

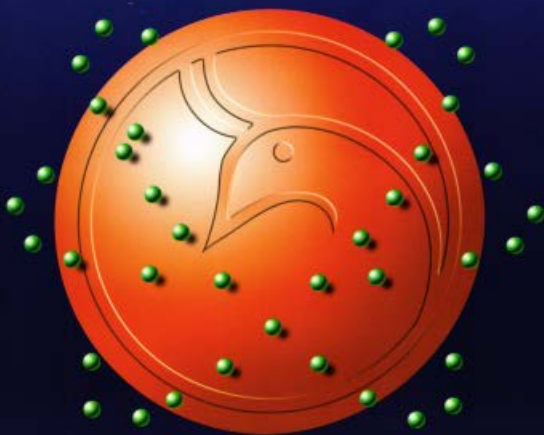


Al-Mustansiriyah

ISSN 1814 - 635X

Journal of Science

Vol. 22, No. 1, 2011



Issued by College of Science - Mustansiriyah University

Vol. 22
No. 1
2011

Al- Mustansiriyah Journal of Science

Issued by College of Science- Al- Mustansiriya
University

Head Editor

Prof. Dr. Redha I. AL-Bayati

General Editor

Asst. Prof. Dr. Ikbal khider Al- joofy

Editorial Board

Dr. Iman Tarik Al -Alawy	Member
Dr. Inaam Abdul-Rahman Hasan	Member
Dr. Awni Edwar Abdulahad	Member
Dr. Majid Mohammed Mahmood	Member
Dr. Ramzy Rasheed Al-Ani	Member
Dr. Hussain Kareem Sulaiman	Member
Dr. Saad Najm Bashikh	Member

Consultant Committee

Dr. Yosif Kadhim Al-Haidari	Member
Dr. Tariq Salih Abdul-Razaq	Member
Dr. Mehdi Sadiq Abbas	Member
Dr. Abdulla Ahmad Rasheed	Member
Dr. Hussein Ismail Abdullah	Member
Dr. Muhaned Mohammed Nuri	Member
Dr. Monim Hakeem Kalaf	Member
Dr. Amir Sadiq Al-Malah	Member
Dr. Tariq Suhail Najim	Member

Mobile: 07711184399
e-mail: mustjsci@yahoo.com

INSTRUCTION FOR AUTHORS

1. The journal accepts manuscripts in Arabic and English languages. Which had not been published before.
2. Author (s) has to introduce an application requesting publication of his manuscript in the journal. Four copies (one original) of the manuscript should be submitted. Should be printed by on the computer by laser printer and re produced on A4 white paper in three coppice with floppy disc should be also submitted.
3. The title of the manuscript together with the name and address of the author (s) should typed on a separate sheet in both Arabic and English. Only manuscripts title to be typed again with the manuscript.
4. For manuscripts written in English, full name (S) of author (s) and only first letters of the words (except prepositions and auxiliaries) forming title of the manuscript should be written in capital letters. Author (s) address (es) to be written in small letters.
5. Both Arabic and English abstracts are required for each manuscript. They should be typed on two separate sheets (not more then 250 words each).
6. References should be denoted by a number between two bracket on the same level of the line and directly at the end of the sentence. A list of references should be given on a separate sheet of paper, following the interactional style for names and abbreviations of journals.
7. Whenever possible, research papers should follow this pattem: INTRODUCTION, EXPERIMENTAL (MATERIALS AND METHODS), RESULTS AND DISCUSSION, and REFERENCES. All written in capital letters at the middle of the page. Without numbers or underneath lines.
8. The following pattern should be followed upon writing the references on the reference sheet: Sumame (s), initials of author (s), title of the paper, name or abbreviation of the journal, volume, number, pages and (Year). For books give the author(s) name(s), the title, edition, pages, publisher, place of publication and (Year).
9. A publication fees in the amount of ID. 25 thousand is charged upon a Receipt of the paper and 25 thousand upon the acceptance for publication for their ID. 50 thousand should be paid for the editorial board.

CONTENTS

ITEM	Page No.
Theoretical Study for Solid Solution using The Classical Phonon Transport Model Dheyaa Badr Habash and Ahmed Saleh Mahdi	1-6
Detection of Serum anti-p53 Antibodies in Breast Cancer Patients Ahmed A. Al-Hassan, Mosadak I. shakeeb , Batool H. Al-Ghurabi Mohammed O. Hamzah, and Ahmid hamed kadhim	7-12
Study of Antibacterial Activity of <i>Callistemon citrinus</i> Leaves Extract on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Faris A. Al-Hilli, Nazar E. Nasser, and Kadhim H. Zwain	13-22
Bacteriological Study of <i>Staphylococci</i> Species in Acne: Antibiotics Susceptibility and Honey Effect Ammar Riyadh Qasem	23-32
Hepatitis B Seroprevalence in Ten Iraqi Governorates Mohammed A.Saleh, Ali R. Omer , Atallah M. Al-Salmani, and Suzain A.Karrem	33-42
Antimicrobial Susceptibility Patterns of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> among urinary tract infections Shrooq rayes, Suhad Faisul Hatim, and Ishraq Hassan	43-50
Prospective Study on Functional Outcome of Intra Articular Hyaluronic Acid with Oral Glucosamine and Chondroitin Sulfate Compared to Intra Articular Hyaluronic Acid Alone for Treatment of Osteoarthritis of Knee Joint Ahmed Alkhuzai, Seerwan Hama Shareef, and Zeyad Mustafa	51-62
Spectrophotometric Determination of Phenoxazine in Water Using Miceller Mediums Karim Dema Khalaf	63-68
Synthesis of Some New 1, 3, 4-Thiadiazole Containing Diamidic Moieties Redha I. AL-Bayati , Mahmoud A, J- AL- Issa and Sarah M.Salman	69-76
Synthesis and characterization of some new Diazahomoadamantan Derivatives Abdel-Amir M. Fenjan and Shukkur A. H.	77-86
Synthesis of 2-(4-Bromophenyl)-4H-1,3-Benzodioxin-4-One Derivatives Redha I.H.AL-Bayati, Mohammed Z.Thani, Wafaa F.Rodhan, and Ismaa M.Abdullah	87-94
The Factors Effect of IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) Extraction by Crown Ether (18C6) Hadi H. Jasim	95-102
The Thermal Degradation of Some Cellulosic Materials Mohammed H.A. Al-Ameri and Wadahe W.N. Jassime	103-114

Modification Approach Method for RC4 Using 2D Wavelet Transform Hala B. Abdul Wahab and Maisaa A. Khodher	115-128
Study the Effect of Thickness on Optical Properties of Sb_2O_3 Thin Films Ali H. Abed ¹ , Ehssan S. Hassan, and Nihaya M. Theeb	129-138
Measurement of Radon Concentration in Henna Plant Using Etched Track Detectors Dawser Hussain Ghayb	139-144
Investigation of the Dielectric Behavior and A.C. Conductivity of Cd_2SnO_4 Compound Salma M. Shaban, Bushra S. Mahdi, And Raad M. Saleh Al-Haddad	145-154
A Study A Study of Edge Detection Filter Ali A. Al-Zuky and Haidar J. Al- Taa'y	155-160
Separable Variable Metric Updates For Large Scale Optimization Abbas Y. AL-Bayati and Basim A. Hassan	161-178
ON c-L SPACES Haider J. Ali and Arkan J. Mohammed	179-184

Theoretical Study for Solid Solution using The Classical Phonon Transport Model

Dheyaa Badr Habash¹ and Ahmed Saleh Mahdi²

¹University of Misan , College of Science, Department of Biology, Misan, Iraq

²University of Basra , College of Education, Department of Physics, Basra, Iraq

Received 23/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

تم حساب التوصيل الحراري الشبكي للمحاليل الصلبة لكل من النتروجين النقي والنتروجين المشوب بأحادي
أكسيد الكربون في مدى درجات الحرارة (14-25.5) درجة مطلقة باستخدام النموذج الكلاسيكي للانتقال
الفونوني $[K=(A+BT)^{-1}]$ ، كما تم استخدام هذا النموذج في درجات الحرارة العالية لعينات المحاليل الصلبة
لاوكسيد اللانثانيوم-أكسيد الثوريوم في مدى درجات الحرارة (373-1773) درجة مطلقة. وقد تم الحصول
على تطابق جيد مع القيم العملية، حيث أنجز ذلك باستخدام عوامل الضبط.

ABSTRACT

The lattice thermal conductivity of pure nitrogen and carbon monoxide doped nitrogen crystals solid solutions has been calculated over the temperature range (14-25.5 K) by using the classical phonon transport model $[K=(A+BT)^{-1}]$, which is used over the high temperature for the thorium oxide-lanthanum oxide solid solutions samples at the temperature range (373-1773 K). Good agreement with the experimental data achieved by using the adjustable parameter.

INTRODUCTION

Mutual solid solution of nitrogen and carbon monoxide is a unique object in terms of phonon spectroscopy investigation. The main reason for phonon interaction with foreign admixture molecule-the difference of masses of the host and the impurity molecule-is absent from that system[1].

Stachowiak and et. al.[2] has been investigated the lattice thermal conductivity of natural nitrogen over the temperature ranges (1.2-38 K). The result of the experimental below (14 K) can be well described by integral equation obtained by the method of Callaway[3], but they cannot get any agreement at temperature($T > 14$ K).

Stachowiak and et. al.[1] measured the thermal conductivity of pure nitrogen and carbon monoxide doped nitrogen for samples containing up to 50% of Co in the temperature range(1.2-26 K). They was applied Callaway method [3] to analysis the experimental data of pure nitrogen and nitrogen with concentration(0.7% and 1.5%) of Co, they obtained a good agreement with the experimental data of this samples at temperature range (1.2-14 K), but this method failed to analyze these experiment data at ($T > 14$ K), because of the dependence on relaxation rate of umklapp processes (τ_u^{-1}) which becomes weaker than that used during the fitting procedure and given by equation(1).

$$\tau_u^{-1} = a_{1u} x^2 T^2 \exp\left(-\frac{a_{2u}}{T}\right) \dots\dots(1)$$

The parameter $\chi = \frac{\hbar\omega}{KT}$, T is temperature, a_{iu}, a_{2u} is adjustable parameter.

In the present work, we applied the classical phonon transport model $[K=(A+BT)^{-1}]$ [4] to calculate the lattice thermal conductivity of solid solution to pure and carbon monoxide doped nitrogen crystals containing 0.7% and 1.5% of Co in the temperature range (14-25.5 K).

Mathematical Description

The classical phonon transport model can be represented in the equation (2):

$$k = [A + BT]^{-1} \quad \dots \dots (2)$$

Where, A correspond to lattice defect thermal conductivity, arising from the scattering of phonons by lattice defect, impurities, isotopic or other mass differences as well as bulk defects such as grain boundaries in the samples, etc., while B is the intrinsic lattice thermal conductivity, arising from the phonon-phonon scattering interactions such as umklapp processes.

RESULTS AND DISCUSSIONS

By using the classical phonon transport model we can analysis the lattice thermal conductivity of solid solution to pure nitrogen and nitrogen doped with concentration 0.7% and 1.5% Co in the temperature range (14-25.5 K).

Figures (1,2 and 3) appearing best fitting of the present work by using the adjustable parameters, which it show in table (1), with the experimental data[2], especially at this range of high temperature compared with the Callaway model which is used by Stachawiak and et. al.[1].

The largest difference in the percentage change between two theoretical models (Callaway and the present work) according to the equation(3) can be represented in fig.(4).

$$\% \& k = \left| \frac{k_{call.} - k_{p.w.}}{k_{call.}} \right| \times 100\% \quad \dots \dots (3)$$

Where $k_{p.w.}, k_{call.}$ represent the thermal conductivity values of present work and Callaway model consecutively. These percentage change reached to higher than (238% at $T=25.2K$, 165% at $T=22K$, and 257% at $T=25.5K$) for the samples (N_2 , N_2 with 0.7% of CO and N_2 with 1.5% of CO) consecutively.

We taking some samples of the thorium oxide–lanthanum oxide solid solutions (ThO_2 , $Th_{0.98}La_{0.02}O_2$ and $Th_{0.96}La_{0.04}O_2$) at temperature range (373-1773 K)[5] to improve the success classical phonon

transport model for analysis the lattice thermal conductivity of solid solution at high temperatures, and we got a best fitting with experimental data[5] by using the adjustable parameters, which appearing in table(2), see fig.(5). This agreement with number of studies for solid solution at high temperature ranges[6-11].

The classical phonon transport model has been applied to calculate the lattice thermal conductivity of solid solution to (pure N_2 , $N_2+0.7\%$ Co and $N_2+1.5\%$ Co) in the temperature range (14-25.5 K).

Good agreement between the present work by using the classical phonon transport model with the experimental data at this range of temperature comparing with the Callaway model, which is show a large different according to the results of percentages change, which appearing in the previous figures, and success the classical phonon transport model to analyze the lattice thermal conductivity of solid solution at high temperature, when we applying this model on the samples (ThO_2 , $Th_{0.98}La_{0.02}O_2$ and $Th_{0.96}La_{0.04}O_2$) at the temperature range (373-1773 K) and getting best fitting with experimental data.

Table -1: The adjustable parameters values calculated and used for theoretical curves of present work to pure nitrogen and carbon monoxide doped nitrogen crystals solid solution.

Samples	A(m. K /W)	B(m/W)
Pure N_2	1.00×10^{-2}	1.200×10^{-1}
$N_2+0.7\%Co$	1.00×10^{-3}	1.185×10^{-1}
$N_2+1.5\%Co$	1.00×10^{-3}	1.2×10^{-1}

Table -2: The adjustable parameters values calculated and used for theoretical curves of present work to thorium oxide –lanthanum oxide solid solution.

Samples	A(m. K /W)	B(m/W)
ThO_2	2.00×10^{-2}	1.80×10^{-4}
$Th_{0.98}La_{0.02}O_2$	3.50×10^{-2}	2.40×10^{-4}
$Th_{0.96}La_{0.04}O_2$	5.50×10^{-2}	3.00×10^{-4}

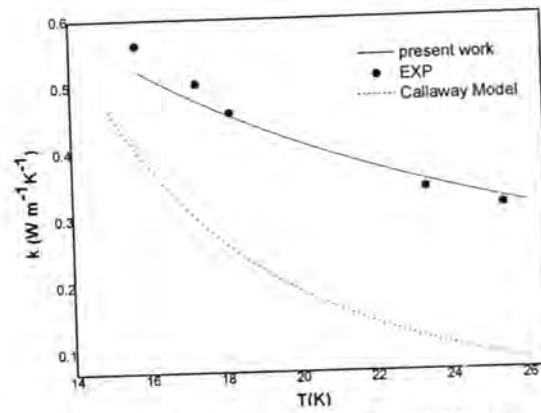


Fig-1: Thermal conductivity of pure nitrogen solid solution.

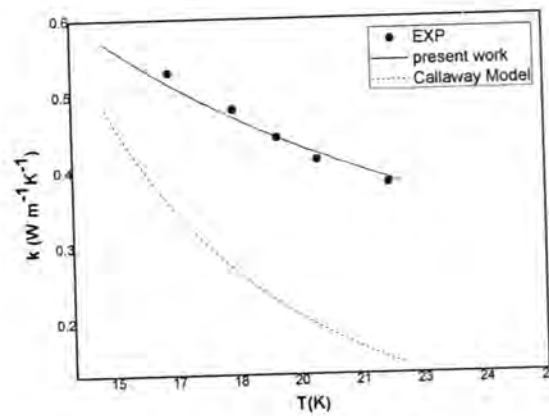


Fig.-2: Thermal conductivity of nitrogen with concentration 0.7% Co solid solution.

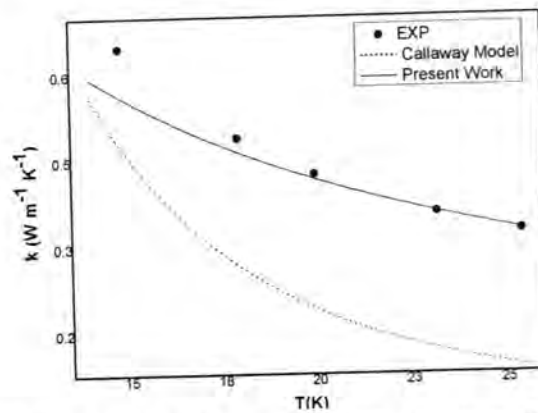


Fig.-3: Thermal conductivity of nitrogen with concentration 1.5% Co solid solution.

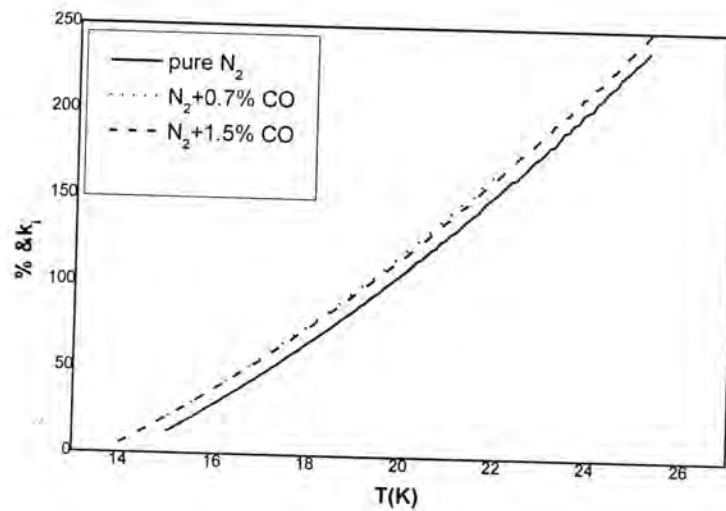


Fig.-4: percentage change of thermal conductivity between Callaway model and present work to pure nitrogen, nitrogen with (0.7% and 1.5% of CO) solid solution.

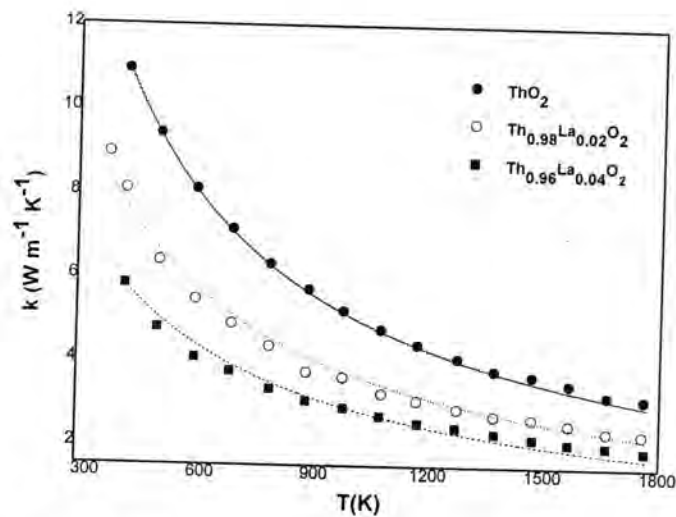


Fig.-5: Thermal conductivity of thorium oxide–lanthanum oxide solid solutions

REFERENCES

1. Stachowiak P., Sumarokov V. V., and Jezowski A., Lattice thermal conductivity in mixed crystals in the absence of mass mismatch: investigation of N_2 -CO solid solution, Phys. Rev. B. 69, 024305 (2004).
2. Stachowiak P., Sumarokov V. V., Mucha J., and Jezowski A., Thermal conductivity of solid nitrogen, Phys. Rev. B 50, 543-546 (1994).

3. Callaway J., Model for Thermal Conductivity at Low Temperatures, *Phys. Rev.* 113: 1046-1051 (1959).
4. Morimoto K., Kato M., Ogasawara M., Kashimura M., and Abe T., Thermal conductivities of (U, Pu, Am)O₂ solid solution, *J. of Alloys and compounds* 452:54-60 (2008).
5. Jain D., Pillai C. G. S., Rao B. S., Kulkarni R. V., Ramdasan E., and Sahoo K. C., Thermal conductivity and thermal conductivity of thoria-lanthana solid solutions up to 10% mol. LaO_{1.5}, *J. of Nuclear Materials* 353: 35-41 (2006).
6. Arima T., Yamasaki S., Inagaki Y., and Idemitsu K., Evaluation of thermal conductivity of hypostoichiometric (U, Pu)O_{2-x} solid solution by molecular dynamics simulation at temperatures up to 2000 K, *J. of Alloys and compounds* 415: 43-45(2006).
7. Winter M. R. and Clarke D. R., Thermal conductivity of yttria-stabilized-hafnia solid solutions, *Acta Materialia* 54: 5051-5059 (2006).
8. Fukushima S., Ohmichi T., Maeda A., and Handa M., Thermal conductivity of stoichiometric (Pu, Nd)O₂ and (Pu, Y)O₂ solid solutions, *J. of Nuclear Materials*, 114: 260-266 (1983).
9. Konstantinov V. A., Manzhelii V. G., Revyakin V. P., Smirnov S. A., Manifestation of lower limit to thermal conductivity of solid Kr with CH₄ impurities, *Physica B* 291: 59-65 (2000).
10. Zheng X., Cahill D. G., Kranochtkhekov P., Averback R. S., and Zhao J.-C., High-throughput thermal conductivity measurements of nickel solid solutions and the applicability of the Wiedemann-Franz law, *Acta Materialia* 55: 5177-5185 (2007).
11. Kim S.- H., Joung C.-Y., Lee S.-C., and Kim H.-S., Variation of the thermal conductivity of (U, Dy)O₂ solid solutions as a function of the Dy content, *J. of Alloys and compounds* 441: 23-28 (2007).

Detection of Serum anti-p53 Antibodies in Breast Cancer Patients

Ahmed AA. Al-Hassan¹, Mosadak I. shakeeb², Batool H. Al-Ghurabi³ Mohammed O. Hamzah⁴,
and Ahmed hamed kadhim⁵

^{1,2,4}Medical College/ Al-Nahrain University.

³College of Dentistry/ University of Baghdad.

⁵Al-Kadimia Medical Center.

Received 5/1/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

الاجسام المضادة الذاتية ضد المورث المثبط لنمو الورم p53 تم تحديدها في مصول العديد من المرضى المصابين بسرطانات مختلفة. أن الهدف الاساسي لهذه الدراسة هو قياس الاجسام المضادة للمورث المثبط لنمو الورم وكذلك تحديد قيمة التنبؤ لهذه الاجسام المضادة في سرطان الثدي. هذه الدراسة تضمنت 70 حالة و التي تتكون من مجموع 40 مريضة مصابة بسرطان الثدي مقارنة ب 30 امرأة سليمة بدون تاريخ مرضي لهذا المرض. تم قياس المستوى المصلي للمورث المثبط لنمو الورم باستخدام تقنية المقايسة المناعية الانزيمية (ELISA). لقد تم تحديد الاجسام المضادة ضد المورث المثبط لنمو الورم كأعلى مستوى في مصول 8 من المرضى (20%)، كما أن المستوى المصلي لهذه الاجسام أظهر زيادة معنوية في المريضات (164.2±21.5pg/ml) عند مقارنتها بمجموعة السيطرة $P < 0.001$ (4.1±1.9pg/ml). بالإضافة الى ذلك وجد أن النسبة المئوية الموجبة للاجسام المضادة ليس لها علاقة بعمر المريضة و لامرحلة الورم أو التميز النسيجي للورم. أن النتائج الحالية تشير الى أن الاجسام المضادة ضد المورث المثبط لنمو الورم في المصل لايمكن ان تعمل كعامل تنبؤ في سرطان الثدي.

ABSTRACT

Auto-antibodies against the tumor suppressor gene (p53) have been detected in the sera of a proportion of patients with various cancers. The essential aim of this study was to detect serum p53-antibodies (p53-Abs) and to evaluate the prognostic value of these antibodies in patients with breast cancer. The current study covered 70 subjects. It comprised a total of 40 patients with primary breast cancer compared with 30 apparently healthy controls. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum p53-Abs.

Antibody against p53 was detected in the sera of eight patients (20%), the mean serum levels of p53-Abs showed significant increase in patients (32.8±5.4pg/ml) when compared to control group (4.1±0.3pg/ml) $P < 0.001$. Moreover the positive rate of serum p53-Abs was not related to each of age, stage and histologic grade of tumor. In conclusion, the findings indicate that serum p53-Abs may not act as prognostic factor in breast cancer.

INTRODUCTION

Mutation of the tumor suppressor gene (p53) is the most frequent abnormality in various human tumors (1). More than 95% of these alterations are missense mutation which are scattered in the central part of the gene. Although these mutations lead to the inactivation of the biological properties of the p53 protein, they also have dramatic consequences in term of p53 stability. Mutant p53 which takes an abnormal conformation is more stable than the wild type and

There is a general agreement that the presence of p53-Abs indicates disease aggressiveness and poor clinical outcome in this cancer. Volgtešek and colleagues (17) reported absence of serum p53-Abs in breast cancer patients, claiming that the antibodies described in previous studies are most likely specific for another 53KDa protein, which is unrelated to p53. On the other hand, other studies (16,18) pointed out to the strong correlation were found between the presence of p53-Abs and p53 protein expression and lymph node status. Moreover, it was observed that the presence of p53-Abs was associated with lack of estrogen receptor expression, so they concluded that p53-Abs appears to be a promising new parameter to evaluate the cellular biology and prognosis of breast cancer. Contrary to the literature cited above the present study was in agreement with the results of (6,19) who reported that serum p53-Abs did not correlate with age, tumor stage and histological grade of tumor.

Although mutations throughout the p53 gene can result in stabilization and overexpression, the study by Davidoff et al. (20) found that only tumors with complexes between p53 and a 70 KDa heat shock proteins can elicit p53-Abs. These complexes were primarily found in tumors with p53 mutations in exons 5 and 6, whereas tumors of patients without p53 Abs exclusively displayed mutations in exons 7 and 8. This finding gives an explanation for the low frequency of p53-Abs in patients with overexpressing tumors. The induction of p53- Abs is an autoimmunization process caused by the presentation of accumulated p53 to the immune system (21), which apparently has not become tolerant to this self-protein. The detection of IgG class p53-Abs indicates that CD4 T-helper cells have been activated. These T cells are required to provide help for activation of cytotoxic T cells and may be used for p53 directed immunotherapy. In conclusion the current findings indicate that serum p53-Abs could not act as prognostic factor in breast cancer.

REFERENCES

1. Soussi, T. ; Legros, Y.; Lubin, R. and Ory, K. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int.J.Can.* 57:1-7 (1994).
2. Balogh, GA.; Maili, DM.; Corte, M.M.; Roncoroni, P. and Nardi, H. Mutant p53 protein in serum could be used as a molecular marker in human breast cancer. *Intern.J.Onco.* 28:695-2 (2006).
3. Crawford, L.V.; Piw, D.C. and Ulbrook, RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int.J. Can.* 30:403-8 (1982).

Table -1: The difference in mean levels of serum p53-Abs (pg/ml) between the two studied groups.

	<i>Breast cancer cases</i>	<i>Healthy control</i>	<i>P-value</i>
serum p53-Abs			
Minimum	0	0	
Maximum	325	125	
mean	32.8	4.1	<0.001
SD	5.8	0.38	
SE	0.9	0.07	
NO.	40	30	

P53 mutations and their implications tumorigenesis attracted much attention over the past 20 years. P53-Abs are developed in a proportion of cancer patients (12,13,14) and they can be detected in serum, this lead researchers to investigate the utility of these antibodies as markers for diagnosis.

The clinical significance of p53-Abs in breast cancer has been studied more extensively, positivity rates vary between different groups from 5%-26% (3,15,16). These findings were corresponds to our results in this study about the presence of p53-Abs in sera of breast cancer patients.

II. Relationships between positive rate of serum p53-Abs and some clinicopathologic features

The relationships between p53-Abs and the disease clinicopathologic features (age, tumor stage, and histologic grade) are shown in table-2. The present study revealed that the presence of p53-Abs was not associated with patient's age, tumor stage ($p \geq 0.05$), and tumor histologic type ($p > 0.05$).

Table-2: Association between p53-Abs and some Clinicopathological features in breast cancer .

	<i>Number of patients (%)</i>		<i>P-value</i>
	<i>p53-Abs (positive) No.=8</i>	<i>p53-Abs (negative) No.=32</i>	
Age			$p \geq 0.05$
<50	5(62%)	16(50%)	
>50	3(37%)	16(50%)	
Tumor stage			$p \geq 0.05$
Stage 0,I,II	4(50%)	15(46%)	
Stage III	4(50%)	17(53%)	
Histologic grade			$p > 0.05$
Grade I,II	4(50%)	21(65%)	
Grade III	4(50%)	11(34%)	

There is a general agreement that the presence of p53-Abs indicates disease aggressiveness and poor clinical outcome in this cancer. Volgtešek and colleagues (17) reported absence of serum p53-Abs in breast cancer patients, claiming that the antibodies described in previous studies are most likely specific for another 53KDa protein, which is unrelated to p53. On the other hand, other studies (16,18) pointed out to the strong correlation were found between the presence of p53-Abs and p53 protein expression and lymph node status. Moreover, it was observed that the presence of p53-Abs was associated with lack of estrogen receptor expression, so they concluded that p53-Abs appears to be a promising new parameter to evaluate the cellular biology and prognosis of breast cancer. Contrary to the literature cited above the present study was in agreement with the results of (6,19) who reported that serum p53-Abs did not correlate with age, tumor stage and histological grade of tumor.

Although mutations throughout the p53 gene can result in stabilization and overexpression, the study by Davidoff et al. (20) found that only tumors with complexes between p53 and a 70 KDa heat shock proteins can elicit p53-Abs. These complexes were primarily found in tumors with p53 mutations in exons 5 and 6, whereas tumors of patients without p53 Abs exclusively displayed mutations in exons 7 and 8. This finding gives an explanation for the low frequency of p53-Abs in patients with overexpressing tumors. The induction of p53- Abs is an autoimmunization process caused by the presentation of accumulated p53 to the immune system (21), which apparently has not become tolerant to this self-protein. The detection of IgG class p53-Abs indicates that CD4 T-helper cells have been activated. These T cells are required to provide help for activation of cytotoxic T cells and may be used for p53 directed immunotherapy. In conclusion the current findings indicate that serum p53-Abs could not act as prognostic factor in breast cancer.

REFERENCES

1. Soussi, T. ; Legros, Y.; Lubin, R. and Ory, K. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int.J.Can.* 57:1-7 (1994).
2. Balogh, GA.; Maili, DM.; Corte, M.M.; Roncoroni, P. and Nardi, H. Mutant p53 protein in serum could be used as a molecular marker in human breast cancer. *Intern.J.Onco.* 28:695-2 (2006).
3. Crawford, L.V.; Piw, D.C. and Ulbrook, RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int.J. Can.* 30:403-8 (1982).

4. Wild, C.P.; Ridanpaa, M. and Anttila, S. p53-Abs in the sera of lung cancer patients :comparison with p53 mutation in the tumor tissue. *Int.J.Can.* 64:176-81 (1995).
5. Angelopoulou, K. and Diamandis, E.P. Detection of Tp53 tumor suppressor gene product and p53-Abs in the ascites fluid of women with ovarian cancer. *Eur.J.Cac.* 33:115-21 (1997).
6. Coomber, D.; Hawkins, N.J.; Clark, M. and Meagher, A. Characterization and clinicopathological correlates of serum anti-p53 antibodies in breast and colon cancer. *J.Can.Res.Clin.Onco.* 122(12):1332-35 (1996).
7. Schlichtholz, B.; Tredaniel, J.; Lubin, R. and Zalcman, G. Analysis of p53-Abs in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant region in the p53 protein. *Br.J Can.* 69:809-16 (1994).
8. Bourhis, J.; Lubin, R. and Roche, B. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J.Natl.Can.Inst.* 88:1228-33 (1996).
9. Angelopoulou, K. and Diamandis, E.P. Quantification of antibodies against the p53 tumor suppressor gene product in the serum of cancer patients. *Can.J.* 6:315-21 (1993).
10. Lubin, R.; Zalcman, G. and Bouchet, L. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature.Med.* 1:701-2 (1995).
11. Angelopoulou, K.; Rosen, B.; Stratis, M. and Yu, H. Circulating antibodies against p53 protein in ovarian cancer : correlation with clinicopathological features and survival. *Can.* 77:2146-52 (1996).
12. Cai, H.Y.; Wang, X.H.; Tian, Y. and Gao, L. Changes of serum p53 antibodies and clinical significance of radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *World.J.Gastro.* 12(25):4082-86 (2008).
13. Liu, X.F.; Zhang, H.; Zhu, S.G. and Zhou, X.T. Correlation of p53 gene mutation and expression of p53 protein in cholangiocarcinoma. *World.J.Gastro.* 12(29):4706-9 (2006).
14. Balogh, G.A.; Corte, M.M.; Roncoroni, P. and Nardi, H. Detection of mutant p53 protein in serum could be use to differentiated malignant from benign breast cancer. *J.Women.Can.* 5(1):18-23 (2005).
15. Mudenda, B.; Green, J.A. and Green, B. The relationship between serum p53 autoantibodies and characteristics of human breast cancer. *Br.J.Can.* 69:1115-9 (1994).
16. Sangrajrang, S.; Arpornwirat, W.; Chheirsilpa, A. and Thisuphakorn, P. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. *Can.Dete.Prev.* 27(3):182-186 (2003).

17. Vojtesek, B.; Kovarik, J. and Dolezalove, H. Absence of p53 autoantibodies in a significant proportion of breast cancer patients. *Br.J.Can.* 71:1253-56 (1995).
18. Pokharel, H.P.; Bhatla, N.; Kriplani, A. and Mukhopadhyay, A. Evaluation of endomaterial changes and p53 expression in tamoxifen treated women: Comparison of various methods. *Kathmandu.Univer.Med.J.* 4(2):145-51 (2006).
19. Ahu, S.H.; Moon, H. and Han, S. Correlation between serum p53 antibody and tissue expression of mutant p53 protein in primary breast carcinoma patients. *J.Korean.Surg.Soc.* 59(4):441-46 (2007).
20. Pavel, R.J.; Gammon, M.D.; Zhang, Y.J. and Terry, M.B. Mutation in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J.Cell.Mole.Med.* 43:67-71 (2008).
21. Lubin, R.; Schlichtholz, B.; Bengoufa, D. and Zalcmann, G. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Can.Res.* 53:5872-76 (1993).

Study of Antibacterial Activity of *Callistemon citrinus* Leaves Extract on *Pseudomonas aeruginosa*

Faris A. Al-Hilli¹, Nazar E. Nasser², and Kadhim H. Zwain³

¹College of Pharmacy Baghdad University

^{2,3}Department of Biology, College of Science, Al-Mustansiriya University

Received 22/3/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

درست الغالية ضد البكتيرية لمستخلصات اوراق نبات الكالستيمون سيترينس (فرشة القتيه) *Callistemon citrinus* على بكتريا الزائفه الزنجاريه *Pseudomonas aeruginosa*. اختبرت المستخلصات (الكحولي و المائي الحار و البارد) لاوراق النبات تجاه (9) عزلات من بكتريا *aeruginosa Pseudomonas* الماخوذه من اصابات متنوعه و المتضمنه عزلات حساسه وعزلات متعدده المقاومه للمضادات الحياتيه الخاصه بهذه البكتريا. اظهر المستخلص الكحولي و المستخلص المائي الحار فعاليه مضاده للبكتريا فقط عند التراكيز العاليه (160 ملغم/مل) ضد (4) عزلات بينما اظهر المستخلص المائي البارد فعاليه مضاده للبكتريا عند التراكيز الواطئه (10,20,40,80) ملغم/مل ضد نفس العزلات.

كانت قيمة التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص المائي البارد تتراوح بين (10-40) ملغم/مل للعزلات الاربعه الحساسه بينما تراوحت قيمة التركيز القاتل الادنى MBC بين (20-80) ملغم/مل لنفس العزلات. باجراء اختبارات كيميائية بسيطة، وجد ان المستخلصات الثلاثه تحوي على مركبات كلايكوسيديه و فينولييه بينما خلت جميع المستخلصات من المركبات القلودية.

ABSTRACT

Leaves extracts from *Callistemon citrinus* were subjected for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Alcoholic, hot and cold water extracts of *C. citrinus* leaves were tested against nine isolates of *P. aeruginosa* taken from various infections and including sensitive and multiresistant isolates to antipseudomonal antibiotics. The ethanolic and hot water extracts exhibited antibacterial activity only at high concentration (160 mg/ml) against four isolates of *P. aeruginosa* while the cold water extract exhibited antibacterial activity at low concentrations (10,20,40 and 80) mg/ml. The MIC of the cold water extract was between (10-40) mg/ml and the MBC was between (20-80) mg/ml for the four isolates of *P. aeruginosa*. By using simple chemical tests, we have found that the ethanolic, hot water and cold water extracts contained glycosides and phenolic compounds while the alkaloids were absent.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is one of the most feared the opportunistic pathogens because the infections that it causes are difficult to treat and are often fatal (1). The bacteria cause burn, wound, urinary tract, ear and eye infections. Other infections that occur include respiratory tract infections, bone and joint infections and nervous system infections in immunocompromised persons and patients undergoing immunosuppressive therapy (2). This bacteria is normally resistant to most commonly employed antibiotics (3) and the increasing resistance of this bacteria has led to the search for new antimicrobial agents from natural sources. A different variety of important plants have been reported to be used in folk medicine (4). Antimicrobial agents have been identified in some plants and were isolated from them (5).

The plant *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) is widely cultivated as ornamental trees in gardens (6). Few studies have been made on the antimicrobial activity of *C. citrinus*(7). The volatile oil of this plant has been reported to posses fungistatic activity (8,9). Antimicrobial activity of the leaves was studied *in vitro* in the form of ethanolic crude extract and showed activity against various bacteria (10,11,12). Chemical compounds were isolated from the plant such as phenolic compounds and sesquiterpene lactones and exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* (10). The aim of the study is To evaluate the antibacterial activity of *Callistemon citrinus* leaves' extracts on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Cultures

Nine isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were obtained from various clinical sources and were identified by specific biochemical tests, which includes pyocyanin production, oxidase test, growth on *Pseudomonas* agar containing cetrimide and other biochemical tests(13). The isolates were designated with the letter (P) and a number.

Antibiotic Sensitivity Test

Twelve various available and commonly used antibiotic discs were used in the antibiotic sensitivity test. The Kirby-Bauer disc diffusion method was used on Mueller-Hinton media. *P. aeruginosa* ATCC 27853 strain was used as a control. The sensitivity and resistance of the nine isolates were determined by measuring the diameter of inhibition zones around the antibiotic discs and comparing them with standard charts provided from the NCCLS(14). Table (1) shows the antibiotic discs that were used in this test.

Table-1: Various Antibiotic discs(oxoid) that are used in the antibiotic sensitivity test with their symbol and concentration(NCCLS).

Antibiotic	Symbol	Concentration
Ampicillin	AMP	20 µg
Carbencillin	CAR	100 µg
Cefotaxime	CTX	30 µg
Chloramphenicol	C	30µg
Cloxacillin	OB	5 µg
Gentamicin	CN	30 µg
Neomycin	N	30 µg
Penicillin G	P	100 U
Polymyxin B	PB	300 U
Rifadine	RD	30 µg
Tetracycline	T	30 µg
Tobramycin	TOB	10 µg

Plant material and extraction

Leaves of the plant *C. citrinus* were collected during April 1999 and were identified at the herbarium of the College of Science, Baghdad University. The leaves were washed with tap water to remove dirt and then washed with distilled water and dried at room temperature. They were chopped into small pieces in a mortar; then, a grinder finally ground it into fine powder. The powder was dried at room temperature for 24 hrs and then, three extracts were prepared from the dried leaves powder; cold water, hotwater and alcoholic extracts.

a- The alcoholic extract was prepared by extracting the leave's powder with 70% ethanol for 7 hrs using soxhlet apparatus. The method was repeated until a desirable concentration was obtained (160 mg/ml) (15).

b- The cold water extract was prepared by steeping 15 gm of the plant powder in 100 ml of cold distilled water and the extract was left in a cooled orbital incubator for 24 hrs and the method was continued to achieve the desirable concentration as indicated above (16).

c- The hot water extract was prepared by boiling 15 gm of plant powder in 100 ml of distilled water for 30 min and also the method was repeated until a desirable concentration was obtained (17).

After the extraction had been completed, the pH of the three extracts was adjusted to 7, then the extracts were sterilized by millipore filtration (using 0.45 μ m filter paper) and kept in the freezer for later use.

Antibacterial activity of the plant extract

The agar well-diffusion method was used to evaluate the antibacterial activity of the three extracts of the plant. The inoculum was prepared by making a bacterial suspension from 4-5 colonies of an overnight culture grown on *Pseudomonas* agar and comparing it with a turbidity standard (McCfarland solution) which corresponds to a density of (1.5×10^8 cells/ml). The suspension was inoculated on Mueller-Hinton agar plates. Wells (5 mm in diameter) were made on the solidified agar using a cork borer. Concentrations of (10,20,40 and 80 mg/ml) of the extract were made from the stock solution (160 mg/ml). An amount of 0.1 ml of each concentrations of the extract was added to the wells and one well contained normal saline as a control. The plates were then incubated for 18-20 hrs at 37°C. The method was made for each extract and the antibacterial activity was recorded by measuring the diameter of inhibition zone around the well. Triplicates were made and the mean difference of the inhibition zones was recorded (18).

Determination of the minimum inhibitory concentration (mic) and minimum bactericidal concentration (mbc) of the extracts

The tube dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract that gave effective antibacterial activity. The extract was diluted in a two-fold tube dilutions series ranging from (10-80)mg/ml in nutrient broth tubes. A standard inoculum of (1.5×10^8 cell/ml) was added to each tube in the dilution series. A control tube containing only nutrient broth was inoculated with the standard inoculum. The tubes were incubated at 37°C for 24 hrs. The MIC was determined as the last tube (lowest concentration) in the series showing no growth.

The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by removing 0.1 ml from the tubes that showed no visible turbidity at the end of the MIC value and subculturing on nutrient agar and incubating at 37°C for 24 hrs. The plate that showed almost no growth was defined as the MBC of the extract which is the lowest concentration of the extract that inhibited 99% of the test organism (19).

Chemical analysis of the plant extract

A simple chemical analysis was performed to identify the component of the extract. Benedict's and Molisch's reagents were used for the detection of glycosides. Ferric chloride solution (1% aqueous solution of FeCl_3) was used to detect phenolic compounds in the extracts. Dragendorff's reagent (solution) was used to detect alkaloids in the plant extracts (see table-6-).

RESULTS AND DISCUSSION

Antibiotic sensitivity test:

In the antibiotic sensitivity test, twelve antibiotics belonging to various groups: β -lactams, aminoglycosides, cephalosporines, polymyxins, Rifadine, Tetracycline and Chloramphenicol were used. Penicillin G, cloxacillin, ampicillin and tetracycline didn't show any inhibitory effect on the isolates owing to the intrinsic resistance that the bacteria possess towards these antibiotics through low outer membrane permeability and multidrug efflux systems (15,16). As shown in table (2), the most active antibiotic was polymyxin B followed by tobramycin, gentamicin, neomycin and carbencillin. Some of the isolates were multiresistant to more than three antipseudomonal antibiotics (P_1 , P_3 , P_5 , P_8). Since *P. aeruginosa* is found with other pathogens such as *E. coli*, *Proteus sp.* and other gram negative bacteria in various infections, it is possible that resistance is transmitted between *P. aeruginosa* and these gram negative bacteria by plasmid borne mechanisms (17).

Table-2: Antibiotic Sensitivity Test of *P. aeruginosa* isolates

Antibiotic Isolate	P 10U	AMP 25µg	OB 5µg	CAR 100µg	PB 300µg	CTX 30µg	TOB 10µg	CN 30µg	N 30µg	C 30µg	RD 30µg	T 30µg
P ₁	R*	R	R	R	S*	R	R	R	R	R	R	R
P ₂	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R
P ₃	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
P ₄	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
P ₅	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
P ₆	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R
P ₇	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R
P ₈	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
P ₉	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R

*R=Resistant, S=Sensitive

Antibacterial Activity of the Plant Extracts

In the agar-well diffusion test, the hot water and ethanolic extracts exhibited antibacterial activity only at the stock solution concentration against 4 isolates (P₄, P₆, P₈, P₉). The cold water extract had an antibacterial activity against these isolates at concentrations (10, 20, 40, 80) mg/ml. Isolates (P₆) and (P₉) were inhibited only at concentrations (20, 40, 80) mg/ml. The maximum diameter of inhibition zone was observed at 80mg/ml for the four isolates (Table-3-).

Table-3: Antibacterial Activity of Ethanolic and Aqueous (hot and cold water) Extracts of the Leaves of *C. citrimus* on Selected Isolates of *P. aeruginosa* by the Agar-Well Diffusion Method

Type of Extract	Concentration mg/ml	Diameter of Inhibition Zone (mm)								
		P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉
Ethanolic Extract	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cold Water Extract	80	0	0	0	17	0	16	0	16	16
	40	0	0	0	14	0	14	0	13	13
	20	0	0	0	12	0	10	0	11	10
	10	0	0	0	11	0	0	0	0	6
Hot Water Extract	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control (normal saline)	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

In a comparison between the activity of the cold water extract and some antipseudomonal antibiotics on the four sensitive isolates, the extract showed a similar activity to that of polymyxin B and neomycin

in the diffusion test. There was no relation between resistance to antipseudomonal drugs and resistance to the cold water extract because the extract had activity on (P₈), which is a multiresistant burn isolate (resistant to gentamicin, tobramycin, carbencillin and neomycin), in concentrations (20, 40, 80) mg/ml. It may be possible that the active constituents of the crude cold water extract may exhibit more activity in low concentrations (in micrograms) when isolated in pure form (Table-4).

Table -4: Comparison Between the activity of Cold Water Extract of *C. citrinus* and Some Antipseudomonal Antibiotics on the Sensitive Isolates of *P. aeruginosa*

Substance	Inhibition zone of the four sensitive isolates(in mm)			
	P ₂₀	P ₂₈	P ₃₉	P ₄₈
Cold water extract 80µg/ml	17	16	14	16
Gentamicin 30µg	22(S)*	24(S)	0(R)*	30(S)
Tobramycin 10µg	22(S)	23(S)	9(R)	28(S)
Carbencillin 100 µg	15(I)*	20(S)	0(R)	22(S)

*R : Resistant, S : Sensitive, I : Intermediate

MIC and MBC values of the Cold Water Extract

The MIC and MBC values were determined on the four sensitive isolates. The MIC values for (P₄,P₆,P₈,P₉) were (10,40,40,20) mg/ml respectively and the MBC values for them were (20,80,80,40) mg/ml respectively (Table-5-).

Table-5: MIC and MBC Values for the Cold Water Extract of *C. citrinus* Leaves on Sensitive Isolates of *P. aeruginosa*

Isolates	P ₄	P ₆	P ₈	P ₉
MIC (mg/ml)	10	40	40	20
MBC (mg/ml)	20	80	80	40

Detection of Chemical compounds in the Alcoholic and Aqueous Extracts

Chemical tests on the extracts showed the presence of glycosides and phenolic compounds in the three extracts. No alkaloids were detected in them (Table-6-).

Table-6: Detection of Some Chemical Constituents in Ethanolic and Aqueous Extracts of the Leaves of *C. citrinus*

Type of extract	Glycosides		Phenolic compounds	Alkaloids
	Molisch's reagent	Benedict's reagent	Ferric chloride solution	Dragendorff's reagent
Cold water extract	+	+	+	-
Hot water extract	+	+	+	-
Ethanolic extract	+	+	+	-

Since the chemical tests revealed the presence of phenolic compounds in the plant extract, it may be possible that the antibacterial activity of the cold water leaves extract is due to these compounds. Most water extracts of various plants possess strong antimicrobial activity due to the presence of polyphenolic compounds, which are soluble in water (5).

In a study by Jawad *et.al.* (10), isolated phenolic compounds from *C. lanceolatus* exhibited antimicrobial activity against *P. aeruginosa* while the isolated sesquiterpene lactones and the ethanolic extract (at concentration of 20mg/ml) didn't show any inhibitory effect on *P. aeruginosa*. Phenolic compounds in *Myrtus communis* (Myrtaceae) such as hydrolysable tannins and flavinoid glycosides (myrcetin, gallic and ellagic acids) proved to be antibacterial compounds against gram positive and gram negative bacteria (among them is *P. aeruginosa*) (23). Other phenolic compounds that possess antibacterial activity in *Myrtus communis* are myrtucommulones A and B (24).

In the hot water and ethanolic extracts, phenolic compounds were present but the extract exhibited antimicrobial activity only at high concentration and this may be due to the incomplete extraction of phenolic compounds in the boiling method of hot water extraction and the soxhlet method of alcoholic extraction. Essential oils of the plant had been reported to be fungistatic (8,9) and studies on essential oil extracted from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) which closely resembles *C. citrinus*, showed that the whole oil failed to inhibit the growth of *P. aeruginosa* while one of its components (terpinen-4-ol) inhibited the growth of the bacteria. 1-8 cineole, which is also one of the components of the oil, had no effect on *P. aeruginosa*. This suggests that there may be an antagonism between components of the oil (25,26).

Other essential oils such as γ -terpinen, α -pinene and linalool were reported to possess antibacterial activities on *P. aeruginosa* (27,28) and these components are present in the oil of *C. citrinus*. Antimicrobial activity of essential oils has been generally attributed to phenolic compounds (29). Some previous workers reported that the presence of substances in the crude extract exert antagonistic effects during the antimicrobial testing procedure (6) while others reported a synergism

between constituents of crude extracts to produce an antimicrobial action (30). Further studies on the chemical constituents of *C. citrinus* should be done and testing of these substances especially phenolic compounds for antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms must take place in future studies to evaluate their therapeutic applications.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to express our thanks to the Biology Department in College of Science at Al-Mustansiriya University and Al-Nuiman Hospital for providing all the possible requirements and facilities. Special thanks to Dr. Ikbāl Al-Khateeb, Dr. Ali Almosawi and Dr. Lina Al-Ameer for their advice and assistance.

REFERENCES

- 1- Myrvik, Q.N. and Weiser, R.S. Fundamentals of Medical Bacteriology and Mycology. 2nd edition. Lea and Febiger, Philadelphia (1988).
- 2- Pollack, M. Infection Due to *Pseudomonas* species and related organisms In "Harrison's Textbook of Internal Medicine". Edited by R.G. Petersdorf, R.D. Adams, E. Braunwald, K.J. Isselbacher, J.B. Martin and J.D. Wilson. McGraw-Hill International Book Company (1998).
- 3- Govan, G.R. *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* In "MacKie and McCartney's Practical Medical Microbiology". Edited by J.G. Colle, A.G. Fraser, B.P. Marmion and A. Simmons. 14th edition. Churchill Livingstone. U.K (1996).
- 4- Mitscher, L.A.; Leu, R.P.; Bathala, M.S.; Wu, W.N. and Beal, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, Rationale and Methodology. J.Natural Products (Lloydia), 35 (2): 157-166 (1972).
- 5- Leven, M.; Bergh, D.A.; Mertens, F.; Vlietnick, A. and Lammens, E. Screening of higher plants for biological activity. Planta Medica, 36 (4): 311-321 (1979).
- 6- Townsend, C.C. and Guest, E. Flora of Iraq. 4 (1) Ministry of Agriculture and Irrigation, Baghdad, Iraq (1980).
- 7- Cock, I.E. (2008). Antibacterial Activity of Selected Australian Native Plant Extracts. The Internet Journal of Microbiology, 4(2).
- 8- Pandey, A.K. Fungitoxicity of essential oil of *Callistemon lanceolatus* D.C. against some sugarcane pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. India, 65 (1): 73-80 (1995).
- 9- Jazet, P.M.; Tatsadjieu, L.N.; Ndongson, B.D.; Kuate, J.; Zollo, P.H. and Menut, C. Correlation between chemical composition and

- antifungal properties of essential oils of *Callistemon rigidus* and *Callistemon citrinus* of Cameroon against *Phaeoramularia angolensis*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(1): 009-015(2009).
- 10- Jawad, A.L.M.; Jaffer, H.J.; Al-Naib, A. and Saber, H.S. *In vitro* antimicrobial activity of total sesquiterpene lactones and phenols isolated from Iraqi plants. Proc. 5th Sci. Conf/SRC., 5 (1): 52-58(1989).
 - 11- Frame, A.D.; Rios-Olivares, E.; De-Jesus, L.; Ortiz, D.; Pagan, J. and Mendez, S. Plants from Puerto Rico with antimycobacterium tuberculosis properties. P.R. Heath. Sci. J., 17(3): 43-52(1998).
 - 12- Seyyidnejad, S.M.; Niknejad, M.; Darabpoor, I. and Motamedi, H. Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbek*. American Journal of Applied Sciences 7 (1): 13-16(2010).
 - 13- Baron, E.J. and Finegold, S.M. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8th. edition. the C.V Mosby Company, U.S.A. p.387, 395, 396, 397, 398, 406(1990).
 - 14- Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, C.L. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. W.H.O., Switzerland. p 84-90(1991).
 - 15- Deshmukh, S.D. and Borle, M.N. Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products. Indian J. of Ent., 37 (1): 11-18(1975).
 - 16- Al-Janabi, A.A. The Effect of Some Plant Extracts on the Growth of Some Human Dermatophytes. M.Sc. thesis, College of Science-Al-Mustansiriya University(1996).
 - 17- Anesini, C. and Perez, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. of Ethnopharmacology, 39(2): 119-128(1993).
 - 18- Mahmood, M.J.; Jawad, A.J.; Hussein, A.M.; Al-Omari, M. and Al-Naib, A. *In vitro* antimicrobial activity of *Salsola rosmarinus* and *Adiantum capillus-veneris*. Int. J. Crude Drug Res., 27: 14-16(1989).
 - 19- Moore, G.S. and Atckins, R.D. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast like fungi. Mycologia, 69 (2): 341-348(1977).
 - 20- Akasaka, T.; Ondora, Y.; Tanaka, M. and Sato, K. Cloning, expression, and enzymatic characterization of *P. aeruginosa* topoisomerase IV. Antimicrob. Agents Chemoth., 43(2): 530-536(1999).
 - 21- Mine, T.; Morita, Y.; Kataoka, A.; Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Expression in *E. coli* of a new multidrug efflux pump, Mex.XY,

- from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob.Agents Chemoth., 43(2):415-417(1999).
- 22- Tredget, E.E.; Shankowky, H.A.; Joffe, A.M.; Inkson, T.I.; Volpel, K.; Paranchych, W.; Kibsey, P.C.; Alton, J.D. and Burke, J.F. Epidemiology of infections with *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients: The role of hydrotherapy. Clin.Inf.Dis., 15:941-949(1992).
 - 23- Nadir, M.T. and Salih, F.M. Evaluation of antibacterial activity in some of the Iraqi plants. J.Biol.Sci.Res., 16(2):169-178(1985).
 - 24- Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastre, R. Constituents of essential oils of *Myrtus communis*. Planta Medica, 39 (2): 164-167(1980).
 - 25- Carson, F. and Riley, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology, 78: 264-269(1995).
 - 26- Silva, C.J.; Barbosa, L.C.; Demuner, A.J.; Montanari, R.M.; Pinheiro, A.L.; Dias, I. and Andrade, N.J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. Quím. Nova. 33(1) (2010).
 - 27- Deans, S.A.; Sovboda, K.P. and Kennedy, A.T. Biological activity of plants volatile oils and their constituents. Planta Medica, 55 (7): 588(1989).
 - 28- Delahaye, C.; Rainford, L.; Nicholson, A.; Mitchell, S.; Lindo, J. and Ahmad, M. Antibacterial and antifungal analysis of crude extracts from the leaves of *Callistemon viminalis*. J. of Medical & Biological Sciences, 3(1) (2009).
 - 29- Cruz, T.; Cabo, M.R.; Cabo, M.M.; Jimenez, J.; Cabo, J. and Ruiz, C. *In vitro* antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Bioss. Microbios, 60 (242): 59-61(1989).
 - 30- Low, D.; Rawal, B.D. and Griffen, W.J. Antibacterial action of the essential oils of some Australian myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fraction of oil of *Eucalyptus citriodora*. Planta Medica, 26 (2): 184-189(1974).

Bacteriological Study of *Staphylococci* Species in Acne: Antibiotics Susceptibility and Honey Effect

Ammar Riyadh Qasem

Biology and Microbiology Dept., College of Sciences, Diyala University

Received 24/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

حبّ شباب هو أحد أمراض الجلد الأكثر شيوعاً في الشباب خصوصاً أثناء سن البلوغ. هذه الدراسة أجريت لتحديد الحساسية الدوائية لبعض المضادات الحيوية وتأثير العسل على بكتيريا المكورات العنقودية المعزولة من حبّ الشباب. جُمِعَت العينات من العقد والبثور الجلدية من مائة حالة (24 أنثى، 76 ذكور) بين طلبة كلية العلوم/ جامعة ديالى تتراوح أعمارهم من (18-24) سنة خلال الفترة من 11/30 عام 2009 ولغاية 4/1 عام 2010. تم زرع العينات على وسط أكار الدم، و حضن المزروع تحت ظروف هوائية ولمدة 24 ساعة. تم تشخيص البكتيريا وتقييم حساسيتها الدوائية للمضادات الحيوية الشائعة وحسب الطرق القياسية باستخدام وسط مولر- هنتون. أظهرت نتائج الحضن للعينات المزروعة تحت ظروف هوائية إن بكتيريا المكورات العنقودية عزلت من (64%) من العينات المدروسة، المكورات العنقودية الجلدية كانت نسبتها (44%) والمكورات العنقودية الذهبية كانت (20%) من عينة الدراسة الكلية. المكورات العنقودية المعزولة من الذكور كانت (65.8%) أكثر بكتيريا من الإناث (58.3%). الـ Doxycycline و الـ Gentamycin كانا فعال على حد سواء ضد البكتيريا المعزولة (75%، 71.9% حساسية) وعلى التوالي. الـ Tetracycline ارتبط بـ 50% حساسية. الـ Ampicillin و Cloxacillin كانا أقل فعالية وبنسبة حساسية (21.9% و 3.1%) على التوالي. عموماً كان هناك اختلاف هام بشكل إحصائي في حساسية المضادات الحيوية المُجَرَّبَة، أظهرت النتائج أنه لا اختلاف مهم أو هام بشكل إحصائي في التركيز الأوطى من العسل المرتبط بتنشيط النمو البكتيري قد لوحظ بين النوعين من المكورات العنقودية. نستنتج من هذه الدراسة إن الجنتاميسين والدوكسيساين سايلكسن هي من أكثر المضادات الحيوية فعالة ضد المكورات العنقودية المعزولة من حب الشباب. وللوصول إلى العلاج الأفضل، يوصى باستعمال العسل مع المضادات الحيوية الأكثر فعالية هذا و نقترح أن تكون هناك دراسات للتقييم الأفضل ومعالجة مرضى حبّ الشباب.

ABSTRACT

Acne vulgaris is one of the most common skin disorders in youth especially during the puberty. This *in vitro* study performed to determine the antibiotic sensitivity and honey effect on staphylococci in acne vulgaris. Samples were collected from acne lesions of one hundred youngsters (24 girls, 76 boys) among Sciences College/ Diyala University students in the age range of (18-24) years old. The specimens were cultured individually on blood agar. The cultures were then overnight incubated under aerobic conditions. Bacteria were identified and their sensitivity to common antibiotics were evaluated according to the standard procedures by using Muller-Hinton agar. In aerobic culture of Acne vulgaris samples, Staphylococci species was isolated from (64%) of studied sample, *S. epidermidis* was isolated from (44%) and *S. aureus* from (20%) of the total study samples. Staphylococci were more frequently isolated from males (65.8%) than females (58.3%). Doxycycline and Gentamycin were equally effective against isolated bacteria (75% sensitivity), followed by (71.9%). Tetracycline was associated with 50% sensitivity. Ampicillin and cloxacillin were least effective associated with a sensitivity rate of 21.9% and 3.1% respectively. In general there were a statistically significant difference in antibiotic sensitivity of the tested antibiotics. The findings showed that no important or statistically significant difference in lowest concentration of honey associated with bacterial inhibition was observed between the 2 Staphylococci

species. Results of this study showed that gentamycin and doxycyclin was the most sensitive antibiotics *in vitro* for staphylococcus isolated from acne vulgaris. To achieve a better treatment, a combination of honey with other antibiotics may be more efficient. We suggest *in vivo* studies for better evaluation and treatment of acne patients.

INTRODUCTION

Acne vulgaris is the most common cutaneous disorder of Pilosebaceous unit and is of an etiology that appears to be multifactorial (1), that affects areas containing the largest oil glands, including the face, back, and trunk (2). It is generally characterized by formation of seborrhea, comedone, inflammatory lesions and presence of bacteria *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur* and *Staphylococcus aureus* in the follicular canal and sebum production (3). *Propionibacterium acnes* have been described as an obligate anaerobic organism. It is implicated in the development of inflammatory acne by its capability to activate complements and by its ability to metabolize sebaceous triglycerides into fatty acids, which chemotactically attract neutrophils. On the contrary, *Staphylococcus epidermidis*, an aerobic organism, usually involves in superficial infections within the sebaceous unit (4). These factors provide a potential target for treatment. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* are the target sites of antiacne drugs (5). The first use of antibiotics in acne and the clear-cut clinical improvement of acne seen with those agents; such as tetracyclines, macrolides, sulfonamides and clindamycin, strengthen the hypothesis that bacterial *acnes* plays an important role. Likewise the emergence of antibiotic-resistant strains (6). Long term use of antibiotics against acne is outdated because of exacerbated antibiotic resistance (7). The development of antibiotic resistance is multifactorial, including the specific nature of the relationship of bacteria to antibiotics, how the antibacterial is used, host characteristics, and environmental factors. To overcome the problem of antibiotic resistance, natural honey have been extensively studied as alternative treatments for diseases. In this study, honey used as antibacterial agents were examined for antimicrobial activities against microorganisms frequently involved in acne inflammation, *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*.

MATERIALS AND METHODS

The type of honey that had been used was of standard grade, which has the following properties Specific gravity (1-37), moisture (25% maximum), reducing sugar (65% minimum), sucrose (5%

maximum), fructose and glucose (1.0 minimum), acidity (0.2% maximum), ash (0.5% maximum) (8).

The specimens were deposited at Department of Biology and Microbiology/ Sciences College/ Diyala University/ Diyala/ Iraq. A total of (100) volunteer student (male and female) with *Acne vulgaris* attending the Collage laboratory were studied. Their age range of (18-24) years old, and all had mild to moderate acne. None had been receiving antibiotic treatment for at least (6) weeks. This study was during November 2009- April 2010.

Bacteriologic samples were taken from the center of the forehead, right scapula and anterior nares at baseline. Samples were immediately inoculated and then streaked into blood agar plate, incubated under aerobic conditions at (37°C for 18-24) hrs. Following incubation, bacteria was diagnosed depending upon to the following:

1. Standard morphological and physiological characteristics (Gram +ve Cocci, grape like collection microscopically, alpha or beta hemolysis on blood agar).
2. Biochemical tests (Catalase, Coagulase and Oxidase).
3. Culture on manitol salt agar (selective and differential medium).

The sensitivity of bacteria to antibiotics was determined according to the method of Kirby and Bauer (1966) , antibacterial activity was expressed as the mean of inhibition diameters (mm).

The minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined by broth dilution assay. The cultures were prepared at (24-48) hrs broth cultures of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*, respectively. The MIC was defined as the lowest concentration of honey inhibits the growth of microorganisms.

Honey samples were measured out and diluted in sterile distill water to prepare a (50%) stock honey solution from which different concentrations of honey were prepared in nutrient broth (Oxoid) to give double fold dilution of (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) dilutions each. One tube containing 1ml of undulated honey was used as a control.

Twenty-four hours old cultures of *Staphylococcus* species were inoculated in saline, the turbidity was adjusted to McFarland's standard No.5, and (5 μ L) of bacterial culture was inoculated in all dilutions and incubated at (37°C for 24) hrs, then were observed for growth. MIC was recorded as the lowest concentration of honey that prevented growth of the test isolates (9).

Statistical Analysis

Analysis were computer aided using SPSS version 13. The statistical significance of association between 2 categorical variables was tested by chi-square test of independence. The minimal inhibitory

concentration of honey was measured on an ordinal level (3 consecutive dilutions), therefore it was described by median and the non-parametric test of significance was used. The difference median dilution between 2 groups was assessed by Mann-Whitney test. The statistical significance of difference in antibiotic sensitivity between more than two types of tested antibiotics was assessed by Cochran's Q test for multiple paired comparisons. When Cochran's Q test showed significant differences, further exploration for the site of statistical significance in antibiotic sensitivity between the antibiotic with highest sensitivity and each of the remaining antibiotics was tested by McNemar Chi-square test for paired observations. P value less than the 0.05 level of significance was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

As shown in table 1, *Staphylococci* species was isolated from 64% of studied samples, *S. epidermidis* was isolated from (44%) and *S. aureus* from (20%) of the total study samples. *Staphylococci* were more frequently isolated from males (65.8%) than females (58.3%), but the difference was not significant statistically. *S. epidermidis* had a significantly higher isolation rate (50%) in males compared to females (25%). *S. aureus* was less frequently isolated in males (15.8%) than females (33.3%), but the difference was not significant statistically, table 2.

Doxicyclin and Gentamycin were equally effective against isolated bacteria (75% sensitivity), followed by (71.9%). Tetracyclin was associated with 50% sensitivity. Ampicillin and cloxacillin were least effective associated with a sensitivity rate of 21.9% and 3.1% respectively. In general there was a statistically significant difference in antibiotic sensitivity of the tested antibiotics. Doxicyclin was not significantly better than Gentamycin and Cefotaxime, while it had a statistically significant higher sensitivity than the remaining 3 antibiotics, table 3.

S. epidermidis showed a significantly higher sensitivity to Gentamycin (86.4%) than *S. aureus* (50%). In the same way it showed a slightly higher, although not statistically significant, sensitivity to the remaining tested antibiotics (except for Ampicillin) compared to *S. aureus*, table 4. *Staphylococcal* isolates from males showed a slightly higher sensitivity to all tested antibiotics. These differences however, failed to reach the level of statistical significance (possibly because of small sample size and small effect size), table 5.

As shown in table 6, no important or statistically significant difference in lowest concentration of honey associated with bacterial inhibition was observed between the 2 *Staphylococci* species.

Table -1: Relative frequency of positive Staphylococci culture in the study samples.

Total n=100	No.	%
Staphylococcus sp.		
<i>S. epidermidis</i>	44	68.75
<i>S. aureus</i>	20	31.25
	64	100

Table-2: The gender difference in relative frequency of positive Staphylococci culture.

Gender	Total	Staphylococcus species		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>	
	No.	No.	%	No.	%	No.	%
Female	24	14	58.3	6	25	8	33.3
Male	76	50	65.8	38	50	12	15.8
P (Chi-square) =		0.51[NS]		0.031		0.08[NS]	

Table-3: Antibiotic sensitivity for isolated Staphylococci.

Overall sensitivity for culture positive cases (n=64)		
Antibiotic Disk	No.	%
Doxicyclin	48	75
Gentamycin	48	75
Cefotaxime	46	71.9
Tetracycline	32	50
Ampicillin	14	21.9
Cloxacillin	2	3.1

P (Cochran's Q) for multiple paired comparisons < 0.001

P (McNemar test) for difference between Doxicyclin x Gentamycin = 1[NS]

P (McNemar test) for difference between Doxicyclin x Cefotaxime = 0.82[NS]

P (McNemar test) for difference between Doxicyclin x Tetracycline < 0.001

P (McNemar test) for difference between Doxicyclin x Ampicillin < 0.001

P (McNemar test) for difference between Doxicyclin x Cloxacillin < 0.001

Table -4: The difference between 2 species of isolated Staphylococci in sensitivity rate to selected antibiotics.

Type of bacterial isolate	Antibiotic sensitivity (percent sensitive)									
	Tetracycline		Cloxacillin		Gentamycin		Cefotaxime		Ampicillin	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>S. epidermidis</i> (n=44)	24	54.5	2	4.5	38	86.4	34	77.3	8	18.2
<i>S. aureus</i> (n=20)	8	40	0	0	10	50	12	60	6	30
P (Chi-square)=	0.42[NS]		1[NS]		0.004		0.23[NS]		0.34[NS]	

Table- 5: The difference between males and females in sensitivity rate to selected antibiotics.

antibiotics.		Antibiotic sensitivity (percent sensitive)										
Gender	Tetracycline		Cloxacillin		Gentamycin		Cefotaxime		Ampicillin		Doxicyclin	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	N o.	%	No.	%
Female (n=14)	4	28.6	0	0	8	57.1	8	57.1	2	14.3	10	71.4
Male (n=50)	28	56	2	4	40	80	38	76	12	24	38	76
P (Chi-square)=	0.13[NS]		1[NS]		0.1[NS]		0.19[NS]		0.72[NS]		0.74[NS]	

Table -6: The difference in median lowest concentration of honey causing bacterial inhibition by Species type of isolated *Staphylococci*.

Lowest concentration of honey causing bacterial inhibition									
Bacterial isolate	Median	1:8		1:4		1:2		Total	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>S. epidermidis</i>	1:4	12	27.3	14	31.8	18	40.9	44	100
<i>S. aureus</i>	1:4	4	20	10	50	6	30	20	100
P (Mann-Whitney) = 0.81[NS]									

In this study, the results those showed in table 1 were unacceptable to (10) who found that (50%) of the samples that collected from acne lesions were *Staphylococci*, and (11) who published that (35.7%) of acne samples were *staphylococci*, as well as (12) were explained that *staphylococci* colonized 19% and 32% respectively.

In adolescence, acne is usually caused by an increase in male sex hormones, which people of both genders accrue during puberty (13). The negative result might occur due to changes in pilosebaceous units, skin structures consisting of a hair follicle and its associated sebaceous gland, changes which require the hormone androgen stimulation (14).

According to table 2 of this study, results were closely to (15) findings that in aerobic culture of pustular and nodulocystic Acne lesions, *Staphylococcus aureus* was present in (41%) of subjects, *Staphylococcus epidermidis* in (53%).

Many reports showed that most frequent bacteria isolated from acne patients were *Staphylococcus aureus*, It is possible that acne vulgaris is mainly caused by *Staphylococcus aureus* (16, 17) This is in contrast to some reports which published that both *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* as bacteria causing Acne vulgaris (18, 19).

The low incidence of *staphylococci* that causing Acne in present study may be due to the small amounts of samples that collected from patient with Acne vulgaris, taking in consideration the accuracy of diagnosis methods and techniques; the rate of *Staphylococcal* isolation varies in geographical areas (20), because of the difference in the seasonal and climatical conditions that play an important role in the distribution of *staphylococcal* infection, (21) in addition to the habits of random antibiotics usage.

Many reports published about the antimicrobial susceptibility and bacterial resistant to antibiotics in acne vulgaris can be compared with the data in table 3, 4, 5. (15) found that sensitivity of isolated bacteria to following antibiotics: tetracycline, gentamycin, cefotaxime and cloxacillin were 65%, 50%, 40% and 0% (15). (22) found that the resistances to ampicillin (65.7%) while (28.1%) were resistant to tetracycline. Other geographical area with *Staphylococcus aureus* as primary casual agent in acne development, *Staphylococcus aureus* was resistant to tetracycline which is consistent to reports by some other investigators (23).

