic system (Q150R S/E/ES) where Argon is an ambient gas, the source of Carbon is graphite of purity(99.999), with pulse current 80 A and pulse duration of 5 seconds, the desirable thickness can be obtained by repetition of pulses. As for the I-V characteristics Gold layer is deposited on the front and rear sides by the same plasma coating system. The thickness of the carbon layer is controlled during the sputtering process by the device itself with thickness range (10-22nm).

The substrates for the samples are silicon wafers on which the Carbon layer is deposited. They are cleaned using a suitable solutions and acids then ultrasonically cleaned to remove any contamination or native oxide. Figure (1) shows cross sectional views of the samples.

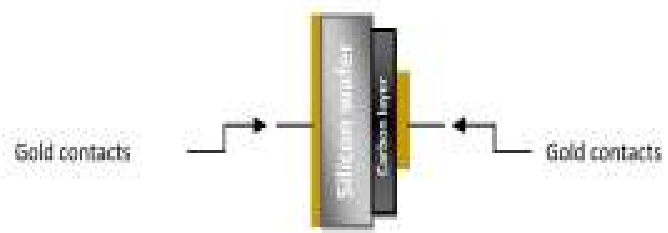


Figure (1): cross sectional view of the samples

The surface microstructure was obtained by a cold field scanning electron microscope (SEM) (JEUM-JSM-6756 F) operating at a voltage of 10 keV. Scanning electron microscope (Jeol; JDS-7391LV) was used to record Energy dispersive scattering (EDS).

Raman spectra measurements (GM SER No 87120) (Germany made), of laser source used with a helium-neon laser emitting at 633 nm. The integration time used is about several minutes. Micro-Raman spectroscopy consists of a laser excitation beam that is focused through a microscope on the sample surface. The back scattered light intensity is measured as a function of its frequency shift. These shifts are induced by the inelastic energy exchange between photons and vibration modes. The spectra obtained give information on the bonding environment in the sample.

X-ray diffraction (XRD, Bruker/D8-advance with Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$), the diffraction angle was scanned from 20° to 100° at the scanning speed of 0.02° per second. The cross-sectional structures were characterized by TEM investigations, which were carried out using a Tecnai H2 F20 U-TWIN (GEI Inc, Hillsboro, OR, USA), operated at 200 kV.

RESULTS

In order to find the effect of thickness on the structural and electrical properties of the junction, many measurements are done which include Scanning electron microscopy, X-ray diffraction (XRD), Raman spectra and energy dispersive X-ray (EDX). I-V characteristics and cross sectional structure of the junction are also taken.

The SEM images show clearly formation of Carbon nanotube as in figure (2) and shape of carbon nanotube become more accurate by increasing thickness as in figure (2-b and c) meaning formation of well-formed CNT.

More insight study of the image starting from figure (2-a), it is noticed that finer Carbon nanotubes are formed with diameter of about 10 nm or less on comparison with the scales on the image. By comparing with (b) and (c) images of the same

figure, we see that the diameters increases to about 18 nm in (b) and to about 22 nm in (c) which lead us to the conclusion that the increasing thickness of carbon layer lead to increase the diameter of CNT. The later results (diameter increase) means the formation of multiwall nanotube (MWNT) and this is very logical result, which means that increasing thickness of the Carbon layer will be adds more outer layers to the same tubes thus increasing its diameter (9-11). This conclusion will be strengthened by X-ray diffraction and Raman spectra, which we will consider later.

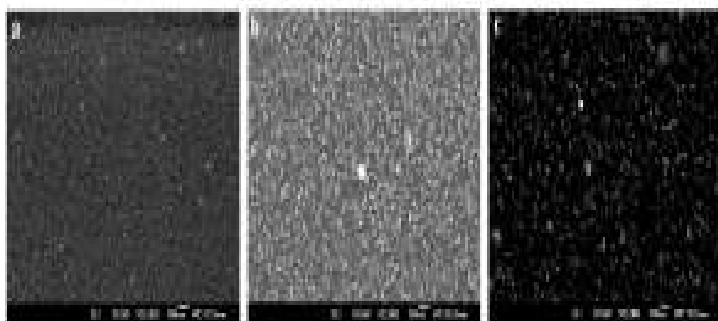


Figure (2): SEM images for Carbon layers (a) 10 nm thickness, (b) 18 nm thickness and (c) 22 nm thickness

The Raman spectra is a very important tool for the investigation of CNT, it can give us valuable information about the existence and purity of CNT, single wall SWNT or multiwall nanotube MWNT and also give indications of the diameter of the nanotube (1,2).

Raman spectra for the samples are taken using laser source at 633 nm wavelength, the G and D bands appear for all the thicknesses indicating free of defect Carbon nanotubes also intensity of Raman peaks increases with increasing Carbon layer thickness by comparing (a) with (b) and (c) in figure (3).

The most important features seen in figure (3) are the disorder induced D band at $1350\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ and the tangential G band at $1550\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$, which is related to the graphite tangential Raman active mode where the two atoms in graphene unit cell are vibrating tangentially one against the other. A presence in the Raman spectra of D bands with the frequency 1350 cm^{-1} is ascribed to a presence of amorphous Carbon in the sample, while presence of G bands with a frequency position of 1580 cm^{-1} give us information about the existence of ordered Carbon structure.

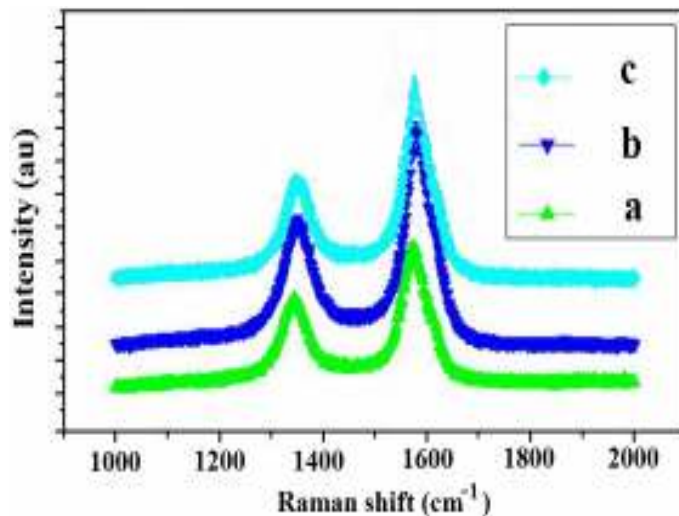


Figure (3): The Raman spectra for Carbon layers (a) 10 nm thickness, (b) 18 nm thickness and (c) 22 nm thickness

The Raman features associated with the radial breathing mode (RBM) from the large diameter tubes is usually too poor to be observable. The D band is activated in the first order scattering process of sp^2 Carbons by the presence of in plane substitution heteroatom vacancies, grain boundaries, or other defects and by finite size effects, all of which lower the crystalline symmetry of the quasi-infinite lattice. Therefore, the D mode can be used as a diagnostic of disruptions in the hexagonal framework of MWNTs and is induced by double resonance process. This result was also observed in the other papers. The ratio of D/G bands are about 60%, which give indication that amorphous phase is very little and more pronounced is the ordered phase (1,5).

The shape of the G Raman peak gives possibility to distinguish between semiconducting or metallic nanotubes. Here, we think, the nanotubes are associated with semiconducting type of conductivity. In purified sample G band is narrower than in not purified, so the spectra shows that our samples were well purified. At low thickness the intensity is somewhat lower than that of high thickness, this indicate that the diameter of the nanotube is increasing, this is clear by comparing (a) with (b) and (c) spectra in figure (4).

X-ray measurements for Carbon nanotube is somewhat different from that of crystalline or polycrystalline samples. X-ray diffraction of CNT give indication of the presence of the graphite layers. Peaks in the X-ray diffraction of CNT not appear for single wall nanotube but it appears for multiwall nanotube. our X-ray diffraction pattern shows clearly the characteristic peak (002) of the graphite layers which indicate surly the existence of multiwall Carbon nanotube, intensity of the peak of low thickness (10 nm) is lower than that of (18

and 22 nm) which indicate slightly increase in the diameter. This coincides with former conclusion of Raman spectra. XRD spectrum also show characteristic peaks of Si which belong to the substrate and SiC which is normally formed at the junction but the intensity is low indicating small quantity of SiC.

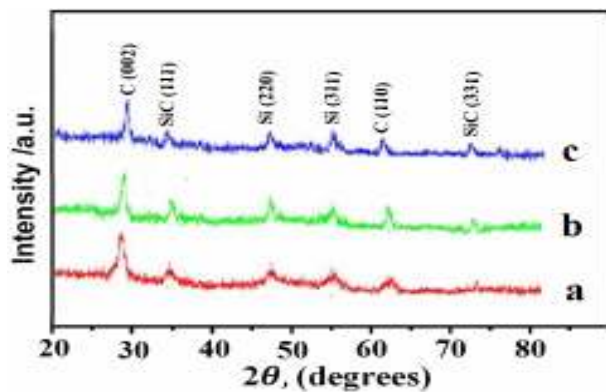


Figure (4): X-ray spectrum for Carbon layers (a) 10 nm thickness ,(b)18 nm thickness and (c)22 nm thickness

Energy dispersive x-ray shows increase of Carbon content with respect to silicon content . The weight and atomic percentage for Carbon layer and silicon within the sample (10 nm) as shown in figure (5-a) , these percentages will be increases with increases in carbon layer thickness as shown in figure(5-b)and figure(5-c) .

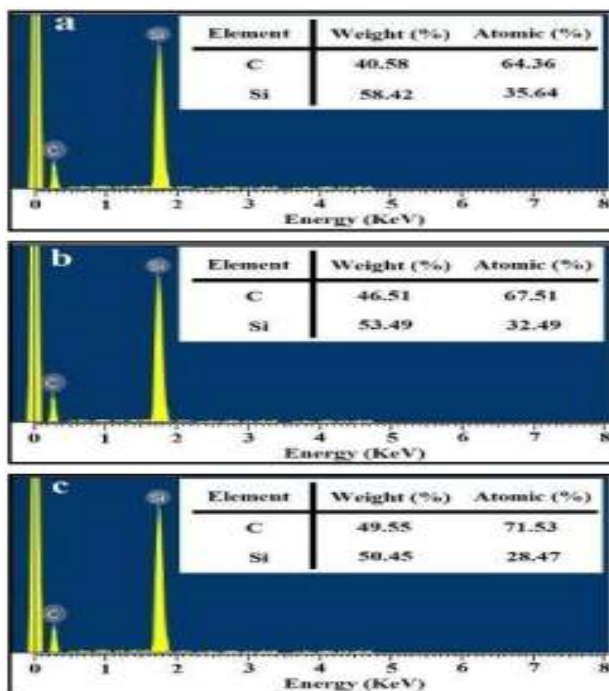


Figure (5): Energy dispersive x-ray Spectroscopy for Carbon layers and silicon (a) 10 nm thickness ,(b)18 nm thickness and (c)22 nm thickness

The I-V characteristics for Si – C junction with Gold electrodes on the front and back sides of the junction is shown in figure (6) . It is very clear that the Carbon has a semiconducting behavior in the junction, which is a characteristic property of the zigzag nanotubes.

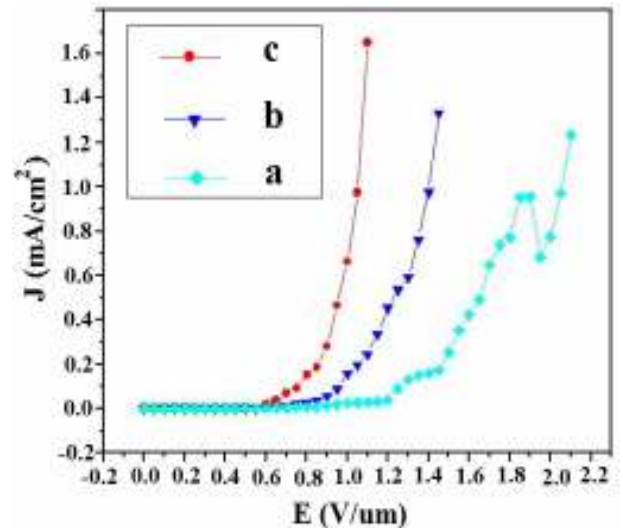


Figure (6): I-V characteristics for Si-C junction (a) 10 nm thickness ,(b)18 nm thickness and (c)22 nm thickness

The TEM (transmission electron microscopy image of cross-sectional morphologies of Si-C films are show the junction between the silicon and Carbon layers which indicate the increase in the junction width with increasing Carbon layer thickness as shown in figure (7), we expect that the junction consists of Silicon carbide that is indicated in X-ray spectrum in figure (4) which is result from the diffusion of Carbon atoms within the silicon .

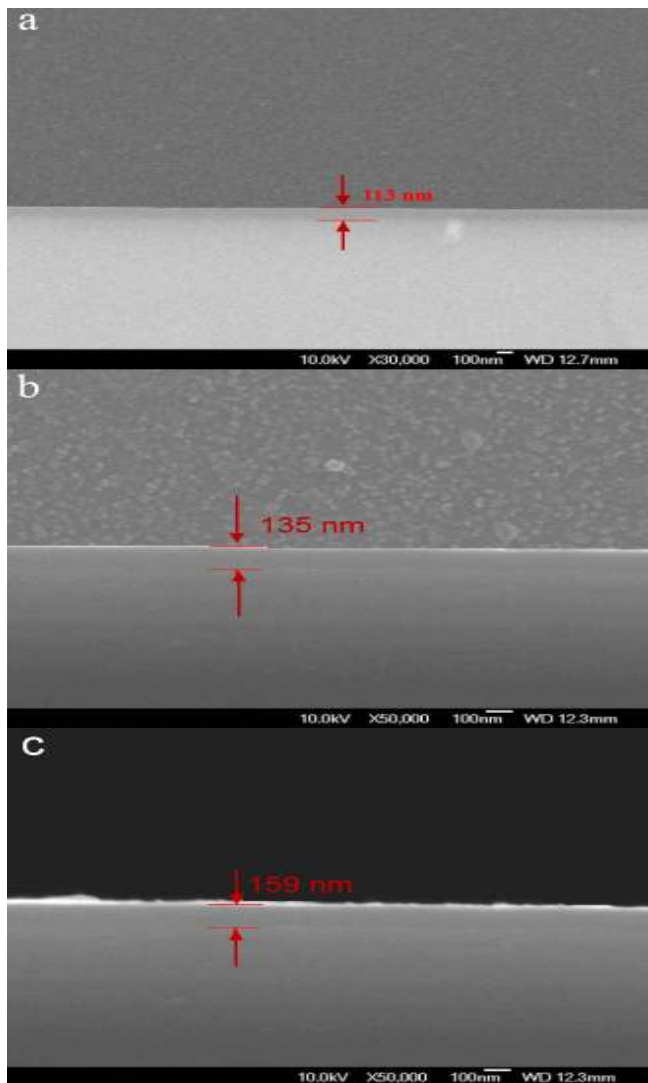


Figure (7): The TEM (transmission electron microscopy image of cross-sectional morphologies of Si-C films (a) 10 nm thickness, (b) 18 nm thickness and (c) 22 nm thickness

CONCLUSION

Raman and X-ray spectra of the samples shows the existence of multiwall nanotube (MWCNT) due to the existence of the G and D bands in the Raman spectra and (002) peaks in the X-ray spectra which related to the hexagonal structure, they shows small diameter for the multiwall nanotube MWCNT and this increases with thickness increases. Scanning electron microscope (SEM) images shows that diameter of low thickness is small (about 10 nm) and increases with increasing thickness (18-22 nm) for thickest layers.

Energy dispersive x-ray Spectroscopy (EDS) shows increase in the percentage of Carbon with respect to the silicon in the samples with increase of thickness also transmission electron microscopy (TEM) show the cross section image of the Si-C junction where junction width increases with the increasing of

thickness. I-V characteristics revealed the usual semiconducting properties of the Si-C junction.

Acknowledgments

The Authors would like to thank the College of Science, administration at Mosul University for supporting this work. Also thanks to Dr. Abid Al karem M. Muhammad Sumy Syate university Ukraine department of Nano for his great help in samples analysis.

REFERENCES

1. Bokova SN.; Obraztsova EE.; Grebenyukov VV.; Elumeeva KV.; Ishchenko AV. and Kuznetsov VL.(2010). Raman diagnostics of multi-wall carbon nanotubes with a small wall number. Phys. Status Solidi B, 1-4 / DOI 10.1002/pssb.201000237.
2. Jorio A.; Pimenta MA.; Souza Filho AV.; Saito G.; Dresselhaus F. and Dresselhaus MS.(2003). Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. New J. Phys. 5(139):13-17.
3. Murphy H.; PPapakonstantinou A. and Okpalugo TIT. (2006). Raman study of multiwalled carbon nanotubes functionalized with oxygen groups. J. Vac. Sci. Technol. B 24:1071-1023.
4. Zdrojek M.; Gebicki W.; Jastrzebski C.; Melin T. and Huczko A.(2004). Studies of multiwall carbon nanotubes using Raman spectroscopy and atomic force microscopy. Sol. Stat. Phenom. 99: 265.
5. Costa S.; Borowiak E.; M. Kruszynska A.; Bachmaiuk A. and Kalenczuk RJ.(2008). Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy. Mat. Sci. Pol. 26(2): 105-111.
6. Valentin NP. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. Mat. Sci. Eng. 43: 61-102.
7. Valentini L.; Armentano I.; Kenny JM.; Lozzi L. and Santucci S. (2003). Pulsed plasma-induced alignment of carbon nanotubes. Mat. Lett. 57: 3699-3704.
8. Mark H R.; Alicja B.; Felix B.; Franziska S.; Imad I. Krzysztof C.; Grazyna S. *et.al.* (2011). Synthesis of carbon nanotubes with and without catalyst particles. Nanoscale Res. Lett. 6:303-307.
9. Hofmann S.; Kleinsor B.; Ducati C.; Ferrari AC. and Robertson J. (2004). Low-temperature plasma enhanced chemical vapour deposition of carbon Nanotubes. Diamond and Related Mat. 13: 1171-1176.
10. Young C C.; Dong J B.; Young H L. and Byung S L.(2000). Growth of carbon nanotubes by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition at low temperature. J. Vac. Sci. Technol. 0734-0734.
11. Ashkan B.; Nischal A.; Radhakrishna Z. and Ant U. (2010). Electronic properties of metal-semiconductor and metal-oxide -semiconductor structures composed of carbon nanotube film on silicon. Appl. Phys. Lett. 97:233-235.

Evaluation of in- vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of cumin seed

Salwa Khudadad (1) Sundus H. Ahmed (2) and Mohammed K. Mousa (2)

(1) College of Sciences / Al- Mustansirya University / Baghdad (2) Agricultural Research Directorate / Ministry of Sciences and Technology / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Cumin (*Cuminum cyminum*) is commonly used as a flavoring in many eastern dishes. Cumin is known for its antioxidant properties. Our results showed that the alcoholic extracts had a highest content of total phenolic compound (TPC) 158.32 mg GAE/g than water extract 109.5 mg GAE/g. Alcoholic extract had a highest activity in scavenging DPPH free radical in compare with water extracts and ascorbic acid 91.32%, 87.24%, 60%, respectively. Moreover, study the in-vitro anti-inflammatory activities in terms of effect of hypotonic solution – induced haemolysis on RBC membrane stabilization and effect of inhibition of protein denaturation activity, also the alcoholic, water extracts & ascorbic acid showed *in vitro* anti-inflammatory activity by inhibiting the heat induced albumin denaturation with 250, 500, 1000 µg/ml respectively. From our result, it is concluded that phytochemicals of *Cuminum cyminum* seed extracts may be responsible for the antioxidant and anti-inflammatory activity.

Key words: TPC, DPPH, RBC, antioxidant, anti-inflammatory, *Cuminum cyminum*

الملخص باللغة العربية

يستعمل الكمون (*cuminum cyminum*) بشكل شائع كمادة منكهة في العديد من الأطباق الشرقية، وهو معروف بخصائصه المضادة للأكسدة. بينت نتائج الدراسة أن المستخلص الكحولي يحتوي على نسبة أعلى من المركبات الفينولية الكلية 158,32 ملغم من مكافئ حامض الكالك/ غم) من المستخلص المائي 109,5 ملغم من مكافئ حامض الكالك/ غم. إن المستخلص الكحولي يمتلك أعلى فعالية في إزاحة الجذور الحرة لـ DPPH مقارنة بالمستخلص المائي وحامض الاسكوربك 91,32% ، 87,24%، 60%، على التوالي وعلاوة على ذلك، إن دراسة الفعالية المضادة للالتهابات من حيث تأثير المحلول منخفض الضغط التناضحي الذي يحدث على تحلل غشاء كريات الدم الحمراء ويؤثر على تثبيط تحور البروتين ، أيضا أظهرت المستخلصات المائية ، الكحولي وحامض الاسكوربك مختبريا فعالية تثبيط دنتره الالبومين المستحث بالحرارة باستخدام 250، 500، 1000 مايكروغرام / مل على التوالي. ونستخلص من نتائجنا أن الكيمياتيات النباتية لبذور *Cminum cyminum* هي المسؤولة عن الفعالية المضادة للالتهابات والمضادة للأكسدة.

INTRODUCTION

Cumin is a flowering plant in the family Apiaceae, native from the East Mediterranean to India. Its seeds (each one contained within a fruit, which is dried) are used in the cuisines of many different cultures, in both whole and ground form. The English "cumin" derives from the Old English *cymen* (or Old French *cumin*), from Latin *cuminum*, which is the latinization of the Greek (*kuminon*), cognate with Hebrew (*kammon*) and Arabic (*kammun*). Forms of this word are attested in several ancient Semitic languages, including *kamūnu* in Akkadian(1). The ultimate source is believed to be the Sumerian word 'gamun' (2). The use of cumin is verycommon in Indian and Pakistani foods. It is used to season many dishes, as it draws out their Natural sweetness. It is traditionally added to curries, enchiladas, tacos, and other Middle-Eastern, Indian, Cuban and Mexican-style foods. It can also be added to salsa to give it extra flavor. Cumin has also been used on meat in addition to other common seasonings. The spice is extensively used in the cuisines of the Indian subcontinent. Cumin was also used heavily in ancient Roman cuisine (3,4). Antioxidants are compounds that can prevent the delay oxidative damage of lipids, nucleic acids and proteins by reactive oxygen species (ROS), which involved reactive free radicals such as superoxide, alkoxyl, hydroxyl peroxy, and non- radicals such as hydrogen peroxide (5). The antioxidant activity of phenolic compound is mainly due to their redox properties that allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, and singlet oxygen quenchers. In addition, they have a metal chelation potential. The present study is aimed to identify and to quantify the phenolic compounds contained in the ethanolic and aqueous extracts of the *Cumin seed*, and to evaluate their antioxidant capacity using the DPPH and anti-inflammatory activity. Furthermore, spectrophotometric analysis were employed for the determination of total phenolic compound concentrations in the extracts of the *Cuminum cyminum* seed.

MATERIALS AND METHODS

Water extract

The water extract of the cumin seed prepared by homogenizing 5 gm of seed powder in 10 ml of water and incubated in shaker incubator at 28°C for 24 h the homogenates were centrifuged at 2000 rpm for ten min. The supernatant was used for the antioxidant activity study.

Alcoholic extract preparation

Alcoholic extract of the plant seed was subsequently prepared by homogenizing 5 gm of the of seed under study in 10 ml of Absolute ethanol alcohol and kept in dark for ten days , the homogenates were centrifuged at 2000 rpm for ten min. The supernatant was used for the antioxidant activity study.

Total phenol determination

The total phenol content was determined by mixing 0.5 ml of the alcoholic extract, water and ascorbic acid, separately with 2.5 ml 10% Folin-Cioalteus reagent (v/v) and 2 ml of 7.5% sodium carbonate was subsequently added .The reaction mixture and incubated at 45°C for 40 min, and the absorbance was measured at 765nm in the spectrophotometer Gallic acid was used as standard phenol (6).

Free radical-scavenging ability by the use of a stable DPPH radical

The DPPH radical-scavenging activity was determined using the method proposed by (5). DPPH (100 IM) was dissolved in pure ethanol (96%). The radical stock solution was prepared fresh daily. The DPPH solution (1 ml) was added to 1 ml of polyphenol extracts with 3 ml of ethanol. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand at room temperature in the dark for 10 min. The decrease in absorbance of the resulting solution was monitored at 517 nm at 10 min. The results were corrected for dilution and expressed in IM trolox per 100 g dry weight (dw). All determinations were performed in triplicate.

Effect on membrane stabilization / Inhibition of membrane lysis

The principle involved here is stabilization of human red blood cell (HRBC) membrane by hypo tonicity induced membrane lysis. The assay mixture contains 1ml phosphate buffer (pH 7.4, 0.15 M), 2 ml hypo saline (0.36 %), 0.5 ml HRBC suspension (10 % v/v) with 0.5 ml of water extract and standard drug diclofenac sodium of various concentrations (100, 250, 500, 1000 µg/ml) and control (distilled water instead of hypo saline to produce 100 % hemolysis) were incubated at 37°C for 30 min and centrifuged respectively. The hemoglobin content in the suspension was estimated using spectrophotometer at 560 nm. The percentage inhibition of membrane stabilization can be calculated as:

Percentage inhibition = $100 - \frac{[(\text{optical density of test solution}) - (\text{optical density of control})]}{(\text{optical density of control})} \times 100$].