Variability in the antibiotic susceptibility patterns of staphylococci has been observed by various authors (9,24) who positively reflect the different protocols and panels of antibiotics being used in the different geographical locations from where these isolates have been obtained. It is therefore suggested that to fully assess the importance of staphylococci, it may be essential to determine its species and antibiotic sensitivity as no particular pattern can be predicted in any problematic situation.

(25, 26) reports explain that coagulase-negative staphylococci are very similar to *S. aureus* in their susceptibility to honey due to similar antibacterial potency, this finding was some what closely to our data that found in table 6. Wound infection to be controlled by honey in vivo, since there are many reports of honey rapidly healing wounds infected with *S. aureus* and pseudomonads (27). (27) showed that honey could be diluted by exudates up to 20-fold and still inhibit the growth of coagulase-negative staphylococci. Honey, therefore, would be suitably active for both therapeutic and prophylactic application.

Staphylococcus is now recognized as an important opportunistic pathogen. It is routinely found on the skin and in the hospital environment, with prevalence on the skin surface of 85-100% (28). Various researchers have shown that honey exerts an antibacterial activity against various microorganisms, including both gram-positive and gram-negative bacteria (28). The antibacterial activity of honey is mainly due to inhibines in honey. These inhibines are hydrogen peroxide, flavinoids, and phenolic acids, plus many other unidentified inhibines (28). Several authors are of the opinion that the sugar content of honey is exclusively responsible for its antibacterial effect (28, 30, 31). A number of reasons for this have been suggested: shrinkage disruption of the bacterial cell wall due to the osmotic effect of the sugar content; induction of an unfavorable environment with low water activity (28).

This study concludes that; Males were infected with *Acne vulgaris* more than females. *Staphylococci* in *Acne* was mostly caused

by *Staphylococcus epidermidis* (68.7%) (Was the most common cause of bacterial acne) in addition to *Staphylococcus aureus* (31.3%). Doxycycline, Gentamicin and Cefotaxime were the drugs of choice for treatment of staphylococcus that causing acne. The therapeutic application of honey in Acne vulgaris that caused by staphylococci could effectively complement standard antibiotics with beneficial healing effects.

REFERENCES

1. Chan, J.J. and Rohr, J.B. Acne vulgaris: yesterday, today and tomorrow. *Australas. J. Dermatol.*, 41: 569-572(2000).
2. Leyden, J.J. Therapy for Acne vulgaris. *The New Eng. J. Med.*, 156-1162(1997)..
3. Leyden J.J. Current issues in antimicrobial therapy for the treatment of acne. *J. Eur. Dermatol. Venereol.*, 15(3): 51-55(2000)..
4. Burkhardt, C.G., Burkhardt, C.N. and Lehmann, P.F. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *J. Post. Grad. Med.*, 75: 328-331(1999).
5. Leyden, J.J., The evolving role of *Propionibacterium acnes* in acne. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 20:139-143(2001).
6. Eady, E.A., Cove, J.H., Holland, K.T. and Cunliffe, W.J. Erythromycinresistant propionibacteria in antibiotic-treated acne patients. Association with therapeutic failure. *Br. J. Dermatol.*, 121: 51 - 57(1989).
7. Swanson, I.K. Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in Acne vulgaris. *Dermatol. Nurs.*, 5: 359-361(2003).
8. El-Sukhon, S.N., Abu-Harfeil, N. and Sallal, A.K. Effects of honey on Bacterial Growth and Spore Germination. *J. Food Prot.*, 57(10): 918- 920(1994).
9. Deighton, M. A., Franklin, J. C., Spicer, W. J. and Bulkan, B. Species identification, antibiotic sensitivity and slim production of Coagulase negative staphylococci isolated from clinical specimens. *Epidermiol. Infect.*: 101: 99-113(1988).
10. Nishijima, S., Kurokawa, I., Katoh, N. and Watanabe, K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J. Dermatol.*, 27: 318 - 323(2000).
11. Leemingk, J.P., Holland, K.T. and Cuncliffe, D.W.J. The pathological and ecological significance of microorganisms colonizing acne vulgaris comedones. *Med. Microbiol.*, 20: 11-16(1985).

12. Leemingn, J.P., Holland, K.T. and Cuncliffe, W.J. The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. *British J. Dermatol.*; 118(2): 203 – 208(1988).
13. James, W.D. Clinical Practice. *Acne. N. Engl. J. Med.*, 352 (14); 1463–72(2005).
14. Acne Vulgaris : Article by Julie C Harper. eMedicine. 2009-08-06. <http://www.emedicine.com/DERM/topic2.htm>. Retrieved (2009).
15. Hassanzadeh, P., Bahmani, M. and Mehrabani, D. Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: An *in vitro* study. *Indian J. Dermatol.*, 53(3): 122-124(2008).
16. Toyoda, M. and Morohashi, M. An overview of topical antibiotic for acne treatment. *J. Dermatol.*, 196: 130–4(1998).
17. Rodriguez-Cavallini, E. and Vargas-Dengo, P. Etiología bacteriana y susceptibilidad a antibióticos en pacientes con acné. *Rev Biomed.*, 15: 101–6(2004).
18. Thiboutot, D. New treatments and therapeutic strategies for acne. *Arch. Fam. Med.*, 9:179–87(2000).
19. Leyden, J.J. Effect of topical benzoyl peroxide-clindamycin versus topical cindamycin and *Propionibacterium acnes*. *Cutis.*, 69: 475–80(2002).
20. Ashkenazi, H., Malik, Z., Harth, Y. and Nitzan, Y.. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35: 17–24(2003)
21. Herminia de Lencastre, Elena, P., Hedda, S., Konkoly M.M. and Thege, A.T. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin. Microbiol. and Infect.*, 3(3): 289– 296(2008).
22. Otto Mills, J.R., Thornsberry, C., Caroline, W., Cardin, K. Smiles, A. and James, J. L. Bacterial Resistance and Therapeutic Outcome Following Three Months of Topical Acne Therapy with 2% Erythromycin Gel Versus Its Vehicle. *Acta. Derm. Venereol.*, 82: 260–265(2002).
23. Cunliffe, W.J., Baron, S.E. and Coulson, I.H. A clinical and therapeutic study of 29 patients with infantile acne. *Br. J. Dermatol.* , 145: 463–6(2001).
24. Goel, M. M., Singh, A.V., Mathur, S. K., Mastan, Singh., Singhal, S. and Chaturvedi, U. C. Resistant Coagulase negative staphylococci from clinical samples. *Indian. J. Med. Res.*, 93: 350-352(1991).
25. Cooper, R.A., Molan, P.C. and Harding, K.G.. Honey and gram positive cocci of clinical significance in wounds. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 857–63(2002)

26. Cooper, R.A., Halas, E. and Molan, P.C. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. J. Burn. Care. Rehabil., 23: 366–70(2002).
27. Molan, P.C. and Betts, J.A.. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. J. Wound Care, 13: 353–6(2004)
28. Subrahmanyam, M., Archan Hemmady, and Pawar, S.G. Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. Annals of Burns and Fire Disasters. vol. 15 :1 (2001).
29. Somerfield, S.D. Honey and healing. J. of Royal Society of Med., 84(3): 179(1991).
30. Tovey, F.I. Honey and healing. J. of Royal Society of Med., 84(7): 447(1991).
31. Condon, R.E. Curious interaction of bugs and bees. Surgery, 113(2): 234–235(1993).

Hepatitis B Seroprevalence in Ten Iraqi Governorates

Mohammed A.Saleh¹, Ali R. Omer², Atallah M. Al-Salmani³, and Suzain A.Karrem⁴

¹College of Science, Diyala University, Biology Department.

^{2,4}Ministry of Health, Viral Hepatitis Reference Laboratory in Iraq

³Ministry of Health, Center for Disease Control and Prevention in Iraq

Received 17/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتقييم حالة الانتشار المصلي لالتهاب الكبد الفيروسي نمط ب في عشرة محافظات عراقية (بغداد/الكرخ و دهوك و أربيل و نينوى و صلاح الدين و الانبار و بابل و ميسان و ذي قار و البصرة) مع الأخذ بالنظر عامل العمر والجنس. أجريت هذه الدراسة على 4961 شخص من المراجعين للمختبر المرجعي لالتهاب الكبد الفيروسي في العراق للفترة الممتدة من نيسان 2008 إلى كانون الأول 2009 ، والأعمار تتراوح من 6-47 سنة وكانت نسبة الذكور إلى الإناث (1:1.3). تم التحري عن الأجسام المضادة ضد مستضدات لب الفيروس (anti-HBc) باستخدام تقنية الاليزا ولذلك لتحديد الانتشار المصلي للإصابة بالفيروس ، حيث أظهرت النتائج بأن أجمالي أعلى انتشار مصلي للفيروس موجود في بابل (15.9%) ويتبعها كل من دهوك (14.6%) ، صلاح الدين (10.7%) ، ميسان (9.6%) ، بصرة (9.4%) ، بغداد/الكرخ (8.9%) ، الانبار (8.5%) ، نينوى (8.5%) ، ذي قار (8.3%) ، أربيل (6.1%) . بالإضافة قياس الانتشار المصلي للمستضد السطحي لالتهاب الكبد الفيروسي باستخدام تقنية الاليزا ، إذ سجلت أعلى أصابه في دهوك (3.6%) وأقل أصابه سجلت في نينوى (0.7%). من ناحية أخرى وفي جميع المحافظات وجد زيادة في الانتشار المصلي للأجسام المضادة للبيئة (anti-HBc) في الأشخاص ضمن العقد الثالث والرابع من العمر. من جهة أخرى أثبتت الدراسة وجود اختلاف في معدل الانتشار المصلي من محافظة إلى أخرى وهذا يعود إلى وبائية التهاب الكبد الفيروسي البائي والتي تعتمد على الاختلاف في الموقع الجغرافي ، المناخ ، درجة التوسع الحضري ، الأصل العرقي وحجم العينة .

ABSTRACT

The present study was performed to assess the current status of hepatitis B seroprevalence in ten Iraq governorates (Baghdad /Kerkh,Duhok ,Arbil ,Nenava,Saladdin,AL- Anbar,Babel,Mesan,Theqar and Basrah) , with respect to age and gender. This study was conducted on 4196 subjects referred to the Viral Hepatitis Reference Laboratory in Iraq during April 2008 to December 2009, aged from 6-47 years with female to male ratio of 1.3: 1 . Antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) were measured by use Enzyme linked immunoassay in order to determine hepatitis B infection. The highest overall seroprevalence was found in the Babel (15.9 %) , followed by Duhok (14.6 %), Saladdin (10.7%), Mesan (9.6%), Basrah (9.4%), Baghdad /Kerkh (8.9%) ,AlAnbar (8.5 %), Nenava(8.5 %), Theqar(8.3 %) and Arbil (6.1 %). In addition estimate the seroprevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by employ Enzyme linked immunoassay .The highest (3.6 %) prevalence of HBs Ag was in Duhok ,while the lowest (0.7%)in Nenava. In all the governorates an increase in seroprevalence was found among persons within third to fourth decade . This study showed a variation in seroprevalence rates from one governorate to another. Possibly influencing the epidemiology of hepatitis B infection from governorate to governorate are differences in geography, climate, degree of urbanization, ethnic origin and sample size.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection with its associated sequelae is a disease of major public health importance worldwide. Globally, it is estimated that about 320 – 350 million individuals are chronic carriers of hepatitis B virus (HBV) and about 1.5 million people die annually

from HBV-related causes (1). It is based on this high prevalence, and the various sequelae of HBV infection, especially liver cirrhosis and primary liver cell carcinoma (PLCC) that makes HBV infection to continue to remain a public health concern (2, 3). At least six different types of viruses are referred to as hepatitis viruses and they generally can not be distinguished clinically, these are hepatitis A virus (HAV) the etiologic form of infectious hepatitis; hepatitis B virus which is associated with serum hepatitis; hepatitis C virus (HCV); hepatitis D virus (HDV); hepatitis E virus (HEV); and hepatitis G virus (HGV) (4). Transmission methods of HBV are; sexually by persons with more than one sex partner, persons diagnosed with a sexually transmitted disease, homosexual men, injecting drug users, household contacts of infected persons, infants born to infected mothers, infants or children of immigrants from areas with high HBV rates, health care and public safety workers who are exposed to blood, and hemophiliacs, and haemodialysis patients (5). Hepatitis B virus infections are also health problems in the Iraq, reported prevalence rate is (2-4) % among normal Iraqi population which is among the countries of intermediate hepatitis B endemicity (6). Countries with intermediate or high endemicity must have mass immunization for all infants at birth and for all risk groups (7,8). The prevalence of HBV infection varies from country to country and depends upon a complex mixture of behavioral, environmental and host factors (9). The prevalence of HBsAg in the countries of Middle East varies from 3-7% (10), while in Iraq, the carrier rate of HBV is between 2-4% among normal population and 2-3% among healthy blood donors and these results put Iraq among the intermediate HBV endemic countries (10,11). Lower carrier rate was detected in the last 10 years among Iraqi blood donors (2-3%) (12). The prevalence of HBsAg in the normal population of neighbor countries of Iraq such as Kuwait was 1.5% (13), in Jordan, it was 10.4% and 9.1% among males and females respectively (14), in Iran was 1.7 % (15), in Saudi Arabia, it was 26% and 15% among males and females, respectively (16). in Syria was 5% (17) and Turkey was 4% (17). This study was aimed to evaluate the seroprevalence of hepatitis B in ten Iraq governorates.

MATERIALS AND METHODS

A total of (4196) subjects referred to the Viral Hepatitis Reference Laboratory in Iraq during April 2008 to December 2009. The seroprevalence of hepatitis B was investigated in ten Iraq governorates: Baghdad /Kerkh,Duhok ,Arbil ,Nenava,Saladdin, AL- Anbar, Babel, Mesan, Theqar and Basrah . Aged from 6-47 years with female to male ratio of 1.3:1

Sample collection

From each individual included in this study, 5-10 ml of blood was drawn by venepuncture using disposable syringes, the blood was placed in plastic disposable tubes, it was left to stand at room temperature (20-25)°C to allow it to clot, then the sera was separated by centrifugation at 1000 r.p.m for 5 minutes, and divided into aliquots (250 µl) and stored at -20°C till examination. Each aliquot of the serum was used once to avoid thawing and freezing, all sera and reagents were allowed to stand at room temperature before use in the test.

ELISA screening test for HBs Ag

Hepanostika HBsAg Uni-Form is an ELISA for qualitative determination of HBs Ag subtypes *ad* and *ay* in human serum or plasma (18). This test is based on a one step "Sandwich" principle. As HBs Ag coupled with HRP serves as the conjugate with TMB and peroxide as a substrate, upon completion of the test, a color develops which directly proportional to the amount of HBs Ag in the sample (18). The detailed procedure was carried out as has been suggested in the leaflet supplied with the test kit (Bio Merieux, France).

HBs Ag confirmatory test

Hepanostika HBs Ag Uniform II confirmatory reagents are to be used for the confirmation of HBs-Ag in specimens (20). HBs Ag confirmatory test requires the use of two solutions: Confirmatory neutralizing antibody (Nab) and confirmatory control, each were pipetted into one of two non-coated wells, then the sample was added to both wells. Following incubation, the mixtures were transferred to HBs Ag Uni-Form II Ab-coated wells containing a conjugate phase. The test continued with the reagent and procedure of the HBs Ag. Sample that contains HBs-Ag showed a reduced color developed in the well neutralized by the confirmatory Nab (20). The details procedure was carried out as has been suggested in the leaflet supplied with the test kit (Bio Merieux, France).

VIDAS screening test for HBs Ag

The VIDAS HBs Ag is an automated qualitative test for use on the VIDAS analyzer for detection of HBs Ag in human serum or plasma (19). The test is an enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA). The solid phase receptacle (SPR), coated with anti-HBs Monoclonal antibody (Mab) conjugated to biotin serves as a solid phase, the conjugate (streptavidin with ALP) will bound with biotin. During the final step, the substrate (4-methylumbelliferyl phosphate) is hydrolyzed into a fluorescent product, fluorescence is measured at 450 nm, which is proportional to the concentration of HBs Ag present in the sample (19). The details procedure was carried out as suggested in the leaflet supplied with the test kit (Bio Merieux, France).

VIDAS confirmatory test

The HBsAg if present in the sample, is immuno complexed using a serum containing polyclonal and monoclonal anti-HBs antibody. After treatment, the sample is tested using the VIDAS HBs kit and compared with a reference test (21). The detailed procedure was carried out as has been suggested in the leaflet supplied with the test kit (Bio Merieux, France).

Detection of anti-HBc IgG

Hepanostika anti-HBc is an ELISA for detection of Ab to hepatitis B core Ag (anti-HBc) in human serum or plasma (21). The test is based on an inhibition principle. The wells of microelisa plate are coated with HBc-Ag as a solid phase Ag, if positive test sample was incubated in such a well with an anti-HBc, the HBc-Ag will be blocked partially or completely, after the addition of conjugate (anti-HBc labeled with HRP and incubation with substrate), and blue color was developed, which turns yellow when the reaction was stopped with H_2SO_4 (21). The details procedure was carried out as suggested in the leaflet supplied with the test kit (Bio Merieux, France).

RESULTS AND DISCUSSION

Viral hepatitis has become a major public health problem with consequent burden on economy for many countries. Regarding anti-HBc-IgG, this antibody is the main tool for epidemiological study on HBV infection prevalence, as it is present in both active and resolved infection, it is increased in the serum of infected patients early in the disease and last for many years after infection resolved, so anti-HBc-antibody is present even in the window period when the HBsAg has disappeared and yet anti-HBs-Ab is not detectable (22). In the present study the overall prevalence of anti-HBc-antibody in ten Iraqi governorates are (Babel 15.9 % , Duhok 14.6 % , Saladdin 10.7%, Mesan 9.6%, Basrah 9.4%, Baghdad /Kerkh 8.9% ,AlAnbar 8.5 %

,Nenava 8.5 % ,Theqar 8.3 % and Arbil 6.1 %). This study showed a variation in seroprevalence rates from one governorate to another. Probably influencing the epidemiology of hepatitis B infection from governorate to governorate are differences in geography, climate, degree of urbanization ,ethnic origin and sample size (23), besides that , both sexes can be affected by HBV. By analyzed the distribution results of studied groups according to gender, the results showed that males are more affected By HBV than females ,there were the positivity of anti-HBc Ab in males was 10.3 % ,while in females was 9.2 % (table 1), the sex differences among both gender could be explained on the basis that males may have a greater chance to come in contact with risk factors of HBV than females (23).More over , the distribution of studied groups according to the age are shown in (table 2), the results recorded that the age between (30- above 41 y) have a high prevalence rate of anti-HBc Ab (table 2), these results were in correspondence with the results of Grob *etal.*(2000) found that the prevalence of anti-Hbc Ab is higher in population within third to fourth decade (24) .

Table-1 : Prevalence of antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) according to sex.

Province	Male			Female			Total		
	No.	+	%	No.	+	%	No.	+	%
Duhok	225	27	12.0	275	46	17.8	500	73	14.6
Arbil	227	14	6.2	328	20	6.1	555	34	6.1
Nenava	327	14	10.4	539	40	7.4	866	74	8.5
Saladdin	134	15	11.1	61	6	9.8	195	21	10.7
AL-Anbar	97	8	8.2	90	8	8.8	187	16	8.5
Baghdad/Kerkh	97	10	10.3	93	7	7.5	190	17	8.9
Babel	148	25	16.9	144	19	13.2	292	44	15.6
Mesan	105	10	4.5	124	12	9.6	229	22	9.6
TheQar	134	14	10.4	105	6	5.7	239	20	8.3
Basrah	427	47	9.9	471	42	8.9	943	89	9.4
Total	1966	204	10.3	2230	206	9.2	4196	410	9.7

Table-2 : Prevalence of antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) according to age groups.

Age Groups																		
Province	1-10			11-20			21-30			31-40			41&above			Total		
	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%
Duhok	45	3	6.6	118	11	9.3	157	20	12.7	98	21	21.4	82	18	21.9	500	73	14.6
Arbil	133	1	0.75	135	8	6	71	6	8.5	50	5	10	166	14	8.4	555	34	6.1
Nenava	96	4	4.1	309	22	7.1	224	20	8.9	100	10	10	137	18	12.4	866	74	8.5
Saladdin	50	2	4	32	4	12.5	53	7	13.2	32	4	12.5	28	4	14.2	195	21	10.7
AL-Anbar	48	2	4.3	33	2	6.4	40	5	12.5	30	3	10	36	4	11.1	187	16	8.5
Baghdad/Kerkh	50	2	4	40	3	7.5	30	4	13.3	40	5	12.5	30	3	10	190	17	8.9
Babel	31	2	6.4	40	4	10	65	7	10.7	28	5	17.8	128	26	20.3	292	44	15.06
Mesan	45	1	2.2	64	7	10.9	44	3	6.8	31	3	9.6	45	8	17.7	229	22	9.6
TheQar	62	4	6.5	64	6	9.3	37	3	8.1	52	5	9.6	24	2	8.3	239	20	8.3
Basrah	79	3	3.8	262	25	9.5	298	27	9	146	14	9.6	158	20	12.7	943	89	9.4
Total	639	24	3.7	1097	92	8.4	1019	102	10	607	75	12.3	834	117	14	4196	410	9.8

Furthermore, this study was employed to calculate approximately the seroprevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg), because hepatitis B surface antigen represents the hallmark of HBV infection. The whole prevalence of hepatitis B surface antigen in ten Iraqi governorates are (Duhok 3.6%, Saladdin 3.4%, Babel 3.0%, Al-Anbar 2.9%, Theqar 2.4%, Mesan 2.1%, Basrah 1.9%, Baghdad/Kerkh 1.6%, Arbil 0.9% and Nenava 0.7%) (table 3). Iraq was considered to be within the area of intermediate endemicity where the WHO estimated the prevalence of hepatitis less than 10% of the general population (25,26,27). Moreover the results showed also that the prevalence of infection in males (2.3%) was higher than females (1.7%). There is a high similarity between this results and previous work, in Iraq many investigators reported that the prevalence of HBsAg in males were higher than in females (27,28,29). Al-Hilli (2000) found that the overall prevalence of HBsAg was 1.59% in Baghdad in blood donors and was higher in males than females for both viral markers (HBsAg and anti-HBcAb) (30). The difference in exposure rate to HBV infection between both sexes may be attributed to occupational factors, travel and social differences that are known to be more identified with male population (31).

Furthermore, in this study the most common age group affected, was between (30- above 41 y) (table 4). This result coincided with results of Sanchez-Tapias *et al.* (2002) reported that the most common age group was thirties for hepatitis and Dienstag *et al.* (1995) who also reported the forties was the most common age group for hepatitis (32,33), these results showed that individuals were affected at younger age group

which may be due to much earlier exposure to the etiological factor and increases steadily with the age. Finally ,Hepatitis B is a disease with global distribution, but there are significant differences in its prevalence between various geographical areas and between different age groups within specific areas, this variation depends on geography, climate, degree of urbanization ,ethnic origin , complex of behavioral, environmental and host factors.

Table -3 : Prevalence of hepatitis B surface antigen (HBS Ag) according to sex.

Province	Male			Female			Total		
	No.	+	%	No.	+	%	No.	+	%
Duhok	243	9	3.8	257	9	3.5	500	18	3.6
Arbil	227	2	0.9	303	3	0.9	530	5	0.9
Nenava	329	4	1.2	446	2	0.4	775	6	0.7
Saladdin	246	10	4	222	6	2.7	468	16	3.4
AL-Anbar	148	5	2	167	6	3.6	315	9	2.9
Baghdad/Kerkh	500	8	1.6	320	5	1.5	820	13	1.6
Babel	148	5	3.3	134	1	2.9	282	9	3.0
Mesan	71	2	2.8	68	1	1.4	139	3	2.1
TheQar	122	3	2.4	85	2	2.3	207	5	2.4
Basrah	52	1	1.9	108	2	1.8	160	3	1.9
Total	2086	49	2.3	2110	37	1.7	4196	87	2.0

Table-4: Prevalence of hepatitis B surface antigen (HBS Ag) according to age groups.

Province	Age Groups																	
	1-10			11-20			21-30			31-40			41&above			Total		
	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%	No	+	%
Duhok	45	1	2.2	118	3	2.5	157	6	3.8	117	6	5.1	63	2	3.2	500	18	3.6
Arbil	130	1	0.7	100	1	1	81	2	2.4	110	0	0	109	1	0.9	530	5	0.9
Nenawa	96	1	1	213	1	0.4	228	2	0.8	109	1	0.9	129	1	0.7	775	6	0.7
Saladdin	36	1	2.7	128	2	1.5	226	9	3.9	43	3	6.9	35	1	2.8	468	16	3.4
AL-Anbar	33	0	0	50	1	2	80	1	1.2	56	1	1.8	96	6	6.3	315	9	2.9
Baghdad/Kerkh	120	1	0.8	100	1	1	210	3	1.4	230	4	1.7	160	4	2.5	820	13	1.6
Babel	31	0	0	40	1	2.5	55	2	3.6	28	0	0	128	6	4.7	282	9	3
Mesani	24	0	0	49	1	2.0	46	1	2.1	20	1	5.0	0	0	0	139	3	2.1
TheQar	33	1	3.0	65	1	1.5	28	2	7.1	71	1	1.4	10	0	0	207	5	2.4
Basrah	24	0	0	29	1	3.4	53	1	1.9	25	0	0	29	1	3.4	160	3	1.9
Total	572	6	1.0	892	13	1.45	1164	29	2.5	809	17	2.1	759	22	2.9	4196	87	2.0

REFERENCES

- 1- Wright, T.L. Introduction to chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol.*; 101(Suppl 1):S1-6. (2006).
- 2- Wurie, I.M.; Wurie, A.T. and Gevao, S.M. Sero-prevalence of hepatitis B virus among middle to high socio-economic antenatal population in Sierra Leone. *West Afr J Med.*; 24:18-20. (2005).
- 3- McCarthy, M.C.; El-Tigani, A.; Khalid, I.O. and Hyams, K.C. Hepatitis B and C in Juba, southern Sudan: results of a serosurvey. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 88:534-536. (1994).
- 4- Brooks, G.F.; Butel, J.S.; and Morse, S.A. *Medical Microbiology*. 22^{ed}. McGraw-Hill. USA (2001).
- 5- Communicable Disease Center. Hepatitis B. *MMWR.*; 40: 624 – 639. (2005).
- 6- Omer, A.R. and AL-Salmani, A. Hepatitis B virus. *Health Ministry and WHO J.*; 5:27. (2005).
- 7- Communicable Disease Center. Recommendation of the immunization practices advisor committee (ACP): recommendation for protection against viral hepatitis. *MMWR.*; 34: 313 – 24. (1985).
- 8- Communicable Disease Center. Prevention of hepatitis through active or passive immunization. *MMWR.*; 48: RR-12. (1999).
- 9- Marcus, S.; Al-Moslih, M. and Al-Tawil, N.G. Virological and immunological studies in patients with acute viral hepatitis. *Scand J Immunology*; 37: 265. (1993).
- 10- W.H.O. Viral hepatitis in Iraq. *Iraqi Med. J.*; 30: 31-36. (1996 b).
- 11- Omer, A.R. and Al-Douri, S. Viral hepatitis in Iraqi normal population. *Proceedings of the 6th International congress of virology, Sendai- Japan*; p 32-36. (1984).
- 12- Omer, A.R. Viral hepatitis among hemophiliac and thalassemic patients. *CDC/Iraq*. (2004).
- 13- Toukan, A.; Sharaiha, Z.K. and Abu-el-Rub, O. A. The epidemiology of hepatitis B virus among family members in the Middle East. *Am. J. Epidemiol.*; 132: 220-232. (1990).
- 14- Toukan, A. Hepatitis B in the Middle East: Aspects of epidemiology and liver disease after infection. *Gut*; 38 (Suppl. 2): S2 – S4. (1996).
- 15- Zali, M.R.; Mohammad, K. and Frahadi, A. Epidemiology of hepatitis B in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health J.*; 2 (2): 290-298. (1996).
- 16- Takieddine, F.N.; Tufenkeji, H.Y.; Sheth, K.V. and Ghandour, M.H. Prevalence of HBV markers in adult Saudis in relation to age and sex. *Ann. Saud. Med. J.*; 6: 205-209. (1996).
- 17- W.H.O. Hepatitis B infection. Edited by Previsoni, N. and Lavanchy, D. and Zuckerman, A.J., Department of communicable disease surveillance response. (2002).

- 18- Voller, A.; Bartlett, A. and Bidwell, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin. Pathology*; 31: 507. (1978).
- 19- Ahtone, J. and Maynard, J.E. Laboratory diagnosis of hepatitis B. *JAMA*; 249:206-210. (1993).
- 20- Chaple, H. and Haeney, M. Basic component. In *Essential of Clinical Immunology*. Editors: Chapel, H. and Heaney, M. 3rd edition, Chapter I, Black well science USA. It d, pp:8-14. (1993).
- 21- Klaus, R.; Huber, C.S. and Kurt, B. Detection of HBV with a third generation enzyme immunoassay. *J. Hepatology*; 24: 3. (1996).
- 22- Gerlich, W. Structure and molecular virology. In: Zuckermann A J and Thomas H C (4th ed). *Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management*. Edinburgh:Churchill Livingstone. 84-113. (1993).
- 23- Berenguer, M. and Wright, T.L. Viral hepatitis. In: Sleisenger and Fordtrans *Gastro intestinal and liver disease, Pathophysiology, diagnosis, management*. Edited by Feldman, M., Friedman, L.S., and Sleisenger, M.H. vol 3. pp: 1278-1290. (2002).
- 24- Grob, P.; Jilg, W.; Bornhak, H. and Gerken, G. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol*; 62: 450-5. (2000).
- 25- AL-Shama, R. and Omer, A. HBV markers in haemodialysis unit in Iraq. *Proceeding of second national symposium on viral hepatitis, Iraq*. 27-29. (1984).
- 26- Mahmood, A.E. Study of some immunogenetic aspects of viral hepatitis C patients of haemodialysis units. Ph.D. Thesis, College of Sciences, Baghdad university. (2005).
- 27- AL-Saaedi, A.A. A seroepidemiological survey on hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to hepatitis C virus (anti-HCV) in AL-Qadisiya governorate. M.Sc. Thesis. College of medicine, University of Kufa. (2001).
- 28- Omer A. Hepatitis B antigen in a cross section of Iraqi community. Study of the immunological status of carriers M. Sc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad. (1975).
- 29- Mohammed, D. Prenatal transmission of HBV. M. Sc. Thesis. College of Medicine, University of Baghdad. (1986).
- 30- Al-Hilli, J. M. Prevalence of serological markers of HBV and HCV among blood donors and certain risk groups in Baghdad. *J. Fac. Med., Baghdad*, 40 (1). (2000).
- 31- Hansson, B.G. Age and sex related distribution of antibodies to HBs-Ag in Swedish population. *Acta. Pathol. Microbial. Scand*; 84: 342-346. (1986).

- 31- Sanchez-Tapias, J.M.;Costa, J.; Mas, A. Influence of HBV genotype on the long term outcome of chronic HBV in western patients. *Gastroenterology*; 123: 1848. (2002).
- 32- Dienstag, J.L.; Perrillo, R.P.;Schiff, E.R. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N. Engl. J. Med.*; 333(25): 1657. (1995)

Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among urinary tract infections

Shrooq rayes, Suhad Faisul Hatim, and Ishraq Hassan
College of Pharmacy /Almustansiriya University

Received 4/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

شخصت 30 عزلة تعود لبكتريا *Escherichia coli* بنسبة (41.2%) و 12 عزلة تعود لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* بنسبة (15%) من مجموع 80 عزلة بكتيرية حيث تم عزلها من 270 عينة ادرار من رجال و نساء ممن يعانون من اخماج المجاري البولية . و تم التشخيص باستخدام الاختبارات البكتريولوجية و البيوكيميائية . لقد بينت النتائج في هذه الدراسة على ان بكتريا *E. coli* هي المسبب الرئيسي لأصابات المجاري البولية بنسبة (41.2%) ثم تليها بكتريا *Klebsiella pneumoniae* بنسبة (15%). اجري اختبار الحساسية للمضادات الميكروبية باستخدام تقنية انتشار الأقراص على وسط مولر هنتون الصلب و تم استخدام 12 نوع من اقراص المضادات الميكروبية (amikacin و imipenem و ciprofloxacin و cotrimoxazole و nitrofurantoin و nalidixic acid و norfloxacin و piperacillin و ampicillin و augmentin و gentamycin) . كانت جميع عزلات *Escherichia coli* حساسة لمضاد imipenem (100%) و amikacin (66.6%) و nitrofurantoin (66.6%) و ابدت مقاومة لمضاد ampicillin (90%) و augmentin (90%) . أظهرت جميع عزلات *Klebsiella pneumoniae* حساسية لمضاد imipenem (100%) و مقاومة لمضاد augmentin (83.3%) و co-trimoxazole (83.3%) . اجري اختبار انتاج البيتا لكتاميز بطريقة اليود و بينت النتائج ايجابية الاختبار لخمس عزلات منتجة لهذا الأنزيم : ثلاث عزلات تعود لبكتريا *Escherichia coli* و عزلتان لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* .

ABSTRACT

30 isolates of *Escherichia coli* (41.2%) and 12 isolates of *Klebsiella pneumoniae* (15%) were detected from 80 isolates . 270 urine samples from females and males were collected from patients with urinary tract infection. The bacterial isolates were detected by bacteriological and biochemical tests. This study revealed that *E. coli* is the most common cause of community-acquired UTI (41.2%), followed by *K. pneumoniae* (15%) .

Susceptibility to antibiotics was assessed by the disc diffusion technique on Mueller–Hinton agar (MH). 12 kinds of antibiotic discs used (amikacin , imipenem , ciprofloxacin , tobramycin , cotrimoxazole , nalidexic acid, nitrofurantoin , norfloxacin , piperacillin , ampicillin , augmentin and gentamycin).

All the isolates of *E. coli* were sensitive to imipenem ((100%) , amikacin (66.6%) and nitrofurantoin (66.6%) , while they were resistant to ampicillin (90%) and augmentin (90%) . The isolates of *K. pneumoniae* were all sensitive to imipenem (100%) and most of them were resistant to augmentin (83.3%) and co-trimethoxazole (83.3%) . The isolates were tested for beta-lactamase production , and 5 isolates were regarded as positive producer ; 3 isolates of *E. coli* and two isolates of *K. pneumoniae* .

INTRODUCTION

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common bacterial infections encountered by both general practitioners and hospital doctors [1]. In almost all cases, treatment must be initiated before the final bacteriological results are available. Therefore, studies to increase our knowledge about the types of pathogens responsible for UTIs and their resistance patterns to antibiotic drugs are very important to help clinicians choose the right empirical treatment [2].

Acute UTIs are associated with substantial morbidity and problems of recurrent infections. Studies have shown that approximately 25% of women with first UTI will have another attack within 6 months. A mounting body of evidence indicate that UTI is responsible for a large proportion of antibiotic consumption in and out of the hospital. No wonder that the infection has a large socio-economic impact and contributes to the emergence of antibiotic resistance in the hospital and the community [3]. The vast majority of uncomplicated UTIs are caused by the Gram-negative bacillus *Escherichia coli*, with other pathogens including enterococci, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp. and *Proteus mirabilis* and effective management of UTIs in both the inpatient and outpatient settings has been complicated by the fact that many uropathogenic strains have developed resistance to antimicrobials, including cotrimoxazole (trimethoprim /sulfamethoxazole), the current first-line treatment for uncomplicated UTIs in the US and many other countries. Antimicrobial resistance has been associated with an increased rate of clinical failure. Use of fluoroquinolones is recommended for uncomplicated UTIs in areas where the incidence of cotrimoxazole resistance exceeds 10%, as well as for the treatment of complicated UTIs and acute pyelonephritis. Ciprofloxacin is a widely used fluoroquinolone with high bactericidal activity against uropathogens and well established clinical efficacy in the treatment of UTIs[4].

The aim of this study was to show that there is increasing resistance among urinary tract pathogens to conventional drugs and also to obtain data on susceptibility patterns of pathogens responsible for urinary tract infections.

MATERIALS AND METHODS

Isolation :

We carried out a study from the urine of out-patients with urinary tract infection who attended Baghdad teaching hospital between(April - July 2008).

Specimens:

Two hundred and seventy urine samples were collected from females and males, only one specimen per patient was included in the study. The bacteria were identified by Gram staining and standard microbiological techniques: the specimens were plated on blood agar, MacConkey agar, mannitol salt agar, Simmons citrate agar, urea agar and triple sugar iron agar. Catalase test, oxidase test, API system and EPI system (Oxoid) were also used [5].

Antibiotic susceptibility testing:

Susceptibility to antibiotics was assessed by the disc diffusion technique on Mueller–Hinton agar. 12 kinds of antibiotic discs (amikacin, imipenem, ciprofloxacin, tobramycin, cotrimoxazole, nalidixic acid, nitrofurantoin, norfloxacin, piperacillin, ampicillin, and augmentin) were used (Oxoid).

Standard strains: Standard strains: *E. coli* ATCC (25922), *P. aeruginosa* ATCC (27853) were used for antibiotic susceptibility test.

Beta-lactamase assay:

Production of beta-lactamase test was done for the isolates by using the rapid idometric method of WHO [6].

RESULTS AND DISCUSSION

Out of 270 urine samples, 80 bacterial isolates (29.6 %) were detected by bacteriological and biochemical tests. The overall species distribution is shown in Table 1. Our study showed that *E. coli* is the most common cause of community-acquired UTI (41.2%), followed by *K. pneumoniae* (15%). 80 Pathogens were isolated from 270 urine sample (34.1%), 54 of the patients were female and 26 were male.

Table-1: Number and percentage of bacterial isolates from 270 specimens of urinary tract infections

Bacterial isolates	Number	%
<i>Escherichia coli</i>	33	41.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	15
<i>Proteus Spp.</i>	10	12.5
<i>Enterobacter Spp.</i>	7	8.7
<i>Acinetobacter Spp.</i>	6	7.5
<i>Streptococcus Spp.</i>	5	6.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	5
<i>Pseudomonas Spp.</i>	3	3.7
Total	80	

Table -2:Antibiotics patterns of *E.coli* from urinary tract infections

Bacteria	Ak 15	Imp 10	Cip 10	Tob 10l	G 30	Co-Tr 25	Na 30	Nf 300	Nor 10	Pip 100	Am 10	Auc 30
<i>E.coli</i> 1	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
2	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R
3	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
4	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R
5	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R
7	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
8	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R
9	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R
10	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R
11	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
12	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
13	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R
14	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
15	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
18	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R
19	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
20	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
21	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
22	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
23	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
24	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
25	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
27	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
28	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R
29	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
30	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
31	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
32	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
33	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R

Ak=amikacin,Cip=ciprofloxacin,Tb=tobramicin,Co-tr=trimethoprim-cotrimethaxazole ,Na=nalidixic acid ,Nf=nitrofurantine ,Nor=norfloxacin ,Pip=piracillin,Am=ampicillin,Auc=augmentin,Imp=imipenem,G=gentamycin, R=resistant isolate, S=sensitive isolate.

Table -3:Antibiotics patterns of *K.Pneumoniae* from urinary tract infections

Bacteria	Ak 30	Imp 10	Cip 10	Tob 10	G 30	Co-Tr 25	Na 30	Nf 300	Nor 10	Pip 100	Am 10	Auc 30
<i>K.Pneumoniae</i> 1	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
2	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S
3	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R
4	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
6	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R
7	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R
8	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
10	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
11	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
12	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R

Ak=amikacin,Cip=ciprofloxacin,Tb=tobramicin,Co-tr=trimethoprim-cotrimethaxazole ,Na=nalidixic acid, Nf=nitrofurantine,Nor=norfloxacin ,Pip=piracillin,Am=ampicillin, Auc=augmentin, Imp=imipenem, G=gentamycinR=resistant isolate, S=sensitive isolate.

Beta-lactamase production was done by idometric method and the results revealed that only 3 isolates were positive for *E. coli* and 2 isolates of *K. pneumoniae*.

In this study most of the isolates of *E. coli* were resistant to ampicillin and augmentin (both 30 isolates) followed by piperacillin (28 isolates), and co-trimethoxazole (25 isolates). All the isolates were sensitive to imipenem (33 isolates) and (22 isolates) were sensitive to amikacin and nitrofurantoin as in table 2 and 3. All the isolates of *K. pneumoniae* were resistant to ampicillin (12 isolates), followed by augmentin and co-trimethoxazole (both 10 isolates) and nitrofurantoin (8 isolates), while all the isolates were sensitive to imipenem (12 isolates) and amikacin (10 isolates) as in table 2 and 3.

The detection of urinary tract infection is difficult, because the background rate of urinary tract infection is so high, and because many different organisms can cause urinary tract infection. Further, the bacteria that most commonly cause urinary tract infection, *E. coli*, a usual bowel inhabitant, are extremely heterogeneous. With *E. coli*, collections resulting from population-based epidemiologic studies can assist the molecular biologist in identifying groups for studying pathogenesis and in making inferences about the potential role of newly identified genes. These results, in turn, can be used to further characterize the epidemiology [7].

In a new study designed in Iran at 2009 [8], the greatest resistance was observed against ampicillin (96.3%) and the least resistance was against ceftazidime (16.5%) [8]. These results may be explained by the high prevalence of plasmid-mediated *ampC* in a selected population of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* [9]. In this study both *E. coli* and *K. pneumoniae* were resistant to ampicillin and this may be explained by the ability of resistance to transfer by plasmids and many mechanisms.

Another study designed for UTI which focused on *E. coli* and *Klebsiella*, revealed that all strains were resistant to ceftazidime, gentamicin, and tobramycin; 96% were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and 41% to ciprofloxacin hydrochloride. Widespread dissemination of a predominant antibiotic resistance plasmid has occurred. Use of broad-spectrum oral antibiotics and probably poor infection control practices may facilitate spread of this plasmid-mediated resistance [10]. Our results showed the resistance of trimethoprim and ciprofloxacin was very high which resulted from the abuse of these antibiotics among people.

In The Netherlands, *Escherichia coli* isolates resistance to norfloxacin increased from 1.3% in 1989 to 5.8% in 1998. Multiresistance, defined as resistance to norfloxacin and at least two of the other three antibiotics, increased from 0.5% in 1989 to 4.0% in 1998 [11].

In a study of outpatient clinics of Ankara University Medical Faculty, Ibni-Sina Hospital during 2005-2006, the resistance rates of *E. coli* isolates for ampicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulonate, cefuroxime, ceftriaxone, fluoroquinolones (FQ), co-trimoxazole (TMP-SMX) and gentamicin were 55.1%, 32.7%, 32.7%, 23.4%, 15.9%, 25.2%, 41.1%, 6.1% respectively [12]. In India a total of 174 urine samples were analyzed for isolation and identification, 68 found to be significant bacteriuria with *Escherichia coli* (59%), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (15%), *Klebsiella pneumoniae* (10%), *Proteus mirabilis* (9%), *Staphylococcus aureus* (6%) and *Citrobacter freundii* (1%).

The urinary tract infections were found to most frequently in female (63%) than male (37%). The isolated uropathogens showed resistant to ampicillin (87%), co-trimoxazole (91%), nalidixic acid (88%) and sensitive to nitrofurantoin (52%), cephalexin (54%) and norfloxacin (71%) [12]. Urinary tract infection was frequently caused in female (63%) than male (37%), which were also observed by [13].

In this study 54 patients were female and 26 patients were male. The incidence of UTI is greater in women as compared to men who may be either due to anatomical predisposition or urothelial mucosa adherence to the mucopolysaccharide lining or other host factors [14] and *Escherichia coli* is the most frequent urinary tract pathogen isolated from urinary tract infections as it is present in the gastrointestinal tract and provide a pool for initiation of UTI [15]. This present study data gives idea about the increased antibiotics resistance of uropathogens. This data not only help in proper treatment of UTI patients but also discourage the indiscriminate use of antibiotics and prevent further development of bacterial drug resistance.

The most prevalent aetiological agent was *Escherichia coli* (73.0%), followed by *Proteus* spp. (8.9%) and other species of Enterobacteriaceae (9.6%). Few community infections were caused by Gram-positive bacteria (2.2%). Gram-positive cocci were isolated more frequently from a hospital setting (14.1%) and the most common were *Enterococcus* spp. (8.5%). *Pseudomonas aeruginosa* was found only among hospital isolates and was responsible for 10.7% of infections [3]. In other studies, *Escherichia coli*, accounting for 47% of isolates in hospitals, followed by *Klebsiella pneumoniae* (9.6%), *Streptococcus agalactiae* (GBS; 9.5%), *Enterococcus faecalis* (4.2%) and *Pseudomonas aeruginosa* (4.1%) [16]. Another study also of UTI showed that more than 85% of isolates were Enterobacteriaceae: *E. coli* (67.2%), *Klebsiella pneumoniae* (9.6%), *Proteus mirabilis* (3.6%) and other Enterobacteriaceae (5.5%). Other Gram-negative bacteria (*Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.) accounted for 2.2% of the

isolates, while only 11.4% of the isolates were Gram-positive: *S. aureus* (3.9%), *Enterococcus faecalis* (2.8%), streptococci (3.2%) and coagulase-negative staphylococci (CoNS) (1.5%). There was no significant difference concerning the species according to age classes or gender [17].

The data will also help the clinicians to give proper treatment and prescription of most sensitive antibiotic to the patient and avoid use of resistant antibiotics. Most of the studies refer the resistance to β -lactam antibiotics to the production of betalactamase by plasmids in *E. coli* and *Klebsiella* [18].

REFERENCES

1. (Sussman M. Urinary tract infections: Microbiology and Microbial Infections (9th ed) pp. 601–21 Topley & Wilson's (Arnold, London) (1998).
2. . Smith R and Coast J ,Antimicrobial resistance: a global response. Bull World Health Organ 80:126–33. [Web of Science][Medline] (2002).
3. . Katarzyna Hryniewicz, Katarzyna Szczypa, Agnieszka Sulikowska, Krzysztof Jankowski, Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland, Journal of Antimicrobial Chemotherapy :, 773-780 (2002).
4. Blondeau JM, Current issues in the management of urinary tract infections: extended-release ciprofloxacin as a novel treatment option. Drugs;64(6):611-28 (2004).
5. . Collee J; Fraser A; Marimon , & Simmons, Culture tests & medium .In : Practical Medical Microbiology , 4th Curchil Livingstone (1996).
6. World Health Organization, Techniques for detection of β -lactamase producing strains of *Neisseria gonorrhoea* ., 616:137-43 (1987).
7. Betsy Foxman and Lee Riley, Molecular Epidemiology: Focus on nfection., American Journal of Epidemiology 153(12):1135-1141 (2001).
8. Irajian G, Jazayeri-Moghadas A, Beheshti A, Prevalence of Extended spectrum Beta lactamase positive and multidrug resistance pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates, Semnan, Iran. IRAN. J MICROBIOL. 1(1):49-53 (2009).
9. TY Tan, S.Y. Ng , L Teo, Y Koh and CH Teok, Detection of plasmid mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* journal of Clinical Pathology ;61:642-644 (2008).

10. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering R:V, Nathan C, Bush K, Weinstein RA;Michae. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. Hospital and Medical Center, Chicago, Ill,USA. JAMA. Feb10;281(6):563-4(1999) .
11. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG,Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract nfections in the netherlands.Antimicrob Chemother .;46(2):223-8(2000).
12. Cenk Aypak , Adalet Altunsoy and Nurşen Düzgün ,Empiric antibiotic therapy in acute uncomplicated urinary tract infections and fluoroquinolone resistance: a prospective observational study, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials , 8:27 (2009).
- 13.D.H. Tambekar, D.V. Dhanorkar, S.R. Gulhane, V.K. Khandelwal and M.N.Dudhane Antibacterial susceptibility of some urinary tract pathogens to commonly used antibiotics . African Journal of Biotechnology,5(17):1562-1565 (2006).
14. Schaeffer AJ, Rajan N Cao Q, Anderson BE, Pruden DL, Sensibar J, Duncan JL., Host pathogenesis in urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents;17: 245-251(2001).
15. Raksha R, Shrinivasa H, Mawcaden RS, Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infection. Ind J Med Microbiol;21 (2);102-107(2003).
16. MobleyHL.,Virulence of the two primary uropathogens,,ASM News; 66403–410 (2000).
17. Noura Al Sweih, a.; Wafaa Jamal, b.; V.O. Rotimi, Spectrum and antibiotic Resistance of Uropathogens Isolated from Hospital and Community Patients with Urinary Tract Infections in Two Large Hospitals in Kuwait, Med Princ Pract ;14:401–407 (2005).
- 18.Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, Li G, Jiang Y,Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY 2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. J Clin Microbiol. 46(4):1317(2008).

Prospective Study on Functional Outcome of Intra Articular Hyaluronic Acid with Oral Glucosamine and Chondroitin Sulfate Compared to Intra Articular Hyaluronic Acid Alone for Treatment of Osteoarthritis of Knee Joint

Ahmed Alkhuzai, Seerwan Hama Shareef, and Zeyad Mustafa
Sulaimaniyah University.

Received 5/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

يستخدم الحقن المفصلي للركبة بمادة هيايلورونيك اسيد، اقراص كلوكوز امين و كوندروتين سلفيت في معالجة مرضى سوفان الركبة. في هذا البحث قمنا بتحديد مدى الاستفادة و تأثيرات استخدام الحقن المفصلي لهيايلورونيك اسيد مع حبة كلوكوز امين و كوندروتين سلفيت مقارنة باستخدام حقنة المفصلي لهيايلورونيك اسيد فقط في معالجة مرض سوفان الركبة. تم اختيار 104 عينة من المرضى يعانون من مرض سوفان الركبة و تم تقسيمهم الى مجموعتين عشوائيا بعد تحديد مرضى السوفان فقط.

المجموعة أ : تتكون من 55 عينة يعانون من التصنيف الثاني و الثالث لسوفان الركبة طبقا لتصنيف (kellgren). ان هذه المجموعة كانت تخضع لعلاج الحقن المفصلي لهيايلورونيك اسيد 25 ملغم اسبوعيا و لمدة خمسة اسابيع مع عقاري كلوكوز امين 1500 ملغم و كوندروتين سلفيت 645 ملغم يوميا عن طريق الفم لمدة سنة واحدة.

المجموعة ب : تتكون من 49 عينة يعانون من التصنيف الثاني و الثالث لسوفان الركبة. ان هذه المجموعة كانت تخضع لعلاج الحقن المفصلي هيايلورونيك اسيد 25 ملغم اسبوعيا و لمدة خمسة اسابيع فقط.

تم متابعة المجموعتين لمدة اثنا عشر شهرا، و كانت متابعة المرضى و استجاباتهم للعلاج تستند على تصنيفي WOMAC و Lequesne's و كانت المتابعة قد اعتمدت على اخذ البيانات الاولى و عند الشهر الاول، الثالث، السادس و الشهر الثاني عشر.

ان عدد مرضى المجموعة (أ) والتي اكملت المتابعة في دراسة البحث كانت 55 مريضا فقط. ان معدل العمر ضمن هذه المجموعة كان 61 سنة. اما عدد مرضى المجموعة (ب) والتي اكملت المتابعة كان 49 مريضا فقط و كان معدل العمر ضمن هذه المجموعة 60 سنة.

في كلتا المجموعتين و خلال المتابعة في البحث كان هناك انخفاض واضح ومهم في المعدل الوسطي طبقا لتصنيفي WOMAC و Lequesne's. (في بداية الدراسة كان المعدل الوسطي لتصنيف Lequesne's للمجموعة أ 14.4 و مجموعة ب كان 13.8 و المعدل الوسطي لتصنيف WOMAC للمجموعة أ كان 35.9 و مجموعة ب كان 34.7. و قد لوحظ تغييرا في المعدل الوسطي خلال مدة البحث. كان المعدل الوسطي في الشهر الثاني عشر لتصنيف Lequesne's للمجموعة أ 9.2 و مجموعة ب كان 11.8 و المعدل الوسطي لتصنيف WOMAC للمجموعة أ 22 و مجموعة ب كان 29.6 ($p\text{-value} < 0.0001$)

و ايضا كان هناك فرقا احصائيا مهما في الشهر الثاني عشر لتصنيفي WOMAC و Lequesne's بين المجموعتين أ و ب. ($p\text{-value} < 0.0001$). لم يتم تسجيل اى عوارض جانبية شديدة خلال مدة البحث.

من خلال دراستنا في هذا البحث استنتجنا ان استخدام الحقن المفصلي لهيايلورونيك اسيد 25 ملغم اسبوعيا و لمدة خمسة اسابيع مع عقاري كلوكوز امين 1500 ملغم و كوندروتين سلفيت 645 ملغم يوميا عن طريق الفم لمدة سنة واحدة كانت نتائجه افضل من استخدام الحقن المفصلي لهيايلورونيك اسيد 25 ملغم اسبوعيا و لمدة خمسة اسابيع فقط. ان هذا المزيج الدوائي كان افضل في تخفيف الام مفصل الركبة و تحسين اداء وظيفة المفصل ومن ثم اداء المريض و لفترة اطول للمرضى الذين يعانون من التصنيف الثاني و الثالث لسوفان الركبة.

ABSTRACT

We studied the effect of combination of intra articular injection of hyaluronic acid plus oral glucosamine and chondroitin sulfate compared to intra articular injection of hyaluronic acid alone in treatment of knee osteoarthritis.

In prospective comparative study 104 patients with knee osteoarthritis were randomized according to inclusion exclusion criteria into two groups to receive either, intra-articular injections of hyaluronic acid 25 mg plus oral combination of glucosamine 1500mg and chondroitin sulfate 645 mg daily for 1 year, or receive intra-articular injection of hyaluronic acid 25 mg alone. The patients were followed up for 12 months period. The primary outcome measurements were according to Lequesne's and WOMAC scores.

In both group A and B significant reduction in the mean of both Lequesne's and WOMAC scores from baseline were seen at all follow up visit for 12 months. Also there were significant statistical differences at 12 months for both Lequesne's and WOMAC scores between group A and group B (p-value < 0.0001). No severe adverse events related to drugs were observed.

We concluded that intra-articular injections of hyaluronic acid plus oral combination of glucosamine and chondroitin sulfate for 1 year are superior to intra-articular injections of hyaluronic acid alone.

Key words: *OA osteoarthritis, HA hyaluronic acid, GS glucosamine, CS chondroitin sulfate, IA Intraarticular.*

INTRODUCTION

Osteoarthritis is the most common cause of musculoskeletal disability in elderly. (1) Osteoarthritis can arise in any synovial joint in the body (2) The important risk factors for OA are obesity, previous knee injury, selected physical activity.(3, 4) . Other risk factors are torn meniscus, ligament instability. (5) The articular surface is lubricated by a viscous fluid called synovial fluid. It is produced by synovial membrane. (6) The cartilage consists of 70% water, collagen with proteoglycans and glycosaminoglycans (consisting mainly of aggrecan and chondroitin) produced by chondrocytes. (7) Hyaluronic acid is one of the most important components of synovial fluid. It is usually accepted as protector of articular cartilage. (8)

The HA was discovered by Meyer and Palmer in 1934 in the vitreous humor of cattle eyes. (9) The concept of Viscosupplementation for the joint was developed by Endre A. Balazs and his co-worker in 1960s. Hylan is an easily deformable gel with fluid like property. In that time, the development of hyaluronan, derived from human umbilical cord and rooster comb, for the medical use was begun. (8)

Viscosupplementation came into clinical use in Japan and Italy in 1987, in Canada in 1992, in Europe in 1995 and in the United States in 1997. (10) At present, multiple Viscosupplementation products from various sources, with different degree of purity and different molecular weights,

are available for medical applications (11) Hyaluronan is a large, polydisperse, linear glycosaminoglycan. The synoviocytes, fibroblasts and chondrocytes all synthesize HA. In normal human synovial fluid the MW of HA is $6-7 \times 10^6$ Da. (12) the actual period that the hyaluronan stays with in joint space is in the order of hours to days, but the time of clinical efficacy is often in the order of months. (11) When the fluid accumulates in joint due to any pathology, the concentration of HA will decrease, which leads to a viscous circle. In arthragia due to pain and increase in fluid volume, the joint movement decrease. In such situation the injected HA restores the theological properties of synovial fluid. (8) Glucosamine and chondroitin sulfate are symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis (SYSADOA). These substances are characterized by both a several week delay in improvement of OA symptoms. . (13) The rationale for their usage is based on a general belief that osteoarthritis is associated with a local deficiency in some key natural substances. Therefore, it is assumed that they work as a "building box" for cartilage extracellular matrix repair. (14)

PATIENTS AND METHODS

This study was prospective comparative clinical trail. From November 2008 to November 2009 one hundred twelve patients attending private out patient clinic in Sulaimaniyah city with a diagnosis of OA of one or both knee joints according to the American College of Rheumatology Criteria were included. All patients had x ray of knee with kellgren and Lawrence grade two or three and hematological investigation prior to study entry.

Inclusion criteria are adult of both genders with a minimum age of 45 years. OA of one or both knee joint, radiographic changes equivalent to kellgren stage II and III, and dissatisfaction with prior attempt at non operative treatment as NSAID, physiotherapy.

The most widely used classification schemes for OA are based on the Radiological appearance of the joint Severity may be graded based on the 0-4 scale developed by:

Kellgren and Lawrence (15);

- Grade 1; doubtful narrowing of joint space and possible osteophyte lipping.
- Grade 2; definite osteophyte and possible narrowing of joint space.
- Grade 3; moderate multiple osteophytes, definite narrowing of joint space, some sclerosis and possible deformity of bone ends.
- Grade 4; large osteophytes, marked narrowing of joint space, sclerosis

Exclusion criteria are; Kellgren grade 1 and grade 4 OA of knee. Allergy to egg protein, any systemic active inflammatory condition such as Rheumatoid arthritis, gout, pseudo gout, ankylosing spondylitis, or infection as septic arthritis. Meniscal diseases, ligament and Meniscal injuries.

As our study is an Intraarticular injection of HA plus combination of oral GS and CS compared to Intraarticular injection of HA alone, Following initial screening, patients who fulfilled the entry criteria were admitted to the trial. We divided randomly the patients into two groups. Group A were 55 patients who received IA injection of HA and oral GS and CS and group B were 49 patients who received injection of HA alone to one or both knee joint.

For assessment of pain and function of knee joint we used both WOMAC and Lequesne's indices to know the effect of treatment on pain and functional outcome of this new line of treatment of OA. The patients were asked at the end of treatment about the satisfaction and any adverse events during follow up period. The WOMAC and Lequesne's indices were used for assessments.



Figure -1: intra articular injection of HA into knee joint.

Patient's Full Name: _____ Date: _____

Month Day Year

WOMAC OSTEOARTHRITIS INDEX⁽²¹⁾

1. The following questions concern the amount of pain you are currently experiencing in the knees. For each situation, the amount of pain in the past 48 hours.

	None	mild	moderate	severe	extreme
A. Walking on a flat surface	A. ☐	☐	☐	☐	☐
B. Going up or down stairs	B. ☐	☐	☐	☐	☐
C. At night while in bed	C. ☐	☐	☐	☐	☐
D. Sitting or lying	D. ☐	☐	☐	☐	☐
E. Standing upright	E. ☐	☐	☐	☐	☐

2. The level of pain experienced in the past 48 hours for each one of your knees.

	None	mild	moderate	severe	extreme
A. Right knee	A. ☐	☐	☐	☐	☐
B. Left knee	B. ☐	☐	☐	☐	☐

3. How severe is stiffness after first awakening in the morning?

None	mild	moderate	severe	extreme
☐	☐	☐	☐	☐

4. How severe is stiffness after sitting, lying, or resting later in the day?

None	mild	moderate	severe	extreme
☐	☐	☐	☐	☐

5. The following questions concern your physical function. By this we mean your ability to move around and to look after yourself. For each of the following activities, please indicate the degree of difficulty experienced in the last 48 hours, in your knees.

What degree of difficulty do you have with?

	None	mild	moderate	severe	extreme
A. Descending (going down) stairs	A. ☐	☐	☐	☐	☐
B. Ascending (going up) stairs	B. ☐	☐	☐	☐	☐
C. Rising from sitting	C. ☐	☐	☐	☐	☐
D. Standing	D. ☐	☐	☐	☐	☐
E. Bending to floor	E. ☐	☐	☐	☐	☐
F. Walking on a flat surface	F. ☐	☐	☐	☐	☐
G. Getting in/out of car	G. ☐	☐	☐	☐	☐
H. Going shopping	H. ☐	☐	☐	☐	☐
I. Putting on socks/stockings	I. ☐	☐	☐	☐	☐
J. Rising from bed	J. ☐	☐	☐	☐	☐
K. Taking off socks/stockings	K. ☐	☐	☐	☐	☐
L. Lying in bed	L. ☐	☐	☐	☐	☐
M. Getting in/out of bath	M. ☐	☐	☐	☐	☐
N. Sitting	N. ☐	☐	☐	☐	☐
O. Getting on/off toilet	O. ☐	☐	☐	☐	☐
P. Heavy domestic duties (mowing the lawn, lifting heavy grocery bags)	P. ☐	☐	☐	☐	☐
Q. Light domestic duties (such as tidying a room, dusting, cooking)	Q. ☐	☐	☐	☐	☐

Patient's full name _____

Lequesne's index ⁽¹⁸⁾

Pain or discomfort

1. During nocturnal bed rest:

- non or insignificant
- only on movement or in certain position
- with no movement

0
1
2

2. Morning stiffness or regressive pain after rising

- one minute or less
- more than 1 minute but less than 15 min
- 15 minutes or more

0
1
2

3. after standing for 30 minutes 0 – 1

☐

4. While ambulating

- None
- Only after ambulating some distance
- After initial ambulation and increasing with continued ambulation
- After initial ambulation not increasing With continued ambulation

0
1
2
1

5. While getting up from sitting with out the help of arms 0 – 1

☐

6. Maximum distance walked (may walk with pain)

- Unlimited
- More than 1 km, but limited
- About a km in about 15 min
- From 500 to 900 m about 15 min
- From 300 to 500 m
- From 100 to 300 m
- Less than 100m
- With one walking stick or crutch
- With two walking sticks or crutches

0
1
2
3
4
5
6
1
2

7. Activity of daily living

- Able to climb up a standard flight of stairs
0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2
- Able to climb down a standard flight of stairs
0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2
- Able to squat or bend on the knees
0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2
- Able to walk on uneven ground
0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

Without Difficulty: 0
With Small Difficulty: 0.5
Moderate: 1
Important Difficulty: 1.5
Unable: 2

Statistical package for social science (SPSS) version 16 was used for data analysis. ANOVA test was used to compare the means within group A and B separately for both indices at different period of follow up. T-test was used to compare the means of both indices between the two groups at the baseline and at twelve month period. Level of significance was regarded to be <0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

Total Number of patients was 104 in the study. 55 patients in group A, and the number of patients in group B were 49 patients. The base line characteristic features are shown in table 1.

Table -1: Baseline features of patients of both groups

Characters of patients	Group A	Group B
Mean of age	61 years	60 years
Female to male ratio	3.6:1	3.1:1
Duration of OA	27 months	24 months
Right side OA Grade 2	24	22
Grade 3	27	17
Left side OA Grade 2	23	25
Grade 3	27	19
Mean of Lequesne's score	14.4	13.8
Mean of WOMAC score	35.9	34.7

From the analysis of data, both groups showed a decline in Lequesne's and WOMAC knee OA scores, also there were significant decreases in Lequesne's and WOMAC knee OA scores in group A, compared to group B. In figure (2) and figure (3).

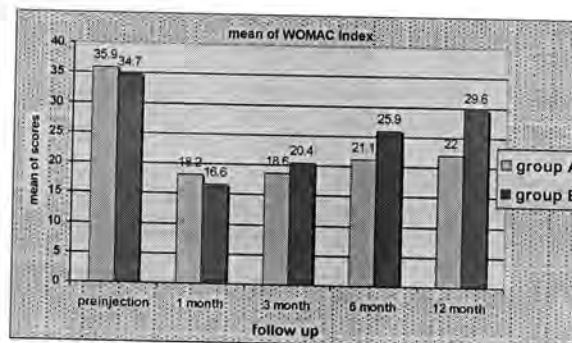


Figure -2: shows the means of knee OA scores over 12 Months of follow up period for Lequesne's score.

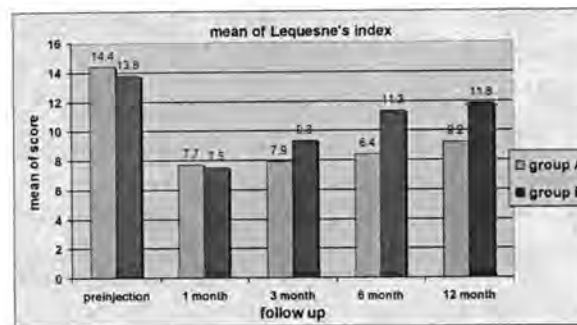


Figure -3: shows the means of knee OA scores over 12 Months of follow up period for WOMAC score.

The statistical analysis done for means in each groups separately .In group A there was a significant statistical difference among the means of both scores (Lequesne's and WOMAC) of the different period of follow up (P value < 0.0001).

Also in the group B there was significant statistical difference among the means of both scores (Lequesne's and WOMAC) of the different period of follow up (P value < 0.0001). The statistical analysis done for the means of scores of both (Lequesne's and WOMAC) between group A and group B at baseline and at 12 month of follow up, there was no significant statistical difference between the means of scores of (Lequesne's and WOMAC) at baseline (P value = 0.232 for Lequesne's index ,P value = 0.406 for WOMAC index)

But there was a significant statistical difference of the means of scores of both (Lequesne's and WOMAC) between group A and group B at the 12 months of follow up (P value = 0.001 for Lequesne's index, P value = 0.001 for WOMAC index).The adverse events that happened during follow up period is minimal and mostly related to local adverse event mostly pain at injection site and swelling of knee joint.

In the recent years the use of Viscosupplementation becomes widely used for knee OA. In a study in United Kingdom which was done by E. C. Huskisson and S. Donnelly (16), they examined the efficacy, safety and patient satisfaction with 5 weekly intra articular injection of HA (10mg/ml) to knee joint in 100 patients. They were found that intra articular HA was superior in first few months to placebo but at 6th month their Lequesne's scores is elevated as the patients were starting to complain of symptoms of OA. The mean of Lequesne's score at base

line was (13.4) and at 6 months was (11.2) in HA treated group. In our study the mean of Lequesne's score at base line in group A was (14.4), at month 6 was (8.4) and at month 12 was (9.2). In group B of our study which they were received HA injection alone; the mean of Lequesne's score at base line was (13.8), at month 6 was (11.3) and at month 12 was (11.8). The reported adverse events during their study in HA treated group were few and mostly related to local reaction at injection site, flare at knee and effusion. While in our study the adverse events were injection site pain more than 1 day (11%, 10%) and swelling of knee joint (14%, 13%) in group A and B respectively.

A study done in Taiwan (Shu-Fen Sun et al)⁽¹⁷⁾, they also used HA for treatment of osteoarthritis in a prospective study. The assessment of outcome in their study was by Lequesne's index alone as they found Lequesne's score changed from 10.3 at baseline to 5.7 at 6 months, while in our study we used both Lequesne's and WOMAC indices. Their result supported our study. The score of Lequesne's was lower than our result at baseline and at 6 months, this is probably because of our patients were grade 2 and 3 Kellgren and Lawrence knee osteoarthritis and follow up for 12 months. From the above 2 studies in comparison to our results in group B (injection alone) we concluded that Intraarticular injections of HA is effective up to 6 months. The complication of injection of HA was local and transient with no systemic adverse events.

Regarding the effect of glucosamine and chondroitin sulfate, there were variable effects of these drugs on knee osteoarthritis. In a study done by Sudha et al in India (18). They used Lequesne's index as changed from (11.5) at baseline to (8) at 12 weeks. In our study the group who used combined injection and oral combination of glucosamine and chondroitin sulfate, the mean of Lequesne's score were changed from (14.4) at baseline to (7.9) at 3 months. This explains that the Lequesne's scores were more dropped in our patient in comparison to that study in 3 months.

Other studies had used chondroitin sulfate or glucosamine alone. As a study was done by Bernard et al (19) on efficacy and tolerability of chondroitin sulfate in 307 patients and Gabriel et al (20) compared the use of oral glucosamine in dose of 1500 mg daily to placebo and acetaminophen. Both studies showed effectiveness of these drugs the

scores is less decreased compared to our results. In there study no severe adverse events were recorded.

The above studies on both glucosamine and chondroitin sulfate is explaining that both drugs were effective in treatment of osteoarthritis but in comparism to our result there was more response to treatment if these drugs combined with intra articular injection of HA and prolong their effect on knee joint for patients with knee OA grade 2 and 3, who do not get benefit from NSAIDs and non pharmacological therapies.

We concluded from this study that the combination of intra articular injection of Hyaluronic acid 5 weekly injections, plus oral glucosamine and chondroitin sulfate for 1 year was effective in reducing pain and increasing functional outcome of patient with knee OA with kellgren grade 2 and 3.

REFERENCES

1. Yuanyuan Wang, Louise F Prentice, Luis Vitetta, Anita E Wluka, Flavia M Cicuttini. The effect of nutritional supplements on osteoarthritis. *Alternative Medicine Review*; 9(3):275-96(2004).
2. David Borenstein, Shari Diamond. Arthritis In: Jeffry S Fischgrund. *Orthopedic Knowledge Update 9*. American academy of orthopedic surgeons: p. 227-9(2008).
3. Cyrus Cooper, Shelagh Snow, Timothy E MCAlindon, Samantha Kellingray, Brenda Stuart, David Coggon, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*; 43 (5):995-1000(2000).
4. Helga Lorenz, Wiltrud Richter. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*; 40:135-63(2006).
5. Osteoarthritis In: Louis Solomon, David J Warwick, Selvaduria Nayagam. *Apley's System of Orthopedic and Fracture*. 8th ed. Arnold; P 77-86,472-3(2001).
6. Disease of articular tissue. Nicholas A Athanasou In: *Pathological Basis of Orthopedic and Rheumatic disease*. 1st ed. Arnold. p 156-60(2001).