Effect on protein denaturation

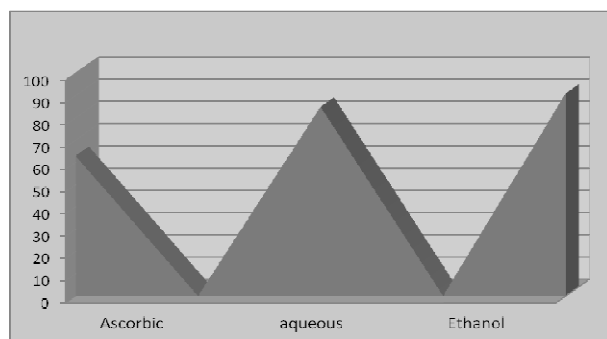
Test solution consisting of 1ml of different concentrations of Cumin preparation ranging from Various concentrations (100, 250, 500, 1000 µg/ml) (test solution) and diclofenac sodium (standard) were taken, respectively. All the above solutions were adjusted to pH6.3 using 1N HCl. µg/ml, was mixed with 1ml of egg albumin solution (1mM), incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 15 minutes. Denaturation was induced by keeping the reaction mixture at 70°C in a water bath for 10 minutes, then turbidity was measured spectrophotometrically at 660 nm. Protein denaturation was calculated as inhibition Percentage as follows:

Percentage Inhibition = $\frac{100 - (\text{optical density of test solution} - \text{optical Density of product control})}{(\text{optical density of test control})} \times 100$.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activity of Cumin

Antioxidants are substances that delay the oxidation process, inhibiting the polymerization chain initiated by free radicals and other subsequent oxidizing reactions (7). Many medicinal plants have been known to support various biological activities such as antimicrobial and antioxidant properties. The radical scavenging effects (percentage of quenched radicals) were determined for *Cumin* seed extracts. The extracts or their constituents when mixed with DPPH decolorized due to hydrogen donating ability. All the tested samples (ethanol, aqueous extracts and ascorbic acid) revealed scavenging effects on DPPH (63 to 91.32%) as shown in figure (1). The ethanol extract of Cumin was found to act as strong free radical scavengers (91.32%) in comparison with commercial antioxidants ascorbic acid as indicated by DPPH assays.



Figure(1): Antioxidant activity of Cumin

Total phenolic content

Total phenolic contents of seed extracts were tested using the diluted Folin-Ciocalteu reagent. Table (1) showed total phenolic content of seed extracts. Result showed that ethanol extract had the highest total phenolic content followed by water and ascorbic acid with mean value of 158.32 mg GAE/100 g extract and 109.50 mgGAE/100 g extract and 99.35 mgGAE/g, respectively.

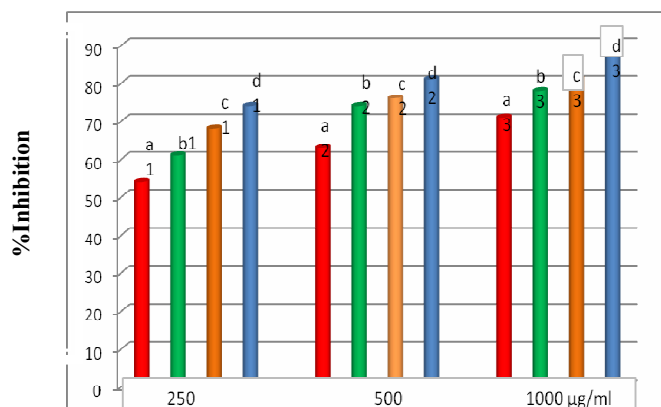
Table (2): The amount of TPC in the leaves and stems of Cumin

Seed Extract	Total phenolic (mgGAE/100g extracts)
Ethanol	158.32± 0.91
water	109.50 ± 0.74
Ascorbic	99.35±0.38

A number of reports on flavonoids, triterpenoids, and polyphenols indicated that they possess antioxidant and free radical scavenging activities (8). However, many of the health beneficial functions of polyphenols, including antimutagenicity, anticarcinogenicity and anti-aging, among others, have been discussed in relation to their antioxidant properties (9).

In the current study, the *in vitro* anti-inflammatory effect of *cumin* was evaluated against the denaturation of egg albumin. The results are summarized in figure (2). The present findings exhibited a concentration dependent inhibition of protein (albumin) denaturation by the test extract throughout the concentration range of (100, 250, 500, 1000, µg/ml). Diclofenac sodium (at the concentration range of (100, 250, 500, 1000, µg/ml) was used as the reference drug which also exhibited concentration dependent inhibition of protein denaturation however, the effect of diclofenac sodium was found to be less as compared with that of *Cumin* extracts. In the study of membrane stabilization activity of *Cumin* at concentration range of 100- 1000 µg/ml protected significantly in a concentration dependent manner the erythrocyte membrane against lysis induced by hypotonic solution. diclofenac in the concentration of 100-1000µg/ml used as standard also offered significant ($p < 0.001$) protection of RBC's membrane against damaging effect induced by hypotonic solution. The membrane stabilization action and inhibitory effect of different concentrations of Cumin extract are presented in figure (2), which reflected a significant inhibition of denaturation of egg albumin in concentration dependent manner. Both membrane stabilization activity and effect on protein denaturation contribute to the *in-vitro* anti-inflammatory activity of the Cumin extract used in our study. It has been reported that one of the features of several non-steroidal anti-inflammatory drugs is their ability to stabilize heat treated albumin

at the physiological pH. (10). A possible explanation for the stabilizing activity of the extractives is due to an increase in surface area /volume ratio of the cells which could be brought about by an expansion of membrane or shrinkage of the cell and an interaction with membrane (11).



Figure(2): In-vitro anti-inflammatory effect of Cumin evaluated by hypotonic solution – haemolysis and protein denaturation methods .

Diclofenac, hypotonic solution – haemolysis, a , protein denaturation,b, Cumin, solution – haemolysis, c, , protein denaturation,d.

The effect of extract and drug in stabilization membrane effect by inhibiting hypotonic induced lysis of erythrocyte membrane. Stabilization of lysosomal membrane is important in limiting the inflammation response by preventing the release of lysosomal constituents of activated neutrophil such as bactericidal enzymes and proteases, which cause further tissue inflammation and damage upon extracellular release (12)

REFERENCES

1. Thippeswamy NB. and Naidu KA.(2005). Antioxidant potency of cumin varieties cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. Europ. Food Res. Technol. 220: 472–476.
2. Zohary D. and Hopf M. (2000). Domestication of plants in the Old World. 3rd Ed. Oxford University Press, p. 206.
3. Peter KV. and Kandiannan K. (1999). Ginger. Tropical Horticulture. (Eds. Bose, T.K., S. K. Mitra, A. A. Farooqi and M. K. Sadhu), Naya Prokash, Calcutta 1: 46- 52.
4. Raghavan S. (2007). Handbook of spices, seasonings, and flavorings. 2nd CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 240.

5. Aiyegoro OA. and Okoh A I. (2010). Preliminary phytochemical screening and In vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium*. DC. BMC. Complement Altern. Med. 10- 21.
6. Indian herbal pharmacopoeia (1998). A joint publication of Regional Research Laboratory,Council of scientific & Industrial Research ; Jammutawi, vol. I, pp. 1-10.
7. Lister E. and Wilson P. (2001). Measurement of Total Phenolics and ABTS Assay for Antioxidant Activity. Crop Research Institute Lincoln, New Zealand.
8. Halliwell B. and Aruoma O I. (1990). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. FEBS Lett. 281: 9– 19.
9. Bouayed J. (2010). Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. Curr. Nutr. Food Sci. 6: 13-16.
10. Williams LAD.; O'Connar A.; Latore L.; Dennis O.; Ringer S.; Whittaker JA.; Conrad J.; Vogler B.; Rosner H. and Kraus W. (2008). The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin. West Indian Med. J. 57: 327-331.
11. Abe H. ; Katada K. ; Orita M. and Nishkibe M. (1991). Effects of calcium antagonists on the erythrocyte membrane. J. Pharm. Pharmacol. 41: 22-26.
12. Kumar V. ; Bhat ZA. ; Kumar D. and Bohra P and Sheela S. (2011). In –vitro anti –inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* Linn.Var Alba .Int. J. Drug Develop. Res. 3 : 176-179.

قسم الدراسات العربية

ARABIC SECTION

دراسة تصنيفية لأنواع القراد المتطفل على الأبقار في محافظة الأنبار

عز الدين عطية البيار

كلية العلوم / جامعة الأنبار / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

ينتشر القراد في معظم مناطق العراق ويتركز في مناطق وحقول تربية الحيوانات على مدار السنة ولكنه يتزايد بشكل كبير في الربيع والصيف ، في هذه الدراسة تم تسجيل أربعة أنواع من القراد تعود لجنسين مختلفين في مناطق (الرمادي ، القائم ، هيت ، العامرية ، الفلوجة) في محافظة الأنبار (للمدة من شهر آذار الى شهر تشرين الأول من عام 2012) متطفلة على الأبقار، إذ وجد الجنس *Rhipicephalus* في جميع مناطق المحافظة وتم تسجيل نوعين له هما *R. turanicus* و *R. microplus* . بينما وجد الجنس *Hyalomma* في المناطق الغربية من المحافظة فقط و تم تسجيل نوعين هما *H. anatolicum* و النوع *H. detritum* .

الكلمات المفتاحية: القراد، *Rhipicephalus*، *Hyalomma*

Taxonomic Study of Ticks Species Among Cattle in Al-Anbar Province

Ezeddin A. Albayyar

College of Sciences / Al- Anbar University/ Republic of Iraq

ABSTRACT

Ticks Spread in most parts of Iraq specially in animals fields year round but it is increasing dramatically in spring and summer. four types of ticks were recorded belonging for tow different genera in the province of Anbar cities (ramadi, alkaem,heet,amreia and falluja) intrusive on the cattle .The genus *Rhipicephalus* was found in all areas of the province and recorded with two species *R. turanicus* and *R. microplus* while genus *Hyalomma* was found in the western regions and only two types have been recorded, *H. anatolicum* and type *H. detritum*

المقدمة

2012) وهي الفترة التي يمكن ان يتواجد فيها القراد على الايقار لتوفر الظروف الملائمة من حيث درجات الحرارة وكذلك هي الفترة التي يتكاثر فيها القراد وقد شملت الدراسة فحص أكثر من 2500 بقرة متواجدة في المزارع والحقول التي تمت زيارتها . خلال هذه الدراسة جمعت البيانات عن تواجد القراد على الايقار وشملت البيانات منطقة الجمع ، جنس البقرة ، عمر البقرة ، اعداد القراد و موقع الإصابة على جسم الحيوان وذلك وفق استمارة أعدت مسبقاً لأغراض الدراسة استخدمت من قبل الباحث لتدوين المعلومات . جمع القراد من المناطق المصابة باستخدام قطعة من القطن مبللة بكحول ايثيلي تركيزه 70% . سحب القراد باستخدام ملقط عريض النهائيين بعناية وذلك لتجنب تلف أجزاء الفم و وضعت في قناني زجاجية محكمة تحتوي على كحول ايثيلي 100% وجلبت الى المختبر لتصنيفها (11) . أرسلت نماذج من القراد الى متحف التاريخ الطبيعي لجامعة بغداد لغرض التأكد من التشخيص .

تم تأكيد تشخيص انواع القراد في قسم الحشرات واللافقريات / مركز بحوث متحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد وقد ثبتت الانواع وفق ما تم تشخيصه واعتمدت على انها متواجدة على الايقار ضمن التنوع الاحيائي لمحافظة الانبار .

النتائج

تم تسجيل اربعة انواع من القراد في المحافظة جمعت من الحقول والمزارع المختلفة و تعود الى جنسين مختلفين حيث سجل نوعين لجنس *Rhipicephalus* ونوعين آخرين لجنس *Hyalomma* وهذه الانواع التي تم التاكيد منها وتسجيلها هي :

- 1-*Rhipicephalus turanicus*
- 2-*Rhipicephalus microplus*
- 3-*Hyalomma anatolicum*
- 4-*Hyalomma detritum*

ومن الجدير بالذكر ان النوع *Rhipicephalus turanicus* وكذلك النوع *Rhipicephalus microplus* وجدا في جميع المناطق التي جمعت منها العينات والتي شملتها الدراسة كما ان هذه الانواع وجدت احيانا مجتمعة معا على نفس العائل وكذلك في نفس اماكن الإصابة ، والجدول رقم (1) يبين انتشار القراد في المناطق التي جمعت منها العينات والتي شملتها الدراسة.

جدول رقم (1): توزيع القراد في مناطق محافظة الانبار المختلفة

الجنس	النوع	الرمادي	القائم	هيت	العامةرية	الفلوجة
<i>Rhipicephalus</i>	<i>microplus</i>	+	+	+	+	+
<i>Rhipicephalus</i>	<i>turanicus</i>	+	+	+	+	+
<i>Hyalomma</i>	<i>detritum</i>	+	+	+	-	-
<i>Hyalomma</i>	<i>anatolicum</i>	+	+	+	-	-

ان الجنس *Hyalomma* لم يسجل تواجده على الايقار في منطقتي الفلوجة والعامةرية ضمن العينات التي جمعت من هذه المناطق على الرغم من تشابه الظروف البيئية في هذه المناطق مع مثيلاتها في المنطقة الغربية مع فارق بسيط في درجات الحرارة.

المناقشة

ان المعلومات المتوفرة عن تواجد وانتشار القراد في عموم العراق تعد ضئيلة لعدم وجود تسجيل وتوثيق بشكل مستمر في اغلب المدن لحالات الإصابة او التواجد، لذلك من الصعوبة اكتشاف التغيرات الكمية والنوعية للمدة التي سبقت الدراسة . ان عملية تصنيف القراد ليست بالسهولة المتوقعة وتتطلب جهود كبيرة وخبرة وتقنية عالية لتمييز الانواع عن بعضها ، كما ان التقلب المستمر للظروف البيئية والمدى الواسع لدرجات الحرارة مابين

يعد القراد من اهم اللافقريات الكثيرة التي تنتشر بشكل واسع ولها تأثير اقتصادي وصحي في محافظة الانبار وان العامل الاهم الذي يحدد مدى انتشار وتواجد القراد هو الظروف البيئية وتواجد العائل وهذا العاملان هما المحددان الرئيسيان في انتشار وتنوع القراد في جميع مناطق العالم لان هذه الكائنات لا تستطيع ان تتشط وتتكاثر عند انخفاض درجات الحرارة وكذلك لخصوبتها العالية جدا واعداد البيض الهائلة التي تضعها تتطلب وجود اعداد كافية من الايقار لكي تستطيع ان تاخذ كفايتها من دماء العائل وتقليل التنافس فيما بينها(1) .

تكمّن خطورة القراد الصحية والاقتصادية في تطفله على الكثير من الحيوانات الداجنة للإنسان ونقله للكثير من الأمراض لهذه الحيوانات لطبيعة تغذيته على دماها مثل حمى الربع التي يسببها *Coxiella burneti* والتهاب الدماغ الفيروسي وحمل اومسك النزفية Omsk hemorrhagic fever (2) كما يتسبب القراد الصلب في نقل بعض الأمراض للإنسان ، مثل مرض اللايم Lyme disease ومرض حمى جبال الروكي البقية Rocky Relapsing mountain spotted fever) والحمى الارتدادية (3 fever) وحمى كيو (Q fever) وغيرها من الامراض (3) وقد تسبب الإصابة بالقرد تفاعلات جلدية مهيجة عند المصابين وتؤدي الى ظهور أعراض مشابهة للربو (4) .

يستطيع القراد التطفل على مجموعة كبيرة من الحيوانات ومنها الايقار على الرغم من وجود تخصص عالي لبعض الانواع ولاسيما في المناطق الاستوائية والمعتدلة ذات الرطوبة العالية وهو متطفل في جميع اطواره وغالبا ما يلتصق بجسم الحيوان في المناطق القليلة الشعر مثل الضرع و الأرجل من الداخل وخلف الاذن واسفل الذيل .

ان انتشار القراد كان في المناطق الزراعية اكثر من تواجده داخل المدن بسبب زيادة اعداد الايقار والحقول في الريف وتوفر ظروف اكثر ملائمة للعيش مما هو عليه داخل المدن من حيث الإعداد والنظافة والمتابعة المستمرة واستخدام المبيدات وطرق مكافحة المختلفة (5). ويعد القراد من اهم ناقلات المسببات المرضية ذات الاهمية الطبية والطبية البيطرية (6) .

يصنف القراد على عدة اساس فقد يكون اعتمادا على نوع العائل المصاب وقد يصنف اعتمادا على نوع اجزاء الفم او حسب لون الأرجل او لون الجسم و احيانا يؤخذ الموقع الجغرافي في تسمية بعض الانواع (7).

تتوفر بعض الدراسات حول القراد في عموم العراق وبخاصة في محافظة الانبار ومن هذه الدراسات ما قام به (8) اذ سجل في دراستهم على الاغنام اربعة انواع للجنس *Hyalomm* ونوعين للجنس *Rhipicephalus* وكذلك الدراسة التي اجرتها (9) حيث استخدمت الفطر *Beauveria bassiana* في مكافحة القراد نوع *Rhipicephalus microplus* بالمقارنة مع المبيد كلوربيرفوس ، لذلك فقد سمعت الدراسة الحالية الى تثبيت بعض الانواع التي تتطفل على الايقار و التي وجدها من خلال الفحص والتفتيش في مناطق مختلفة من المحافظة الواسعة وبعد تشخيص النماذج في متحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد تم تثبيت هذه الانواع كتسجيل اولي ضمن محافظة الانبار على امل استمرار الدراسات لتثبيت انواع اضافية قد تتواجد وبخاصة على المضايغ الاخرى مثل الاغنام والدواجن والحيوانات السائبة كما ان بعض الانواع قد تتطفل على اكثر من عائل خلال دورة حياتها اذ من الممكن ان تتناب التطفل على انواع مختلفة من العوائل بعد كل انسلاخ او خلال الاطوار المختلفة (10) .

المواد وطرق العمل

اجريت الدراسة في عدد من مناطق محافظة الانبار للتحري عن إصابة الايقار باي نوع من انواع القراد وشملت الدراسة مجموعة من حقول تربية الايقار في مناطق (الرمادي ، القائم ، هيت ، العامةرية ، الفلوجة) التابعة الى محافظة الانبار واستمرت الدراسة ثمانية أشهر (منذ بداية اذار 2012 الى نهاية تشرين الاول

6. De la Fuente J.; Estrada-Pena A.; Venzal JM.; Kocan KM.; and Sonenshine DE (2008). Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in and animals. Front. Biosci. 13:6938–6946.
7. Marquardt WC.; Demuree RS. and Grieve RB. (2000). Parasitology and vector biology . 2nd, ed. Academic press. Attarcount science and technology. Cop. San diego. Cali. USA. 9:2101-4495.
8. Mohammad M.K. and Suhad YJ. (2011). Distribution of hard tick species among sheep OV is A Ries L. in Al- Anbar province , western desert of Iraq. Bull. Ir a q n a t. Hist. Mus . 11 (4): 27-31.
9. الفهداوي ، سعاد شلال شحاذه (2013). مكافحة الحيوية للقرد الصلب *Rhipicephalus microplus canestrini* باستخدام الفطر *Beauveria bassiana* (Acarina: Ixodidae) مقارنة بالمبيد Chlorpyrifos على الإبقار. اطروحة دكتوراه - جامعة الأنبار
10. Walker AR. ; Bouattour A. ; Camicas JL. ; Estrada-pena A. ; Hrak IG. ; Latif AA. ; Pegram RG. and Preson PM.(2003). Ticks of domestic animals in Africa : A guide to identification of species . Atlanta, Houten , The Netherlands. P221.
11. Khalifa KA.(1978). Acquired immunity against ticks Assi. Vet. Med. J. 5(9-10):109-119.
12. Olwoch JM.; Scholtz CH. and Horak IG.(2007). Climate change and the genus *Rhipicephalus* Acari: (Ixodidae) in Africa. Onderstepoort J. Veter. Res. 74:45–72.
13. Walker JB.; Keirans JE. and Horak IG.(2000). The genus *Rhipicephalus* (Acari Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
14. Al-Khalifa MS.; Khalil GM. and Diab FM. (2007). A two-year study of ticks infesting camels in Al-Kharj in Saudi Arabia. Saudi J. Biol. Sci. 14(2): 211-220.

الصيف والشتاء أدى إلى اختفاء القراد لفترات تمتد أحياناً لعدة أشهر، فضلاً عن الاستخدام المفرط للمبيدات الكيميائية على مدار السنة وغالباً ما يكون الاستخدام بشكل عشوائي وغير علمي، كل ذلك أدى إلى صعوبة دراسة تواجد وانتشار الكثير من اللاقريات ومنها القراد.

إن العوامل المحددة لتوزيع وانتشار أنواع القراد المختلفة تعتمد بصورة رئيسة على الظروف البيئية المتوفرة في المنطقة والتي تؤثر بشكل مباشر على توفير المتطلبات الأساسية لاحتياجات القراد من أجل البقاء (12).

لقد تبين من خلال الدراسة أن الجنس *Rhipicephalus* يتوزع على جميع مناطق المحافظة وباعداد كبيرة جداً وهذا يشير إلى طبيعة هذا القراد وإمكانته في تحمل التباينات البيئية في معدلات الحرارة والرطوبة والتنافس من أجل البقاء وقد يكون الدرع الواقي الذي يحيط بالجسم وخاصة من الناحية الظهرية دوراً مهماً في الحفاظ على القراد من التغيرات البيئية والظروف الخارجية وتحمله لمدى واسع من درجات الحرارة، ومن الجدير بالذكر أن المناطق الغربية من المحافظة تتخفف فيها درجات الحرارة بشكل كبير في الشتاء عكس المناطق الشرقية من المحافظة إذ يكون الانخفاض أقل نسبياً.

إن الجنس *Rhipicephalus* يعد رابع أكبر جنس في عائلة Ixodidae وينظم تحته 74 نوع مسجل من القراد (13).

النوعان الآخران من القراد والعائدان إلى الجنس *Hyalomma* فكان انتشارهما أقل مقارنة مع النوعين العائدين للجنس *Rhipicephalus* فلم يسجل تواجدهما في المناطق الشرقية من المحافظة، بينما شوهدت بشكل واسع في المناطق الغربية ومترافقة مع الأنواع الأخرى، ولا يوجد في اعتقادي ما يمنع من انتشار هذا النوع من القراد في هذه المناطق لأن الظروف البيئية متقاربة جداً مع فارق في تباين درجات الحرارة بخاصة في فصل الشتاء إذ لا تتخفف درجات الحرارة في المناطق الشرقية من المحافظة مثل انخفاضها في المناطق الغربية واحتمال أن تتواجد هذه الأنواع على عوائل أخرى غير الإبقار.

وكان (14) قد أشار إلى أن الجنس *Hyalomma* ينتشر في قارتي أفريقيا وآسيا بما في ذلك الجزيرة العربية وتركيا وينقل العديد من أنواع الممرضات الحيوانية مثل داء الباييزيا *Babesia* وداء التيليرية *Theileria* الركتسيا *Rickettsia* وهذا يعني بأنه من المحتمل أن تكون هناك دراسات سابقة أظهرت حقيقة انتشار هذا الجنس في هذه المناطق ولكن لم تحدد تواجده في مناطق معينة.

من هنا يتبين لنا أهمية إنشاء مراكز متخصصة لتسجيل وتثبيت أنواع واعداد ومناطق انتشار وتوزيع القراد في محافظات العراق كافة ليتسنى متابعة هذه الافة التي تسبب خسائر جسيمة صحية واقتصادية وتوفير الاساليب اللازمة لتقليل اثارها والسيطرة عليها.

المصادر

1. Adam KM. ; Paul J. and Zaman V.(1971). Arthropoda vectors. Med. Vet. Protozol . an Illustrated Guide Churchill, Living stone . Edinburgh and London:144-161.
2. Larisa V.(2001). Tick biology, background information on the biology of ticks . Master Thesis. University of California, Davis. Pp. 1-4.
3. Service MW. (1984). A guide to medical entomology . J. Med. Ent. 15:351-358.
4. Petrova AD. and Zheltikova TM. (1993). Parasitic mites and ticks and allergy . Nauchnye . Doki. Vyss. Shkoly. Biol. Nauk. 1:25-49.
5. Barntt SF.(1969).The control of ticks on livestock. Food and agriculture organization of the United Natios , Roma, Italy.

تقييم فعالية مستخلصات رايزومات الزنجبيل في إزاحة الجذور الحرة المتولدة عن مادة DPPH

محمد موسى خليل، سندس حميد أحمد، عبد القادر هادي

وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

أظهرت نتائج الدراسة أن السيقان الجذرية للزنجبيل الطازج تحتوي على (80.9%) رطوبة و (2.3%) بروتين ، و (0.9 %) دهن ، وعلى ما يقارب (1.2 %) معادن ، و (2.4%) ألياف ، و (12.3 %) كاربوهيدرات ، وفيتامينات ومجموعات زيتية (Aryl Alkanes) وأهمها ، (Gengerol) الحاوي على (Gingenol) الذي يعزى إليه الطعم الحار. كما بينت النتائج أن القدرة في إزاحة الجذور الحرة 0.1 ملغم / مل كفاءة المستخلص في إزاحة الجذور الحرة هي 10.43% ، وفي التركيز 3 ملغم/مل للمستخلص فكانت نسبة الإزاحة 61.31 % ، أما المستخلص الكحولي ولنفس التراكيز أعلاه وجد أن كفاءتها الإزاحية : 13.09 % للتركيز 0.1 ملغم/مل من المستخلص الكحولي، وعند الجرعة 3 ملغم/مل من المستخلص الكحولي هي 91.07 % ، حيث يؤشر تفوق المستخلص الكحولي على المستخلص المائي بعمله الأكثر فعالية في إزاحة الجذور الحرة .

الكلمات المفتاحية: السيقان الجذرية، الجذور الحرة، رايزومات الزنجبيل، DPPH.