7. Megumi Hashimoto, Tomoyuki Nakasa, Tomohiro Hikata, Hiroshi Asahara. Molecular Network of Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *Medical Research Review*; 28 (3):464-81(2008).
8. Sureshwar pandey, Anil kumar pandey. Intra-articular hyaluronic acid In: Sureshwar pandey, Anil kumar pandey Intra-articular and allied injection. 2nd edition. Jaypee Brother; p 18-21(2005).
9. Kazuaki Kakehi, Mitsuhiro Kinoshita, Shin-ichi Yasueda. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography*; 797:347-55(2003).
10. Dennis Y Wen. Intra-articular Hyaluronic Acid Injections for Knee Osteoarthritis. *American Family Physician*; vol.62/No.3(2000).
11. E J P Jansen, P J Emans, C M Douw, N A Guldmond, L W Van Rhijn, S.K. Bulstra, et al. One intra articular injection of hyaluronan prevents cell death and improves cell metabolism in a model of injured articular cartilage in rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*; 26(5):624-30(2008).
12. Kenneth D Brandt, Gerald N Smith, and Lee S Simon. Intra articular injection of hyaluronan as treatment for knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*; 43(6):1192-203(2000).
13. Fajardo M, Di Cesare PE. Disease-modifying therapies for osteoarthritis: current status. *Drugs Aging*; 22:141-61(2005).
14. Tiraloche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, et al. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*; 52:1118-28(2005).
15. J H Kellgren, J S Lawrence. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*; 16:494-502(1957).
16. E C Huskisson and S Donnelly. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology*; 38; 602-07(1999).
17. Shu-Fen, Chien Wei Hsu, Chiao-Wen Hwang, Pei-Te Hsu, Jue-Long Wang, Shin-Lung Tsai, et al. Hyaluronate improves pain, physical function and balance in the geriatric osteoarthritis knee: a 6 month follow-up study using clinical tests. *Osteoarthritis and Cartilage*; 14:696-701(2006).
18. Sudha V, Prabhu M, U Shashikiran, Adiga Sachidananda, Sharath Rao, K Laxminarayana Bairy et al. Efficacy and tolerability of Glucosamine - Chondroitin sulfate - Methylsulfonylmethane (MSM)

- in osteoarthritis of knee in Indian patients. Iranian journal of Pharmacology and Therapeutics; 3(2):61-5(2004).
19. Bernard Mazieres, Michel Hucher, Mohammed Zaim, Patrick Garnero. Effect of chondroitin sulphate in symptomatic kneeosteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. Ann Rheum Dis; 66:639–45(2007).
 20. Gabriel Herrero, Jose Andres, Maria del ,Francisco Jvier , Pere Benito, Emilio Martin-Mola et al. Glucosamine sulfate in treatment of knee osteoarthritis symptoms. Arthritis and Rheumatism; 56 (2):555-67(2007).
 21. Bellamy N. WOMAC: a 20-year experiential review of a patient-centered self-reported health status questionnaire. Journal of Rheumatology; 29:2473-6(2002).

Spectrophotometric Determination of Phenoxazine in Water Using Micellar Mediums

Karim Dema Khalaf,

College of Science for Women, Department of Chemistry - University of Baghdad

Received 14/4/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

يظهر مركب الفينوكسين في محاليله المائية فلوره ضعيفه بسبب احتوائه على عدد قليل من الأواصر نوع (باي) بالإضافة الى طبيعته تركيبه الكيميائي . وقد وجد ان فلوره هذا المركب عند 405 نانومتر تزداد بشكل كبير باستخدام محلول من هكسا دي سايل ثلاثي مثيل بروميد الامونيوم تركيز 1% . وكان المدى الخطي للتركيز التي تطاوع قانون بير ضمن المدى 50 – 500 نانوغرام /ملتر وبحد كشف 4,9 نانوغرام /ملتر وقد طبقت الطريقه بنجاح في تقدير الفينوكسين في مياه الشرب والري.

ABSTRACT

Excitation of phenoxazine in aqueous solution exhibits a very low fluorescence intensity because this compound has not a large conjugated π -bonds system as well as, it is a planar compound.

Fluorescence of phenoxazine at 405 nm was found to be greatly enhanced in micellar medium of hexa decyl trimethyl ammonium bromide. Beer's law was found to be obeyed in the concentration range of 50-500 ng.ml⁻¹ and the detection limit (LD) was 4.9 ng.ml⁻¹. The method was successfully applied for the determination of low concentration of phenoxazine in spiked drinking and irrigation water without any pre-treatment.

Keywords: phenoxazine; micellar medium, spectrofluorimetric.

INTRODUCTION

Phenoxazine (Figure-1) was prepared In 1930 as an organic compound freely soluble in methanol, ethanol, ether, chloroform and benzene (1).

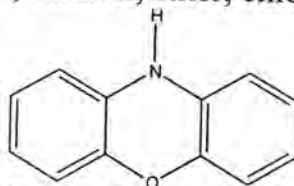


Figure -1: Structural formula of phenoxazine

This compound is a well known heterocyclic compound with electron abundant oxygen and nitrogen heteroatom and hence, the physical and chemical properties of phenoxazine make it suitable for manufacturing dyes (2).

Molecules and polymers containing phenoxazine have recently attracted much researcher's interest because of their unique electro-optical properties and their resulting potential in different applications such as chemiluminescence, light-emitting diode and organic field-effect transistors (3).

Also, phenoxazine derivatives play an important role as antiproliferative agent with potential application both as anti-tumour and antimicrobial

drugs (4-8). Phenoxazine has recently been used as a good reagent for developing new spectrophotometric methods for the determination of nitrite (9,10), residual chlorine in drinking and environmental water samples (11). Also, it was used for ozone monitoring in air (12)

All the published works dealing with phenoxazine derivatives showed no official method for the determination of phenoxazine. The present work deals with the fluorimetric method for the determination of phenoxazine as a planar compound and fewer nano grams have been detected in micellar medium which produced a moderate fluorescent product which can be excited by wavelength of 312 nm xenon lines producing a fluorescence band at 405 nm.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus:

A Hewlett Packard (8452 A) diode array spectrophotometer with a response time of 0.1 s equipped with a 1 cm quartz cell was used to carry out the absorbance measurements.

A Perkin-Elmer LS 50 Luminescence spectrophotometer equipped with a 1-cm quartz cell was used to carry out the fluorescence measurements using different values of the excitation and emission slit widths.

Reagents :

All the solutions were prepared from analytical grade chemicals. Phenoxazine (PNZ) of 97% was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). Absolute ethanol of 99.8% was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain), and hexa decyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) of 99% was supplied by Fluka. Ultra-pure water with a conductivity resistance of 18.2 M Ω .cm was obtained from a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA).

A stock standard solution of phenoxazine (PNZ) daily prepared by dissolving of 25mg of PNZ in 100 ml absolute ethanol to obtain 250 μ g.ml⁻¹ and working standard solutions were prepared from the stock standard solution by diluting with absolute ethanol.

A solution of 5% (w/v) of hexa decyl trinethyl ammonium bromide (CTAB) was prepared by dissolving 5 g of surfactant in 100 ml distilled water and left over night for complete dissolution .

General Procedure:

Accurate volumes of working standard solution (10 μ g.ml⁻¹) of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 ml were put into 6 volumetric flasks of 10 ml capacity. Then 2 ml of 5% (w/v) CTAB was added to each volumetric flask and the solutions were diluted to the mark with Ultra-pure water. Fluorescence measurements were carried out at a wavelength of 405 nm (λ_{ex} =312 nm) against a reagent blank prepared in the same way but without PNZ.

RESULTS AND DISCUSSION

Fluorescence of phenoxazine

Figure (2) shows the molecular absorption spectrum of $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ phenoxazine prepared in a solution of 50% (V/V) ethanol which shows three main absorption bands at 212 , 235 and at 312 nm , the later absorption band is the selective one .

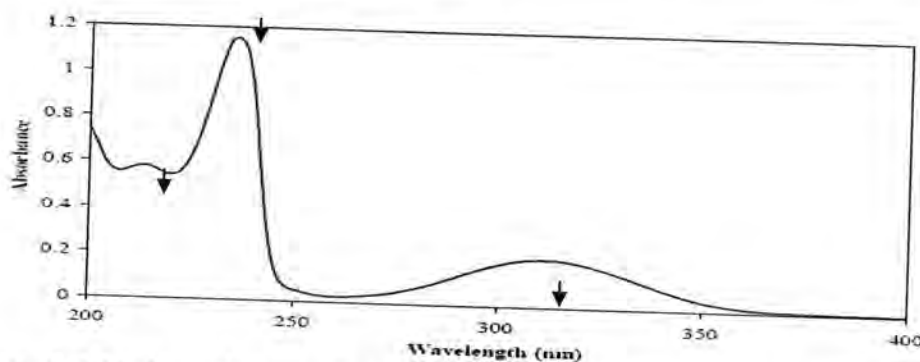


Figure -2: UV-absorption spectra of $5 \mu\text{gml}^{-1}$ phenoxazine solution in 50% (v/v) ethanol

Figure - 3 shows the native fluorescence spectra of $500 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ phenoxazine prepared in 50% (v/v) ethanol, using a wavelength of 312 nm as an exciting radiation . It can be seen that phenoxazine has a very low native fluorescence at 405 nm due to the solvent polarity and hydrogen-bonding characteristic which are very critical because they affect the nature of the excited state. Also, the presence of oxygen quenches the fluorescence of the compound and it was mentioned that there is often a rapid (10^{-11} to 10^{-12}) reorientation of solvent molecules around the excited species that occurs before photon emission (14). Other effect such as viscosity, polarity of the solvent and the planar shape of the phenoxazine itself may highly reduce the native fluorescence emission of this compound.

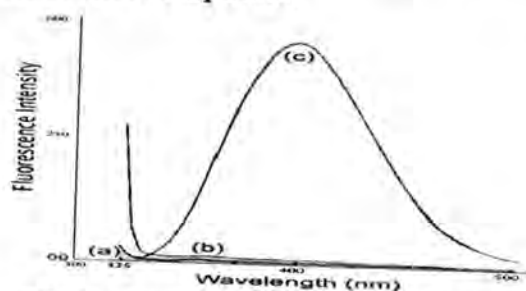


Figure -3: Fluorescence emission spectra of (a) 500 ng ml^{-1} phenoxazine in 50% (v/v) ethanol , (b) 1% CTAB and (c) 500 ng ml^{-1} phenoxazine in surfactant .

In analytical chemistry ,surfactants have been recognized as being very useful in analytical methodology such as in chromatography and

luminescence spectroscopy (15-17). Also, it was mentioned that local microenvironment in a micellar aggregate is dramatically different from that in the homogenous bulk solution which can lead to a significant increase in photoluminescence and chemiluminescence quantum yield (13). Therefore, the effect of different surfactants on the native fluorescence intensity of phenoxazine was studied using anionic, non-ionic and cationic surfactants such as sodium dodecyl benzene sulfonate, titron-x100, hexa decyl pyridinium chloride and CTAB. The obtained results showed that hexa decyl trimethyl ammonium bromide has dramatically enhanced the native fluorescence intensity of phenoxazine, and in order to estimate the optimum concentration of CTAB, fluorescence of 500 ng.ml⁻¹ phenoxazine solution was fixed while changing the final CTAB concentration (from 0.5 to 2%). The results showed that on using of 1% CTAB, a high enhanced fluorescence is achieved. Figure-3. Shows that the high sensitivity and selectivity which obtained is dependent on the fluorescence quantum yield of phenoxazine enhanced by the micellar system and not by the micellar itself because of the back ground fluorescence of the blank which is very low.

Analytical data:

The analytical features of the proposed fluorimetric method refer that the enhanced fluorescence intensity of phenoxazine under optimum experimental condition such as Beer's law limits, excitation slit width of 3.7 ,excitation wavelength of 312 nm and optimum micellar concentration of 1% CTAB are summarized in Table (1)

Table -1: Optical characteristics of the proposed method for PNZ

Parameters	Results
linearity (ng.ml ⁻¹)	50 - 500
Detection limit (ng.ml ⁻¹)	4.90
Regression equation*	$Y = 234.148 + 1.4386x$
Correlation coefficient (r^2)	0.9981
Standard deviation(SD)	1.756

* $y = a + bx$, a= intercept and b= slope

Application:

The proposed method was successfully recovery tested for the determination of phenoxazine in drinking and irrigation water samples under the optimum conditions previously mentioned. Table-2 , shows the recovery percentage and relative standard deviation.

Table -2: Application of the proposed method for the determination of phenoxazine in spiked water samples

Water sample	Conc. Of phenoxazine ng ml ⁻¹		Recovery % $\pm$ RSD
	Added	Found	
Tap water	100	104	104 $\pm$ 0.20
	200	208	104 $\pm$ 2.25
	300	300.92	100.3 $\pm$ 0.25
	400	402	100.50 $\pm$ 2.30
	500	478.90	95.60 $\pm$ 3.59
Irrigation water	100	104	104 $\pm$ 0.39
	200	186.40	94.34 $\pm$ 2.80
	300	285	95 $\pm$ 1.20
	400	391.58	97.89 $\pm$ 0.60
	500	488.80	97.80 $\pm$ 0.10

*a Average of five determinations $\pm$ relative standard deviation

On using a cationic micellar (CTAB) for spectrofluorimetric determination of phenoxazine, a high sensitivity of phenoxazine native fluorescence enhanced by 1% CTAB was achieved which enabling detection of low concentration of phenoxazine in water samples. The proposed method might used for detecting of phenoxazine in biological complex matrices for those who are under medical administration with phenoxazine derivatives.

REFERENCES

1. The Merck index, 4th.Ed., Merck & Co. inc. White house station N.J.USA: 7253 (2006).
2. V.A.Anfinogenov; F.Khlebnikov; V.D. Filimonov, and V.D.Ogorodnikov, Chemistry of hetrocyclic compounds, vol.24, number 12, : 1384- 1387 (1998).
3. H. Do-Hoon ; L.Tong-Don ; L.Moon-Tae and L.Changhee ,organic light-emitting diode using a new DCM derivative as an efficient orange-red doping molecule, Curr. Appl. Phys. 5: 244-248, (2005).
4. A.Bolognese ; G.Correate ; M.Manfra ; A.Lavecchina ; A.E.Novellino ; and S.Pepe, Antitumor agent-5-synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of dimethyl-5H-pyridophenoxazin-5-ones, tetrahydro-5H-benzopyridophenoxazin-5-ones with potent antiproliferative activity, J. Med., Chem.49: 5110-5118(2006).
5. J.w.Foley ; X.Song ; T.N.Demidova ; F.Jilal and M.R.Hamblio , synthesis and properties of benzo{a}phenoxazinium chalcogen analogs as novel broad- spectrum antimicrobaial phosesitizers, J.Med.Chem. 49: 5291-5299 (2006).

6. N.Miyano-Kurosaki, K.Ikegam, K.Kurosaki, T.Endo, H.Aoyagi, M.Manami, J.Yasumoto and A.Tomoda, Anticancer effect of phenoxazine derivatives revealed by inhibition of cell growth and viability disreulation of 5 cell cycle and apoptosis induction in HTLV-1-positive leukemia cells , J. Of pharmacological science, 110: 87-97(2009).
7. A.Alberti ; A.Bologense ; M.Guerra ; A.Lavecchia and D.Macciantelli , Antitumor agent 4. Characterization of free radicals produced during reduction of antitumor drug 5H-pyridophenoxazin-5-one,an EPR study, Bio.Chem. 42: 11924-11931(2003).
8. H.Vania ; J.Frade ; J.Maria Sousa ; C.V.P. Joao Moura and M.Sameiro T.Goncalves, synthesis, characterization and antimicrobial activity of new benzo{a}phenoxazine based fluorophores.Tetrahedron lett. , 48: 8347-8352,(2007).
9. R.A Al-okab and A.S.Akheel, novel oxidation coupling reaction of cisapride or metaclopramide with phenoxazines and their applications in the determination of nitrite of trace level in environmental samples, Spectrochimi Acta: 68:739-746(2007).
10. R.A.Al-okab and A.S.Akheel ,novel reaction for simple and sensitive spectrophotometric determination of nitrite , Talanta,72(4): 1239-1247(2007).
11. R.A.Al-okab and A.S.Akheel , novel oxidative electrophilic coupling reactionof phenoxazine derivatives with MBH andtheir applications to spectrophotometric determination of residual chlorine in drinking water and environmental water samples, J.Hazard, Mater,170: 292 (2009).
12. J.L.Lambert , Y.L.Laiw and J.V.Paukstelis, ; Phenoxazine as a solid monitoring reagent to ozone, Environ.Sci.Technol. 21, 503-505(1987).
13. M.Shamsipur and F.Jalali, acid-base titratrimetric determination of ketoconazole and micronazole in miccellar media, Chem. Anal.(Warsaw), 47: 1-7 (2002).
14. D.James ; J.R.Ingle and R.Stanley Crouch, Spectrochemical analysis, Prentice Hall, Upper Saddle River NJ: 347 (1988).
15. L.J.Cline , J.E.Habrata , J.E.Dorsey , the micell-analytical chemistry interface, Anal. Chem. 56 : 1132A1148A (1984).
16. W.L.Hinze ; H.N.Singh ; Y.Baba ; N.G.Harvey , micellar enhanced analytical fluorimetry, Trends Anal. Chem., 3: 193-199 (1984).
17. E.Pelizetti ; E.Pramauro , analytical applications of organized molecular assemblies, Anal. Chim. Acta, 169: 1-29 (1985).

Synthesis of Some New 1, 3, 4-Thiadiazole Containing Diamidic Moieties

Redha I. AL-Bayati¹, Mahmoud A, J- AL- Issa² and Sarah M.Salman³

¹Dept. of Chemistry, College of Science, AL-Mustansiriya Univ.

²Dept. of Chemistry, College of Science, for Women, Univ. of Baghdad.

Received 17/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

يتضمن هذا البحث تحضير المركب 2-امينو -5- مركبتو -4,3,1- ثياديازول (S₁) من الثايوسيميكاربازايد وثاني كبريتيد الكربون بوجود كربونات الصوديوم اللامائية وتم صهر هذه المادة (S₁) مع انهيدريد الفثاليك بدرجة حرارة (180-170 C°) ليعطي المشتق (S₂). تم معاملة المركب (S₂) مع الهيدرازين ليعطي المشتق (S₃). عند تفاعل المشتق (S₃) مع اسيثيل اسييتون والديهيدات أو كيتون مختلفة (بنزالديهيد، ايساتين، 4-نتروبنزالديهيد) يؤدي الى تكوين مشتق البايرازول (S₄) وقواعد شف (S₅-S₇) على التوالي. ايضاً تم مفاعلة هذا المشتق (S₃) مع انهيدريدات مختلفة (ماليك، سكسينيك، فثاليك، 3-نتروفثاليك وايتاكونيك) للحصول على مشتقات جديدة (S₈-S₁₂) على التوالي. اضافة الى اعلاه فان معاملة المركب (S₃) مع فنييل ثايو ازو سيانيت، نفثيل-1- ازوسيانيت، فنييل ازو سيانيت، 3-كلورو فنييل ازو سيانيت و 4,1- ثلوين ثنائي ازو سيانيت ليعطي المشتقات (S₁₃-S₁₇) على التوالي.

ABSTRACT

In this work, 2-amino -5- mercapto-1, 3, 4- thiadiazole (S₁) has been synthesized by the reaction of thiosemicarbazide with CS₂ in the presence of anhydrous Na₂CO₃ and then fused with phthalic anhydride at (170-180C°) to the give compound (S₂). Treatment of compound (S₂) with hydrazine hydrate gave the benzamide derivative (S₃). The reaction of derivative (S₃) with acetyl acetone and various aldehydes or ketone(benzaldehyde, isatine, 4-nitrobenzaldehyde) afforded the pyrazole derivative (S₄) and the corresponding Schiff bases (S₅-S₇). Moreover, the reaction of compound (S₃) with various anhydrides (maleic, succinic, phthalic, 3-nitrophthalic and itaconic) afforded the corresponding derivatives (S₈-S₁₂) respectively. In addition, treatment of compound (S₃) with phenylthioisocyanate, naphthyl 1-isocyanate, phenyl isocyanate, 3-chlorophenylisocyanate and 1, 4-toluenediisocyanate gave the corresponding derivatives (S₁₃-S₁₇) respectively. All the new synthesized compounds were confirmed by FT-IR,UV and NMR spectroscopy.

INTRODUCTION

Compounds containing 1,3,4- thiadiazole moiety are endowed with a large number of biological activates such as antifungal, antibacterial, anticancer, relaxing vascular and anticonvulsant activities(1-5). In addition these compound were used as herbicides , plant growth regulators , anti-inflammatory activities(6) Also 1,3,4- thiadiazole derivatives have various applications in dyes industry , metal complexes synthesis and in analytical field(7).

MATERIALS AND METHODS

Melting points were determined on Kamp melting point apparatus and are uncorrected. The IR spectra (KBr discs) were recorded with a pye- Unicam SP-300 Spectrometer. UV Spectra were recorded on Hitachi-2000 Spectrophotometer using absolute ethanol as solvent. ¹HNMR spectra using (DMSO) as solvent. Elemental analysis was done on a 1106 Carbo – Erba instrument.

Preparation of 2- amino -5- mercapto- 1, 3, 4- thiadiazole (S₁).

This compound was prepared according to the method in the literature. M.p. 234-236 C° (Lit .m.p. 232-234 C°) (Tables 1 and 2).

Preparation of 2-(5- mercapto -1, 3, 4- thiadiazol -2- yl) isoindolin-1, 3- Dione (S₂).

A mixture of compound (S₁) (0.01 mol) and phthalic anhydride (0.01 mol) was heated in oil bath at temperature 170-180 C° for 15 minutes , then cooled , the solid formed was recrystallized from ethanol (Table 1and 3).

Preparation of 2-(hydrazine carbonyl) –N- (5- mercapto -1, 3, 4- thiadiazol - 2 - yl) benzamide (S₃).

A mixture of compound (S₂) (0.005 mol) and hydrazine 99% (0.005 mol) in absolute ethanol was refluxed for 6h., then cooled. The excess solvent was evaporated then recrystallized from ethanol. (Tables 1 and 4).

Preparation of 2-(3,5- Dimethyl -1H- pyrazol-1- carbonyl –N- (5- mercapto 1,3,4- thiadiazol-2-yl) benzamide (S₄)⁸.

A mixture of compound (S₃) (0.001 mol),with acetylacetone (0.001 mol) in absolute ethanol (20 ml) in presence of 5 drops of acetic acid was refluxed for 7h. The mixture was concentrated under reduced pressure, then filtered off, the solid formed recrystallized from ethanol. (Table 1 and 5).

Preparation of Schiff bases (S₅-S₇).

A mixture of compound (S₃) (0.001 mol) and an appropriate aryl aldehydes or ketones (0.001 mol) in absolute ethanol (15 ml) with 5 drops of glacial acetic acid was refluxed for 6h. Then cooled and the solid formed was filtered off and recrystallized from ethanol (Table 1 and 6).

Preparation of compounds (S₈-S₁₂)⁹.

A mixture of compound (S₃) (0.001 mol) and an appropriate anhydride (0.001 mol) in glacial acetic acid was refluxed for 7h. Then cooled and filtered off, washed with distill water and recrystallized from ethanol (Table 1 and 7).

Preparation of compounds (S₁₃-S₁₆).

A mixture of compound (S₃) (0.003 mol) and appropriate(aryl thio isocyanate or arylisocyanate (0.003 mol) or 1,4-toluene-diisocyanate) (0.0018 mol) in absolute ethanol (15 ml) was refluxed for 5h. The solid formed recrystallized from ethanol (Table 1 and 8,9).

Table -1: some physical properties of compounds (S₁-S₁₇)

Compound No.	M.P. C°	Yield%	Color	Purification Solvent	Molecular formula
S ₁	234-236	85	Yellow	Ethanol	C ₂ N ₃ S ₂ H ₃
S ₂	240-242	90	Deep Yellow	Ethanol	C ₁₀ O ₂ N ₃ S ₂ H ₅
S ₃	230-232	55	White	Ethanol	C ₁₀ O ₂ N ₅ S ₂ H ₉
S ₄	196-198	51	Yellow	Ethanol	C ₁₅ O ₂ N ₅ S ₂ H ₁₃
S ₅	188-190	70	Orange	Ethanol	C ₁₇ O ₄ N ₆ S ₂ H ₁₂
S ₆	150-152	65	Red	Ethanol	C ₁₈ O ₃ N ₆ S ₂ H ₁₂
S ₇	172-174	53	Yellow	Ethanol	C ₁₇ O ₂ N ₅ S ₂ H ₁₃
S ₈	244-246	65	White	Ethanol	C ₁₄ O ₄ N ₅ S ₂ H ₉
S ₉	216-218	65	White	Ethanol	C ₁₄ O ₄ N ₅ S ₂ H ₁₁
S ₁₀	206-208	60	White	Ethanol	C ₁₈ O ₄ N ₅ S ₂ H ₁₁
S ₁₁	218-220	65	White	Ethanol	C ₁₈ O ₅ N ₆ S ₂ H ₁₀
S ₁₂	224-226	65	Rosy	Ethanol	C ₁₅ O ₄ N ₄ S ₂ H ₁₁
S ₁₃	180-182	85	White	Ethanol	C ₁₇ O ₂ N ₆ S ₃ H ₁₄
S ₁₄	222-224	92	White	Ethanol	C ₂₁ O ₃ N ₆ S ₂ H ₁₆
S ₁₅	214-216	73	White	Ethanol	C ₁₇ O ₃ N ₆ S ₂ H ₁₄
S ₁₆	236-238	67	White	Ethanol	C ₁₇ O ₃ N ₆ S ₂ H ₁₃ Cl
S ₁₇	300-302	76	White	Ethanol	C ₂₉ O ₆ N ₁₂ S ₄ H ₂₄

RESULTS AND DISCUSSION

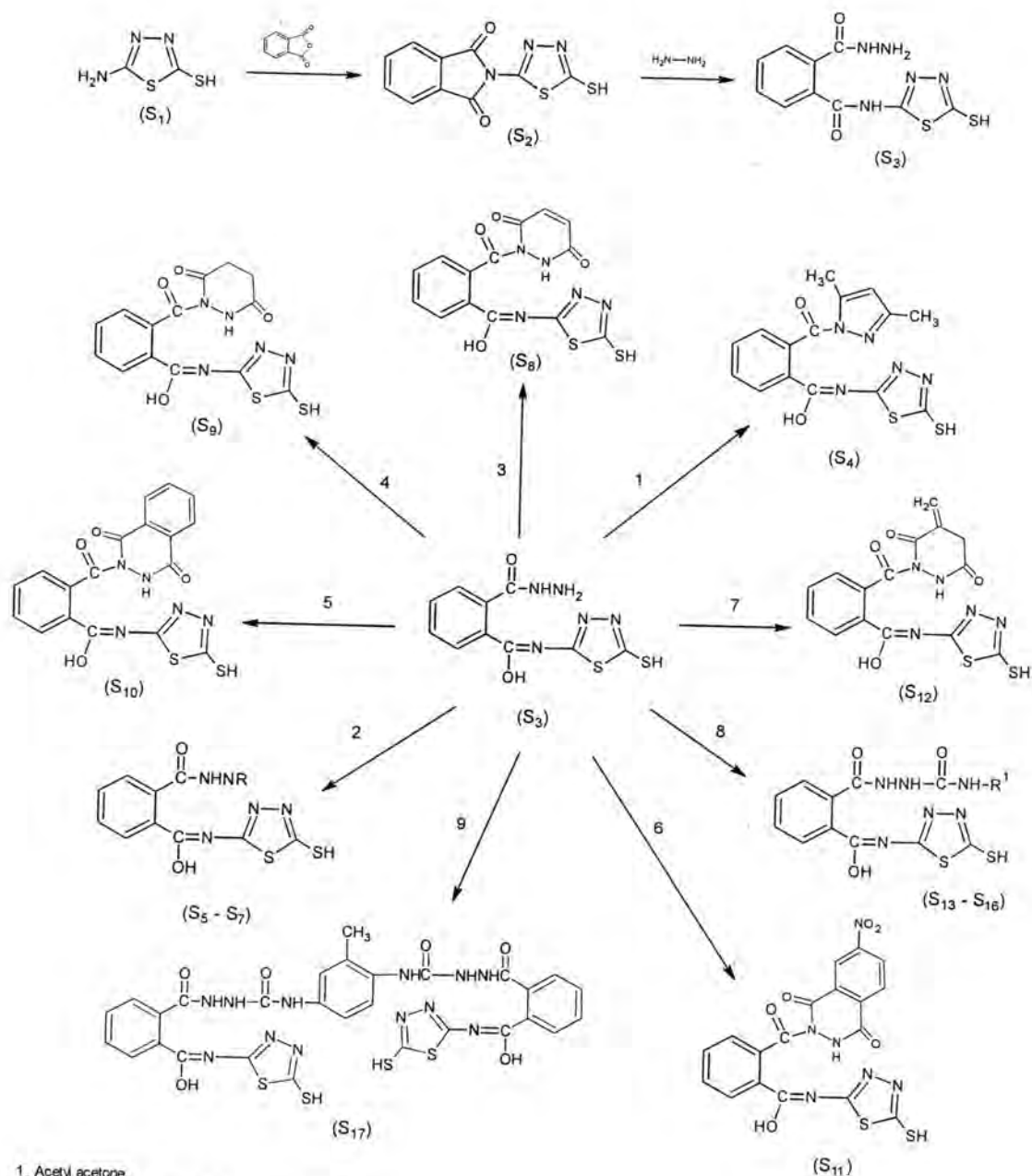
The preparation of titled compound was carried out according to the Schemes (1,2). The 2-amino -5- mercapto- 1,3,4- thiadiazole (S₁) has been prepared by the reaction of thiosemicarbazide with CS₂ in the presence of anhydrous Na₂CO₃ and then converted into the derivative (S₂) by fusion of compound (S₁) with phthalic anhydride at (170-180 C°). Reaction between compound (S₂) and hydrazine hydrate afforded the acid hydrazide (S₃) in good yield. The reaction of acid hydrazide (S₃) with acetyl acetone in the presence of glacial acetic acid as catalyst afforded pyrazole derivative (S₄). IR spectrum of it showed the disappearance of NH₂ stretching bands and appearance of vibration band (1620 cm⁻¹) for (C=N). The IR spectrum showed NH₂ and (N-H)

stretching absorptions near ($3251-3332\text{ cm}^{-1}$) (3136 cm^{-1}) and the two amide (C=O) stretching bands at ($1651-1660\text{ cm}^{-1}$). In addition, $^1\text{HNMR}$ of compound (S_3) showed two singlet near ($7.0-7.5\text{ ppm}$) due to NH proton, and multiple at ($9.9-10.2\text{ ppm}$) for NHNH_2 protons. A multiple signals at ($7.8-8.4\text{ ppm}$) are belonged to aromatic protons. Condensation of the acid hydrazide with aryl benzaldehydes and isatine in absolute ethanol gave the Schiff bases (S_5-S_7).

The formation of these Schiff bases were indicated by the presence of the azomethine (CH=N) stretching bands ($1597-1612\text{ cm}^{-1}$), combined with the disappearance of the NH_2 stretching band. In addition, $^1\text{HNMR}$ of compound (S_7) showed two singlet at (8.9 ppm), (3.6 ppm) due to (NH) proton, and at ($7.8-8.6\text{ ppm}$) return to aromatic protons, and at (6.6 ppm) return to (N=CH) imin proton. Further, derivatives (S_8-S_{12}) were obtained in good yields. When the acid hydrazide (S_3) was allowed to react with various anhydrides (malice, succinic, phthalic, 3-nitrophthalic and itaconic) respectively. The structure were confirmed by the presence of amidic (C=O) at ($1660-1732\text{ cm}^{-1}$) and at ($3309-3464\text{ cm}^{-1}$) due to (O-H) stretching vibration confirming the equilibrium between enol-form and ketoform for above compounds.

Condensation of acid hydrazide (S_3) with phenylthio isocyanate and various aryl isocyanates afforded the corresponding thiosemicarbazide and semicarbazides ($\text{S}_{13}-\text{S}_{17}$). The IR spectra of these compounds displayed a (C=O) stretching at ($1658-1750\text{ cm}^{-1}$) and (C=S) stretching at (1210 cm^{-1}). In addition, $^1\text{HNMR}$ of compound (S_{16}) showed signal at ($6.95-8.35\text{ ppm}$) return to aromatic and (N-H) protons, and at (9.00 ppm) return to (N-H or O-H) proton, and at (2.5 ppm) return to (S-H) proton.

Finally, the CHN analyses of the synthesized compounds, gave results which were agreement with proposed structures.



1_ Acetyl acetone

2_ R = benzaldehyde, isalinal, 4 - nitro benzaldehyde

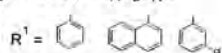
3_ maleic anhydride

4_ succinic anhydride

5_ phthalic anhydride

6_ 3 - nitro phthalic anhydride

7_ itaconic anhydride

8_ R¹ S.O = X X=C=N-

9_ Toluene 2,5 - diisocyanate

Table -2: some spectral data for compound (S₁)

Com. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
	Max λ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	ν (O-H) cm ⁻¹	N-H) (ν cm ⁻¹	(C=N) ν cm ⁻¹	(C-S) ν cm ⁻¹	(S-H) ν cm ⁻¹	(NH ₂) ν cm ⁻¹
S ₁	308.0	1.5	-	3170	1597	748	2611	3271 3390
	273.0	0.5						
	239.0	1.8						

 Table -3: Some spectral data for compound (S₂)

Com. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
	Max λ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	O-H) (ν cm ⁻¹	N-H) (ν cm ⁻¹	(C=N) ν cm ⁻¹	(C-S) ν cm ⁻¹	ν (S-H) cm ⁻¹	ν (C=O) cm ⁻¹
S ₂	323.0	2.4	-	3197	1600	746	2615	1786 1732
	250.0	0.9						
	216.0	1.4						

 Table -4: some spectral data for compound (S₃)

Comp. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
	Max λ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	NH ₂) (ν cm ⁻¹	ν (N-H) cm ⁻¹	(C=N) ν cm ⁻¹	(C=O) ν cm ⁻¹	(C-H) ν cm ⁻¹ Aromt	ν (C-N) cm ⁻¹
S ₃	300.0	0.7	3251 3332	3136	1612	1651 1660	3030	1219
	262.0	0.5						
	214.0	1.3						

 Table -5: some spectral data for compound (S₄)

Com. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)						
	Max λ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	N-H) (ν cm ⁻¹	C-H) (ν Aromt cm ⁻¹	(C-H) ν Alph cm ⁻¹	(C-S) ν cm ⁻¹	(S-H) ν cm ⁻¹	(C=O) ν cm ⁻¹	ν (C=N) cm ⁻¹
S ₄	279.0	0.9	3120	3014	2890 2975	740	2600	1660	1600
	206.0	1.5						1662	1610

Table -6: some spectral data for compounds (S₅-S₇)

Comp. No.	Ar	R	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
			Max λ (nm)	ϵ_{max} (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	N-H) (v cm ⁻¹)	(C=O) v cm ⁻¹	(C=N) v cm ⁻¹	(C-H) v Alph cm ⁻¹	(C-H) v Aromt cm ⁻¹	v (NO ₂) cm ⁻¹
S ₅		H	318.0 308.0	1.6 2.0	3100	1690 1660	1597	2924 2850	3086	1519
S ₆		C ₆ H ₅	319.0 210.0 206.0	0.9 0.9 1.0	3282 3221	1724 1701	1612	-	3055	-
S ₇		H	280.0 225.0 202.0	0.6 1.9 2.00	3180	1685 1662	1600	2924	3070 3012	-

Table -7: some spectral data for compounds (S₈-S₁₂)

Comp. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)						
	Max λ (nm)	ϵ_{max} (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	N-H) (v cm ⁻¹)	(C=O)v cm ⁻¹	(C=N) v cm ⁻¹	(C=C) v cm ⁻¹	(C-H) v cm ⁻¹ Aromt	v (other) cm ⁻¹	
S ₈	290.0 242.0	1.2 1.7	3163 3263	1660	1600	1460 1496 1558	3012	(O-H) 3371 (S-H)2673	
S ₉	306.0 220.0	1.1 1.9	3275 3390	1732	1597	1489 1553 1577	3089	(O-H) 3541 (S-H)2650	
S ₁₀	294.0 225.0	1.5 2.0	3124 3170	1662	1610	1480 1520 1550	3016	(O-H) 3309 (S-H)2670	
S ₁₁	307.0 224.0	1.0 2.5	3170 3250	1665	1605	1468 1540 1564	3020	(O-H) 3464 (S-H)2650 (NO ₂) 1525	
S ₁₂	310.0 216.0	1.2 2.7	3175 3300	1660	1602	1477 1543 1590	3020	(O-H) 3398 (S-H)2662	

Table -8: some spectral data for compounds (S₁₃-S₁₆)

Comp. No.	Ar	X	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
			Max λ (nm)	ϵ_{max} (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	N-H) (v cm ⁻¹)	(C=O) v cm ⁻¹	(C=N) v cm ⁻¹	(C=S) v cm ⁻¹	(C-H) v cm ⁻¹ Aromt	v (C=C) cm ⁻¹
S ₁₃		S	319.0 267.0	0.9 1.3	3190 3213	1658	1597	1210	3035	1450 1460 1543
S ₁₄		O	301.0 243.0 210.0	1.2 1.6 1.3	3170 3217 3226	1660 1690	1604	1226	3012	1446 1496 1550
S ₁₅		O	321.0 217.0 203.0	1.1 1.7 1.9	3221 3294	1670 1690	1597	1220	3089	1446 1489 1543
S ₁₆		O	311.0 235.0 213.0	1.8 2.2 2.5	3228 3290	1670 1680	1593	1215	3081	1427 1481 1535

Table -9: some spectral data for compounds (S₁₇)

Comp. No.	U.V. (EtOH)		Characteristic bands of I.R. spectra (cm ⁻¹ .KBr disk)					
	Max λ (nm)	ϵ_{max} (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	N-H) (v cm ⁻¹)	(C=O) v cm ⁻¹	(C=N) v cm ⁻¹	(C-H) v Alph cm ⁻¹	(C-H) v Aromt cm ⁻¹	v (S-H) cm ⁻¹
S ₁₇	279.0	0.9	3150	1650		2924		
	226.0	2.4	3250	1750	1612	2960	3039	2610

REFERENCE

1. G.Q. Hu, W.L.Huang, H.Wang . "Phase Transfer Catalyzed Synthesis and Antibacterial Activity of Water-soluble S-Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles Containing Piperazine Group". Chinese Chemical Letters 16(10), 1309 (2005).
2. C.B.Chapleo, P.L.Myers, A.C.B.Smith, I.F.Tulloch, D.S.Walter. Substituted 1,3,4-thiadiazoles with anticonvulsant activity. III. Guanidines. J. Med. Chem., 30, 951-954(1987)
3. A.Foroumadi, V.Sheibani, A.Sakhteman, M.Rameshk, M.Abbasi, R.Farazifard, S.A.Tabatabai, and A.Shafiee."Synthesis and anticonvulsant activity of novel 2-amino-5-[4-chloro-2-(2-chlorophenoxy)phenyl]-1,3,4-thiadiazole derivatives". Daru, 15(2), 89 (2007).
4. M.M.Burbulienc, V.Sakociute and P.Vainilavicius. "Synthesis and characterization of new pyrimidine based 1,3,4-oxa(thia)diazoles,1,2,4-triazoles and 4-thiazolidinones". Arkivoc, xii, 281 (2009).
5. N.S.Cho, S.Hong, Y.S.Park and H.Suh., "Synthesis and Structural Aspects of Macrocycles Composed of Two 5-Mercapto-2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazol-2-ones and Two Xylenes". Bull Korean Chem. Soc, 22(11) 1280 (2001).
6. N.Siddiqui, M.S.Alam and Ahsan."Synthesis, anticonvulsant and toxicity evaluation of 2-(1H-indol-3-yl)acetyl-N-(substituted phenyl)hydrazine carbothioamides and their related heterocyclic derivatives". Acta. Pharm. 58,445 (2008).
7. S.Ghosh, S.Malile, B.Jain and N.Ganesh,"Synthesis, Characterization and Biological studies of Zn(II) Complex of Schiff Base Derived from 5-Acetazolamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulphonamide, A Diuretic Drug". Asian J.Exp. Sci, 23(1), 189 (2009).
8. I.M.Abdon, A.M.Salah and H.F.Zohdi,"Synthesis and antitumor Activity of S-Trifluoromethyl-2,4-dihydropyrazol-3-one Nucleosides" J. Molecules,9,109 (2004).
9. G.E.Wieg, V.J.Bauer,S.R.Safir, D.A.Blickens and S.J.Riggi, "Quaternary Oxazolyl pyridinium salts. Oral hypoglycemic agents". J. Med. Chem., 12,943(1969).

Synthesis and Characterization of Some New Diazahomoadamantan Derivatives

Abdel-Amir M. Fenjan¹ and Shukkur A. H.²

¹Chemistry Dept., College of Science for Women, Baghdad University,

²Chem.Dept., College of Education for Pure Sciences, University of Al – Anbar

Email ; fenjanamir@yahoo.com

Received 4/4/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

لقد تم تحضير بعض مشتقات أريل - 3 ، 6 - ثنائي أزا هومو آدمانتان الجديدة ، الحاملة لمجموعة معوضة في الهيكل الاروماتي أو الاليفاتي . إن تكثيف المركب ميتا نيترو بنزايل مثيل كيتون ورباعي مثيلين ثنائي أثيلين رباعي أمين (الاسم التجاري - تيوتروبين) مع حامض الخليك أدى الى تحضير المركب الأولي 1-ميتا نيترو فنيل - 3 ، 6 - ثنائي أزا هومو آدا منتان - 9 - أون (1) ويمتوج جيد اعتماداً على تفاعل ماننيخ . إن تفاعل المركب الأولي (1) مع مختلف الكواشف الكيميائية مثل بورون رباعي هيدريد الصوديوم وحامض الخليك اللامائي ، ونظام الاختزال المعدني المؤلف من (المنيوم - كلوريد النيكل المائي) ، وهيدروكسيل أمين هيدروكلوريد ، تحت ظروف مناسبة ، أعطى المركبات المقابلة الجديدة . لقد تم تشخيص هذه المركبات الجديدة بوساطة التقنيات الفيزيائية مثل التحليل الكمي الدقيق للعناصر ، وطيف الأشعة تحت الحمراء ، وطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ، إضافة الى تعيين درجة الانصهار .

ABSTRACT

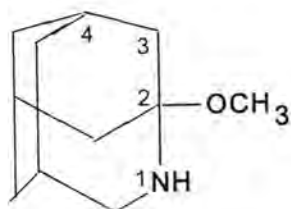
Some new aryl-3,6-diazahomoadamantan derivatives , (where the substituents are on the aromatic or on the aliphatic skeleton) are prepared . Condensation of m-nitrobenzylmethylketone , tetramethylenediethylenetetramine (teotropine) and acetic acid gave the starting material of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one **1** in a good yield according to the Mannich's reaction . Reaction of compound **1** or its derivatives with various chemical agents like { NaBH_4 , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, $\text{Al-NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ } under appropriate conditions gave the new corresponding derivatives . These new compounds were characterized by various physical techniques like : microanalysis , FTIR spectra , ¹HNMR spectra and melting point .

INTRODUCTION

The synthesis and application of monoaza , diaza and triazamacrocyclic

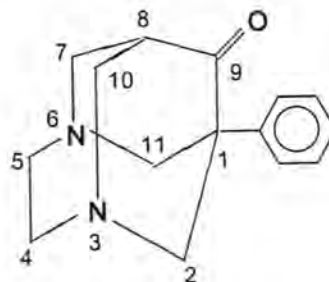
compounds such as 2-methoxyazaadamantan (A-structure) , 1-phenyl-3,6-diazahomoadamantan-9-one (B-structure) and Tris(ethylene) triamine (C-structure) have an enormous interest and diversity in recent years [1 – 5] . Metal complexes of these compounds have found application as oxidation catalysts and as hydrolase enzyme mimics capable of the non-oxidative cleavage of RNA and DNA [6] . According to the Mannich's reaction , condensation of benzyl methylketone with tetramethylenediethylenetetramine in acetic acid gave 1-phenyl-3,6-diazahomoadamantan-9-one (B structure) in a selective yield [7 – 8] . The nitration process for aryl-3,6-diazahomoadamantan with acidic mixture of (H_2SO_4 / HNO_3 , in

a molar ratio of (1 : 1) guide to obtain nitro group in the para-position of aromatic skeleton [9] . When (B structure) have been treated with NaBH_4 as a reducing agent , carbonyl group can be converted into hydroxyl group in a good yield [9] . In the recent years , reagent based on aluminium find wide application in organic synthesis because of their ready availability , easy handling and low cost [11] . The system metallic of aluminium – nickel chloride hexahydrate in THF chemoselectively reduces the double bond of a , β – unsaturated ketones without effecting other reducible functional group like carbonyl and ester groups [11] .



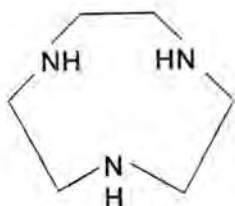
A structure

2-methoxyazaadamantan
diazahomoadamantan-9-one



B structure

1-phenyl-3,6-



C structure

Tris(ethylene)triamine

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and instruments

Reagents and solvents were of standard grade and used without further purification . Crude tetramethylenediethylenetetramine (teotropine) was purified by recrystallization from isopropanol . Melting points were determined using a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected . FTIR spectra were recorded on a Perkin – Elmer 1720X FTIR spectrometer , KBr disc . Microanalysis were obtained using a Carlo Erba 1106 elemental analyzer . ^1H NMR spectra were obtained using a Bruker WM – 250 spectrometer in $\text{DMSO} - d_6$ using TMS as an internal standard . The analyses were achieved in (Institute of Organic Chemistry , Lenine Street , Moscow – Russia) .

Typical procedure

Synthesis of 1-(m-Nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one 1

It was prepared according to the published procedure [9] as follows :

A mixture of m-nitrobenzylmethylketone (40 mmole , 7.16 gm) , tetramethylenediethylenetetramine (teotropine) (40 mmole , 6.72 gm) and acetic acid (120 mmole , 6.8 ml , 7.2 gm) in 40 ml of isopropanol were stirred for 1.5 hr at room temperature . The mixture was filtered off and added 20 ml of cold isopropanol . The volume's solution was reduced to 25 ml . The residue was kept for 12 hrs at (- 10 °C) , then filtered off . The crude product was recrystallized from toluene to obtain yellowish brown material (24 mmole , 6.9 gm , 60%) . $C_{15}H_{17}N_3O_3$ (M.wt = 287) , microanalysis (Found ; C , 62.5 ; H , 5.7 ; N , 14.3 , Calc. ; C , 62.7 ; H , 5.9 ; N , 14.6) , m.p = 128 – 130 °C . FTIR spectra , wave number (cm^{-1}) , KBr disc , stretching vibration of functional groups were : NO_2 (1345 , 1516) ; CO (1710) . 1H NMR spectra (Chem. Shift , ppm) in DMSO – d_6 solvent : N-CH₂-CH₂-N (s , 3.05 , 4H) , N-CH₂-C (d , 3.19 – 3.48 , 8H , J_{AB} = 13.5 Hz) ; CH (s , 2.59 , 1H) ; C_6H_4 (m , 7.5-8.1 , 4H) .

Synthesis of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-ol 2

It was prepared according to the published procedure [10] as follows : A solution of sodium borohydride (15 mmole , 0.6 gm) in 15 ml ethanol was added dropwise to a solution of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one 1 (10 mmole , 5.2 gm) in 35 ml ethanol during 0.5 hr at room temperature . The mixture was stirred for 4.5 hrs at room temperature , also . 15 ml of distilled water was added , then extracted with toluene (2 x 20 ml) . The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and filtered off . The solvent was evaporated under a reduced pressure . The crude product was recrystallized from hexane to obtain a pale yellow material (12.8 mmole , 3.71 gm , 71%) . $C_{15}H_{19}N_3O_3$ (M.wt = 289) , microanalysis (Found ; C , 62.6 ; H , 6.4 ; N , 14.2 , Calc. ; C , 62.2 ; H , 6.5 ; N , 14.5) , m.p = 107 – 109 °C . FTIR spectra , wave number (cm^{-1}) , KBr disc , stretching vibration of functional groups were : NO_2 (1425 , 1560) ; OH (3460) . 1H NMR spectra (Chem. Shift , ppm) in DMSO – d_6 solvent : N-CH₂-CH₂-N (s , 3.07 , 4H) , N-CH₂-C (d , 3.15 – 3.48 , 8H , J_{AB} = 13.5 Hz) ; CH (s , 2.00 , 1H) ; C_6H_4 (m , 7.6-8.2 , 4H) ; OH (s , 4.49 , 1H) ; CH-OH (s , 2.6 , 1H) .

Synthesis of 9-Oxoacetyl-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 3

A mixture of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-ol 2 (2.45 mmole , 0.7 gm) and 7.5 ml of acetic anhydride in 4 ml hexane were stirred and refluxed for 1.5 hr. The solvent was evaporated under a reduced pressure . A solution of 5% NaOH was added to neutralize the solution . The product was extracted with toluene (2 x 10 ml) . The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and filtered off. The solvent was evaporated under a reduced pressure . The product was purified by recrystallization from ethanol to obtain a yellowish - paige material (1.97 mmole , 0.65 gm , 82% yield) . $C_{17}H_{20}N_3O_4$ (M.wt = 330) , microanalysis (Found ; C , 61.4 ; H , 5.8 ; N, 19.2 , Calc. ; C , 61.8 ; H , 6.1 ; N, 19.4) , m.p = 196 – 198 $^{\circ}C$.

Synthesis of 9-Oxoacetyl-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 4

To a mixed solid mixture of aluminium powder (10 mmole , 0.58 gm) , nickel chloride hexahydrate (15 mmole , 3.56 gm) is added a solution of 9-oxoacetyl-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 3 (0.9 mmole , 0.3 gm) in freshly distilled 25 ml of THF at room temperature . A vigorous exothermic reaction takes place immediately which subsides for 15 minutes . The reaction mixture showed disappearance of the starting material , then diluted with 25 ml of THF and filtered off . Evaporation of the filtrate gave the crude product . Recrystallization from chloform – ethanol (1 : 1) gave a white material (0.67 mmole , 0.2 gm , 74% yield) . $C_{17}H_{22}N_3O_2$ (M.wt = 300) , microanalysis (Found ; C , 68.3 ; H , 7.1 ; N, 13.7 , Calc. ; C , 68 ; H , 7.3 ; N, 14) , m.p = 144 – 146 $^{\circ}C$.

Synthesis of 9-Oxoacetyl-1-(m-acetamidophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 5

The dry 9-oxoacetyl-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 4 (2.5 mmole , 0.75 gm) in a beaker , 8 ml of acetic acid anhydride was added to cover the solid completely .

The beaker was covered and set aside at room temperature . The mixture became warm spontaneously during 5 minutes and allowed to proceed for 5 hrs . 10 ml of methylene chloride was added . The solid product was collected by filtration , washed with 3 ml of methylene chloride and dried at room temperature . Recrystallization from ethanol gave a white material (1.75 mmole , 0.6 gm , 71% yield) . $C_{19}H_{25}N_3O_3$ (M.wt = 343) , microanalysis (Found ; C , 66.9 ; H , 7.7 ; N, 12.8 , Calc. ; C , 66.4 ; H , 7.3 ; N, 12.2) , m.p = 204 – 206 $^{\circ}C$.

Synthesis of 9-Oximo-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 6

A solution of hydroxylaminehydrochloride (10 mmole , 0.7 gm) in 5 ml of distilled water was added to a solution of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one 1 (5 mmole , 1.43 gm) in 5 ml of distilled water at room temperature . The mixture stirred and heated at 60 – 70 °C for 1 hr. A solution of Na₂CO₃ (10 mmole , 1.1 gm) in 5 ml of distilled water was added . The mixture was heated for 30 minutes at 60 – 70 °C again , then filtered off . The crude product was recrystallized from toluene to give a yellowish - white material (3.24 mmole , 0.98 gm , 65% yield) . C₁₅H₁₈N₄O₃ (M.wt = 302) , microanalysis (Found ; C , 60.3 ; H , 8.5 ; N , 22.3 , Calc. ; C , 59.6 ; H , 8.1 ; N , 21.8) , m.p = 218 – 220 °C .

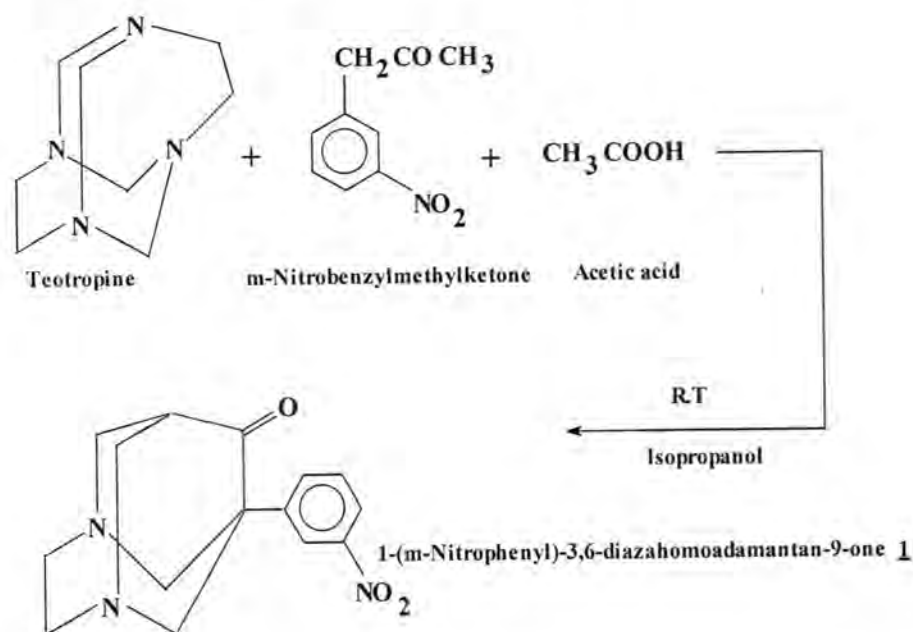
Synthesis of 9-Amino-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 7

Analogous to the procedure of 9-oxoacetyl-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 4 . Aluminium powder (15 mmole , 0.88 gm) , NiCl₂.6H₂O (22.5 mmole , 5.34 gm) and 9-oximo-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 6 (0.9 mmole , 0.27 gm) . Recrystallization from hexane gave a white material (0.66 mmole , 0.17 gm , 76 % yield) . C₁₅H₂₁N₄ (M.wt = 257) , microanalysis (Found ; C , 69.7; H , 8.5 ; N , 22.3 , Calc. ; C , 70 ; H , 8.1 ; N , 21.8) , m.p = 173 – 175 °C .

RESULTS AND DISCUSSION

A survey of diazahomoadamantan chemistry in recent years showed their importance in organic chemistry due to among other reasons their microbial effects , their roles as accelerators in rubber's industry and their thermal stability [4 , 9 – 10] . The present investigation describes the synthesis of some new aryl diazahomoadamantan derivatives (scheme 2 and scheme 3) , which were containing a substituted groups in the meta – position of the aromatic skeleton and a functional group in a position of carbon no. (C₉) of the aliphatic skeleton . The synthetic strategy is based on the Mannich's reaction in the present work . Kuznetsov and Co – Workers have prepared para – isomer of 1-(p-nitrophenyl)-3,6 – diazahomoadamantan-9-one derivatives in good yields and explained the synthesis , mechanism , characterization and stereochemistry [4 , 7 – 8] . In previous work , we prepared meta – isomer of 1-(m-nitrophenyl)-3,6 – diazahomoadamantan-9-one 1 and 1-(m-nitrophenyl)-3,6 – diazahomoadamantan-9-ol 2 in selective yields [9 – 10] . The condensation of m-nitrobenzylmethylketone , tetramethylenediethylenetetramine (trade's nomenclature – teotropine) and acetic acid in isopropanol are capable of producing the major

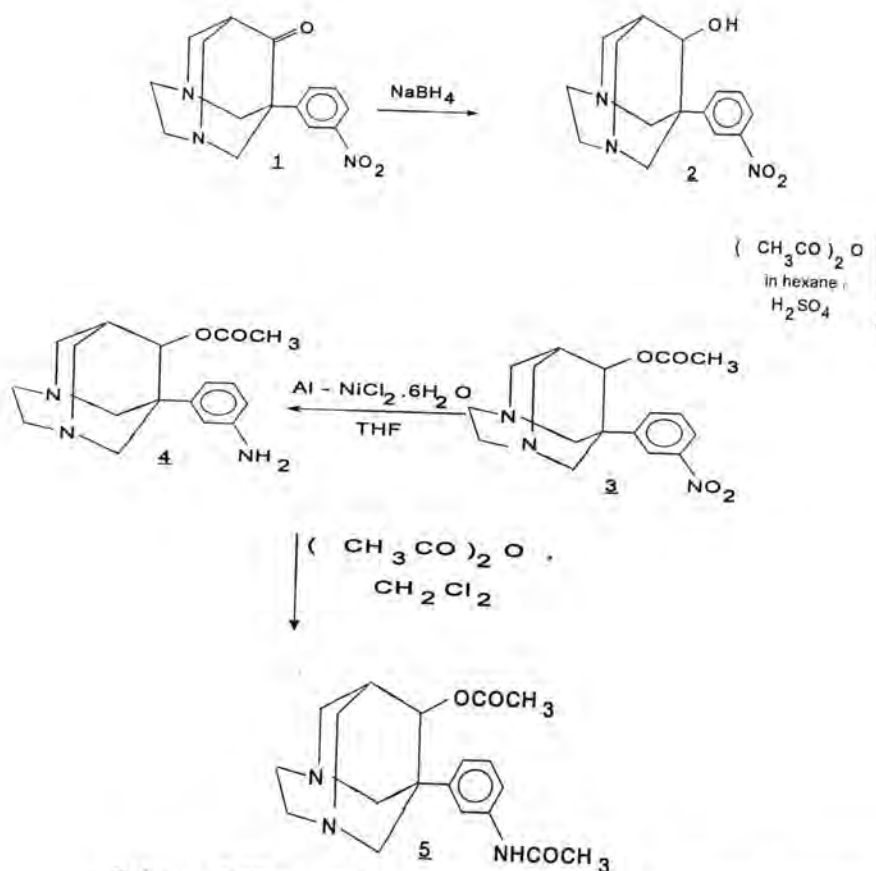
product 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one **1** (65% yield , in a molar ratio of 1:1:3) . It is known that the reduction of compound **1** with NaBH_4 converts carbonyl group into hydroxyl group to get 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-ol **2** (81% yield , in a molar ratio of 1:1) . Based on the encouraging results , we carried out the acetylation of hydroxyl group when compound **2** reacted with excess of acetic anhydride to obtain 9-oxoacetyl-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan **3** (82% yield) . We wish to report that the metallic system of ($\text{Al-NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / substrate in THF , in a molar ratio of 10:15:0.9) is very efficiently



Scheme-1: The reaction of synthesis the starting material of 1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one **1** [9]

reduces nitro group of compound **3** into amino group to give 9-oxoacetyl-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan **4** (74% yield) in a neutral condition, a short time reaction and a simple procedure . Anhydrous NiCl_2 does not react with aluminium powder even after long exposure . Addition of few drops of H_2O to this system initiates a vigorous exothermic reaction with evolution of H_2 and formation of a black precipitate which probably is NiO . The hydrogen might be produced by aluminium with HCl generated from hydrolysis of $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Thus , the reduction of nitro group is probably due to electron transfer from NiO to the substrate . In compound **4** , amino group can be acetylated when sufficient acetic acid anhydride was covered the solid material completely in CH_2Cl_2 solvent to obtain 9-oxoacetyl-1-(m-acetamidophenyl)-3,6-diazahomoadamantan **5** (71%

yield). The 9-oximo-1-(m-nitrophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 6 can be obtained from the reaction between compound 1 and $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ with Na_2CO_3 (65% yield , in a molar ratio of 1:2.5:2.5). The metallic system of ($\text{Al-NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ / substrate in THF and a molar ratio of 15:22.5:0.9) reduces oximo group and nitro group (compound 6) together into two various positions in aliphatic and aromatic skeletons to obtain 9-amino-1-(m-aminophenyl)-3,6-diazahomoadamantan 7 (76% yield) , (scheme 3) . FTIR spectra of all compounds showed bands of the stretching vibrations due to ($\text{C}=\text{O}$, NO_2 , NH_2 , NH , OH and $\text{C}=\text{N}$) groups in regions $1710 - 1735 \text{ cm}^{-1}$, $1350 - 1530 \text{ cm}^{-1}$, $3310 - 3430 \text{ cm}^{-1}$, 3420 cm^{-1} , 3450 cm^{-1} and 1630 cm^{-1} respectively , (table 1) . In the ^1H NMR spectra , the expected ratio of aliphatic to aromatic protons were observed . The protons of (NCH_2C) group for diazahomoadamantan derivatives have proved (AB - system) , due to doublet - doublet signals at range ($2.8 - 3.5 \text{ ppm}$, $^2J_{\text{AB}} = 13.5 \text{ Hz}$) . The protons of ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) group appeared as a singlet around ($3.1 - 3.6 \text{ ppm}$) . Some representative ^1H NMR data for the new compounds are gathered in (table 1) . The microanalysis for these new compounds agreed well with the calculated values.

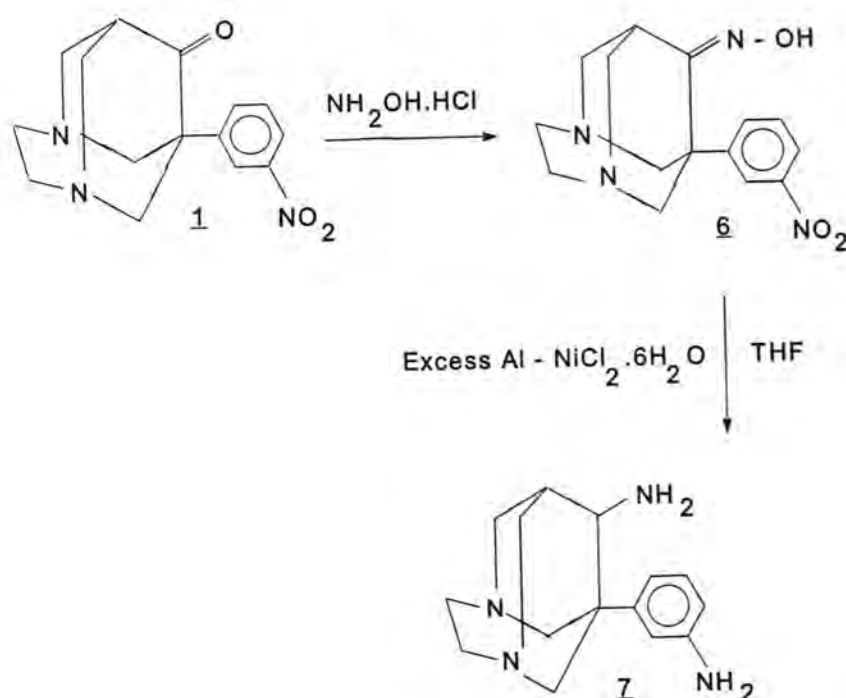


Scheme-2: The reactions of aryldiazahomoadamantan derivatives

Table -1: The ^1H NMR and FTIR data for the new compounds

Comp. No.	^1H NMR spectra (Chem. Shift , ppm) in DMSO – d_6 solvent , singlet signal at 2.5 ppm				FTIR spectra , wave number in (cm^{-1})
	N-CH ₂ -CH ₂ -N (S)	N-CH ₂ -C (D) $^2J_{AB} = 13.5$ Hz	C-H (S)	C ₆ H ₄ (M), OCOCH ₃ (S), NCOCH ₃ (S), C = N - OH (Sb), NH ₂ aliph. (S), NH ₂ aromat. (Sb)	
3	3.6	3.3 – 3.5	2.6	C ₆ H ₄ = 7.6 – 8.1 , COCH ₃ = 1.6	C=O (1735) , NO ₂ (1350 , 1520)
4	3.5	3.2 – 3.3	2.6	C ₆ H ₄ = 7.5 – 8.1 , NH ₂ = 3.7 , COCH ₃ = 1.3	C=O (1730) , NH ₂ (3420 , 3320)
5	3.5	3.1 – 3.4	2.6	C ₆ H ₄ = 7.6 – 8.1 , NH = 3.7 , OCOCH ₃ = 2.6 , NCOCH ₃ = 1.3	OC=O (1730) , NC=O (1710) , NH (3420)
6	3.5	3.4 – 3.5	2.6	C ₆ H ₄ = 7.6 – 8.2 , C=N-OH = 9.5	OH (3450 , 3110) , C=N (1630) , NO ₂ (1355 , 1530)
7	3.1	2.8 – 3.2	2.6	C ₆ H ₄ = 6.6 – 7.8 , NH ₂ aliph. = 3.5 , NH ₂ aromat. = 1.2	NH ₂ (3430 , 3310 , 3200)

S = singlet , D = doublet , M = multiplet , Sb = broad singlet , $^2J_{AB}$ = AB system .



Scheme 3:-The new oximo and diaminodiazahomoadamantan derivatives

The present investigation furnished effective routes for synthesis of five new aryldiazahomoadamantan derivatives in selective yields by using $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, $\text{Al-NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ as reagents. Synthesis, optimization and characterization of aryldiazahomoadamantan derivatives with the base of Mannich's reaction for the starting material only are described herein. The reactions are operationally simple and use the effective metallic system is the first with aryldiazahomoadamantan derivatives to fulfill the reduction of nitro and oximo groups into amino group. The $^1\text{HNMR}$, FTIR spectra and microanalysis were done successfully to determine the structures of these new compounds.

REFERENCES

1. A. I. Kuznetsov, A. H. Shukkur and K. Kamara, Synthesis of 4,5-dihydro-1,6-:3,8- dimethano-1,3,6,8-benzotetrazecine, Russian J. Chem. Bull, 57 (7):1575 -1577 (2008).
2. A. I. Kuznetsov, A. H. Shukkur and K. Kamara, The synthesis of 1,5:3,7- dimethano1,3,5,7-benzotetrazonine, Russian J. Chem. Bull, 56 (3): 563 – 565 (2007)
3. P. Sonia, S. Kirtida, C. Nicholas and W. Michael, "A remarkably efficient and direct route for the synthesis of binucleating 1,4,7-triazacyclononone ligands, J. Synthesis 3011, 16 :2381–2383 (2001).
4. A. I. Kuznetsov, U. Barri, G. Majed and A. Vladimirova, "Synthesis of some new 1-phenyl-3,6-diazahomoadamantan derivatives containing nitro group, Latvian J. Chem. Hetrocy. Comp., 9 :1257– 1261 (1992)
5. T. Sasaki, S. Eguchi and T. Okano, "Novel synthesis and reactivity of 4-azahomoadamantan-3-ene and 4-aza-4-homobrend-3-enes Via intramolecular aza –Wittig reactions, J. Am. Chem. Soc., 105: 5912 –5913 (1983).
6. D. Barton and W. Smith, "Complexation of some new aza, diazamacrocyclic ligands and microbial study, J. Tetrahedron Lett., 39: 7055 – 7060 (1998).
7. A. I. Kuznetsov and A. Vladimirova, "Reduction of nitroaryl derivatives for 3,6- diazahomoadamantan, Latvian J. Chem. Hetrocyc. Comp., 10: 1405 – 1408(1993).
8. A. I. Kuznetsov and A. Muscovkine, Synthesis of some new 9-amino-3,6- diazahomoadamantan derivatives, Latvian J. Chem. Comp., 5 :643 (1992).
9. A-A M. Fenjan and A. I. Kuznetsov, "Synthesis of some new 1-(m-aminophenyl)-3,6- diazahomoadamantan-9-one derivatives, Russian J. Scie. Notes, 7 : 47 – 50 (2003).

10. A-A M. Fenjan and A. I. Kuznetsov , " Synthesis of some new 9-hydrazono- phenyl-3,6-diazahomoadamantan derivatives , Russian J. Scie. Notes ,7 : 54 –56 (2003)
11. P. Sarmah and N. Barua , " A facile reduction procedure for nitroarenes with Al – NiCl₂ – THF system , J. Tetrahedron Lett. , Vol. 31 ,28 : 4065 – 4066 (1990).

Synthesis of 2-(4-Bromophenyl)-4H-1,3-Benzodioxin-4-One Derivatives

Redha I.H.Al-Bayati, Mohammed Z.Thani, Wafaa F.Rodhan and Ismaa M.Abdullah
Department of Chemistry, College of Science, Al-Mustansyriah University

Received 17/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

تم تحضير 2-(4-برومو فنييل)-4H-1,3-بنزوداي اوكسين-4-اون (1) من تفاعل حامض الساليسيليك مع 4-برومو بنزالدیهاد بوجود كلوريد الالمنيوم -حامض الخليك وبعدها حولت الى مشتق N-امينو (2) بتفاعله مع الهيدرازين. حضرت المشتقات (3-7) من تفاعل الانهيدرايد المناسب مع مشتق N-امينو (2) بينما حضرت قواعد شيف (8-15) للمشتق N-امينو (2) بتفاعلها مع الديهايدات وكيونات اروماتية والتي عند معاملتها مع كلوريد الاروبيل والفا مركيتو حامض الخليك يعطي المشتقات (16-19) و(20-23) على التوالي.

ABSTRACT

In this work 2-(4-bromo phenyl)-4H-1,3-benzodioxin-4- one (1) was prepared from the reaction of salicylic acid with 4-bromo benzaldehyde in the presence $AlCl_3 \cdot CH_3COOH$ and then converted into N-amino derivative (2) by reaction with hydrazine hydrate. The derivatives (3-7) were prepared from appropriate anhydrides and N-amino derivative (2). The azomethines (8-15) were prepared from the corresponding aryl aldehydes or Ketones and N-amino derivative (2) which upon treatment with aroyl chloride and α -mercapto acetic acid yielded the corresponding derivatives (16-19) and (20-23) respectively.

INTRODUCTION

1,3-Benzodioxine derivatives are interesting series of heterocyclic compounds which have been shown to be diverse fungicidal and bactericidal properties ⁽¹⁻⁵⁾. Also 1,3-oxazine ring system occurs naturally as part of oxazinomycin and ansamycin antibiotics ⁽⁶⁾. Schiff bases have also widely reported to be biologically versatile compounds having antifungal herbicidal and plant growth regulating properties ^(7,8). Moreover derivatives of cyclic amide, thiozolidine-4-one moieties and acid chloride addition product are known to exhibit various biological activity ⁽⁹⁾.

We now report on the synthesis of compounds derivative from 2-(4-bromo phenyl)-4H-1,3-benzodioxine-4-one containing N-amino, azomethine, phthalimide moieties and derivating that obtained from azomethines with aroyl chloride and α -mercapto acetic acid with purpose of investigating in future their possible biological actives.

MATERIALS AND METHODS

Melting points were determined in open capillary tubes on a Gallen kamp melting point apparatus and uncorrected.

The IR spectra (KBr disc) were recorded with Shimadzu-2N, FTIR - 8400 S. UV Spectra were recorded on Varian, UV-Vis

spectrophotometer using absolute ethanol as solvent . ¹HNMR spectra were recorded on Bruker spectrophotometer model ultra shield at 300 MHZ in DMSO-d6 solution with the TMS as internal standard .

Synthesis of 2-(4-bromo phenyl)-4H-1,3-benzodioxin-4-one (1)⁽¹⁰⁾

A mixture of salysilic acid (0.025 mole), 4-bromobenzaldehyde (0.05 mole) and aluminium chloride (0.02 mole) in acetic acid (50 ml) was stirred for 48 hrs at 25° water (200 ml) was slowly added to the reaction mixture which was then the precipitate formed was filtered off, and recrystallized from ethanol to give compounds(1).

Synthesis of 3-Amino-2-(4-bromo phenyl)-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-one (2)⁽¹¹⁾

To a solution of compound (1) (0.01 mole) in 50 ml of absolute ethanol and hydrazine hydrate (0.03 mole) , were refluxed for 6hrs. Cooling ,the precipitate formed was filtered off and recrystallized from ethanol to give compound (2).

Synthesis of 1-[2-(4-bromo phenyl)-4-oxo-2H-1,3-benzoxazin-3(4H)-yl]-1H-Aryl-2,5-dione (3-7)⁽¹¹⁾

To a stirring solution of compound (2) (0.01 mole) in acetic acid (15ml) appropriate anhydride for (8hrs) and cooled to room temperature .The precipitate and recrystallized from aqueous ethanol to give compounds(3-7).

Synthesis of Schiff bases (8-15)⁽⁸⁾

General procedure

To stirring solute of compound(2) (0.01mole) in absolute ethanol(15ml) appropriate aldehydes or ketone (0.01 mole) was added ,the mixture was refluxed for (6hrs) and cooled to room temperature .The precipitate was filtered and recrystallized from ethanol.

Synthesis of N-[2-(4-bromo phenyl)-4-oxo-4H-benzo(C)[1,3] oxazin-3-yl]-N-[chloro—(Aryl)-methyl] 2,4-dinitro-benzamide (16-19)⁽⁹⁾

To a stirring solution of a compounds (9,10,13,14) (0.005 mole) in dry benzene (10 ml), 2,4-dinitrobenzoyl chloride (0.005 mole) in dry benzene (10 ml) was added dropwise ,the mixture reaction was refluxed for (1hr), after cooling, the precipitate was filtered and recrystallized from benzene.

Synthesis of 2-(4-bromo phenyl)-3-[2-methyl-4-oxo-2-(1H-Aryl)-1,3-thiazolidin-3-yl]-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazine-4-one (20-23)⁽⁹⁾

A mixture of azomethine derivative (8,11,12,15) (0.01 mole) and mercapto acetic acid(1ml), in dry toluene(15ml), were refluxed for (5hrs).The solvent was then distilled in vacuum and the obtained precipitate was filtered and recrystallized from xylene.



•

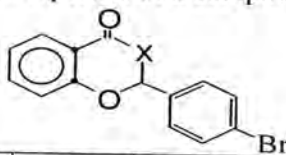
RESULTS AND DISCUSSION

The new derivatives of compound (1) were prepared following the reaction sequences depicted in scheme 1. The starting material for the synthesis of the targeted compounds is 2-(4-bromo phenyl)-4H-1,3-benzodioxin-4-one (1) which was prepared by the reaction of salysilic acid with 4-bromobenzaldehyde in the presence of $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$ (Table 1). The formation of this compound was indicated by presence in their IR spectra of the carbonyl group (C=O) at 1695 cm^{-1} combined with the disappearance of the (O-H) stretching bands. UV spectra of compound (1) mostly showed intense maxima at 259 nm and 308 nm which belonged to $\pi\rightarrow\pi^*$ and $n\rightarrow\pi^*$ transition respectively. $^1\text{HNMR}$ also showed aromatic proton as multiplit at (7.6 - 8.7) ppm and ($-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$) as singlet at (7.2) ppm. Reaction between compound (1) and hydrazine hydrate afforded the N-amino derivative (2) in good yield (table 1). The spectrum showed the (N-H) stretching absorption near $3358, 3282\text{ cm}^{-1}$ and the (C=O) stretching one at 1687 cm^{-1} . UV spectrum of compound (2) mostly showed intense maxima at 220 nm and 309 nm which belonged to $\pi\rightarrow\pi^*$ and $n\rightarrow\pi^*$ electronic transition respectively. $^1\text{HNMR}$ also showed aromatic proton as multiplit at (7.2 - 8.0) ppm and ($-\text{NH}_2$) as singlet at (4.4) ppm. Reaction of the N-amino derivative (2) with deferent anhydrides (malice, 3,4-dichloro malice, phthalic and 5-nitophthalic) in acetic acid gave the derivatives (3-7) (table 1). The formation of these derivatives was indicated by the presence in their IR spectra of the (C=O) stretching bands at $1673\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$ combined with the disappearance of the NH_2 stretching band. UV spectra showed intense maxima at 229-284 nm and 309-323 nm which belonged to $\pi\rightarrow\pi^*$ and $n\rightarrow\pi^*$ transition respectively. $^1\text{HNMR}$ of compound (7) also showed aromatic proton as multiplit at (7.2 - 8.0) ppm and ($-\text{O}-\text{CH}-\text{N}-$) as singlet at (7.0) ppm and disappearances of (NH_2) area absorption proton NMR.

Condensation of compound (2) with aryl aldehydes and ketones in absolute ethanol gave the Schiff bases (8-15) (table 2). The formation of these azomethines was indicated by the presence in their IR spectra of the azomethine (CH=N) stretching bands at $(1624\text{-}1629)\text{ cm}^{-1}$ combined with the disappearance also of the NH_2 stretching band. UV spectra showed mainly intense maxima at 205-221 nm and 309-382 nm which belonged to $\pi\rightarrow\pi^*$ and $n\rightarrow\pi^*$ transition respectively. Treatment of some above Schiff bases with acid chloride led to the formation of derivative (16-19) (Table 3) where the Cl and ArCO were introduced in the same step of the reaction. The IR spectra of these derivatives showed the disappearance of absorption bands of (CH=N) in the region $1624\text{-}1629\text{ cm}^{-1}$ combined with the appearance of absorption bands at $1675\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$ and $801\text{-}808\text{ cm}^{-1}$ which were attributed to C=O and

C-Cl stretching bands .UV spectra of these derivatives showed intense maxima at 232-236 nm and 303-322nm due to $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions, furthermore, some Schiff bases were cyclo-condensed with α -mercapto acetic acid to give the thiazolidine-4-ones(20-23) (table 4),IR spectra showed the stretching bands at 1688-1697 cm^{-1} for (C=O) group combined with the disappearance of the (C=N) stretching bands.UV.spectra showed mostly intense maxima at 230-238nm and 250-289nm due to $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ respectively.

Table-1: Properties of a compounds (1-7)



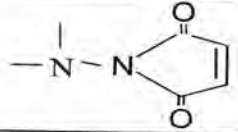
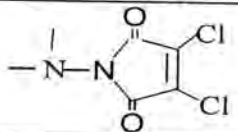
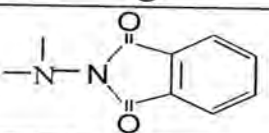
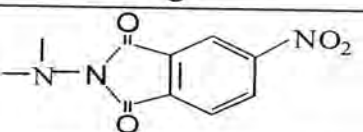
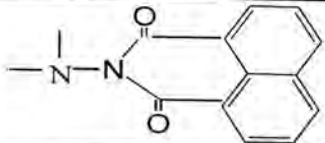
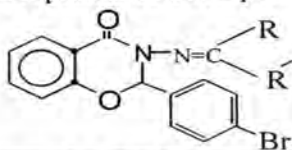
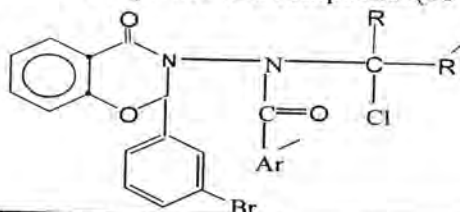
Com. No.	-X-	M.P C°	Yield %	Spectra data	IR cm^{-1}
				UV, λ_{mx} (EtOH)	
1	-O-	79-81	58%	308,259,208	1695(C=O), 3082(C-H)ar, 585(C=C) 1201(C-O), 758(C-Br)
2		220-222	62%	309,220	3358,3282(N-H), 3039(C-H)ar, 1687(C=O), 1591(C=C), 723(C-Br), 1219(C-O)
3		204 decom.	71%	309,259	3080(C-H)ar,2920(C-H), 1690,1687(C=O),1585 (C=C),700(C-Br)
4		234- decom.	86%	310,255	3047(C-H)ar, 1690, 1675(C=O),1585(C=C), 700(C-Br), 806(C-Cl)
5		199-203	89%	308,284	3050(C-H)ar, 1695, 1677(C=O), 1587(C=C), 709(C-Br).
6		200 decom.	53%	309,284,264	3091(C-H)ar, 1689,1671(C=O), 1583(C=C),750(C-Br), 1453(NO ₂).
7		241-245	88%	323,229	3066(C-H)ar, 1691,1673(C=O), 1580(C=C),725(C-Br).

Table-2: Properties of a compounds (8-15)



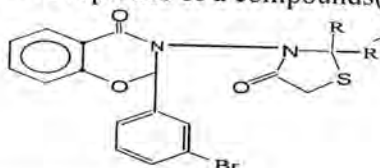
Comp. No.	R	R'	M.P C°	Yield %	Spectra data	IR cm ⁻¹
					UV. λ_{max} (EtOH)	
8	CH ₃		184-186	71%	322,205	1680(C=O),1624(C=N), 3070(C-Har),1587(C=C), 709(C-Br),2950(C-Hal)
9	H		157-159	78%	339,300,219	3421(OH),3050(C-Har), 1626(C=N),1687(C=O), 732(C-Br),1570(C=Car)
10	CH ₃		215- decopm.	84%	311,221	3056(C-Har),2941(C-Hal), 1626(C=N),1690(C=O), 1585(C=C),700(C-Br)
11	CH ₃		228-230	69%	310,221	3050(C-Har), 2939 (C-Hal), 1680(C=O),1626(C=N), 1583(C=Car), 704(C-Br)
12	H		198-201	81	309,221	3040(C-Har), 1688(C=O), 1625(C=N),1587(C=Car), 702(C-Br),808(C-Cl)
13	H		210-204	85%	309,220	3080(C-Har),1699(C=O), 1624(C=N),1583(C=Car), 1398,1629(NO ₂),700(C-Br)
14	-H		206-209	92%	382,222,310	3070(C-Har),2939(C-H), 1683(C=O),1624(C=N), 1583(C=Car), 705(C-Br)
15	-H		169-172	90%	310,220	3380(O-H),1685(C=O), (1629(C=N),3093(C-Har). 1545(C=Car),2964(C-Hal), 725(C-Br).

Table -3: Properties of a compounds(16-19)



Com p. No.	R	R'	M.P C°	Yiel d %	Spectra data	IR cm ⁻¹
					UV.λ _{mx} (Et OH)	
16	H		145 decom p.	73 %	310,203,23 2	3090(C-Har),2941(C-Hal), 1705,1696(C=O),1543(C=C), 721(C-Br),808(C-Cl)
17	H		195- 198	77 %	309,205,23 5	3091(C-Har),2943(C-Hal), 1698-1675(C=O),1545(C=C), 1348(NO2),725(C-Br), 805(C-Cl)
18	H		149 decom p.	81 %	322,212,23 6	3093(C-Har), 2964(C-Hal), 1692-1703(C=O),1546(C=C), 1349(NO2),726(C-Br),808(C-Cl)
19	CH 3		201- 203	64 %	303,207,23 2	3090(C-Har),2945(C-H), 1701,1693(C=O),1550(C=C),134 1(NO2), 731(C-Br),801(C-Cl)

Table -4: Properties of a compounds(20-23)



Comp. No.	R	R'	M.P C°	Yield %	Spectra data	IR cm ⁻¹
					UV.λ _{mx} (EtOH)	
20	H		89- 93	60%	205,238,277	3466(O-H),3030(C-H)ar,2929(C- H),1690- 697(C=O),1545(C=C),758(C-Br)
21	CH ₃		118- 120	53%	250,279,234	3080(C-H)ar,2944(C-H), 1698-1677(C=O),1520(C=C), 727(C-Br)
22	CH ₃		132- 135	69%	206,230,280	3441(O-H),3091(C-H)ar, 2956(C-H),1688(C=O), 1584(C=C),721(C-Br)
23	H		165- 168	55%	204,233,289	3396(O-H),3010(C-H)ar,2920(C- H),1694(C=O),1587(C=C),730(C- Br)823(C-Cl)

REFERENCES

- 1- Bath,H.S, "Inorganic Synthesis" ,MC Gram-Hill Book Company,NewYork and London,4, 85 (1939).
- 2- Al-Rawi,J.M., Al-Shahiry.K.F., "Synthesis of 4-oxo-2-thio-3,4-dihydro-2H-1,3-Substituted benzoxazine-Their Transformation with water diazomethane and Amines", Asian J.of Chem.,2:343-350(1990).
- 3- Ibrahim,M.N., Saeed,M. and Fadhil,S., "Carbon-13 Spectral of some unsaturated Amino acids and dihydropeptides derived from oxazol-5-one", Iraqi,J.Chem.Soc.,12,179(1987).
- 4- Bollamy L.J., "The infrared Spectra of complex Molecule", Second Edition, Methuen, London , (1958).
- 5- Al-Bayati,R.I., Al-Rawi,J.M. and Al-Naimi,K.H., "Reaction of 2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazine with some secondary Amines", Iraqi J. of Chem.,23(2)(1997).
- 6- Al-Bayati,R.I., Al-Rawi,J.and Al-Naimi,K.H., "Studies on the reaction of substituted-4-oxo-2-thio and 2,4-dioxo -3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazines", Mu'tah J., 9:243-262,(1994).
- 7- Al-Bayati,R.I.,Thani.M.Z. and Abdullah,A.M., "Synthesis of New 4-amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-pyrazol-3-derivatives", Journal of college of Education,3: 79-86,(2008).
- 8- Roui I.H., "Synthesis and biological activity of some new Twin compounds containing heterocyclic unit", Al-Mustansiriya J.Sci., 19(4):41-52,(2008)
- 9- Thani M.Z., "Synthesis of new 2,7-dihydroxy naphthalene heterocyclic derivatives", Al-Mustansiriya J. Sci., 2,(2):59-69,(2009).
- 10- Fujita T., Watanabes S., Suga K., Isobe T. and Miura T., "The reaction of β -Hydroxy acids with aldehydes", Aust. J. Chem., 33:685-687 (1980) .
- 11- Habib J.M., "Synthesis and characterization of new nitrogenous coumarin derivatives", Ph.D Thesis, (2006).

The Factors Effect of IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) Extraction by Crown Ether (18C6)

Hadi H. Jasim

Al-Mustansiriyah University, College of Science- Department of Chemistry

Received 8/6/2010 – Accepted 5/10/2010

ABSTRACT

There are many factors effecting on the group IIIA ions extraction by the macro cyclic (crown ether 18C6): solvent effect, the pH range, ionic radius, the crown ether structure or the cavity size and the anion size.

The 1:1:3 complex (Metal : Ligand : Anion) is the most stable, when the ionic radius of the cation fits the size of the crown ether (18C6) cavity, otherwise, the stability of the complex is poorer and the extraction decreases, if the relative size of (18C6) cavity was very different from the ionic of the metal ion, then the distribution coefficient (K_D) and extraction percentage (E%) decrease, or the solvent effect, the relative efficiencies of the extraction of IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) observed depend on the number of carbon atoms in the solvent, CH_3OH , CH_3CH_2OH , $CH_3CH_2CH_2OH$. pH effect when the concentration of solution is (0.25M) and the temperature $27^\circ C$, K_D and (E%) values increase when pH between (1-3.5) for Ga^{3+} extraction and between pH values (1-4) for In^{3+} and Tl^{3+} extraction, if the pH value more than 4 the extraction of metal ions decreases. The greatest extraction for IIIA ions follow the sequence : $Tl^{3+} > In^{3+} > Ga^{3+}$ depend on the radius of the ions.

The extraction increase when the size of the counter ion was large and the extraction efficiency was found to follow the sequence $I^- > OH^- > Br^- > Cl^-$ under the same conditions.

الخلاصة

يتضمن البحث دراسة تأثير أربعة عوامل هي المذيب وقيمة pH للمحلول ونصف قطر الأيون الفلزي المراد إستخلاصه وحجم الأيون المرافق بالتعقيد على إستخلاص كل من Ga^{3+} و In^{3+} و Tl^{3+} من الزمرة IIIA بإستخدام الأثير التاجي (18C6). وقد ظهر أن المعقد الناتج كان بالنسبة التالية 1:1:3 لكل من الأيون السالب : الليكاند : الأيون الموجب على التوالي، وظهر من خلال البحث أن الإستخلاص إزداد كلما إقترب نصف قطر الأيون المراد إستخلاصه من نصف قطر التجويف للأثير التاجي (18C6) أما تأثير المذيب حيث إستخدمنا ثلاث مذيبات من نفس السلسلة وهي الميثانول والإثانول والبروبانول والفرق الوحيد بينهما هو عدد ذرات الكربون بالسلسلة. "وظهر أن الإستخلاص يقل كلما إزداد طول السلسلة الكحولية" على شرط ثبوت الظروف الأخرى. أما تأثير الـ pH فيلاحظ أن الإستخلاص يزداد كلما إزدادت قيمة pH للمحلول حتى تصل قيمة pH للمحلول أربعة بعدها أي زيادة في قيمة pH تؤدي إلى تقليل نسبة الإستخلاص للأيونات تحت نفس الظروف. كما لوحظ أن الإستخلاص دائماً يكون $Ga^{3+} > In^{3+} > Tl^{3+}$ تحت نفس الظروف والسبب يرجع إلى أن نصف قطر أيون Tl^{3+} أقرب إلى قطر التجويف من بقية الأيونات. أما تأثير الأيون السالب، فيلاحظ من خلال النتائج أن الإستخلاص يزداد كلما كبر حجم الأيون السالب للهالوجين المرافق بالتعقيد. وتبين النتائج أن الإستخلاص يزداد كما يأتي : $I^- > OH^- > Br^- > Cl^-$ عند إستخدام هذه الأيونات تحت نفس الظروف.

INTRODUCTION

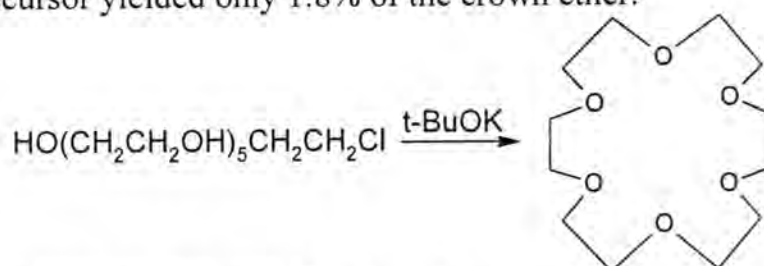
There are many quantative (1, 2) methods of determining IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) ions each requires a preliminary separation from interfering ions, i. g., by solvent extraction, gravimetric methods are

being superseded by faster and more sensitive volumetric and colorimetric method(3, 4).

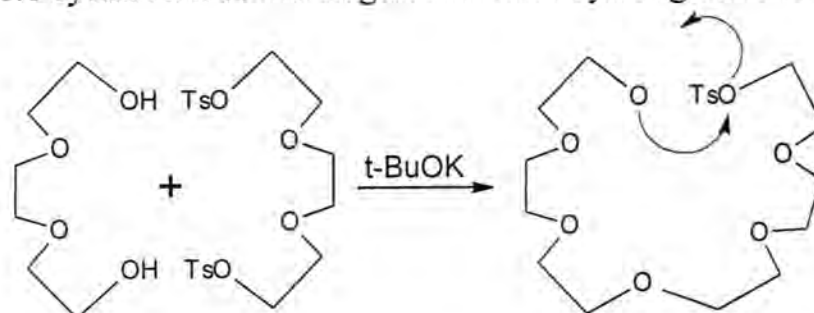
In this study crown ether (18C6) has been used for IIIA metal ions (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) extraction. The relation between the stability of complexes in solution and their extractability, generally the recovery of more stable complexes is greater than that of less stable ones (5).

MATERIALS AND METHODS

Oxygen macrocyclic (18C6) the best known of the crown ethers was obtained for the first time by Pederson (6). The cyclization of an open-chain precursor yielded only 1.8% of the crown ether.



Five years later, Green and Kristiansen prepared the same macro-cycle by the 1:1 cyclization of two fragmentation in a yield greater 30%



The complexation dependence(7) on the size of the cat ion (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) and the macro cycle and to propose the famous principle stating that the most stable complexes are formed when the macro cyclic cavity size matches the cat ion size.

In this study one of these ions matches the cavity size of crown ether because the cavity diameter is much large than the diameter of metals ($18\text{C}6=2.67^\circ\text{A}>\text{Tl}=1.4^\circ\text{A}>\text{In}=1.32^\circ\text{A}>\text{Ga}=1.13^\circ\text{A}$)(8), when determine the distribution coefficient (K_D) and extraction percentage ($E\%$) for 2 10-3Mhalide salt (GaCl_3 , InCl_3 , TlCl_3) extraction with crown ether in 0.25Methanol solution at pH equal (3.5-4.0) at 27°C is shown at table (1).

The extraction yield in Tl^{3+} ions is a greatest and In^{3+} extraction is larger than Ga^{3+} . The remaining concentration of salt after shaking determine by U.V. Spectroscopy (9).

Table -1 : Describe the cavity diameter effect of IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) extraction by crown ether (18C6) at 27°C , pH range (3.5-4.0) 0.25M ethanol solution

Cation	$(C_{aq})_{10}$ Mol/l	Extraction Concentration (Cor) Mol/l	Distribution Coefficient K_D	L og K_D	Extraction Percentage E%	Shaking Time (min.)	Radius Ions A° M^{3+}
Ga^{3+}	6.52	4.35×10^{-3}	2.06.748	2.31	67.42	40	0.62
In^{3+}	4.49	4.45×10^{-3}	264.298	2.42	72.56	40	0.81
Tl^{3+}	4.54	4.55×10^{-3}	340.528	2.53	77.31	40	0.95

Which K_D : distribution coefficient C_{aq} : remaining concentration E% extraction percentage, C_{or} : extraction concentration

$$K_D = \frac{C_{or}}{C_{aq}} * \frac{V_{ml}}{W_{(g)}} \text{-----(1)} \quad E\% = \frac{C_{or}}{C_T} * 100 \text{----- (2)}$$

V : volume of sample, W: gram the weight of crown ether was added.

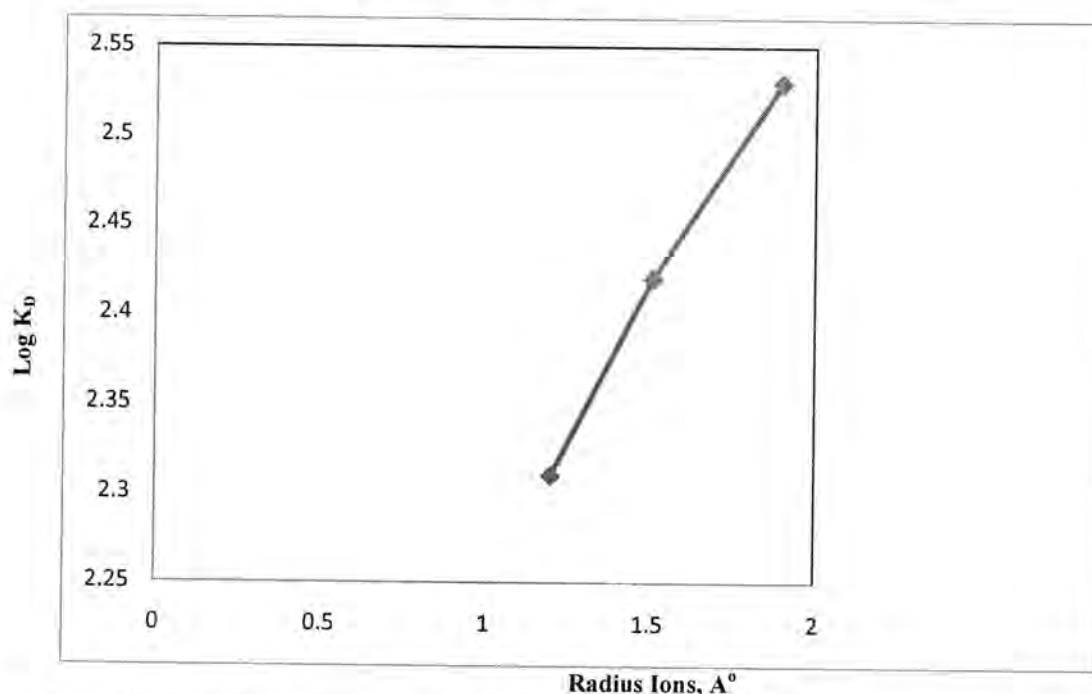


Fig -1 : The relation between log K_D values and the radius IIIA metals for (18C6) in ethanol solution at 27°C

Solvent Effect

Crown ether recovers metal ions by forming stable (10) cationic complexes or neutral complex when the solution contains excess concentration of an ion.

The stability and extraction ratio of complexes are effected with different factors and the solvent one of them.

This study examines three types of alcohol used as solvents methanol, ethanol and propanol. The effect of these three types of alcohol

illustrated at table (2) for IIIA (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) ions extraction by crown ether (18C6) at constant temp. 27°C and pH range (3.5-4.0).

The effect depends on the number of carbon atoms in the solvent.

The extraction ratio increases when the number carbon atoms decreases, that the distribution coefficient (K_D) and extraction percentage (E%) increase for the following sequence was obtained

$\text{CH}_3\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Table (2) illustrates the effect of two factors, the first one solvent effect and the other is cavity diameter of the ions.

Table -2 : IIIA ion extraction with (18C6) at 27°C , pH=(3.5-4.0), 3 types of solvent

No.	Solvent	Cation	$C_{\text{aq}} \cdot 10^{-4}$ Mol/l	(C_{or}) Mol/l	K_D	Log K_D	E%	Shaking Time min.
1	Methanol CH_3OH 0.25M	Ga^{3+}	6.04	$1.396 \cdot 10^{-3}$	231.125	2.36	69.82	40
		In^{3+}	4.92	$1.508 \cdot 10^{-3}$	306.504	2.48	75.41	
		Tl^{3+}	4.06	$1.594 \cdot 10^{-3}$	392.610	2.59	79.71	
2	Ethanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 0.25M	Ga^{3+}	6.52	$1.348 \cdot 10^{-3}$	206.748	2.31	67.42	40
		In^{3+}	5.49	$1.451 \cdot 10^{-3}$	264.298	2.42	72.56	
		Tl^{3+}	4.54	$1.546 \cdot 10^{-3}$	340.528	2.53	77.31	
3	Propanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ 0.25M	Ga^{3+}	7.32	$1.268 \cdot 10^{-3}$	173.224	2.23	43.63	40
		In^{3+}	6.51	$1.349 \cdot 10^{-3}$	207.219	2.31	67.45	
		Tl^{3+}	5.47	$1.453 \cdot 10^{-3}$	265.630	2.42	72.66	

Note : $C_T = 2 \cdot 10^{-3} \text{M}$, Temp. = 27°C , pH=3.5-4

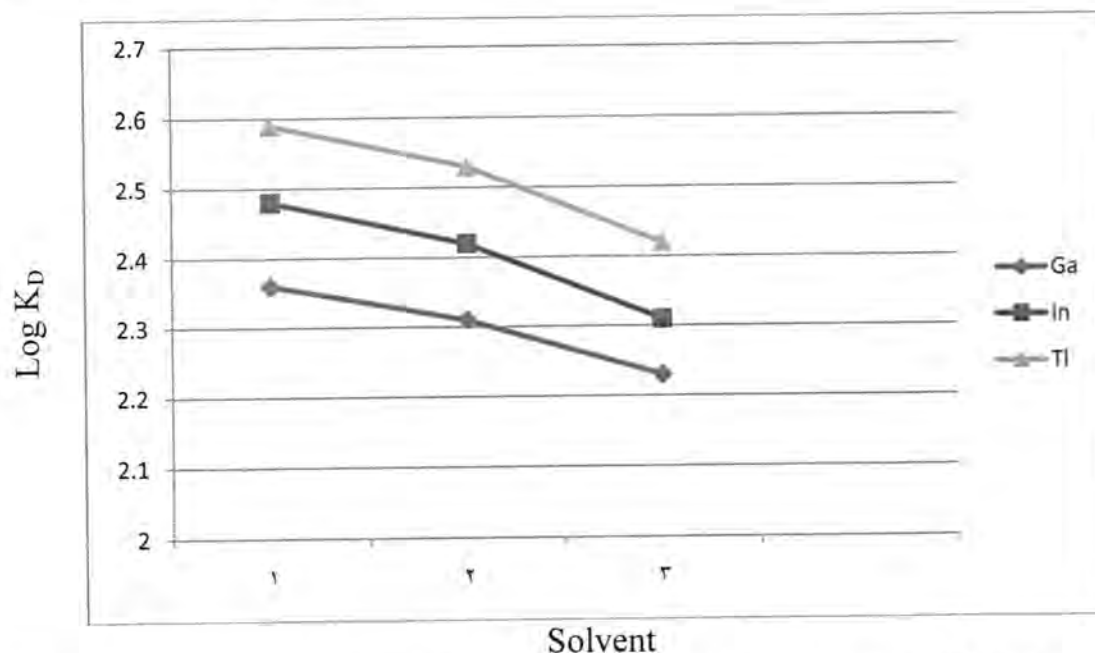


Fig. -2: Solvent effect on the IIIA ions extraction with crown ether (18C6) in presence of three solvent 1-methanol, 2-ethanol and 3-propanol

Anion Effect

The second factor that defects (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) ions extraction by crown ether (18C6) is the volume of anion uses in the complexation. In this study of extraction when the concentration of solution, temperature and pH range was constant, extraction efficiency decreases according to the following sequence of anion $\text{I}^- > \text{OH}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$.

Generally the extraction ratio increases when the radius of anion or the volume of the anion increases, because rapid and easy precipitation of complex formed. Table (3) illustrated the anionic effect from (Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) ions extraction with 0.25M methanol solution but table (4) illustrated the same anion effect under the same condition, with propanol solution.

Table -3: Anion effect from IIIA ions extraction with 0.25M CH_3OH solution

No.	Cation	Anion	$(C_{\text{aq}}) \cdot 10^{-4}$	(C_{or})	K_D	$\text{Log } K_D$	E%
1	Ga^{3+}	Cl^-	7.28	$1.272 \cdot 10^{-3}$	174.725	2.24	63.64
		Br^-	6.35	$1.365 \cdot 10^{-3}$	214.960	2.33	68.26
		I^-	5.14	$1.486 \cdot 10^{-3}$	289.105	2.46	74.33
		OH^-	5.71	$1.429 \cdot 10^{-3}$	250.262	2.39	71.45
2	In^{3+}	Cl^-	6.50	$1.350 \cdot 10^{-3}$	207.692	2.31	67.51
		Br^-	5.81	$1.419 \cdot 10^{-3}$	244.234	2.38	70.95
		I^-	4.38	$1.562 \cdot 10^{-3}$	356.621	2.55	78.12
		OH^-	5.18	$1.482 \cdot 10^{-3}$	286.100	2.95	74.13
3	Tl^{3+}	Cl^-	6.16	$1.384 \cdot 10^{-3}$	224.675	2.35	69.22
		Br^-	5.49	$1.451 \cdot 10^{-3}$	264.289	2.42	72.55
		I^-	4.0	$1.600 \cdot 10^{-3}$	400.000	2.60	80.02
		OH^-	4.96	$1.504 \cdot 10^{-3}$	303.225	2.48	75.24

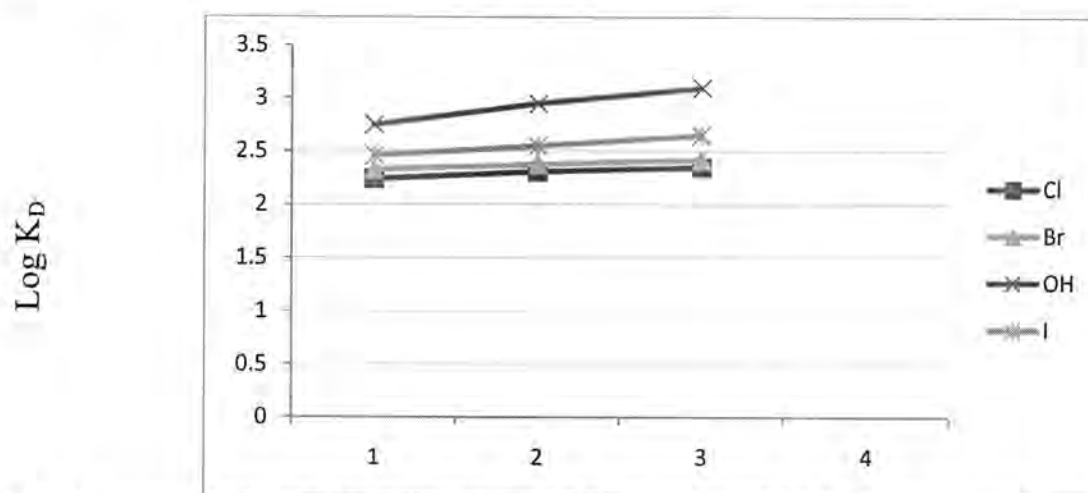


Fig. -3: Anionic effect of IIIA ions extraction by crown ether with 0.25M methanol solution 1- Ga^{3+} , 2- In^{3+} , 3- Tl^{3+}

pH Effect

The third factor, which effected from IIIA ions extraction by crown ether (18C6) with 0.25M ethanol solution, was the pH value of the solution. In this study we showed the distribution coefficient (K_D) and extraction percentage (E%) values increase when the acidity of the solution decrease or when the pH values increase, between (1-3.5) from Ga^{3+} extraction and (1-4) from In^{3+} and Tl^{3+} extraction, but when the pH values increase after (pH=4). The (K_D) and (E%) values decrease at the same condition. The best pH solution from Ga^{3+} extraction was (pH=3.5) and from In^{3+} and Tl^{3+} the best pH equal (4). Table (4) illustrated the relation between pH values and $\log K_D$.

Table -4: pH effect from IIIA ions extraction with crown ether (18C6), methanol solution, at 27°C

E%			$\log K_D$			K_D			pH
Ga^{3+}	In^{3+}	Tl^{3+}	Ga^{3+}	In^{3+}	Tl^{3+}	Ga^{3+}	In^{3+}	Tl^{3+}	
55.0	59.1	64.0	2.47	2.52	2.58	296.05	335.55	382.13	1.0
69.4	61.4	70.2	2.65	2.56	2.66	256.01	364.35	465.01	2.0
71.5	65.3	74.1	2.61	2.59	2.70	477.89	393.06	506.18	2.5
72.2	66.2	75.2	2.69	2.61	2.73	292.23	414.86	543.32	3.0
75.6	72.1	78.8	2.72	2.67	2.78	532.11	477.97	606.24	3.5
72.2	79.0	81.5	2.70	2.75	2.80	506.21	573.03	635.41	4.0
70.5	75.9	74.0	2.66	2.73	2.77	464.94	543.25	598.04	5.0
58.2	65.0	58.2	2.50	2.60	2.67	321.02	406.82	477.98	6.0

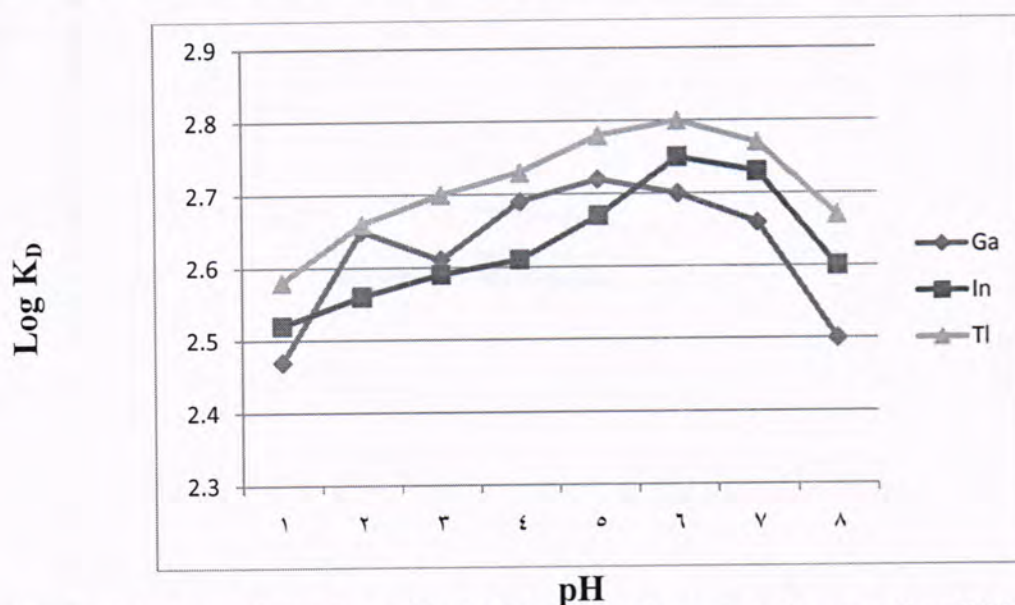


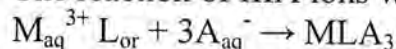
Fig -4: Extraction of IIIA ions with 0.25M methanol solution of crown ether (18C6), describe the pH solution effect

RESULTS AND DISCUSSION

The characteristic chemistry of crown ether involves complexation of the ether oxygen with (Ga^{3+} , In^{3+} and Tl^{3+}) ionic species.

This is termed host-guest. The purpose of this study is illustrated the effect of solvent, pH and anion of IIIA cation extraction by 18-crown-6 from the solvent effect uses three types of alcohol, the number of carbon atoms was the different between these solvent (methanol, ethanol and propanol), for the following sequence was obtained $\text{CH}_3\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ from IIIA extraction when determine the extraction ratio of the three cation at different values of pH solution, show the extraction of IIIA ions increase when the pH values increase from pH range (1-4), after that range the extraction decrease if the pH solution greater than (pH=4). The anion effect is the third factor studied, we show the distribution coefficient (K_D) and extraction percent, (E%) decreases when the radius of the anion decreases, the following sequence of the anions studies show $\text{I}^- > \text{OH}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, at the same condition from (temperature, pH of solution and solution type).

The reaction of IIIA ions with crown ether extraction system.



REFERENCES

- 1- M. S. Bffleben Zayeed, Kimbrough D, "Evaluation of Urban non Point Source Runoff Hazardous Metals", Wat. Sci-Tech, 45:263-268, (2002).
- 2- L. Prodi and F. Bolletta, "Luminescence Signalled Enantiomeric Recognition of Chial Organic Ammonium Ions", New J. Chem., 24:781-785, (2000).
- 3- H. Peter and Turde Toth, "Synthesis and Molecular Regnition Studies of Crown Ether", Chemical Engineering, 51/2:45-51, (2007)
- 4- K. Ahmed, Suham T. Ameen, "Potentiometric Sensors for Determination of Trifluoperazine", Anal Sci., 25, 1295, (2009).
- 5- J. Genercser, N. Bathori and M. Czugler, "Synthesis of New Optically Active Pyridino and Pyridino-18-Crown-6 Type Ligands Containing Four Lipophilic Chains", 14:2803-2811, (2003).
- 6- J. Gerencser, P. Huszthy and M. Nogradi, "Synthesis of New Optically Active Bis Pyridino and Bis Pyridino-18-Crown-6 Type Ligands Containing Four Lipophilic Chains", Attached to the Chiral Centers Arkivoc:7-14, (2004).
- 7- M. Kader, A. Biro, K. Toth, B. Vermes, "Spectrophotometric Determination of the Dissociation Constant of Crown Ether with

- Grafted Acridone Unit in Methanol Based on Bensi-Hilbrand Evaluation", *Spectrochemica Acta* Pat A62:1032-1038, (2005).
- 8- Nur Muhammed and Anne Morris Hooke, "Diffuse Pollution in Oxford Ohio, USA Watershed and Performance of Street Sweeping", *J. Water and Health*, 4, 4, (2006).
 - 9- S. M. Bakolova and M. P. VALdimirova, "Synthesis Electronic Spectra and Conformational Properties of Some N-Communications", 35:245-251, (2005).
 - 10- J. Martin Jones, "Effect of Addition of 18-Crown-6 on Salts" Crown Ether Solubilities of Potassium Complexation:1-3, (2001).

The Thermal Degradation of Some Cellulosic Materials

Mohammed H.A. Al-Ameri and Wadahe W.N. Jassime

University of Baghdad, College of Science, Department of Chemistry

Received 28/2/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

لقد تمت دراسة التحلل الحراري للسليولوز النقي والقطن العراقي اضافة الى السليولوز المستخرج من بعض الاشجار المزروعة في شمال العراق. وعند الخوض في عملية التحلل الحراري للسليولوز لابد من معرفة رتبة التحلل والتي تدعى (n) وثابت سرعة التفكك النوعي والذي يدعى (k) بالاضافة الى قياس الخواص الثرموديناميكية مثل طاقة التنشيط (E_a) والتغيير في الانثالبي (ΔH) والتغيير في الطاقة الحرة (ΔG) اضافة الى التغيير في الانتروبي (ΔS)، حيث توجد هنالك عدة طرق تستخدم لقياس رتبة التفاعل (n) وثابت سرعة التفكك النوعي (k) للبولىمرات ومنها السليولوز معظمها يعتمد على معدل تفكك البولىمر بالحرارة.

ABSTRACT

The thermal degradation of pure powdered cellulose, Iraqi cotton fibers and grained extracted cellulose from some plants in north of Iraq is studied. It is found to be first order reaction with rate of degradation (k), ranging from 1.1 to 3.1 min⁻¹.

The activation energy (E_a), the entropy change (ΔS), the enthalpy change (ΔH) and Gibbs free energy (ΔG) are calculated by applying the rate theory of the first order reaction. The variation of these parameters is discussed in the light of the variation of the degree of crystallinity or the ordering of a disordering structure and the nature of the cellulosic material.

INTRODUCTION

The thermogravimetric analysis (T.G.A.) is widely used as a method to investigate the thermal decomposition of polymers and to determine some kinetic parameters such as rate of decomposition (k) order of reaction (n) and activation energy (E_a)(1). The values of these parameters can be of major importance in the elucidation of the mechanisms involved in polymer degradation(2) and in the estimation of the thermal stability of polymers(3). Many authors(4) studied and discussed the qualitative and quantitative estimation of thermal degradation of the polymers.

The electrical properties of the cellulosic materials were tackled previously(5-10). To the authors knowledge the only work concerning the thermal properties of cellulosic materials was that reported by Shafizadeh(11) and Chatterjee(12). The present investigation aims at studying the effect of the cellulosic nature and the degree of crystallinity on the thermal degradation of some cellulosic materials. Also the kinetic parameters (k, n) and the thermodynamic functions such as activation energy (E_a) enthalpy change (ΔH), entropy (ΔS) and Gibbs free energy (ΔG) for the samples were calculated.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Three types of cellulosic materials were used, pure powdered cellulose (supplied from Fluka), Iraqi cotton fibers and grained extracted cellulose from some plants in north of Iraq.

Preparation of the cotton samples: Fibers of Iraqi cotton were cut into small pieces and shredded. The powder thus obtained was sieved to different particle sizes ranging from 0.009 to 0.5 mm in diameter. The samples were purified and dried at (70°C) under vacuum before any measurements(10).

Measurement of the degree of crystallinity: The indirect method(13) was used for determining the degree of crystallinity of the samples. This method is based on the acid hydrolysis for the cellulose sample at different time intervals.

The thermal degradation measurement: The thermogravimetric analysis (T.G.A.), the weight loss thermogram (TG) and the differential thermogram (D.TG) were carried out by using "MoM-Derivatograph no.3427" from 20 to 500°C. The rate of heating was adjusted to 10°C/min.

RESULTS AND DISCUSSION

The result of the sieve analysis and the degree of crystallinity for the investigated cotton samples are shown in table (1).

Table -1: Characterization of the samples

Sample no.	Nature of sample	Particle size (mm)	Degree of crystallinity
1	Powdered cellulose	-	-
2	Iraqi cotton	0.009-0.063	88.100
3	Iraqi cotton	0.063-0.125	88.510
4	Iraqi cotton	0.125-0.250	89.120
5	Iraqi cotton	0.250-0.500	90.573
6	Iraqi cotton	> 0.500	91.410
7	Extracted cellulose	Grains	-

The thermal profiles for one of the samples are shown in Figure (1).

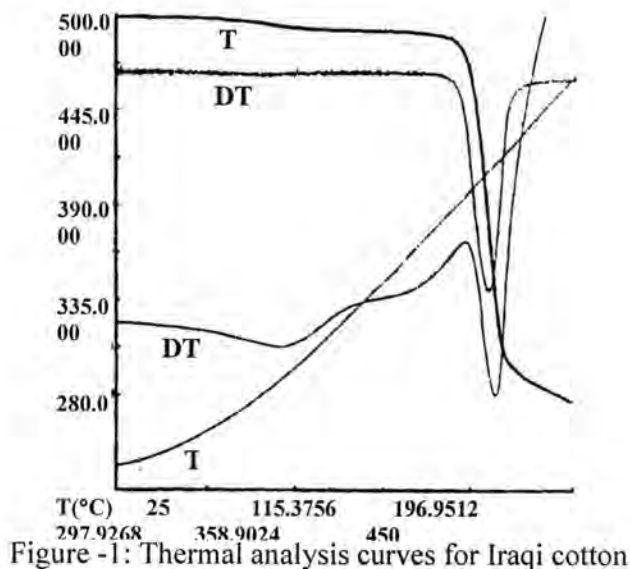
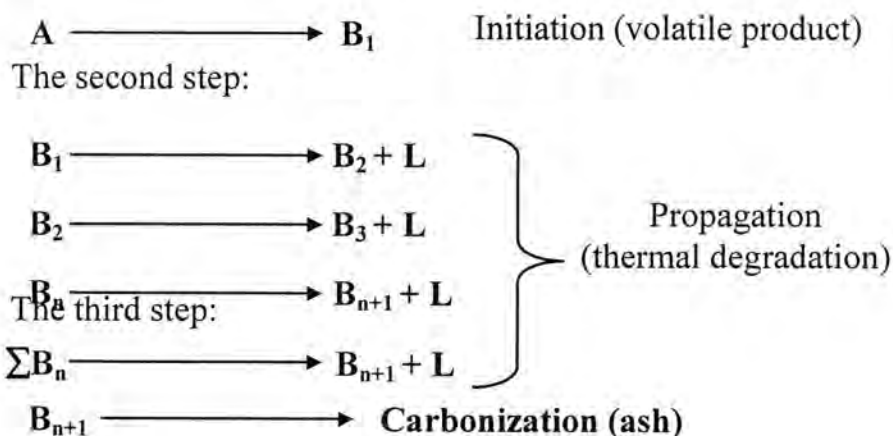


Figure -1: Thermal analysis curves for Iraqi cotton

This sample having particle size between (0.009 to 0.063mm) is taken as example for discussion.

The (D.T.A.) of the Iraqi cotton sample (no.2), Figure (1) shows an exothermic reaction beginning at $\sim 300^{\circ}\text{C}$ and ending at 400°C . This exotherm is interrupted by an endotherm centered at $\sim 310^{\circ}\text{C}$. This endothermal peak can be attributed to formation and evaporation of some volatile pyrolysis products, and the exothermal one is due to the carbonization of these products¹¹. The (TG) for this sample, Figure (1) can be classified into three parts. The first part, from 25 to $\sim 300^{\circ}\text{C}$, represents the volatile materials and / or some residual absorbed water. The second part starts at $\sim 300^{\circ}\text{C}$ and ends at 400°C , and represents the maximum thermal degradation of the sample. The third part, ranging from ~ 400 to 500°C , represents the carbonization of the products to ash. These three parts might correspond to the three steps which were suggested by Chatterjee⁽¹²⁾ as representing the thermal degradation of cellulose. Thus the first step:



Where A denotes initial molecules of cellulose $B_1, \dots, B_n$ are fragmented molecules, L denotes volatile products.

The rate of degradation (k), of the samples was taken in terms of the rate of the weight loss (dw/dt). The thermal degradation of any polymers can be represented by the following equation:



Thus the general rate expression may be written (15,16)

$$R_T = -dw/dt = (A/RH) e^{-E_a/RT} w^n$$

Where (w) is the weight of active material remaining for a particular reaction and (R_H) is the rate of heating, (dw/dT) the rate of degradation, (A) the frequency factor, (E_a) the activation energy, (R) the gas constant, (T) the temperature and n the order of reaction. The above equation can be arranged as follows:

$$\ln R_T = \ln A - E_a/RT + n \ln w$$

When (w) is constant, a plot of $\ln(R_T)$ versus $\left(\frac{1}{T}\right)$ should give a linear relation.

Tables 2-8 give the values of the rate constant for all samples.

Table -2: The thermal degradation data of pure cellulose sample no.1 $w_0 = 560\text{mg}$, $w_{500} = 80\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log \left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}} \right) \times 10^2$
0	560.000	0	-	-
28.542	528.000	32.000	1.121	2.996
28.780	522.667	37.333	1.286	3.516
29.018	517.334	42.666	1.470	4.043
29.256	512.000	47.000	1.607	4.576
29.494	506.667	52.333	1.774	5.115
29.739	501.334	57.666	1.940	5.662

Table -3: The thermal degradation data of Iraqi cotton sample no.2 (particle size = 0.009-0.063 mm) $w_0 = 500\text{mg}$, $w_{500} = 60\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log \left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}} \right) \times 10^2$
0	500.000	0	-	-
37.439	445.000	55.000	1.469	5.799
37.805	431.250	68.750	1.819	7.372
38.171	417.500	82.500	2.161	9.026
38.536	403.750	96.250	2.498	10.721
38.902	390.000	110.000	2.828	12.483
39.268	376.250	123.750	3.151	14.342

Table -4: The thermal degradation data of Iraqi cotton sample no.3 (particle size = 0.063-0.125mm) $w_0 = 500\text{mg}$, $w_{500} = 60\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log\left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$
0	500.000	0	-	-
36.232	458.029	41.971	1.158	4.354
36.715	446.708	53.292	1.452	5.607
37.198	433.069	66.931	1.799	7.166
37.681	417.290	82.710	2.195	9.043
38.164	393.377	106.623	2.794	10.324
38.647	388.823	111.177	2.877	11.521

Table -5: The thermal degradation data of Iraqi cotton sample no.4 (particle size = 0.125-0.250 mm) $w_0 = 530\text{mg}$, $w_{500} = 60\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log\left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$
0	530.000	0	-	-
36.585	491.238	38.762	1.060	3.738
37.073	474.531	55.469	1.496	5.454
37.561	462.728	67.272	1.791	7.512
37.805	445.171	84.829	2.244	8.640
38.048	422.146	107.854	2.835	9.871
38.292	393.664	136.336	3.560	11.342

Table -6: The thermal degradation data of Iraqi cotton sample no.5 (particle size = 0.250-0.500mm) $w_0 = 540\text{mg}$, $w_{500} = 90\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log\left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$
0	540.000	0	-	-
36.585	497.792	42.208	1.154	4.277
36.829	487.714	52.286	1.420	5.364
37.012	464.785	65.215	1.762	6.799
37.134	462.041	77.959	2.099	8.262
37.280	449.118	90.882	2.438	9.798
37.402	436.558	103.442	2.766	11.344

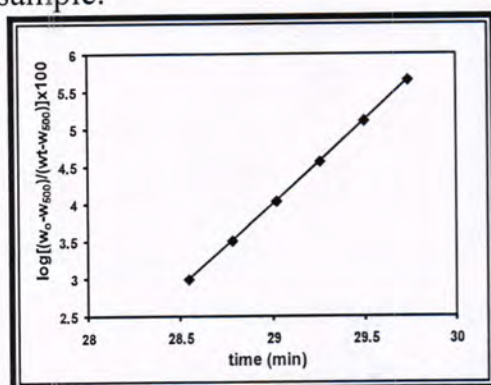
Table -7: The thermal degradation data of Iraqi cotton sample no.6 (particle size = > 0.500 mm) $w_0 = 665\text{mg}$, $w_{500} = 70\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log\left(\frac{w_0 - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$
0	665.000	0	-	-
33.810	625.334	39.666	1.173	2.996
34.048	615.417	49.583	1.456	3.779
34.286	605.500	59.500	1.735	4.576
34.524	595.583	69.417	2.011	5.388
34.762	585.666	79.334	2.282	6.215
35.000	575.749	89.251	2.550	7.058

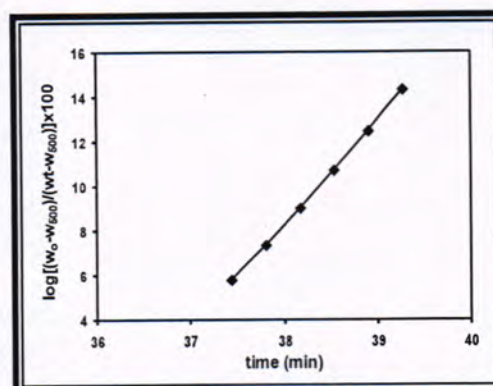
Table -8: The thermal degradation data of Iraqi cotton extracted cellulose sample no.7 (grains) $w_o = 320\text{mg}$, $w_{500} = 20\text{mg}$

Time (t min)	Weight wt (mg)	Loss in weight dw mg	K (min^{-1})	$\log\left(\frac{w_o - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$
0	320.000	0	-	-
30.476	284.000	36.000	1.181	5.552
30.952	278.000	42.000	1.357	6.550
31.428	272.000	48.000	1.527	7.572
31.904	266.000	54.000	1.693	8.619
32.380	260.000	60.000	1.853	9.691
32.856	254.000	66.000	2.009	10.791

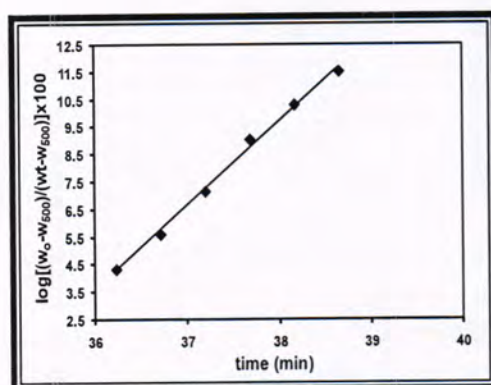
Figures below represent the variation of $\log\left(\frac{w_o - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$ against time (t min) where (w_o) (wt) and (w_{500}) are the weight of the initial sample.



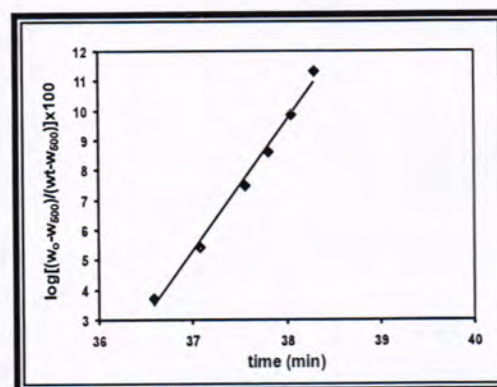
Sample no.(1)



Sample no.(2)

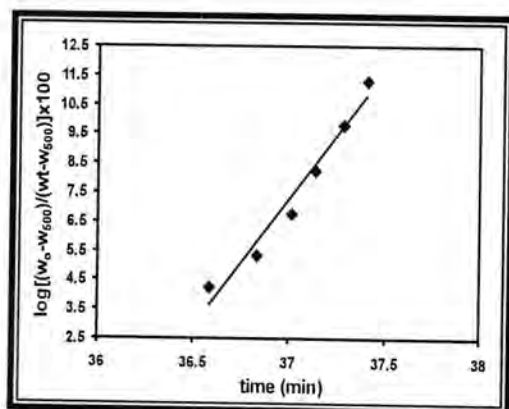


Sample no.(3)

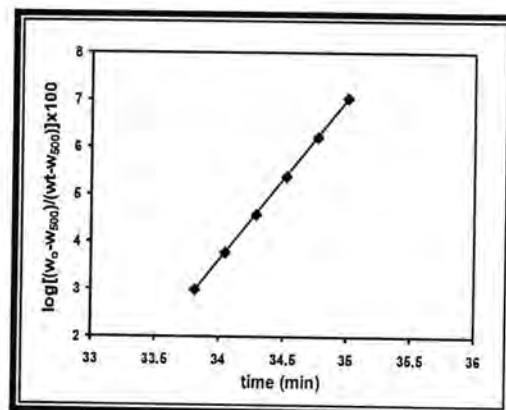


Sample no.(4)

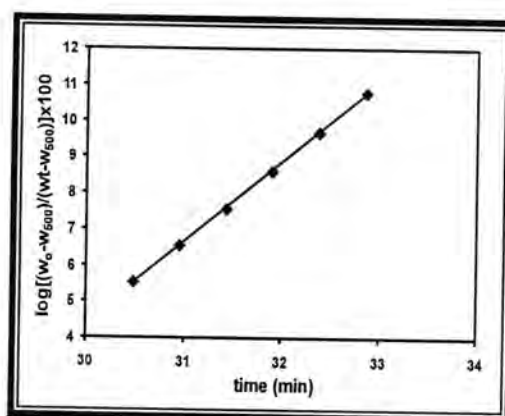
Figure -2: The variation of $\log\left(\frac{w_o - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$ with time t (min) for samples no's 1,2,3 and 4.



Sample no.(5)



Sample no.(6)



Sample no.(7)

Figure -3: The variation of $\log\left(\frac{w_o - w_{500}}{wt - w_{500}}\right) \times 10^2$ with time t (min) for samples nos. 5, 6 and 7

After (t) time and at the end of the experiment (at 500°C), respectively. The linearity of these curves indicates the thermal degradation of all cellulosic samples is of first order reaction.

According to Arrhenius equation, the activation energy (E_a) is calculated for all cellulosic samples. (Table 9) in kcal/mol.

Table -9: The values of the activation energy E_a , the change in enthalpy ΔH , the change in entropy ΔS and the change in free energy ΔG for same cellulosic samples.

Sample no.	ΔE_a (k.Cal.mole ⁻¹)	ΔH (k.Cal.mole ⁻¹)	ΔS (Cal.mole ⁻¹ .deg ⁻¹)	ΔG (k.Cal.mole ⁻¹)
1	32.023	30.987	126.675	-35.626
2	36.628	35.396	124.605	-41.893
3	40.041	38.629	131.636	-41.466
4	43.582	42.364	137.278	-41.786
5	50.689	49.475	148.956	-41.546
6	56.321	55.141	160.767	-40.316
7	17.847	16.740	97.810	-37.745

It is found that the value of activation energy (E_a) is equal to (17.847-56.321) kcal/mole depending on the nature of cellulose, particle size and degree of crystallinity and these values are almost agreed with the authors(12).

Energy is expressed in terms of an entropy and a heat of activation i.e. as ($\Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$), the result is:(17-19)

$$k = \frac{kT}{h} e^{\Delta S^\circ / R} e^{-\Delta H^\circ / RT} \dots\dots\dots(1)$$

For first order reaction the activation energy is related with the change in the heat of activation(20) by the following equation:

$$E_a = \Delta H^\circ + RT \dots\dots\dots(2)$$

Then the rate of reaction may therefore by written as

$$k = \frac{kT}{h} e^{\Delta S^\circ / R} e^{-(E_a - RT) / RT} \dots\dots\dots(3)$$

or

$$k = e \frac{kT}{h} e^{\Delta S^\circ / R} e^{-E_a / RT} \dots\dots\dots(4)$$

From equation 1 to 4 the thermodynamic functions (ΔS°), (ΔH°) and (ΔG°) can be calculated.

Table (9) represents the values of the activation energy (E_a) the enthalpy change (ΔH), the entropy change (ΔS) and the free energy change (ΔG) for all the cellulosic samples.

From Table (9) data we observed that the enthalpy change (ΔH) values are positive for all the used cellulosic samples which means that the thermal degradation of cellulose is endothermic reaction and it is increasing with the increasing of particle size or degree of crystallinity, and the entropy change (ΔS°) values are positive as well and it is increasing with the increasing of particle size or degree of crystallinity of the samples.

Table -10: The variation of change in entropy (ΔS) with the degree of crystallinity and particle size for the Iraqi cotton samples.

Particle size (mm)	$\Delta S \text{ cal.mol}^{-1}.\text{deg}^{-1}$	Degree of crystallinity
0.009-0.063	124.605	88.100
0.063-0.125	131.636	88.510
0.125-0.250	137.274	89.125
0.250-0.500	148.956	90.573
> 0.500	160.767	91.410

The variation of change in entropy (ΔS) with the degree of crystallinity is given in Figure (4). It is clear that the parameter of ordering and disordering structure (ΔS) increases as the degree of crystallinity increases.

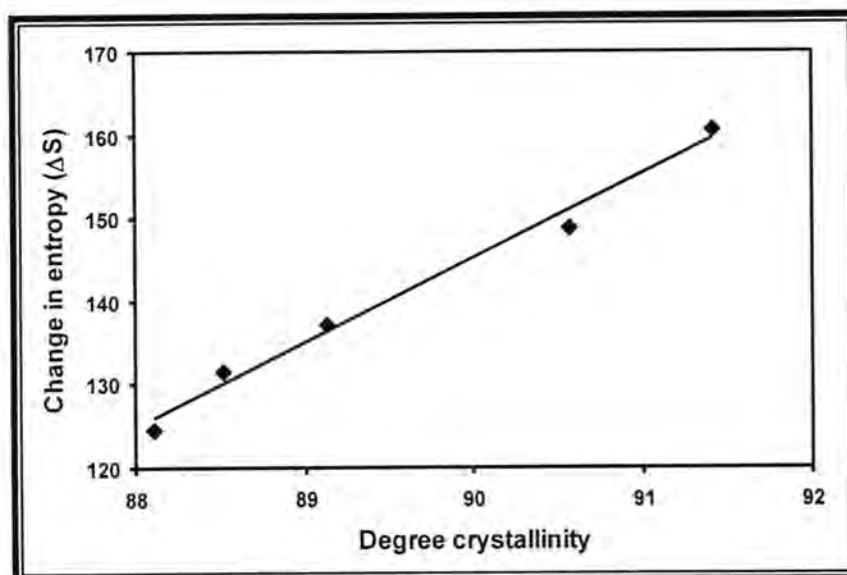


Figure -4: The variation of change in entropy (ΔS) with the degree of crystallinity for Iraqi cotton samples

The difference in the free energy value may be considered as consumed in breaking the crystalline parts of cellulose to more finer ones. The activation energy for the powdered cellulose (sample no.1) and the fine Iraqi cotton (sample no.2) is equal to 32.023 and 36.626 kcal.mol⁻¹, respectively. This difference in the activation energy may be due to the higher purity or the higher percentage of α -cellulose for the sample no.1 than for the sample no.2. The pronounced decrease in the value of the activation energy of the extracted cellulose (sample no.7), 17.847 kcal.mol⁻¹, than any other sample may be attributed to:

- 1- The presence of some lignin compounds which softens cellulose chains.
- 2- The presence of some volatile materials and / or.
- 3- The lower value of the degree of crystallinity than the other samples.

Finally the negative sign of free energy (ΔG) indicates that the free energy of the ash, the final state is lower than that of the initial sample.

REFERENCES

- 1- Nishizaki H. and Wang A.H., "Determination of some kinetic parameters of polymers by thermal decomposition", J. Appl. Polym. Sci., **25**, 2869, (2000).
- 2- Levi D.W. and Lee L., "The thermal degradation of cellulose with some copolymers ", Polym. Eng. Sci., **5**, 135, (1985).
- 3- Reich L. and Levi D.W. "The thermal degradation of the cellulose powder", Makroml. Chem., **66**, 102, (1983).
- 4- Reich L. and Levi D.W., " Dynamic thermogravimetric analysis on polymer degradation" , Macromolecular Reviews, vol.1 (1967).
- 5- Boutros S. and Hanna A.A., "The electrical properties and thermal stability of powder cellulose", J. Polym. Sci., **16**, 89, (1997).
- 6- Boutros S. and Hanna A.A., "Determination the dielectric constant of some cellulosic materials", J. Polym. Sci., **16**, 1113, (1998).
- 7- Shinouda H.G. and Hana A.A., "The electrical properties of some cellulosic materials", J. Appl. Polym. Sci., **21**, 1179, (1998).
- 8- Hana A.A., Ibrahim A.A. and Heikal S.O., "Thermogravimetric analysis of cellulose and some cellulosic materials", J. Polym. Sci., **18**, 1425, (1998).
- 9- Shinouda H.G. and Hanna A.A., "Grafting of some monomers onto some cellulosic materials", Cellulose Chem. Technol., **9**, 317, (1999).

- 10- Hanna A.A. and Boutros S., "The electrical properties of the copolymer of cellulosic materials", *J. Polym. Sci.*, **18**, 115, (2000).
- 11- Shafizadeh F. and Bradbury G.W., "The thermal degradation of cellulose with some copolymers", *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 1431, (1999).
- 12- Chatterjee P.K., "The thermal degradation of cellulose", *J. Polym. Sci.*, **6**, 3217, (1988).
- 13- Phillip H.J. and Nelson M.L., "Determination the degree of crystallinity by using hydrolysis technique", *Text Res. J.*, **17**, 585, (1937).
- 14- Rabek J.F., "Experimental methods in polymer chem.", John Wiley, New York, 54, (1980).
- 15- Freeman E.S. and Carroll B., "Determination the activation energy of some copolymers", *J. Phys. Chem.*, **62**, 394, (1958).
- 16- Anderson D.A. and Freeman E.S., "The relation between the thermodynamic functions and the degree of crystallinity of some copolymers", *J. Polymer Sci.*, **54**, 253, (1961).
- 17- Anderson H.G., "Calculation the order of degradation , the specific rate constant and the thermodynamic properties of some cellulosic materials", *J. Polym. Sci.*, **B.2**, 115, (1978).
- 18- Pacault A. and Souret G., "Synthesis and characterization of copolymerization between cellulose and vinyl chloride", *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **216**, 608, (1985).
- 19- Fung D.P.G., "The thermogravimetric analysis of some cellulosic copolymers", *Tappi*, **52**, 319, (1989).
- 20- Wynue W.F.K. et. al., "Determination the thermodynamic functions of some copolymer with cellulose", *J. Chem. Phys.*, **3**, 492, (1955).

Modification Approach Method for RC4 Using 2D Wavelet Transform

Hala B. Abdul Wahab and Maisaa A. Khodher
Computer Science Department, University of Technology

Received 9/6/2009 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

في السنوات القليلة الماضية أمنية البيانات أخذت بأعادة تطوير لمواكبة التكنولوجيا الحديثة والتطبيقات الجديدة والتي جلبت معها تهديدات جديدة، مما أدى الى العمل على طرح جديد للأمنية وميكانيكية جديدة. واحدة من المشاكل التي تعاني منها الانظمة الامنية هي كبر حجم البيانات المراد نقلها عبر شبكات الاتصالات او الانترنت وبدون فقدان المعلومات العامة وكذلك الحفاظ على الخصوصية والسرية . هذا البحث يطرح طريقة تعمل على دمج مابين خوارزميات التشفير وخوارزميات ضغط البيانات للوصول الى خوارزمية جديدة تعمل على تقليص حجم الصورة الى المستوى الثالث وتشفيرها بشكل يحافظ على سرية المعلومات . ان النتائج التي تم الحصول عليها في الخوارزمية المقترحة تم اختبارها وقد اجتازت كافة الفحوصات الشائعة وكانت النتائج مقبولة.

ABSTRACT

Every few years, computer security has to reinvent itself. New technologies and new application bring new threats, and force us to invent new protection mechanisms. One of the problems of the security systems is the increase the information that wanted to transfer without loss any information and keep the information with secrecy manner in this paper produce new approach aim to combine between two direction, cryptography algorithm and compression algorithm to reach to a new algorithm increase the secrecies with reduced the size of information from the selected image in three level according to the compression algorithm that selected in this paper, without loss any important information, the proposed algorithm.

Result is passing all popular tests and the result give accepted result.

INTRODUCTION

Partial encryption enables information of different levels of security and / or destined for different uses to be encrypted into the same ciphertext. This property has many applications. It is known that an image can be considered as a combination of correlated and uncorrelated data as well as most of the perceptual information are present in the correlated data rather than the uncorrelated data. Hence, the amount of residual intelligence present in an encrypted image depends on the correlated data. It is, therefore, sufficient to encrypt the correlated data instead of encrypting the entire image in order to speed up the entire operation. From the perception point of view, the most significant bit (MSB) planes have high adjacent correlation between the pixels whereas the least significant bit (LSB) planes contain comparatively more uncorrelated data. PRS with simple hardware like *m*-sequences and Gold sequences have less correlation between the adjacent bits.

Image Compression

Image compression is the application of Data compression on digital images. In effect, the objective is to reduce redundancy of the image data in order to be able to store or transmit data in an efficient form. Image compression can be lossy or lossless. Lossless compression is sometimes preferred for artificial images such as technical drawings, icons or comics. This is because lossy compression methods, especially when used at low bit rates, introduce compression artifacts. Lossless compression methods may also be preferred for high value content, such as medical imagery or image scans made for archival purposes [3].

Cryptography

Cryptography is the study of mathematical techniques related to aspects of information security such as confidentiality, data integrity, entity authentication, and data origin authentication [6].

Cryptographic systems are characterized along three independent dimensions: [1,2]

- 1- The type of operations used for transforming plaintext to ciphertext. All encryption algorithms are based on two general principles: substitution, in which each element in the plaintext (bit, letter, group of bits or letters) is mapped into another element, and transposition, in which elements in the plaintext are rearranged.
1. The number of keys used. If both sender and receiver use the same key, the system is referred to as symmetric, single-key, secret-key, or conventional encryption.
2. The way in which the plaintext is processed. A block cipher processes the input one block of elements at a time, producing an output block for each input block.

Wavelet Transform 2D

Human visual perception is known to function at multiple scales. Wavelet transforms were developed for the analysis of multiscale image structures.

Unlike traditional transform domain methods, such as the Fourier transform, wavelet-based methods not only dissect signals into their component frequencies but also enable the analysis of the component frequencies across different scales. As a result these methods are more suitable for such applications as image data compression, noise reduction, and edge detection [4].

Wavelet-Based Image Compression

There are two type of image compression: lossless and lossy. With losses compression, the original image is recovered exactly after decompression. Unfortunately, with images of natural scenes it is rarely possible to obtain error-free compression at a rate beyond 2:1. Much higher compression ratios can be obtained if some error, which is usually difficult to perceive, is allowed between the decompressed image and the original image. This is lossy compression. In many cases, it is not necessary or even desirable that there be error-free reproduction of the original image [4].

Lossy Compression

This paper on the following methods of losses compression: DWT (Discrete Wavelet Transform).

Quantizing refers to a reduction of the precision of the floating point values of the wavelet transform, which are typically either 16 or 32 or 64 bit floating point numbers [5].

To use less bits in the compressed transform which is necessary if compression 8bpp or 12bpp images is to be achieved these transform values must be expressed with less bits for each values. This leads to rounding error. These approximate, quantized, wavelet transforms will produce approximation to the images when an inverse transform is performed. Thus creating the error inherent in lossy compressed see image compressed in figure (1) and image decompressed in figure (2) [5].

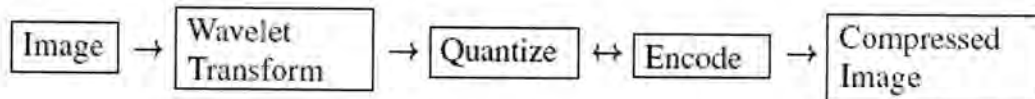


Figure -1:Compressed of Image

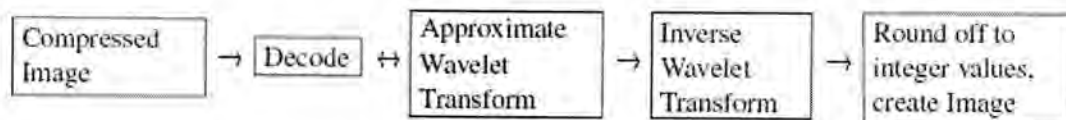


Figure-2:Decompressed of Image

Wavelet Thresholding

The application of wavelet-based methods to image enhancement has been studied extensively. A widely used technique known as wavelet thresholding performs enhancement through the manipulation of wavelet transform coefficients so that object signals are boosted while noise is suppressed. Wavelet transform coefficients are modified using a

nonlinear mapping. Hard-Thresholding and soft- thresholding functions are representative of such nonlinear mapping functions[4].

$$\Phi(X) = \begin{cases} X - T & \text{if } X > T \\ X + T & \text{if } X < -T \\ 0 & \text{if } |X| \leq T \end{cases} \quad (1)$$

Small coefficients (below thresholding T or above $-T$) normally corresponding to noise and are reduced to a value near zero. Usually, the thresholding operation of equation (1) is performed in the orthogonal or biorthogonal wavelet transform domain [4].