Evaluation of the effectiveness of ginger extracts rhizomes as scavengers for free radicals generated from DPPH

Mohammed M. Khalil, Sundus H. Ahmed and Abdul Kadir Hadi

Ministry of Sciences and Technology / Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The results of the studying ginger root contain (80.9%) Moist, (2.3%) Protein, (0.9%) lipids, approximately (1.2%) Minerals, (2.4%) fibers, (12.3%) of carbohydrates, contain vitamins and thus addition ginger is groups known as (Aryl Alkanes) important compounds of this group are (Gengerol) that contain (Gingenol) attributable to the hot taste of ginger.

Extracts ability removing free radicals:

0.1 mg / ml was efficient Abstract in removing free radicals are 10.43%, concentration On 3 mg / ml of the extract was displacement ratio is 61.31%, while in the same alcoholic extract concentrations above found that the efficiency of removal of free radicals are: 13.09% of the concentration of 0.1 mg / ml of alcoholic extract, and when the dose 3 mg / ml of alcoholic extract is 91.07%, this indicates to superiority of alcoholic extract on the water extract of its most effective in removing free radicals.

المقدمة

$$\text{Protein \%} = \text{N}_2\% * 6.25$$

إذ إن 6.25 العامل الثابت (11).

الرماد

تم اخذ النموذج المتبقي من نبات الزنجبيل بعد استخراج نسبة الألياف منه، حيث وضع النموذج في فرن الترميد وبدرجة حرارة 550 °م إلى حين تحول النموذج إلى رماد ، ويكون لونه رمادي فاتح .

تحضير المستخلص الكحولي

غسلت السيقان الجذرية لإزالة الأتربة منها ومن ثم جففت من الماء ، بعدها تم سحق السيقان الجذرية وهيئت للاستخلاص بواسطة جهاز الاستخلاص المستمر (Sohcxlante) باستخدام كحول الأيثانول وبتركيز 70% ، حيث تم بعد ذلك ترشيح المستخلص الناتج باستخدام ورق الترشيح وجفف بدرجة حرارة الغرفة.

اختبار أشباه القلويدات

تم اخذ (5) غرامات من مستخلص الزنجبيل ومزجت بـ (5) مل لـ 1 % من حامض الهيدروكلوريك المائي 1% على حمام بخاري. اخذ (1) مل من الراشح وأضيف له بضعة قطرات من كاشف (Dragendorff)، إن تكون المعركة ذات اللون الأزرق المسود دليل على وجود أشباه القلويدات.

اختبار الكشف عن السابونينات

أخذت (5) غرامات من المستخلص ورجت بالماء المقطر في أنبوبة اختبار. حيث لوحظ ظهور التدهن والازيد المستمر والذي تم أخذه كدليل تمهيدي على وجود السابونينات.

اختبار الكشف عن التانين

علقت (5) غرامات من المستخلص بـ (100) مل من الماء المقطر ورشح المعلق ثم أضيف كاشف الكلوريد الحديدي للراشح، و ظهور اللون الأخضر المزرق أو الأزرق المسود يدل على وجود التانين.

اختبار الفلويوتانينات

تم غلي المستخلص المائي في حمام الهيدروكلوريك 1 % حيث تشكل راسب احمر اللون والذي دل على وجود الفلويوتانينات.

اختبار الفلافونويدات

تم أخذ (5) مل من محلول الامونيا المخفف وأضيف إلى الراشح المائي من عينات الاختبار واتبع بإضافة حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 . حيث لوحظ ظهور اللون الاصفر، وهذا أثر الى وجود الفلافونويد flavonoid .

اختبار الجلايكوسيدات القلبية (اختبار keller killiani)

تم اخذ 5 غم من المستخلص ، وذوبت في حامض الخليك الثلجي المحتوي على محلول راسب كلوريد الحديد. الذي كان محفوظاً بتركيز 1 مل من حامض الكبريتيك . حيث نستج ظهور طبقة سمراء بشكل الوصلة والتي تشير إلى خاصية الديوكسي سكر للـ cardenolides .

إن المستخلصات والأدوية الطبيعية من النباتات الطبية كانت بمثابة مصادر ثمينة لاكتشاف المسكنات ضد مرض السرطان (1)، وقد تم فحص برنامج وضع من قبل (2) والذي كشف الكثير من المستخلصات النباتية التي تمتلك تأثيرات مضادة على مختلف الكائنات ، (الفيروسية والفطرية والبكتيرية والطفيلية) (3). ولما كان الاهتمام العلمي بالنباتات والأعشاب الطبية يأخذ مساحة قيمة في الوسط الطبي ، ولما للنباتات الطبية من فوائد كثيرة ومتعددة الأوجه تم اختيار جذور نبات الزنجبيل (Zingiber officinale) والمتوفر محلياً بأشكال مختلفة ، والنباتات في هذا الجنس غنية بالزيوت العطرية (Volatile Oils) ومستعملة كمصادر للمواد الغذائية، وتوابل وأدوية تقليدية (4)، وبعض أنواعه تظهر إمكانية العمل كمضادات للأكسدة (Antioxidant) ومضادات بكتيرية (Antimicrobial) (5-7)، أما الاستخدام الطبي فقد استعمل ابتداءً من المساعدة في اكمال عملية الهضم تصاعداً إلى اضطرابات النزف والعديد من الأمراض (8).

أهداف الدراسة:

1. تحضير مستخلصات مائية وكحولية لنبات الزنجبيل.
2. دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الزنجبيل على منع أكسدة الدهون غير المشبعة في كبد ودمغ الفئران.
3. دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الزنجبيل في إزاحة الجذور الحرة.

المواد وطرق العمل

جمع العينات النباتية

تم الحصول على عينات الساق الجذري للزنجبيل المجفف من مركز الأعشاب الطبية خلال شهر آذار، حيث تم تنظيف العينة من الأتربة وإزالة المواد العالقة ، وطحنت باستخدام الطاحونة اليدوية (الهاون) ، ثم أخذت العينة لطحنها مرة أخرى بالطاحونة الكهربائية لتحويلها إلى مسحوق ، وعبئت في أكياس نايلون معمة وتم حفظها في الثلاجة في درجة حرارة (4 °م) حتى إجراء الاستخلاص لها.

الاستخلاص

لتحضير المستخلص المائي الحار الخام لمسحوق سيقان الزنجبيل الجذرية اتبعت طريقة Zhang-mu وآخرون (9).

كواشف التحاليل الكيميائية للمكونات الأساسية

تم قياس النسب المئوية للمكونات الكيميائية للدهون Lipids والبروتين Protein والألياف Fibers والرماد Ash في نماذج الزنجبيل وحسب الطرائق المعتمدة في A.O.A.C (10).

وتم حساب البروتين وفقاً للمعادلة التالية:

$$\text{N}_2\% = (\text{V}_1 - \text{V}_2) * \text{N} \backslash \text{W}(\text{mg})$$

حيث :

- %N = النسبة المئوية للنيتروجين
- V1 = كمية HCL (مل) المعادلة للنموذج عند التسحيح .
- V2 = كمية HCL (مل) المعادلة للبلانك عند التسحيح
- W = وزن النموذج بالمليغرام
- N = عيارية HCL

اختبار الستيريديتات

الأكسدة الكلية للدهون والتفاعل العكسي لحامض الثايوباربيتيورك في دماغ وكبد الفئران

نقذت تجربة أكسدة الدهون الكلية باستخدام الطريقة المعدلة Ohkawa-H وآخرون (16).

النتائج والمناقشة

دراسة المكونات الأساسية

يتميز من الجدول رقم (1) نسب المكونات الأساسية لمطحون سيقان الزنجبيل، ويبين الجدول نتائج الكشوفات الكيميائية للمكونات الأساسية لمطحون السيقان الجذرية (الرايزومات) للزنجبيل ، إذ وجد بأنه يحتوي على الدهون (Lipids) بنسبة 0.8% والبروتين (Protein) بنسبة 2.1% كما ويحتوي على الألياف (Fibers) بنسبة 2.2% بالإضافة إلى الرماد (Ash) بنسبة 0.5% .

جدول رقم (1): المكونات الأساسية لمطحون سيقان الزنجبيل

المادة	نسبتها في السيقان الجذرية
الدهون	0.8 %
البروتين	2.1 %
الألياف	2.2 %
الرماد	0.5 %

دراسة محتوى المستخلص (الكحولي والمائي) للمكونات الكيميائية الثانوية

بينت نتائج دراسة المستخلص الكحولي للسيقان الجذرية في الزنجبيل بعد تحليل المكونات الكيميائية الثانوية للنبات احتواءها على المكونات التي هي قلويات (Alkaloids) ، تانين (Tanins) ، فلافونيدات (Flavonoids) ، مركبات مثبطة ، تيريبيويدات (terpenoids) ، جلايكوسيدات (glycosides) ، سابونينات (saponins) ، كما أن هذه المكونات موجودة بنسب مختلفة متفاوتة عند نتائج دراسة المستخلص المائي الحار وهذا يوضح الجدول رقم (2) ، وهذه الفحوصات جاءت مطابقة لـ منظمة الصحة العالمية (WHO) (17).

جدول رقم (2): المكونات الكيميائية في المستخلص الكحولي والمائي للزنجبيل

المكونات الكيميائية	المستخلص المائي للزنجبيل	المستخلص الكحولي للزنجبيل
ألكالويدات	++	+++
تانين	++	+++
جليكوسيدات	+++	+++
سابونينات	++	++
ستيرويدات	-	-
فلافونيدات	++	+++
تيريبيويدات	++	+++
قلوياتانينات	++	+++

علامة (+) تشير إلى الفحص الموجب وتكرارها دليل ارتفاع نسبة وجودها وعلامة (-) تشير إلى الفحص السالب

أخذ (2) مل من الخل اللامائي (Acetic anhydride) وتمت اضافته إلى 0.5 غم من المستخلص و (2) مل من حامض الكبريتيك (Sulphuric acid) ، الذي أضيف بشكل جانبي لأنبوبة الاختبار وقد لوحظ تغير اللون من البنفسجي إلى الأخضر المزرق دليل على وجود الستيريديتات .

فحص التيريبينويدات (اختبار Salkowski)

تم أخذ (0,5) غرام من المستخلص ، وأضيف إليه (2) مل من الكلوروفورم ، و (3) مل من حامض الكبريتيك المركز وبغاية تامة ، حيث تشكلت طبقة سمراء محمرة إشارة إلى وجود terpenoid .

التحليل الكمي للمكونات الكيميائية الثانوية والموجودة في المستخلص الخام لنبات الزنجبيل *Zingiber officinale* (Ginger roots)

تحضير الزيت: الزيوت الضرورية لنبات الزنجبيل استخلصت بطريقة التقطير المائي (hydro distillation) ، حسب طريقة Krittika-N وآخرون (12) ، بعد غسل السيقان الجذرية للزنجبيل ثم سحقها ثم قطرت مائيا في جهاز (Clevenger) ، ثم جمع الزيت وجفف فوق كبريتات الصوديوم اللامائية، وأخذت عينة الزيت وحفظت في القوارير المعتمة في درجة (4 ° م) قبل التحليل .

الخواص الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية: عملت هذه الفحوصات تبعا إلى الطريقة الموصوفة من قبل A.O.A.C (13) ، وكانت الخواص المفحوصة هي كل من حجم الصبونة (saponification value) (g/mg KOH) ، وحجم البيروكسيد (mg/kg) حجم الحديد (g/g) والنسب المئوية للأحماض الدهنية والنسب المئوية للمحتويات الممتزجة واللون وحجم الحامض (mg/mg OH) ، اما الكثافة النوعية ومعامل الانكسار (Refractive index) في درجة (25) سيليزي وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Pearson-D وآخرون (14).

فعالية المستخلصات النباتية في إزاحة الجذور الحرة

قيست فعالية المستخلصات النباتية في إزاحة الجذور الحرة وحسب الطريقة الموصوفة في Uirsini-F وآخرون (15).

فحص أكسدة الدهون غير المشبعة

تم تخدير الحيوانات بالإيثر، وقتلت بفصل الرأس (decapitation) من ثم تمت إزالة الدماغ والكبد بوجود الثلج ، ووزن (1) غم من نسيج الكبد والدماغ كل على حده، وتمت المجانسة لمدة 10 دقائق في 10 احجام من الماء المملح البارد ، ثم رسب باستخدام الطرد المركزي بسرعة (4000 rpm) في درجة (4 م) ولمدة 10 دقائق ثم استعمل الراسب في تجربة (TBARS).

دراسة قدرة إزاحة الجذور الحرة

نتائج قابلية المستخلص المائي والكحولي للسيفان الجذرية للزنجبيل على إزاحة الجذور الحرة

يبين الشكل رقم (1) قابلية المستخلص المائي للزنجبيل في إزاحة الجذور الحرة إذ وجد أنه عند التراكيز التالية : 0.1، 0.2، 0.5، 1.5، 2، 3 ملغم / مل كانت كفاءة المستخلص في إزاحة الجذور الحرة كالآتي:

10.43 ، 12.81 ، 20.33 ، 33.62 ، 49.09 ، 61.31 % ، أما في المستخلص الكحولي ولنفس التراكيز المذكورة أعلاه وجد أن كفاءة إزاحة الجذور الحرة هي :

13.09 ، 22.14 ، 49.56 ، 62.45 ، 75.18 ، 91.07 % وجد أنه بتزايد تراكيز المستخلص المائي والكحولي تزداد كفاءة إزاحة الجذور الحرة (شكل رقم 2). ويمكن أن يكون سبب مقدرتها في إزاحة الجذور الحرة هو احتوائها على المواد التي تعمل على كسح هذه الجذور وإزالتها مثل الفلويونات والتانينات ، حيث تحتوي درنات نبات السعد مثلاً على مركبات (Sesquiterpene) من الزيوت الأساسية وهذه تمتلك خاصية مضادة لأكسدة الجذور الحرة (2)، كما وجد أيضاً أن المستخلص الكحولي لرايزومات الزنجبيل هو أكثر كفاءة في إزاحة الجذور الحرة حيث وجد عند التركيز 0.1 ملغم/مل للمستخلص الكحولي كان 91.07 % بينما استخدام المستخلص المائي ونفس التركيز الكحولي كان 61.31 % وهذا يتفق مع نتائج دراسة (25)، من أن إعطاء المستخلص الكحولي (الايثانول) لدرنات نبات السعد للجرذان المصابة بالسكري المحدث عن طريق الألوكانس أعطى نتائج معنوية ككاسح لجذور DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

فعالية مستخلص نبات الزنجبيل في منع أكسدة الدهون غير المشبعة لكبد ودمغ الفئران

1. فعالية المستخلص المائي:

يبين كل من الشكل رقم (3) ، (4) فعالية المستخلص المائي في منع أكسدة الدهون غير المشبعة والمستحثة بكيريئات الحديدوز Fe^{+2} في كبد ودمغ الفئران .

وجد عند تراكيز المستخلص المائي المستخدمة في التجربة كالآتي :

0.1 ، 0.2 ، 0.5 ، 1.5 ، 2 ، 3 ملغم / مل كانت نتائج الامتصاصية على طول موجي 532 نانومتر كالآتي بالنسبة لكبد الجرذان 0.036 ، 0.074 ، 0.54 ، 0.204 ، 1.308 ، 1.752 على التوالي أما بالنسبة لدمغ الفئران ولنفس التراكيز أعلاه كانت الامتصاصية على طول موجي 532 نانومتر 0.091 ، 0.098 ، 0.105 ، 0.416 ، 0.485 ، 0.995 إذ وجد أن بتقليل تركيز المستخلص تزداد الامتصاصية أي أن فعالية المستخلص تجاه منع أكسدة الدهون غير المشبعة تزداد بانخفاض التركيز ، كما وجد أن تأثيرها في الكبد أكثر من الدماغ وذلك من المحتمل لكثرة الدهون غير المشبعة في الكبد ، ففي دراسة (26) تبين أن للمستخلص الكحولي لدرنات نبات السعد مقدرة على أكسدة الدهون Lipids Peroxidation بشكل فعال.

2. فعالية المستخلص الكحولي:

يبين كل من الشكل رقم (5)، (6) فعالية المستخلص الكحولي في منع أكسدة الدهون غير المشبعة والمستحثة بكيريئات الحديدوز Fe^{+2} في كبد ودمغ الفئران.

إن وجود الفلافونويدات (Flavonoides) في المستخلص الكحولي والمائي للسيفان الجذرية للزنجبيل ، والتي طالما اثبتت الدراسات العلمية فعاليتها البايولوجية والفيولوجية العالية عند إعطائها عن طريق الفم وتعمل عمل المواد المضادة للأكسدة (Antioxidants) وتوفير الحماية للنبات من الجذور الحرة للأكسجين (Free Oxygen) ، عن طريق التخلص منها وإزالتها (18، 19)، كما أن للمركبات الفينولية المتعددة وخاصة تلك المضادة لعملية الأكسدة القدرة على تثبيط نمو الخلايا السرطانية والحد من انتشارها ؛ وذلك لامتلاكها القابلية في كسح (Scavenger) الجذور الحرة المتولدة عند تحول الخلايا من الطبيعية إلى خلايا سرطانية (20).

إن احتواء المستخلص الكحولي والمائي للزنجبيل على التانينات (Tannins) والتي هي عبارة عن مركبات كحولية مرة يفسر مدى الزيادة في استهلاك الفئران المعاملة بالمستخلص بجرعة (1) مل للعلبة والماء ، وذلك لكونها المسبب في جفاف الفم وانقباض الأوعية الدموية (21).

إن التربينات (Terpenoids) الموجودة في أوراق نبات المعدوس مثلاً والتي تمثل أحد مركباتها لها دور مؤثر يتمثل بالقدرة على تثبيط نمو خلايا سرطان المعدة من خلال قدرتها على خفض تصنيع الـ (DNA) ، وحث الخلايا على الموت المبرمج للخط الخلوي السرطاني (Leukemia cell HL-601) (22).

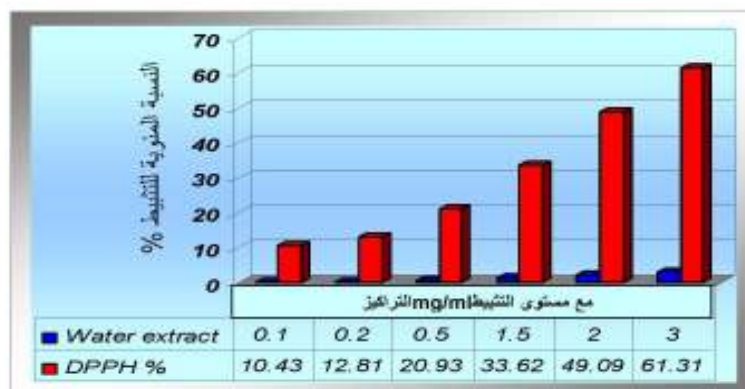
يحتوي المستخلص على الكلايكوسيدات التي هي عبارة عن مركبات كيميائية عضوية يعطي المستخلص القدرة المضادة للأمراض وهذا يطابق ما جاء في دراسة أجريت بعنوان "تقييم التأثيرات العلاجية لمركب الفايسين وعقار الالبندازول تجاه طفيلي الاكياس العذرية *Echinococcus granulosus* L. داخل وخارج الجسم الحي" إذ تعطي هذه المركبات عند تحليلها جزء سكري وجزء غير سكري غالباً ما يكون أستر أو ألدهيد أو فينول مثل الفايسين، وتمتاز هذه المركبات بفعاليتها تجاه الطفيليات ومنها طفيلي الاكياس العذرية ، والذي يعد من الأمراض ذات الانتشار العالمي ، إذ ينتشر في آسيا ، وأفريقيا ، وأوروبا ، وأمريكا الجنوبية، محدثاً مشاكل صحية ، وبيطرية ، واقتصادية ، كبيرة ومن الدراسات التي أجريت في هذا المجال دراسة بينت أن مركب الفايسين يشبه (Anaphthalene ، و Naphthoquinone) من حيث عملهما كعوامل مؤكسدة تؤثر على مواقع مستهدفة في خلايا الكائنات حقيقية النواة مما قد يؤكد تأثيره على الاكياس العذرية (23).

دراسة الخواص الفيزيوكيميائية للزيت الاساسي

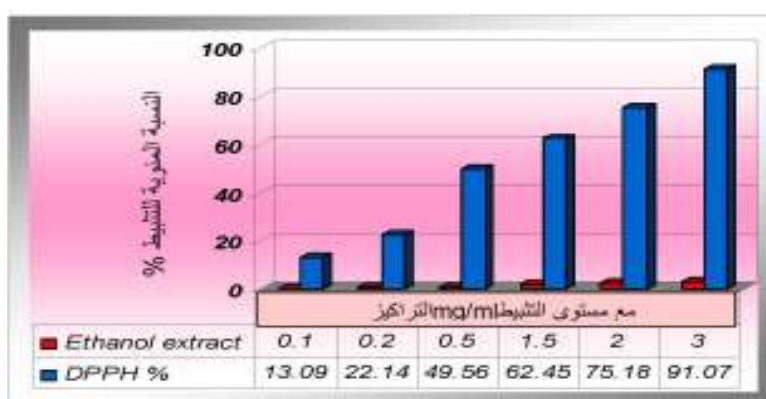
أشارت النتائج التي أجريت لمعرفة المميزات والخواص الطبيعية والكيميائية للزيت الاساسي لسيفان الجذرية إلى مطابقتها مع نتائج دراسة (14)، جدول رقم (3).

جدول رقم (3): الخواص الفيزيوكيميائية للزيت الاساس لسيفان الجذرية للزنجبيل

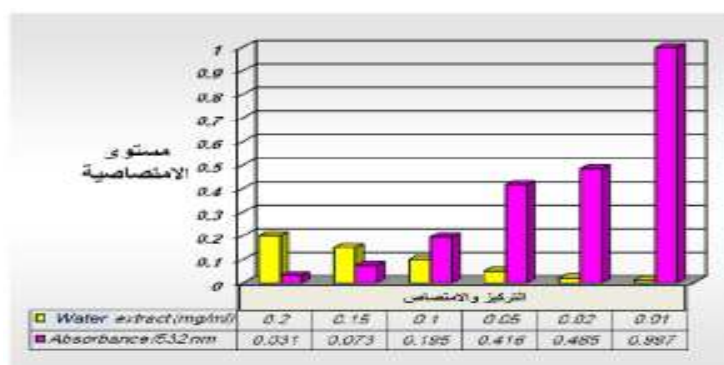
الخواص الفيزيوكيميائية	وصفها وتواجدها في زيت الزنجبيل
الحالة في درجة حرارة الغرفة	سائلة
اللون	أصفر بني
محتوى الرطوبة	3.9
الاجاذبية الخاصة	0.793
قيمة الحمض	2.7
قيمة البيروكسيد	2.32
نسبة الاحماض الدهنية الحرة	1.32%
قيمة الصونية	187.56
معامل الانكسار	1.564



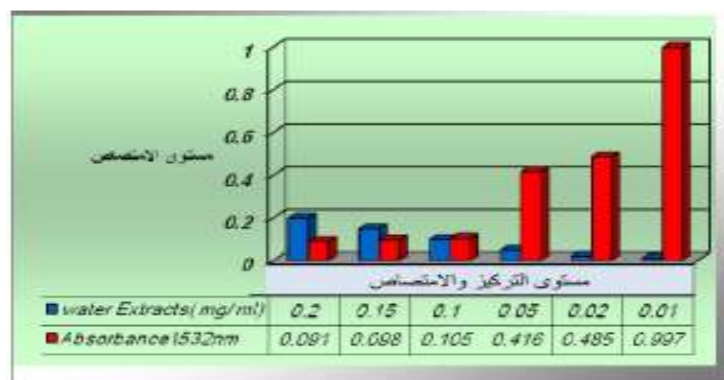
شكل رقم (1): قابلية المستخلص المائي في إزالة الجذور الحرة (DPPH)



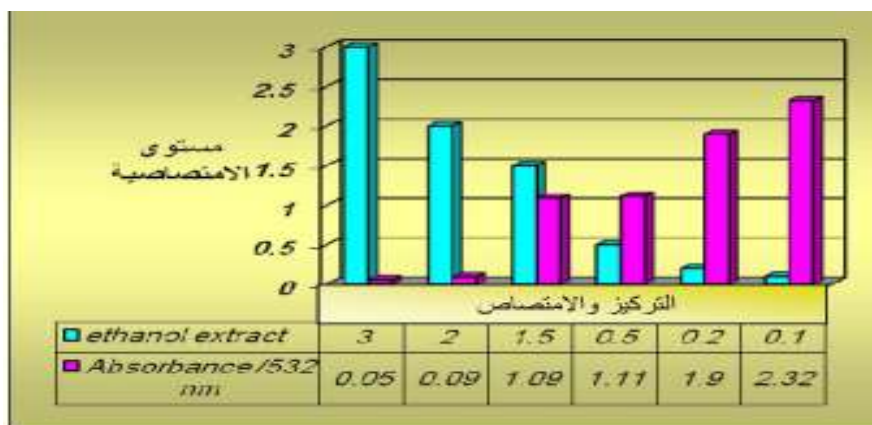
شكل رقم (2): قابلية المستخلص الكحولي لإزالة الجذور الحرة (DPPH)



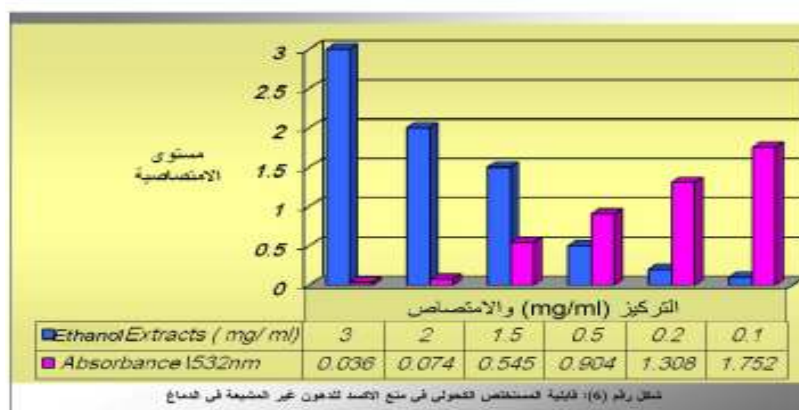
شكل رقم (3): قابلية المستخلص المائي في منع تصدع اللون غير المشبعة في قهوة



شكل رقم (4): قابلية المستخلص المائي في منع اكسدة اللون غير المشبعة في دماغ



شكل رقم (5): قابلية المستخلص الشعوي للزنجبيل في منع التأكسدة في اللحم



شكل رقم (6): قابلية المستخلص الشعوي في منع التأكسدة للدهون غير المشبعة في اللحم

المصادر

7. Ficker CE.; Smith ML.; Susiarti S.; Leaman DJ.; Irawati C. and Arnason JT. (2003). Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). J. Ethnopharmacol. 85: 289-293.
8. Duke JA. and Ayensu ES.(1984). Medicinal Plants of China. Algonac, Michigan, Reference Publications. Inc.pp.4-20.
9. Zhang-mu M.; Sakai X.; Osei T.; Safo H.; Nasasoi H.; Safo M.; Mizuno M.; Ono K. and Nakeneg H. (1990). Autimutogenic activity by the medicinal plant in traditional chines medicines. Shoya Kuhak Zasshi .44:225-229.
10. Association of official Chemists (AOAC). (1984). Official Method of Analysis. 14th ed. Washington D.C., U.S.A.
11. A.O.A.C. (1970). Official Method of Analysis 11th ed. Washington,D.C. Association of the Official Analytical Chemistry. P. 101.
12. Krittika N.; Natta L. and Orapin K. (2007). Antibacterial Effect. Molec. 12(8):2047-2060.
13. A.O.A.C. (1990). the edition published by A.O.A.C.Po.Boc, 540,Ben Jamin Frank station, wasting bon DC. Zoonn.
1. Schwartzmann G.; Ratain MJ.; Cragg GM.; Wong JE.; Saijo N.; Parkinson DR.; Fujiwara Y.; Pazdur R.; Newman DJ.; Dagher R. and Di-Leone L. (2002). Anticancer drug discovery and development throughout the world. J. Clin. Oncol. 20: 47S-59S.
2. Nassr-Allah A.; Amr A.; Ahmed MA.; Khalid MA.; David AL.; Alan C. and Hany A. (2009). Anti-cancer and anti-oxidant activity of some Egyptian medicinal plants. J. Med. Plants Res. 3(10): 799-808.
3. Jang M.; Cai L.; Udeani GO.;Slowing KV. and Thomas CF. (1997). Cancer activity of resveratrol. Nat. Prod. 275 (5297): 218-220.
4. Braun L. and Cohen M.(2005). Herbs and Natural Supplements: An Evidence-Based Guide, Elsevier Science, Melbourne ,Australian Publishing Awards.
5. Habsah M.; Amran M.; Mackeen MM.; Lajis NH.; Kikuzaki H.; Nakatani N.; Rahman AA. and Ali A.M. (2000). Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. J. Ethnopharmacol. 72:403-410.
6. Jitoe A.; Masuda T. and Mabry TJ. (1994). NovelAntioxidants, Cassumunarin A, B and C, for Zingiber cassumunar. Tet. Lett., 35(7): 981-984.

14. Pearson D. (1976). Chemical analysis of foods 7th eds, Church-Hill, Living Stone, London.
15. Uirsini F.; Maiorino M.; Morazzoni K.; Roveri A. and Pifferi G.(1994). A novel antioxidant (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular . Free Rad. Biol. Med. 16:547-553.
16. Ohkawa H.; Ohishi N. and Yagi K.(1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95:351-358.
17. World Health Organization (WHO).(1998).Quality control methods for medicinal plant materials .Regional Office for the Western Pacific .Manila.
- 18.Nakayama T.;Hor K.;Terazawa A. and Kawakish S.(2002). Comparision of the cyto-toxicity of different hydroperoxides to cell. Free Rad. Res. 14:173-178.
19. Nakayama T.; Hiramitsu M.; Osama T. and Kawakish S. (1993). The protective role of Gallic acid esters in bacterial cytotoxicity and SOS responses induced by hydrogen peroxide. Mutate. Res. 303:29-34.
20. Forkmann G. and Martens S.(2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr Opin Biotechnol.12:155-160.
21. McGee H. (2004). On food and cooking: the science and lore of the kitchen. New York: 2Edi Scribner.
22. عبد الوهاب، أفنان اسماعيل (2010). تأثير مستخلص الكحول الايثيلي الخام لبذور واوراق نبات المعدنوس *Petroselinum crispum* في الفئران البيض وفي بعض الخطوط الخلوية السرطانية. رسالة ماجستير ، الجامعة التكنولوجية ، بغداد ، ص 53 ، 95-96 .
23. المياح، صبيح هليل جاب (2010). تقييم التأثيرات العلاجية لمركب الفايسين وعقار الاليندازول تجاه طفيلي الاكياس العذرية *Echinococcus granulosus* L. داخل وخارج الجسم الحي دراسة مقدمة من جامعة البصرة ، مجلة أبحاث البصرة (العلميات) العدد 36 ، الجزء 6 ، B 15.
24. Seo WG.; Pae HO.;Oh GS.; Chai KY.; Kwon TO. and Yun YGJ(2001). Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine. Macroph. cell line.76:59.
25. Raut NA. and Gaikwad NJ.(2006). Antidiabetic activity of hydro-ethanolic extract of *cyperus rotundus* in alloxan induced diabetes in rats. Fitoterapia. 77:585-589.
26. Soumaya K.; Ledauphin J.; Bouhlel I.; Sghaier MB.; Boubaker J.; Skandrani I.; Mosrati R.; Ghedira K.; Barillier D. and Ghedira LC. (2008). Comparative study of *cyperus rotundus* essential oil by a modified GC/MS analysis method. Evaluation of its antioxidant, cytotoxic, and apoptotic effects. Chem. Biodiv. 5:729.

تلوث المياه المعبأة بالفطريات وتحديد علاقتها بالاستعمال المتكرر للعبوات البلاستيكية

أمير خضير عباس ، إيمان عباس خلف ، عصام شاكر حمزة ، سلمان عبود حمود ، فرقد فرحان عبد الحميد ، سارة خطاب إسماعيل

وزارة العلوم والتكنولوجيا/ بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

لقد شغل تواجد الفطريات في المياه المعبأة اهتمام الباحثين والدارسين خلال العقود الأخيرة بعد أن تبين تسبب الفطريات في تلوث مياه الشرب. تهدف الدراسة الحالية إلى تعيين تلوث المياه المعبأة والسطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية بالفطريات وتحديد علاقتها بالاستعمال المتكرر للعبوات

تم إجراء الدراسة على 45 منتج من المياه المعبأة سعة 20 لتر المنتجة محليا حيث سحبت بصورة عشوائية من الأسواق المحلية لمدينة بغداد واستعملت طريقة الترشيح بالأغشية وأخذ المسحات الطبية في تعيين الفطريات في المياه المعبأة والعبوات البلاستيكية. بينت النتائج احتواء 42 منتج من مجموع 45 ونسبة 93.3% من المياه المعبأة على الفطريات.

(*Aspergillus niger* , *Aspergillus ochraceus* , *Aspergillus terreus* , *Aspergillus parasiticus* , *Penicillium aurantiogriseum* , *Penicillium nalgiovense* , *Penicillium italicum* , *Penicillium expansum* , *Penicillium glabrum* , *Byssoschlamys nivea* , *Alternaria alternata* , *Fusarium verticillioides* , *Rhodotorula* spp , *Yeast* , *Chladosporium cladosporioides* , *Bipolaris* spp , *Trichoderma* spp , *Emericella* spp , *Rhizopus* spp , *Neosartorya fischeri*).

في حين أظهرت ان 33 من مجموع 45 من العبوات البلاستيكية ونسبة 73.3% تحتوي على نوع أو أكثر من الفطريات التي تم تعيينها في المياه .

وقد أوصى الباحثون بضرورة إعادة النظر بالمواصفة القياسية العراقية لمياه الشرب المعبأة لتتضمن الإشارة إلى حدود أعداد الفطريات كأحد مسببات المرضية المنقولة عن طريق مياه الشرب المعبأة .

الكلمات المفتاحية: المياه المعبأة ، الفطريات ، العبوات البلاستيكية

Fungal contamination of bottled water and its relationship to the frequent use of plastic bottles

Amir Kh. Abbas, Eman A. Khalaf, Isam Sh. Hamza, Salman A. Hammood, Farked F. Abdul Hameed, and Sarah Kh. Ismail

Ministry of Sciences and Technology / Baghdad/ Republic of Iraq

ABSTRACT

Fungal contamination in bottled water had received great attention in recent decades after it was found that it is a cause of drinking water. The current study aims to determine pollution of bottled water and interior surfaces of the plastic containers by fungi and describe its relationship to the reuse of the containers.

The study was conducted on 45 locally produced bottled water capacity of 20 liters collected randomly from local markets of Baghdad capital city.

Membrane filtration technique and medical swabs used in the appointment of fungi in bottled water and plastic containers.

The results showed 42 of the total 45 (93.3 %) of the bottled water contain fungi (*Aspergillus niger* , *Aspergillus ochraceus* , *Aspergillus terreus* , *Aspergillus parasiticus* , *Penicillium aurantiogriseum* , *Penicillium nalgiovense* , *Penicillium italicum* , *Penicillium expansum* , *Penicillium glabrum* , *Byssoschlamys nivea* , *Alternaria alternata* , *Fusarium verticillioides* , *Rhodotorula* spp , *Yeast* , *Chladosporium cladosporioides* , *Bipolaris* spp , *Trichoderma* spp , *Emericella* spp , *Rhizopus* spp , *Neosartorya fischeri*).

While 33 of the total 45 (73.3%) of the plastic containers showed to contain one or more types of fungi that have been found in the water.

We recommend reconsider to Iraqi standard specification of bottled drinking water to include a reference to the limits of the fungi as one of the pathogens transmitted by drinking bottled water.

المقدمة

الكشف عن الفطريات في المياه:

تم التحري عن الفطريات في المياه المعبأة بحسب (12) باستخدام تقنية الترشيح بالأغشية (Membrane filtration technique) وذلك بترشيح 100 مليلتر من المياه لكل منتج من خلال أغشية الترشيح Sartorius Stedim-Cellulose Nitrate Filterpore (Size 0.45 μm) وقد تم تخفيف المنتجات الملوثة 1:100 بعدها نقل غشاء الترشيح على سطح الوسط الزراعي Sabouraud (Himedia, India), Dextrose Agar-SDA مضاف اليه المضاد الحيوي Chloroamphenicol بتركيز 100 mg/L حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م وفحصت يومياً لمدة اسبوع وتم إعادة زرع المستعمرات الفطرية على وسط SDA للحصول على مستعمرات منفردة ونقية لغرض التشخيص .

التحري عن الفطريات على السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية:

تم اخذ مسحات للعبوات البلاستيكية بعد تفرغها من المياه تحت ظروف معقمة بواسطة مسحات (Sterile Swabs) نقلت المسحات على سطح الوسط الزراعي SDA وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م وتم ملاحظتها يومياً لمدة اسبوع بحسب (13) وتم إعادة زرع المستعمرات الفطرية على وسط الـ SDA للحصول على مستعمرات منفردة ونقية لغرض التشخيص .

النتائج والمناقشة

بينت نتائج فحوصات المياه المعبأة في العبوات البلاستيكية سعة (20) لتر احتواء (42) منتج من مجموع (45) على الفطريات وابعاد تراوحت بين 3-390 مستعمرة / 100 مليلتر جدول (1) وظهر (30) منتج معياراً من الفطريات يفوق الحدود المسموح بها بالمواصفات القياسية العالمية لمياه الشرب والبالغة 100 مستعمرة / 100 مليلتر (7) ان تواجدها الفطريات في مياه الشرب المعبأة يتسبب في احداث مشاكل حسية (Sensory problems) والمتمثلة بتغير في اللون وطعم ورائحة المياه اذ غالباً مايرتبط تغير طعم ورائحة المياه المعبأة بتواجد الفطريات نتيجة افراز الصبغات وبعض المركبات مثل مادة Geosmin التي تكسب المياه رائحة التربة (8).

تم عزل عشرين نوعاً من الفطريات من منتجات المياه المعبأة كما يوضح شكل رقم (1) وهي :

(*Aspergillus niger* , *Aspergillus ochraceus* , *Aspergillus terreus* , *Aspergillus parasiticus* , *Penicillium aurantiogriseum* , *Penicillium nalgiovense* , *Penicillium italicum* , *Penicillium expansum* , *Penicillium glabrum* , *Byssoschlamys nivea* , *Alternaria alternata* , *Fusarium verticillioides* , *Rhodotorula* spp , *Yeast* , *Cladosporium cladosporioides* , *Bipolaris* spp , *Trichoderma* spp , *Emericella* spp , *Rhizopus* spp , *Neosartorya fischeri*).

تتواجد الفطريات بصورة واسعة في الطبيعة اذ هنالك اكثر من سبعين الف نوع منها 300 نوع تتسبب في احداث الامراض للانسان واقل من 12 نوع تسبب حوالي 90% من الاصابات الفطرية (1).

ان تواجدها الفطريات في البيئة المائية لم ينل الاهتمام الواسع مقارنة بتواجد الفطريات في البيئات الاخرى (التربة والهواء) الا في السنين الاخيرة اذ ثبت وجود الفطريات في جميع انواع المياه (المياه الخام، المياه المعالجة، المياه المقطرة، المياه المفلترة النقية، مياه الشرب والمياه المعبأة) (2-5).

ان من اهم الاعتبارات التي تهتم المستهلك لمياه الشرب المعبأة هي مدى مطابقة هذه المياه للمواصفات القياسية لمياه الشرب وسلامتها من مسببات المرضية المتضمنة الانواع المختلفة من البكتيريا المرضية والطفيليات والفيروسات التي تتسبب في احداث امراض المعدة والامعاء (6) ولم يتم الاهتمام بالفطريات كأحد مسببات المرضية المنقولة عن طريق مياه الشرب المعبأة ويعزى ذلك الى ان مسببات المرضية الاخرى (البكتيريا والطفيليات والفيروسات) غالباً ما تؤدي الى اعراض مرضية حادة في حين ان تناول مياه الشرب الملوثة بالفطريات يؤدي الى اصابات مزمنة الا انه في العقدين الاخيرين ازداد الاهتمام بالفطريات الملوثة لمياه الشرب اذ ثبت ان الفطريات تتسبب في احداث اشكال مختلفة من الامراض التي تتضمن الحساسية او انتاج السموم الفطرية او احداث الاصابة المباشرة للمستهلك (7) وتسبب الفطريات ايضاً تغيرات غير مرغوبة في طعم ورائحة مياه الشرب مما يؤدي الى مشاكل حسية في المياه المعبأة المنتجة (8) وان تواجدها الفطريات على السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية يمكن ان يتسبب في تحطيم وتحلل المواد الكيميائية المعقدة المصنعة منها العبوات البلاستيكية نتيجة لقدرة الفطريات على انتاج العديد من الانزيمات مما تسبب مشاكل صحية (9).

يشكل نقص مياه الشرب المأمونة والوصول اليها تحدياً كبيراً في مناطق عديدة من العالم وهنالك اهتمام متزايد لسلامة وجودة مياه الشرب وتعد صناعة مياه الشرب المعبأة من اكثر قطاعات صناعة الاغذية والمشروبات ديناميكية بالرغم من التكلفة العالية بالمقارنة مع تكاليف خدمات مياه شبكة التوزيع وأصبحت المياه المعبأة توصف بأنها المشروب الاسرع نمواً في العالم (10).

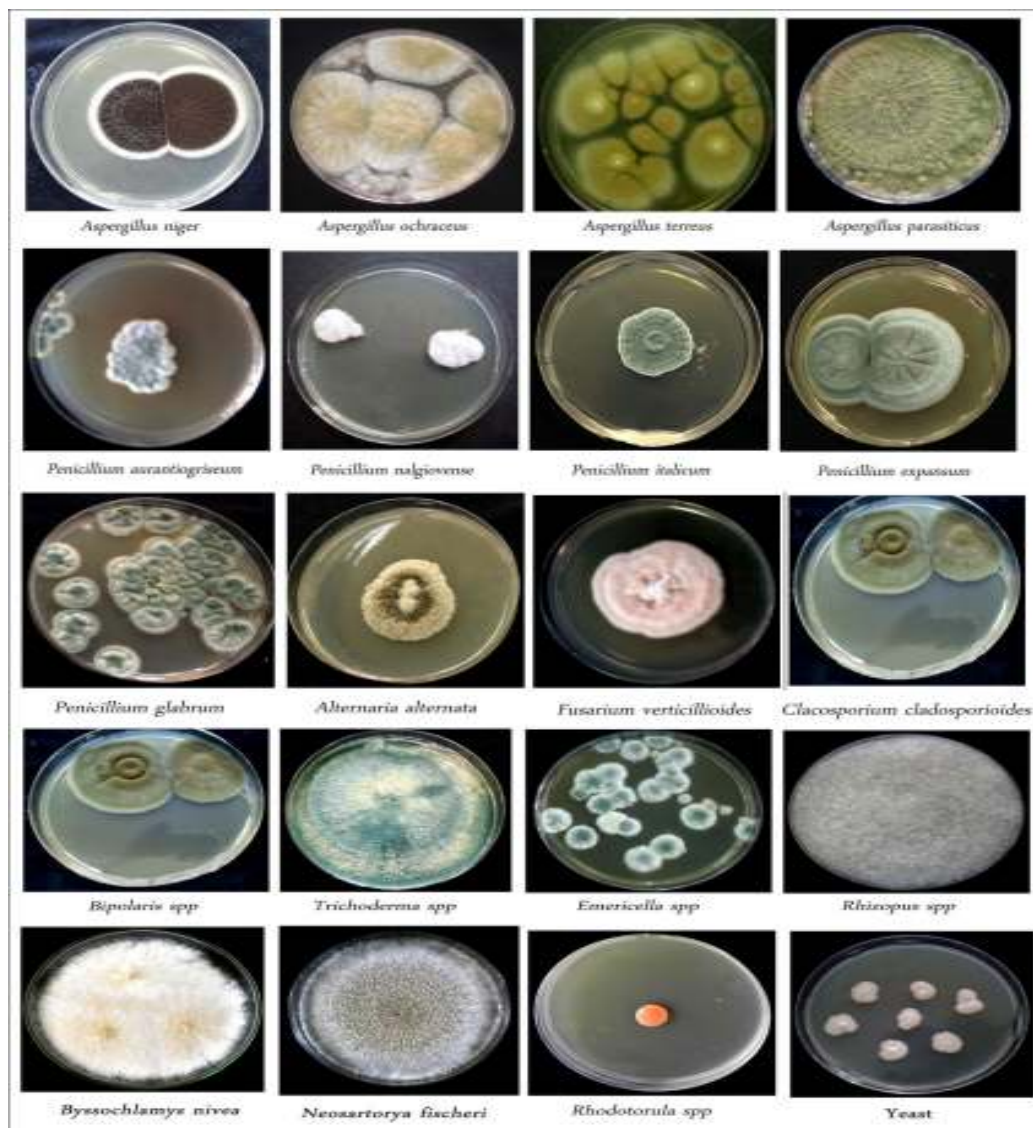
أما في العراق فتلقى صناعة مياه الشرب المعبأة رواجاً كبيراً وتحللت اعداد معاملها نسبة 54% من مجمل الصناعات الغذائية المختلفة بالعراق والمسجلة لدى المديرية العامة للتنمية الصناعية لتشهد بذلك هذه الصناعة انتشاراً واسعاً في ظل تزايد الطلب على المنتج لاسباب تتعلق بنوعية مياه الشرب وتوافرها وقد رافق هذه الزيادة الملحوظة في اعداد المعامل انخفاضاً حاداً في النوعية متمثلة بزيادة النسبة المئوية للفشل في تطبيق المتطلبات الصحية الواردة في المواصفة القياسية العراقية الخاصة بمياه الشرب المعبأة رقم 1937 في 2000 مما أدى الى اغراق السوق المحلية بالعديد من العلامات التجارية التي تفتقر الى المواصفات الصحية الخاصة (11).

ونظراً لافتقار المواصفة القياسية العراقية لمياه الشرب المعبأة الى أي اشارة الى تواجدها الفطريات واعادتها لذا يهدف البحث التحري عن انواع الفطريات المتواجدة في مياه الشرب المعبأة (سعة 20 لتر) وعلاقتها بأنواع الفطريات المتواجدة على السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية المتكررة الاستعمال.

المواد وطرق العمل

النمذجة :

تم التحري عن الفطريات في عبوات المياه البلاستيكية المتكررة الاستخدام سعة 20 لتر لـ (42) منتج محلي بالرمز (F1-F42) وثلاث منتجات من المياه المعبأة لعبوات بلاستيكية سعة 20 لتر ذات الاستخدام الواحد بالرمز (F43, F44, F45) سحبت بصورة عشوائية من الاسواق المحلية لمدينة بغداد للفترة من تشرين الاول 2013 ولغاية آذار 2014.



شكل رقم (1): الفطريات المعزولة من منتجات المياه المعبأة

تراكيز السموم وإن شرب كميات كبيرة من هذه المياه الملوثة وخاصة في فصل الصيف يؤدي إلى زيادة تراكيزها مما يشكل خطورة على صحة المستهلكين (17).
اظهرت نتائج فحوصات المسحات المأخوذة من نفس العبوات البلاستيكية بعد تغريبها من المياه احتواء 33 من مجموع 45 من العبوات البلاستيكية على الفطريات:

(Aspergillus niger , Aspergillus terreus , Penicillium italicum , Penicillium expansum , Byssoschlamys nivea , Alternaria alternata , Rhodotorula spp , Yeast, Cladosporium cladosporioides , Emericella spp , Rhizopus spp) .

وعند مقارنة أنواع الفطريات التي تم عزلها من المياه والمسحات المأخوذة من العبوات البلاستيكية اظهر (32) منتج من المياه المعبأة احتوائه على الاقل نوع واحد من نفس الفطريات التي ثبت وجودها في المسحات المأخوذة من العبوات البلاستيكية. جدول رقم (1).

ان العديد من هذه الفطريات هي مسببات مرضية انتهازية تؤدي إلى اصابات مزمنة ويمتاز المرض بتطوره البطيء ولكن في الأشخاص الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي يكون المرض حاداً إذ تتسبب هذه الفطريات في احداث امراض عديدة والمتمثلة بتسمم الأغذية المخاطية والجلد والأنسجة تحت الجلدية والتهاب القصبات والرئتين والربو والحساسية ويمكن ان يصاب القلب والجهاز العصبي (14).

ان تلوث المياه المعبأة بالفطريات ينال اهتماماً كبيراً في المستشفيات عند استهلاك المرضى المقيمين بها لهذه المياه وبصورة خاصة المرضى الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي الخاضعين للعلاج (15) واكثر المرضى عرضة للإصابة بالفطريات هم المرضى الذين يعانون من مشاكل تنفسية، مرضى السكري، مرضى الايدز، مرضى السرطان، المرضى الخاضعين للعلاج بمركبات Corticosteroids، المرضى الخاضعين لعمليات القلب الجراحية أو نقل الاعضاء (16) كما ان العديد من الفطريات التي تم عزلها من المياه المعبأة لها القابلية على انتاج السموم الفطرية وان تلوث هذه المياه بانواع مختلفة من الفطريات والتي لها القدرة على انتاج السموم الفطرية وبالرغم من وجود عامل التخفيف (Dilution factor) للسموم المنتجة الا ان خزن هذه المياه لفترة زمنية طويلة قبل استهلاكها يؤدي إلى زيادة

جدول (1): نتائج فحوصات الفطريات للمياه المعبأة والمسحات للعبوات البلاستيكية

ت	رمز المنتج	اعداد الفطريات في المياه مستعمرة/100 مليلتر	انواع الفطريات في المياه المعبأة	انواع الفطريات على السطوح الداخلية للعبوات
1	F1	120	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
2	F2	163	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
3	F3	300	<i>Penicillium nalgiovense</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
4	F4	220	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>
5	F5	280	<i>Alternaria alternata</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhodotorula spp.</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus niger</i>
6	F6	180	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Aspergillus niger</i>
7	F7	250	<i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	Negative
8	F8	300	<i>Penicillium italicum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	<i>Penicillium italicum</i> Yeast
9	F9	320	<i>Penicillium expansum</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> Yeast	<i>Alternaria alternata</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>
10	F10	210	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	Yeast
11	F11	140	<i>Rhodotorula spp.</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> Yeast	Yeast
12	F12	350	Yeast <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Bipolaris spp.</i>	Yeast
13	F13	70	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
14	F14	180	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>
15	F15	220	<i>Trichoderma spp.</i>	Negative
16	F16	90	<i>Aspergillus niger</i>	Negative
17	F17	Negative	Negative	Negative
18	F18	200	<i>Emericella spp.</i>	<i>Emericella spp.</i>
19	F19	Negative	Negative	<i>Aspergillus niger</i>
20	F20	240	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium italicum</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium italicum</i>
21	F21	320	<i>Aspergillus niger</i> <i>Emericella spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
22	F22	300	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
23	F23	340	<i>Aspergillus niger</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>
24	F24	200	<i>Rhizopus spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
25	F25	360	<i>Aspergillus niger</i> <i>Emericella spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
26	F26	40	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
27	F27	30	<i>Aspergillus niger</i> <i>Emericella spp.</i>	Negative
28	F28	390	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Neosartorya fischeri</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
29	F29	30	<i>Aspergillus niger</i>	Negative
30	F30	350	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium expansum</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium expansum</i>
31	F31	80	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhodotorula spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
32	F32	20	<i>Penicillium glabrum</i> <i>Alternaria alternate</i>	<i>Alternaria alternata</i>
33	F33	144	<i>Aspergillus niger</i> <i>Emericella spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	90	F34	34
Yeast	<i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	110	F35	35
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	160	F36	36
<i>Emericella spp.</i>	<i>Trichoderma spp.</i> <i>Emericella spp.</i>	220	F37	37
Negative	<i>Aspergillus niger</i>	70	F38	38
<i>Penicillium italicum</i>	<i>Penicillium italicum</i>	40	F39	39
Negative	<i>Trichoderma spp.</i>	75	F40	40
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	110	F41	41
Negative	<i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	140	F42	42
Negative	<i>Rhodotorula spp.</i> Yeast	3	F43	43
Negative	Negative	Negative	F44	44
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Rhodotorula spp.</i> Yeast <i>Alternaria alternata</i>	29	F45	45

مجموعة من المضادات الفطرية للقضاء على الفطريات المسببة للحالات المرضية (23).