In the following shown complete example to compress on image size(0-255) and type (BMP), shown in figure(3).

1	2	5	8	17	24	25	32
3	4	6	7	18	23	26	31
9	10	13	14	19	22	27	30
12	11	15	16	20	21	28	29
33	34	35	36	49	50	54	55
40	39	38	37	51	53	56	61
41	42	43	44	52	57	60	62
48	47	46	45	58	59	63	64
1	2	5	8	17	24	25	32
3	4	6	7	18	23	26	31
9	10	13	14	19	22	27	30
12	11	15	16	20	21	28	29
33	34	35	36	49	50	54	55
40	39	38	37	51	53	56	61
41	42	43	44	52	57	60	62
48	47	46	45	58	59	63	64

16 Parts of Images (2-level) 32 Parts of Images (3- level)

Figure -3:

Residual Intelligibility and Regularity of Digital image:

When ciphering systems are constructed, there must be some techniques to show the amount of *residual intelligibility* in ciphered images, and the quality of the reconstructed images. The noise (chaotic) with low *residual intelligibility* and low quality, on other side the reconstructed (deciphered) image, must give high intelligibility and high quality with high level of regularity[7].

Objective Fidelity Criteria

The objective fidelity criteria provide equations that can be used to measure the amount of error in the reconstructed (deciphered) images or to measure the amount of error between pure image and ciphered image.

Commonly used objective measures are the Root-Mean-Square error (*MSE*), Signal-to-Noise Ratio (*SNR*) and the Peak Signal-to-Noise Ratio (*PSNR*) [8].

step1: (The Mean Square Error (*MSE*)).

The *MSE* is the average of the square of errors (pixel differences) of the two images, it is found by taking the square root ("root") of the error squared ("square") divided by the total number of pixels in the image ("mean") [10]:

$$MSE = \frac{1}{H * W} \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (f(x, y) - f'(x, y))^2$$

The Root Mean Square error (*RMSE*) is defined as the square root of the *Step2: (PMSR)*

$$RMSE = \left[\frac{1}{H * W} \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (f(x, y) - f'(x, y))^2 \right]^{1/2}$$

Hence, the smaller the value of *MSE*, the better the deciphered image represents the original image and the large value of error. The better the ciphered image conceal pure image information.

Step2: (Signal to Noise Ratio).

It is fidelity parameter used to measure the distortion level caused by image cryptography can define as.

$$SNR = \frac{\sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (f(x, y))^2}{\sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (f(x, y) - f'(x, y))^2}$$

And

Peak Signal to Noise Ratio (*PSNR*) can be defined as [9]:

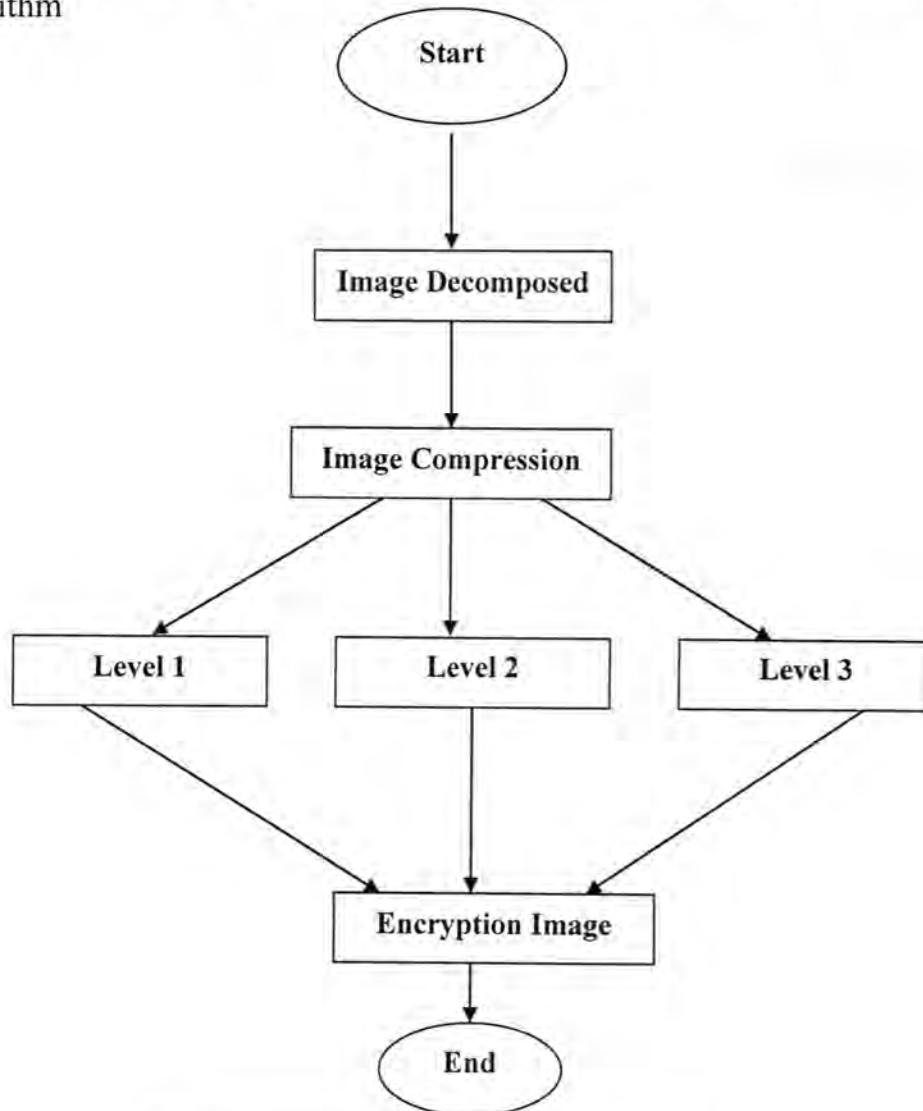
Step3:(PSNR)

$$PSNR = 10 \log_{10} \left(\frac{(255)^2}{MSE} \right)$$

where MSE is the mean square error.

In image cryptography, the large value of PSNR implies a better-deciphered image, and smaller number implies better image concealment of original image is obtained.

In down the block diagram that explain the main idea for to proposed algorithm



[Parameter of Algorithm]

A: parameter of original image.
 B: parameter of image four parts.
 C: parameter of image sixteen parts.
 D: parameter of image thirty-two Parts.
 Temp: parameter of swap.
 SFC: parameter of array.
 Ars: parameter of array.

Proposed New Approach Method for RC4 Using 2D Wavelet Transform :

In this research the photographs of the type (Bit Map Picture) and the pressure of the image to fragmentation manner Wavelet transform 2D into four parts and then take the picture in the first level LL1 as in Figure (5) that shown any part of the upper left of the original image.

{The first part in pushing the image at the first level LL1 and the sixteen to divide any part of the picture in the second level LL2 as in Figure (6) and then apply the RC4 encryption algorithm on the image}.

Process: (level one)

Input: compression Image, key (RC4 algorithm).

Output: Cipher Image.

Step1: Initial

A= Load original picture.

B= Compressed picture to decomposed with four parts (LL1).

C= Compressed picture to decomposed with sixteen parts (LL2).

D= Compressed picture to decomposed with thirty-two parts (LL3).

Step2: Encryption Process Level two:

For x= 0 to Ni2-1

For j= 0 to Nj2-1

Ars (y) = far2(x, y)

Step3: Applied the key on the picture in RC4 algorithm:

j=0

For i= 0 to Nj2-1

j=Abs ((j+Ars (i)+(i modlen(txtkey.Text))))modNj-1)

Step4: Swap in RC4 algorithm:

Temp= Ars (i)

Ars (i) = Ars (j)

Ars (j) = Temp

For y = 0 to Nj2-1

Sf(x, y) = Ars (y)

Step5: Result (Put the result of encrypted picture in E).

{In the second part, press the image at the second level LL2 and divide into thirty-two any part of the picture in the third level LL3 as in Figure (7) and also apply the RC4 encryption algorithm and this algorithm has been explained in detail above, where the image is encrypted based on

the length of the key used to encrypt the image and the key system used to be binary number $(0,1)\}$.

Step6: initial {the same A, B, C, D picture}

Step7: Encryption Process Level three:

For $x=0$ to N_i-1
 For $j=0$ to N_j-1
 $Ars(y) = far(x, y)$

Step8: Applied the key on the picture in RC4 algorithm:

$j=0$
 For $i=0$ to N_j-1
 $j = Abs((j + Ars(i) + (i \bmod len(txtkey.Text))) \bmod N_j - 1)$

Step9: Swap in RC4 algorithm:

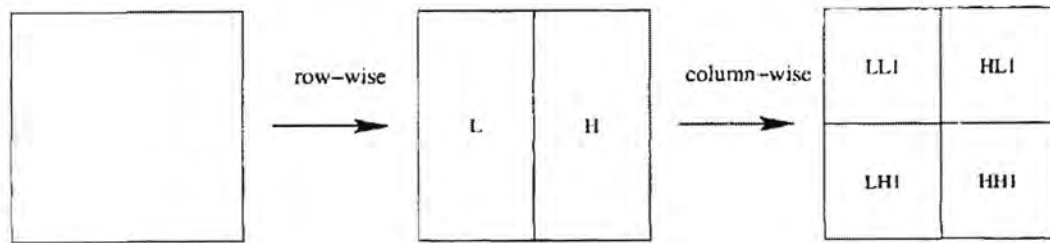
$Temp = Ars(i)$
 $Ars(i) = Ars(j)$
 $Ars(j) = Temp$
 For $y=0$ to N_j-1
 $Sf(x, y) = Ars(y)$

Step10: Result (Put the result of encrypted picture in F).
 End.

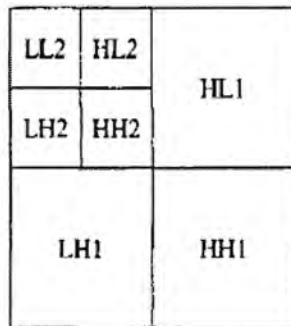
As the image increases as the encryption key length in the second level and third level LL2 and LL3 Encryption and more to the picture when it is sent over the Internet landscape is not lost because it is compressed based on partial encryption when it is sent over the Internet and network possible for the recipient to open the code and get the picture.

The more compact than the picture whenever the encryption process faster and less time in the process of sending the picture through the networks.

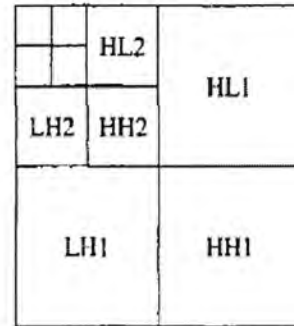
In the following figure (4-a, b, c) shown the block diagram for decomposed three level.



(a)



(b)



(c)

Figure-4:(a) First Level Decomposed , (b) Two Level Decomposed (c) Three Level Decomposed

Implementation:

In this section executed the proposed algorithm and the selected image is size (255) and shown in the result of the selected image in three levels.

In the following shown in figures (5, 6,7) the executed the algorithm.

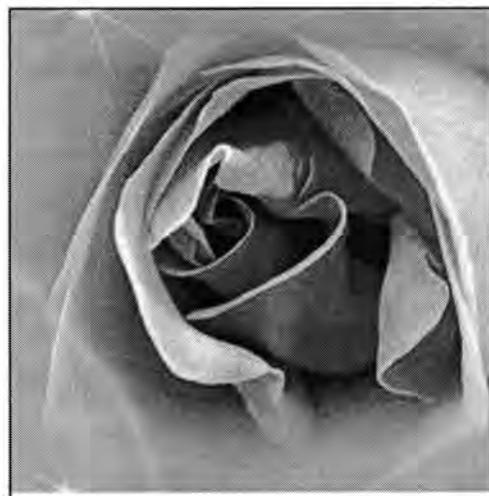


Image original

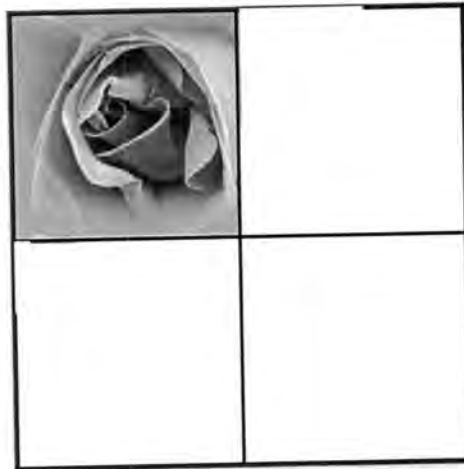


Figure -5: Image Four parts first Level

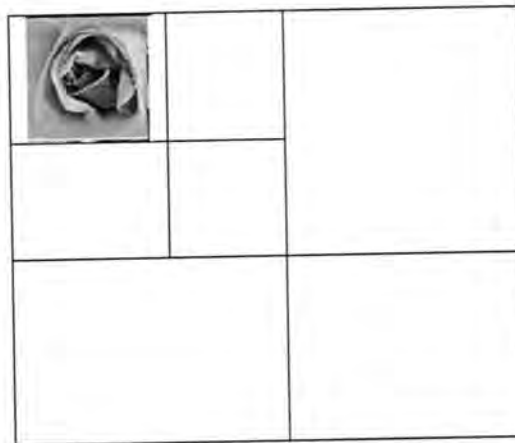


Figure -6: Image Sixteen parts second Level

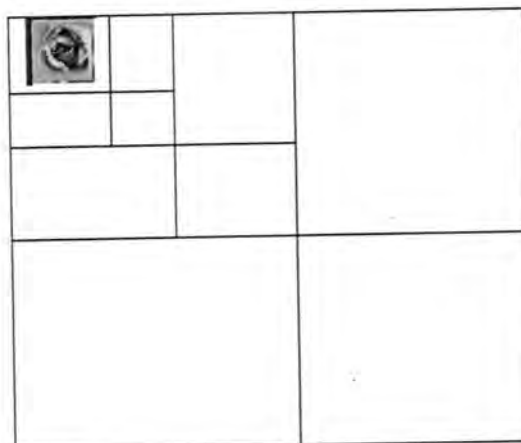


Figure -7: Image Thirty –two parts three Levels



Image Four part



Image sixteen part



Image thirty-two

Test the results:

In this section execute two more tests the cipher image, shown in figure (8) and figure (9).

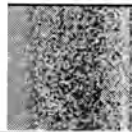
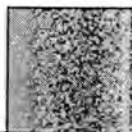
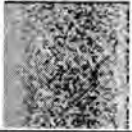
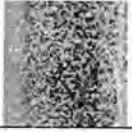
Length of Key	Level	Encrypted picture
One byte	2	
Two byte	2	
Three byte	2	
Four byte	2	
Five byte	2	
Six byte	2	

Figure -8: Test one

According from the result that obtained form encryption process for the image show that when increase the key length size reach to image with good cipher that cancel all the information.

Length of Key	Level	Encrypted picture
One byte	3	
Two byte	3	
Three byte	3	
Four byte	3	
Five byte	3	
Six byte	3	

Figure -9: Test two

According to the measurement test illustrated that in section (6) implementation the measure on the cipher image.

In the following shown the result for test on all image with three levels in table (1)

Table-1:

Image cipher	MAE			MSE			RMSE			PSNR			SNR		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B
1 B LL2	1.6402366	0.527337	0.567337	5305.794566	56651.06553	1199.452511	72.84385	76.60397	34.633113	2.921866	2.771864	5	6.101560	5.547700	8.371344
2 B LL2	1.6402366	3.274062	0.740562	5305.794566	63221.28063	1176.710639	72.84385	79.51181	34.332364	2.921866	2.663124	5	6.101560	5.343775	8.452341
3 B LL2	-11.15975	-6.71641	1.296873	5255.46991	62569.61124	1552.167727	92.349715	90.66762	39.397569	2.2443097	2.268133	5	3.712783	3.866638	7.233072
4 B LL2	-13.07023	-7.96795	2.056595	5387.322409	5728.39966	1511.138621	91.43069	90.71804	38.573382	2.2701700	2.292791	5	3.795629	3.871159	7.249417
5 B LL2	-14.67207	-11.7036	0.567596	7941.34567	7970.905791	1164.417693	99.114244	98.71812	34.123605	2.241566	2.263823	5	3.929150	4.001192	5.466099
6 B LL2	-13.63452	-12.3969	-0.95349	7657.25397	7522.22885	1120.365476	87.505731	86.73063	33.472704	2.2615360	2.416636	5	4.117363	4.197968	5.633501
1 B LL3	7.944489	9.342040	1*2.362*1	7113.694680	7925.481658	3820.224487	84.342721	89.04202	61.907964	2.494707	2.343795	3	4.542803	4.438934	5.034862
2 B LL3	11.691270	7.960793	3.727777	6357.43480	6702.09533	1261.063952	79.735219	81.56633	38.519065	2.656071	2.579235	5	5.340165	4.692629	7.313609
3 B LL3	7.905642	0.951365	-3.405179	5494.76537	7518.51135	2345.395620	92.100219	88.04429	45.460250	2.246613	2.237484	4	4.056066	4.060373	4.609009
4 B LL3	-0.993243	-0.38060	-3.433934	5587.75321	6313.26830	2356.75681	94.115637	91.17762	45.567034	2.183275	2.27896	4	3.911709	3.793957	4.626081
5 B LL3	-0.883645	6.509248	6.0753911	5395.760226	7372.56037	1338.291722	81.647550	85.56362	35.1839431	2.2650775	2.444556	5	4.121660	4.314219	7.485401
6 B LL3	-0.704125	-0.42534	2.753200	9566.438063	6137.369760	1775.229711	99.338895	90.20737	42.1334749	2.0602944	2.308144	4	3.422230	3.855662	5.917119

According to the result in table (1)

From the results of the measures that were used to test the ciphered images, we can obtain the following:-

- 1- The large results of MSE means the proposed algorithm is succeeded to conceal pure image information (i.e. there are large errors in ciphered image caused by the use of the proposed algorithm.).
- 2- The small results of SNR and PSNR means the proposed algorithm caused large noise (i.e. small, a result implies better image concealment of original image.).

In this research can be detected three conclusions:

- 2- Image Encryption plays an important role in the image sent through the local and international networks in order to maintain the structure of the picture, especially when the image is compressed where the encryption part of the picture.
- 3- Image has been way RC4 encryption to maintain the structure of the image and based on the length of the key to this method as the key length increases as becoming stronger as the compressed image encryption possible and return to the original image when received.
- 4- Without loss any information according to the results from the tests.

REFERENCES

- 1- William Stalling, "Cryptography and network Security Principles and Practices" Four Edition (2005).
- 2- Schaefer E. D., "An introduction to Gryptography", Santa Clara University(1999).
- 3- David Salomon, "Data Compression", Third edition.
- 4- Qiang wu, Fatima Merchant, Kenneth R. Catleman, (2008) "Microscope Image Processing"(2004).
- 5- Ed. K. R. Rao and P. C. Yip. , "The Transform and Data Compression Handbook", Boca Raton, CRC Press LLC(2001).
- 6- Schneir B., (1997). "Applied Cryptography", Second Edition.
- 7- Raghad Z. Y. Al-Macdici and Dr.Muzhir S. M. Al-Ani, "Modified Large-Sca Randomization Key-Stream Generator fo Digital Image Encryption"", Second National Conference on Computer, Communication and Control Engineering(2001).
- 8- Scotte E. U., "Computer Vision and Image Processing :Practical Approach Using CVIp Tools", Prentice-Hall ,Inc(1998).
- 9- Ayad A. Salam. "Visual Partial Encryption Using Wavelet and Clock-Controlled Random Algorithm", PhD. Thesis, Ministry of Higher Education and Scientific Research in Computer Sciences(2005).
- 10- Ikhlas Khalaf Alsaadi, "Lossless Wavelet Based Image ComparessionWith Hybird 2D Decomposition", M.Sc. Thesis, University of Technology at Computer Science(2005).

Study the Effect of Thickness on Optical Properties of Sb_2O_3 Thin Films

Ali H. Abed¹, Ehssan S. Hassan², Nihaya M. Theeb³

^{1,2}Physics Department, College of Science, Al-Mustansiriya University

³Foundation of technical Education, Technical College –Baghdad

Received 19/4/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

تم ترسيب الأغشية الرقيقة من ثلاثي اوكسيد الانتيمون على قواعد زجاجية لتحضير اغشية رقيقة مختلفة السمك 250-400-500 نانومتر باستعمال تقنية التبخير الحراري في الفراغ حيث تم دراسة تأثير سمك الاغشية على الخصائص البصرية. ان المعلمات البصرية التي تم دراستها تتضمن النفوذية /الامتصاصية /فجوة الطاقة البصرية /الانعكاسية /معامل الانكسار / معامل الخمود/التوصيلية البصرية /ثابت العزل المعقد مع سمك الغشاء. ان معامل الامتصاص و فجوة الطاقة للأغشية الرقيقة في منطقة الامتصاص الاساسية تم ايجادها باستخدام قيم النفوذية المقاسة ضمن مدى من الاطوال الموجية تتراوح بين 300-1100 نانومتر. لقد وجد ان كل من النفوذية، الامتصاصية وفجوة الطاقة البصرية تعتمد بشكل ملحوظ على سمك الاغشية. ان فجوة الطاقة تقل قيمتها من 3.75-3.59 اليكترون فولت عند زيادة سمك الغشاء من 250 الى 500 نانومتر. ان طيف النفاذية للغشاء الرقيق ذو السمك 250 نانومتر يوضح بان الغشاء يمتلك شفافية عالية حيث ان النفاذية اكبر من 85% في منطقة الطيف المرئي وتحت الحمراء. اما لنفاذية للغشاء السميك ذو السمك 500نانومتر تقل الى 60%.

ABSTRACT

Thin films of antimony trioxide (Sb_2O_3) with different thickness ($t=250, 400$ and 500 nm) were deposited onto glass substrates by thermal evaporation technique. The effect of films thickness on optical properties were investigated. The optical parameters investigated include transmittance / absorbance / reflectance spectra, band gap, refractive index, extinction coefficient, optical conductivity, complex dielectric constant versus thickness. It was found that the optical parameters depend markedly on the film thickness. The spectral absorption coefficient and optical band gap energy of films at the fundamental absorption region were determined using the spectral data of transmittance measurements in the wavelength range 300-1100 nm. It was found that the optical band gap decreases from 3.75 to 3.59 eV when the films thickness increase from 250 nm to 500 nm. The transmittance spectrum corresponding of thinner film ($t=250$ nm) demonstrates that the film was highly transparent (transmittance $>85\%$) in the visible and near infrared regions. The transmittance of the thicker film (500 nm) decreases to 60%.

INTRODUCTION

The V–VI semiconductors, antimony trioxide (Sb_2O_3), is particularly interesting because of its large and direct band gap located in the near ultraviolet region [1,2]. Thin films of this material exhibit many attractive optical properties including excellent transmission at visible, infrared region and wonderful absorbance in ultraviolet region [14]. Data on optical constants of thin semiconductors Sb_2O_3 films are necessary for design and development of thin-film devices for different high power laser and interferometric applications. they are used in various fields including laser visible diodes, coatings, solar cells, IR detectors and ultraviolet filters [3,4]. This paper is focused on the

analysis of optical properties of Sb_2O_3 thin films prepared by thermal vacuum evaporation technique, with different thickness.

MATERIALS AND METHODS

Thin films of antimony trioxide (Sb_2O_3) were deposited on glass substrates by thermal evaporation under vacuum ($p = 1 \times 10^{-5}$ Torr) of high purity Sb_2O_3 powder, (99.99 % from Merck), . The evaporation source, consisting from Molybdenum boat was mounted about 9 cm below the substrate holder assembly. The substrate temperature (T_s) during film deposition was maintained constant (300 K). The deposition rate was maintained constant about 20 Å/s. The thickness of the films(t) measured with an Optical interference (Tolansky's method): ranged between 250 nm and 500 nm. For the study of the optical properties, the transmittance (T), at 300 K, was recorded in the wavelength range 200–1120nm using double beam spectrophotometer (Hitachi U-2001 UV/VIS). The absorbance (A) and absorption coefficient (α) were determined by using the relations,

$$A = \text{Log} (I_0/I) = \text{Log} (1/T) \dots \dots \dots (1)$$

$$\alpha = 2.303 (A/t) \dots \dots \dots (2)$$

Where I_0 and I are the intensity of incident and transmittance of radiation respectively and (t) the film thickness[5].

RESULTS AND DISCUSSION

The transmittance spectra of trioxide antimony (Sb_2O_3) thin films with different thickness(250, 400 and 500 nm), which recorded in wavelength range of 300-1100 nm, are shown in Figure 1.

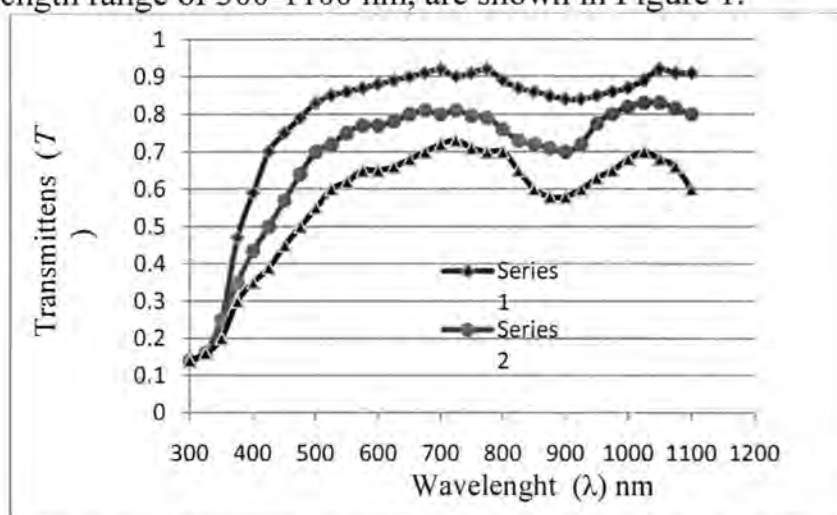


Figure -1: Variation of transmittance (T) with wavelength(λ). Series 1, 2, and 3 represent 250, 400, and 500 (nm) thickness respectively.

The transmittance spectrum corresponding of thinner film ($t=250$ nm) demonstrates that the film was highly transparent(transmittance ranged between 85 to 92%) in the visible and near infrared region. The transmittance of the thicker film (500 nm) decreases to 60%.This is because of the reason that in case of thicker films more atoms are present in the film so more states will be available for the photons to be absorbed [6]. The appearance of the maxima and minima is due to the interference effect from the substrate-film and film-air interferences[2]. It is also observed in Figure 1 that the transmittance curves move toward lower values of wavelength by decreasing the film thickness, which indicating that the reduction of the film thickness leads to an increase of the optical band gap, E_g [7] .

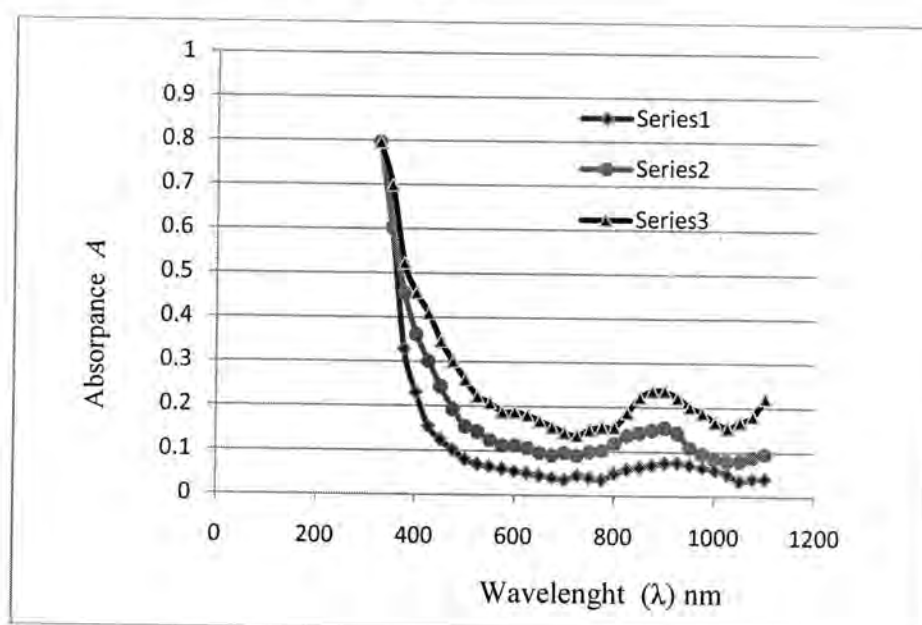


Figure-2: Variation of absorbance (A) with wavelength (λ). Series 1, 2 and 3 represent 250,400, and 500(nm) thickness respectively.

The over all transmittance of the films decreases with the film thickness in the visible and infrared region. The absorbance spectra of the thin films of Sb_2O_3 , having different thickness, are shown in Figure 2. These spectra reveal that films grown under the same parametric conditions have low absorbance in the visible and infrared regions. However, absorbance in the ultraviolet region is high. The over all absorbance of the films increases with the film thickness in the visible and infrared region.

In the domain of the fundamental absorption edge, the absorption coefficient (α) for allowed direct transition has been given by the expression

$$\alpha \cdot (h\nu) = B(h\nu - E_g)^{1/2} \quad \dots\dots\dots(3),$$

where B is a constant which is related to the effective masses associated with the bands and depends on the transmission probability, E_g is the band gap energy and $(h\nu)$ the photon energy[8].

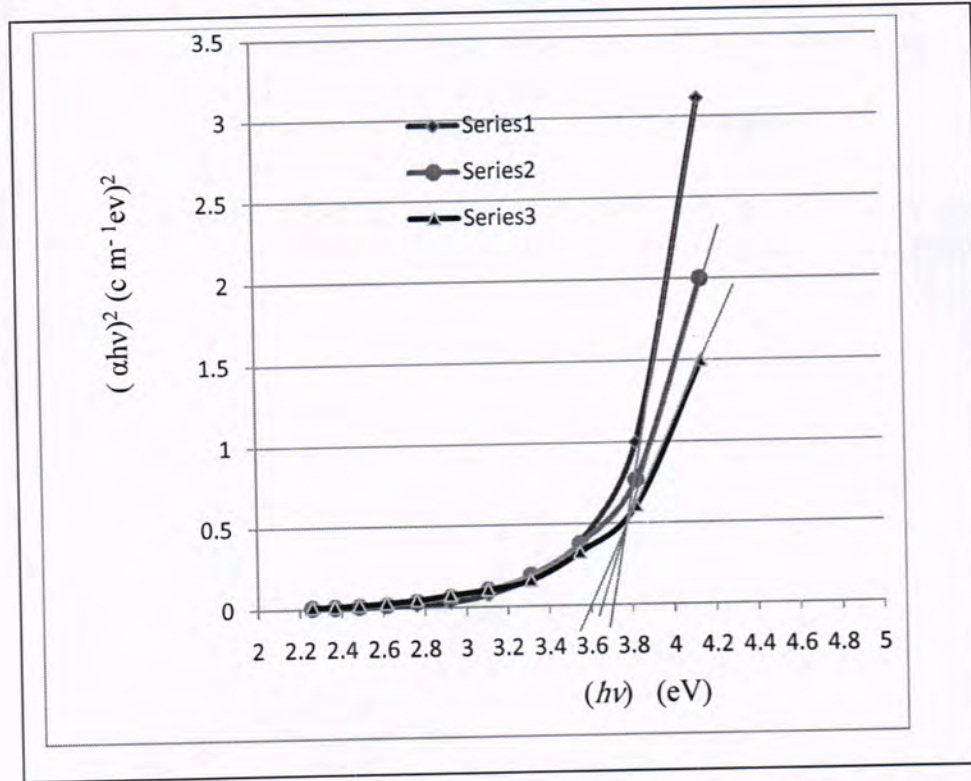


Figure -3: the variation of $(\alpha h\nu)^2$ with photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

According to equation (3), in vicinity of fundamental absorption edge, the dependence of $(\alpha h\nu)^2 = f(h\nu)$ is linear[9]. Figure (3) shows this dependence for three of studied samples. The values of energy gap (E_g) can be determined by extrapolating the linear portions of the respective curves to $(\alpha h\nu)^2 = 0$. These values of the energy gap, which have been determined for films, are 3.70, 3.65 and 3.59 eV for 250, 400, and 500 nm thickness respectively. These values are in a good agreement with values reported by N. Tigaua [1]. The energy gap is decreases with increasing of film thickness [9]. There is the possibility of structural defects and unintentional impurities in the films due to their preparation at 300 K; this could give rise to the allowed states near the conduction band in the forbidden region. In case of thicker films these allowed states could well merge with the conduction band resulting in the reduction of the band gap[10].

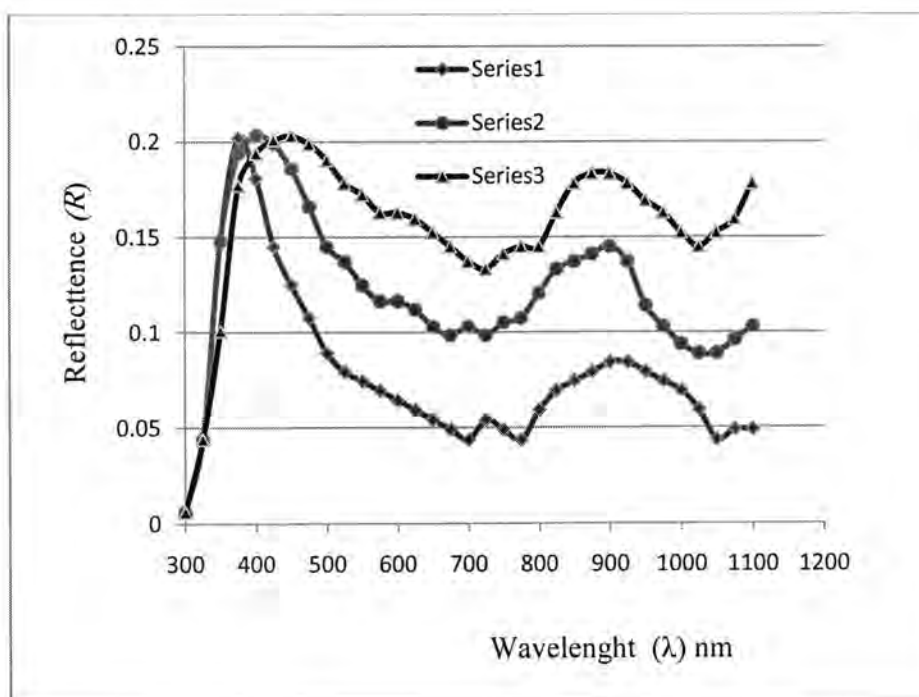


Figure (4) Variation of absorbance (A) with wavelength (λ). Series 1, 2 and 3 represent 250,400, and 500(nm) thickness respectively

Figure 4 shows the optical reflectance spectra for Sb_2O_3 thin films. The reflectance has been found by using the relationship,
 $R + T + A = 1$ (4).

where R is the normal reflectance. The reflectance of Sb_2O_3 thin films is low in the near infrared and visible region. This is can be attributed to the low absorbance in the visible and infrared region. The over all reflectance of the films increases with the film thickness in the visible and infrared region. The reflectance spectra of the films are show the usual interference pattern in the reflectance spectra. For normal reflectance [11], we have,

$$R = (n - 1)^2 / (n + 1)^2 \text{(5).}$$

where R is the normal reflectance; using the above relation the refractive index n was determined.

Figure 5 shows the variations in the refractive index with the incident photon energy. The increase in the film thickness results in the over all increase in the refractive index in the visible and infrared regions.

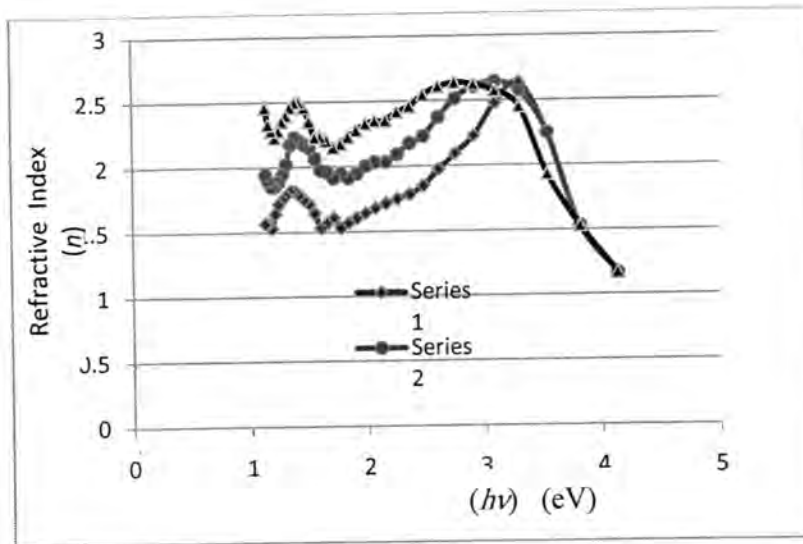


Figure -5: The variation of refractive index with incident photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

This increase is due to the over all increase in the reflectance with the film thickness in that regions. The peak value of the refractive index for the Sb_2O_3 thin films of various thickness vary in the range of 1.5 to 2.5. These values are in a good agreement with values reported by N. Tigaua [14].

The extinction coefficient k could be found using the relation [11],

$$k = \alpha \lambda / 4\pi \quad \dots\dots\dots(6),$$

where λ is the wavelength.

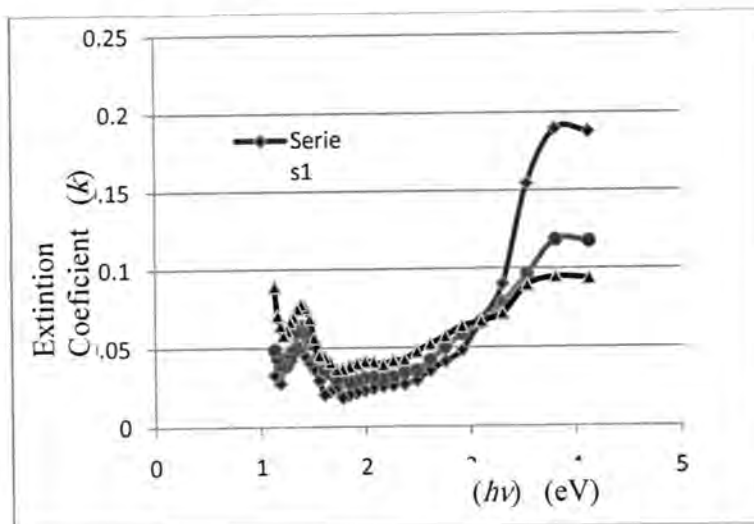


Figure 6. The variation of extinction coefficient with incident photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

Variations of extinction coefficient as a function of photon energy are shown in figure 6. The rise and fall in the extinction coefficient is due to the variation in the absorbance with photon energy. In the case of polycrystalline films, extra absorption of light occurs at the grain boundaries. This leads to non-zero value of k for photon energies smaller than the fundamental absorption edge, [15].

The optical conductivity was determined using the relation,

$$\sigma = anc \dots\dots\dots(7)$$

where c is the velocity of light [12]. Figure 7 shows the variation of optical conductivity with the incident photon energy. The enhanced optical conductivity at high photon energies is due to the high absorbance of the films in that region.

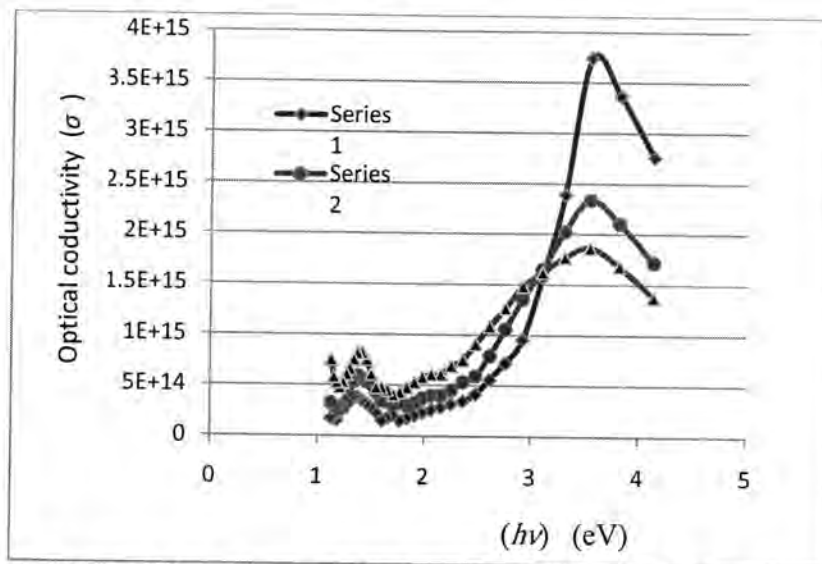


Figure -7: The variation of optical Conductivity with incident photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

The real and imaginary parts of the dielectric constant were determined using the relation $\epsilon_c = \epsilon_r + \epsilon_i = (n + ik)^2 \dots\dots\dots(8)$, where ϵ_r is the real part and is the normal dielectric constant, ϵ_i is the imaginary part and represents the absorption associated with radiation by free carrier [13].

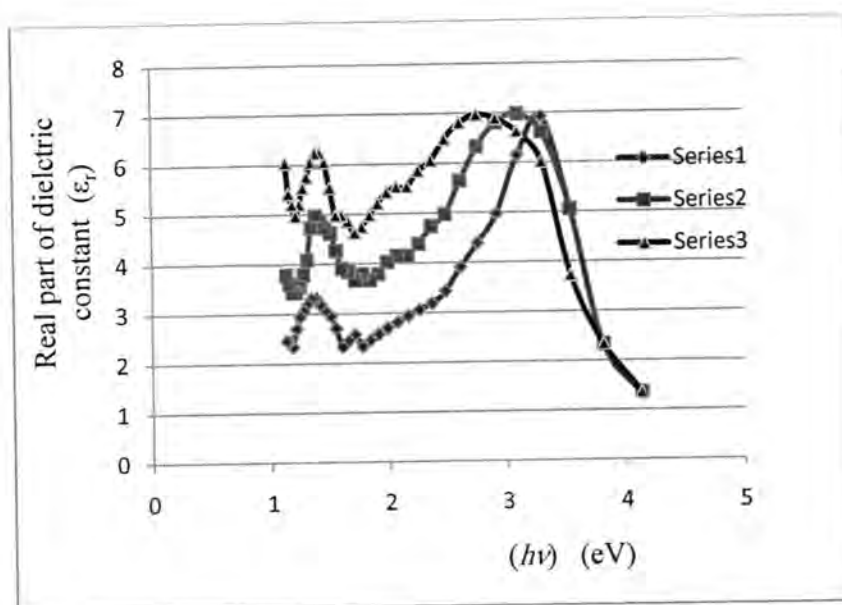


Figure -8: The variation of real part of the dielectric constant with incident photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

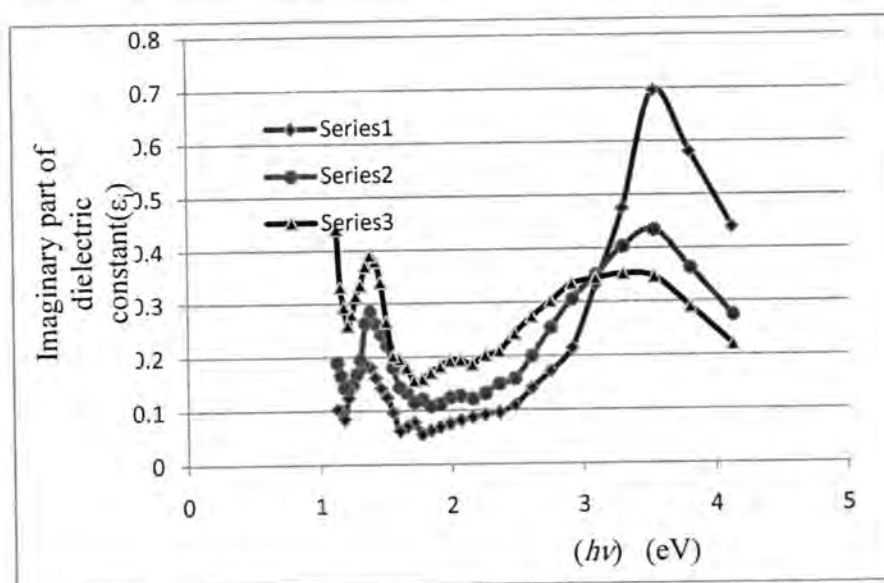


Figure -9: The variation of imaginary part of the dielectric constant with incident photon energy. Series (1),(2) and (3) represent 250, 400 and 500 nm thickness respectively.

Figures 8 and 9 show the variations in the real and imaginary parts of the dielectric constant with the incident photon energy. These variations are found to be oscillatory in nature, depending upon the thickness of the films. The peak values of real dielectric constant for the films of different thicknesses vary in the range of 2.5 to 6.2 in the visible and infrared region. The imaginary part confirms the free carriers contribution to the absorption.

The transmission spectra are strongly influenced by deposition conditions, It was found that both transmittance, absorbance and optical band gap, E_g , depend markedly on the films thickness. The transmittance is decreases with increasing film thickness. The transmittance of thinner film ($t = 250$ nm) is high (transmittance ranged between 85 to 98 %) in the visible and near infrared regions. The direct optical band gap values of Sb_2O_3 thin films are higher for the thinner films. The high transmittance of wave lengths in the visible and near infrared regions and the high absorbance in the ultraviolet region offered the possibility of using Sb_2O_3 films in various fields including, laser visible diodes, solar cells, IR detectors and ultraviolet filters.

REFERENCES

1. N. TIGAU, V. CIUPINA^a, G. PRODAN^a, Structural, optical and electrical properties of Sb_2O_3 thin films with different thickness. *Phys. Stat. S ol. (b)* 54 ,701 (2006).
2. N. Tigaua, V. Ciupinab, G. Prodanb , The effect of substrate temperature on the polycrystalline of Sb_2O_3 thin films, *Journal of Crystal Growth films* 277 , 529(2005) .
3. G.Kiriakidis, N. Katsarakis, M. Bender, E. Gagaoudakis, V. Cimalla, InOx thin films, candidates for novel chemical and optoelectronic applications, *Mater. Phys. Mech.* 1, 83, (2000).
4. K. Narasimha Rao, Influence of deposition parameters on optical properties of TiO_2 films, *Opt. Eng.* 41, 2357, (2002).
5. A.A. Ibrahim , M.A. Kaid, And Ashour* Structural and electrical properties of evaporated ZnTe thin films, *Vactuum* 75 189-194. (2004).
6. N. F. Mott, E. A. Davis, *Electronic Processes in Non-Crystalline Materials*, Calderon Press Oxford,(1979).
7. J. Szczyrbowsky, A. Czapla, The effect of substrate temperature on the optical properties of Thin Solid Films 46 ,127 (1977).
8. T. S. Tauc, A. Memth, *J. Non-Cryst. Solids* 126,569 (1972).
9. K. L. Chopra, *Thin Film Phenomena*, (1969) .
10. M.Y. NADEEM and W AHMED, Optical Properties of ZnS Thin Films, *TUBITAK* 651-659 (2000).
11. J. I. Gittleman, E.K. Sichel, Y. Arie, *Sol. Energy Mater.* 1 , 93 (1979).
12. J. I. Pankove, *Optical processes in semiconductors*, (Dover Publications, Inc. NewYork, p. 91(1975).
13. K.L. Chopra, *Thin Film Phenomena*, (McGraw Hill Book Company, USA, p.729(1969).

14. N. Tigaua, V. Ciupinab, G. Prodanb, The effect of substrate , temperature on the optical properties of polycrystalline Sb_2O_3 thin films, Vol. 8 No. 1, p. 37 – 42, (2006).
15. P. P. Sahay*, R. K. Nath, and S. Tewari ,Optical properties of thermally evaporated CdS thin films, 42, No. 3, 275 – 280 (2007).

Measurement of Radon Concentration in Henna Plant Using Etched Track Detectors

Dawser Hussain Ghayb

Baghdad University, College of Science for Women, Physics Department, Baghdad, Iraq

E – Mail: dawserhussain@yahoo.com

Received 31/12/2009 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

يهدف البحث الحالي الى قياس تراكيز غاز الرادون في نبات الحناء باستخدام كواشف الاثر النووي الحالة الصلبة. تم جمع عدد من النماذج المختلفة لمناطق انتاج مختلفة (الحناء الخليج العربي، و الحناء العراقية، و الحناء الهندية). اسطوانة الانتشار استخدمت كتقنية قياس و كاشف الاثر البوليمري من نوع CR 39 – كجهاز قياس. تم قياس تركيز الرادون في هواء العينة و في داخل العينة. تم ايجاد زمن القسط المناسب للكاشف المستخدم بسمك 1 ملم. كذلك زمن التعريض الفعال تم حسابه في البحث الحالي. فضلا عن ذلك تجري حساب للفعالية النوعية للرادون في العينات. بينت النتائج ان اعلى النماذج تركيزا هو Dulhan حيث كان تركيز غاز الرادون في هواء العينة (0.640) بيكرل / م³ و في داخل العينة (28.791) بيكرل / م³. اقل التراكيز كانت في نموذج حناء الملكة حيث كان التركيز (0.117) بيكرل / م³ في هواء العينة و في داخل العينة بلغ التركيز (7.962) بيكرل / م³ ونموذج حناء البصرة حيث كان التركيز في هواء العينة (0.240) بيكرل / م³ و في داخل العينة (10.796) بيكرل / م³.

ABSTRACT

The main aim of the present research is to measure radon concentration in Henna plants using SSNTDs. Samples were collected from different types of production countries (Arab Gulf Henna, Iraqi Henna and India Henna). Diffusion cylinder was used as measurement technique and CR – 39 plastic track detectors as a measurement device. Radon concentration in the air of samples C_a and inside samples C_s were presented. The optimal etching time for CR – 39 track detectors with 1 mm thickness was studied. Also, the effective exposure time for radon exposure calculated. In addition to that, radon specific activity was calculated. Results show that high radon concentration was in Dulhan sample (0.640) Bq / m³ due to C_a and (28.791) Bq / m³ inside sample. The less concentration was recorded in Al – Malika sample which was of C_a equal to (0.117) Bq/m³ and C_s equal to (7.962) Bq/m³ followed by Basra sample which was of C_a equal to (0.240) Bq/m³ and C_s equal to (10.796) Bq/m³.

INTRODUCTION

Naturally existing low levels of Uranium occur widely in earth's crust. Radon is formed by the natural radioactive decay of uranium in rocks, soil, and water. It emits ionizing radiation in the form of alpha – particles. It also produces short – lived decay products, often called progeny or daughters. Some of which are also radioactive (1). Public exposure to radioactive gas radon and its progeny present in air results in the largest contribution to total effective dose received by human beings (2). Radiation from radon and its daughters has been attributed to increase of lung cancers. It is unknown whether radon causes other types of cancer, but recent studies suggest a need for further studies to assess the relationship between radon and leukemia (3, 4). The environmental radon concentration is a function of time and climate

conditions (5). To monitor radon, both active and passive techniques have been developed. Active methods are usually used for short – term measurements of radon and for detailed investigations of individual sites under inspection. Passive methods are more suitable for the assessment of radon exposure over long time scales and can be used for large – scale surveys at moderate cost. One of the most used devices for radon concentration measurements in the environmental fields are Solid State Nuclear Track Detectors SSNTD's. These detectors are widely used for radioactivity determination in geological samples, as well as for studying the influence of pollution in dwellings. In this work, CR – 39 plastic track detectors were used for the evaluation of radon concentration in different types of Henna plant. Henna plant is widely used in coloring hair and as a natural treatment plant for different hand and foot diseases, as well as for hair diseases. It is found in all Iraqi markets and be most used by women. So, it is necessary to measure radon concentration in this plant.

MATERIALS AND METHODS

Detectors:

The most popular member of solid state nuclear track detectors family CR – 39 plastic track detector supplied by Pershore Moulding LTD Co. U. K. were used as detection device for radon concentration. The detectors of 1000 μm (1 mm) thickness, were cut to $1 \times 1 \text{ cm}^2$ area and stored at normally lab condition of temperature and pressure.

Samples:

Seventeen samples were collected from different production countries. The samples were weighted to 5 g using sensitive balance and kept for measurement in enclosed test tubes.

Detection Technique:

Diffusion sampler technique was used as a detection technique since it is small, low cost, and easy to both handle and read. The samples were put in test tubes and enclosed using rubber cover to make sure that no radiation can be getting to samples. Fig (1) shows a simple form to the cylindrical diffusion technique. The samples were left to 22 days in order to reach to the equilibrium between radon and other isotopes. After that the covers were replaced by others containing CR – 39 detectors and enclosed and left to 40 day as exposure time. A serial number was engraved on each sample for case of identification.

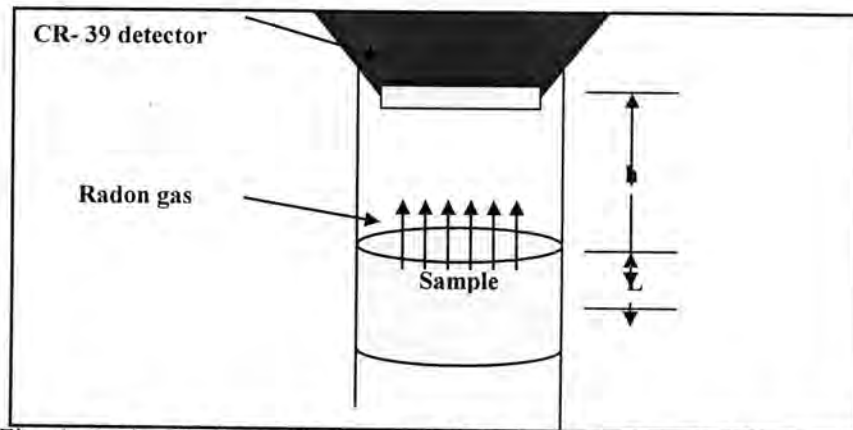


Fig -1: A simple form of cylindrical diffusion technique in this research

The irradiated detectors were etched in NaOH solution in 6.25 N at 70 °C during periods of 4 - 10 hr. The etching was carried out in a temperature – controlled water bath. After etching the detectors were cleaned using distilled water and dried flat between tissues wipes to remove the etchant and etch products from the surface of the detector, and observed under optical microscope in each time. After the end of exposure time, the detectors were raised from samples and etched with the chosen etching solution and the etching proper conditions.

Due to the diffusion technique, diffusion constant k must be calculated which depends on the geometrical parameters of the cylinder and calculated using the equation (6):

$$k = 0.25 \cdot r (2 \cos \theta_c - r / R_a) \dots\dots[1]$$

Where: r = radius of the system, θ_c = critical angle of CR – 39 detector = 35°, R_a = range of alpha particle in air that produced and emit from Rn – 222 which is equal to = 4.15 cm.

Then, radon concentrations in the air of samples were calculated using the equation (7):

Where: C_a is radon concentration in air of sample (in Bq/m³), ρ is track density (track / m³), and t = total time of exposure (sec).

The radon concentration inside samples C_s was calculated using the equation (8):

$$C_s = \lambda_{Rn} \cdot C_a \cdot h \cdot T / L \dots\dots[3]$$

Where: λ_{Ra} represent the decay constant of radon, h represent air column height (cm), T = is the exposure time in days, and L equal to the sample thickness which is equal to 1.2 cm.

Specific activity A_{Ra} (Bq) of radon was also calculated depends on the parameters C_s and the samples volume V and applying the equation (9):

$$A_{Ra} = C_s \cdot V \dots\dots[4]$$

In addition to that, the effective exposure time T_e calculated using the following equation (9):

$$T_e = [T - \lambda_{Rn}^{-1}(1 - \ln \lambda_{Rn}^T)] \dots\dots\dots[5]$$

RESULTS AND DISCUSSION

First of the work, the optimal etching time for CR – 39 track detectors with 1 mm thickness should be known. By using aqueous solution of NaOH with 6.25 N as an etching solution in water bath at 70 °C, and observing the latent tracks revealed on the irradiated detectors for various etching time, it is found that the optimum etching time in this study equal to 8 hr for the given conditions.

The effective exposure time T_e for radon exposure in this work was calculated to be equal to 37.268 day.

Radon concentration in the air of Henna samples C_a and inside samples C_s (Bq / m³) in Henna samples from Arab Gulf Production are delivered in table (1). Results show that high concentration recorded in Yemen sample of type Al – Jazeera which was equal to (0.607) Bq / m³ in the air of sample and (27.307) Bq / m³ inside sample, followed by United Arab Emirates sample which was equal to (0.532) Bq / m³ due to C_a and (23.933) Bq / m³ due to C_s . The less concentration was recorded in Basra sample which was of C_a equal to (0.240) Bq/m³ and C_s equal to (10.796) Bq/m³.

Table -1: Radon Concentrations in Henna Samples from Arab Gulf Production.

code	Production Site	P (track / m ³)	Ca (Bq/m ³)	Cs (Bq/m ³)
1	North of Iraq	0.589 ± 0.01	0.295 ± 0.02	13.271 ± 1.2
2	Basra Sample	0.987 ± 0.011	0.240 ± 0.01	10.796 ± 1.1
3	Yemen (Al – Rabeaa)	0.48 ± 0.02	0.362 ± 0.01	16.285 ± 0.9
4	Yemen (Al – Jazeera)	0.39 ± 0.01	0.607 ± 0.03	27.307 ± 1.23
5	United Arab Emirates	0.864 ± 0.03	0.532 ± 0.02	23.933 ± 1.02
6	Kuwait sample	0.44 ± 0.02	0.350 ± 0.01	13.05 ± 2.1

Table (2) represents radon concentrations in Henna samples from India production. It is obvious from table (2) that the high concentration recorded in Dulhan sample which was equal to (0.640) Bq / m³ in the air of sample and (28.791) Bq / m³ inside sample, followed by Mashhoor sample which was equal to (0.616) Bq / m³ due to C_a and (27.712) Bq / m³ due to C_s . The less concentration was recorded in Al – Malika sample which was of C_a equal to (0.117) Bq/m³ and C_s equal to (7.962) Bq/m³.

Table -2: Radon Concentrations in Henna Samples from India samples.

code	Production Site	P (track / m ³)	Ca (Bq/m ³)	Cs (Bq/m ³)
1	Al – Malika	0.288 ± 0.02	0.117 ± 0.11	7.962 ± 1.2
2	Al – Moomtaz	0.452 ± 0.01	0.278 ± 0.05	12.506 ± 1.33
3	Layla	0.836 ± 0.01	0.514 ± 0.03	23.123 ± 2.5
4	Sadiya	0.740 ± 0.02	0.455 ± 0.02	20.469 ± 2.11
5	Henna	0.781 ± 0.03	0.480 ± 0.03	21.593 ± 1.1
6	Dulhan	1.04 ± 0.05	0.640 ± 0.04	28.791 ± 0.7
7	Taj Al – Malika	0.603 ± 0.01	0.371 ± 0.022	16.691 ± 1.5
8	Al – Ameerat	0.685 ± 0.01	0.421 ± 0.05	18.939 ± 0.98
9	Shama	0.672 ± 0.02	0.413 ± 0.051	18.579 ± 2.3
10	Shama Herbal	0.960 ± 0.01	0.591 ± 0.02	26.587 ± 1.33
11	Mashhoor	1.001 ± 0.02	0.616 ± 0.011	27.712 ± 0.76

In addition to that, radon specific activity have been calculated and presented in tables (3 & 4). It is clear from tables (3 & 4) that the samples of the high radon concentration also have high radon specific activity in comparison with other samples.

Table -3: Radon Specific Activity in Henna Samples from Arab Gulf Production.

code	Production Site	A _{Ra} (Bq)
1	North of Iraq	0.178 ± 0.02
2	Basra Sample	0.144 ± 0.01
3	Yemen (Al – Rabeaa)	0.218 ± 0.01
4	Yemen (Al – Jazeera)	0.366 ± 0.03
5	United Arab Emirates	0.321 ± 0.02
6	Kuwait sample	0.310 ± 0.01

Table -4: Radon Specific Activity in Henna Samples from India samples.

code	Production Site	A _{Ra} (Bq)
1	Al – Malika	0.106 ± 0.11
2	Al – Moomtaz	0.167 ± 0.05
3	Layla	0.310 ± 0.03
4	Sadiya	0.274 ± 0.02
5	Henna	0.289 ± 0.03
6	Dulhan	0.386 ± 0.04
7	Taj Al – Malika	0.224 ± 0.022
8	Al – Ameerat	0.254 ± 0.05
9	Shama	0.249 ± 0.051
10	Shama Herbal	0.357 ± 0.02
11	Mashhoor	0.372 ± 0.011

From the above results we can conclude the following:

1. The best conditions for etching process to CR – 39 plastic track detector of 1 mm thickness is an aqueous solution of NaOH with 6.25 N at 70 °C for 8 hr.
2. The effective exposure time T_e for radon exposure in this work is 37.268 day.
3. The high radon concentration was in Dulhan sample followed by Mashhoor sample, and the less concentration was recorded in Al – Malika sample followed by Basra sample.
4. The Iraqi sample of type Basra is in good agreement with other samples, in other words, Al – Basra Henna sample is good to used due to radon concentration in comparison with other samples.

REFERENCES

1. D. Majumdar, " Rdaon : not so noble", *Resonance*, 1: 44 – 55, (2000).
2. S.A. Khan, S. Ali, M. Tufail, and A. A. Qureshi, "Radon concentration levels in Fatima Jinnah wmen university Pakistan", *Radia. Prot.*, 40(1):11-27, (2005).
3. Smith B. J., Zhang L., and Field W. R., " Iowa radon leukemia study: a hierarchical population risk model for spatially correlated exposure measured with error", *Statistical Medicine*, 26:4619, (2007).
4. Rericha V., Kulich M., Rericha R., Shore D. L., and Sandler D. P., " Incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma in Czech uranium miners: a case – cohort study", *Environ. Health Perspectives*, 115(4):184-190, (2007).
5. Gil H. A. and Jai K. L., "Construction of an environmental radon monitoring system using CR – 39 nuclear track detectors", *Nucl. Engineer. Tech.*, 37(4):395 – 400, (2005).
6. Barillon R., Klein D., Chambaudet A., & Devillarade C., " Comparison of effectiveness of three radon detectors (LR-115, CR-39 & Silicon Diode) placed in cylindrical device theory and experimental technique", *Nucl. Track. Radia. Meas.*, 22 (1-4): 218-282, (1993).
7. Azam A., Naqvi A. H., & Srivastava D. S., " Radium concentration and radon exhalation measurements using LR – type II plastic track detectors ", *Nucl. Geophys.*, 9(6):653 – 657, (1995).
8. Al – Bataina B. A., Ismail A. M., Kullab M. K., Abumurad K. M. and Mustafa H., " Radon measurements in different types of natural waters in Jordan ", *Radia. Meas.*, 28(1-6):591-594, (1997).
9. الجبوري، عامر حسن علي، تحديد تراكيز اليورانيوم المنضب في بقايا (مخلفات) معدات عسكرية في مواقع معينة من جنوب العراق باستخدام كاشفي CR – 39 و HPGe ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل – العراق، (2003).

Investigation of the Dielectric Behavior and A.C. Conductivity of Cd_2SnO_4 Compound

Salma M. Shaban, Bushra S. Mahdi, and Raad M. Saleh Al-Haddad
Department of physics, College of science, University of Baghdad

Received 22/2/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

حضر واحد من الاوكسيدات الثلاثية مثل Cd_2SnO_4 بطريقة الباور وكبس بشكل قرص بقطر 1.3 cm لدراسة تركيبه وسلوك ثابت العزل المركب والتوصيلية المتناوبة. يملك باوذر Cd_2SnO_4 تركيب متعدد البلورات كما بين بتحليل حيود الاشعة السينية (XRD). يملك تركيبه ثلاث قمم حيود قوية وان المستوي لمعاملات ميلر (130) هو الاتجاه المفضل. قيس سلوك ثابت العزل المركب والاستجابة الكلية للتوصيلية لاقراص Cd_2SnO_4 ضمن مدى التردد 100 Hz الى 10 MHz ومدى درجة الحرارة (298 – 453) K. وجد ان ثابت العزل يزداد عند الترددات الواطنة الى قيمة معينة في تردد معين ثم يقل بزيادة التردد. تراح هذه القمة الى قيمة اعلى للتردد بزيادة درجة الحرارة. تزداد قيم التردد الاسي s بزيادة درجة الحرارة. كذلك تزداد قيم طاقة التنشيط بزيادة التردد.

ABSTRACT

One of the ternary oxides, like Cd_2SnO_4 powder was prepared by powder technology and press it as pellet of diameter 1.3 cm in order to study its structure and the behavior of complex dielectric constant and a.c. conductivity. Cd_2SnO_4 powder as bulk has polycrystalline structure as indicated by X-ray diffraction analysis (XRD). Its structure has four strongest diffraction peaks as well as another peaks have different small intensities and plane of Miller indices (130) is the preferred orientation. The behavior of complex dielectric constant and overall response of conductivity for Cd_2SnO_4 as pellets were measured within frequency range 100 Hz to 10 MHz and temperatures range (298 – 453) K. It was found that the dielectric constant increases at lower frequency to a maximum value in a certain frequency then decreases with the increase of frequency. This peak shifts to higher value of frequency with the increase of temperature. Values of frequency exponent s for a.c. conductivity increases with the increase of temperature. Also values of activation energy increase with the increase of frequency.

INTRODUCTION

The ternary oxides, like Cd_2SnO_4 , CdSnO_3 and CdIn_2O_4 have attractive electrical and optical Properties because of their band gaps ($E_g = 2.06$ eV for Cd_2SnO_4 , $E_g = 2.23$ eV for CdIn_2O_4 , and $E_g = 2.3$ eV for CdSnO_3 [1]) which are bigger than for CdO ($E_g = 1.8$ eV) itself. From these different types of cadmium stannate, the semiconductor oxides Cd_2SnO_4 is the more stability than others. These various types of cadmium stannate have structural difference due to Cd to Sn ratio and oxygen content. These ternary oxides, therefore, considers alongside SnO_2 as potential transparent conducting materials and they have received extensive study over the past few years. Cadmium stannate is extrinsic n-type semiconductors due to oxygen vacancies which form donor levels in the energy gap. The carrier concentration in these materials can also be tuned either, by creating oxygen deficiencies or by chemical substitution. Cd_2SnO_4 is bright yellow and exhibits much more atmosphere-sensitive when prepared in oxidizing conditions [2]. It has a

relatively high carrier mobility and its visible absorption edge moves to much higher energy with n-type doping [2]. This results in an increasing window of transparency in the visible region and increasing reflectance in the IR region with the increase of electrical conductivity. The present paper studies the behavior of the dielectric constant for Cd_2SnO_4 as pellets.

MATERIALS AND METHODES

Samples of Cd_2SnO_4 were prepared by solid – state reaction of mixtures of SnO_2 and CdO , the latter pre – calcined at 500°C for 1 hour to remove hydroxide and carbonate impurities. After being weighted out in the appropriate molar ratios, the powder were intimately mixed by hand grinding and reacted at 900°C for 6 hour. Then pressed into a 13 mm diameter pellet at 4 Mpa and lightly sintered in air at 850°C for 12 h. To study A.C. conductivity and the behavior of the dielectric constant, Cd_2SnO_4 as pellet was put between two Cu electrodes into electrical oven which is connected to LCR system of a programmable automatic LCR bridge (PM 60304 Philips) in order to measure the capacitance C and the conductance G as a function of temperatures and frequencies. X-ray diffraction technique using $\text{Cu K}\alpha$ source of wavelength $1.54 \text{ \AA}$ was used to measure the structure of Cd_2SnO_4 powder.

RESULTS AND DISCUSSIONS

STRUCTURE

Figure 1 shows the XRD patterns of Cd_2SnO_4 powder as bulk. It is observed from the figure, that XRD for the compound exhibits four strongest diffraction peaks associate with (130), (200), (111), and (221) reflections of which the intensity of the (130) orientation is the predominant. Also Fig. 1 shows another peaks for Cd_2SnO_4 which have different small intensities as shown in Table 1. This is in a good agreement with data for Shannon in ref. [3]. Values of Miller indices and inter-planer spacing are indicated in Table 1. The other peaks in Fig. 1 were ignored due to its small intensities than others.

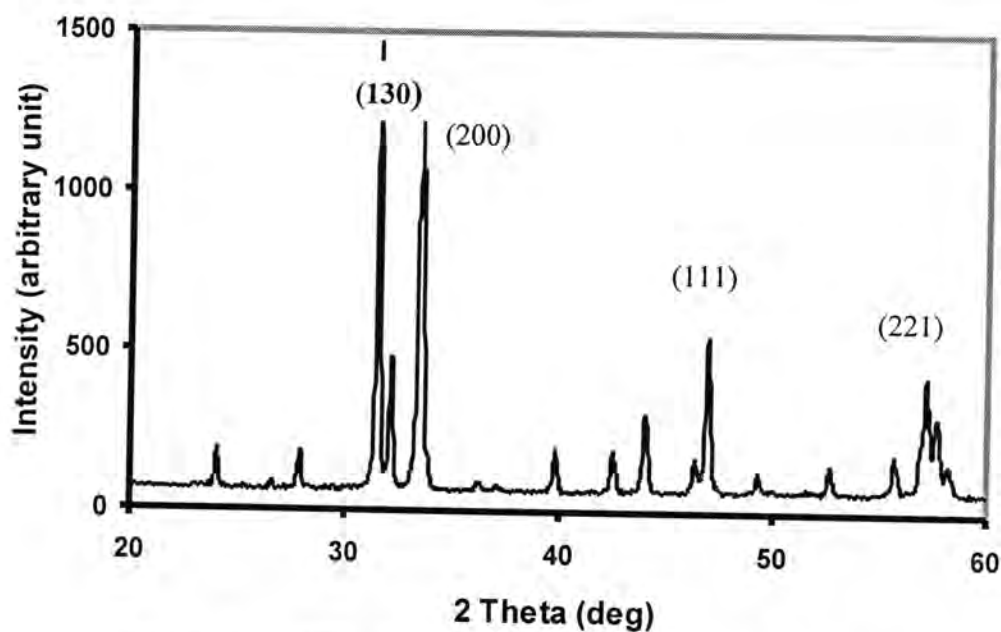


Fig.-1: X-ray diffraction pattern of Cd_2SnO_4 powder as bulk.