تتصف الفطريات بمقاومتها لعمليات المعالجة وتعقيم المياه أذ تقاوم سبوراتها المواد الكيميائية المستعملة في عملية التبختر والكلور المستعمل في تعقيم المياه لذا يستخدم Ozone و Chlorinedioxide في القضاء على سبورات الفطريات (24) اما استخدام الاشعة فوق البنفسجية والتي تستعمل بنطاق واسع في تعقيم المياه المعبأة فأنها غير فعالة في القضاء على الفطريات المنتجة للصبغات مثل (*Aspergillus spp* , *Penicillium spp*) إذ تحمي الصبغات سبورات الفطريات من الاشعة فوق البنفسجية (25).

تفتقر المواصفة القياسية العراقية لمياه الشرب المعبأة الى أي اشارة الى الفطريات التي ثبت

وجودها وبنسب عالية في منتجات المياه المعبأة لذا يوصي الباحثون بإعادة النظر بالمواصفة القياسية العراقية لمياه الشرب المعبأة لتتضمن اشارتها الى الفطريات كأحد المسببات المرضية المنقولة عن طريق مياه الشرب المعبأة والأزام المعامل المنتجة للمياه المعبأة في حالة عدم توفر اجهزة تنظيف وتعقيم العبوات البلاستيكية بعدم استخدام العبوات ذات الحجم (20) لتر في الانتاج حيث تبين ان هذه العبوات تكون ملوثة بأنواع مختلفة من الفطريات بسبب تكرار استخدامها والتي يمكن ان تشكل خطورة على صحة المستهلكين وزيادة الرقابة الصحية من قبل الجهات المعنية على المعامل المنتجة للمياه المعبأة بعدم اطلاق اي وجبة انتاج إلا بعد تحديد صلاحيتها ومطابقتها للمواصفة القياسية العراقية لمياه الشرب المعبأة وحث المعامل المنتجة للمياه المعبأة على استعمال العبوات البلاستيكية ذات الاستعمال الواحد في الانتاج .

جدول رقم (2): عدد منتجات المياه المعبأة ومسحات السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية الموجبة لتواجد الفطريات

النوع	العدد المفحوص	الاعداد الموجبة	النسبة المئوية
المياه المعبأة	45	42	93.3
مسحات السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية	45	33	73.3
العلاقة بين نوع الفطريات في المياه المعبأة والعبوات البلاستيكية	42	32	76.1

بلغت النسبة المئوية لتواجد الفطريات في المياه المعبأة 93.3% في حين كانت النسبة المئوية لتواجد الفطريات على السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية 73.3% وبلغت نسبة العلاقة بين انواع الفطريات المتواجدة في المياه المعبأة والعبوات البلاستيكية 76.1% .جدول رقم (2). ان ارتفاع نسبة تواجدها الفطريات في المياه المعبأة يمكن ان يكون مصدر للعدوى بالفطريات المرضية والمنتجة للسموم الفطرية.

اما بخصوص منتجات المياه المعبأة بالعبوات البلاستيكية ذات الاستخدام الواحد (F43, F44, F45) اظهر المنتج بالرمز F43 احتوائه على ثلاث مستعمرات من (*Rhodotorula spp* , *Yeast*) وخلو العبوة البلاستيكية من الفطريات في حين اظهر المنتج بالرمز F44 خلوه والعبوة البلاستيكية من الفطريات والمنتج بالرمز F45 اظهر احتوائه على (29) مستعمرة من الفطريات (*Rhodotorula spp* , *Yeast*, *Alternaria alternata*) كما في جدول رقم (1). ان تواجدها الفطريات في هذه المنتجات يعود الى عدم نظافة العبوات البلاستيكية او تلوث معاملة الانتاج بهذه الفطريات لكن اعداد الفطريات كان ضمن الاعداد المسموح بها لتواجد الفطريات في مياه الشرب (7).

كثير من انواع الفطريات التي تم عزلها من المياه المعبأة والسطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية لها القدرة على تكوين الفلم الحيوي Biofilm (18) ومن بين اهم انواع الفطريات المكونة للفلم الحيوي والذي تم تعينه في المياه المعبأة والعبوات البلاستيكية عفن (*Aspergillus niger*) وهو من الاعفان الواسعة الانتشار في الطبيعة اذ يتواجد في التربة والهواء وينتج بتمحله للجفاف ودرجات الحرارة العالية وله القدرة على اصابة الانسان بامراض عديدة تعرف بـ *Aspergillosis* الذي يصيب الجهاز التنفسي مسبب اعراض تشبه الى حد كبير اعراض مرض التدرن الرئوي كما يصيب الأذن مسبب مرض *Otomycosis* وعند توفر الظروف الملائمة من رطوبة ودرجة حرارة مناسبة فإن هذا العفن له القابلية على افراز العديد من السموم مثل (*Nigragillin* , *Malformin*) (19) اضافة الى ذلك ان كتلة دائرية من *Hyphae* لهذا العفن ممكن ان تتكون ويطلق عليها بـ *Aspergilloma* تسبب مشاكل صحية في الجهاز التنفسي او الجهاز البولي (20).

ومن الفطريات الاخرى التي ثبت وجودها ولها القابلية على تكوين الفلم الحيوي (*Rhodotorula spp*) التي تسبب في احداث اعراض مرضية حادة وخاصة في الاشخاص الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي ومرضى السرطان والمرضى الذين يخضعون لعمليات القسطرة القلبية أذ تسبب في احداث *Fungemia* ومن ثم اصابة العيون *Eye infection* والتهاب البريتون *Peritonitis* والتهاب الدماغ *Meningitis* (21,22) تمتاز الفطريات المكونة للفلم الحيوي بمقاومتها للمضادات الفطرية لذا يتطلب في كثير من الاحيان الى استخدام جرعات عالية من

المصادر

16. Denning DW. (2006). Aspergillosis. Schering-Plough Corporation. Kenilworth, NJ.
17. Paterson RRM. (2006). Fungi and fungal toxins as weapons. Mycol. Res. 110: 1003-1010.
18. Siqueira VM. ; Oliveira HMB. ; Santos C. ; Paterson RRM. ; Gusmao NB. and Lima N. (2011). Filamentous Fungi in Drinking Water, Particularly in Relation to Biofilm Formation. Int. J. Environ. Res. Public Health. 8: 456-469.
19. Batra V. ; Asmar B. and Ang JY. (2006). Aspergillosis eMedicine D:/Medical Mycological/eMedicine- Aspergillosis Article by Vandana Batra, MD. Htm.
20. Lee SW. (2010). An aspergilloma mistaken for a pelviureteral stone on nonenhanced CT: a fungal bezoar causing ureteral obstruction. Korean J. Urol. 51: 216-218.
21. Unal A. ; Koc AN. ; Sipahioglu M. H. ; Kavuncuoğlu F. ; Tokgoz B. and Buldu HM. (2009). CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Perit Dial Int. 29: 581-582.
22. Tuon FF. and Costa SF. (2008). *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. Rev. Iberoam. Micol. 25: 135-140.
23. Mowat E. ; Butcher J. ; Lang S. ; Williams C. and Ramage G. (2007). Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. J. Med. Microbiol. 56: 1205-1212.
24. Kelley J. ; Kinsey G. ; Paterson R. and Brayford D. (2003). Identification and Control of Fungi in Distribution Systems. Awwa Research Foundation and American Water Works Association. Denver. CO.
25. Kanzler D. ; Buzina W. ; Paulitsch A. ; Haas D. ; Platzer S. ; Marth E. and Mascher F. (2007). Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. Mycoses 51: 165-169.
1. Yamaguchi MU. ; Rampazzo RCP. ; Ogatta YSF. ; Nakamura CV. ; Nakamura TU. and Filho BPD. (2007). Yeasts and Filamentous Fungi in Bottled Mineral Water and Tap Water from Municipal Supplies. Brazil. Arch. Biol. Technol. 50: 1-9.
2. Pereira VJ. ; Fernandes D. ; Carvalho G. ; Benoliel MJ. ; Romao MVS. and Crespo MTB. (2010). Assessment of the Presence and Dynamics of Fungi in Drinking Water Sources Using Cultural and Molecular Methods. Water Res. 1-10.
3. Ribeiro A. ; Machado AP. ; Kozakiewicz Z. ; Ryan M. ; Luke B. ; Buddie AG. ; Venancio A. ; Lima N. and Kelley J. (2006). Fungi in bottled water. A case study of a production plant. Revista Iberoamericana de Micologia. 23: 139-144.
4. Cabral D. and Fernandez P. (2002). Fungal spoilage of bottled mineral water. Int. J. Food Microbiol. 72: 73-76.
5. Fujikawa H. ; Wauke T. ; Kusunoki J. ; Noguchi Y. ; Takahashi Y. ; Ohta K. and Itoh T. (1997). Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. J. Appl. Microbiol. 82: 287-291.
6. Mara D. and Horan N. (2006). The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. 1st ed. Elsevier Academic Press, London.
7. Hageskal G. ; Lima N. and Skaar I. (2009). The Study of Fungi in Drinking Water. Mycol. Res. 113: 165-172.
8. Paterson RRM. ; Venancio A. and Lima N. (2007). Why do food and drink smell like earth. In: Mendez-Vilas A (ed). Microbiology Book Series-Communicating Current Research and Education Topics and Trends in Applied Microbiology. Formatex. Badajoz, Spain. pp. 120-128.
9. Junghanns C. ; Moeder M. ; Krauss G. ; Martin C. and Schlosser D. (2005). Degradation of the Xenoestrogen nonylphenol by aquatic Fungi and their Laccases. Microbiol. 151: 45-57.
10. Hairston JE. (2008). Bottled water: Beneficial industry or super can job. Alabama state water program. Auburn University. National Water Conference. 10.
11. رزوقي ، سراب محمد محمود . (2008). دراسة واقع مياه الشرب المعبأة في العراق بين الاعوام 1995-2008 . المؤتمر العلمي الاول للصحة العامة استثمار لحياة افضل , وزارة الصحة.
12. Clesceri LS. ; Greenberg AS. and Eaton AD. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA). 21.
13. Food and Drug Administration. (FDA). (2003). A guide to environmental microbiology testing for the food industry.
14. Kaur R. ; Mittal N. ; Kakkar M. ; Aggarwal AK. and Mathur MD. (2000). Otomycosis. Clinico. Mycologic. Study. 79(8): 606-609.
15. Paterson RRM. ; Hageskal G. ; Skaar I. and Lima N. (2009). Occurrence, problems, analysis and removal of filamentous fungi in drinking water. In Fungicides: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects; De Costa, P., Bezerra, P., Eds. Nova Science Publishers: New York, NY, USA, pp. 379-399.

معالجة بعض الفطريات السامة المعزولة من المياه العراقية بالمحتوى الفينولي الكلي لمستخلصات نبات السعد *Cyperus rotundus* وبطرق استخلاص متنوعة

سبا رياض خضير الطائي (1) لبيب أحمد الزبيدي (2) إنعام نوري علي (2)

(1) كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية/ بغداد (2) دائرة المياه والبيئة/ وزارة العلوم والتكنولوجيا/ بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

استخلصت المركبات الفينولية من درنات نبات السعد *Cyperus rotundus* باستخدام الأمواج فوق الصوتية، الماء الساخن، الكحول الايثيلي والكحول المثلثي، وركزت المستخلصات بالمبخر الدوار تحت الضغط المخفل وجففت. اجري الكشف الكيميائي النوعي عن المجموع الفعالة في المستخلصات، حيث ظهر احتواء المستخلص الكحول المثلثي على المجموع الفعالة (التانينات، الفلافونات، الفينولات، التربينات، الصابونيات، القلويدات والكومارينات)، واختلفت المستخلصات في محتواها من المجموع الفعالة كما ونوعا. تم تحليل حامض العفصيك لتحديد المحتوى الفينولي الكلي باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu فوجد احتواء المستخلص الكحولي على نسبة عالية من المحتوى الفينولي الكلي، واختبرت الفعالية التثبيطية للفطريات السامة *Aspergillus flavus* المعزولة من مياه نهر دجلة و *Aspergillus niger* المعزولة من مياه خزانات المنزلية و *Rhizopus oligosporium* المعزولة من مياه الفضلات، أظهرت المستخلصات الأربعة فعالية تثبيطية ونسب مختلفة، أعطى المستخلص الكحولي مثلي لدنات نبات السعد أعلى فعالية تثبيطية وبمعنوية ($P \leq 0.05$)، مقارنة بنموذج السيطرة (المعاملة بدون مستخلص) والمستخلصات المائية الساخنة وبالأمواج فوق الصوتية والكحول الايثيلي ولكن غير معنوية مع مضاد الفطري Clotrimazole بتركيز 1 غرام/ 100 مليلتر. كانت النتائج متقاربة في الفعالية التثبيطية لمستخلصات المائية الساخنة وبالأمواج فوق الصوتية، بينما اظهر المستخلص الكحول الايثيلي فعالية تثبيطية اعلى من المستخلصان المائيان وبمعنوية ($P \leq 0.05$). وجد أن الاختلاف في الفعالية التثبيطية يمكن أن تعود الى الاختلاف بقطبية المذيبات المستخدمة في الاستخلاص درنات نبات السعد وأنواع الفطريات الاختبارية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات السامة، المياه العراقية، المحتوى الفينولي الكلي، نبات السعد.

Treatment the some of toxigenic fungi isolated from Iraqi waters by total phenolic content of *Cyperus rotundus* extracts by various extraction processes

Sabaa R. K. Al-Tai (1) Labeeb A. Al- Zubaidi (2) and Inaam N. Ali (2)

ABSTRACT

Phenolic compounds were extracted by Ultrasonic, and hot water, methanol and ethanol alcohol of *Cyperus rotundus* (coco-grass) extracts separately use prepared, the extracts evaporate and deride. The evaluated the qualitative chemical test of the extracts active groups was carried. The results was noticed contain the major active groups (Tannins, Flavones, Phenols, Terpenoids, Saponins, Alkaloids and Coumarins). The extracts were quantitatively and qualitatively different in their active groups. Tannic acid was further analyzed to determine their total phenolic content by Folin- Ciocalteu method. The alcoholic extract was found to have highest percent of total phenolic content. The inhibition activity to toxic fungi *Aspergillus flavus* that isolated from tiger river waters and *Aspergillus niger* isolated from waters tanks and *Rhizopus oligosporium* isolated from swag waters was tested. The ethanol extract of the coco-grass fruits was giving significant in inhibition activity ($P \leq 0.05$), in comparison to the negative control (without extract treatment) and the hot water and ultrasonic extracts and ethanol alcohol extract but no significant with antifungal Clotrimazole 1g/100 ml concentration. The inhibition activity results the hot water and ultrasonic extracts of coco-grass plant were approach one another, while the ethanol alcohol extract showed significant of high activity with the watery extracts ($P \leq 0.05$). The significant difference in inhibition activity among the extracts were found to be due to the polarity of the solvents used for extraction as coco-grass fruit and types of tested fungi.

المقدمة

طرائق استخلاص المركبات الفينولية في نبات درنات السعد:

تم الحصول على درنات نبات السعد من مركز الطب الشعبي في بغداد/ وزارة الصحة العراقية، طحنت الدرنات بواسطة طاحونة للحصول على مسحوق متجانس وحفظت في حاويات زجاجية نظيفة ومعقمة بدرجة حرارة 5°م لحين الاستخدام. للحصول على المستخلص المائي بالأمواج فوق الصوتية والمستخلص المائي الحار (الساخن) لدرنات نبات السعد اتبعت الطريقة التي ذكرها Xiang وجماعته (10). حضر المستخلص الكحولي المثلي لدرنات نبات السعد باستخدام الكحول المثلي بينما حضر المستخلص الكحولي الايثيلي باستخدام الكحول الايثيلي على الترتيب وحسب الطريقة التي وصفه Ali وجماعته (11). اتبعت طريقة Shihata (12) في الكشف عن المجاميع الفعالة الرئيسة وهي (التانينات، الفلافونات، الفينولات، الصابونيات، التربينات، القلويدات والكومارينات). تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في مستخلصات درنات نبات السعد باستخدام طريقة Amin وجماعته (13).

تحديد التركيز المثبط الأدنى لمستخلصات درنات نبات السعد في الفطريات الاختبارية :

اختبرت الفعالية التثبيطية لمستخلصات درنات نبات السعد وتحديد التركيز المثبط الأدنى (Minimum Inhibition concentration) باستخدام طريقة قياس منع النمو في الوسط الزراعي الصلب وذلك بوضع تراكيز من مستخلصات درنات نبات السعد (50، 25، 12.5، 10، 5، 2.5، 1) غرام/100مليتر كل على انفراد، ونقل قرص لكل فطر من الفطريات الثلاثة (*Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* و *Rhizopus oligosporium*) بقطر 6 ملليمتر فضلاً عن نموذج السيطرة (المعاملة بدون مستخلص)، حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة (2±28) م مدة (4±72) ساعة، ثم قيس منطقة منع النمو (قطر المستعمرة). تم قياس الوزن الجاف في الوسط الزراعي السائل وذلك باخذ تراكيز من مستخلصات درنات نبات السعد (50، 25، 12.5، 10، 5، 2.5، 1) غم/100مليتر كل على انفراد ولقح بالعوائل الفطرية *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Rhizopus oligosporium* على التوالي، اما مجموعة السيطرة السالبة (الوسط الزراعي السائل الملقح بالفطريات الثلاثة بدون المستخلص) فضلاً عن مجموعة المقارنة (السيطرة الموجبة: الوسط الزراعي الحاوي على المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز 1 غم/100 مليتر الملقح بالفطريات الثلاثة) كل على انفراد. حضنت بدرجة حرارة (2±28) م مدة (4±72) ساعة، رشح النمو الفطري تحت الضغط المخلخل وأخذ الراسب على أوراق الترشيح، وجففت بدرجة 60 م واستخرج الوزن الجاف للفطريات ولجميع التراكيز من خلال حساب الفرق الوزني قبل وبعد الترشيح كدليل للنمو الفطري وحسب Irkin و Korukluoglu (14).

أخذ نموذج ماء الصرف الصحي من حوض التصريف النهائي لمحطة الرسمية وعولمت مع التراكيز التي أعطت فعالية تثبيطية الأفضل لدراسة فعالية المستخلص في إزالة أو منع نمو الفطريات السامة في مياه الصرف الصحي حيث تم معاملة عشرة مليترات من ماء الصرف الصحي بتراكيز المثلي لفعالية مستخلص درنات نبات السعد وبلغت (25، 12.5، 10 و 5) غم/100 مليتر كل على انفراد بعد ذلك تم زرعها على وسط أكار دكستروز بطاها بإضافة 5 مليتر إلى الوسط الزراعي ودورت الأطباق بصورة ضمان انتشار النموذج على سطح الوسط الزراعي وتركت الأطباق لفترة قليلة وحضنت مدة (4±72) ساعة بدرجة (2±28) م مقارنة بنموذج السيطرة (المعاملة بدون المستخلص) وكررت التجارب ثلاث مرات.

الاختبارات الإحصائية:

استخدم برنامج SPSS في إجراء التحليل الإحصائي للحصول المعدل ± الخطأ القياسي باستخدام اختبار T-test و بمسوى معنوي (P≤0.05).

تدخل الأحياء المجهرية في أنظمة توزيع مياه الشرب خلال المعالجة غير الكافية للماء الخام وعدم اكتمال أو وجود تخسفات في شبكة خط أنابيب توزيع المياه وعن طريق خزانات المياه، وجدت الفطريات *Aspergillus*، *Fusarium* وخمائر *Candida* في أنابيب توزيع مياه الشرب في عدد من المستشفيات المناطق الأوربية حيث تعتبر من الفطريات الغازية لمياه الشرب وتسبب إصابات شديدة (1). عزلت الأنواع قيد الدراسة من المياه العراقية ومن مياه خزانات مناطق مختلفة من بغداد لذلك لابد من طريقة معالجة لإزالتها أو تخفيضها حيث تعد الفطريات من الأحياء المرضية بسبب إنتاجها للسموم ومن أمثلة هذه السموم هي الأفلاتوكسينات والتي هي أكثر السموم الفطرية mycotoxins شيوعاً، فهي تنتج أساساً من قبل العفن *Aspergillus flavus*، فضلاً عن *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus nomius*. الأفلاتوكسينات هي مجموعة من المركبات والأكثر شيوعاً ومن أهم أسباب التسمم الحاد وتخر الكبد، تدهور وتليف الكبد، والتي تتطور إلى تليف وسرطان ولقيت اهتماماً كبيراً في أنحاء مختلفة من العالم منذ اكتشافها في بداية الستينات من القرن الماضي ولغاية الوقت الحاضر بسبب تأثيراتها السامة والمسرطنة للإنسان والحيوان (2) لذلك كان لابد من حماية الإنسان والحيوان من الأضرار الناتجة عن هذه السموم وتأتي هذه الحماية بعدة وسائل منها منع نمو الفطريات الملوثة أو منع تكوين السموم باستخدام بعض المواد الكيماوية وبالنظر لأن الغالبية العظمى من هذه المواد الكيماوية لها العديد من التأثيرات الجانبية لذلك أصبح من الضروري إيجاد بدائل لهذه المواد الكيماوية ومنها المستخلصات النباتية والتي تكون بديلاً عن المواد الكيماوية المصنعة (3). يتواجد نبات السعد بصورة رئيسة في حقول المرتفعة والأرز فضلاً عن أماكن المستنقعات في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية والمعتدلة. واسمه الشائع nutgrass، هي برديات عشبية معمرة مع درنات متحرشة زاحفة و متبرعمة عند القاعدة (4). تستخدم درنات نبات السعد كأعشاب علاجية وطبية في علاج الأم المعدة واضطرابات المناعية والالتهابات والإصابات المرضية، حيث يحتوي نبات السعد على الزيوت الثابتة، التربينات، الفلافونات، سيتوستيرويدات، فيتامين C، اما التربين الرئيسي في نبات السعد فهو هيدروكربونات سيسكويتربين (sesquiterpene hydrocarbons) (5)، لذا هدف البحث إلى عزل وتشخيص بعض الفطريات من ثلاثة مصادر من المياه واختبار فعالية المحتوى الفينولي لبعض مستخلصات درنات نبات السعد في تثبيط نمو بعض العزلات الفطرية المعزولة من المياه العراقية.

المواد وطرق العمل

عزل وتشخيص الفطريات من المياه:

عزلت وشخصت الفطريات المنتجة للسموم من المياه العراقية (مياه نهر دجلة ومياه خزانات منزلية ومياه الفضلات الصناعية) وتمييزها على الأوساط الزرع المناسبة لها وهي Potato dextrose agar، Corn meal agar، sabauroud dextrose agar، حيث استخدمت طريقة agar and malt extract agar media، وضع مليتر واحد من كل عينة ماء في أطباق زجاجية معقمة وصب فوقها الأوساط الزرعية كل على انفراد المعقمة بالمؤسدة والمضاف إليها المضاد الحيوي لمنع نمو البكتيريا وحسب طريقة Holmberg وجماعته (5) وحضنت الأطباق مدة ثلاثة أيام بدرجة حرارة (2±28) م. تم عزل عدد من الأجناس الفطرية النامية على الأطباق حسب شكل ولون المستعمرات ونقيت العزلات وشخصت الأنواع الفطرية بواسطة الاستخدام المباشر للمجهر الضوئي وحسب المفاتيح التصنيفية Barnett و Hunter (6) و Robert وجماعته (7). حضرت الكواشف والمحاليل حسب الطرق التي ذكرها Atlas وجماعته (8) و Stahl (9).

النتائج والمناقشة

توضح الجداول (3، 4، 5 و 6) تأثير تراكيز مختلفة من مستخلصات درنات نبات السعد وظهر المستخلص الكحول المثلي أعلى فعالية تثبيطية للفطريات قيد الدراسة من بقية المستخلصات لدرنات نبات السعد وبمعنوية ($P \leq 0.05$) على نمو الفطر *A. flavus* الذي أظهر مقاومة أعلى من بقية العزلات الفطرية. تبين النتائج بأن جميع تراكيز المستخلص الكحول المثلي لدرنات نبات السعد لها تأثير مثبط على نمو الفطر حيث انخفض النمو من 78.63 ملمتر إلى (32.2، 25.11، 18.62، 8.68، 7.92، 3.11 و 1.82) ملمتر عند معاملتها بالتراكيز لمستخلصات نبات السعد (1، 2.5، 5، 10، 12.5، 25 و 50) غم/ 100 مليلتر على التوالي، وإن الفطر *A. flavus* أظهر مقاومة لفعالية المستخلصات أعلى من بقية العزلات الفطرية الاختيارية وبالرغم من حدوث نمو للفطريات الاختيارية إلا أنه لم يلاحظ وجود نمو للابواغ (سبورات) في المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الزراعي من جهة وعدم نمو هيافات في فطر *A. niger* و *R. oligosporium* عند التراكيز العالية للمستخلصات المائية و تراكيز المستخلص الكحولي من (1-5) غم/ 100مليلتر. يمكن أن يعود التباين في الفعالية التثبيطية إلى الاختلافات في المحتوى من المجموع الفعالة (منها الفلافونات التي لها فعالية تثبيطية وتضاد للأكسدة (16) و الفينولات المتعددة والقلويدات والصابونيات ومركبات فعالة أخرى فلهم فعالية تثبيطية للجراثيم (الميكروبات) سواء كانت بكتريا أو فطريات أو فيروسات أو خمائر كما ونوعا وبسبب الاختلاف في نوع المذيب وقطبيته فضلا عن نسبة المحتوى الفينولي الكلي. توافقت هذه النتيجة مع ما استنتجه Sharma و Singh (17) من أن المستخلص الكحول المثلي لنبات السعد يمتلك فعالية تثبيطية للأحياء الدقيقة أعلى من بقية المستخلصات ومنها المائية والزيتي سواء كانت بكتريا أو فطريات أو خمائر، واكد Prasad (18) و Balpande و Cherian (19)، فضلا عن ما استنتجه Samariya و Sarin (20) بأن الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحول المثلي لدرنات نبات السعد في الأحياء المجهرية كانت أعلى من المستخلص الزيتي والمائي واعزبا السبب إلى قطبية المذيب وكذلك ما أكده Nima وجماعته (21) بأن لنبات السعد فعالية تثبيطية للعزلات البكتيرية وإن الاختلاف في فعالية المستخلصات يمكن أن تعود إلى الاختلاف في المحتوى للمركبات الكيميائية الفعالة.

جدول رقم (3): تحديد التركيز التثبيطي الأدنى (MIC) للمستخلص المائي بالأمواج فوق الصوتية لنبات السعد في العزلات الفطرية الاختيارية

الفطريات	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. oligosporium</i>
التركيز غرام/ 100مليلتر	معدل قطر النمو الفطري ± الخطأ القياسي (ملم)		
السيطرة	2.10 ± 78.63	1.20 ± 81.78	1.21 ± 82.18
Clotrimazole 1	0.67 ± 8.33	0.08 ± 3.67	0.53 ± 6.67
50	0.13 ± 24.22	0.11 ± 18.32	0.13 ± 10.90
25	1.90 ± 32.30	1.60 ± 2034	0.22 ± 19.11
12.5	2.15 ± 38.12	1.22 ± 30.34	1.13 ± 31.11
10	1.24 ± 41.68	1.22 ± 32.38	1.23 ± 34.48
5	1.33 ± 51.22	0.21 ± 40.22	1.13 ± 44.06
2.5	1.27 ± 58.26	1.21 ± 52.32	1.12 ± 50.14
1	1.13 ± 68.2	1.22 ± 64.22	1.21 ± 58.33

الاحتمالية ($P \leq 0.05$).
النتائج معدلات لثلاثة مكررات

تعد المجموع الفعالة من النواتج الأيضية الثانوية التي لها أهمية دفاعية للنبات ضد الأحياء الدقيقة والحشرات، والتي يستفاد منها الإنسان في مجالات متعددة من الأغذية والأدوية وغيرها (3).
يبين جدول رقم (1) نتائج الكشف النوعي عن المجموع الفعالة في المستخلصات (المائية بالأمواج فوق الصوتية، المائية الساخنة، الكحول المثلي والكحول الايثيلي) لدرنات نبات السعد، وأظهرت اختلافات وتباين في احتوائها على المجموع الفعالة ويمكن أن يعود السبب إلى الاختلاف في طريقة الاستخلاص فضلا عن نوعية وقطبية المذيب المستخدم مما أعطى إلى احتواء المستخلص الكحول المثلي على نوعية وكمية المجموع الفعالة بنسبة أكبر من بقية المستخلصات بينما اختلفت النوعية والكمية المجموع الفعالة بين المستخلصات الأخرى.

جدول رقم (1): نتائج الكشف الكيميائي النوعي عن المجموع الفعالة الرئيسية لمستخلصات لدرنات نبات السعد

المكونات المستخلصة	طرائق الاستخلاص			
	الكحول الايثيلي	الكحول المثلي	المائي الساخن	المائي بالأمواج فوق الصوتية
التانينات	++	+++	+	+
الفلافونات	-	+	-	-
الفينولات	++	+++	+	++
التربينات	-	+	-	-
الصابونيات	++	+++	++	+
القلويدات	+	++	+	+
الكومارينات	-	+	-	-

(+) النتيجة موجبة.

(++) شدة ناتج التفاعل.

(-) النتيجة سالبة.

النتائج لثلاث مكررات

يبين جدول رقم (2) اختلاف المحتوى الفينولي الكلي في مستخلصات مختلفة لنبات السعد حيث أظهر المستخلص الكحولي المثلي أعلى نسبة من بقية المستخلصات وبلغت 47.7% بينما أظهر المستخلص المائي الساخن أقل نسبة وبلغت 32.3% ويمكن أن يعود السبب إلى الاختلاف في المحتوى من المركبات الكيميائية والمجموع الفعالة كما ونوعا، وتتفق هذه النتيجة مع نتائج الكشف النوعي للمجموع الفعالة لمستخلصات درنات نبات السعد فضلا عن توافقه مع Jeyadevan و Sivapalan (15) حين ذكروا أن أعلى نسبة للمحتوى الفينولي الكلي لدرنات نبات السعد في المستخلص الكحولي.

جدول رقم (2): يوضح معدلات المحتوى الفينولي الكلي لمستخلصات نبات السعد المختلفة

نوع المعاملة	المحتوى الفينولي الكلي %
المستخلص المائي بالأمواج فوق الصوتية	38.1
المستخلص المائي الساخن	32.3
المستخلص الكحول المثلي	60.3
المستخلص الكحول الايثيلي	47.7

النتائج معدل لثلاث مكررات

جدول رقم (4): تحديد التركيز التثبيطي الأدنى (MIC) للمستخلص المائي الحار لدرنات نبات السعد في العزلات الفطرية الاختبارية

الفطريات	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>R. oligosporium</i>
التركيز غرام/ 100مليتر	معدل قطر النمو الفطري \pm الخطأ القياسي (ملم)		
السيطرة	3.20 \pm 81.78	2.10 \pm 78.63	1.21 \pm 82.18
Clotrimazole 1	0.08 \pm 3.67	0.67 \pm 8.33	0.53 \pm 6.67
50	0.11 \pm 20.30	1.13 \pm 21.22	0.10 \pm 18.90
25	1.60 \pm 24.30	1.90 \pm 28.30	0.60 \pm 23.30
12.5	1.22 \pm 34.32	2.15 \pm 31.12	1.33 \pm 38.21
10	1.30 \pm 39.68	1.24 \pm 37.68	2.11 \pm 40.68
5	2.26 \pm 48.22	1.33 \pm 44.22	0.23 \pm 50.22
2.5	4.61 \pm 57.30	1.27 \pm 62.26	1.14 \pm 56.30
1	2.44 \pm 69.0	1.13 \pm 75.2	1.33 \pm 67.0

جدول رقم (5): تحديد التركيز التثبيطي الأدنى (MIC) للمستخلص الكحول الأيثلي لدرنات نبات السعد في العزلات الفطرية الاختبارية

الفطريات	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>R. oligosporium</i>
التركيز غرام/ 100 مليتر	معدل قطر النمو الفطري \pm الخطأ القياسي (ملم)		
السيطرة	3.20 \pm 81.78	2.10 \pm 78.63	1.60 \pm 82.18
Clotrimazole 1	0.08 \pm 3.67	0.67 \pm 8.33	0.53 \pm 6.67
50	0.11 \pm 1.31	0.13 \pm 20.32	0.18 \pm 1.90
25	1.21 \pm 4.32	1.22 \pm 28.12	0.17 \pm 5.30
12.5	1.22 \pm 11.23	2.21 \pm 33.22	1.33 \pm 10.12
10	1.31 \pm 13.86	1.42 \pm 30.17	1.22 \pm 13.86
5	1.26 \pm 21.22	1.23 \pm 42.12	1.31 \pm 17.22
2.5	1.22 \pm 30.12	1.22 \pm 49.22	1.33 \pm 28.22
1	2.44 \pm 41.2	1.13 \pm 59.2	1.22 \pm 38.13

جدول رقم (6): تحديد التركيز التثبيطي الأدنى (MIC) للمستخلص الكحول الميثيلي لدرنات نبات السعد في العزلات الفطرية الاختبارية

الفطريات	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>R. oligosporium</i>
التركيز غرام/ 100مليتر	الوزن الجاف (ملغرام/ 25/مليتر)		
السيطرة	1.34 \pm 96.87	3.34 \pm 116.25	1.19 \pm 71.33
Clotrimazole 1	0.08 \pm 3.67	0.67 \pm 8.33	0.53 \pm 6.67
50	0.08 \pm 10.67	0.67 \pm 16.67	0.53 \pm 12.53
25	0.01 \pm 16.15	0.67 \pm 23.67	0.02 \pm 16.73
12.5	0.33 \pm 24.22	0.13 \pm 28.67	0.32 \pm 26.66
10	0.22 \pm 30.67	0.72 \pm 32.67	0.12 \pm 33.54
5	0.13 \pm 45.22	0.67 \pm 48.67	0.41 \pm 41.22
2.5	2.66 \pm 58.87	1.67 \pm 74.87	0.83 \pm 57.42
1	2.93 \pm 83.67	2.33 \pm 90.15	1.02 \pm 63.23

يوضح الجدول رقم (7) تأثير مستخلص الكحول الميثيلي لدرنات نبات السعد في الكتلة الحيوية الجافة للفطريات *A. niger* و *R. oligosporium* النامية في الوسط مرق دكستروز بطا (PD broth) فضلا عن معاملة السيطرة (المعاملة بدون المستخلص)، أظهرت النتائج حدوث تثبيط تدريجي للنمو، ويزداد التثبيط بازدياد تراكيز مستخلص الكحول الميثيلي وبمعنوية ($P \leq 0.05$)، مما يعطي تأكيدا على فعالية مستخلص الكحول الميثيلي في خفض نمو الفطريات وبالتالي يمنع إنتاج وإفراز السموم الفطرية الخطرة ومنها الافلاتوكسينات والتي تعتبر من أهم مسببات المرضية للإنسان والحيوان والتي قد تصل إلى التسبب في حدوث السرطان (22،9).

جدول رقم (7): الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحول الميثيلي في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية.

الفطريات	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>R. oligosporium</i>
التركيز غم/ 100 مليتر	معدل الوزن الجاف \pm الخطأ القياسي (ملم)		
السيطرة	3.20 \pm 81.78	2.10 \pm 78.63	1.60 \pm 82.18
Clotrimazole 1	0.01 \pm 0.92	0.01 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00
50	0.01 \pm 1.82	0.01 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00
25	0.01 \pm 3.11	0.01 \pm 1.32	0.01 \pm 0.11
12.5	0.01 \pm 7.92	0.02 \pm 6.12	0.01 \pm 3.15
1	1.24 \pm 8.68	0.02 \pm 7.13	0.01 \pm 4.11
5	1.33 \pm 18.62	0.02 \pm 19.88	0.01 \pm 13.22
2.5	1.27 \pm 25.11	1.21 \pm 24.33	0.11 \pm 20.30
1	1.13 \pm 32.2	1.34 \pm 30.22	0.21 \pm 30.22

تشير النتائج في جدول رقم (8) الفعالية التثبيطية لمستخلص الكحول الميثيلي لنبات السعد في نمو الفطريات والخمائر لنماذج المياه الصرف الصحي (حوض التصريف النهائي لمحطة الرستمية)، فظهر تبانين كبير في عدد المستعمرات الفطرية والخمائر قبل وبعد المعاملة بتركيز مختلفة للمستخلص النباتي. انخفض معدل عدد المستعمرات بعد ثلاثة أيام من المعاملة بمستخلص الكحول الميثيلي بتركيز 25 غم/100مليتر ليصل العدد إلى 1.53 مستعمرة /مليتر وبمعنوية ($P \leq 0.05$) مقارنة بنموذج السيطرة (المعاملة بدون المستخلص) والذي بلغ معدل عدد المستعمرات النامية 27.33 مستعمرة/مليتر بينما لم تكن بمعنوية مقارنة بالسيطرة الموجبة (Clotrimazole 1 gm/100ml)، وأظهر المستخلص بتركيز 5 غم/ 100 مليتر فعالية تثبيطية الأوطأ حين بلغ المعدل 18.3 بينما تبانيت الفعالية التثبيطية للتركيز الأخرى بين هذين المعدلين وبفروق معنوية ($p \leq 0.05$) مقارنة بنماذج السيطرة ويمكن أن يعود السبب إلى الاختلافات في نسبة تراكيز المواد الكيماوية الفعالة والمؤثرة في نمو الفطريات ومنها القلويدات، الفلافونات والمركبات الأخرى.

10. Xiang QS.; Zhen LZ.; Luyengi L.; Kook LS.; Pezzato JM.; FainsWorth NR.; Thompson LU. and Fong HHS. (1999). Isolation and characterization of flax seed (*Linum usitatissimum*) constituents Pharm. Biol. 937: 1-7.
11. Ali MR.; Hussinm MS.; Kadum M M.; Kadum YA. and Hamza EH. (2009). *In-vitro* Antimicrobial Activities of *Myrtus communis* L. and *Cyperus rotundus* L. Extracts. Al- Mustansiriya J. Sci. 20 (1): 29-36.
12. Shihata IM. (1951). Apharmacological study of *Anagallis arvensis*. MSc. Thesis, Faculty of Vet. Med. Cairo Univ. Egypt.
13. Amin I.; Norazaidah Y. and Emmy Hainida KI. (2006). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *aegeria var. alba*. Food Chem. 89: 533-539.
14. Irkin R. and Korukluoglu M. (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African J. Biotechnol. 6 (4): 384-387.
15. Sivapalan Sri R. and Jeyadevan P. (2012). Physico- Chemical and Phyto- Chemical study of *Cyperus rotundus* Linn. Int. J. Pharmacol. Pharmaceut. Technol. (IJPPT). 1 (2): 1-8.
16. Kilani S.; Dhekra M.; Fadwa Ch.; Zied Gh.; Ilef L.; Kamel Gh. and Leila Ch.-Gh. (2013). Pharmacological, antioxidant, genotoxic studies and modulation of rat splenocyte functions by *Cyperus rotundus* extracts. BMC Complem Altern. Med. 13 (28):13-19.
17. Sharma SK. and Singh AP. (2011). Antimicrobial investigations on rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. Der. Pharmacia. Lett. 3 (3): 427-431.
18. Prasad MP. (2014). Analysis of antimicrobial compounds in *Cyperus rotundus* and *Azadirachta indica* against human pathogens. nt. J. Curr. Microbiol. App.Sci. 3 (3): 206-210.
19. Balpande Sh M. and Cherian, K J.(2013). Phytochemical Analysis of Aqueous Methanol Extract OF *Cyperus rotundus* and *Vetiveria zizanoides* and its antifungal activities on indoor airborne fungal of some schools in Nagpur city. India. J. Environ. Res. Develop. 7(4):1597-1601.
20. Samariya K. and Sarin R. (2013). Screening for phytochemical content and antimicrobial activity of *Cyperus rotundus* Linn. World J. of Pharm. Pharmaceut. Sci. 2 (5):2956-2968.
21. Nima Z. .; Jabier MS.; Wagi RI. and Hussain H A. (2008). Extraction, Identification and Antibacterial activity of *Cyperus* oil from Iraqi *C. rotundus*. Eng. Technol. 26(10):1156-1163.
22. Imam MZ. and Sumi Ch D. (2014). Evaluation of antinociceptive activity of hydromethanol extract of *Cyperus rotundus* in mice.BMC Complem. Altern. Med. 14 (83): 102-119.

جدول رقم (8): الفعالية التثبيطية للمستخلص كحول المثلي في الفطرية والخمائر لعينات مياه الصرف الصحي في الرستمية (حوض التصريف النهائي) مدة حضن 72 ساعة من المعاملة

معدل عدد المستعمرات (مستعمرة/ملييلتر)	تراكيز غم/ 100ملييلتر
0.67±27.33	السيطرة
0.001±0.67	Clotrimazole 1
0.02±1.53	25
0.06 ±3.06	12.5
0.01 ±8.03	10
18.3±0.67	5

الاحتمالية ($P \leq 0.05$).

النتائج معدلات لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي

نستنتج من النتائج أعلاه بان مستخلصات درنات نبات السعد قد أظهرت طيف واسع من الفعالية التثبيطية ضد الفطريات السامة الاختبارية والتي يمكن استخدامها في معالجة المياه العرفاقية، مع ذلك اظهر المستخلص الكحولي المثلي فعالية تثبيطية وبمعنوية ضد الفطريات السامة والمريضية، فضلاً عن أن النتائج قد أفرزت عن طريق الفحص الكيميائي النباتي إمكانية استخدامه في العلاجات الطبية، فضلاً عن احتواء المستخلص الكحولي المثلي على محتوى فينولي كلي اعلى نسبة من بقية المستخلصات وهذا سوف يساعد في الكشف عن مكونات مختلفة موجودة في مختلف المذيبات.

المصادر

1. Hajjeh RA. and Warnock DW. (2001). Counterpoint: invasive aspergillosis and environment-rethinking our approach to prevention. Clin.Infect.Dis. 33: 1549-1552.
2. Prescott LM.; Harley JA. and Klein DA. (1996). Microbiology 3rd ed. W.M.C. Brown publishers U.S.A. 935.
3. Cowan MM. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12 (4): 564-582.
4. Meena A K.; Yadav AK.; Niranjan US.; Brijendra S.; Nagariya AK. and Verma M.(2010). Review on *Cyperus rotundus* - A Potential Herb.Int. J. Pharmaceut. Clin. Res. 2(1): 2022- 2029.
5. Holmberg T.; Kaspersson A.; Goransson B.; Kozakiewicz Z. and Krammans L. (1989). Aflatoxin production and tolerance to organic acid by *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus* isolates from acid treatment moist grain. Acta. Agric. Seand. 39:449-455.
6. Barnett HL. and Hunter BB. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd Burgess publ. co., Minnesota.
7. Robert AS.; Ellen SH. and Connie AN. (1984). Introduction to food borne – fungi contamination. 2nd ed. Drukkerij. J.Van Gestol & Zn. B.V. Laren N.H: 1-205.
8. Atlas RM.; Brown AE. and Parks L C. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby Company-Yearbook, Inc.
9. Stahl R. (1969). Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, 2nd ed. Translated by Ashworth M.R., Springer, verlag, Berlin.

استجابة نبات القرنفل *Dianthus coryophyllus* L. للرش بمستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C في صفات النمو والإزهار

جمال احمد عباس، مشتاق طالب حمادي الزرفي، صفاء نمير الفتلاوي

كلية الزراعة / جامعة الكوفة / جمهورية العراق.

الملخص باللغة العربية

أجريت تجربة حقلية في مشتل كلية الزراعة / جامعة الكوفة خلال الموسم الزراعي (2012-2013) لدراسة تأثير رش مستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C في نمو وإزهار نبات القرنفل، نفذت التجربة بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R.C.B.D) بثلاث مكررات بعاملين الأول ثلاثة تراكيز من مستخلص الخميرة هي (3, 0 و 6) غم.لتر⁻¹ والثاني ثلاثة تراكيز من فيتامين C هي (0, 100 و 200) ملغم.لتر⁻¹ والتداخل فيما بينهما، قورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) وعلى مستوى احتمال 0.05. أظهرت النتائج إن رش مستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم.لتر⁻¹ مع فيتامين C بتركيز 200 ملغم.لتر⁻¹ زاد معنويا ارتفاع النبات وعدد الأوراق والوزن الجاف للمجموع الخضري ومحتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي والكاربوهيدرات الكلية الذاتية وطول أطول جذر والوزن الجاف للجذور. إضافة إلى زيادة عدد الأزهار والبتلات وقطر الزهرة والوزن الجاف للإزهار والعمر المزهري للأزهار، إذ بلغت 8.00 زهرة.نبات⁻¹ و 33.42 بتلة.زهرة⁻¹، 5.27 سم، 2.38 غم و 7.67 يوم معنويا مقارنة بمعاملة المقارنة والتي أعطت اقل المعدلات، إذ بلغت 4.00 زهرة.نبات⁻¹ و 22.67 بتلة.زهرة⁻¹، 2.43 سم، 0.67 غم و 4.12 يوم وعلى التوالي.

الكلمات المفتاحية: القرنفل *Dianthus coryophyllus* L.، مستخلص الخميرة الجافة *Saccharomyces cerevisiae*، فيتامين C

Response of Carnation (*Dianthus coryophyllus* L.) to spraying dry yeast extract and vitamin C in growth and flowering

Jamal A. Abbass, Mushtaq T. Al-Zurfi and Safaa N. Al-Fatwi

College of Agriculture/ Kufa University / Republic of Iraq

ABSTRACT

An experiment was conducted at the nursery of Agriculture Faculty/ Kufa university during growing season 2012 – 2013 to study the of Response of carnation *Dianthus coryophyllus* L. to spraying dry yeast extract and vitamin C in growth and flowering The experiment was adopted in Randomized Complete Block Design (R.C.B.D) with three replicates in two factors The first factors was the concentration of spraying yeast extract i.e. (0,3 and 6)g.L⁻¹ the second was the concentration of spraying vitamin C i.e. (0,100 and 200)mg.L⁻¹ The means of treatments were compare by using the Least Significant Difference (L.S.D) test at 5% probability. Results showed that spraying yeast extract concentration of (6)g.L⁻¹ and spraying vitamin C concentration of (200) mg.L⁻¹ increased significantly plant height , number of leaves ,shoot dry weight , total content of chlorophyll and total soluble carbohydrates , height of the longest root and root dry weight. In addition to increased the number of flowers per plant and petals per flowers, flower diameter , dry weight of flower and visa life to 8.00 flowers. plant⁻¹ and 33.42 petals. flowers⁻¹, 5.27cm, 2.38g and 7.67days significantly as compared with control treatment which gave the least values (4.00 flowers. plant⁻¹ and 22.67 petals. flowers⁻¹, 2.43cm, 0.67 and 4.12 days) respectively.

المقدمة

67.0 سم و 333.3 ورقة نبات¹ مقارنة بمعاملة المقارنة 51.0 سم و 213.3 ورقة نبات¹ و عدد الازهار بلغ 106.6 اذ زهرة نبات¹ عند الرش بتركيز 75 ملغم لتر¹ مقارنة بمعاملة المقارنة بلغت 86.0 زهرة نبات¹ وعلى التوالي، كما وجدت الراشدي (17) عند رش ابرصال الكلايولس *Gladolus X hortulanus* بفيتامين C بواقع رشتين وبتراكيز 100 ملغم لتر¹ ان هنالك زيادة معنوية في طول النورة الزهرية وعدد الزهيرات المتفتحة اذ بلغ 84.8 سم و 12.5 زهرة نبات¹ مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت اقل معدل بلغ 80.7 سم و 11.3 زهرة نبات¹ وعلى التوالي . ولاهمية نبات القرنفل الجمالية والتسويقية تم اجراء تجربة لبيان تأثير عدة تراكيز من مستخلص الخميرة وفيتامين C في مؤشرات النمو والازهار للنبات .

المواد وطرق العمل

اجريت تجربة في مشتل كلية الزراعة / جامعة الكوفة خلال الموسم الزراعي 2012-2013 لبيان تأثير رش مستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C في نمو وازهار نبات القرنفل. تم زراعة البذور بتاريخ (2012/9/1) المنتجة من شركة (Euro garden) الاسبانية في ثم نقلت إلى أصص ذات قطر 15 سم و ارتفاع 20 سم وتحتوي على تربة رملية مزيجية 3 كغم وبواقع شتلة لكل أصيص وذلك عند ظهور أربعة أوراق حقيقية عليها . تم تحليل تربة الاصص لمعرفة الصفات الفيزيائية والكيميائية لها وحسب جدول رقم (1).

نفذت التجربة بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized Complete Block Design (R.C.B.D) بعاملين الاول ثلاثة تراكيز من مستخلص الخميرة هي (0، 30، 60) غم.لتر¹ الى الثاني ثلاثة تراكيز من فيتامين C هي (0، 100، 200) ملغم.لتر¹ وتم رش المستخلص والفيتامين C بعد 20 يوم من زراعة الشتلات والثانية بعد ثلاثة اسابيع من الرش الأولى . فورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) وعلى مستوى احتمال 5% (18) . واجريت كافة عمليات الخدمة من ري وتغشيب ومكافحة افات وحسب الحاجة ولجميع المعاملات وبشكل عشوائي. وفي نهاية التجربة وبتاريخ 2013/6/2 تم ارتفاع النباتات (سم) وعدد الأوراق (ورقة) نبات¹، الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم) وذلك بقطع النبات من مستوى التربة ووضعه في غرفة ذات تهوية جيدة متجددة لمدة (7-14) يوم ولحين الجفاف التام وثبوت الوزن ولكل وحدة تجريبية ، محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100 غم وزن طري¹) وحسب ما جاء ب (19)، محتوى الأوراق الكاربوهيدرات الكلية الذائبة (ملغم . غم¹) وذلك حسب طريقة (20)، طول أطول جذر (سم) تم قياسه بواسطة المسطرة وذلك بعد إخراج النبات من الأصص ووضعه في حوض ماء لمدة 24 ساعة بعدها تم غسل الجذور جيدا للتخلص من بقايا جميع الأتربة العالقة به ولكل وحدة تجريبية ، الوزن الجاف للجذور (غم)، عدد الازهار (زهرة نبات¹) والبتلات (بتلة زهرة¹)، قطر الزهرة (سم)، الوزن الجاف للازهار (غم) اذ تم حسابه بوضع الازهار في غرفة ذات تهوية جيدة متجددة ولحين الجفاف وثبوت الوزن، وعمر الازهار المزهري (يوم) تم حساب عدد الايام بقاء الازهار في المزهرة الى حين الوصول الى الذبول ولكل وحدة تجريبية .