Table 1 Values of Miller indices and inter-planer spacing

2 θ deg.	$d_{\text{stad.}}$	hkl	$d_{\text{exp.}}$	$(I/I_0)_{\text{exp.}}$	$(I/I_0)_{\text{stand.}}$
24.059	3.695	(120)	3.695	9	20
27.923	3.191	(001)	3.192	9	20
31.504	2.836	(130)	2.837	100	100
32.135	2.783	(200)	2.783	31	70
33.389	2.679	(210)	2.681	60	85
33.589	2.667	(111)	2.665	82	100
39.852	2.259	(140)	2.26	10	20
42.593	2.109	(131)	2.12	10	20
44.083	2.052	(211)	2.052	20	40
46.398	1.954	(041)	1.955	8	20
47.007	1.931	(221)	1.931	36	60
52.653	1.737	(320)	1.736	7	20
55.701	1.648	(060)	1.648	9	20
56.825	1.617	(330)	1.618	7	30
57.161	1.609	(151)	1.61	27	55
57.646	1.596	(311)	1.597	17	25

DIELECTRIC BEHAVIOR

DIELECTRIC CONSTANT

We have studied the frequency-dependence of dielectric constant of Cd_2SnO_4 as pellets. The measurements were carried out through the temperature range (298 – 453) K and frequency range from 0.1 kHz to 4 MHz. In general the complex relative dielectric permittivity is given by the equation [4]:

$$\epsilon_r(\omega) = \epsilon_1(\omega) - i\epsilon_2(\omega) \dots\dots\dots (1)$$

($\epsilon_r = \epsilon / \epsilon_0$; where $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ F/m is the permittivity of free space and ω is the angular frequency) .

The dielectric constant ϵ_1 was calculated from the equation:

$$\epsilon_1 = C/C_0 \dots\dots\dots (2)$$

where C_0 is the geometrical capacitance of the sample ($C_0 = \epsilon_0 A/d$, where d is the thickness of the sample and A is the cross sectional area).

Also the dielectric loss ϵ_2 was calculated from the equation :

$$\epsilon_2 = G/ \omega C_0 \dots\dots\dots (3)$$

Fig. 2 shows the variation of the dielectric constant as a function of frequency at different temperatures .

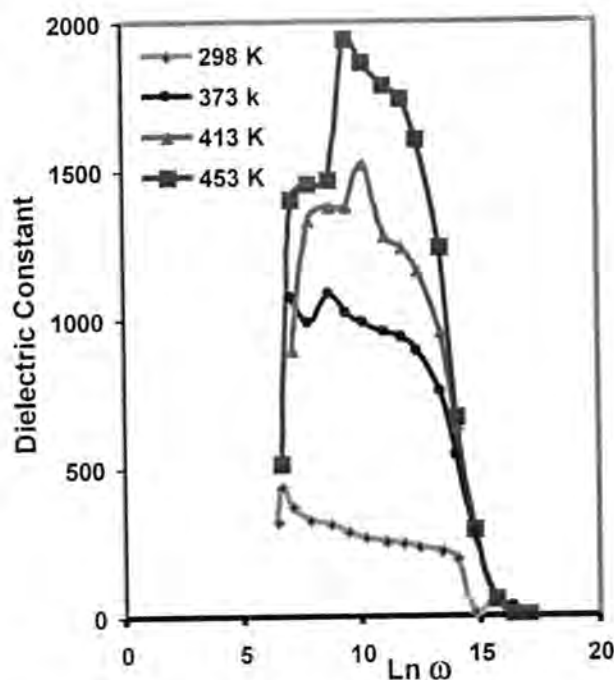


Fig.- 2: Frequency dependence of dielectric constant of Cd_2SnO_4 as bulk.

Dielectric constant as shown from Fig. 2 increases at lower frequencies to a maximum value in a certain frequency and then decreases with the increase of frequency. This peak shifts to higher value of frequency with the increase of temperature. The behavior of dielectric constant at lower frequencies can be explained to the static dielectric constant but at higher frequencies can be attributed to the relaxation of carriers with the alternate of frequencies then the increase of polarization [5].

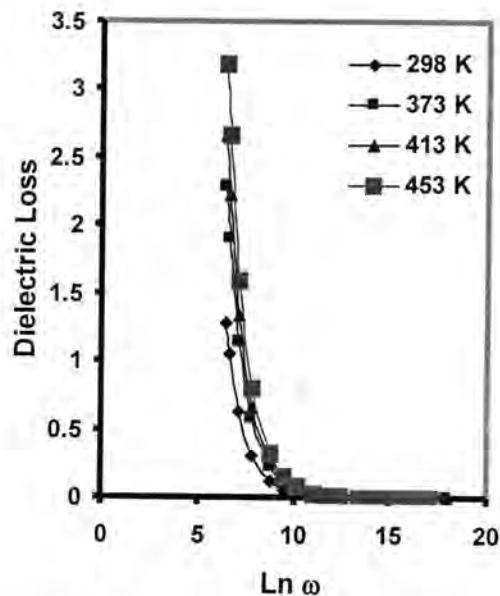


Fig. -3: Frequency dependence of dielectric loss of Cd_2SnO_4 as bulk.

As shown from Fig. 3 the dielectric loss decreases with the increase of frequency because of traps of oxygen ions which make levels in the energy gap to capture the excitation carriers [6].

A.C.CONDUCTIVITY

Fig 4 shows the frequency dependence of the overall response of conductivity $\sigma(\omega)$ at different temperatures in the range 298-453 K for Cd_2SnO_4 as bulk. The overall response of conductivity follows the equation:

$$\sigma(\omega) = \sigma_{d.c.} + A \omega^s \dots\dots\dots(4)$$

where $A \omega^s$ represents the a.c. conductivity which obeys the Almond-West universal power law in the form of [5] :

$\sigma_{a.c.} = A \omega^s$, where A is constant and s is the frequency exponent .

It is clear from figure 4 that at low frequencies , from 100 Hz up to 40 kHz , the bulk of ac conductivity is frequency independent which means d.c. conductivity $\sigma_{d.c.}$. But , at frequencies from 40 kHz to 2 MHz , the conductivity decreases with the increase of frequency because of

the deficiency of oxygen ions that make traps for carriers. This behavior for the region between 40 kHz to 2 MHz can be certified that the frequency exponent in this region does not vary and has fixed value which is 1.5 so that the conductivity can be considered close to that of d.c. conductivity [7].

At higher frequencies up from 2 MHz the ac conductivity increases, following power law behavior such that [7],

$$\sigma(\omega) \propto \omega^s \dots\dots\dots (5)$$

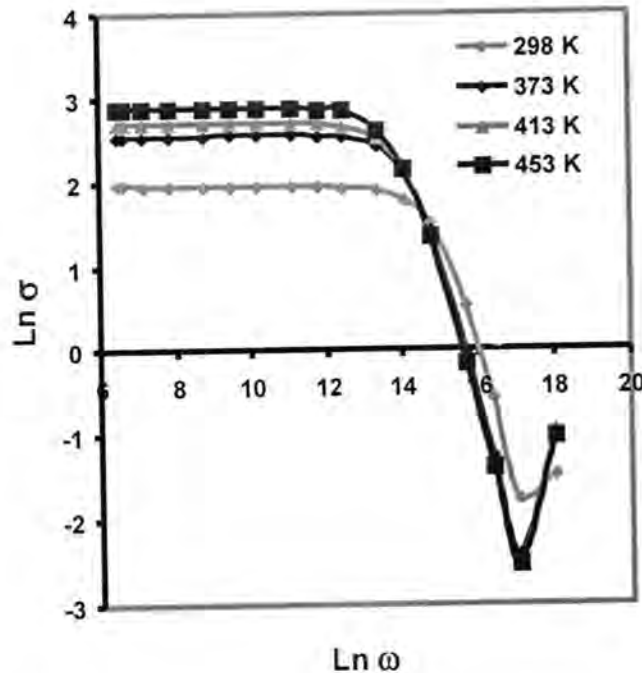


Fig. -4: Frequency dependence of overall response of conductivity for Cd_2SnO_4 as bulk at different temperatures.

Values of the frequency exponent s can be determined from the slope of the linear part of figure 4 in the region between (2 – 4) MHz at different temperatures as shown in Figure 5.

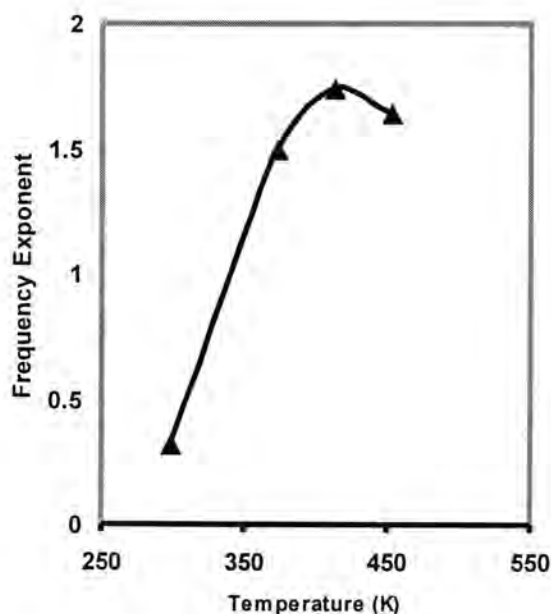


Fig. -5: The frequency exponent as a function of temperature .

As shown in figure 5 , values of s in the range (0.32 - 1.64) and this means that at high frequencies , these values were attributed to localized hopping and/or re-orientational motion which is expected to be the dominated type of a.c conduction [7].

Fig. 6 shows the plot of $\ln \sigma$ versus the inverse of temperature for Cd_2SnO_4 as bulk at high frequencies .The pattern of temperature dependent conductivity plots can be said to follow the Arrhenius behavior [8]:

$$\sigma = \sigma_0 \exp (-E_A/kT) \dots\dots\dots (6)$$

where σ_0 is the pre-exponential factor, E_A is the activation energy, k is Boltzmann constant and T is absolute temperature [18].

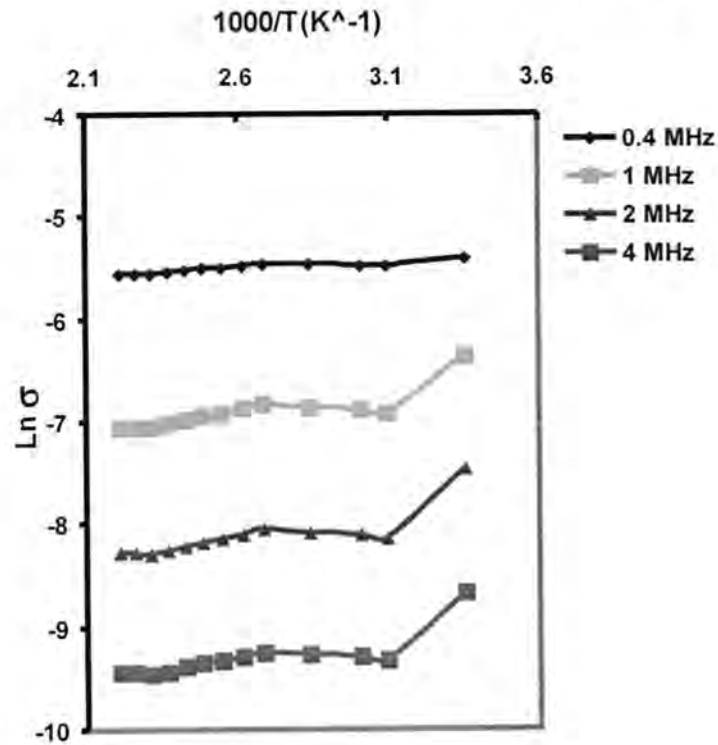


Fig.-6: Temperature dependence of the electrical conductivity of Cd_2SnO_4 as bulk at high frequencies

From equation 6 the activation energy E_A can be calculated from the slope of the linear part at low temperatures for all frequencies in Fig. 6 which shows Frequency dependence of the activation energy. It can be observed that the activation energy values increases with the increase of frequency as shown in Fig. 7.

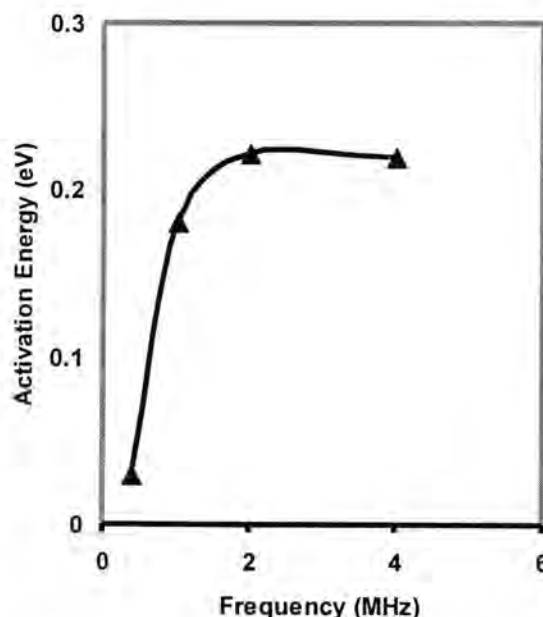


Fig.-7: Frequency dependence of the activation energy $E_A(\omega)$.

Samples of Cd_2SnO_4 were prepared by solid – state reaction of mixtures of SnO_2 and CdO . XRD for the Cd_2SnO_4 compound as bulk exhibits four strongest diffraction peaks as well as another peaks which have different small intensities. Complex dielectric constant was carried out through the temperature range (298 – 453) K and frequency range from 0.1 kHz to 4 MHz. Dielectric constant increases at lower frequencies to a maximum value in a certain frequency and then decreases with the increase of frequency. This peak shifts to higher value of frequency with the increase of temperature. But the dielectric loss decreases with the increase of frequency. At low frequencies, from 100 Hz up to 40 kHz, the bulk of ac conductivity is frequency independent. But, at frequencies from 40 kHz to 2 MHz, the conductivity decreases with the increase of frequency. At higher frequencies up from 2 MHz the ac conductivity increases. Values of the frequency exponent s increase with temperatures and the activation energy values increases with the increase of frequency.

REFERENCES

1. Y. Dou and R.G. Egdell, "Synthesis of Some Ti Doped Strontium Stannate", *Surface Science*, 372 : 289-299(1997).
2. E. Elangovan and K. Ramamurthi, "Micro-cubes with Porous Architecture: Synthesis and Gas-Sensing", *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 5(1): 45 – 54(2003).

3. R.D.Shannon and J.L. Gillson ,” Enhancement of Optical and Electrical Compounds”, J. Phys. Chem. Solids , 38 : 877-881(1989).
4. Nor Hazlizaaini Basri and N.S. Mohamed , “Optoelectronic Properties of Sray Deposited $\text{SnO}_2\text{:F}$ Films”,Solid State Science and Technology, 17, 1 : 63-72(2009).
5. J. Won Kim and C. Won Ahn , “Surface Properties of Indium Doped of CdSnO_4 ”,Applied Physics Letters , 80 , 21 : 4006-4010(2002).
6. S.Panteny and C.R. Bowen , Transparent Conducting Oxides:Status and Opportunities in Basic Research“,Ferroelectrics , 319 : 1563-1570(2005).
7. R. N. P. Choudhary and B. K. Samantaray,” Electrical Properties of CdSnO_2 ” , Int. J. Electrochem. Sci., 3 :597 – 608(2008).
8. Dillip K. Pradhan , Chinese,”Dielectric Behavior Of ZnMnO_4 ” J. Phys. , 47 (6), 780(2008).

A Study of Edge Detection Filter

Ali A. Al-Zuky and Haidar J. Al- Taa'y
Al-Mustansiriya Univ., College Of Science, Physics Dept.

Received 3/1/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

ان العلاقة بين المستويات الرمادية والصفة الخطية قد درست . حيث ان الشدات (المستويات الرمادية) الموقعية في الصورة تكون عالية الترابط في المناطق المتجانسة (غير الحافية) . لذلك استخدمنا خوارزمية المربعات الصغرى للتقريب الخطي لفصل المناطق المتجانسة و المناطق غير المتجانسة (الحافية) وذلك بتعيين موقع الحافات . لذلك يمكن ان نفرض بان افضل تقريب لقيم مستويات الصورة المرتبة تصاعديا في المناطق المتجانسة هو دالة خطية .
نتائج هذه الخوارزمية اظهرت الدقة العالية واعطت حافات وحدود نحيفة مقارنة مع الطرق الاخرى .

ABSTRACT

The relationship between the gray levels and linearity has been studied. Where the local image intensities are highly correlated in homogenous (non-edge) regions. Therefore, we used least square line-fitting algorithm to separate homogenous regions and non-homogenous regions and locate edges. So, can be assumed that the best approximation for local sorted image gray values in homogenous regions as a line function. The results of this algorithm produced accurate and thin edges comparing with the results of the other edge detection operators.

INTRODUCTION

In computer vision and image processing, edge detection concerns the localization of significant of the physical phenomena that originated them. This information is very useful for applications in 3D reconstruction, motion, recognition, image enhancement, and restoration, image registration, image compression, and so on. (1). Most of edge detectors in the published literature have been developed around the assumption that one wishes to identify step edges and they have been made optimal with respect to some criteria for this type of edge. (2)

It is difficult to design general edge detection algorithm that performs well in many contexts and captures the requirements of subsequent processing stages. Edge detection operators are based on the idea that edge information in an image is found by looking to the relationship which a pixel has with its neighbors. If the pixel gray level values are similar to those around it; there is probably not an edge at that point. However, if a pixel has neighbors with widely varying gray levels, it may represent an edge point. (3)

Most of the edge and line detection operators are implemented with convolution masks, and based on discrete approximations to differential operators. Differential operators measure the rate of change in a function (4). Therefore, the introduced method was extending (5) to be applying for various images with different edge strength and of different orientations and directions. Where the non-agreement with the fitted line were exploited to precise the edge points.

THEORETICAL CONCEPT

The edge detection filters are normally grouped into two classes a) non-directional and b) directional filters. The difference between them is that the non-directional filters didn't focus on a particular direction within the image but rather deal with linear features in all direction, while directional filters can be very useful if only interested in accenting the features in one direction, or a limited number of directions. (6)

In this study, line regression method adopted to detect image edges (5), where this algorithm previously utilized to introduced adaptive digital smoothing filter for reducing noise from images (7). The points in any homogenous image region, where the gray values sorting, in increasing manner (i.e. present the values as a set of sorted numbers $[x, y(x)]$, where $x = 1, 2, 3, \dots, n$) where x represent the index of gray level value $y(x)$, and (n) is the total number of points in the homogenous region.

Assuming that the ascending points $([x, y(x)], x=0, 1, 2, \dots, n)$ always have linear relation between x and $y(x)$. So, can be estimate the best fitting line for this data by using least square curve fitting algorithm. This performed by using the following steps: (5)

1. compute the following summations:

$$\sum_{x=1}^n x, \dots \sum_{x=1}^n y(x), \dots \sum_{x=1}^n x^2, \dots \sum_{x=1}^n x \cdot y(x) \dots \dots \dots (1)$$

2. From least square line fitting method estimate the following

$$a \cdot n + b \sum_{x=1}^n x = \sum_{x=1}^n y(x) \dots \dots \dots (2)$$

$$a \cdot \sum_{x=1}^n x + b \sum_{x=1}^n x^2 = \sum_{x=1}^n x \cdot y(x) \dots \dots \dots (3)$$

where a, and b constant of estimated line, can be concluded from:

$$b = \frac{\sum_{x=1}^n x \cdot y(x) - \sum_{x=1}^n x \sum_{x=1}^n y(x)}{\sum_{x=1}^n x^2 - \left(\sum_{x=1}^n x \right)^2} \quad (4)$$

$$a = \frac{\sum_{x=1}^n y(x) - b \sum_{x=1}^n x}{n} \quad (5)$$

2. The approximated line for the sorted data given by:

$$Y(x) = a + bx \quad (6) \quad \text{where } (x = 1, 2, 3, \dots, n)$$

Here the errors between the values of $y(x)$ and $Y(x)$ are so small in homogenous regions. While, edge image regions are always contains points from two or more different targets. So, the estimated curve fitting line gives a high error between $y(x)$ and $Y(x)$. This contrast between homogenous regions and non-homogenous regions exploited to locate image edges.

ALGORITHM OF EDGE DETECTION

The proposed edge detector, performed by using the following steps:

Start algorithm

- i. Mention the size of sliding mask (n).
- ii. Determine the values for this mask, by applying sliding mask on the image plane and rescinding these values in increasing manner, then the resulted data presented in a vector $y(x)$, where $(x=1,2,3,\dots,n)$.
- iii. Estimate (a and b) of the best fitting line for the sorted data in vector $y(x)$, by using eq.s (4), and (5), then can be status the equation of best fitted line $Y(x)$ from eq.(6).
- iv. Estimate the absolute error between the data $y(x)$ and the approximated line $Y(x)$, from:

$$er = \frac{1}{n} \sum_{x=1}^n |y(x) - Y(x)| \dots \dots \dots (7)$$

- v. If $er > th$.. then.. can be assign the central mask point as an edge point.

End Algorithm

RESULTS AND DISCUSSION

Two (Synthetic, and House) real images are used to evaluate the efficiency implementation of the suggested algorithm. These images have spatial resolution (256 x 256) pixels, and gray tone resolution 8 bits/pixel.

To, determine the powerful of the introduced edge detector, compare its results with that of Sobel, Robert, Variance, NLLAP and Lablace edge detectors. The results demonstrated in fig. (1), from the results can be shown the present Least Square Linear Fitting (LSLF) edge detector, give best results (thin connected edges and with small number of isolated edge points), comparing with the mentioned edge detectors. Hence, can be say, that the image regions can be locally modeled as linear function when the region homogenous (7). Any contrasts with this model, mean that the region is represent edge region or non-homogenous gray tone region. This edge detector, highly, success in determines straight lines and edges, see fig. (1).

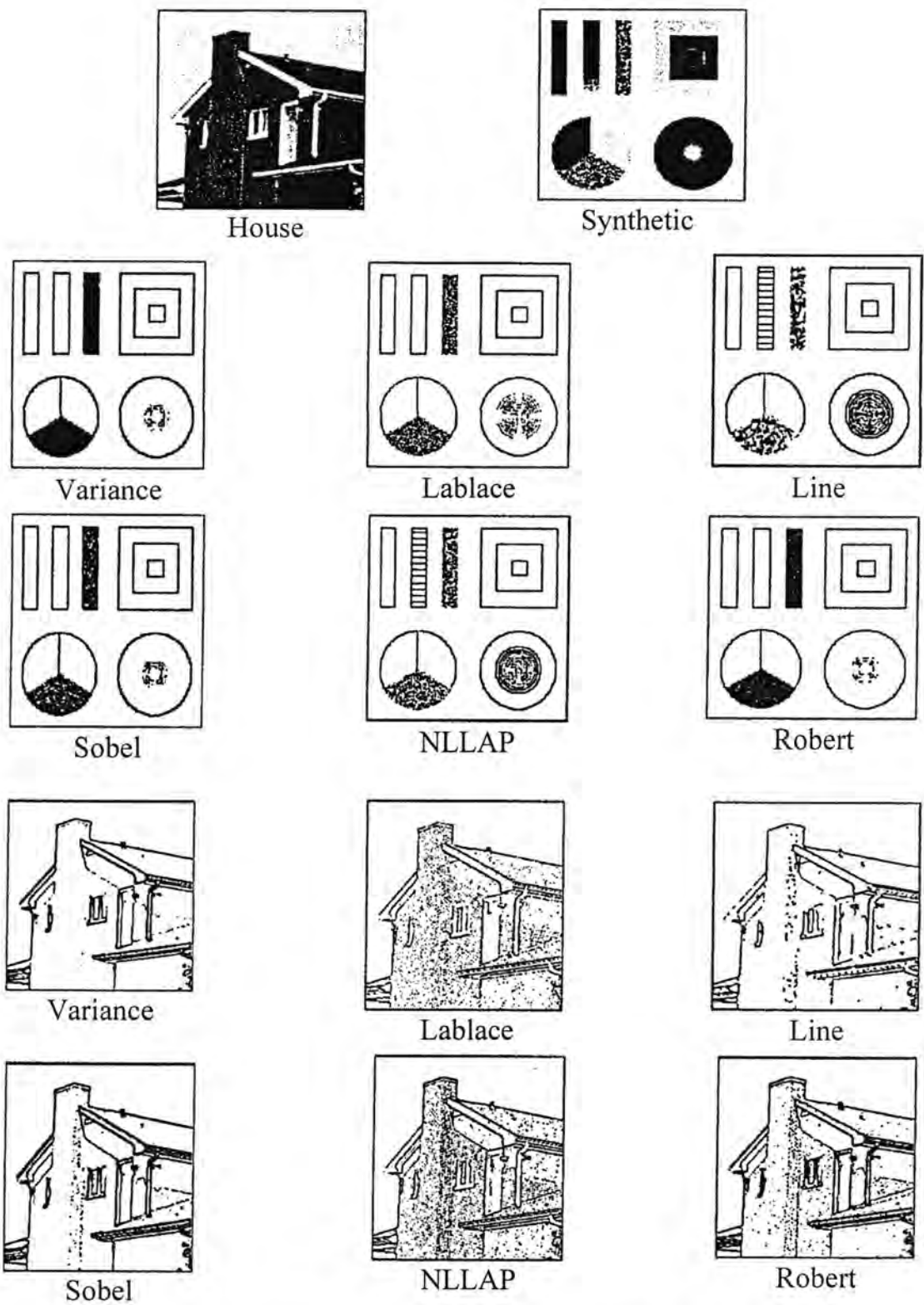


Figure -1: Original Images and The Results of Edge Detectors

REFERENCES

1. Mitra Basu, Tim Kam Ho, "Data Complexity in Pattern Recognition", New York, USA, (2006).
2. Didier Dubois and Henri Prade, "Fuzzy models and algorithms for pattern recognition and image processing ", IRIT, University Paul Sabatier, Toulouse, France (2005).
3. Ludmila I. Kuncheva," Combining Pattern Classifiers Methods and Algorithms ", (2004).
4. John C. Russ North "The Image Processing ", Carolina State University Materials Science and Engineering Department Raleigh, North Carolina, (2007).
5. Ali A. D. AL-Zuky & Haidar Jawad M. AL-Taa'y, "Least Square Line Fitting Algorithm for Image Edge Detection", AL-Mustansiriya J. of Science, AL- Mustansiriya Univ., Iraq, (2002).
6. Bernd Jahne, " Digital Image Processing", Univ. of Heidelberg, Germany, (2005).
7. Ali A. D. AL-Zuky, "Least Square Line Fitting Filter for Additive Noise Suppression", AL-Mustansiriya J. of Science, AL-Mustansiriya Univ., Iraq,(2002).

Separable Variable Metric Updates For Large Scale Optimization

Abbas Y. AL-Bayati and Basim A. Hassan

Department of Mathematics, College of Computers Sciences and Mathematics, University of Mosul

Received 23/5/2010 – Accepted 5/10/2010

الخلاصة

في هذا البحث تم اقتراح طريقة تصغيرية جديدة معتمدة على فكرة الفصل في تحديثات المتري المتغير على أساس إمكانية فصل دالة الهدف إلى مجموعة من الدوال. ثم البحث والتقصي في دراسة التقارب الشامل للطريقة. النتائج الحسابية أثبتت كفاءة الطريقة الجديدة بالمقارنة مع طريقة BFGS القياسية.

ABSTRACT

This paper presents a new minimization method based on the idea of separable updating of the Hessian matrix of the Variable Metric in the case where the objective function can be decomposed in to a sum of functions. Global convergence of the new method is established. Experimental results, indicate that the new proposed method was efficient than the standard separable BFGS method.

INTRODUCTION

Consider the unconstrained optimization problem :

$$\min \{f(x) \mid x \in R^n\} \quad \dots\dots\dots(1)$$

where f is a continuously differentiable function of n variables. Quasi-Newton methods for solving (1) often needed the new search direction d_k at each iteration by :

$$d_k = -B_k^{-1} g_k \quad \dots\dots\dots(2)$$

where $g_k = \nabla f(x_k)$ is the gradient of f evaluated at the current iterate x_k [9]. One then computes the next iterate by

$$x_{k+1} = x_k + \alpha_k d_k \quad \dots\dots\dots(3)$$

where the step size α_k satisfies the Wolfe – Powell (WP) conditions

$$f(x_k + \alpha_k d_k) \leq f(x_k) + \delta_1 \alpha_k d_k^T g_k \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$g(x_k + \alpha_k d_k)^T d_k \geq \delta_2 d_k^T g_k \quad \dots\dots\dots(5)$$

where $\delta_1 < 1/2$ and $\delta_1 < \delta_2 < 1$, and H_{k+1} is an approximation to $\{\nabla^2 f(x_k)\}$. For most recent work in the field of preconditioned conjugate gradient (CG) method see [3]. The matrix B_{k+1} satisfies the actual Quasi-Newton (QN) condition

$$B_{k+1} v_k = y_k \quad \dots\dots\dots(6)$$

where $y_k = g_{k+1} - g_k$, $v_k = x_{k+1} - x_k$, and $B_k = H_k^{-1}$ see [2].

In [6] Li & Fukushima proposed another Quasi-Newton like condition defined by :

$$B_{k+1} v_k = y_k^* \quad \text{.....(7)}$$

where

$$y_k^* = y_k + m_k v_k \quad \text{.....(8)}$$

where m_k is a positive constant. The parameter m_k can be chosen to be a very small number, for example $m_k \leq 10^{-6}$. In this paper, we consider a wide class of separable optimization problems where the objective function is a sum of

$$f(x) = \sum_{k=1}^m f_k(x) \quad \text{.....(9)}$$

where $f_k(x)$, $1 \leq k \leq m$, are smooth functions depending on a small number of variables. [5]

1. Modified Separable Variable Metric (VM) updates:

In this section we focus our attention on separable functions of the form (9), where each of the element function $f_k(x)$ depends only on n_k variables and n_k is much less than n , the size of the original problem.

Then we can define the transform point $\hat{x}$ and the reduced gradients by $\hat{x} = Z_k^T x_k$ and $\hat{g}_k = Z_k^T g_k$ and the reduced Hessian matrices then becomes $\hat{G}_k = Z_k^T G_k Z_k$, where Z_k are columns of the unit matrix. The k -th iteration of VM methods for separable functions starts in the point x_k with reduced gradient $\hat{g}_k$ and approximations of reduced Hessian matrixes $\hat{B}_k$, $1 \leq k \leq m$. Then the gradient g_k and the matrix B_k are constructed in such a way that

$$g_k = \sum_{k=1}^m Z_k^T \hat{g}_k, \quad B_k = \sum_{k=1}^m Z_k \hat{B}_k Z_k^T. \quad \text{.....(10)}$$

Now, the reduced gradients $\hat{g}_{k+1}$ are computed and the new approximations of reduced Hessian matrices $\hat{B}_{k+1}$, $1 \leq k \leq m$ are obtained by VM updates using differences questions, i.e.

$$v_k = Z_k^T (x_{k+1} - x_k), \quad y_k = g_{k+1} - g_k, \quad y_k^* = y_k + m_k v_k. \quad \text{.....(11)}$$

Therefore, a VM-update can be used for each of the particular functions. However, there is a difference between the classic and the separable approach, since condition $v_k^T y_k^* > 0$, which are necessary for positive

definiteness of $\hat{B}_{k+1}$, are not guaranteed for all $1 \leq k \leq m$. This difficulty was unavoidable and an efficient method has to handle this situation. Therefore, the following separable modified VM method is defined by :

$$\hat{B}_{k+1} = \hat{B}_k + \rho_k^* \frac{\hat{y}_k^* \hat{y}_k^*}{\hat{v}_k^T \hat{y}_k^*} - \frac{\hat{B}_k \hat{v}_k \hat{v}_k^T \hat{B}_k}{\hat{v}_k^T \hat{B}_k \hat{v}_k}, \quad \hat{v}_k^T \hat{y}_k^* > 0 \quad \text{.....(12)}$$

$$\hat{B}_{k+1} = \hat{B}_k, \quad \hat{v}_k^T \hat{y}_k^* \leq 0 \quad \text{.....(13)}$$

Now there are two important special cases, for $\rho_k^* = 1$ modified separable BFGS, namely modified (1) method will be obtained for

$\rho_k^* = \hat{v}_k^T \hat{B}_k \hat{v}_k / \hat{v}_k^T \hat{y}_k^*$ a scaled modified separable BFGS will be obtained, namely modified (2).

1.1 Outlines of the Modified Separable VM-methods (MSVM):

The outlines of these methods are as follows :

Step 0 : Choose an initial point $x_1 \in R^n$, set $k = 1$.

Step 1 : If the hybrid stopping criterion is satisfied stop :

ITERM=1- if $|x_{k+1} - x_k|$ was less than or equal to $1.0D-16$,

ITERM=2- if $|F_{k+1} - F_k|$ was less than or equal to $1.0D-14$,

ITERM=3- if F_{k+1} is less than or equal to $1.0D-16$,

ITERM= 4- if $\|g_k\|$ is less than or equal to $1.0D-6$,

ITERM= 6 if termination criterion was not satisfied, but solution is probably acceptable,

ITERM=12- if NOF exceeded 1000,

ITERM < - if the method failed.

Step 2 : Solve $d_k = -\hat{B}_k^{-1} g_k$ to obtain a search direction d_k . Determine $\hat{B}_k$

form $\hat{B}_k$, $1 \leq k \leq m$.

Step 3 : Find α_k by (WP) step size rule (4) and (5).

Step 4 : Generate a new iteration point by $x_{k+1} = x_k + \alpha_k d_k$ and calculate

the new updating $\hat{B}_{k+1}$ by formulas (12) & (13).

Step 5 : Set $k = k + 1$ and go to step 1.

2. Updating semi- positive definite Hessian matrixes :

In the following, we explain how to determine a symmetric positive definite Hessian approximation matrix $\hat{B}_{k+1}$ to satisfy the secant equation

$$\hat{B}_{k+1} \hat{v}_k = \hat{y}_k^* \quad \text{.....(14)}$$

A necessary condition for $\hat{B}_{k+1}$, being symmetric positive definite is that

$$\hat{v}_k^T \hat{y}_k^* > 0 \quad \text{.....(15)}$$

i.e.,

$$(\hat{x}_{k+1} - \hat{x}_k)^T (\hat{g}_{k+1} - \hat{g}_k) > 0 \quad \text{.....(16)}$$

This necessary condition can be proved as follows. From the Wolfe – Powell (WP) conditions, we know that :

$$\hat{g}(\hat{x}_k + \hat{\alpha}_k \hat{d}_k)^T \hat{d}_k \geq \delta_2 \hat{d}_k^T \hat{g}_k. \quad \text{.....(17)}$$

Since $\hat{v}_k = \hat{\alpha}_k \hat{d}_k$, we have

$$\hat{g}_{k+1}^T \hat{v}_k \geq \delta_2 \hat{g}_k^T \hat{v}_k \quad \text{.....(18)}$$

Therefore

$$\hat{g}_{k+1}^T \hat{v}_k - \hat{g}_k^T \hat{v}_k \geq \delta_2 \hat{g}_k^T \hat{v}_k - \hat{g}_k^T \hat{v}_k \quad \text{.....(19)}$$

$$\hat{y}_k^T \hat{v}_k = (\hat{g}_{k+1} - \hat{g}_k)^T \hat{v}_k \geq (\delta_2 - 1) \hat{g}_k^T \hat{v}_k \geq 0 \quad \text{.....(20)}$$

where the parameter $\delta_2 < 1$.

Theorem (2.1) : For any given k , $(\hat{\alpha}_k, \hat{x}_k, \hat{g}_k, \hat{d}_k)$ are generated by MSVM, then $\hat{B}_{k+1} > 0$ holds for all k provided that the following inequality holds

$$\hat{y}_k^T \hat{v}_k \geq 0 \quad \text{.....(21)}$$

proof : following the definition of $\hat{y}_k^*$, we have

$$\hat{y}_k^T \hat{v}_k = \hat{v}_k^T \hat{y}_k + \hat{v}_k^T \hat{m}_k \hat{v}_k \quad \text{.....(21)}$$

$$\hat{y}_k^T \hat{v}_k = \hat{v}_k^T \hat{y}_k + \hat{m}_k \|\hat{v}_k\|^2 \quad \text{where } \hat{m}_k \geq 10^{-6} \quad \text{.....(22)}$$

by (20) and $\|\hat{v}_k\| > 0$, we have

$$\hat{y}_k^T \hat{v}_k \geq 0. \quad \text{.....(23)}$$

3. Global convergence property of the new methods (MSVM) :

The important property of the line-search method is the global convergence defined by relation :

$$\liminf_{k \rightarrow \infty} \|g_k\| = 0 \quad \dots\dots\dots(24)$$

In [1] & [4], if α_k satisfies (WP)-conditions then search direction will be descent, i.e. $\hat{v}_k^T \hat{y}_k^* > 0$.

Theorem (3.1):

Let the objective function $f(x)$ be bounded from below and has bounded second-order derivatives .Consider the line- search method satisfying (4) and (5) .If

$$\sum_{k=1}^{\infty} \frac{(g_k^T d_k)^2}{g_k^T g_k d_k^T d_k} \Rightarrow \infty \quad \text{and} \quad g_k^T d_k < 0 \quad \dots\dots\dots(25)$$

Then (24) holds.[7] and [4]

Theorem (3.2)

Let the objective function $f: R^n \Rightarrow R$ be bounded from below and has bounded second-order derivatives .Consider the line-search method satisfying the Wolfe – Powell (WP) conditions with

$$\hat{d}_k = -\hat{H}_k \hat{g}_k \quad \dots\dots\dots(26)$$

Assume also that the gradient $\hat{g}_k$ is Lipchitz continuous, i.e. there exists a constant $c > 0$, s.t.

$$\|g(x) - g(y)\| \leq c \|x - y\|, \quad \forall x, y \in R^n \quad \dots\dots\dots(27)$$

then (24) holds.

proof :

Assume, for contradiction purposes , that (24) does not hold.

Then, we can suppose $\|g_k\| \geq \varepsilon$.

For some $\varepsilon_* > 0$, and $g_k^T H g_k > 0$, $k \geq 1$. On the other hand, the Lipchitz condition

$$\|(\hat{g}_{k+1} - \hat{g}_k)^T \hat{d}_k\| \leq c \|(\hat{x}_{k+1} - \hat{x}_k)^T \hat{d}_k\| \quad \dots\dots\dots(28)$$

$$(\hat{g}_{k+1} - \hat{g}_k)^T \hat{d}_k \leq \alpha_k c \|\hat{d}_k\|^2 \quad \dots\dots\dots(29)$$

from (20) and (29) we get

$$\alpha_k c \left\| d_k \right\|^2 \geq (\delta_2 - 1) g_k^T d_k \quad \dots\dots\dots(30)$$

$$\alpha_k \geq \left(\frac{\delta_2 - 1}{c} \right) \frac{g_k^T d_k}{\left\| d_k \right\|^2} \quad \dots\dots\dots(31)$$

Since both $(\delta_2 - 1) g_k^T v_k$ and $c \left\| d_k \right\|^2$ are semi-positive definite, then

$$\left(\frac{\delta_2 - 1}{c} \right) \frac{g_k^T d_k}{\left\| d_k \right\|^2} \geq 0 \quad \dots\dots\dots(32)$$

Summing the expression in (32) is also positive definite. Using Theorem (4.1), we have a contradiction.

4. Numerical Results :

In this section, we have been reported the numerical results for the new methods MSVM. We tested, using the collection of test problems, for general sparse and separable unconstrained optimization test problems from [9]. We have used the dimension of the problem (N), N=10,100,500,1000. For each problem, These algorithms use a line search technique, [8] which satisfy Wolfe-Powell (WP) condition as in which $\delta_1 = 0.0001$, $\delta_2 = 0.2$.

We will test the following VM-methods.

1. Separable BFGS method (Original).
2. Modified (1) stands for the new method MSVM with $\rho_k^* = 1$.
3. Modified (2) stands for the new method MSVM with

$$\rho_k^* = v_k^T B_k v_k / v_k^T y_k.$$

Table (5-1) shows the computational results, where the columns have the following meanings :

Problem : the name of the test problem .

NOI : number of iterations .

NOF : number of function evaluations .

f : value of the objective function at the point x .

g : value of the gradient function at the point x .

ITERM : the hybrid stopping criterion .

From Table (1), we observed that the average performances of the modified (1) & modified (2) are better than the original method and especially for our selected test functions.

Table- (1):Comparison results of all methods as a total of (15) test functions.

	Standard BFGS algorithm		
N	NOI	NOF	TIME
10	3885	7703	0:00:00.08
100	5463	10332	0:00:00.67
500	4091	9164	0:00:02.20
1000	4065	9003	0:00:04.63
Total	17504	36202	0:00:07.58
	modified (1)		
N	NOI	NOF	TIME
10	460	791	0:00:00.02
100	1137	2627	0:00:00.53
500	1224	2619	0:00:02.36
1000	1144	2726	0:00:05.44
Total	3965	8761	0:00:08.35
	modified (2)		
N	NOI	NOF	TIME
10	546	985	0:00:00.03
100	1065	2035	0:00:00.55
500	1050	1955	0:00:02.20
1000	1221	2342	0:00:07.13
Total	2271	6332	0:00:09.91

The details of these test results are fully described in the subsequent tables.

Table (2)

Algorithm	Standard BFGS N=10				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	398	1001	22.3407562	0.163E+01	12
2	654	1001	0.121328883E-03	0.125E-01	12
3	656	1000	0.921077850	0.620E-02	12
4	106	153	0.799804276E-10	0.702E-05	2
5	139	179	0.160886197E-09	0.788E-05	2
6	69	112	3.01929454	0.965E-06	4
7	423	1000	11.4354732	0.217E+01	12
8	57	92	-133.510600	0.233E-05	2
9	374	1002	1.05358706	0.316E-01	12
10	13	23	0.944550269E-13	0.428E-06	4
11	500	1001	0.105143334E-03	0.167E-02	12
12	262	698	1.92460901	0.698E-04	2
13	74	123	-8.05139211	0.877E-06	4
14	74	145	-0.385263183E-01	0.836E-06	4
15	86	173	-0.251419625E-01	0.968E-06	4
Total	3885	7703			

TIME= 0:00:00.08

Table (3)

Algorithm	standard BFGS N=100				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	357	1000	375.772751	0.416E+01	12
2	675	1000	0.417037296E-03	0.229E-01	12
3	642	1000	25.2065330	0.110E-01	12
4	94	126	0.736274182E-10	0.347E-05	2
5	195	259	0.353606890E-08	0.233E-04	2
6	84	145	33.3754297	0.800E-06	4
7	490	725	1039.41617	0.274E-04	2
8	56	57	-98.8560279	0.562E-06	4
9	350	1001	18.9030005	0.500E+00	12
10	7	14	0.512511155E-13	0.667E-07	4
11	500	1001	0.110666145E-05	0.118E-04	12
12	334	1002	2.39784602	0.109E+00	12
13	578	1000	-49.9997833	0.285E-04	12
14	501	1001	-0.133766122E-02	0.207E-01	12
15	600	1001	0.908528629E-02	0.334E-01	12
Total	5463	10332			

TIME= 0:00:00.67

Table (4)

Algorithm	standard BFGS N=500				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	313	1000	1950.53768	0.506E+01	12
2	654	1000	0.190687684E-03	0.178E-01	12
3	615	1000	133.781367	0.107E-01	12
4	143	179	0.407524183E-10	0.174E-05	2
5	224	298	0.116517131E-08	0.108E-04	2
6	88	151	168.291764	0.134E-05	2
7	83	196	163899.853	0.740E-03	2
8	34	54	90.9672145	0.713E-06	4
9	406	1002	97.5181572	0.102E+01	12
10	6	12	0.315195199E-13	0.251E-06	4
11	132	265	0.101551041E-07	0.100E-05	4
12	334	1002	2.66906251	0.436E-01	12
13	390	1001	-218.394928	0.162E+01	12
14	335	1002	0.311487476	0.209E-01	12
15	334	1002	0.120585472	0.261E-01	12
Total	4091	9164			

TIME= 0:00:02.20

Table (5)

Algorithm	standard BFGS N=1000				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	318	1002	3920.15325	0.250E+01	12
2	645	1000	0.134675134E-03	0.171E-01	12
3	592	1001	269.500609	0.302E-01	12
4	151	190	0.658806352E-10	0.233E-05	2
5	229	300	0.142991691E-08	0.119E-04	2
6	90	151	336.937181	0.225E-05	2
7	106	265	761774.954	0.242E-02	2
8	34	55	316.436141	0.433E-06	4
9	468	1002	196.256249	0.228E+01	12
10	5	10	0.783883858E-11	0.252E-06	4
11	10	21	0.129032045E-08	0.992E-06	4
12	334	1002	2.68842398	0.300E-01	12
13	414	1000	-423.279033	0.514E+01	12
14	335	1002	0.336253881	0.155E-01	12
15	334	1002	0.128686577	0.194E-01	12
Total	4065	9003			

TIME= 0:00:04.63**Table (6)**

Algorithm	modified (1) N=10				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	89	140	0.168569223E-15	0.456E-06	4
2	36	51	0.182521334E-13	0.985E-06	4
3	29	46	0.920931745	0.915E-06	4
4	10	20	0.396688126E-12	0.409E-06	4
5	16	29	0.547361777E-12	0.268E-06	4
6	11	16	3.01929454	0.586E-06	4
7	112	220	10.2327785	0.217E-05	2
8	11	14	-133.510600	0.664E-07	4
9	60	105	0.107765879	0.677E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	8	13	0.683259631E-14	0.149E-06	4
12	35	70	1.92460901	0.739E-06	4
13	21	36	-8.05139211	0.300E-06	4
14	9	12	-0.385263183E-01	0.424E-07	4
15	12	17	-0.251419625E-01	0.860E-06	4
Total	460	791			

TIME= 0:00:00.02

Table (7)

Algorithm	modified (1) N=100				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	275	1000	129.808266	0.215E+02	12
2	36	48	0.189528096E-13	0.743E-06	4
3	29	46	25.2061295	0.649E-06	4
4	10	18	0.507411689E-12	0.343E-06	4
5	18	32	0.180055648E-13	0.582E-07	4
6	21	34	31.6908719	0.330E-06	4
7	162	328	1057.85018	0.228E-05	2
8	13	16	-98.8560279	0.843E-06	4
9	64	104	1.07765879	0.448E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	14	25	0.402468685E-14	0.764E-07	4
12	434	887	1.92402295	0.277E-05	2
13	24	38	-49.9997833	0.781E-06	4
14	11	16	-0.379985307E-01	0.486E-06	4
15	25	33	-0.245807867E-01	0.242E-06	4
Total	1137	2627			

TIME= 0:00:00.53**Table (8)**

Algorithm	modified (1) N=500				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	353	1000	371.225742	0.220E+02	12
2	37	59	0.537046032E-12	0.817E-06	4
3	24	38	133.780980	0.450E-06	4
4	11	20	0.336619161E-12	0.238E-06	4
5	18	31	0.738398667E-13	0.173E-06	4
6	27	42	166.607206	0.147E-06	4
7	11	15	163899.853	0.769E-07	4
8	95	169	90.9672145	0.426E-05	2
9	66	107	5.38829394	0.428E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	27	49	0.725609352E-09	0.853E-06	4
12	500	1000	1.93099025	0.428E+00	12
13	20	35	-218.910580	0.654E-06	4
14	11	17	-0.379923068E-01	0.785E-06	4
15	23	35	-0.245743245E-01	0.116E-06	4
Total	1224	2619			

TIME= 0:00:02.36

Table (9)

Algorithm	modified (1) N=1000				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	224	1005	3874.32714	0.444E+02	12
2	39	55	0.381233140E-14	0.588E-06	4
3	24	35	269.499543	0.219E-06	4
4	12	21	0.660759524E-12	0.354E-06	4
5	19	31	0.245209052E-12	0.333E-06	4
6	25	40	335.252624	0.695E-06	4
7	12	16	761774.954	0.437E-06	4
8	158	310	316.436141	0.251E-05	2
9	65	106	10.7765879	0.278E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	6	11	0.126662417E-08	0.670E-06	4
12	499	1001	2.15700622	0.721E+00	12
13	24	40	-427.404476	0.594E-06	4
14	13	18	-0.379921091E-01	0.154E-06	4
15	23	33	-0.245741193E-01	0.257E-06	4
Total	1144	2724			

TIME= 0:00:05.44**Table (10)**

Algorithm	modified (2) N=10				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	82	123	0.330103577E-16	0.212E-06	3
2	36	71	0.118471352E-13	0.886E-06	4
3	34	64	0.920931745	0.450E-06	4
4	11	21	0.278029262E-12	0.360E-06	4
5	20	40	0.291894533E-11	0.950E-06	4
6	11	16	3.01929454	0.795E-06	4
7	193	386	10.2327785	0.113E-05	2
8	13	15	-133.510600	0.608E-06	4
9	60	99	0.107765879	0.144E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	11	18	0.445467779E-13	0.418E-06	4
12	34	67	1.92460901	0.917E-06	4
13	17	27	-8.05139211	0.739E-06	4
14	8	13	-0.385263183E-01	0.114E-07	4
15	15	23	-0.251419625E-01	0.524E-06	4
Total	546	985			

TIME= 0:00:00.03

Table (11)

Algorithm	modified (2) N=100				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	96	155	7.14712083	0.388E-06	4
2	39	73	0.218549203E-13	0.487E-06	4
3	34	53	25.2061295	0.106E-06	4
4	14	26	0.534905949E-12	0.458E-06	4
5	30	56	0.176827215E-11	0.611E-06	4
6	23	37	31.6908719	0.119E-06	4
7	202	405	1059.36872	0.713E-05	2
8	16	30	-98.8560279	0.790E-06	4
9	68	113	1.07765879	0.535E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	23	43	0.156657278E-13	0.251E-06	4
12	459	942	1.92402295	0.334E-05	6
13	18	31	-49.9997833	0.393E-06	4
14	13	21	-0.379985307E-01	0.199E-06	4
15	29	48	-0.245807867E-01	0.176E-06	4
Total	1065	2035			

TIME= 0:00:00.55

Table (12)

Algorithm	modified (2) N=500				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	106	171	38.3383609	0.146E-06	4
2	35	65	0.224048441E-13	0.970E-06	4
3	32	51	133.780980	0.956E-06	4
4	13	22	0.942820192E-12	0.723E-06	4
5	27	53	0.602713456E-11	0.823E-06	4
6	20	31	166.607206	0.947E-06	4
7	25	37	163899.853	0.258E-04	2
8	88	178	90.9672145	0.796E-07	4
9	123	197	5.38829394	0.492E-07	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	24	45	0.356423455E-08	0.374E-06	4
12	491	1001	1.93673918	0.147E+01	12
13	21	36	-218.910580	0.283E-06	4
14	15	21	-0.379923068E-01	0.382E-06	4
15	29	45	-0.245743245E-01	0.607E-06	4
Total	1050	1955			

TIME= 0:00:02.20

Table (13)

Algorithm	modified (2) N=1000				
Problem	NOI	NOF	f	g	ITERM
1	100	167	89.5345927	0.178E-06	4
2	40	75	0.447527768E-13	0.783E-06	4
3	33	56	269.499543	0.442E-06	4
4	17	30	0.122409430E-11	0.962E-06	4
5	27	52	0.105565975E-10	0.764E-06	4
6	20	32	335.252624	0.443E-06	4
7	26	40	761774.954	0.276E-04	2
8	298	597	316.436141	0.207E-05	2
9	71	120	11.1589533	0.483E-06	4
10	1	2	0.00000000	0.000E+00	3
11	27	53	0.806589238E-09	0.697E-06	4
12	491	1000	2.10022663	0.941E+00	12
13	26	50	-427.404476	0.761E-06	4
14	14	22	-0.379921091E-01	0.308E-06	4
15	30	46	-0.245741193E-01	0.153E-06	4
Total	1221	2342			

TIME= 0:00:07. 13

RESULTS AND DISCUSSIONS

In this paper, we have proposed two modified versions of a new proposed MSVM-type methods for solving unconstrained minimization problems. The computational experiments show that the modified approaches given in this paper are successful. We claim that the two modified (1) & (2) are better than the original formula. Namely, for the modified (1) & (2) there are about (78–88)% improvement in NOI & there are about (76–83)% improvement in NOF overall, the calculations & for different dimensions

Relative efficiency of the different methods discussed in the paper.

Methods	NOI	NOF	TIME
standard BFGS	100	100	100
Modified (1)	22.65	24.20	130.7
Modified (2)	12.97	17.49	110.1

Test problems for general sparse & partially separable unconstrained optimization

In [9], Test problems for general sparse and partially separable unconstrained optimization. We seek a minimum of either a general objective function $f(x)$ or a partially separable objective function

$$f(x) = \sum_{k=1}^{n_1} f_k(x) \quad , \quad x \in R^n$$

from the starting point $\bar{x}$. For positive integers k & l , we use the notation $\text{div}(k, l)$ for integer division, i.e., maximum integer not greater than k/l , and $\text{mod}(k, l)$ for the remainder after integer division, i.e., $\text{mod}(k, l) = l(k/l - \text{div}(k, l))$. The description of individual problems is as follows:

problem 1: Chained Wood function.

$$f(x) = \sum_{j=1}^k [100(x_{i-1}^2 - x_i)^2 + (x_{i-1} - 1)^2 + 90(x_{i+1}^2 - x_{i+2})^2 + (x_{i+1} - 1)^2 + 10(x_i + x_{i+2} - 2)^2 + (x_i - x_{i+2})^2 / 10]$$

$$i = 2j, \quad k = (n-2)/2$$

$$\bar{x}_i = -3, \quad \text{mod}(i, 2) = 1, \quad i \leq 4, \quad \bar{x}_i = -2, \quad \text{mod}(i, 2) = 1, \quad i > 4$$

$$\bar{x}_i = -1, \quad \text{mod}(i, 2) = 0, \quad i \leq 4, \quad \bar{x}_i = 0, \quad \text{mod}(i, 2) = 0, \quad i > 4$$

problem 2: Chained Powel singular function.

$$f(x) = \sum_{j=1}^k [(x_{i-1} + x_i)^2 + 5(x_{i+1} - x_{i+2})^2 + (x_i - 2x_{i+1})^4 + 10(x_{i-1} - x_{i+2})^4]$$

$$i = 2j, \quad k = (n-2)/2$$

$$\bar{x}_i = 3, \quad \text{mod}(i, 4) = 1, \quad \bar{x}_i = -1, \quad \text{mod}(i, 4) = 2$$

$$\bar{x}_i = 0, \quad \text{mod}(i, 2) = 3, \quad \bar{x}_i = 1, \quad \text{mod}(i, 4) = 0$$

problem 3: Chained Cragg and Levy function.

$$f(x) = \sum_{j=1}^k [(e^{x_{i-1}} - x_i)^4 + 100(x_i - x_{i+1})^6 + \tan^4(x_{i+1} - x_{i+2}) + x_{i-1}^8 + (x_{i+2} - 1)^2]$$

$$i = 2j, \quad k = (n-2)/2$$

$$\bar{x}_i = 1, \quad i = 1, \quad \bar{x}_i = 2, \quad i > 1$$

problem 4: Chained Cragg and Levy function.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n \|(3 - 2x_i)x_i - x_{i-1} - x_{i+1} + 1\|^p$$

$$p = 7/3, \quad x_0 = x_{n+1} = 0$$

$$\bar{x}_i = -1, \quad i \geq 1$$

problem 5 : Generalized Broyden banded function.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n \left\| (2 + 5x_i^2)x_i + 1 + \sum_{j \in J_i} x_j (1 + x_j) \right\|^p$$

$$p = 7/3, \quad J_i = \{j : \max(1, i-5) \leq \min(n, i+1)\}$$

$$\bar{x}_i = -1, \quad i \geq 1$$

problem 6 : Seven – diagonal generalization of the Broyden tridiagonal function.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n \left\| (3 - 2x_i)x_i - x_{i-1} - x_{i+1} + 1 \right\|^p + \sum_{i=1}^{n/2} \|x_i + x_{i+n/2}\|$$

$$p = 7/3, \quad x_0 = x_{n+1} = 0$$

$$\bar{x}_i = -1, \quad i \geq 1$$

problem 7 : Sparse modification of the Nazareth trigonometric function.

$$f(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(n + i - \sum_{j \in J_i} (a_{ij} \sin x_j + b_{ij} \cos x_j) \right)^2$$

$$a_{ij} = 5[1 + \text{mod}(i, 5) + \text{mod}(j, 5)], \quad b_{ij} = (i + j)/10$$

$$J_i = \{j : \max(1, i-2) \leq \min(n, i+2)\} \cup \{j : \|j - i\| = n/2\}$$

$$\bar{x}_i = 1/n, \quad i \geq 1$$

problem 8 : Another trigonometric function.

$$f(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(i(1 - \cos x_i) - \sum_{j \in J_i} (a_{ij} \sin x_j + b_{ij} \cos x_j) \right)$$

$$a_{ij} = 5[1 + \text{mod}(i, 5) + \text{mod}(j, 5)], \quad b_{ij} = (i + j)/10$$

$$J_i = \{j : \max(1, i-2) \leq \min(n, i+2)\} \cup \{j : \|j - i\| = n/2\}$$

$$\bar{x}_i = 1/n, \quad i \geq 1$$

problem 9 :Chained Wood function.

$$f(x) = \sum_{j \in J} \left\{ \exp P \left(\prod_{j=1}^5 x_{i+1-j} \right) + 10 \left(\sum_{j=1}^5 x_{i+1-j}^2 - 10 - \lambda_1 \right)^2 \right. \\ \left. + 10(x_{i-3}x_{i-2} - 5x_{i-1}x_i - \lambda_2)^2 + 10(x_{i-4}^3 + x_{i-3}^3 + 1 - \lambda_3)^2 \right\} \\ \lambda_1 = -0.002008 \quad , \quad \lambda_2 = -0.001900 \quad , \quad \lambda_3 = -0.000261 \\ j = \{i, \text{mod}(i,5) = 0\} \\ \bar{x}_i = -2 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 1 \quad , \quad i \leq 2 \quad , \quad \bar{x}_i = -1 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 1 \quad , \quad i > 2 \\ \bar{x}_i = 2 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 2 \quad , \quad i \leq 2 \quad , \quad \bar{x}_i = -1 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 2 \quad , \quad i > 2 \\ \bar{x}_i = 2 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 3 \quad , \quad \bar{x}_i = -1 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 4 \\ \bar{x}_i = -1 \quad , \quad \text{mod}(i,5) = 0$$

problem 10 :Generalization of the Brown2 function.

$$f(x) = \sum_{i=2}^n [(x_{i-1}^2)^{(x_i^2+1)} + (x_i^2)^{(x_{i-1}^2+1)}] \\ \bar{x}_i = -1.0 \quad , \quad \text{mod}(i,2) = 1 \quad , \quad \bar{x}_i = 1.0 \quad , \quad \text{mod}(i,2) = 0$$

problem 11 :Discrete boundary value problem.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n [2x_i - x_{i-1} - x_{i+1} + h^2(x_i + ih + 1)^3 / 2] \\ h = 1 / (n+1) \quad , \quad x_0 = x_{n+1} = 0 \\ \bar{x}_i = ih(1 - ih) \quad , \quad i \geq 1$$

problem 12 :Discretization of a variational problem.

$$f(x) = 2 \sum_{i=1}^n \left[x_i(x_i - x_{i+1}) / h + 2h \sum_{i=0}^n [(e^{x_{i+1}} - e^{x_i}) / (x_{i+1} - x_i)] \right] \\ h = 1 / (n+1) \quad , \quad x_0 = x_{n+1} = 0 \\ \bar{x}_i = ih(1 - ih) \quad , \quad i \geq 1$$

problem 13 :Banded trigonometric problem.

$$f(x) = \sum_{i=1}^n i[(1 - \cos x_i) + \sin x_{i-1} - \sin x_{i+1}] \\ x_0 = x_{n+1} = 0 \quad , \quad \bar{x}_i = 1 / n \quad , \quad i \geq 1$$

problem 14 : Variationa l problem 1.

This problem is a finite difference analogue of a variationa l problem defined as a minimization of the functional :

$$f(x) = \int_0^1 \left[\frac{1}{2} x^2(t) + e^{x(t)} - 1 \right] dt$$

where $x(0)=0$ & $x(1)=0$. We use the trapezioda l rule together with 3 – point f int e difference s on a uniforrm grid having $n+1$ int ernal nodes. The starting point is given by the formula

$$\bar{x}_i = x(t_i) = ih (1 - ih) , \text{ where } h = 1 / (n + 1) .$$

problem 15 : Variationa l problem 2.

This problem is a finite difference ana logue of a variational problem defined as a minimization of the functional :

$$f(x) = \int_0^1 [x^2(t) - x^2(t) - 2t x(t)] dt$$

where $x(0)=0$ & $x(1)=0$. We use the trapezioda l rule together with 3 – po int f int e difference s on a uniforrm grid having $n+1$ int ernal nodes. The starting point is given by the formula $\bar{x}_i = x(t_i) = ih (1 - ih)$, where $h = 1 / (n + 1)$.

REFERENCES

1. Al-Bayati, A.Y. & Abdullah M. R.,:A new family of spectral CG-algorithm, Raf. J. of comp. & Math., 5, 1 :69-80(2008).
2. Al-Bayati, A.Y. and Al-Salih, M.S.:New self-scaling VM-algorithm for non – convex optimization, The 2nd conference on Mathematical science ICMS, Aleppo University Syria: 225-37(2008).
3. Al-Bayati, A.Y. & Latif, I.S.,:A new 3-term PCG algorithm for non linear optimization problems, American journal of Math. & tatis. USA ,4(2) :81-87(2008).
4. Al-Bayati, A.Y. & Latif, I.S.,:A new tape of PCG algorithm with exactly descend condition for solving Nonlinear U.U., J. of Mu'tah Jordan, 22, 3 : 71-90(2007).
5. Barzilai J. and Borwein,:Two point step size gradient method IMA J. Numer. Anal., 8:141-148,(1988).
6. Griewank A. & Toint P.:Partitioned variable metric updates for large-scale structured optimization problems. Numer. Math.,39, :119-137(1982).

7. Li. D and Fukushima M.: Modified BFGS-method and global convergence in non-convex minimization , Journal of Computational and Applied Math. ,129,: 15-35(2001).
8. Luksan L. and Vlcek J.: Shifted limited-memory VM methods for large-scale unconstrained optimization ,J. of Computational and Applied Math., : 1-26(2005) .
9. Luksan L. and Vlcek J.: Sparse and separable test problems for unconstrained and equality constrained optimization, Technical Report No. 767 Prague, ICS AS CR(1999) .
10. Storey C. and HU .Y. F.: Preconditioned Low-Order Newton methods , J. of optimization theory and application ,79(2) :311-331(1993).

On c-L Spaces

Haider J. Ali And Arkan J. Mohammed

Al-Mustansiriya University College Of Science Department Of Mathematics

Received 19/9/2010 – Accepted 14/11/2010

الخلاصة

كرس هذا البحث لتقديم مفاهيم جديدة هي الفضاءات اللندلوفيه النسبيه الاكبريه والفضاءات c-L. مبرهنات عديدة ومتنوعة حول هذه المفاهيم قد برهنت. فضلا عن ذكر خصائصها وكذلك تحري العلاقات بين هذه المفاهيم والفضاءات LC.

ABSTRACT

This paper is devoted to introduce new concepts so-called M-R-L and c-L spaces. Several various theorems about these concepts are proved. Further properties are stated as well as the relationships between these concepts and LC-spaces are investigated.

INTRODUCTION

Lindelof spaces have always played a highly expressive role in topology. They were introduced by Alexandroff and Urysohn back in 1929 and their names are due to lindelofs proof in 1903 that from any collection of open sets covering the Euclidean space one can find a countable subcollection covering the space. It is well known that in a Lindelof space, every closed set is Lindelof, but not conversely. It is equally well know that in an Lc-space, every Lindelof set is closed, but not conversely. Throughout the present paper we introduce a new concept namely c-L spaces, these are the spaces in which the Lindelof sets are coinciding with closed sets.

1.Preliminaries. In this work, spaces always mean topological spaces on which no separation axioms are assumed unless explicitly stated, a topological space is denoted by (X, τ) (or simply by X). For a subset A of X , the closure and the interior of A in X are denoted by $cl(A)$ and $Int(A)$ respectively. In [2] it was define c-c spaces, these are the spaces in which every closed subset is compact and every compact subset is closed. A topological space whose lindelof subsets are closed is called Lc-space by Mukherji and Sarker [4]. They generalize Kc-spaces (=compact subsets are closed) [5].

2.c-L Spaces

Now, we introduce the following definition:

Definition 2.1: A topological space (X, τ) is called a c-L space if every closed subsets of X is Lindelof and every Lindelof subset of X is closed.

Remark 2.1: The concepts of c-L and c-c spaces are independent of each other and both imply Lc and Kc-spaces respectively. However, the converses are not true in general.

Example 2.1: If $X = [0, 1]$ is a subspace of $\mathbb{R}$ with the usual topology. Since every closed subset of X is bounded, then it is compact. On the other hand, every compact in X is closed and bounded. So X is c-c space. Now, if $S = \{\frac{1}{n} : n=2, 3, 4, \dots\}$, then S is lindelof (since S is countable). But 0 is a limit point to S , which is not belonging to it and then S is not closed. Therefore, X is not c-L.

Example 2.2: Let X be a nonempty countable infinite set and τ be the discrete topology, then (X, τ) is c-L but not a c-c space. Since if we give any closed subset of X , then it is countable (subset of countable space is countable). So it is lindelof (every countable set is lindelof). Also if we give any lindelof subset of X , it is closed (since X is the discrete space). Therefore X is c-L. Now if we take any infinite closed subset of X , then it is not compact. So X is not c-c space.

Example 2.3: Let X be a nonempty uncountable set and τ be the discrete topology, Then X is L_c (K_c) but not c-L (c-c) space. Since if we given any lindelof(compact) subset of X , then it is closed. But if we given any uncountable closed subset of X , then it is not lindelof (compact) set.

Definition 2.2: Let (X, τ) be a topological space. Then τ is said to be maximal relative to Lindelofness (briefly M.R.L) if (i) (X, τ) is lindelof space and (ii) if τ is a proper subfamily of τ^* , then (X, τ^*) is not Lindelof.

The following theorem plays a fundamental role in describing c-L spaces.

Theorem 2.1: Let (X, τ) be a lindelof space and let A be a subset of X . If

$\tau^* = \{U \cup (V \cap A) : U, V \in \tau\}$, Then (X, τ^*) is Lindelof if and only if A^c is Lindelof in (X, τ) .

Proof: Necessity. It is clear that $A \in \tau^*$ (since $A = \{\emptyset \cup (X \cap A) : \emptyset, X \in \tau\}$ and thus A^c is closed in (X, τ^*) . Therefore A^c is Lindelof in (X, τ^*) and hence Lindelof in (X, τ) , since $\tau \subset \tau^*$. Sufficiency let $X = \bigcup \{U_\alpha \cup (V_\alpha \cap A) : \alpha \in \Lambda\}$, therefore $A^c \subset \bigcup \{U_\alpha : \alpha \in \Lambda\}$ and since A^c is Lindelof in (X, τ) , it follows $A^c \subset \bigcup \{U_\alpha : \alpha \in \Gamma_1\}$, where Γ_1 is a countable subset of Λ . Now $X = \bigcup \{U_\alpha \cup V_\alpha : \alpha \in \Lambda\}$ and (X, τ) is Lindelof, so $X = \bigcup \{U_\alpha \cup V_\alpha : \alpha \in \Gamma_2\}$, where Γ_2 is a countable subset of Λ . Hence $A \subset \bigcup \{U_\alpha \cup (V_\alpha \cap A) : \alpha \in \Gamma_2\}$. But $X = A^c \cup A = \bigcup \{U_\alpha \cup (V_\alpha \cap A) : \alpha \in \Gamma_1 \cup \Gamma_2\}$, thus (X, τ^*) is Lindelof.

Theorem 2.2: If (X, τ) is a Lindelof L_c -space, then τ is M.R.L.

Proof: Suppose the theorem is false. Then there exists $\tau^\#$ such that $\tau \subset \tau^\#$ and $(X, \tau^\#)$ is Lindelof.

Take $A \in \tau^\# - \tau$, and let τ^* be the topology for X generated by τ and A as in theorem 2.1.

Then $\tau \subset \tau^* \subset \tau^\#$. And thus (X, τ^*) is Lindelof by theorem 2.1. A^c is Lindelof in (X, τ) , which is Lc- space, then it is closed in (X, τ) , that is, A is in τ which yields a contradiction.

Corollary 2.1: Let (X, τ) be Lindelof Lc-space and $\tau' \subset \tau$. Then (X, τ') is not Lc- space.

Proof: If (X, τ') is Lc-space, since $\tau' \subset \tau$, then it is Lindelof which implies by theorem 2.2 the space (X, τ') is M.R.L which is a contradiction.

Theorem 2.3: Let (X, τ) be a topological space. Then (X, τ) is c-L space if and only if τ is M.R.L.

Proof: Sufficiency. Let A be a Lindelof subset of X and suppose that A is not closed, then $A^c \notin \tau$ and let τ^* be the topology for X generated by τ and A^c as in theorem 2.1. Since $(A^c)^c$ is Lindelof in (X, τ) , then by theorem 2.1 (X, τ^*) is Lindelof and $\tau \subset \tau^*$ which contradicts the fact τ is M.R.L. Also if we take any closed subset of M.R.L space X , then it is lindelof, since X is lindelof.

Necessity, suppose that there exists a topology $\tau^\#$ for X such that $\tau \subset \tau^\#$ and $(X, \tau^\#)$ is Lindelof.

Take $A \in \tau^\# - \tau$, then A^c is closed in $(X, \tau^\#)$ and hence is Lindelof in $(X, \tau^\#)$. Then A^c is Lindelof in (X, τ) and therefore closed in (X, τ) , hence $A \in \tau$ which a contradiction.

Corollary 2.2: Let (X, τ) be a topological space. If (X, τ) is Lindelof and Lc -space, then (X, τ) is c-L.

Proof: By theorem 2.2 and theorem 2.3.

Theorem 2.4: If (X, τ) is c-L space, then it is Lindelof and T_1 space.

Proof: Since X is closed in itself, which is c-L space, then it is Lindelof. Also $\{x\}$ is lindelof for all $x \in X$, which implies that it is closed (since X is c-L space). Therefore X is Lindelof and T_1 space. The converse of above theorem is not true in general.

Example 2.4: Suppose (R, τ) , where R is the set of all real numbers and τ the cocountable topology, and then (R, τ) is T_1 and Lindelof but it is neither c-L nor T_2 . Since (Q^c, τ) , where Q^c is the set of all irrational numbers, is Lindelof space but it is not closed, because $Q^{cc} = Q$ is not open in fact Q is countable set, which implies it is closed. Therefore Q^c is not closed.

Remark 2.2: If (X, τ) is locally compact and c-L space, then it is T_2 space.

Before we state our next theorem we need the following theorem.

Theorem 2.5: [2] Let (X_α, τ_α) be nonempty countable family of second countable Lindelof spaces. Then the product space (X, τ) is also Lindelof. [2].

Theorem 2.6: Let $\{(x_\alpha, \tau_\alpha): \alpha \in \Lambda\}$ is a nonempty countable family of second countable Lindelof spaces and (X, τ) be the product space. If C_α is Lindelof subset of X_α , then $p_\alpha^{-1}(C_\alpha)$ is Lindelof in (X, τ) .