ينتمي نبات القرنفل إلى العائلة القرنفلية Caryophyllaceae ، وهو من النباتات العشبية المعمرة ذات التربية الخاصة إذ يحتاج إلى خبرة فنية عالية بغية إنتاج أزهاره بنوعية تجارية جيدة . ويعد القرنفل من أزهار القطف المهمة عالميا ذات القيمة التسويقية والجمالية العالية (1) ، وهو غزير التفريع عند قاعدة النبات وقد يصل عددها من (10-15) فرعاً وتحمل عليها عدد من الأزهار والتي قد يصل عددها إلى 15 زهرة ذات رائحة عطرية جميلة ومختلفة الألوان منها الأبيض والأحمر والزهري (2، 3) . تعد منطقة البحر الأبيض المتوسط الموطن الأصلي له، يستعمل في تزيين الحدائق ويزرع في الأصص لغرض تزيين الشرفات والسطوح ويمكن إكثاره بواسطة البذور (3).

وأشارت الأبحاث إلى أهمية التغذية الورقية والتي يمكن اعتبارها طريقة فعالة في انتقال وتوصيل العناصر الغذائية بشكل كبير داخل النبات ومساهمتها في النمو الطبيعي للنبات فضلاً عن أن الأبحاث أثبتت أن 85% من حاجة النبات من العناصر الغذائية يمكن تلبيتها عن طريق الأوراق مقارنة مع تلك التي تدخل عن طريق الجذور (4) ، وقد ذكر Eibner (5) بأن التغذية الورقية هي طريقة حديثة في التسميد إلا أنها ليست بديلاً عن التسميد الأرضي وإنما مكملة له ، فقد رش مستخلص الخميرة الجافة كنوع من المستخلصات الطبيعية الغير ضارة للبيئة ومغذية للنبات وذلك لاحتوائها على العديد من العناصر الغذائية المهمة لنمو وتطور النبات كما أنها منتجة لكثير من الهرمونات النباتية كالأكسينات والجبرلينات والسايتوكاينينات وكذلك كميات كبيرة من فيتامين B1 B2 (6) ، كما بينت نتائج دراسة (7) أن الخميرة تحتوي على نسبة من البروتين تبلغ 34.87% والرماد 7.55% والكلوكوجين 6.54% والدهون 2.09% والكلوكوز 4.92% ، وقد وجد Ahmed (8) أن رش مستخلص الخميرة الجافة على نبات البابونج *Matricaria recutita* بتركيز 0، 1، 2، و 4 غم.لتر¹ أدى إلى حدوث زيادة معنوية في ارتفاع النبات والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري وعدد النورات الزهرية وطول الجذور ، كما بين جاسم (9) أن الرش بمعلق الخميرة الجافة على نبات الفريزيا *Freesia sp* بتركيز 8 أو 10 غم.لتر¹ أدى إلى زيادة معنوية في ارتفاع النبات بلغ 39.7 سم و 37.3 سم وعدد الأوراق 8.8 ورقة نبات¹ و 7.5 ورقة نبات¹ وعلى التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة والتي اعطت أقل المعدلات بلغت 36.8 سم و 6.5 ورقة نبات¹ وعلى التوالي ولكلا الموسمين، وأوضح الشولي (10) أنه عند رش نبات الحناء *Lawsonia inermis L.* بمعلق الخميرة النشطة و بتركيز 2 غم لتر¹ وجود زيادة معنوية في صفات النمو إذ ازداد عدد الأوراق و عدد الأفرع الجانبية إذ بلغ 237.71 ورقة نبات¹ و 2.92 فرع نبات مقارنة بمعاملة المقارنة والتي أعطت أقل معدل بلغ 198.08 ورقة نبات¹ و 6.17 فرع نبات¹ وعلى التوالي .

يعد فيتامين C أحد اللاكتونات المهمة وصيغته الكيميائية $C_6H_8O_6$ ، وقد أشارت الأبحاث إلى أن له تأثير في العديد من العمليات الحيوية في النبات إذ يعمل على زيادة محتوى الأحماض النووية في النبات (11) كما يعد أحد الهرمونات النباتية التي تنتج بصورة طبيعية في النبات، وأن الإنزيم المسؤول عن تصنيعه هو GDP-L-galactose phosphorylas ويتواجد في جميع الخلايا بتركيز يتراوح 20-25 مل (12) وهو يعمل كمضاد للاكسدة فضلاً عن كونه عامل مساعد مهم في البناء الحيوي لكثير من الهرمونات النباتية من ضمنها الأثيلين والجبرلين وحامض الأبسيسك (13) ويعمل كمراقب انزيمي في التفاعلات الانزيمية التي عن طريقها يتم بناء وتحليل الكاربوهيدرات والبروتينات إضافة إلى أنه ينظم انقسام وتمدد الخلايا (14) وقد بين Aziz و Talaat (15) عند رش نبات البابونج بحامض الاسكوربيك بتركيز 0، 100 و 200 ملغم.لتر¹ حدوث زيادة معنوية في نمو النبات وإنتاج الازهار المركبة مقارنة بمعاملة المقارنة ، وأوضحت الجابر (16) عند رشها نبات الحلبه *Trigonella foenum-graecum L.* بحامض الاسكوربيك بتركيز 150 ملغم لتر وجود زيادة معنوية في صفات النمو إذ ازداد ارتفاع النبات و عدد الأوراق حيث بلغ

الجدول رقم (1): الصفات الفيزيائية والكيميائية لتربة الأوص

الصفات	وحدات القياس	
نسجة التربة	مفصولات التربة	طين Clay 4.80 غرين Silt 18.5 رمل Sand 76.7
درجة تفاعل التربة pH		6.35
درجة الايصالية الكهربائية (Ec)	ديسي سيمنز م ⁻¹	2.38
Ca++	ملي مول شحنة . لتر ⁻¹	22.8
K+	ملي مول شحنة . لتر ⁻¹	1.85
Mg++	ملي مول شحنة . لتر ⁻¹	15.8
N	ملغم . كغم ⁻¹	30.2
المادة العضوية Organic matter	غم . كغم ⁻¹	8.3

النتائج

طول أطول جذر و الوزن الجاف للجذور وبلغتا 15.97 سم و 2.26 غم مقارنة بمعاملة المقارنة و التي أعطت أقل القيمتين بلغتا 11.19 سم و 1.05 غم و على التوالي .

كما بينت نتائج جدول (3) أن هناك تأثيراً معنوياً للرش بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم . لتر⁻¹ مع فيتامين C بتركيز 200 ملغم . لتر⁻¹ في إعطاء أعلى معدل في صفات النمو الجذري إذا ازداد طول أطول جذر و الوزن الجاف للجذور إذ بلغ 20.17 سم و 3.34 غم مقارنة بمعاملة المقارنة و التي أعطت أقل معدل بلغ 10.53 سم و 0.66 غم و على التوالي.

يتضح من نتائج جدول (3) أن رش بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم . لتر⁻¹ زاد معنوياً في صفات النمو الزهري كما تفوق هذا التركيز على باقي التراكيز ، وأعطى أعلى عدد الأزهار والبتلات و أكبر قطر للأزهار و أعلى وزن جاف للأزهار و أكبر عمر مزهري للأزهار المزهري بلغت 6.89 زهرة . نبات⁻¹ و

31.33 بتلة . زهرة⁻¹ و 4.84 سم و 1.98 غم و 6.14 يوم مقارنة بمعاملة الرش بالماء المقطر فقط و التي أعطت أقل القيم بلغت 4.11 زهرة نبات⁻¹ و 23.11 بتلة . زهرة⁻¹ و 2.82 سم و 0.76 غم و 4.22 يوم و على التوالي. وتبين كذلك من نتائج جدول رقم (3) التأثير المعنوي للرش بفيتامين C بتركيز 200 ملغم . لتر⁻¹ في مؤشرات النمو الزهري، إذ ازدادت من عدد الأزهار والبتلات وقطر الزهرة و الوزن الجاف للأزهار والعمر المزهري للأزهار، إذ بلغت 6.00 زهرة . نبات⁻¹ و 28.56 بتلة . زهرة⁻¹ و 4.14 سم و 1.56 غم و 6.11 يوم مقارنة بمعاملة الرش بالماء المقطر فقط إذ أعطت 5.11 زهرة . نبات⁻¹ و 5.20 يوم و 20.44 بتلة . زهرة⁻¹ و 3.49 سم و 1.03 غم و 5.20 يوم ، و على التوالي .

أظهرت نتائج جدول رقم (2) أن الرش بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم . لتر⁻¹ أعطى أعلى ارتفاع للنبات و أكبر عدد من الأوراق و أعلى وزن الجاف للمجموع الخضري و محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي و الكربوهيدرات الكلية الذاتية إذ بلغت 84.34 سم و 48.67 ورقة النبات⁻¹ و 3.82 غم و 31.92 ملغم 100 غم وزن طري⁻¹ و 6.53 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف معنوياً مقارنة بمعاملة المقارنة (النباتات المرشوشة بالماء المقطر فقط) و التي أعطت أقل القيم، إذ بلغت 72.89 سم و 32.57 ورقة نبات⁻¹ و 1.95 غم و 27.57 ملغم 100 غم وزن طري⁻¹ و 3.38 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف و على التوالي. كذلك تبين من نتائج جدول (2) وجود زيادة معنوية في صفات النمو الخضري عند الرش بفيتامين C و بتركيز 200 ملغم . لتر⁻¹ و الذي تفوق على باقي التراكيز في إعطاء أعلى معدل في ارتفاع النبات و عدد الأوراق و الوزن الجاف للمجموع الخضري و محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي و الكربوهيدرات الذاتية الكلية ، إذ بلغ 80.59 سم و 43.59 ورقة نبات⁻¹ أو 3.26 غم و 29.98 ملغم 100 غم وزن طري⁻¹ و 5.12 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف مقارنة بمعاملة المقارنة و التي أعطت أقل معدل بلغ 75.67 سم و 38.11 ورقة . نبات⁻¹ و 2.64 غم و 29.07 ملغم 100 غم وزن طري⁻¹ و 4.52 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف و على التوالي.

ومن التداخل بين العاملين يتضح من نتائج جدول (2) وجود زيادة معنوية في صفات النمو الخضري عند رش بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم . لتر⁻¹ مع فيتامين C بتركيز 200 ملغم . لتر⁻¹ ، إذ ازداد ارتفاع النبات و عدد الأوراق و الوزن الجاف للمجموع الخضري و محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي و الكربوهيدرات الكلية الذاتية وبلغت 86.40 سم و 52.67 ورقة . نبات⁻¹ و 4.39 غم و 33.82 ملغم . غم⁻¹ وزن طري⁻¹ و 7.77 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف مقارنة بمعاملة الرش بالماء المقطر فقط (control) و التي أعطت أقل القيم، إذ بلغت 68.60 سم و 30.67 ورقة نبات⁻¹ و 1.66 غم و 26.88 ملغم 100 غم وزن طري⁻¹ و 3.00 ملغم . غم⁻¹ وزن جاف و على التوالي.

وتبين من نتائج جدول (3) أن هناك زيادة معنوية في صفات النمو الجذري عند رش النبات بمستخلص الخميرة الجافة و بتركيز 6 غم . لتر⁻¹ إذ ازداد طول أطول جذر و الوزن الجاف للجذور إذا بلغا 18.43 سم و 2.89 غم مقارنة بمعاملة المقارنة و التي أعطت أقل القيمتين بلغتا 11.19 سم و 1.05 غم و على التوالي . هذا وقد أظهرت نتائج جدول (3) كذلك تأثيراً معنوياً عند الرش بفيتامين C و بتركيز 200 ملغم . لتر⁻¹ إذ ازداد

جدول رقم (2): تأثير رش مستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C والتداخل فيما بينهما في صفات النمو الخضري لنبات القرنفل

المعاملات	ارتفاع النبات (سم)	عدد الأوراق (ورقة.نبات ⁻¹)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	محتوى الأوراق من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100 غم وزن طري ⁻¹)	محتوى الأوراق من الكربوهيدرات الكلية الذائبة ملغم.غم ⁻¹ وزن جاف
مستخلص الخميرة الجافة (غم.لتر ⁻¹)	0	72.07	1.95	27.57	3.38
	3	78.77	2.85	30.04	5.10
	6	84.34	3.82	31.98	6.53
	L.S.D. 0.05				
فيتامين C (ملغم. لتر ⁻¹)	0	75.67	2.64	29.07	4.52
	100	78.92	2.72	29.98	5.12
	200	80.59	3.26	30.53	5.37
	L.S.D. 0.05				
مستخلص الخميرة الجافة × فيتامين C	0	68.60	1.66	26.88	3.00
		73.53	1.72	27.73	3.33
		74.07	2.46	28.09	3.80
	3	75.70	2.78	28.87	4.63
		79.30	2.84	30.03	5.00
		81.30	2.92	31.20	5.67
	6	82.70	3.48	31.45	5.93
		83.93	3.58	30.66	5.90
		86.40	4.39	33.82	7.77
	L.S.D. 0.05				

جدول رقم (3): تأثير رش مستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C والتداخل فيما بينهما في صفات النمو الجذري لنبات القرنفل

المعاملات	طول أطول جذر (سم)	الوزن الجاف للجذور (غم)
الخميرة (غم.لتر ⁻¹)	0	11.19
	3	14.27
	6	18.43
	L.S.D. 0.05	
فيتامين C (ملغم. لتر ⁻¹)	0	13.53
	100	14.39
	200	15.97
	L.S.D. 0.05	
الخميرة × فيتامين C	0	10.53
		11.10
		11.93
	3	13.07
		13.93
		15.80
	6	17.00
		18.13
		20.17
	L.S.D. 0.05	

جدول رقم (4): تأثير رش مستخلص الخميرة الجافة وفيتامين C والتداخل فيما بينهما في صفات النمو الزهري لنبات القرنفل

العمر المزهري للازهار (يوم)	الوزن الجاف للازهار (غم)	قطر الزهرة سم	عدد البتلات (بتلة.زهرة ⁻¹)	عدد الإزهار (زهرة.نبات ⁻¹)	المعاملات
4.22	0.76	2.82	23.11	4.11	0
5.44	1.31	3.58	26.44	5.33	3
6.14	1.98	4.84	31.33	6.89	6
1.22	0.21	1.20	02.29	1.152	L.S.D. 0.05
5.20	1.03	3.49	25.44	5.11	0
5.33	1.46	3.61	26.89	5.22	100
6.11	1.56	4.14	28.56	6.00	200
1.23	0.24	1.21	02.28	1.152	L.S.D. 0.05
4.12	0.67	2.43	22.67	4.00	0
4.28	0.71	2.70	23.00	4.02	100
4.67	0.89	3.33	23.67	4.33	200
5.00	1.18	3.43	24.00	5.00	0
5.33	1.36	3.47	27.00	5.33	100
5.67	1.40	3.83	28.33	5.67	200
6.33	1.25	4.06	29.67	6.33	0
6.34	2.30	4.67	30.39	6.33	100
8.00	2.38	5.27	33.42	8.00	200
2.51	0.62	2.82	03.02	2.995	L.S.D. 0.05

الى زيادة ارتفاع النبات وعدد اوراقه (جدول 2)، وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه الشويبي (10) على نبات الحناء.

أما بالنسبة لتأثير الإيجابي لرش فيتامين C على النبات في صفات النمو، فقد يعود السبب الى دورة في تحفيز انقسام الخلايا (23) وزيادة نمو للخلايا النباتية وذلك بتشجيعه على تكوين الاحماض النووية والبروتينات (12)، وكذلك دورة في تنشيط عملية البناء الضوئي وتصنيع المواد الغذائية، إذ يعمل كمرافق أنزيمي في التفاعلات الإنزيمية لايض الكربوهيدرات والبروتينات، كما له تأثير في كسر السادة القمية للتغلب على التأثير المرتبط للاوكسينات المنتجة في القمة النامية للنبات، والبناء الحيوي لعدد من الهرمونات النباتية ومنها الجبرلينات والسايوكانينات والتي بدورها تشجع عملية التزهير (12) مما يعمل بالنهاية على زيادة مؤشرات النمو لنبات القرنفل وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه الجابر (16) على نبات الحلبة.

يستنتج من التجربة ان رش بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم لتر⁻¹ مع فيتامين C بتركيز 200 ملغم لتر⁻¹ حسن من مؤشرات النمو لنبات القرنفل.

المصادر

1. Anonymous. (2002). Office of the gene technology. 2002. Regulator application for licence international release of GMOS into the environment application. <http://www.ogtr.gov.au.com>
2. Galbally J. and Glabally E. (1997). Carnation and Pinks for Garden and Greenhouses. Timber press, Portland, Oregon, USA.
3. البطل، نبيل نعيم. (2010). نباتات الزينة الخارجية. منشورات جامعة دمشق. كلية الزراعة. مطبعة الروضة. سوريا.
4. عبدول، كريم صالح. (1988). فسيولوجيا النبات المتقدم. الجزء الأول وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة صلاح الدين.

أظهرت نتائج جدول رقم (4) أن رش النبات بمستخلص الخميرة الجافة بتركيز 6 غم.لتر⁻¹ مع فيتامين C بتركيز 200 ملغم لتر⁻¹ زاد معنوياً من عدد الازهار والبتلات وقطر الزهرة والوزن الجاف للازهار والعمر المزهري للازهار اذ بلغت 8.00 زهرة . نبات⁻¹ و 33.42 بتلة .زهرة⁻¹ و 5.27 سم و 2.28 غم و 7.67 مقارنة بمعاملة عدم الرش والتي أعطت أقل معدل بلغ 4.00 زهرة . نبات⁻¹ و 22.67 بتلة .زهرة⁻¹ و 2.43 سم و 0.67 غم و 4.12 يوم و على التوالي.

المناقشة

أظهرت نتائج جداول (2، 3، 4) وجود زيادة معنوية في جميع المؤشرات المدروسة نتيجة رش مستخلص الخميرة الجافة على النبات، وقد يعود سبب ذلك الى احتواء مستخلص الخميرة على العديد من العناصر المعدنية والمواد المغذية ومنها عنصر النتروجين الذي له دور مهم في العمليات الحيوية التي تجري في النبات ومنها دخوله مباشرة في تركيب جزيئة الكلوروفيل مع عنصر المغنيسيوم مما يعمل على زيادة محتوى الاوراق من الكلوروفيل الكلي، اضافة دورة في تكوين الاحماض الأمينية في النبات والتي تعد الوحدات الاساسية لبناء البروتينات والانزيمات الذي ينعكس ايجابياً على زيادة انقسام واستطالتها الخلايا وبالتالي زيادة عدد البراعم الجانبية (21) مما يؤدي الى زيادة ارتفاع النبات وعدد الاوراق، وكذلك الانزيمات لذا فهو يدخل في اغلب الخطوات المرتبطة بتفاعلات البروتوبلازم و عمليات التركيب الضوئي (22)، واحتوائها ايضا على مواد محفزة للنمو مثل فيتامين B₁ والذي يعد كمرافق أنزيمي في عمليات مهمة كالنتفس وإنتاج ATP وكلاهما يعملان على تنشيط عملية البناء الضوئي وزيادة تصنيع المواد الكربوهيدراتية ومنها السكريات مما يؤدي الى زيادة محتوى الاوراق من الكربوهيدرات، وكذلك أحتواء مستخلص الخميرة على B₂ الذي دور مهم في بناء المرافقات الانزيمية المهمة التي لها اوار مختلفة في عمليات الأكسدة و الاختزال التي تحدث خلال عمليات ايضية حيوية عديدة في النبات وهذا ينعكس بالنهاية على تحسين نمو النبات اضافة الى ذلك فان زيادة الزن الجاف للمجموع الخضري قد يعود

- Wisconsin. Published by Van Nostrils Reinhold. New York. P.273.
22. محمد، عبد العظيم كاظم (1985). فسلجة نباتات. ج 2. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.
23. Robinson EA. (1973). Vitamins .In. P. Miller Ed Photochemistry Law-Rence Van Nostrant Re-In hold Co. New York, Vol. III: 195-200.
5. المريقي، احمد جابر موسى. (2005). كيمياء نباتات البساتين. جامعة الإسكندرية، مصر.
6. Ferguson JJWT.; Allen LH. and Kock KE. (1987). Growth of CO₂ enriched sour orange seedling treated with gibberellic acid and cytokinins. Proc. Florida State. Hort. Soc. 99:37-39.
7. Ahmed FF.; Mkel AM. ; El-Morsy FM. and Ragab MA. (1997). The beneficial effect of biofertilizer on red roomy grape vine (*Vitis vinifera* L.) , the effect on growth and vine untrital status . Annal. Agric. Sci. Moshtohor. 35(1):489-495
8. Ahmed GA. (2004). Influence of active dry yeast addition on growth and volatile oil content of chamomile *Matricaria recutita*. Assiut J. Agric. Sci. 35(3):330-343.
9. جاسم، صدى نصيف. (2009). تأثير الرش بمعلق خميرة الخبز في النمو الخضري والزهري والعمر الزهري لنبات الفريزيا. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 40(1):110-119.
10. الشويلي، عبد الكاظم ناصر صالح . (2011). تأثير الرش بمعلق الخميرة النشطة وفيتامين B2 وموعد القرط في النمو وبعض المكونات الفعالة في نبات الحناء *Lawsonia inermis* L. رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة البصرة . العراق.
11. Asard H; May JM. and Sminoff N. (2004). Vitamin C Function and Biochemistry in Animals and Plants. New York Garland Science, BIOS scientific Publishers . USA.
12. Smirnoff N. and Wheeler GL. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 35:291-314.
13. Weaver LM. ; Gan S. ; Quirino B. and Amasino RM. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Molec. Biol. 37:455-469.
14. Dowdle J. ; Ishikawa T. ; Gatzek S. ; Rolinski S. and Smirnoff N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. Plant J. 52: 673-689.
15. Aziz EE. and Talaat EM. (2007). Influence of some antioxidants on growth flower heads and essential oil content of *Marticaria chamomilla* L. plant Annal. Agric. Sci. Moshtohor, 43(1): 395-404
16. الجابر، حيدر صبيح شنو (2010). تأثير عدد النباتات في الجورة الواحدة والرش بحامض الاسكوربيك في نمو و حاصل بذور الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. و بعض مكوناتها . مجلة ابحاث البصرة، 36 B (5): 88-97 .
17. الراشدي، غيداء عبد الله حسين (2010). تأثير بعض المعاملات في النمو والإزهار وحاصل الكورمات والكريمات لصنفين من نباتات الكلاديولس *Gladiolus X hortulanus* رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة الموصل. العراق.
18. الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله. (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل . العراق.
19. Goodwin TW. (1976). Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2nd ed. Academic Press, San Farnisco. USA, p. 373.
20. Dubois M.; Gilles KA.; Hamilton JK.; Rebers PA. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of Sugars and related substances . Anal. Chem. 28(3): 350-356.
21. Nagoda WT. (1991). Yeast technology universal foods corporation milwaukee.

الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور وبذور نبات *Cydonia oblonga* السفرجل على نمو بعض الأنواع البكتيرية الممرضة

رنا علي حسن سلمان

قسم الأحياء / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

الملخص باللغة العربية

اجريت الدراسة لاختبار فعالية المستخلص الكحولي لقشور وبذور نبات السفرجل *Cydonia oblonga* ضد نوعين من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* ونوعين من البكتيريا السالبة لصبغة غرام *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* بطريقة الانتشار بالحفر . حيث اظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي لقشور نبات السفرجل ذو فعالية عالية ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وكان التأثير يزداد مع زيادة التركيز وكذلك بالنسبة للبكتيريا السالبة لصبغة غرام . اما بالنسبة لمستخلص بذور نبات السفرجل اظهر تأثيرا عاليا على البكتيريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بلبكتيريا السالبة لصبغة غرام . حيث اظهر المستخلص تأثيرا على البكتيريا السالبة لصبغة غرام في التراكيز العالية فقط اما في التراكيز الواطئة انعدم التأثير . تم قياس قيمة MIC و MBC وجاءت النتائج تؤيد لما ذكر سابقا . من نتائج تأثير المستخلصين على نمو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام . تم اجراء تحليل HPLC لنبات السفرجل *Cydonia oblonga* وهو تحليل كمي ونوعي لقياس تركيز المركبات الفينولية 3,5-O-, 4-o-Caffeoyquinic acid, 3-o-Caffeoylquinic acid, Quinic acid, Kaempferol , Qurecetin, dieoffyl quinic acid Rutinoside حيث كانت نسبة بعض المركبات الفعالة المقاسة مرتفعة مقارنة مع العينة القياسية.

الكلمات المفتاحية: نبات السفرجل *Cydonia oblonga*، المستخلص الكحولي

Antimicrobial activity of ethanolic extracts of peel and seeds of *Cydonia oblonga* on growth of some species of pathogenic bacteria

Rana A. Hasan

College of sciences for Girls/ Baghdad University/ republic of Iraq

ABSTRACT

This study was conducted to test the activity of alcohol extract of the peel and seeds of *Cydonia oblonga* against *Bacillus cereus* , and two species of negative gram bacteria *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by agar well diffusion method. Results revealed that the alcohol extract have high level of activity against gram positive and negative bacteria, the effect increased with the increasing of the concentration . While the seeds extract has a high effect on gram positive bacteria compare with gram negative bacteria, which were affected only with high concentration. There is no effect in low concentration . MIC and MBC were measured and the results were identical for the previous results .for the effect of both extracts on the growth of gram negative and positive bacteria HPLC analysis was done for *Cydonia oblonga* to measure the concentration of some phenol compound Kaempferol, Quinic acid, 4-o-Caffeoyquinic acid, 3-o-Caffeoylquini acid, 3,5-O-dieoffyl quinic acid, Qurecetin, Rutinoside which be with high ratio compare with standard sample.

المقدمة

جمع العزلات البكتيرية
تم الحصول على العينات البكتيرية المشخصة والمعزولة من مختبرات كلية العلوم للنبات / قسم علوم الحياة في جامعة بغداد.

تحضير العالق البكتيري

استخدمت الطريقة التي ذكرها (11) وذلك بأخذ (4-5) مستعمرات نامية على وسط الاكار المغذي (NA) ووضعت في انبوبة اختبار حاوية على 10 مل من مرق مولر -هنتون (MHB) وحضنت بدرجة 37° لمدة 6 ساعات لحين ظهور العكورة المقارنة مع انبوبة ماكفورلاند 0.5 القياسية.

دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Agar well diffusion method (11) لدراسة تأثير المستخلص الكحولي لقشور السفرجل والمستخلص الكحولي لبذور السفرجل وذلك بنشر العالق البكتيري بحجم مقداره 0.1 مل على وسط مولر -هنتون اكار وبعدها عملت حفر في الوسط الغذائي الملقح بحجم 2 مل وبواسطة ماصة دقيقة ثم نقل 40 مايكروليتر من كل تركيز من المستخلص النباتي ووضع داخل الحفر وعملت اطباق سيطرة بوضع ماء مقطر بالحفر بدل المستخلص وقد عملت ثلاث مكررات لكل تركيز ثم حضنت الاطباق بدرجة 37° لمدة (24) ساعة وقرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بواسطة المسطرة والتي تبين منطقة عدم نمو البكتريا في تلك المنطقة .

تحليل (HPLC)

تم استخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة نوع Shimadzu 2010 وذلك لتشخيص المركبات الفعالة في قشور السفرجل ومنها Quinic acid, Quercetin, Rutinoside وغيرها حيث تم الفصل باستخدام عمود (18) C مع الميثانول كطور متحرك وتم التحري بواسطة مطياف طوله الموجي 270 nm في عمود HPLC وتم تحديد تركيز تلك المركبات الفعالة مقارنة مع منطقة الذروة Peak area للعينة القياسية وتم حساب تركيز المركبات الفعالة حسب المعادلة التالية:

$$\text{Concentration (microgram/ml)} = \frac{\text{area of sample}}{\text{area of standard}} \times \text{conc. of standard}$$

تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC)

تم استخدام طريقة التخفيف بالانابيب لتحديد MIC للمستخلص الكحولي لقشور السفرجل والمستخلص الكحولي لبذور السفرجل أذ تم تحضير تخافيف نصفية من التركيز 200 ملغم/مل. استخدم وسط مرق مولر -هنتون MHB ثم اضيف 0.1 مل من المستخلص وبالاتراكيز المختلفة المحضرة من التركيز 400 ملغم/مل كالتالي 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ملغم/مل الى انابيب تحتوي على 9.8 مل من مرق مولر -هنتون MHB ثم لقت الانابيب بـ 0.1 مل من العالق البكتيري تركيز 1.5×10⁸ خلية /مل .

اصبحت التراكيز كالتالي 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 ملغم/مل ثم حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة وقرئت النتائج مقارنة مع انبوبة السيطرة مضاف لها 0.1 مل من المذيب DMSO (12). اما لتحديد التركيز القاتل الأدنى MBC فقد تم اخذ 0.1 مل من الانابيب خالية العكورة ووزعت على وسط اكار مولر -هنتون MHA بطريقة النشر وحضنت الاطباق بدرجة 37° لمدة 24 ساعة وتم تحديد قيمة MBC (12).

ينتمي نبات السفرجل (Cydonia oblonga) الى العائلة الوردية (Rosaceae) التي تحتوي على الكثير من الاجناس والانواع والتي تنتشر زراعتها في منطقة البحر المتوسط شرقا وغربا وتنتشر زراعة السفرجل كذلك في اليمن وسوريا والعراق وايران (1). وثمار السفرجل بسيطة صفراء اللون والازهار بيضاء او وردية تجمع في فصل الشتاء في شهري تشرين الاول والثاني ويؤكل نيئا او يصنع منه المربى (2).

يحتوي نبات السفرجل بشكل كبير على الماء ويحتوي على بروتينات ودهون وعناصر مهمة مثل الكالسيوم والكلور والكبريت والفسفور والبوتاسيوم وكذلك مواد عصفية ويكتين ، ويتألف السفرجل من مركبات فينولية تتواجد في القشور والبذور والثمار والاوراق حيث يشمل تسعة مكونات هي (3-O,4-O,5-O-) caffeoylquinic acids, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-rutinoside, Kaempferol-3-O-glycoside, rutinoid-5-O-caffeoylquin acid) glycoside, Kaempferol-3-O-glucoside, and Kaempferol-3-O-rutinoside. 5-O-caffeoylquin acid) (3).

تعد ثمار السفرجل من المواد المضادة للتأكسد (4). يستخدم السفرجل في علاج الزحار والاسهال والالتهابات المعوية كما ويستعمل في تخفيض درجة حرارة الجسم ومنع الاجهاض كما انه مزيل للسعال والربو وطارد للبلغم ومقوي للقلب ومدر للبول (5)، وفي تجارب اجريت على جلد الفئران لمعرفة قابلية مستخلص اوراق نبات السفرجل على معالجة الحساسية اثبت المستخلص كفاءته في المعالجة عند استخدامه كدهان للجلد كما انه يعتبر معالجا جيدا لقروح الفم (6)، وفي تجارب اخرى اجريت على الفئران اثبت فيها ان مستخلص اوراق نبات السفرجل يقوي وينشط الجهاز المناعي (7).

وفي تجارب اخرى اجريت على الاسماك اثبتت ان مستخلص اوراق نبات السفرجل يعتبر مشنطا ومقويا للجهاز المناعي (8). هدفت الدراسة الحالية إلى التعرف على تأثير المستخلص الكحولي لكل من بذور وقشور السفرجل على البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام وكذلك لبيان امكانية استخدام الفواكه والاعشاب كبديل عن المضادات الحيوية التي تحتوي على مواد كيميائية.

المواد وطرائق العمل

العينات النباتية

تم الحصول على عينات ثمار نبات السفرجل (Cydonia oblonga) من الاسواق المحلية في بغداد وتم تشخيصه حسب ماورد في (9)، وجففت القشور والبذور بدرجة حرارة الغرفة 25°م ثم طحنت للحصول على مسحوق ناعم وجاف.

تحضير المستخلص الكحولي للقشور والبذور

تم اخذ 10 غرام من مسحوق القشور والبذور الجاف والمطحون ووضع كل منهما في دورق ثم اضيف لكل منهما 100 مل من الكحول الايثيلي بتركيز 80% اي بنسبة 1:10 وزن/حجم . وضع الدورق في حمام مائي هزاز بدرجة 37°م حضرت المستخلصات النباتية حسب ماورد في (10)، حيث استمرت عملية الاستخلاص من (5-6) ساعات وبعد ذلك يرشح المزيج بواسطة ورق ترشيح Whatman No.1 ثم وزع الراشح في انابيب جهاز النبد المركزي بسرعة 4000 دورة للدقيقة ولمدة 10 دقائق . يأخذ الرائق ويوضع في اطباق زجاجية نظيفة في الحاضنة بدرجة 37°م لحين الحصول على المستخلص الجاف.

من خلال الجدول رقم 1 و 2 نلاحظ ان المستخلص الكحولي للقشور كان اكثر تأثيرا من المستخلص الكحولي للبذور وهذا يطابق ما ذكره (14). ويعزى السبب في ذلك الى ان القشور قد تحتوي على مركبات اكثر فعالية من المركبات التي تحتويها البذور وكذلك قد تكون نسب تركيز المواد الفعالة في القشور اكثر من البذور حيث ان تلك المركبات لها دور كبير في تثبيط نمو البكتيريا او الاحياء المجهرية بصورة عامة (15). كذلك من الملاحظ ان كلا المستخلصين لهما تأثير اكبر على البكتيريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة مع البكتيريا السالبة لصبغة غرام وهذا ما تؤكد عليه اغلب البحوث بهذا الصدد (16)، وقد يعزى السبب الى اختلاف جدار البكتيريا لكلا النوعين حيث البكتيريا الموجبة لصبغة غرام ذات تركيب بروتيني اما البكتيريا السالبة لصبغة غرام ذات جدار دهني وغيرها من الاسباب الاخرى (17). ان المستخلص الكحولي لكلا المادتين البذور والقشور لهما القابلية على تثبيط البكتيريا وبشكل كبير فالسفرجل بكل اجزاءه يعتبر مادة مضادة للاحياء المجهرية (18)، ان القشور والبذور تحتوي على مواد كثيرة مثبطة للبكتيريا لكن اهمها المركبات الفينولية والتي تحتوي على 9 مكونات والتي اثبتت قدرتها على تثبيط الانواع البكتيرية المختلفة وكذلك هي مادة مانعة للتأكسد (19). ان تأثير المستخلصات على تثبيط نمو البكتيريا يكون بأشكال مختلفة فمنها قد يؤثر على تكوين الجدار او نفاذية الاغشية او تصنيع البروتينات والاماض النووية الـ DNA و RNA (20).

يوضح كل من جدول رقم 3 و 4 نتائج التحري عن قيم MIC و MBC حيث بينت النتائج في الجدول رقم (3) ان قيم MIC والذي يعبر عن اقل تركيز يمنع نمو البكتيريا كان 0.1 ملغم/مل لبكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و 0.2 ملغم/مل لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* و MBC التي تعبر عن اقل تركيز من المستخلص يقلل عدد المستعمرات البكتيرية كانت 0.2 ملغم/مل لبكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و 0.4 ملغم/مل لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* اما قيم MIC و MBC للبكتيريا السالبة *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* لمستخلص بذور السفرجل. هذه النتيجة كانت مؤكدة للنتائج السابقة لاختبار الحساسية بطريقة الانتشار بالحفر القيم التي لم تحدد قديكون سببها احتياجها الى تراكيز اعلى لتحصل عملية التثبيط ومن هنا يتبين ان المستخلصين كانا مؤثرين اكثر بالبكتيريا الموجبة لصبغة غرام اكثر من البكتيريا السالبة لصبغة غرام قد نحتاج الى تراكيز اكبر للحصول على نتائج ايجابية.

يوضح جدول رقم (5) والشكلان (1 و 2) مقارنة لتركيز المركبات الفعالة لقشور نبات السفرجل بتحليل HPLC نظرا لظهور مستخلص قشور نبات السفرجل كمادة مضادة بشكل فعال ضد الانواع البكتيرية الممرضة. قمنا بدراسة تراكيز المواد الفعالة في القشور من خلال اجراء تحليل HPLC حيث قام الجهاز بتحليل المركبات الفينولية وقام باستخراج تراكيز 7 مكونات فعالة متواجدة في القشور ومن خلال الجدول يوضح كمية التراكيز فلقد ظهرت اقل نسبة للمركب Kaempferol بنسبة 39.9 ملغم/مل اما بقية المكونات فظهرت بنفس التركيز اما الشكل (2) يوضح Retention time مقارنة مع الشكل (1) حيث من الملاحظ ارتفاع اغلب نسب المواد الفعالة في السفرجل بالنسبة للعينات القياسية.

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج بدراسة الفعالية المضادة للمستخلص ضد العزلات البكتيرية باستعمال البرنامج الإحصائي Statistical Analysis SAS- System (2010) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العزلات والتركيز في قطر منطقة التثبيط المدروسة، وفورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) (13).

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول رقم (1) نتائج المستخلص الكحولي لقشور نبات السفرجل على اربع انواع بكتيرية المتمثلة بـ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) فقد اشارت النتائج لوجود فروقات معنوية بين تأثير الانواع البكتيرية الممرضة بالمستخلص وكذلك وجود فروقات معنوية للتركيز المختلفة تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$).

جدول رقم (1): الفعالية الحيوية للمستخلص الكحولي لقشور نبات السفرجل تجاه نمو بعض الانواع البكتيرية

الانواع البكتيرية	التركيز (ملغم/مل)				قيمة LSD
	50	100	200	400	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.75±1.25	27.25±1.25	30.75±0.75	34.75±0.75	*4.047
<i>Bacillus cereus</i>	19.75±0.75	23.50±1.00	28.50±0.50	33.50±1.50	*3.957
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.50±1.50	15.00±2.00	19.00±1.00	23.75±1.25	*5.828
<i>E. coli</i>	8.75±1.25	12.25±0.75	16.75±1.25	21.00±2.00	*5.443
قيمة LSD	*4.783	*5.240	*3.606	*5.681	-----
* ($P < 0.05$).					

بينت النتائج ان المستخلص الكحولي لقشور نبات قشور السفرجل كان فعالا ضد البكتيريا حيث تراوحت اقطار التثبيط لبكتيريا الموجبة لصبغة غرام بين (20.75±1.25, 34.75±0.75) ملغم/مل ولبكتيريا *Staphylococcus aureus* و (33.50±1.50, 19.75±0.75) مل لبكتيريا *Bacillus cereus* اما بالنسبة للبكتيريا السالبة لصبغة غرام فقد تراوحت مناطق قطر التثبيط بين (9.50±1.50, 23.75±1.25) مل لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و (8.75±1.25, 21.00±2.00) مل لبكتيريا *E. coli* كما يوضح جدول رقم (2) نتائج تأثير المستخلص الكحولي لبذور نبات السفرجل على اربع انواع بكتيرية ممرضة المتمثلة بـ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) بينت النتائج وجود فروقات معنوية بين تأثير الانواع البكتيرية الممرضة بالمستخلص وكذلك وجود فروقات معنوية للتركيز المختلفة تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$). حيث كان المستخلص فعالا ضد البكتيريا اذ تراوحت اقطار مناطق التثبيط للبكتيريا الموجبة لصبغة غرام بين (14.25±0.75, 31.5±0.50) مل لبكتيريا *Staphylococcus aureus* و (12.25±0.75, 24.25±0.75) مل لبكتيريا *Bacillus cereus* اما البكتيريا السالبة لصبغة غرام فقد ظهر تأثير المستخلص فقط في التراكيز العليا حيث بلغت في تركيز 200, 400 ملغم/مل (6.25±0.75, 11.00±1.00) مل لبكتيريا *E. coli* و (5.25±1.25, 9.50±1.50) مل لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي اما التراكيز الدنيا فلم تظهر تأثيرا للمستخلص.

جدول رقم (2): الفعالية الحيوية للمستخلص الكحولي لبذور نبات السفرجل تجاه نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة

قيمة LSD	التركيز (ملغم/مل)				الانواع البكتيرية
	50	100	200	400	
*2.643	14.25±0.75	20.00±1.00	27.00±0.00	31.5±0.50	<i>Staphylococcus aureus.</i>
*3.970	12.25±0.75	15.05±1.55	20.75±0.75	24.25±0.75	<i>Bacillus cereus</i>
*2.454	0.00±0.00	0.00±0.00	6.25±0.75	11.00±1.00	<i>E.coli</i>
*3.833	0.00±0.00	0.00±0.00	5.25±1.25	9.50±1.50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-----	*2.082	*3.621	*3.218	*3.957	قيمة LSD
. (P<0.05) *					

جدول رقم (3): التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) للمستخلص الكحولي لقشور نبات السفرجل ضد الانواع البكتيرية الممرضة

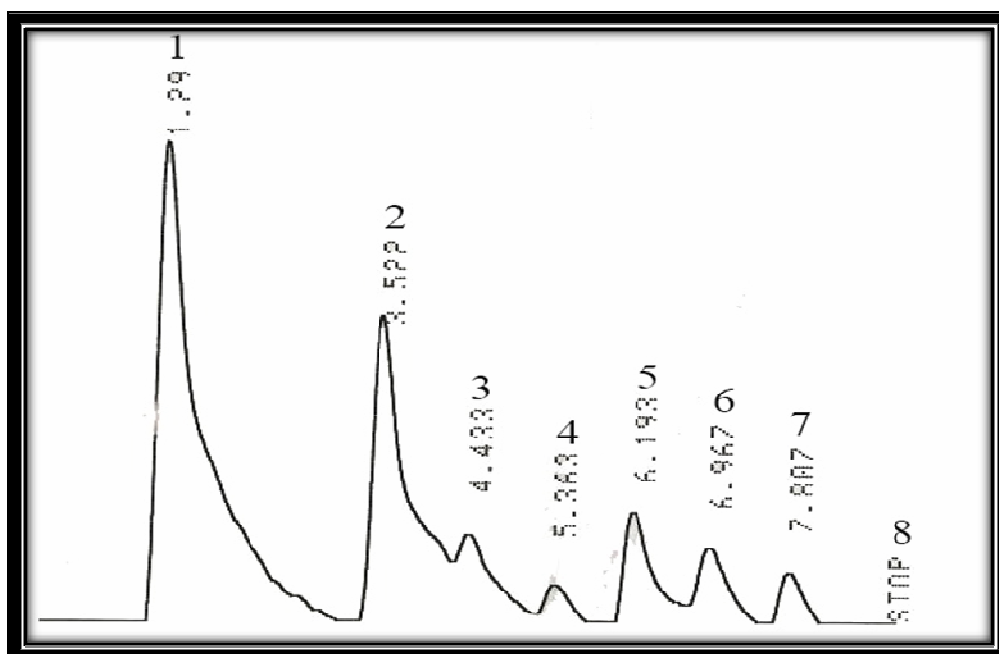
الانواع البكتيرية	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	0.2
<i>Bacillus cereus</i>	0.1	0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.2	0.4
<i>E.coli</i>	0.2	0.4

جدول رقم (4): التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) للمستخلص الكحولي لبذور نبات السفرجل ضد الانواع البكتيرية الممرضة

الانواع البكتيرية	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	0.2
<i>Bacillus cereus</i>	0.2	0.4
<i>E.coli</i>	-----	-----
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-----	-----

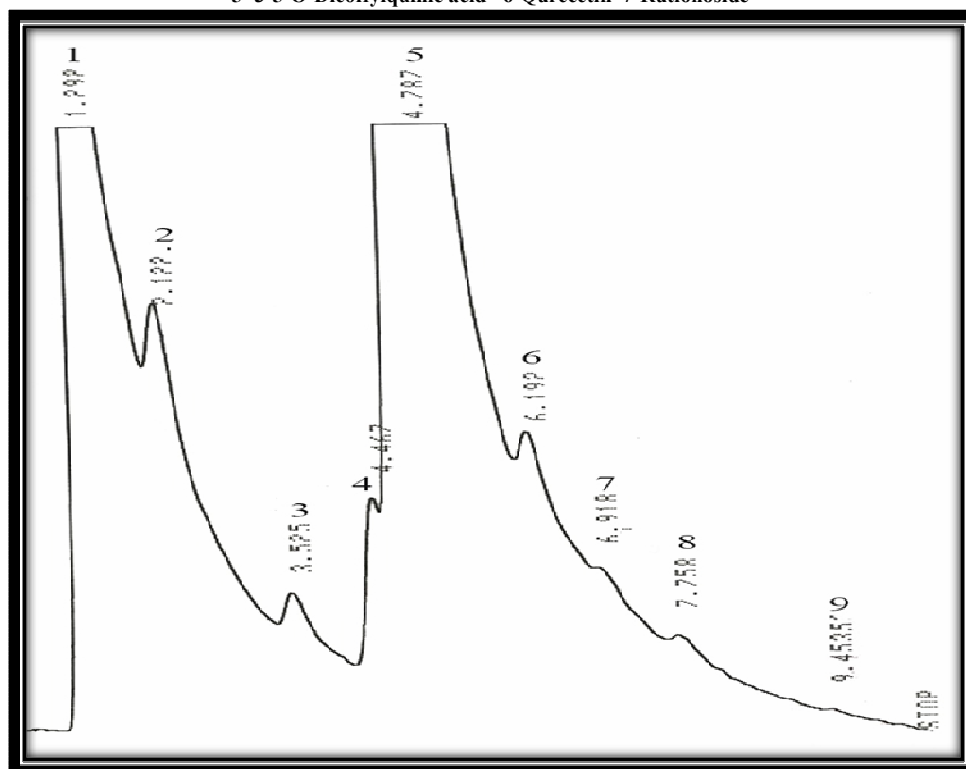
جدول رقم (5): مقارنة تركيز بعض المركبات الفعالة لقشور نبات السفرجل بتحليل HPLC

المركبات الفعالة	Retention time للعينة القياسية	Retention time للعينة المقاسة	تركيز العينة (Mg/ml) con المقاسة
Kaempferol	1.29	1.29	39.9
Quinic acid	3.52	3.52	40
3-o-Caffeoylquinic acid	4.43	40.46	40
4-o-Caffeoyquinic acid	5.36	4.78	40
3,5-O-dieoffyl quinic acid	6.19	6.19	40
Qurecetin	6.96	6.91	40
Rutinoside	7.80	7.75	40



شكل رقم (1): تركيز المركبات الفعالة للعينة القياسية المحللة بتحليل HPLC

1-Kaempeerol 2- Quinic acid 3- 3-O-Caffeoylquinic acid 4- 4-O-Caffeoylquinic acid
5- 3-5-O-Dieoffylquinic acid 6-Qurecetin 7-Rutionoside



شكل رقم (2): تركيز المواد الفعالة في قشور السفرجل المقاسة بتحليل HPLC

1-Kaempeerol 2- Quinic acid 3- 3-O-Caffeoylquinic acid 4- 4-O-Caffeoylquinic acid
5- 3-5-O-Dieoffylquinic acid 6-Qurecetin 7-Rutionoside

13. SAS.(2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9. 1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
14. Banjar S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. J.Ethnopharmacol.94:301-305.
15. Fattouch S. and Caboni P.(2007).Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* miller) plup and peel polyphenolic extracts .J. Agr. Food Chem.55:963-969.
16. SAS.(2004). Sasstat users guide for personal computers release 6.12.SAS.inst.inc.cary .N.C.USA.
17. Smith-palmer A.; Stewart J. and Free L.(1998). Antimicrobiol properties of plant essential oil and essences against five important food borne pathogens. let.app.microbiol .26:118-112.
18. Hemmati AA.; Kalantari H. and Rezaio S.(2010). Healing effect of quinc seedmucilage on T-2toxin-induced dermatotoxicity in rabbit. Exp.toxicol.pathol.23(5): 101-116.
19. Costa RM.; Magalhaes AS.; Andruae PB. and SilvaAM.(2009). Evaluation of free radical –scavenging and anthemolytic activities of quince *Cydonia oblonga* leaf :A comparative study with green tea(camella sinensis). food chem. Toxicol. 47:860-865.
20. Chao SC.; Young DG. And Obery CJ.(2000). Screening for inhibitory of essential oil on selected bacteria ,fungi and viruses. J. Essent. Oil. Res.12:639-649.
21. Chaudhuri S.; Sengupta B. and Banerjee A.(2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipid and proteins :antioxidant and antihemolytic effect. Int.J. biol. macromol.41:42-44.

هذه الطريقة تستخدم للتحري النوعي والكمي للمركبات الفعالة في قشور السفرجل لكون تلك المركبات هي المركبات الفعالة التي لها دور كبير في تثبيط نمو الانواع البكتيرية الممرضة وهذا يتفق مع ما ذكره (21) . ان هذه النتائج تبين ماهي فعالية النباتات في تثبيط البكتيرية الممرضة من خلال ماتحتويه النباتات والفواكه من مركبات فعالة تجعلها ضرورية وذات اهمية اكثرمن استخدام المضادات الحيوية ذات التراكيب الكيميائية في علاج كثير من الاصابات البكتيرية.

المصادر

1. Sancheti S.;Bafna M. and Yumseo S.(2010). Antihyperglycemic,antihyperlipidemic , antioxidant effects of chaenomeles sinensis fruit extraction streptozotoin-induced diabetic rats. Europ. Food. Res. Technol. 231:415-421.
2. Ghanadi AR.(2003) In:Iranian herbal pharmacopoeia(in farsi) Tehran. Ministry of Health and Medical Education Press.pp.176-182.
3. Goryi A.(2003). Pharmacological treatment of headache using traditional Persian medicine. pharm. Sci.24:331-334.
- 4.Oliveira AP.; Pereir JA.; AndradeP B.;Valentao P. and Silva BM.(2007). Phenolic profile of *Cydonia oblonga* miller leaf. J.Agr. Foodchem. ss:7926-7930.
5. Khoubanasabjafar M. and Joughban A.(2011).A review of phytochemistry and bioactivity of quince *Cydonia oblonga* mill. J. med. plants res. 5(16):3577-3594.
6. Shinomiya F.;Hamauzu Y. and Kawahara T.(2009). Anti-allergic effect of ahot-water extract of quince *Cydonia oblonga* biosci. biotechnol. biochem. 73:1773-1778.
7. Alaa GM.; Koutb M. and Sayed A.(2010). Use of hematological parameters to assess the efficiency of quinc *Cydonia oblonga* mill er leaf extract in alleviation of the effect of Ultraviolet –aradiation on African catfish clarias gariepinw. J. photochem. Photobiol. 99:1-8.
- 8.Atlas RM.; Brown AE. And Parks LC.(1995). Laboratory manual of Experimentals Microbiology.Mosbey company-yearbook,inc. St.Louis :563.
9. Rani I.; Akhaud SH.; Suhail M. and Abro H.(2010). Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*. Pakistan J.Bot.42(4):2949-2953.
10. النعمان ، أدبية يونس شريف حمو . (1998) .التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وإيض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرام . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.
11. Jorgensen JH.; Turnide SD. And Wasington JA.(1999). Antibacterial susceptibility test dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical Microbiology .7th ed. Whashington DC. ASM press 1526-1543.
12. الألوسي، ثائرعبدالقادر صالح . (2005) . تأثير بعض المستخلصات النباتية على الاطوار اليرقية لبعوض *Culex quinquefasciatus* (Diptera:culicidae) . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الانبار .