Proof: Let C_{α_0} is Lindelof subset of X_{α_0} , for some $\alpha_0 \in \Lambda$, which is second countable and Lindelof space, then C_{α_0} is second countable subspace. But $p_{\alpha_0}^{-1}(C_{\alpha_0}) = C_{\alpha_0} \times \prod_{\alpha \in \Lambda} X_\alpha$, where $\alpha \neq \alpha_0$. Then by theorem 2.5

$p_{\alpha_0}^{-1}(C_{\alpha_0})$ is Lindelof. Similarly we can prove $p_\alpha^{-1}(C_\alpha)$ is Lindelof whenever C_α is Lindelof subset of X_α for all $\alpha \in \Lambda$ and $\alpha \neq \alpha_0$.

Theorem 2.7: Let $\{(x_\alpha, \tau_\alpha): \alpha \in \Lambda\}$ be a nonempty countable family of second countable spaces, and let (X, τ) be the product space. If (X, τ) is c-L, then (x_α, τ_α) is c-L, for each $\alpha \in \Lambda$.

Proof: If C_α is closed in X_α , then C_α is Lindelof, since X is c-L, then it is Lindelof. But the projection function is continuous, then X_α is Lindelof. Now, let C_α be Lindelof subset of X_α , then $p_\alpha^{-1}(C_\alpha)$ is Lindelof in X by theorem 2.6 which is c-L space, then $p_\alpha^{-1}(C_\alpha)$ is closed. But $C_\alpha^c = p_\alpha p_\alpha^{-1}(C_\alpha^c) = p_\alpha(p_\alpha^{-1}(C_\alpha))^c$ and hence C_α^c is open in X_α , since the projection function is open. Thus C_α is closed in X_α . Therefore (x_α, τ_α) is c-L for each $\alpha \in \Lambda$.

Theorem 2.8: Let (X, τ) be a regular second countable space and $(X \times X, \tau^*)$ be the Cartesian product of (X, τ) with itself. Then $(X \times X, \tau^*)$ is c-L space if and only if (X, τ) is c-L.

Proof: Necessity. If $(X \times X, \tau^*)$ is c-L then (X, τ) is c-L by theorem 2.7.

Sufficiency, since every c-L space is Lindelof and L_c , then $(X \times X, \tau^*)$ is also Lindelof by theorem 2.5 and L_c by [1] which implies it is c-L space by corollary 2.2

Theorem 2.9: Let (X, τ_X) be c-L and (Y, τ_Y) be a subspace of (X, τ_X) . Then (Y, τ_Y) is c-L if and only if Y is closed subset of X .

Proof: Necessity. Since Y is closed in itself, then Y is Lindelof in Y , which implies it is Lindelof in X , which is c-L, then Y is closed in X .

Sufficiency, Let K be Lindelof subset of Y , then it is Lindelof in X , which is c-L, then K is closed in X , so $K \cap Y$ is closed in Y , but $K = K \cap Y$. Therefore K is closed in Y . Also if K is closed in Y , but Y is closed in X , then K is closed in X , which is c-L so it is Lindelof in X , which implies it is Lindelof in Y . Therefore Y is c-L.

Theorem 2.10: Let (X, τ) be a topological space and let $X = Y_1 \cup Y_2 \cup \dots \cup Y_n$ where (Y_i, τ_i) are c-L subspaces of (X, τ) for $i=1, 2, \dots, n$. Then (X, τ) is c-L if and only if Y_i is closed in X .

Proof: Necessity. Since (Y_i, τ_i) is c-L subspaces, then Y_i is Lindelof in X , for each $i \in \Lambda$ where Λ is finite. But X is c-L, so Y_i is closed in X for each $i \in \Lambda$.

Sufficiency, to show that (X, τ) is c-L. Let K be Lindelof subset of X . But $K \cap Y_i$ is closed in K , for each $i \in \Lambda$, so $K \cap Y_i$ is Lindelof in Y_i which is c-L space, then it is closed in Y_i , but Y_i is closed in X , then $K \cap Y_i$ is closed in X .

But $K = \bigcup_{i=1}^n (K \cap Y_i)$, that is, K is closed in X . While

if K is closed subset of X , then $K \cap Y_i$ is closed in Y_i for each $i \in \Lambda$. But Y_i is c-L for each $i \in \Lambda$, so $K \cap Y_i$ is Lindelof in Y_i , for each $i \in \Lambda$ which

implies $K \cap Y_i$ is Lindelof in X , for each $i \in \Lambda$. But $K = \bigcup_{i=1}^n (K \cap Y_i)$ which

is Lindelof for each $i \in \Lambda$, that is, K is Lindelof in X . Therefore X is c-L.

REFERENCES

1. Dontchev J. and Ganster M., On the product of L_c -spaces, Q & A in General Topology 15(1), 71-74(1997).
2. Levine N., When are compact and closed equivalent? The American Mathematical Monthly, vol.72, No.1, pp.41-44(Jan., 1965).
3. Josh K.D., Introduction to general topology, John Wiley and sons (1983).
4. Mukherji T.K. and Sarkar M., On a class of almost discrete spaces, Mat. Vesnik 3(16) (31), 459-474(1979).
5. Willansky A., Between T_1 and T_2 , Amer. Math. Monthly 74, 261-266(1967).

مجلة علوم المستنصرية

تصدر عن كلية العلوم الجامعة المستنصرية

رئيس التحرير
أ. د. رضا ابراهيم البياتي

مدير التحرير
أ. م. د. اقبال خضر الجوفي

هيئة التحرير

عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا

أ. د. ايمان طارق محمد العلوي
أ. د. انعام عبد الرحمن حسن
أ. م. د. عوني ادوار عبد الاحد
أ. م. د. ماجد محمد محمود
أ. م. د. رمزي رشيد علي العاني
أ. م. د. حسين كريم سليمان الوندادي
أ. م. د. سعد نجم باشخ

الهيئة الاستشارية

رئيسا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا
عضوا

أ. م. د. يوسف كاظم عبد الامير
أ. د. طارق صالح عبد الرزاق
أ. د. مهدي صادق عباس
أ. م. د. عبد الله احمد رشيد
أ. م. د. حسين اسماعيل عبد الله
أ. م. د. مهند محمد نوري
أ. م. د. منعم حكيم خلف
أ. م. د. عامر صديق الملاح
أ. م. د. طارق سهيل نجم

بسم الله الرحمن الرحيم

تعليمات النشر لمجلة علوم المستنصرية

1. تقوم المجلة بنشر البحوث الرصينة التي لم يسبق نشرها في مكان آخر بعد إخضاعها للتقويم العلمي من قبل مختصين وبأي من اللغتين العربية أو الانكليزية .
2. يقدم الباحث طلبا تحريريا لنشر البحث في المجلة على أن يكون مرفقا بأربع نسخ من البحث مطبوعة على الحاسوب ومسحوب بطابعة ليزيرية وعلى ورق ابيض قياس (A4) مع قرص مرن (Disk) محمل بأصل البحث ويكون عدد صفحات البحث 10 صفحات وبضمنها الاشكال والجداول على ان لا يكون الحرف اصغر من قياس 12 .
3. يطبع عنوان البحث واسماء الباحثين (كاملة) وعناوينهم باللغتين العربية والانكليزية على ورقة منفصلة شرط ان لا تكتب اسماء الباحثين وعناوينهم في أي مكان اخر من البحث ، وتعاد كتابة عنوان البحث فقط على الصفحة الاولى من البحث .
4. تكتب اسماء الباحثين كاملة بحروف كبيرة وفي حالة استخدام اللغة الانكليزية وكذلك الحروف الاولى فقط من الكلمات (عدا حروف الجر والاضافة) المكونة لعنوان البحث ، وتكتب عناوين الباحثين بحروف اعتيادية صغيرة .
5. تقدم خلاصتان وافيتان لكل بحث ، احدهما بالعربية والاخرى بالانكليزية وتطبع على ورقتين منفصلتين بما لا يزيد على (250) كلمة لكل خلاصة.
6. يشار الى المصدر برقم يوضع بين قوسين بمستوى السطر نفسه بعد الجملة مباشرة وتطبع المصادر على ورقة منفصلة ، ويستخدم الاسلوب الدولي المتعارف عليه عند ذكر مختصرات اسماء المجلات.
7. يفضل قدر الامكان تسلسل البحث ليتضمن العناوين الرئيسية الاتية : المقدمة ، طرائق العمل ، النتائج والمناقشة ، المصادر ، وتوضع هذه العناوين دون ترقيم في وسط الصفحة ولا يوضع تحتها خط وتكتب بحروف كبيرة عندما تكون بالانكليزية .
8. يتبع الاسلوب الاتي عند كتابة المصادر على الصفحة الخاصة بالمصادر : ترقيم المصادر حسب تسلسل ورودها في البحث ، يكتب الاسم الاخير (اللقب) للباحث او الباحثين ثم مختصر الاسمين الاولين فعنوان البحث ، مختصر اسم المجلة ، المجلد او الحجم ، العدد ، الصفحات ، (السنة) . وفي حالة كون المصدر كتابا يكتب بعد اسم المؤلف او المؤلفين عنوان الكتاب ، الطبعة ، الصفحات ، (السنة) الشركة الناشرة ، مكان الطبع .
9. بخصوص اجور النشر يتم دفع مبلغ (25000) عشرون الف دينار عند تقديم البحث للنشر وهي غير قابلة للرد ومن ثم يدفع الباحث (25000) عشرون الف دينار اخرى عند قبول البحث للنشر وبهذا يصبح المبلغ الكلي للنشر خمسون الف دينار .

المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
8-1	تأثيرات خلاص الرصاص على صورة الدم وبعض المعايير الكيموحيوية في الجرذان المختبرية حيدر ميري رضا
22-9	دراسة وراثية جزيئية عن تأثير الملوحة في بعض عزلات بكتريا العقد الجذرية (<i>Sinorhizobium meliloti</i>) المعزولة من الترب العراقية نضال نعمة حسين و حرب عادل وعلي عبد الرحمن
30-23	اضداد الشحميات الفسفورية ومجاميع الدم في النساء ذوات الأجهزة العفوي المتكرر ميثاق جاسم حسين الجبوري
38-31	دراسة كفاءة أوساط زرعية طبيعية وبعض العوامل الفيزيائية في تنمية الفطر المائي <i>Dictyuchus sterile</i> زينة خليل
52-39	تأثير عامل الزمن وتغذية الرش بالنحاس والحديد في العلاقة بين نسبة النتروجين في النبات ومعدل وزن مئة بذرة نوعين من الفاصولياء (<i>Phaseolus vulgaris</i>) ملقحة ببكتريا الرايزوبيوم علي صبيح عبد الأميرو علي قاسم خزعل و عباس علي حسين وعلي هاشم الموسوي

تأثيرات خلاص الرصاص على صورة الدم وبعض المعايير الكيموحيوية في الجرذان المختبرية

حيدر ميري رضا
المعهد الطبي التقني / المنصور

تاريخ تقديم البحث 2010/9/26 - تاريخ قبول البحث 2010/11/14

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effect of lead acetate on blood picture and total protein, cholesterol concentration in rats.

Thirty adult rats with same weight ($M \pm SE$) were divided into two equal groups, (15 rats for each) first group (treated group) received 300 ppm of lead acetate orally with water daily for (45) days, second group (control group) received normal food and water.

Blood parameters included Red Blood Cells (R.B.Cs) counts, Hemoglobin (Hb) concentrations, Packed Cells Volume (P.C.V%), total count and differential leukocytes count in addition to serum total protein concentration and cholesterol level were measured.

The results showed that the treated group has significant decrease in RBC count, Hb concentration and P.V.C %, and significant increase in the total W.B.C count, neutrophils count

While the number of lymphocytes and monocytes count showed significant decrease. For other hand, the results showed significant decrease in total serum protein and significant increase in serum cholesterol level.

We can concluded from this study that the lead acetate can induce physiological defects in many body organs after prolonged exposure to lead compounds.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير خلاص الرصاص على صورة الدم وتركيز البروتين الكلي والكوليستيرول في ذكور الجرذان. استخدم في هذه الدراسة 30 جرذاً بالغاً ذات أوزان متقاربة قسمت إلى مجموعتين، احتوت كل مجموعة 15 جرذاً أعطيت المجموعة الأولى (مجموعة المعاملة) خلاص الرصاص 300p.p.m مع ماء الشرب الاعتيادي يومياً ولمدة 45 يوماً في حين أعطيت المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة) العليقة الغذائية وماء الشرب الاعتياديين. تم قياس معايير الدم التي شملت تعداد كريات الدم الحمر وتركيز خضاب الدم وحجم الكريات المرصوص والعدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض بالإضافة إلى قياس تركيز البروتين الكلي والكوليستيرول في مصل الدم.

أظهرت نتائج المعاملة بخلاص الرصاص انخفاضاً معنوياً في عدد الكريات الحمر وخضاب الدم وحجم الخلايا المرصوص وارتفاعاً معنوياً في تعداد خلايا الدم البيض الكلي والخلايا العدلة وارتفاعاً غير معنوياً في الخلايا الحمضة، بينما أظهر عدد الخلايا اللمفية والوحيدة النواة انخفاضاً معنوياً، أما بخصوص تركيز البروتين الكلي والكوليستيرول فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي في معدل تركيز البروتين الكلي وارتفاع معنوي في معدل تركيز الكوليستيرول في مصل الدم.

نستنتج من هذه الدراسة إن مركبات الرصاص تحدث خللاً فسلجياً في الكثير من الأعضاء بعد التعرض الطويل لهذه المركبات.

المقدمة

يعتبر تلوث البيئة بالمعادن الثقيلة واحدة من المشاكل الصحية الخطيرة في مختلف دول العالم نظراً لما تسببه هذه المعادن من أضرار على الصحة العامة من جراء التطور الصناعي

(1)، ومن أهم العناصر الثقيلة الذي اقترن بالصحة العامة لعمال المناجم مسبقاً هو الرصاص ومركباته (2). وقد شهدت بداية القرن العشرين أسوأ حوادث التسمم بالرصاص نتيجة التقدم الصناعي واستخدام الرصاص في الصناعات المختلفة ووقود المركبات (3). إن تلوث الماء والهواء والغذاء بمركبات الرصاص يعتبر من الطرق الرئيسية التي يمكن للكائن الحي أن يتعرض بواسطتها إلى الرصاص (4). ولمركبات الرصاص تباين واضح في درجة ذوبانها في الماء، وتعتبر خلاات الرصاص من أهم مركبات الرصاص التي تذوب سريعاً فيه (5). أن العمال الذين يعملون في المصانع والتي يدخل الرصاص كمكون أساسي في تكوينها يكونوا أكثر عرضة للتسمم به (6). ومن أهم التأثيرات المرضية على الصورة الدموية لحالات التسمم بالرصاص تلك التي أشار إليها الباحث (7) والمتضمنة أحداث فقر الدم وتأثيره على بعض الإنزيمات التي تدخل في تركيب خضاب الدم. وقد أشير أيضاً في إحدى الدراسات على الجرذان إلى إن المعاملة بخلاات الرصاص قد أدت إلى حصول تغيرات كبيرة في مستوى البروتين الكلي مما يؤثر حدوث اضطرابات في تصنيعها في الكبد (8). في حين أشارت دراسة أخرى أجريت على عمال المصانع إلى التأثير المباشر للرصاص في عملية تكوين الكولسترول في الكبد عن طريق تنشيط الإنزيمات الخاصة بتصنيع الكولستيرول (9). ونتيجة لما تقدم بخصوص تأثيرات مركبات الرصاص العديدة على معظم أعضاء الجسم لذا صممت هذه التجربة لمعرفة التأثير السمي لخلاات الرصاص وبجرعة 300 p.p.m على صورة الدم وتركيز كل من البروتين الكلي و الكولستيرول في الجرذان المختبرية.

المواد وطرائق العمل

1- الجرذان المختبرية

اختير لهذه الدراسة 30 من ذكور الجرذ المختبرية، تم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري \ جامعة بغداد وبأعمار و بأوزان متقاربة، حيث بلغ معدل أوزانها 210 غم وبعمر 8 - 9 أسابيع، جهزت لهذه الحيوانات أقفاص مختبرية خاصة بالجرذان وضعت في البيت الحيواني التابع لقسم الفلسفة في الكلية أعلاه، وقد أجريت هذه الدراسة للفترة الزمنية من 2010\4\1 إلى 2010\5\15 وأخضعت كافة الجرذان لظروف بيئية متشابهة من حيث التهوية والإضاءة (بمعدل 12 ساعة ضوء إلى 12 ساعة ظلام) ودرجة الحرارة (بما يقارب 25 إلى 30 درجة مئوية) والماء والغذاء.

2- مجاميع الدراسة

قسمت الـ 30 جرذاً إلى مجموعتين متساويتين بالعدد و كالاتي:
أ-مجموعة المعاملة: أعطيت خلاات الرصاص بتركيز 300 ppm (وذلك بإذابة 0.3 ملغ من خلاات الرصاص في 1 لتر من ماء الشرب) عن طريق الفم يومياً ولمدة 45 يوماً.
ب-مجموعة السيطرة: أعطيت الغذاء والماء الاعتياديين طيلة فترة التجربة.

3- جمع عينات الدم

بعد انتهاء التجربة خدرت جميع الحيوانات بمادة الكلوفوروم وسحب الدم من القلب عن طريق محقنة طبية ووزع بالتساوي على نوعين من الأنابيب، النوع الأول حاوي على مادة مانعة للتخثر (الهيبارين) لغرض التعرف على صورة الدم في حين وضع الجزء المتبقي من الدم في أنابيب اختبار خالية من مانع التخثر والتي تركت لفترة وجيزة من الزمن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة \ دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض عزل مصل الدم الذي حفظ في درجة حرارة -20م° لحين إجراء قياس مستوى البروتين الكلي و الكولستيرول عليه لاحقاً.

4- صورة الدم

أ-تعداد كريات الدم الحمر (10^6 / مايكرو لتر)
استخدمت شريحة الهيموسايتوميتر لحساب تعداد كريات الدم الحمر ومحلول هائم لغرض تخفيف عينة الدم واستخدمت فيها المعادلة التالية والموضحة في (10):

$$\text{Total RBC (X10}^6/\mu\text{l)} = \text{No.RBC in 5 med.sq.} \times 10000$$

ب-قياس مستوى خضاب الدم (غم/100مل)
تم حساب مستوى خضاب الدم بطريقة Cyanomethemoglobin والموصوفة من قبل (10)، والمعتمدة على تغير الشدة اللونية للنموذج عند قراءتها في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 540 نانومتر وباستخدام المعادلة التالية

$$\text{تركيز الخضاب (غم/100مل)} = \frac{\text{تركيز الخضاب القياسي} \times 251 \times \text{قراءة النموذج}}{1000 \times \text{قراءة الخضاب الأساسي}}$$

ج-حجم الكريات المرصوص (%)
تم قياس هذا الحجم بطريقة الأنابيب الشعرية الموصوفة من قبل (11)، والمعتمدة على قياس حجم الكريات المرصوص (%) بواسطة المسطرة الخاصة لهذا الغرض Hematocrite Reader

د-التعداد الكلي لخلايا الدم البيض (10^9 /لتر)
اتبعت طريقة Dacie & Lewis (12) في حساب الخلايا البيض، وذلك باستخدام شريحة العد المجهرى Hemocytometer حيث تحسب الخلايا الموجودة في أربع مربعات كبيرة ثم تطبق المعادلة التالية

$$\text{عدد الخلايا (خلية/ملم}^3\text{)} = \frac{\text{عدد الخلايا المحسوبة}}{4} \times 20 \times 10^6$$

هـ-التعداد التفريقي لخلايا الدم البيض
تم حسابها بالطريقة الموصوفة من قبل (13)، والمعتمدة على تحضير مسحة الدم المصبوغة بصبغة لشمان، حيث يتم حساب 200 خلية دم بيضاء ثم تحسب النسبة المئوية لكل نوع من أنواعها.

5-حساب البروتين الكلي في مصل الدم

اعتمدت طريقة بايوريت (14) حيث استخدمت عدة التحاليل المجهزة من شركة Randox البريطانية، وبالاتماد على تغير الشدة اللونية للنموذج بعد قراءتها بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 530 نانومتر وبعد تحضير محلول البروتين القياسي من ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin (BSA وباستخدام المعادلة التالية

$$\text{تركيز البروتين الكلي (غم/100مل)} = \frac{\text{شدة امتصاصية محلول الاختبار} \times \text{تركيز المحلول القياسي}}{\text{شدة امتصاصية المحلول القياسي}}$$

6-تقدير الكوليستيرول في مصل الدم

استخدمت عدة التحليل المجهزة من قبل شركة BioMerieux الفرنسية في تقدير الكوليستيرول بالطريقة الإنزيمية التي اتبعها (15)، وقيست شدة الامتصاص عند الطول الموجي 500 نانومتر وبحسب القانون الآتي

$$\text{تركيز الكوليستيرول (ملغم/100مل)} = \frac{\text{شدة امتصاصية محلول الاختبار} \times \text{تركيز المحلول القياسي}}{\text{شدة امتصاصية المحلول القياسي (ملي مول/لتر)}}$$

7- التحليل الإحصائي

تم تحليل نتائج البحث إحصائياً باستخدام تحليل التباين الأحادي ولغرض معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة في المجاميع استخدم اختبار دنكن متعدد الحدود (16) Duncan's Multiple Range Test

النتائج والمناقشة

1-صورة الدم

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي المبينة في الجدول (1) حصول انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في معدل كل من كريات الدم الحمر وتركيز خضاب الدم وحجم الكريات المرصوص للمجموعة المعاملة بخللات الرصاص مقارنة بمجموعة السيطرة. كما أشارت النتائج إلى تأثير مباشر لخللات الرصاص في العدد التفريقي لخلايا الدم البيض حيث لوحظ انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في كل من معدل نسب الخلايا اللمفية للمجموعة المعاملة (0.65 ± 57.81) مقارنة بمجموعة السيطرة (0.45 ± 61.80) والنسب المنوية للخلايا الوحيدة للمجموعة المعاملة (0.03 ± 2.89) مقارنة بمجموعة السيطرة (0.21 ± 3.75). وقد شهدت المجموعة المعاملة بخللات الرصاص ارتفاعاً معنوياً ($P < 0.05$) في معدل النسب المنوية للخلايا العدلة (0.32 ± 37.12) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (0.45 ± 32.18) كما هو موضح في جدول رقم (2).

أشارت الدراسة الحالية إلى حصول انخفاض معنوي في معدل تعداد الكريات الحمر للجرذان المعاملة بخللات الرصاص 300 ppm وقد توافقت هذه الدراسة مع ما قام به الباحث Jain وجماعته (18) حول التأثير المباشر لمركبات الرصاص في إحداث حالة فقر الدم في الأطفال وقد يفسر هذا التأثير إلى التأثير المباشر لهذه المركبات على نقي العظام المسؤول عن تصنيع الكريات الحمر وانقسامها (19).

كما بينت النتائج وجود انخفاض معنوي في معدل تركيز خضاب الدم في المجموعة المعاملة بخللات الرصاص، إن وظيفة كريات الدم الحمر تتركز حول ما تحتويه من خضاب الدم وهو المسؤول الأساسي في وظيفة الكرية الحمراء (20)، ويمكن تفسير هذا الانخفاض بتأثير خللات الرصاص على الإنزيمات المسؤولة عن تصنيع خضاب الدم ويعد أنزيم Aminolevulinic Acid Dehydrates أحد أهم تلك لأنزيمات (21).

وفيما يخص حجم الكريات المرصوص والذي انخفضت نسبته معنوياً في دراستنا الحالية يعتبر معياراً دقيقاً لتعداد الكريات الحمر وتركيز خضاب الدم، وأي خلل في هذه النسبة يمثل التغيرات في أحدهما أو كليهما (22) وهذا ما أثبتته نتائج الدراسة الحالية فيما يخص انخفاض تعداد الكريات الحمر وتركيز خضاب الدم.

أما بخصوص العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض فقد أوضحت النتائج عن وجود ارتفاع معنوي في التعداد الكلي لخلايا الدم البيض والنسبة المنوية للخلايا العدلة وارتفاع غير معنوي للخلايا الحمضة، في حين انخفضت النسبة المنوية للخلايا اللمفية والوحيدة بصورة معنوية مؤيدة ما توصلت إليه الدراسة التي قام بها الباحث (23).

إن الزيادة الحاصلة في عدد الخلايا العدلة والحمضة قد يعود إلى تأثير الرصاص السمي على إحداث التهابات في معظم أعضاء الجسم كالأنسجة الملساء والكبد والكلبتين (24). إن الانخفاض المعنوي الحاصل في النسبة المنوية للخلايا الوحيدة قد يعود إلى التأثيرات الالتهابية، والتي تغادر بها الخلايا الوحيدة خارج مجرى الدم إلى الأنسجة الملتهبة مؤدية إلى انخفاض عددها في مجرى الدم حيث تتحول إلى خلايا بلعمية (25). أما بخصوص الانخفاض الحاصل في الخلايا اللمفية فقد توافقت نتائج الدراسة الحالية مع ما قام به الباحث (26)، حيث أشار إلى تأثير الرصاص على المادة الوراثية للخلايا اللمفية.

2-معدل تركيز البروتين الكلي في المصل (غم/100مل)

أوضحت النتائج إن استخدام خلايا الرصاص في مجموعة المعاملة قد أدى إلى حصول انخفاض معنوي بنسبة ($P < 0.05$) في معدل تركيز البروتين الكلي (0.16 ± 5.20) مقارنة بمجموعة السيطرة (0.35 ± 6.40) كما هو مبين في الجدول رقم (3) .

أظهرت الدراسة الحالية انخفاضاً معنوياً في تركيز البروتين الكلي مما يشير إلى إن لمركبات الرصاص تأثير على تصنيع وأيض تلك البروتينات في الكبد (8) ، وقد أشير إلى هذا التأثير من قبل الباحث (27) في إن التعرض للرصاص يحدث ضرراً في الخلايا الكبدية ، وقد يكون سبب انخفاض تركيز البروتينات إلى زيادة عمليات هدم البروتين بتأثير الرصاص متمثلة بارتفاع مستوى اليوريا في مصل الدم (28) ، ونعتقد إن سبب الانخفاض قد يعود إلى تأثير الرصاص السمي على وظيفة الكية بشكل عام وهذا لا يتعارض كثيراً مع التفسيرات أعلاه .

3- تركيز الكولستيرول في مصل الدم (ملغم/100مل)

أشار الجدول رقم (3) إلى حدوث ارتفاع معنوي بنسبة ($P < 0.05$) في معدل تركيز الكولستيرول في مصل المجموعة الأولى (1.1 ± 75.22) مقارنة بالمجموعة الثانية (1.2 ± 61.11) .

اتفقت نتائج دراستنا مع ما توصل إليه الباحث (9) والذي أشار بها إلى تأثير الرصاص في عملية تكوين الكولستيرول في الكبد من خلال تحفيز الإنزيمات الخاصة به ، وفي دراسة أخرى فسرت الزيادة الحاصلة في الكولستيرول نتيجة التسمم بمركبات الرصاص عن طريق تقليل تكوين أملاح الصفراء المسؤولة عن التخلص من الكولستيرول الموجود في الكبد (29) .

... نستنتج من نتائج هذه الدراسة إن لخلايا الرصاص تأثيراً سلبياً ومباشراً على نقي العظام ينعكس على صورة الدم وتأثيراً ساماً على الكبد محدثاً اضطرابات في تركيز البروتين و الكولستيرول في مصل الدم لذا يجب الحذر من التعامل مع هكذا مركبات مستقبلاً .

جدول - 1 : تأثير خلايا الرصاص على معدل كريات الدم الحمر وخضاب الدم وحجم الخلايا المرصوص في الدم للجردان

المعيار	المجموعة المعاملة بخلايا الرصاص الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	مجموعة السيطرة الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	*المديات الطبيعية
كريات الدم الحمر (10^6 / مايكرو لتر)	0.12 ± 4.95 a	0.15 ± 6.81 b	9.6 – 7.2
خضاب الدم (غم / 100 مل)	0.31 ± 9.75 a	0.14 ± 11.33 b	19.2 – 11
حجم الخلايا المرصوص (%)	0.54 ± 28.11 a	1.85 ± 34.91 b	54 – 36

جدول -2: تأثير خلاص الرصاص على التعداد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض في الجرذان

المعيار	المجموعه المعامله بخلاص الرصاص الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	مجموعه السيطرة الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	*المديات الطبيعيه
العده الكلي لخلايا الدم البيض (10^9 / لتر)	0.11 ± 7.95 a	0.09 ± 6.81 b	18 – 6
الخلايا العده (%)	0.32 ± 37.12 a	0.45 ± 32.18 b	30 – 10
الخلايا للمفيه (%)	0.65 ± 57.81 a	0.45 ± 61.80 b	85 – 65
الخلايا الحمضه (%)	0.19 ± 2.45 a	0.14 ± 1.97 a	6 – 0
الخلايا الوحده (%)	0.03 ± 2.89 a	0.21 ± 3.75 b	5 – 0
الخلايا القاعديه (%)	0.03 ± 0.16 a	0.02 ± 0.15 a	1 – 0

جدول -3: تأثير خلاص الرصاص على معدل البروتين الكلي و الكولستيرول في مصل دم الجرذان

المعيار	المجموعه المعامله بخلاص الرصاص الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	مجموعه السيطرة الوسط الحسابي $\pm$ انحراف معياري	*المديات الطبيعيه
البروتين الكلي (غم / 100 مل)	0.16 ± 5.20 a	0.35 ± 6.40 b	7.6 – 5.6
الكولستيرول (ملغم / 100 مل)	1.1 ± 75.22 a	1.2 ± 61.11 b	130 – 40

* هذه القيم تمثل معدل المديات الطبيعى لمعايير الدم في الجرذان من مصادر مختلفه حيث سجل مدى واسع لهذه القيم . وقد يرجع هذا الاختلاف إلى عمر وجنس ونوع الجرذان المستخدمه وطريقه أخذ النموذج وطريقه عمل الاختبارات لذلك من الصعبه تحديد هذه المديات بصوره دقيقه ويمكن استخدامها كمرشد لقيم تلك المعايير فقط (17) .

المصادر

1. Kunkle, D.B. The toxic emergency. J. Emergency. Med., 18:207-217, (1986).
2. Healy, M.A. & Aslam, M. The lead sandwich syndrome. Nurse Time, 77:1598-1599, (1981)
3. Hernberg, S. Lead poisoning in historical perspective. Am. L. Ind. Med., 38:244-254, (2000)
4. Coper, W.C. Cancer mortality patterns in the lead industry. NY. Acad. Sci., 271:250-259, (1976)
5. Goyer, R.A. Lead. In: Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds. Seiler, H.G. & Sigel, H. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, PP: 359-382, (1988).
6. Greenberg, M.I.; Hamilton, R.J.; Phillips, S.D. & McCluskey, G.J. occupational Industry, and Environmental Toxicology. 2nd ed. Mosby Co. USA. P:864 (2003)

7. Jaff, E.K.; Martins ,J.; Dunbrack , R.L. The molecular mechanism of lead inhibition of human prothobilinogen synthase .J. Biol .Chem .,276 (2) : 1531-1537,(2001)
8. Dufor ,D. Evaluation of liver function and injury. In: Clinical Diagnosis of Management by Laboratory Methods . 20th ed .Henry ,J.(ed) . Saunders Co. p:264 (2001)
9. Mudipalli , A. Lead hepatotoxicity and potential health effect . Indian J. Med . Res., 126 :518-527,(2007).
10. Coles ,E.H. Veterinary Clinical Pathology .3^{ed} ed .W.B. Sanders . Co . Philadelphia PP:190-192 ,(1980).
11. Hillman ,R.S.& Ault, K.A. Hematology in Clinical practice. 3rd ed. co , New York.p:165(2002).
12. Dacia, J.V.& Lewis, S.M. Practical Hematology . 6th ed., Edinburgh Churchill Livingstone .pp:40-55 .(1984).
13. Schalm , O.W. Veterinary Hematology . Lee & Febiger , Philadelphia.pp:664.(1965)
14. Tietz , N.W. Fundamental of Clinical Chemistry . 2nd ed . W.B. Saunders Co., Philadelphia . pp:70-510 .(1982).
15. Richmond, W. Preparation and properties of cholesterol oxidase from *Nocard* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol . Clin . Chem ., 19:1350-1365. (1973).
16. Scheffler,W.C. Statistics for Biological Science. 2nd ed. Addison Wesley, Pup. Co.London, Amsterdam. pp:121.(1980).
17. Karen, H.and Leticia, M. Clinical Laboratory Animal Medicine : An Introduction , 3^{ed}by John Wiley and Sons, Inc. PP: 87-120(2007).
18. Jain , N.B. ; Laden ,F; Guller , U., Shanker, A., Kazani ,S. & Garshike ,E. Relation between blood lead levels and childhood anemia in India . Am . J. Epidemiol ., 161 (10): 968-973. (2005).
19. Rio, B., Froqute, R., Parent-Massin , D. In vitro effect of lead acetate on human erythropoietic. Cell Biol. Toxicol.,17:41-50.(2001).
20. Vander , A.J.; Sherman , J.H. & Luianom ,D.S. Human Physiology .6th,ed ., McGraw-Hill Inc .USA .(1994).
21. Bergdahi, I.A. ; Grubb,A.; Schutz ,A.; Desnick , R.J.; Wetmur ,J.G.; Sassa ,S & Skerfving , A. Lead binding to d-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD)in human erythrocytes , Pharmacol. Toxicol., 87:153-158.(1997).

22. Patil,A.J.; Bhagwat ,V.R.; Patil , J.A.; Donger , N.N. Ambekar ,J.G.; Jailkhani , R .& Das , K. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers(BMW) of western Maharashtra (india) with reference to heme biosynthesis. *Int . J. Environ . Res. public Helth*.3(4):329-337.(2006)
23. Mugahi , M.N., Heidari , Z., Sagheb, H.M. ., Barbarestain , M. Effect of lead acetate intoxication on blood indices of male rat . *DARU* ,11(4) :147-151. (2003).
24. Sengupta, M. & Bishayi, B. Effect of lead and arsenic on murine macrophage response . *Durg Chem .Toxicol .*, 25(4): 459-472 . (2002).
25. Tizand , I.C. *An Introduction to Veterinary Immunology* . 2nd edition Italy . (1990).
26. Shaik , A.P., Sankar ,S.; Reddy, S.C.; Das ,P.G.& Jamil, K. Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of human :In vitro studies. *Drug & Chemical Toxicol .*, 29(1):111-124 .(2006).
27. Sipos , P.; Szentmihalyi K.; Feher ,E.; Abaza, M.; Szilagyi, M. & Blazovics, A. Some effects of lead contamination on liver and gallbladder bile . *Acta Biol. Szeged .*, 47(1-4): 139-42.(2003).
28. Ashour,A.A.; Yassin, M.M.; Abuassi,N.M. & Ali ,R.M. Blood , serum glucose and renal parameter in lead – loaded albino rats and treatment with some chelating agents and natural oils . *Turkish J.Biol* , 31 : 25-34 . (2007)
29. Hami ,J.; Dashti , J.H.; Nemat-Bakhsh, M.; Afshar , M.& Jhaffari ,H.R. The relationship between high dose lead exposure and serum lipids and lipoprotein levels. *Shiraz E-Med.J.*,7(2):1-7.(2006)

دراسة وراثية جزئية عن تأثير الملوحة في بعض عزلات بكتريا العقد الجذرية (*Sinorhizobium meliloti*) المعزولة من الترب العراقية

فضال نعمة حسين¹ و حرب عادل² وعلي عبد الرحمن³

¹جامعة بغداد، كلية التربية ابن الهيثم

²وزارة الزراعة، مركز البحوث الزراعية

³مركز بحوث التقانات الاحيائية، جامعة النهرين

تاريخ تقديم البحث 2010/2/28 - تاريخ قبول البحث 2010/10/5

ABSTRACT

The present study included an isolation of ten local strains of *Sinorhizobium meliloti*, from root nodules of alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) The plants were collected from different agroclimatic locations of Baghdad and from other regions of Iraq. Four strains were obtained from different sources were also included in this study. The salt tolerances for these strains were studied using; NaCl. The effects of salt on some genetic features were also studied under stress condition in comparison with the normal conditions.

The salt tolerance of the all isolates to NaCl was determined by using Mannitol Salt Yeast extract (MSY) solid medium supplemented with different concentrations of these salts, from 0.5% to 6% with intervals of 0.5 %. The results showed that three isolates (Sm8, Sm10, and Sm12) were tolerated up to 6% concentration for the both types of salts. One isolate (Sm1) can tolerate up to 1.5 % for the both salts. The tolerance of remaining isolates varied between 1.5% and 6% concentrations of NaCl. Four isolates were selected for further studies, Sm10 (tolerated), Sm1 (sensitive), Sm6 and Sm9 (semi-tolerate).

The growth curves for Sm10 isolate were studied under normal and stress conditions. The results revealed decreasing in growth rates after 6-72 hours from incubation under stress conditions in comparison with normal conditions. The highest effect of salt stress on growth rates were found after 6-24 hours from incubation.

Total cell proteins and Surface Lipopolysaccharides (LPS) molecules for all isolates were isolated. Patterns were obtained by sodium dodesyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under normal and salt stress conditions and the changes in protein and LPS profiles were observed.

Plasmids for all the isolates were isolated and observed using agarose gel electrophoresed. No changes in plasmid numbers for Sm1, Sm6 and Sm9 isolates. Two plasmids with low molecular weights were missing in Sm10 isolate in comparison with the other isolates.

The results confirm that salt tolerant strain showed alterations in certain biochemical and genetical characterizations. These changes may constitute adaptive responses to salt, allowing normal growth

الخلاصة

تم عزل وتنقية وتشخيص عشر عزلات من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت المزروعة في مناطق مختلفة من العراق، فضلاً عن اربع عزلات تم الحصول عليها من مصادر اخرى. اختبرت هذه العزلات لتحملها لتركيز متزايدة من ملح كلوريد الصوديوم، وكذلك دراسة تأثير الملوحة في بعض الصفات البايوكيميائية و الوراثة للعزلات، تحت ظروف الشد الملحي مقارنة بالظروف الطبيعية.

بينت النتائج تحمل ثلاث عزلات لغاية 6% من الملح وهي (Sm8، Sm10 و Sm12)، وعزلة واحدة حساسة Sm1 تحملت الى 1.5%، بينما كانت بقية العزلات متوسطة التحمل حيث تراوحت قابليتها لتحمل

نضال و حرب وعلي

الملح بين هذين التركيزين. اختيرت اربع عزلات احدها عالية التحمل للملح (Sm10) والاخرى حساسة للملح (Sm1)، واثنان متوسطتا التحمل (Sm6, Sm9)، لاجراء الدراسات اللاحقة عليها .

تم دراسة وحساب منحني النمو للعزلة المتحملة للملوحة (Sm10) في الظروف الطبيعية وظروف الشد الملحي وبيئت النتائج حدوث انخفاض في النمو الحاصل تحت ظروف الشد الملحي بدءا من فترة نمو 6-72 ساعة مقارنة بالظروف الطبيعية، وكان اعلى تأثير للشد الملحي في النمو في الفترة ما بين 6 - 24 ساعة. عزلت البروتينات الخلوية وجزيئات متعددة السكريات الدهني (LPS) Lipopolysaccharides السطحية من العزلات الاربعة قيد الدراسة والنامية في الظروف الطبيعية وظروف الشد الملحي، وبيئت النتائج بعد ترحيلها على هلام متعدد الاكريلاميد، حدوث عدد من التغيرات بتأثير ظروف الشد الملحي. تم عزل البلازميدات من العزلات الاربعة، وبعد ترحيلها على هلام الاكاروز لوحظ تشابه الطرز البلازميدية لجميع العزلات ماعدا العزلة المتحملة للملح Sm10 فانها كانت فاقدة للبلازميد الصغير الحجم التي ظهرت في باقي العزلات يتضح من النتائج ان العزلات البكتيرية المتحملة للملوحة قد تغير من بعض خصائصها البايوكيميائية والوراثية لكي تصبح قادرة على تحمل الشد الملحي.

المقدمة

تعد الملوحة تهديدا حقيقيا للزراعة في المناطق الجافة وشبه الجافة وان حوالى 40% من التربة الصالحة للزراعة على سطح الارض يمكن ان تصنف على انها مهددة بمشكلة الملوحة. وان كل من النبات البقولي والبكتريا المتعايشة معه يتأثران بالملوحة (1). تشير معظم الدراسات الى ان الملوحة تؤثر على النبات البقولي والرايزوبيا، وعلى العلاقة التعايشية بينهما من خلال تأثيرها على حيوية وبقاء البكتريا وتكاثرها في التربة وتثبط عملية اصابتها لجذر النبات، التي تمنع تكون العقد الجذرية، والتي تؤثر في وظيفة العقدة الجذرية، مقللة نمو النبات والتركيب الضوئي، كما تسبب انخفاضا في وزني النبات والعقد الجاف، وكذلك في عدد العقد الجذرية (2,3,4). انطلاقا من الاهمية الاقتصادية للنباتات البقولية والرايزوبيا المتعايشة معها ومنها نبات الجب، حيث ينمو في التربة الفقيرة والمستنزفة كمحصول علقي للحش او كعلف جاف، وهو ليس فقط يزود بأعلاف ذات محتوى بروتيني عالي الجودة، ولكنها تكون غنية ايضا بالجزيئات الفعالة بايولوجيا مثل الفيتامينات والمعادن وغيرها من المغذيات، (5). ان البكتريا التي تتعايش مع الجب (*Sinorhizobium meliloti*) قادرة على تثبيت النتروجين الجوي بالتعايش معه مما يرفع كتلته الانتاجية مضيفا النتروجين للنظام الزراعي، لذا فان هذه البكتريا تعد ذات قيمة زراعية وبيئية، لاسيما في النظام البيئي وعلاقته بالتربة والمحاصيل، حيث كمية العلف ونوعيته يعتبران عاملان محددان في تغذية المواشي. ان الحصول على نظام تعايشي متحمل للشد الملحي يمكن ان يلعب دور كبير في تحسين ملوحة التربة (6).

البروتينات الخلوية في الرايزوبيا تشمل جميع بروتينات الخلية التركيبية منها ونواتج تعبير الجينات المختلفة (7)، والانزيمات المختلفة وبروتينات النواقل الخلوية (8)، ولهذا فانها تتأثر كثيرا بتغير عوامل البيئة كالشد الملحي وتظهر طرز مظهرية مختلفة بعد ترحيلها على هلام متعدد الاكريلاميد (7,9).

الرايزوبيا مثل غيرها من البكتريا السالبة لصبغة جرام، تنتج انواعا من متعددات السكريات السطحية والتي تشمل Capsular polysaccharides (CPS), Lipopolysaccharides (LPS), Exopolysaccharides (EPS), Periplasmic β -glucans (10) وهي مركبات كبيرة تنشأ على سطح خلايا البكتريا السالبة لصبغة جرام ومنها الرايزوبيا، وتعتبر اساسية في غشاء البكتريا السالبة (11,12).

ان LPS, EPS لهما دور مهم في اصابة الرايزوبيا للشعيرة الجذرية وتمازها الى بكتريود داخل العقدة. بيئت الدراسات بان الرايزوبيا المعزولة من تربة مالحة تظهر تغيرات في طرز متعدد السكريات الدهني بعد ترحيله على هلام متعدد الاكريلاميد مقارنة بالعزلات التي تعيش بالظروف الطبيعية (13).

تحتوى بكتريا *S. meliloti* في السلالة (المصدر) 1021، على ثلاث وحدات وراثية هي: الكروموسوم واثنين من البلازميدات التعايشية الكبيرة Megaplasmid هما pSymA ، pSymB بوزن (1 و 700) كيلو زوج قاعدي على التوالي، فضلا عن ذلك فإن العديد من السلالات الطبيعية المتواجدة في التربة ، تحتوي على واحد او اكثر من البلازميدات الاصغر حجما والتي تمثل مجين اضافي لهذه السلالات (14). تؤثر عوامل البيئة كالشد الملحي والحرارة العالية على المحتوى البلازميدى للرايزوبيا ان انتخاب سلالات من الرايزوبيا المتحملة للملوحة وذو كفاءة عالية في تثبيت النتروجين من الاهداف المهمة لاجل تحسين التربة والحصول عتى ناتج بقولى عالى ، لذا فان هدف البحث هو دراسة تأثير الشد الملحي على بعض الصفات البايوكيميائية والوراثية لبكتريا الرايزوبيا المتحملة للشد الملحي والمعزولة من مناطق مختلفة من العراق .

المواد طرائق العمل

العزلات البكتيرية المستخدمة وظروف النمو

تم عزل وتنقية عشر عزلات محلية من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجبب (alfalfa (*Medicago sativa* L.) من مناطق مختلفة من اضافة الى عدد من المحافظات الاخرى. وكذلك تم الحصول على عزلتين محليتين من السيد ابراهيم/ جامعة ديالى وعزلتان احدثهما محليتين والاخرى غير محلية من الدكتور امل نعوم يوسف (وزارة الزراعة/الهيئة العامة للبحوث الزراعية) كما موضح في الجدول (1) . استخدم وسط مستخلص الخميرة-المانيتول الملحي (MSY) Mannitol salt-yeast extract medium والموصوف من قبل (15) فى نمو بكتريا الرايزوبيا. وقد تم عزل البكتريا حسب طريقة (16). تم قياس منحنى نمو البكتريا النامية فى الظروف الطبيعية وظروف الشد الملحي من خلال قياس الكثافة

الضوئية Optical density وخلال 72 ساعة بجهاز Spectrophotometer وعلى طول موجى 590 نانوميتر.

اختبار تحمل العزلات البكتيرية لظروف الشد الملحي

تم اضافة اوزان متصاعدة من ملح كلوريد الصوديوم النقي، الى الوسط الزراعي MSY الصلب، قبل التعقيم بواقع الاوزان من 0.5 الى 6.0 غرام في 100 مليلتر من الوسط وبفارق 0.5 غرام لكل معاملة. زرعت العزلات بطريقة التخطيط على الاطباق ثم حضنت في حاضنة على درجة حرارة 28 ± 2 م لمدة 2-3 ايام وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز اضافة الى السيطرة التي تم زرع البكتريا فيها في الوسط الخالي من الملح (17).

استخلاص البروتينات الخلوية، متعدد السكريات الدهنى (LPS) والبلازميدات

تم استخلاص البروتينات الخلوية الكلية من بكتريا العقد الجذرية حسب الطريقة الموصوفة من قبل (18) . اما عملية استخلاص الـ LPS فقد تمت حسب الطريقة الموصوفة من قبل (19) تم ترحيل البروتينات الخلوية ومتعدد السكريات الدهنى على هلام متعدد الاكريلاميد القلوى كما فى (20)

والمعتمدة اساسا على (21).

تم عزل الدنا البلازميدى بطريقة التحلل القاعدي Alkaline Lyses الموصوفة من قبل (22) . تمت عملية الترحيل الكهربائي للبلازميدات على هلام الاكاروز حسب ماورد فى (23)

النتائج و المناقشة

اختبار تحمل عزلات بكتريا العقد الجذرية للشد الملحي

اظهرت عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة من مناطق مختلفة من العراق تباين واضح في تحملها للملح

حيث ان العزلة Sm1 (سليمانية) كانت اقل قدرة على تحمل الملح وبلغت درجة تحملها 1.5% ، اما العزلات IsnB و Sm10 و ابو غريب ، فأنها تحملت اعلى تركيز من الملح، حيث تحملت لغاية 6% ، اما باقي

العزلات فتدرجت بين ذلك حيث تحملت العزلات Sm2 و Sm4 و Sm5 و Sm6 تركيز 2.5% من ملح NaCl، في حين اشتركت العزلات Sm3 و IsnD و Sm9 و Sm13 و Sm14 بتحملها لتركيز 3% من ملح NaCl و العزلة Sm11 تحملت 3.5% من NaCl، (جدول 2) استنادا الى نتائج اختبار تحمل العزلات للشد الملحي فقد تم اختيار اربعة عزلات مختلفة في درجة تحملها للملح والتي سيتم اجراء الدراسات اللاحقة عليها كما موضح في الجدول (3) تأثير الشد الملحي في نمو بكتريا العقد الجذرية (العزلة Sm10)

بين منحني النمو للعزلة المتحملة للملوحة Sm10 بتأثير الملح NaCl (بتركيز 6%) فضلا عن السيطرة والموضحة في الشكل (1) بأن النمو كان ضعيفا خلال الـ 24 ساعة الاولى مقارنة بالسيطرة والتي بلغت مستوى جيد من النمو من خلال قياس الكثافة الضوئية (Optical density OD)، ثم بدأت بالنمو والنشاط بعد ذلك حتى 72 ساعة الا انها بقيت في مستويات ادنى من الطبيعية.

تأثير الشد الملحي في الطرز المظهرية للبروتينات الخلوية على هلام متعدد الاكريلاميد الترحيل الكهربائي للبروتينات الخلوية المعزولة من بكتريا العقد الجذرية للعزلات الاربعة قيد الدراسة

في الظروف الطبيعية وظروف الشد الملحي (بأستعمال تركيز الملح الذي تحملته كل عزلة) بينت العديد من الاختلافات كما في الشكل (2) يبين الشكل ان العزلة Sm1 (ضعيفة التحمل) في الظروف الطبيعية اظهرت 3 حزم بأوزان جزيئية (140)

و (32) و (18) x 10³ دالتون، اما في ظروف الشد الملحي، فقد اظهرت 4 حزم بأوزان جزيئية (123) و (57) و (40) و (20) x 10³ دالتون، حيث يلاحظ ظهور الحزمة ذات الوزن الجزيئي 57 x 10³ دالتون وهي حزمة اضافية، وكذلك فإن الحزم الثلاثة الاخرى اختلفت قليلا في الوزن الجزيئي.

اما العزلة Sm6 (متحملة) في الظروف الطبيعية اظهرت 4 حزم بأوزان جزيئية (140) و (57) و (31) و (18) x 10³ دالتون، اما في ظروف الشد الملحي فقد اظهرت ايضا 4 حزم بأوزان جزيئية (130) و (57) و (30) و (17) x 10³ دالتون، ويلاحظ ايضا ان الحزم تكاد تكون متماثلة.

العزلة Sm9 (المتحملة) في الظروف الطبيعية اظهرت 4 حزم بأوزان جزيئية (132) و (48) و (21) و (15) x 10³ دالتون، اما في ظروف الشد الملحي فقد اظهرت 5 حزم بأوزان جزيئية (123) و (33) و (16) و (14) و (12) x 10³ دالتون، ويلاحظ انخفاض اوزان الحزم الناتجة وزيادة عددها، حيث ظهرت حزمة جديدة في ظروف الشد الملحي هي بوزن (12) x 10³ دالتون، اضافة الى تغير الاوزان الجزيئية للحزم بشكل بسيط.

العزلة Sm10 (العالية التحمل) في الظروف الطبيعية اظهرت 4 حزم بأوزان جزيئية (113) و (48) و (18) و (14) x 10³ دالتون، اما في ظروف الشد الملحي فقد اظهرت ايضا 4 حزم ولكن باختلاف كبير في اوزانها الجزيئية حيث كانت (130) و (55) و (33) و (22) x 10³ دالتون، ويلاحظ انها في ظروف الشد الملحي تميل الى انتاج حزم بأوزان جزيئية مرتفعة

، حيث تخففي الحزم منخفضة الوزن الجزيئي (14) و(18) $10^3 \times$ دالتون، وظهرت حزم مرتفعة الوزن هي (33) و(22) $10^3 \times$ دالتون، على التوالي. وبشكل عام، يمكن ملاحظة ان الحزم منخفضة الوزن الجزيئي لجميع العزلات في ظروف الشد الملحي تزداد في التآلق مما يعني ان كمية الحزم المنخفضة الوزن الجزيئي تزداد.

تأثير الشد الملحي في الطرز المظهرية لمتعدد السكريات الدهني (LPS) على هلام متعدد الاكريلاميد

اظهرت نتائج ترحيل متعدد السكريات الدهني LPS اختلاف كبير و تباين واضح لجميع العزلات في ظروف الشد الملحي مقارنة مع الظروف الطبيعية لنفس العزلة، كما هو موضح في الشكل (3)

العزلة Sm1 (ضعيفة التحمل)، اظهرت في الظروف الطبيعية 5 حزم وفي ظروف الشد الملحي، 5 حزم ايضاً ولكنها تحركت في الهلام اسرع، مما يعني انخفاض وزنها الجزيئي مقارنة بالظروف الطبيعية، حيث اختفت الحزمة الاولى وظهرت حزمة جديدة بين الحزمة الرابعة والخامسة.

العزلة Sm6 (المتحملة)، اظهرت في الظروف الطبيعية 11 حزمة وفي ظروف الشد الملحي 13 حزمة، حيث ظهرت حزمتين اضافية مرتفعة الوزن الجزيئي قبل الحزمة الاولى.

العزلة Sm9 (المتحملة)، اظهرت في الظروف الطبيعية 11 حزمة، وفي ظروف الشد الملحي 8 حزم، حيث اختفت الحزم (5 و 6 و 10) و زادت سرعة حركة الحزمتين الاولى والثانية مما يعني انخفاض وزنها الجزيئي.

العزلة Sm10 (عالية التحمل)، اظهرت في الظروف الطبيعية 12 حزمة وفي ظروف الشد الملحي 10 حزم، وهي مختلفة تماماً في طرازها المظهري مقارنة بالطراز المظهري الناتج في الظروف الطبيعية، حيث اختفت الحزم (1، 6، 8، 10، 11، 12) و زاد تآلق وكثافة الحزمة الرابعة و ظهرت حزمة جديدة بين الحزمة الرابعة والخامسة و حزمتين جديدتين بين الحزمة السابعة والثامنة و حزمة اخرى ظهرت بين الحزم العاشرة والحادية عشر.

الكشف عن طرز البلازميدات

اظهرت نتائج عزل البلازميدات من عزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة، ان ثلاثة من العزلات (Sm1 و Sm6 و Sm9) احتوت على بلازميدين صغيرين، اما العزلة Sm10 (بلد المتحملة للشد الملحي)،

فأنها كانت خالية من البلازميدات الصغيرة او التي تعرف بالبلازميدات المخفية Cryptic plasmids كما في الشكل (4).

ان اى عامل شد كالملوحة والجفاف وغيرها يتعرض لها الكائن الحي يتطلب الى تكيف خلوى لادامة النمو تحت تلك الظروف ، وهذا يفسر بطيء النمو في الـ 24 ساعة الاولى الذى ظهر على العزلة Sm10 تحت ظروف الشد الملحي . تبدأ البكتريا بالنشاط والنمو بمستوى اعلى بعد 24 ساعة وحتى 72 ساعة، ولكنها تبقى اقل نمواً من البكتريا النامية تحت الظروف الطبيعية ، ويبدو أن التراكيز العالية من الايونات مثل (Na , Cl) التي تتراكم في الخلايا وتسبب تقليل نشاط الانزيمات وتنشيط بناء البروتين وهذا بالتالي يشبط نمو البكتريا، (25,26).

اوضحت النتائج الى ان عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة من مناطق مختلفة من العراق متباينة في تحملها لظروف الشد الملحي، وان هذا التنوع ناتج من تنوع مصادر العزلات وهذا

نضال و حرب وعلي

يتفق مع (27) حيث بين الى ان الرايزوبيا المعزولة من تربة غير متأثرة بالملح تكون حساسة للملوحة، اما المعزولة من تربة مالحة تكون متحملة وذات صفات افضل من الحساسة.

ومن النتائج نجد ان كل من العزلات Sm8 و Sm10 و Sm12 ، قد تحملت حتى 6% من ملح NaCl ، وان هذه النتائج تطابق ماجاء في المصادر العلمية، حيث اشار (28) الى انه حصل على 4

عزلات من *S. meliloti* المتحملة لملاح NaCl بتركيز 700 ملي مولر من ضمن عينات عزلت من تربة متأثرة بالملوحة في تونس، وذكر (Shamseldin and Warner, 2005) ، انه حصل على سلالتين من *Rhizobium etli* تحملت 4% من ملح NaCl ضمن سبعة سلالات عزلت من تربة متأثرة بالملح في مصر

من خلال نتائج الترحيل الكهربائي للبروتينات الخلوية على هلام متعدد الاكريلاميد يمكن ملاحظة تأثير الملوحة الواضح في البروتينات الخلوية، ماعدا العزلة Sm6 (ضعيفة التحمل) والتي لم تتأثر بروتيناتها الخلوية بشكل كبير بالشد الملحي. يعتقد بان السلالات المتعرضة لشد ملحي خفيف قد لا تتأثر بروتيناتها الخلوية وكلما زاد تأثير الشد الملحي تتغير البروتينات الخلوية كما ونوعا (30). يؤثر الشد الملحي على البروتينات الخلوية للعزلات قيد الدراسة من خلال ظهور بروتينات جديدة لم تلاحظ في العزلات الغير معرضة للشد الملحي ، وقد يكون التأثير على شكل زيادة او نقصان في الاوزان الجزيئية للبروتينات الخلوية الموجودة اصلا في نفس العزلات تحت الظروف الطبيعية. وان هذه النتائج تتفق مع ما ذكره (31)، حيث اشار الى ظهور بروتينات مرتفعة الوزن الجزيئي في دراسة على انواع مختلفة من الرايزوبيا المعرضة للشد الملحي، و يقترح ان سبب ذلك هو ان الملح يسبب تثبيط للانزيمات المحللة للبروتينات (Proteases). ان التراكيز العالية من الملح والتي قد تصل الى 400 ملي مولر قد تؤدي عكسيا الى تحليل للبروتينات والذي قد يكون السبب في ظهور بروتينات باوزان جزيئية منخفضة في العزلات عالية التحمل (30).

ان تأثير الملوحة الكبير على الطرز المظهرية لـ LPS قد اشير اليه من قبل العديد من الباحثين، حيث ذكرت اغلب الدراسات بان الشد الملحي يسبب تغيرات كمية ونوعية في متعددات السكريات بكل انواعها (LPS, EPS, CPS). فيذكر (32) ان العزلة المتحملة للملوحة من *S. meliloti* انتجت في ظروف الشد الملحي 40% اقل من EPS، وكذلك ذكر الدركزلي (33) ان الرايزوبيا المتحملة للملح بتركيز 5% (NaCl)، والمعزولة من جذور نبات الباقلاء لم تتمكن من انتاج جزيئات LPS في ظروف الشد الملحي مما ادى الى عدم مقدرة البكتريا على اصابة النبات. وأشار (13)، الى وجود تغاير في طرز LPS المظهرية بين العزلات المختلفة والتي عزلت من تربة متأثرة بالملح في مصر، وان التغاير اختلف حسب نوع الرايزوبيا، (كونها معزولة من الباقلاء، اللوبيا او الترمس) ويذكر ان العزلة التي ليست طبيعية التواجد في التربة المالحة تظهر تغاير اقل في طرز LPS الخاصة بها، وان هذا ينطبق على العزلة Sm1 (السليمانية) في هذه الدراسة، كونها اظهرت اقل تغاير في طرز الـ LPS، باعتبارها عزلة حساسة للملح.

ان اختلاف طرز LPS يعكس الاختلاف بين السلالات والانواع، حيث اشار (34)، الى ان طرز LPS متخصصة ضمن السلالة، وهذا واضح في نتائج ترحيل LPS، عند مقارنة الطرز المظهرية للعزلات في الظروف الطبيعية فقط، حيث انها مختلفة فيما بينها، ويمكن اعتبار كل منها سلالة مختلفة عن الاخرى، والرايزوبيا عندما تنتمي الى بكتريود فانها تعاني من تغيرات وتحورات تركيبية في جزيئة LPS وهذه بطريقة ما تتداخل مع ظروف البيئة (35)، بحيث ان البكتريود يتكيف للملوحة او الازموزية العالية عن طريق تحويل تركيب LPS لهذا فان السلالة المتحملة للملوحة قد تكون غير فعالة في اثناء عملية التعايش (36).

اظهرت نتائج عزل البلازميدات المرحلة على هلام الاكاروز، غياب البلازميدات الصغيرة من العزلة المحتملة للملوحة Sm10، ان فقدان البلازميدات الصغيرة لعزلات الرايزوبيا المحتملة للملوحة قد لوحظ في انواع اخرى من الرايزوبيا (13). وعلى الرغم من ان الطراز البلازميدي يمكن ان يعتبر ثابت، الا ان السلالات يمكن ان تفقد اجزاء من البلازميد او البلازميد بكامله بتأثير ظروف البيئة (37)، حيث وجد (38) ان تعريض بعض سلالات الرايزوبيا للحرارة العالية يسبب فقدان البلازميدات.

جدول 1- مصادر العزلات البكتيرية

رمزها	مصدر العزلة
Sm5	بغداد- ابو غريب
Sm13	- الاكاديمية/حديقة كلية التربية
Sm14	- الجادرية
Sm3	الانبار- القلوجة
Sm4	- الرمادي
Sm9	بابل - الحلة
Sm6	السليمانية
Sm1	صلاح الدين- الطارمية
Sm2	- بلد
Sm10	د. امل نعيم- ابو غريب
ابو غريب 510	- عزلة غير محلية
IsnB	السيد ابراهيم- ابو غريب
IsnD	- ديالى

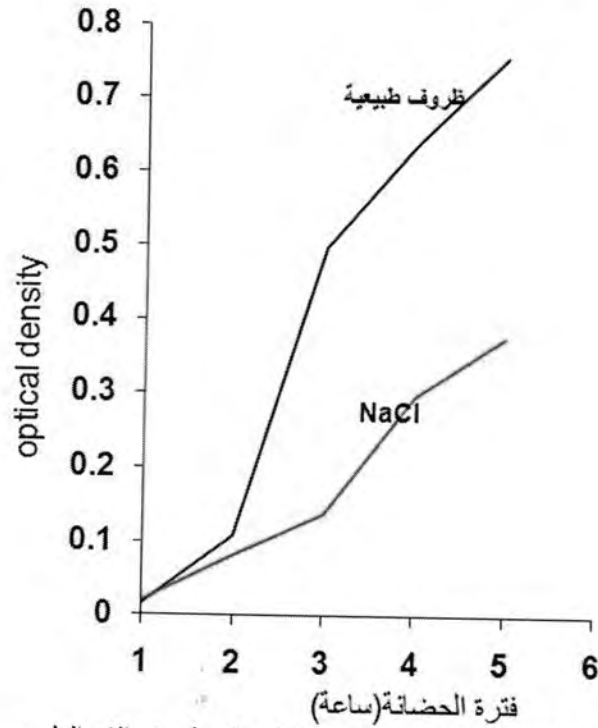
جدول 2- مستويات تحمل العزلات *Sinorhizobium meliloti* لتركيز مختلف من NaCl

اسم العزلة	تركيز ملح NaCl %
Sm1	1.5
Sm2	2.5
Sm3	3
Sm4	2.5
Sm5	2.5
Sm6	2.5
IsnD	3
IsnB	6
Sm9	3
Sm10	6
510	3.5
ابو غريب	6
Sm13	3
Sm14	3

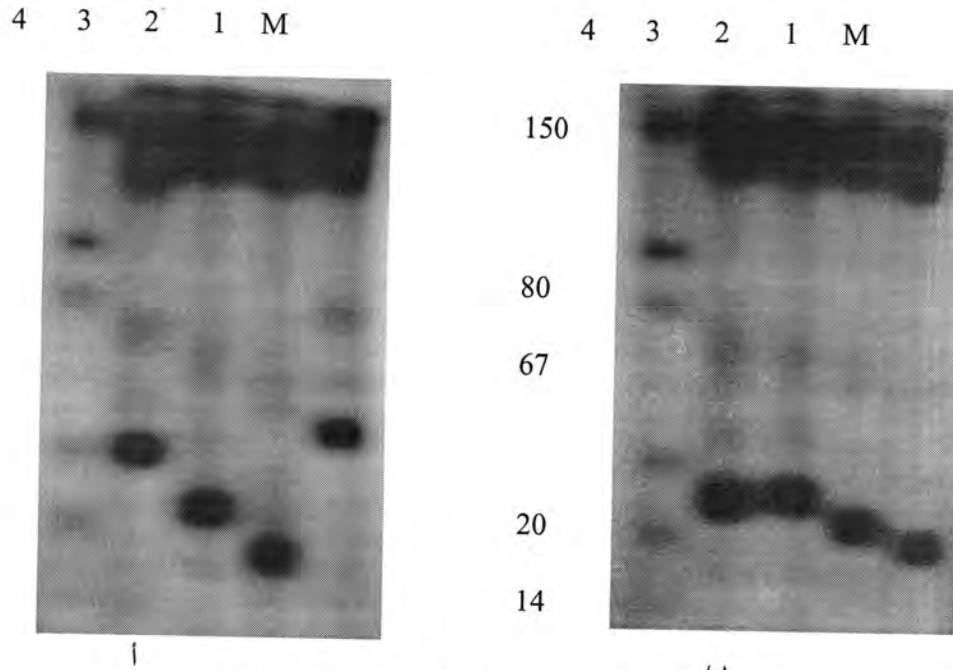
جدول 3- العزلات التي تم اعتمادها في مراحل البحث اللاحقة

اسم العزلة	موقعها	مستوى تحملها من NaCl %	نوعها
Sm1	السليمانية	1.5	ضعيفة التحمل
Sm6	الحلة	2.5	متحملة
Sm9	الرمادي	3	متحملة
Sm10	بلد	6	عالية التحمل

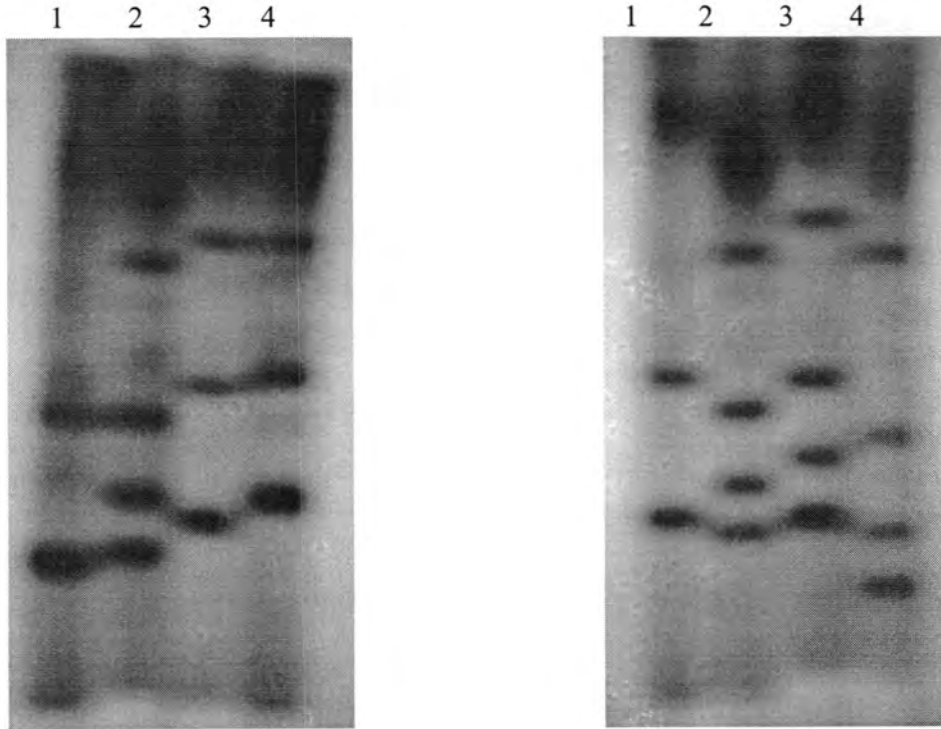
دراسة وراثية جزئية عن تأثير الملوحة في بعض عزلات بكتريا العقد الجذرية (*Sinorhizobium meliloti*) المعزولة من
الترب العراقية
نضال و حرب وعلي



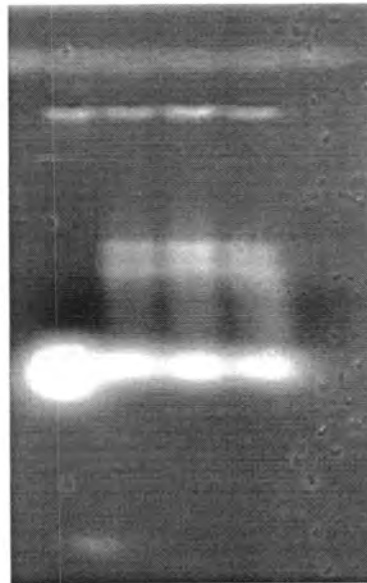
شكل 1: منحنى النمو للعزلة Sm10 تحت الظروف الطبيعية وظروف الشد الملحي



شكل 2: نتائج ترحيل البروتينات الخلوية على هلام متعدد الاكريلاميد 10% ،
أ - في ظروف طبيعية ب- في ظروف الشد الملحي
M، Sm10 -4 ، Sm9 -3 ، Sm6 -2 ، Sm1 -1 -الدليل الحجمي (KD)
-14، Trypsin-20 ، Pepsin -67 ، Transferrin - 80 ، γ -Globulin- 150
Lysozyme



شكل 3- نتائج ترحيل مركبات متعدد السكريات الدهنية (LPS) على هلام متعدد
الأكريلاميد 10% أ - في ظروف طبيعية ، ب في ظروف الشد الملحي حيث (1 -
Sm1 ، 2 - Sm6 ، 3 - Sm9 ، 4 - Sm10)



Plasmid

RNA

شكل 4- ترحيل البلازميدات على هلام الأكاروز 0.8%
(1 - Sm1 ، 2 - Sm6 ، 3 - Sm9 ، 4 - Sm10)

المصادر

1. Saadallah, K.; Drevon, J.J.; Hajji, M. and Abdelly, C. Genetic variability for Tolerance to salinity of N₂- fixing common bean (*Phaseolus vulgaris*). Agronomic, 21:675- 82.(2001).
2. Delgado, M. J.; Ligerio, F. and Lluch, C. Effect of salt stress on growth and Nitrogen fixation by Pea, Faba-bean, common bean and Soybean plants. Soil. Biol. Biochem. 26: 371-6(1994).
3. Sadiki, M. and Rabih, K. Selection of chickpea (*Cicer arietinum*) for yield and symbiotic nitrogen fixation ability under salt stress. Agronomie, 21 : 659- 66(2001).
4. Bolaños, L., El-Hamdaoui, A. and Bonilla, I. Recovery of development and of nodules and plant growth in salt- stressed *Pisum sativum*-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis by boron and calcium(2003).
5. Burris, R. and Roberts, G. Biological nitrogen fixation. Annual, 13:317-35.(1993).
6. Zahran , H.H. Diversity , adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments .Biol. Fertil ,Sci. , 25 : 211 – 23(1997).
7. Ahmad, G.S.D. Biodiversity and performance of *Rhizobia* in relation to plasmid genes and their translational products. J. Biological Sci., 1(12):1134-7(2001).
8. الكسندر، مارتن. مقدمة في مايكروبيولوجيا التربة. جامعة كورنيل. مترجم، مطبعة جون وايلي واولاده، نيويورك(1988).
9. Rüberg, S.; Tian, Z.- X.; Krol, E.; Linke, B.; Meyer, F.; Wang, Y.; Pühler, A.; Weidner, and Becker, A. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. J. Biotechnol., 106:255-68(2003).

10. Brewin, N.J. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. *Cell Biol.*, 7:191-226(1998).
11. Ridley, B.; Jeyaretnam, B. and Carlson, R. The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient *Rhizobium* lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method. *Glycobiology*, 10(1013-1023) (2000).
12. Lerouge, I.; Laeremans, T.; Verreth, Ch.; Vanderleyden, J.; Van Soom, C.; Tobing, A and Carlson, R. Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O- antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional and structural analysis of an LPS mutant deficient in O- antigen. *J. Biol. Chem.*, 276(2): 17190-98(2001).
13. Zahran , H.H. Characterization of root – nodule bacteria indigenous in the salt – affected soils of Egypt by lipopolysaccharide , protein and plasmid profiles. *J. Basic Microbiol .* 32 : 4, 279 – 287(1992).
14. Flores, M., Mavigui, P., Girard, L., Perret, X.; Broughton, Martinez-Romero, E. and Davila, G. Three replicons of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 harb or symbiotic gene sequences. *J. Bacteriol.*, 180(22): 6052-53(1998).
15. Khanuja, S. P. and Kumar, S. Symbiotic and galactose utilization properties of phage RMP 64-resistant mutants affecting three complementation groups in *Rhizobium meliloti*. *J. Genet.*, 68(2): 93-108(1989).
16. Vincent , J.M. A manual for the practicl study the root-nodule bacteria I.B.P hand book No. 15. Blackwell Scintific Publication Ltd., Oxford(1970).

17. Sadowsky, M.; Keyser, H. and Bohlool, B. Biochemical characterization of fast and slow- growing Rhizobia that nodulate soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol., 33(4): 716-22(1983).
18. Lipsanen, P. and Linström, K. Lipopolysaccharide and protein patterns of *Rhizpbium* sp.(galega). FEMS Microbiol. Letters, 58:323-8(1989).
19. Hitchcock, P. and Brown, T. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharides chemo types in silver stained polyacrylamide gel. J. Bacteriol., 154:269-77(1983).
20. Garfin, D. E. One- dimensional gel electrophorsis. In: Methods in Enzymology. Vol.182(ed. By Murrey P. Deutscher) pp. 425-439. New York ,London, Academic press(1990).
21. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-85(1970).
22. Sambrook, J.; Fritsh, E. and Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989).
23. Maniatis, T.; Fritsch, E. and Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory. New York(1982).
24. Brown, T. A. Gene cloning. Van Nostrand Reinhold Co. Engeland(1986).
25. Greenway, H. and Munns, P. Mechanism of salt tolerance in non halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol., 34:149-59(1980).
26. Taiz , L. and Zeiger , E. Plant physiology. Sinauer Associates , Inc. Publishers , Massachusetts , 792 pages(1998).
27. Jenkins, M. B. Rhizobial and Bradyrhizobial symbionts of mesquite from the Sonoran desert: salt tolerance, facultative halophily and nitrate respiration. Soil Biol. Biochem., 35:1675-82(2003).

28. Jebara, M.; Aouani, M. E.; Mhamdi, R. and Mars, M. Effect of salt on *Sinorhizobium* sp. Isolated from Tunisia either *in vitro* or in association with *Medicago* sp. Agriculture, 9(2):99-102(2000).
29. Shamseldin, A. and Werner, D. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. Curr. Microbiol., 50(1): 11-16(2005).
30. Soussi, M.; Santamaria, S.; Ocana, A. and Lluch, C. Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. J. Appl. Microbiol., 90 (3) : 476-82(2001).
31. Saxena, D. ; Amin , M. and Khanna , S . Modulation of protein profiles in *Rhizobium* sp. Under salt stress. Canadian J. Microbiol . , 42 : 617 – 20(1996).
32. Lloret, J.; Wulff, B.; Rubio, J.; Downie, J.; Bonilla, I. and Rivilla R. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol., 64(3): 1024-8(1998).
33. الدركزلي، محمد عبد الجليل. عزل وتشخيص بكتريا الرايزوبيا المتحملة للملوحة ودراسة تأثيرها في العلاقة التكافلية مع نبات الباقلاء (*Vicia faba*). رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم/ جامعة بغداد(2004).
34. Yang, F.-L. and Lin , L. – P ., Cytostructure, Lipopolysaccharides , and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii* , Bot. Bull. Acad. Sci., 39 : 261-7 (1998).
35. Kannenberg, E. L.; Reuhs, B.; Forsberg, L. and Carlson, R. Lipopolysaccharides and K-antigenes : their structures, biosynthesis and functions. pp. 119-154. In: -fixing symbioses between Rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* . Academic dissertation. Division of microbiology. University of Helsinki. Finland(1998).
36. Räsänen, L. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between Rhizobia and the woody legumes

- Acacia* and *Prosopis*. Academic dissertation. Division of microbiology. University of Helsinki. Finland(2002).
37. Zhang, X. – X.; Kosier, B. and Priefer, U.B. Symbiotic plasmid rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* VF39SM. J. Bacteriol. , 183(6) : 2141 – 2144 (2001b).
38. Raposeiras, R., Pinto, P.P.; Passos, R. V. M.; Seldin, L.; Paiva, E.; Scotti, M. R. and Sa, N. Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. Braz. J. Microbiol. 33: 22-28(2002).

اضداد الشحميات الفسفورية ومجاميع الدم في النساء ذوات الأجهزة العفوي المتكرر

ميثاق جاسم حسين الجبوري
كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية

تاريخ تقديم البحث 2008/10/21 - تاريخ قبول البحث 2010/11/14

ABSTRACT

Antiphospholipid antibodies and blood group were screened for seventy five spontaneously recurrent aborted women attending three hospitals in Baghdad city from the period January until March 2007. Control included fifty non aborted women .

The women were divided into five age categories.

High accumulations for the aborted women were seen in the age categories 31-35 years compared to 20-25 years in the control group.

The percentage of women aborted in the first trimester was 66.7 %.

The frequency distribution of ABO blood groups among aborted women were as follow :A (45%), B (12 %), AB (20 %) and O (22.7 %) , compared to a frequency of A (34 %), B (16 %), AB (10 %) and O (40 %) in the control.

Antiphospholipid antibodies were detected in both aborted and control groups by ELISA method. It was found that IgG and IgM were positive in aborted women with 20 % and 5.3 % respectively, while all the women in the control groups were negative a prevalence of.

No relationship was found between the presence of antiphospholipid antibodies and abortions.

الخلاصة

تم التحري عن وجود اُضداد الشحميات الفسفورية وفحص مجاميع الدم لـ 75 امرأة مجهضة اجهاضاً عفوياً متكرراً من مراجعي ثلاث مستشفيات في مدينة بغداد للفترة من شهر كانون الثاني ولغاية شهر نيسان عام 2007 ومقارنتهم مع نساء طبيعيات (50) ممن لم يعانين الاجهاض واللاتي استخدمن كمجموعة سيطرة.

قسمت نساء الدراسة الى خمسة فئات عمرية وبفارق خمس سنوات بين كل فئة والتي تليها. ظهر ان أعلى نسبة للمجهضات كان في الفئة العمرية الثالثة (31 - 35 سنة) ولمجموعة السيطرة كان في الفئة العمرية الأولى (20-25 سنة)، وأن أقل عدد للمجهضات (3) كان في الفئة العمرية الأخيرة (36-40 سنة). كذلك الحال في مجموعة السيطرة التي شهدت أقل تجمع في الفئتين العمريتين الاخيرة وما قبل الأخيرة وبواقع خمسة لكل فئة. تركزت غالبية الاجهاضات ضمن مرحلة الحمل الأولى (66.7 %).

كانت مجاميع دم المجهضات كالآتي: A (45.3%) و B (12%) و AB (20%) و O (22.7%)، أما مجاميع دم نساء السيطرة كانت كالآتي: A (34%) و B (16%) و AB (10%) و O (40%) ولم يتضح وجود علاقة بين الاجهاض ومجاميع دم المجهضات.

تم التحري عن وجود اُضداد لشحميات الفسفورية لدى المجهضات ونساء السيطرة بطريقة الأليزا وظهر وجود هذه الأضداد صنف IgG في 20% من المجهضات وصنف IgM بنسبة 5.3% في حين كانت جميع نساء السيطرة سالبات لهذا الفحص، ولم يتضح وجود علاقة مباشرة ما بين الاجهاض ووجود هذه الأضداد كمسبب رئيسي للاجهاض.

المقدمة

يعد الاجهاض أحد المشاكل السريرية المهمة لكل من الأطباء والمرضى من النساء الحوامل لذلك وجه الباحثون اهتمامهم لدراسته لما يسببه من مشاكل ومضاعفات صحية ونفسية واقتصادية تنعكس على الأم وعائلتها، وهو يعد من الاحداث المهمة التي تؤثر على النساء في سن الانجاب (1).

يعرف الاجهاض بأنه نزول محتويات الرحم (الجنين والمشيمة والأغشية المشيمية) قبل نمو الجنين بشكل كافي يمكنه من البقاء حياً خارج الرحم، غالباً ما يحدث الاجهاض خلال المراحل

المبكرة من الحمل أي خلال الأشهر الثلاثة الأولى من الحمل First trimester وقد يحصل خلال الأشهر الثلاثة الثانية من الحمل Second trimester (2). يحدث الإجهاض غالباً بشكل عفوي فيسمى بالإجهاض العفوي (Spontaneous abortion) وقد يحدث مبكراً قبل الأسبوع الثاني عشر من الحمل ويسمى بالإجهاض العفوي المبكر أو قد يحدث خلال الأسابيع 20-22 من الحمل ويسمى عندئذ بالإجهاض العفوي المتأخر (3).

يسمى الإجهاض الذي يحصل لمرة واحدة فقط بالإجهاض العفوي المفرد Sporadic spontaneous abortion ، أو قد يحصل لمرات متعددة وبشكل متكرر فيسمى بالإجهاض العفوي المتكرر (Recurrent spontaneous abortion)، وهو يشكل نسبة 15-20% من حالات الحمل المشخصة سريريا (4). درست متلازمة اضرار الشحميات الفسفورية (APAS) Antiphospholipid antibodies syndrome لأول مرة 1954 لدى النساء اللواتي يعانين من النزف لفترة طويلة وحدوث إجهاضات متكررة وهذه المتلازمة تعني وجود علامات سريرية نوعية من ارتفاع بمستويات اضرار (APA) (5)، يسمى مثل هؤلاء المرضى بالمصابين بمتلازمة اضرار الشحميات Antiphospholipid antibodies Syndrome (APS) والتي تسمى أيضاً بمتلازمة Hughes.

تعرف هذه المتلازمة بأنها اضطراب متكرر في تكوين الخثرة الوعائية والأجهزة العفوي وقلة الصفيحات الدموية (Thrombocytopenia) (6,7). يمكن أن توضح المميزات السريرية لهذه المتلازمة بزيادة حدوث حالات التخثر ، وهناك أدلة على وجود خرق أو انتهاك لمشيمة الأجنة المجهضة في النساء المريضات اللاتي يملكن مستويات مرتفعة من هذه الاضرار (8).

أن جزيئات الشحميات الفسفورية هي من مكونات أغشية الخلايا وأن تكوين الأضرار لهذه الشحميات الفسفورية له علاقة بالعديد من الحالات المرضية ، إذ أن اضرار APA لها القدرة على أحداث تخريب لبطانة الاوعية الدموية وتحطيم أغشية الصفيحات الدموية من خلال تثبيط البروستوساينكين الذي موسع للاوعية الدموية والتداخل من تنشيط بروتين C (9) مما يتسبب في التصاق الصفيحات الدموية وارتفاع ملحوظ في الثرمبوكسان (Thromboxane) الذي يعمل على تقليص الاوعية الدموية مما يؤدي الى حدوث عملية تخثرية ينجم عنها اذا ماحدثت في الدورة الدموية الرحمية المشيمية موت الجنين أو أعاقه النمو بسبب نقص الدم الورد اليه أو نقص الاوكسجين (10,11).

لا يمكن اعتبار شحم القلب (Cardiolipin) هدفاً مستضدياً اعتيادياً داخل الجسم الحي لأضرار APA وذلك لمحدودية توزيعه في الغشاء الداخلي للمايتوكوندرية مما دفع بعض الباحثين الى استخدام شحميات فسفورية أخرى لتحديد اضرار APA بتقنية الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

المواد وطرائق العمل

اجريت الدراسة في محافظة بغداد على مجموعة من النساء المجهضات اجهاضاً عفواً متكرراً من المراجعات لمستشفيات العلوية للولادة ، واليرموك التعليمي ، والهلال الاحمر للولادة لمدة اربعة أشهر للفترة من شهر كانون الثاني ولنهاية شهر نيسان سنة 2007. قسمت النساء الى المجاميع الاتية :-

- 1- مجموعة السيطرة Control group :- شملت 50 امرأة خصيبة غير متعرضة لأي حالة إجهاض .
- 2- مجموعة النساء المجهضات وشملت 75 امرأة في مراحل مختلفة من أشهر الحمل قسماً منها حصل الإجهاض خلال الأشهر الثلاثة الأولى من الحمل (First trimester) والآخرى حصل خلال الأشهر الثلاثة الثانية من الحمل (Second trimester) .

أخضعت جميع نساء الدراسة الى إجراء فحص الدم وذلك باتباع طريقة الشريحة الزجاجية (الطريقة التقليدية) لفحص مجاميع الدم (A,B,AB,O) وذلك من خلال ملاحظة التلازن الحاصل بين الاضداد المنمطة (Blood group antiserum) وكريات الدم الحمر (12) أتبعنا تقنية الأليزا للتحري عن الاضداد APA من نوعي IgM, IgG وذلك حسب ماورد في عدة القياس المصنعة من شركة AESKULISA Phospholipid-Screen-GM. Germany والمتضمنة صفيحة دقيقة (Microtiter plate) وكذلك تتضمن دارئ النموذج والسيطرات الموجبة والسالبة وسيطرة الحد الفاصل Cut-off Control والمحاليل القياسية المتدرجة لـ APL وهي 0,3,10,30,100,300 U/ ml ومحلول مقترن انزيمي Anti-human immunoglobulins conjugated (Enzyme conjugate) هو horseradish peroxidase ومحلول المادة الأساس (Substrate Solution) ومحلول الغسل (Washing Solution) ومحلول ايقاف التفاعل (Stopping Solution). قرأت الامتصاصية بجهاز قارئ ELISA Reader على طول موجي 450 نانوميتر وحسبت النتائج كالآتي : قيمة الحد الفاصل = قيمة الامتصاص لضابط السيطرة الضعيف . - تكون النتيجة موجبة اذا كانت قيمة الامتصاص الطيفي للمصل اكبر أو تساوي قيمة الحد الفاصل . - تكون النتيجة سالبة اذا كانت قيمة الامتصاص الطيفي للمصل أقل من قيمة الحد الفاصل .

النتائج والمناقشة

قسمت النساء المجهضات (75) مجهضة الى خمسة فئات عمرية وبقارق خمسة سنوات بين كل فئة عمرية والتي تليها وكما هو موضح في الجدول رقم (1) . أما مجموعة السيطرة فقد ضمت (50) امرأة ممن لم يعانين الاجهاض . أظهرت النتائج أن أعلى نسبة من المجهضات (32%) كانت ضمن الفئة العمرية الثالثة (35-31 سنة). كذلك فإن هذه الفئة تضم أعلى نسبة من عدد حالات الاجهاض (35.5%) ، ويلاحظ أن غالبية الاجهاضات كانت ضمن مراحل الحمل الاولى (66.7%) في حين كانت أقل كثيراً ضمن مراحل الحمل الثانية (33.3%).

جدول 1- الفئات العمرية للنساء المجهضات ومجموع الاجهاضات العفوية ضمن مراحل الحمل الاولى والثانية ومجموعة السيطرة .

الفئات العمرية (سنة)	أعداد المجهضات (%)	مجموع الاجهاضات (العدد %)	مجموع الاجهاضات ضمن مراحل الحمل		أعداد السيطرة (%)
			الاولى (%)	الثانية (%)	
25-20	18 (24)	33 (17.7)	24 (72.7)	9 (27.3)	20 (40)
30-26	15 (20)	39 (21.0)	30 (77.0)	9 (23)	10 (20)
35-31	24 (32)	66 (35.5)	43 (65.2)	23 (34.8)	10 (20)
40-36	15 (20)	42 (22.6)	21 (50)	21 (50)	5 (10)
اكثر من 40	3 (4)	6 (3.2)	6 (100)	- (0.0)	5 (10)
المجموع	75 (100)	186 (100)	124 (66.7)	62 (33.3)	50 (100)

لوحظ أن 4 % فقط من المجهضات كانت ضمن الفئة العمرية الاخيرة (أكثر من 40 سنة) وأن جميع الاجهاضات في هذه الفئة العمرية كان ضمن المرحلة الاولى من الحمل (100%) وفي حين لم تسجل أي حالة اجهاض ضمن مراحل الحمل الثانية. تبين أن غالبية حالات

الأجهاض حدثت في الأشهر الأولى من الحمل وللفئات العمرية كافة وقلت خطورة حدوث الأجهاض بتقدم عمر الجنين .

أن هذه النتائج لم تأتي متوافقة تماماً مع ما أورده الكثير من الباحثين (14,13) حيث أشاروا أن تقدم العمر لأكثر من 35 سنة يلعب دوراً كبيراً في حدوث حالات الأجهاض العفوي عند النساء، تتباين النتائج في مثل هذا النوع من الدراسات والتي قد يعود سببها الى صغر حجم عينات الدراسة وخاصة مجهضات الفئة العمرية الأخيرة بسبب قلة فرص حصول الحمل في هذه الفئة العمرية مقارنة بالفئات العمرية الأولى والثانية وكذلك عزى الاختلاف الى تفاوت المراحل العمرية التي يحصل فيها الحمل بين المجتمعات الشرقية والغربية ، علاوة على ذلك زيادة فرصة حدوث حالات الشذوذ الكروموسومي مثل ظهور كروموسومات غير طبيعية أو حدوث خلل في الببضة المخصبة أو وجود تغيرات نسيجية مرضية في الرحم كالترسب الليفياني والتليف أو حدوث فرط ضغط الدم الحاملي الذي يزداد بعد السن 35 (15). فضلاً عن التغيرات التي تطرأ على مستوى الهرمونات التي لها علاقة مباشرة بالحمل كالبروجسترون والأستروجين أو وجود عوامل مناعية في جسم الأم الحامل (16).

أجري فحص مجاميع الدم للنساء المجهضات ومجموعة السيطرة والتي يوضحها الجدول رقم (2) والذي يتبين منه أن 45.3 % كن ضمن المجهضات من ضمن المجموعة A ، أعقبها المجموعة O ونسبة 22.7 % بينما كان نصيب كل من المجموعة AB و B هو 20 % و 12 % على التعاقب.

جدول 2- مجاميع دم النساء المجهضات ضمن مراحل الحمل الأولى والثانية ومجموعة السيطرة

الفئات العمرية (سنة)		مجاميع دم المجهضات								مجاميع دم السيطرة									
		العدد الكلي	A ⁺	A ⁻	B ⁺	B ⁻	AB ⁺	AB ⁻	O ⁺	O ⁻	العدد الكلي	A ⁺	A ⁻	B ⁺	B ⁻	AB ⁺	AB ⁻	O ⁺	O ⁻
25-20	18	12	3	-	-	-	-	-	3	20	10	-	-	-	-	-	-	10	-
30-26	15	7	-	-	-	-	-	-	8	10	5	-	-	-	-	-	-	5	-
35-31	24	3	6	6	-	6	-	3	-	10	-	-	5	-	5	-	-	-	-
40-36	15	3	-	3	-	6	-	3	-	5	2	-	-	-	-	-	-	3	-
أكثر من 40	3	-	-	-	-	3	-	-	-	5	-	-	3	-	-	-	-	-	2
المجموع	75	25	9	9	9	15	-	14	3	50	17	-	8	-	5	-	18	2	2
%	100	33.3	12	12	12	20	-	18.7	4	100	34	-	16	-	10	-	36	4	4

يتبين من الجدول رقم (2) أن هذه العينة الصغيرة هي جزء من المجتمع العراقي وعليه نتوقع أن تكون مجاميع دمها مماثلة تقريباً لمجاميع دم هذا المجتمع، إذ أشارت أحصائية لمصرف الدم المركزي العراقي في بغداد عام 1998 أن 99871 كانت مجاميع دمهم على النحو التالي: 33 % لمجموعتي الدم A و O و 26 % لمجموعة الدم B و 8 % لمجموعة الدم AB. أما مجموعة السيطرة (50) امرأة فقد كانت مجاميع دمهم على الشكل الآتي: 34 % لمجموعة الدم A و 40 % لمجموعة الدم O و 16 % لمجموعة الدم B و 10 % لمجموعة الدم AB. من خلال استعراض هذه النتائج يتبين أن هناك فروقاً بسيطة في نسب هذه المجاميع بين نساء السيطرة والمجهضات في المجتمع العراقي، قد تعود الى صغر حجم عينة

الدراسة عن حجم عينة المجتمع والتي من شأنها إعطاء مثل هذه المتغيرات التي لم تستطع الدراسة الحالية أن تحدد أي من مجاميع الدم هي أكثر عرضه لحدوث حالات الأجهزة العفوي المتكرر عند النساء.

اجري فحص التحري عن وجود اضرار الشحميات الفسفورية لجميع المجهضات ومجموعة السيطرة وظهر وجود هذه الأضرار في 15 مجهزة من مجموع 75 (20%) أما مجموعة السيطرة فجميعهن كن سالبات لهذا الفحص.

تضمن هذا الفحص التحري عن الضدين IgG و IgG بطريقة الأليزا كما يوضحها الجدول رقم (3) الذي أظهر أن اضرار الشحميات الفسفورية صنف IgG كانت موجبة في 20 % من النساء المجهضات. أما الصنف IgM فقد كان موجباً في أربعة مجهزة فقط أي ما يعادل نسبة 5.3 % من نسبة المجهضات الموجبات للصنف IgG ومن ملاحظة هذه النتيجة يتضح أن نسبة المجهضات الموجبات لفحص الشحميات الفسفورية صنف IgM و IgG كان ضئيلاً مقارنة بالمجموع الكلي للمجهضات (75 مجهزة)، وبذلك لا يمكن الجزم أن هذا العامل هو المسؤول الأول عن حدوث الأجهزة، بل أنه قد يعتبر أحد العوامل المساعدة في حدوث حالات الأجهزة بالتزامن مع غيره من العوامل التي تلعب دوراً مهماً في حدوث الأجهزة. الجدول رقم (3) تضمن وصفاً فردياً لكل حالة اجهزة موجبة لفحص التحري عن اضرار الشحميات الفسفورية ويتبين منه أن الفئات العمرية الأولى والثالثة والرابعة التي ضمت كل منها أربع مجهزة موجبات لهذا الفحص، أي ما يعادل نسبة 26.7 % لكل منهم ، تليها الفئة العمرية الخامسة ثم الثانية ونسبة 13.3 % و 6.6 % على التوالي.

جدول 3- جدول وصفي للمجهضات الموجبات لفحص APA صنف IgM و IgG

تسلسل المجهضات	الفئة العمرية (سنة)	عدد الأجهزة	عدد الأجهزة في مراحل الحمل		مجاميع الدم	الأضرار المناعية	
			الأولى	الثانية		IgG	IgM
1	الأولى (21)	4	2	2	O ⁺	+	-
2	الأولى (25)	3	3	-	A ⁺	+	+
3	الأولى (25)	6	5	1	A ⁺	+	-
4	الأولى (23)	5	3	2	AB ⁺	+	-
5	الثانية (28)	7	5	2	B ⁺	+	+
6	الثالثة (33)	8	4	4	AB ⁺	+	+
7	الثالثة (35)	3	3	-	A ⁺	+	-
8	الثالثة (33)	7	4	3	B ⁺	+	-
9	الثالثة (32)	10	7	3	A ⁻	+	-
10	الرابعة (40)	3	2	1	B ⁺	+	-
11	الرابعة (37)	3	3	-	O ⁺	+	-
12	الرابعة (37)	4	3	1	B ⁻	+	+
13	الرابعة (39)	6	6	-	A ⁺	+	+
14	الخامسة (45)	4	4	-	AB ⁺	+	-
15	الخامسة (45)	4	4	-	AB ⁺	+	-
	المجموع	77	58	19			

* جميع المجهضات الأخريات مع مجموعة السيطرة سالبات لفحص APA في محاولة لدراسة العلاقة بين وجود اضرار الشحميات الفسفورية وفصائل دم المجهضات، لم توفق الدراسة في التوصل الى نتيجة قاطعة في هذا المضمار، فقد ظهر أن خمسة من

المجهضات ذوات دم مجموعة A ، وأربعة من مجموعة B ، وأربعة من مجموعة AB ، واثنان من مجموعة O. هذه العينة صغيرة لا يمكن أن يبنى عليها استنتاج بهذا الخصوص ، ويمكن توسيعها في المستقبل .

أن اضرار الشحميات الفسفورية تكون مسؤولة بشكل عام عن فقدان الحمل في الثلث الثاني أكثر من الثلث الأول ، وغالباً ما يحدث فقدان الحمل في النساء المصابات بهذه المتلازمة بعد عشرة أسابيع من الحمل مقارنة بأغلبية الأجهزة العفوية التي قد تحدث في وقت مبكر ويعتقد بأن العامل المسبب هو القصور المشيمي (Placental insufficiency) (17) .

ترتبط اضرار الشحميات الفسفورية من الأصناف IgA, IgM, IgG بالشحميات الفسفورية ذات الشحنة السالبة، غير أن اضرار ذاب مضاد التخثر Lupus anticoagulant antibodies (LA) و اضرار شحم القلب Anticardiolipin antibodies (ACA) تعد الأكثر صلة بالأجهزة العفوي وخاصة الصنف IgG ، حيث وصفت هذه الأضرار بأنها اضرار مكتسبة Aequired antibodies لها نشاط خاص ضد الشحميات الفسفورية السالبة الشحنة وتداخلها مع البروستوغلاندين Prostaglandin(PGI2) والبروستوسايكلين من خلال الخلايا المبطنة للأوعية الدموية Endothelial cells التي تتعرض الى التخثر والاحتشاء المشيمي المتسبب في عدم كفاءة المشيمة وفقدان الحمل (18).

يكون الصنف IgG و IgM ذو صلة وثيقة بمتلازمة اضرار الشحميات الفسفورية، إذ أن ارتفاع مستوى اضرار IgM يعرض الحامل الى الأجهزة العفوي من خلال تفاعل هذه الأضرار مع طبقة المدمج الخلوي Syncytium والزيادة في قابلية فرط التجلط وأن تلك الأضرار تؤدي الى زيادة النضح داخل الأوعية الدموية الجنينية مؤدية الى تلف وتحطم يسبق تكوين المشيمة. يمكن تأثير وجود الصنف IgG في احداث التخثر المتسلسل في الوقت الذي يؤثر فيه الصنف IgM في عملية تكوين طبقة المدمج الخلوي ، إذ أن جزيئات الفوسفوتيديل سرين (PS) Phosphotidyl serine تكون سريعة الالتصاق وضرورية لتكوين طبقة المدمج الخلوي وأن وجود اضرار الشحميات الفسفورية الخاصة بـ PS يؤدي الى تلف وتحطم المشيمة من خلال اتحادها معاً وتكوين معقد يؤدي الى تلك الأحداث (19) .

أن بعض جزيئات الشحميات الفسفورية لها خصائص التصاقية وعلى الأخص منها الفوسفوتيديل سرين (PS) Phosphotidyl serine والفوسفوتيديل ايثانول أمين (PE) Phosphotidyl ethanolamine الذي يسبب الالتحام الخلوي وبذلك تصبح الارومة الغازية الخلوية (Cytotrophpblast) بشكل مدمج خلوي الذي ينظم مرور المواد الغذائية للجنين (20) .

أن احتمالات تكوين الأم اضرار لجزيئات الشحميات الفسفورية ترتفع بنسبة 10 % مع كل حالة اجهاض وان مثل هذا التأثير يكون تراكمياً (21).

المصادر

1. Chamberlain, G.V. Obstetrics by ten teachers. 16th ED. Edward, Arnold, London (1996).
2. Dommergues, M.; Cahen, F.; Garel, M.; Mahieu-Caputo, D.; Dumez, Y. Feticide during second- and third-trimester termination of pregnancy: opinions of health care professionals. Fetal. Diagn. Ther. 18 (2): 91-97, (2003).

3. Strauss, S. L.; Gamble, S.B.; Parker, W.Y.; Cook, D.A.; Zane S.B; Hamdan, S. Abortion surveillance –United State 2004, MMWR Surveill Summ 56 (9): 1–33,(2007).
4. Berer, M.R. Making abortion safe: a matter of good public health policy and practice. Bulletin of WHO, 78(5):580-592,(2000).
5. Hougnd, L.T ;Wechsler, B.; Bletry, O.; Vauthier-Brouzes, D.; Lefebvre, G.; Piette, J.C. A study of 75 pregnancies in patients with antiphospholipid syndrome Journal Rheumatol.28:2025–2030,(2001).
6. Sraig ,G.; Younis, J.; Hoffman,R.; Lanir, N.; Blumenfeld, Z.;Brenner, B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage.Fertility and Sterility 77: 342–347(2002).
7. Hartel,D.; Sorges, E.; Carisson, J.; Romer, V.; Tebbe, U. Myocardial infarction and thromboembolism during pregnancy. Herz 28: 175–184, (2003).
8. Rand, J.H; Wu, X.X; Guller, S.; Scher ,J.; Andree, H.A. ;Lockwood,C.J. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi. Am. J. Obstet, Gynecol :177(4):918-923,(1997).
9. Lee, R.M.; Branch,W.& Silver,R.M.Immunoglobulin A anti- β_2 glycoprotein-I antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death.Am.J.Obstet& Gynecol.,185(3):748-753,(2001).
10. Figuero,F.; Ernesto, A. and Oliveira,Y.; Vanessa, M.Association of recurrent abortion, fetal loss and severe pre-eclampsia with hereditary thrombophilias and antiphospholipid antibodies in pregnant women of central Brazil. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. vol.29, n.11, pp. 561-567,(2007).
11. Vogt, E,; Ng ,A.K.; Rote, N.S.(2005). Antiphosphatidylserine antibody removes annexin-V and facilitates the binding of prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation. Am J Obstet Gynecol .177(4):964-72(2006).
12. Guyton,A.C., Hall,J.E.Textbook of medical physiology. 1th.Ed.agglutination blood group,5-11(2006).

13. Richards, C.; Wilhite, M.& Gramzow, R. Psychological responses of women after first-trimester abortion. *Archives of General Psychiatry*, 57,777–784(2000).
14. Klein, J.; Sauer, M.. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*.185:758–70(2001).
15. Warburton, D.;; Kline, J.; Stein, Z.; Strobino, B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter IH, Willey A, eds. *Perinatal Genetics: Diagnosis and Treatment*. New York: Academic Press, :133–45(2005).
16. AL-Samarraie,A.A. APA in women with recurrent spontaneous abortions :Clinical and laboratory correlation.MD,Ch.B.Thesis.Coll-Med.Univ.Baghdad (2001).
17. van Horn, J.; Craven, C.; Ward, K.; Branch, D.; Silver, R. Histologic features of placentas and abortion specimens from women with antiphospholipid and antiphospholipid-like syndromes. *Placenta*, 25(7): 642-8(2004).
18. Branch, D.; Rodgers, G.M. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *Am. J Obstet Gynecol* 1993;168 Pt:206-10(2007).
19. Sebire ,N.J ; Fox, H.; Backos, M.and, Rai, R.; Paterson, C. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum. Reprod* ;17:1067-71(2002).
20. Sugi, T.; Katsunuma, J.; Izumi, S.; McIntyre, J.and Makino,T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil. Steril.*, 71,1060-1065(1999).
21. Ghosh,K. and Shetty,S. Anti-phospholipid antibodies and other immunological causes of recurrent foetal loss--a review of literature of various therapeutic protocols. *Am.J.Repro. Immunol*.jul;62(1):9-24(2009).

دراسة كفاءة أوساط زرعية طبيعية وبعض العوامل الفيزيائية في تنمية الفطر المائي *Dictyuchus sterile*

زينة خليل

الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

تاريخ تقديم البحث 2010/10/27 - تاريخ قبول البحث 2010/11/14

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the growth of the water mold *Dictyuchus sterile* on different natural media, included corn extract, lettuce extract, date juice and millet extract agar media. Radial colony growth was determined on four media. In addition, the effect of three physical factors was also studied. These were time of incubation (24, 48, 72) hr.

The results of this factors showed the superiority of lettuce extract medium on the third day of incubation in supporting the growth of the fungus. The comparison between corn extract medium and date juice medium gave the highest frequency difference compared to other.

Regarding the second factor which was the temperature of incubation, The fungus showed best growth at 20 °C. The comparison between lettuce extract medium and date juice medium gave the highest frequency difference compared to other.

Effect of various hydrogen ion concentration (3, 5, 7) on growth using the four media, the best growth of the fungus was on corn extract medium at PH =5.

In conclusion using arithmetic mean, lettuce extract medium was the best medium for the growth of the fungus over all other media.

الخلاصة

تمت دراسة نمو الفطر المائي *Dictyuchus sterile* على أوساط زرعية طبيعية مختلفة هي أوساط مستخلص مسحوق الذرة، مستخلص الخس عصير التمر و مسحوق الدخن وقيست أقطار المستعمرة الفطرية النامية عليها بتأثير ثلاث عوامل بيئية هي:

الأول الزمن، حيث قيس قطر المستعمرة بعد 24، 48، 72 ساعة. وأظهرت النتائج أن أفضل نمو كان في اليوم الثالث وأفضل وسط للتنمية هو وسط أكار الخس وعند المقارنة بين الأوساط بمرور الوقت أعطت المقارنة بين وسط أكار الذرة ووسط أكار عصير التمر أعلى فرق معنوي بأفضلية وسط أكار الذرة مقارنة ببقية المقارنات.

والثاني عامل درجة الحرارة حيث حضنت مستعمرات الفطر بثلاث درجات حرارة (15، 20، 25) °م وبينت نتائج هذه التجربة أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر هي 20 °م، وعند مقارنة كفاءة الأوساط لتنمية الفطر باختلاف درجات الحرارة فقد أعطت المقارنة بين وسط أكار الخس ووسط أكار عصير التمر أعلى فرقاً معنوياً بأفضلية وسط أكار الخس مقارنة ببقية المقارنات.

والثالث عامل الأس الهيدروجيني حيث غير الأس الهيدروجيني لكل وسط بثلاث قيم هي (3، 5، 7)، لقد أوضحت نتائج التجربة أن الأس الهيدروجيني الأفضل لنمو الفطر على هذه الأوساط هو 5، وعند مقارنة أفضلية الأوساط الزرعية في تنمية الفطر فقد أعطت المقارنة بين وسط أكار الذرة ووسط أكار عصير التمر أعلى فرقاً معنوياً مقارنة ببقية المقارنات.

ولوحظ من حساب الوسط الحسابي لكل تجربة من تجارب العوامل البيئية الثلاث أن وسط أكار الخس كان الأفضل لنمو الفطر مقارنة ببقية الأوساط.

المقدمة

يعود فطر *Dictyuchus sterile* للعائلة السبرولكنيسية Saprolegniaceae ضمن الفطريات البيضية Oomycetes والتي تعتبر فطريات مهمة اقتصادياً نتيجة معيشتها الطفيلية على الأسماك وبيوضها أو على جذور بعض النباتات الراقية (1) حيث يصيب فطر

D. steril بيوض أنواع مختلفة من الأسماك مثل سمك الكارب *Cyprinus carpio* والجري *Silurus triostegus* والبني *Barbas sharpeyi* والفضي *Hypophthalmichthys* (2).

ولكون جدار هذه الفطريات يتكون من سكريات متعددة polysaccharide (cellulose, glucan) بنسبة 90% من مكونات الجدار و3-5% بروتينات و1-3% دهون وكميات صغيرة من سكريات mannose, glucoseamine وأملاح معدنية (3) فأنها تحتاج الى سكر glucose أكثر مصادر الكربون استعمالاً ويأتي بعده fructose وmannose ويمكن استخدام سكر sucrose أيضاً في بعض الأوساط (4) كما تحتاج الببتون وخلص الشعير وخلص الخميرة والأحماض الأمينية كمصدر للنيتروجين العضوي ويمكن أن تستهلك أملاح الأمونيوم كنيتروجين غير عضوي (5)، أما الأملاح فتتضمن الحديد، الخارصين، المنغنيز وغيرها.

لذلك فقد عزلت هذه الفطريات بطريقة الطعوم باستخدام عدة أنواع من بذور النباتات مثل بذور القنب (6)، وبذور الحنطة وبذور زهرة الشمس (7).

كما تمت تنميتها على أوساط زرعية صناعية حاوية على هذه العناصر مثل وسط (GP-1) Glucose Peptone الذي استخدم لتنمية الفطر *Saprolegnia spp* (8) ووسط (CMA) Corn Meal Agar وهو الأكثر شيوعاً لعزل وتنمية هذه الفطريات بالإضافة الى الأوساط الزراعية الصناعية فقد استخدمت أوساط زرعية طبيعية لتنمية الفطريات البيضية مثل وسط أكار مستخلص سمك الكارب الذي استخدم كوسط كفو لتنمية الفطر *Saprolegnia diclina* (9) ووسط أكار السمسم ووسط أكار بيض سمك الكارب لتنمية الفطرين *Achlya Sp.* و *Saprolegnia turfosa* (10).

وكما تحتاج هذه الفطريات الى عناصر غذائية فإنها تحتاج الى عوامل بيئية مناسبة لنموها كعامل درجة الحرارة الذي يعتبر عاملاً محدداً لنمو الفطر لأنه يؤثر في العديد من العمليات الحيوية كالتكاثر حيث بينت (11) أن إنتاج الأبواغ يتأثر بدرجة الحرارة مما يؤثر في إنتشار الفطر، كمل تؤثر درجة الحرارة في الإنزيمات المحللة كإنزيم اللايباز والليسيثين والبروتياز والجلاتيناز والكيتيناز مما يؤثر في إمراضيتها للأسماك (10). بالإضافة الى عامل الأس الهيدروجيني الذي يلعب دوراً هاماً في العمليات الأيضية نتيجة لتأثيره في إنتاج الإنزيمات وفعاليتها (12).

لذلك إستهدفت هذه الدراسة إختبار كفاءة أربع أوساط زرعية طبيعية (وسط مستخلص الذرة، وسط مستخلص الخس، وسط مستخلص الدخن ووسط أكار التمر) لدعم نمو الفطر *Dictyuchus sterile* بإختلاف بعض العوامل الفيزيائية (فترة الحضان، درجة الحرارة، والأس الهيدروجيني).

المواد و طرائق العمل

المزرعة الفطرية :

عزلت المزرعة الفطرية للفطر *Dictyuchus sterile* من قناة الجيش ببغداد وشخصت حسب المصدر العلمي (13).

الأوساط الزرعية :

وسط أكار مسحوق الذرة :

حضر هذا الوسط مختبرياً" بإضافة 20غم من مسحوق الذرة الصفراء *Zea mays* من السوق المحلي الى لتر واحد من الماء وبعد غليان مسحوق الذرة عصرت الخلاصة بجهاز المعصرة ورشحت عبر عدة طبقات من الشاش ثم أضيف له 20غم من الأكار، أكمل الحجم الى لتر وعدل الأس الهيدروجيني الى 5 باستخدام 1 عياري NaOH (14).

عقم الوسط بجهاز المؤصدة Autoclave وصب في أطباق بترى بحجم 90 مل وبواقع ثلاث مكررات ، لقت الأطباق بأخذ قطعة من حافة مستعمرة الفطر *D. sterile* النامية على وسط CMA بعمر ثلاثة أيام ، ثم فحصت الأطباق بعد (24 ، 48 ، 72) ساعة .

وسط أكار مسحوق الدخن :

تم تحضير هذا الوسط بنفس الطريقة السابقة وبنفس المقادير الكمية مع فرق أن تطحن بذور الدخن ويستعمل المسحوق بدلاً من مسحوق الذرة .

وسط أكار الخس :

أخذت عدة أوراق من الخس وبعد غسلها يؤخذ 20 غم منها ثم عصر بالمعصرة ورشح خلال عدة طبقات من الشاش وأخذ من الراشح 25 مل ثم يضاف 20 غم من الأكار وأكمل الحجم الى لتر ثم عدل الأس الهيدروجيني الى 5 وعقم الوسط وصب ولقت الأطباق وحضنت بنفس الطريقة السابقة .

وسط أكار عصير التمر :

حضر هذا الوسط بأخذ 20 ثمرة من التمر الخستوي بعد نزع النوى وتم غليها مع لتر من الماء المقطر ورشحت عبر عدة طبقات من الشاش ثم أخذ 25 مل من الراشح ليضاف اليه 20 غم من الأكار وأكمل الحجم الى لتر ثم تكمل نفس طريقة العمل السابقة بتعديل الأس الهيدروجيني والتعقيم والصب ثم التلقيح والحضانة .

دراسة تأثير درجة الحرارة :

أخذت الأوساط الزرعية المستخدمة أعلاه (أكار مسحوق الذرة ، أكار مسحوق الدخن ، أكار مسحوق الخس ، أكار عصير التمر) وعدل الأس الهيدروجيني عند 5 ولقت الأطباق بالفطر *Dictyuchus sterile* وحضنت عند ثلاث درجات حرارة هي (15، 20، 25) م وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة ، قيس قطر المستعمرة بعد 72 ساعة .

دراسة تأثير الأس الهيدروجيني :

أخذت الأوساط الزرعية سابقة الذكر على أن يحضر كل وسط منها بأس هيدروجيني مختلف ، حيث عدلت الأوساط الزرعية بإستخدام القاعدة NaOH أو الحامض HCl لتصبح الأوساط الزرعية عند ثلاث أسس هيدروجينية هي (3 ، 5 ، 7) وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة ، لقت الأطباق بالفطر ثم حضنت عند درجة حرارة 20 م وقيس قطر المستعمرة بعد 72 ساعة التحليل الإحصائي :

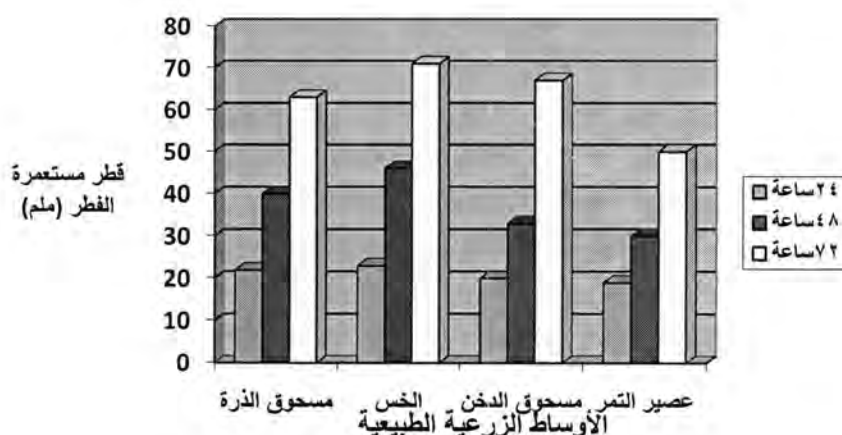
أستخدمت الأوساط الحسابية للتمييز بين الأوساط الزرعية واختيار الوسط الأكثر فعالية ، بالإضافة للتمييز بين معاملات الفطر بدرجات الحرارة المختلفة واختيار درجة الحرارة المثلى لكل وسط من الأوساط المستخدمة ، والتمييز بين معاملات الفطر بأسس هيدروجينية مختلفة واختيار الأس الهيدروجيني الأمثل لكل وسط من الأوساط المستخدمة .

وتم إجراء اختبار Paired Samples T Test للمقارنة بين الأوساط الزرعية الأربعة سابقة الذكر بوجود العوامل التالية : الزمن و درجة الحرارة و الأس الهيدروجيني كلاً على حدة عند مستوى معنوية (P=0.05) .

النتائج والمناقشة

لقد بينت نتائج نمو الفطر *D. sterile* من خلال قياس قطر مستعمرة الفطر المنماة على الأوساط الزرعية الطبيعية الذرة ، الخس ، الدخن ، التمر على التوالي بعد (24 ، 48 ، 72) ساعة وكما موضح في الشكل رقم (1) أن الفطر *D. sterile* قد نمت على وسط أكار الخس بصورة أسرع من بقية الأوساط ومن خلال حساب الأوساط الحسابية لكل وسط وحسب الجدول رقم (2) يليه وسط أكار الذرة ثم وسط أكار الدخن وأخيراً وسط عصير التمر ، كما يبين الجدول رقم (3) أنه بمرور الزمن يزداد قطر المستعمرة الفطرية فيكون اليوم الثالث هو أكبر مستعمرة فطرية بالنسبة لجميع الأوساط الزرعية المستخدمة . أما الجدول رقم (4) فإنه يوضح مقارنة الأوساط الزرعية مع بعضها بوجود عامل الزمن ، حيث يبين أن أكبر فرق في

قطر المستعمرة الفطرية هو بين وسطي أكار مسحوق الذرة و أكار عصير التمر يتفوق أكار مسحوق الذرة بقطر المستعمرة ، يليه الفرق بين وسطي أكار الخس وعصير التمر ، أما المقارنة بين وسطي أكار مسحوق الذرة والدخن فلم تعطي فرقاً معنوياً بمرور الوقت .



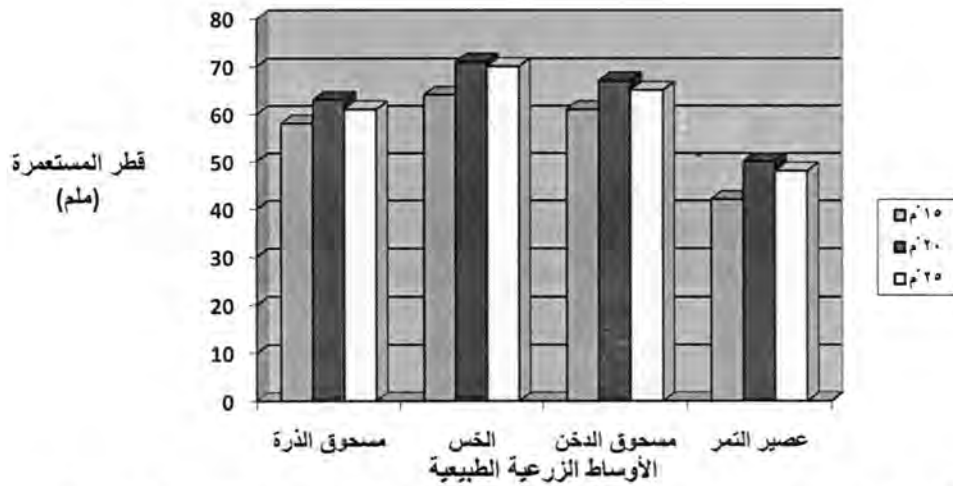
شكل-1: النمو الخضري (القطري) للفطر *Dictyuchus sterile* على الأوساط الزرعية بوجود عامل الوقت

إن نجاح الكائنات الحية في مختلف بيئاتها يعتمد على مدى إنتشارها في المحيط و إستغلالها للموارد المتوفرة فيها لذا فإن نمو الفطر *D. sterile* قد إعتد على مدى إستغلاله للعناصر الغذائية المتوفرة في الأوساط الزرعية المذكورة ومن خلال الجدول رقم (1) الذي يبين بعض المكونات الأساسية للمواد المكونة لهذه الأوساط (15) ، فقد يعزى سبب نمو الفطر على وسط أكار الخس بصورة أفضل من بقية الأوساط الى النسبة العالية من البروتين الخام مقارنةً ببقية المحتوى البروتيني لبقية الأوساط إضافةً الى بقية المواد فقد سجلت أعلى نسب مقارنةً ببقية الأوساط قيد الدراسة ماعدا عنصر الفسفور الذي أعطى وسط الدخن أعلى نسبة له مقارنةً بالأوساط الأخرى . ومن ملاحظة تسلسل الأوساط الحسابية من الجدول رقم (1) فإن وسط أكار مسحوق الذرة يتغلب على البقية لمحتواه البروتيني ، ثم وسط أكار الدخن قد حفز نمو الفطر دون وسط أكار عصير التمر للنسب العالية من بروتين ورماد وألياف وصوديوم و كربون مقارنةً بالوسط الأقل كفاءة لنمو الفطر *D. sterile* وسط أكار عصير التمر .

جدول-1: النسب المئوية لبعض مكونات أجزاء النبات المستخدم في تحضير الوسط (15)

الأوساط الزرعية المكونات	بذور الذرة الصفراء	أوراق الخس الخضراء	ثمرة التمر الخستوي	بذور الدخن
الرماد	1.5	13.7	4.0	2.3
البروتين الخام	10.8	25.5	2.9	1.5
الألياف	2.2	9.2	3.6	3.0
الصوديوم	0.02	0.29	0.50	0.4
البوتاسيوم	0.38	5.94	0.67	0.85
الكربون	0.02	0.84	0.70	0.43
الفسفور	0.38	0.67	0.50	0.83

أما نتائج قياس النمو الخضري (القطري) للفطر *D. sterile* بتنميته بثلاث درجات حرارة (15، 20، 25) °م على الأوساط الزرعية السالفة الذكر وتثبيت قيمة الأس الهيدروجيني عند 5 في اليوم الأخير (الثالث) فقط فقد بينت هذه النتائج ومن خلال الشكل رقم (2) ومن حساب الأوساط الحسابية لمعدلات النمو في كل درجة من درجات الحرارة وحسب الجدول رقم (5) فإن أفضل وسط حسابي لنمو الفطر كان عند درجة حرارة 20 °م. ومن حساب الأوساط الحسابية لنمو الفطر على كل وسط على حدة باختلاف درجات الحرارة من الجدول رقم (6) فإن وسط أكار الخس كان الأفضل أيضاً. ومن خلال التحليل الإحصائي للمقارنة بين كفاءة الأوساط الزرعية لنمو الفطر باختلاف درجات الحرارة فقد أعطى وسط الخس أعلى فرق معنوي عند مقارنته بوسط عصير التمر، تليه المقارنة بين وسطي الدخن والتمر بأفضلية وسط الدخن على التمر، وعلى الرغم من أن جميع المقارنات أعطت فروقاً معنوية إلا أن المقارنة بين وسطي الخس والدخن أعطت أقل فرقاً معنوياً وكما موضح بالجدول رقم (7).

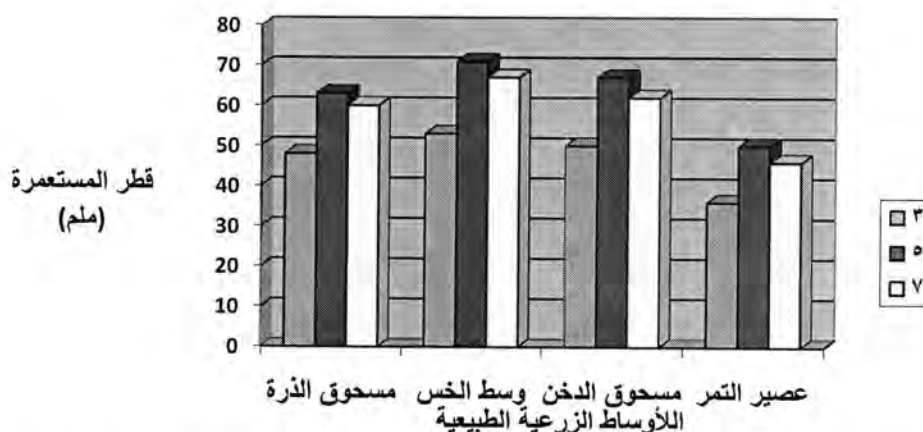


شكل 2- النمو الخضري (القطري) للفطر *Dictyuchus sterile* على الأوساط الزرعية بوجود عامل درجة الحرارة

قد يعزى سبب نمو الفطر *D. sterile* بصورة أفضل عند درجة الحرارة 20 °م إلى أن درجة الحرارة تعتبر عامل محدد لنمو هذا الفطر حيث تؤثر في التكاثر وكذلك في عمل العديد من الإنزيمات كما ذكرنا سابقاً (10، 11) و إن هذا الفطر يفضل النمو في مدى حراري يتراوح بين 18-26.8 °م (16) وهذا قد يكون السبب أيضاً في أفضلية درجة الحرارة 25 °م على درجة الحرارة 15 °م كون الأولى ضمن هذا المدى غير أن الثانية لا تدخل ضمن هذا المدى الحراري.

وأخيراً فإن نتائج تجربة زرع الفطر *D. sterile* على الأوساط الزرعية المذكورة أعلاه بتغيير قيمة PH الوسط إلى ثلاثة قيم هي (3، 5، 7) بدرجة حرارة ثابتة (20 °م) وعند اليوم الثالث فقط تقرأ النتائج، فقد بينت النتائج ومن حساب الوسط الحسابي لمعدلات نمو الفطر على الأوساط الزرعية ومن الجدول رقم (8) وكما موضح في الشكل رقم (3) أن أفضل أس هيدروجيني لنمو الفطر كان 5 بينما أقل نمو كان عند 3 PH، كما بين الجدول رقم (9) أن أفضل وسط لنمو الفطر بمعدل الأس الهيدروجيني كان وسط أكار الخس. أما عند إجراء المقارنة بين الأوساط الزرعية بوجود عامل الأس الهيدروجيني لنمو الفطر فقد أوضح الجدول رقم (10) أن أعلى فرق معنوي كان عند مقارنة وسطي أكار مسحوق الذرة وعصير التمر تليه المقارنة بين نمو الفطر على وسطي أكار مسحوق الدخن وعصير التمر، وعلى

الرغم من أن جميع الفروق معنوية إلا أن أقل فرق معنوي كان عند مقارنة نمو الفطر على وسطي أكار مسحوق الذرة وعصير التمر بتغلب مسحوق الذرة على عصير التمر .



شكل 3-النمو الخضري (القطري) لنمو الفطر *Dictyuchus sterile* على الأوساط الزراعية بوجود عامل الأس الهيدروجيني

قد يعزى السبب في أن الأس الهيدروجيني الأفضل لنمو الفطر *D. sterile* على الأوساط الزراعية المختلفة المذكورة آنفاً إلى أن غالبية فطريات الماء والتربة تفضل مدى للأس الهيدروجيني يتراوح بين حامضي ضعيف إلى متعادل (12) .

جدول 2-الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* على مختلف الأوساط الزراعية باختلاف الزمن

الأوساط الزراعية	وسط أكار مسحوق الذرة	وسط أكار مسحوق الخس	وسط أكار مسحوق التمر	وسط أكار عصير التمر
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (مم)	41.7	46.7	40	33

جدول 3-الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* في أوقات مختلفة بعد فترة الحضانة

زمن زراعة الفطر	24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (مم)	21	37.3	62.8

جدول 4-المقارنة بين كفاءة الأوساط الزراعية لتنمية الفطر *D. sterile* بمرور الوقت

الأوساط الزراعية	مسحوق الذرة و الخس	مسحوق الذرة و الدخن	مسحوق الخس و عصير التمر	الخس و عصير التمر	مسحوق الدخن و عصير التمر
t محسوبة	-402.2*	0.524	2.925*	2.097*	2.709*
t جدولية	0.138	0.652	0.1	0.171	0.114

جدول 5-الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* بدرجات الحرارة المختلفة على الأوساط الزراعية

درجات الحرارة	15°م	20°م	25°م
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (مم)	56.3	62.8	61

جدول 6: الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* على مختلف الأوساط الزرعية باختلاف درجة الحرارة

الأوساط الزرعية	وسط مسحوق الذرة	أكار	وسط أكار الخس	وسط أكار مسحوق الدخن	وسط أكار عصير التمر
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (ملم)	60.6	68.3	64.3	46.7	

جدول 7: المقارنة بين كفاءة الأوساط الزرعية لتنمية الفطر *D. sterile* باختلاف درجات الحرارة

الأوساط الزرعية	مسحوق الذرة والخس	مسحوق الذرة والدخن	مسحوق الذرة وعصير التمر	الخس و مسحوق الدخن	الخس و عصير التمر	مسحوق الدخن وعصير التمر
t محسوبة	-8.693 *	11- *	14 *	6.928 *	65 *	26.5 *
t جدولية	0.013	0.008	0.005	0.002	0.00	0.001

جدول 8: الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* بقيم معينة من الأس الهيدروجيني على مختلف الأوساط الزرعية

الأس الهيدروجيني	3	5	7
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (ملم)	46.8	62.8	58.8

جدول 9: الأوساط الحسابية لنمو الفطر *D. sterile* على الأوساط الزرعية المختلفة بقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني

الأوساط الزرعية	وسط أكار مسحوق الذرة	وسط أكار الخس	وسط أكار مسحوق الدخن	وسط أكار عصير التمر
الأوساط الحسابية لقطر المستعمرة (ملم)	57	63.7	59.7	44

جدول 10: المقارنة بين كفاءة الأوساط الزرعية لتنمية الفطر *D. sterile* باختلاف قيم الأس الهيدروجيني

الأوساط الزرعية	مسحوق الذرة والخس	مسحوق الذرة والدخن	مسحوق الذرة وعصير التمر	الخس و مسحوق الدخن	الخس و عصير التمر	مسحوق الدخن وعصير التمر
t المحسوبة	7.559 *	4 *	22.517 *	6.928 *	14.750 *	17.764 *
t الجدولية	0.017	0.057	0.002	0.2	0.005	0.003

ملاحظة: * الفرق معنوي

المصادر

1. Webster, J. Introduction to fungi, 2 nd.ed., Cambridge Univ. press , NewYork .669pp(1980) .
2. الشمري، رنا هادي حميد . دراسة بيئية للفطريات البيضية في نهر دجلة (بغداد) وأمراضيتها لبعض الأسماك . رسالة ماجستير \كلية العلوم\ الجامعة المستنصرية .89 صفحة (2006).
3. Clauz, J. M. Oomycota , www.ucmp.berkeley.edu.

4. Gleason ,F. H.; Rudolph ,C. R. and Pricc ,J. R. (1970) . Growth of certain aquatic oomycetes on amino acids : *Saprolegnia* ,*Achlya* ,*Leptolegnia* and *Dictyuchus* . *Physiol . Plant*,23:513-516.(2004) .
5. Burnett ,J. H. Fundamentals of mycology . 2nd . , Edward Arnold , England .673pp (1976) .
6. Dick ,M. W. The maintenance of stock cultures of Saprolegniaceae . *Mycologia* . 57(5) :828-831(1965).
7. Al Rekabi, S. A. ; Naeem, R. A. and Butty ,A. N. Specificity of baits in isolating Saprolegniaceae . *Al Mustansiriyah J. Sci.* 7(1):20-22(1996) .
8. Bangyeekhun, E. ;Quiniou, S. M. A. ; B. J. E. and Cerenius, L. Characterization of *Saprolegnia sp.* Isolates from channel catfish . *Disease of Aquatic Organisms*, 45 :53-59(2001).
9. البهادلي ، زينة خليل إبراهيم . . تأثير مبيد الأدغال بروبانيل في بعض الصفات البايولوجية والفسلجية للفطر *Saprolegnia diclina* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم الجامعة المستنصرية ص 75 (2001)
10. شنيشل ، سرمد سالم . دراسة تشخيصية و فسلجية لبعض الفطريات المائية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم الجامعة المستنصرية ص 64 (2004) .
11. النويني ، هديل رضاوي حسين . دراسة فسلجية لبعض الفطريات البيضية المعزولة من قناة الجيش – بغداد . رسالة ماجستير ، كلية العلوم الجامعة المستنصرية ص 89 (2004).
12. خضير ، محمد ياسين تقييم القدرة الإحيائية لإنتاج إنزيم السلييز من عزلات محلية من فطر *Trichoderma* وقياس فعاليته تطبيقياً في تحليل المخلفات النباتية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم / الجامعة المستنصرية ص 107 (2009) .
- 13.Coker , W. C. The Saprolegniaceae with notes on other molds . The university of North Carolina.Press.Chapel , Hill . 201 pp (1923).
- 14.Booth , C. Methods in microbiology , vol. 24, 2nd . ,Acad . Press, New York : 64pp (1971) .
15. فريد ، محمد فريد عبد الخالق ؛وردة ، محمد فاضل ؛كيرلي ، ليونارد هارلس .. القيمة الغذائية لمواد العلف و النباتات الرعوية في الدول العربية والشرق الأوسط - الطبعة الأولى ، دمشق ، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة . ص 554 (1979).
16. Mer ,G.S.; Sati ,S.C.and Khulbe ,R.D. Occurance, Distribution and Seasal periodicity of some aquatic fungi of Sat-Tal(nainnital).India *Hydrobiologia* ,76 (3):201-205(1980).

تأثير عامل الزمن وتغذية الرش بالنحاس والحديد في العلاقة بين نسبة النتروجين في النبات ومعدل وزن مئة بذرة نوعين من الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*) ملقحة ببكتريا الرايزوبيوم

علي صبيح عبد الأمير¹ و علي قاسم خزل² و عباس علي حسين³ و علي هاشم الموسوي⁴
¹كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
²التقنيات الاحيائية/ جامعة بغداد
³كلية الزراعة / جامعة كربلاء

تاريخ تقديم البحث 2010/9/13 - تاريخ قبول البحث 2010/11/14

ABSTRACT

Pot experiment was carried out during the spring season in the year 2008 to investigate the effect of the time factor, foliar spray feeding of copper and Iron on the relation between the nitrogen content in the shoot (N%) and the average weigh of 100 seeds of bean plants. The statistical analysis showed that spray feeding of copper and Iron exceed significantly the control treatment (water spray feeding), also, the spray feeding of Iron after 20 days of seeding increased significantly on the spray feeding of Iron after 30 days of seeding, as well as the Spanish type of seed surpassed significantly the Brazilian kind of seed in nitrogen content in the shoot and the average weigh of 100 seeds. In the other hand the studied characteristics appeared positive significant correlation coefficient ($r=0.67$). The interaction (overlap) treatment $Cu1 \times S2 \times Fe1$ recorded the highest significant values in both the nitrogen content in the shoot and the average weigh of 100 seeds by 2.16 % and 28.45gm, respectively

الخلاصة

نفذت تجربة سدادين خلال الموسم الربيعي 2008 بهدف دراسة تأثير عامل الزمن والتغذية الورقية بالرش بالنحاس والحديد في العلاقة بين محتوى النتروجين في المجموع الخضري (N%) ومعدل وزن مئة بذرة نباتات الفاصولياء، حيث اظهرت نتائج التحليل الاحصائي تفوق معاملات الرش بالنحاس والرش بالحديد معنوياً على معاملة مقارنتهما (الرش بالماء فقط) وتفوق زمن الرش بالحديد بعد 20 يوم من البذار معنوياً على معاملة زمن الرش بالحديد بعد 30 يوم من البذار وتفوق صنف البذور الاسباني على صنف البذور البرازيلي في كل من محتوى النتروجين ومعدل وزن مئة بذرة، وظهر كل من محتوى النتروجين ومعدل وزن مئة بذرة علاقة ارتباط موجبة معنوية ($r=0.67$)، فقد اظهرت معاملة التداخل $Fe1 \times Cu1 \times S2$ (صنف البذور الاسباني) تغذية الرش بالنحاس تغذية الرش بالحديد بعد 20 يوم من البذار اعلى قيم محتوى نتروجين ومعدل وزن مئة بذرة، حيث بلغت 2.16 % و 28.45 غم على التوالي، ويفارق معنوي عن باقي المعاملات.

المقدمة

يعد عامل الزمن من العوامل المهمة الاقل دراسة، والفاصولياء واحدة من اهم مصادر الحبوب البقولية المزروعة في العراق، فرغم انها غنية بالبروتين (N%) الا ان انتاجيتها منخفضة جداً في العراق بالمقارنة مع الدول الاخرى، وان الاسمدة النتروجينية مهمة جداً بسبب انها مصدر النتروجين المكون الرئيسي للاحماض الامينية والبروتين، وان استعمال تقنية تثبيت النتروجين حيويًا بهيئة تلقح حبوب البقوليات ببكتريا الرايزوبيا يمكن ان يكون بديل مهم جداً عن الاسمدة النتروجينية المكلفة اقتصادياً والملوثة بيئياً، كما ان زراعة الفاصولياء تحسن خصوبة التربة عن طريق تثبيت النتروجين الجوي من خلال عملية تعايش البكتريا العقدية مع جذور المحاصيل البقولية ويجعل النتروجين الجوي جاهز للنبات [1].

يعتبر عنصر النتروجين مكون ضروري من مكونات الغذاء والمبيدات والاسمدة والمتفجرات [2]. وقد ثبت انه محرك (Motor) نمو النبات وهو من العناصر الغذائية الهامة والاساسية لحياة النبات والحيوان والاحياء المجهرية على حد سواء [3]. وهو من أكثر العناصر الغذائية عرضة للتحويلات الحيوية لدخوله مكوناً رئيساً في بناء جزيئات البروتين التي تعتمد عليها صور الحياة المختلفة [4].

علي وعلي وعباس وعلي

النحاس من المغذيات الضرورية وهو متطلب مباشر في ايض الرايزوبيا لتتمكن من البقاء والنمو كاحياء حرة المعيشة وكاحياء متكافلة مع البقول. ان الاشكال المفيدة للنحاس لبيكتريا الرايزوبيا في محلول التربة هي ايونات Cu^{+2} ومركبات النحاس العضوية، وان له فائدة مباشرة في الاداء الوظيفي الانزيمي في الرايزوبيا، كما وان له دور مباشر في تكوين التعايش مع النباتات البقولية من خلال تكوين العقد الجذرية وتثبيت النتروجين الجوي. كذلك الحال بالنسبة للحديد الا ان صور الحديد المفيدة لبيكتريا الرايزوبيا في محلول التربة هي Fe^{+2} و Fe^{+3} والحديد المخلبي وان له دور مهم اضافي كمؤشر كيميائي- تنظيمي في الخلية [5].

ان اهمية النحاس كعنصر في غذاء الاحياء المجهرية والنبات يحتاج المزيد من الدراسة، حيث لا توجد بيانات معروفة على المستوى المطلوب وطريقة تطبيقه لاجل النمو غير المحدود [6]، ذلك ان معظم صور معادن النحاس محدودة الذوبان، وان ايون النحاس الفعال الذي يمتصه النبات من محلول التربة يكون بشكل Cu^{+2} ، ألا انه يوجد بشكل الايونات المعقدة القليلة التأثير $Cu_2(OH)^{+2}$ و $Cu(OH)^{-3}$ عندما يكون pH التربة اكثر من 6.5 ؛ على العموم ان معادن التربة وبالاخص *المونتموريلونايت تقوم بامتزاز مقادير ملحوظة من النحاس في الترب المتعادلة والقاعدية، كما في حالة الترب العراقية، وقد عزا بعض الباحثين هذا الى ترسيب الهيدروكسيدات والكربونات ، وقد يمتز النحاس بارتباطه بايونات داخلية في تركيب معادن التربة عن طريق الاواصر، كما ان مركبات النحاس العضوية التي تمثل 98% من النحاس الموجود في محلول التربة، تكون اكثر ثباتاً في التربة فلا يتمكن النبات الاستفادة منها. حيث يرتبط النحاس بالمواد العضوية عن طريق مجموعة الكربوكسيل او الفينول والهيدروكسيل، وتكون حوامض الهيومك (Humic acid) مركبات نحاسية مترسبة في التربة. علاوة على ذلك فان التركيز العالي لايون الكالسيوم المهم للنبات في التربة تقلل امتصاص النحاس كما في الترب الكلسية العراقية و/او عند اضافة اسمدة فوسفات الكالسيوم وكذلك الحال بالنسبة لكل من ايون النتروجين والالمنيوم او التسميد باحدهما، ولسوء الحظ فان اضافة اسمدة النحاس للتربة تسبب نقص الحديد [7].

يعد الحديد العنصر الرابع من حيث انتشاره في القشرة الارضية الا ان نقص الحديد في الترب على العموم ومنها الترب العراقية هي الظاهرة الاكثر صعوبة من حيث المعالجة بسبب الفة الحديد لتكوين مركبات ثابتة مع السليكون والاكسجين والكبريت ولقابليته العالية على الاحلال محل الالمنيوم والمغنيسيوم. فالترب القاعدية الحاوية على نسبة عالية من كربونات الكالسيوم والمغنيسيوم كما في الترب العراقية تعاني بدرجة كبيرة من نقص الحديد. حيث يترسب الحديد في الترب بهيئة هايدروكسيدات الحديد غير الجاهزة للامتصاص [7, 8].

ان تجهيز المغذيات عن طريق الجذور قد يُحد في بعض الظروف البيئية والترب ذات الـ pH المرتفع ومحتوى الكلس العالي بالإضافة إلى نقص ماء الري. ان مثل هذه الظروف تسود في المناطق القاحلة ونصف القاحلة [9] ، كالعراق. اذ ان الترب العراقية تقع ضمن ترب مناخ البحر الابيض المتوسط وتتصف بانها ذات محتوى عالي من كربونات الكالسيوم ودرجة تفاعل قاعدية وانخفاض نسبة المادة العضوية لذا فان الحديد المرسب هو السائد [7, 8]، وكذلك الحال بالنسبة للنحاس [7]، ونسبة النتروجين في الترب العراقية واطنة جدا [1]. ففي هذا النوع من الترب تكون اضطرابات المواد المغذية هي العامل المحدد الأكثر أهمية في انتاج المحاصيل، حيث أن عدم توفر المغذيات الصغرى ممكن ان تُعيق إنتاج المحاصيل [10]. وهنا يبرز دور الاخصاب الورقي الضروري لتعويض نقص المواد المغذية عن طريق الجذور أو لتصحيح نقص هذه المواد المغذية أو لمواجهة الحاجات العظيمة لهذه العناصر عن طريق الأوراق [11].

*Montmorillonite : معدن طيني المينوسيليكاتي بنظام طبقي من نوع 1:2 وتركيب بلوري قابل للتمدد اي انه يتكون من صفيحتين رباعي السطوح السيليكاتية تحصران صفيحة من ثنائي السطوح الالمنيومية. ص 87 مصطلحات علم التربة ترجمة صالح دميرجي و وليد العكدي (1982).

وعلى ما يبدو ان الدراسات حول تأثير الزمن والتغذية بالرش على الاوراق بالنحاس والحديد في العلاقة بين نسبة النتروجين في النبات وانتاجية النبات متمثلاً بوزن مئة بذرة نباتات الفاصولياء ضئيلة جداً او غير موجود اصلاً في العراق، لذلك صُمم البحث الحالي لتقييم تأثير مستويان من النحاس وثلاثة مستويات من الحديد ونوعين من بذور نباتات الفاصولياء مع تلقیح البذور باللقاح الرايزوبي في العلاقة بين نسبة النتروجين في النبات و معدل وزن مئة بذرة ليتبعها دراسة هذا التأثير على باقي الصفات في دراسات لاحقة.

المواد وطرائق العمل

اجريت تجربة أصص ذات حجم 15 كغم في كلية الزراعة/جامعة بغداد في الموسم الربيعي 2008 حيث ملئت بتربة معقمة بطريقة بروميد المثلل باستعمال التصميم Randomize Complete Blok Design وثلاثة مكررات لكل معاملة، وقد قدرت بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة المستعملة باستعمال الاجراءات التحليلية القياسية، وكما مبين في جدول (1) ادناه :

جدول-1: بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة الدراسة.

القيم	الصفات
16	الرمل
46	% الغرين
38	الطين
مزيج طينية غرينية	النسجة
2.43	Ec (ds/m)
7.91	pH
10.12	O. M. (g/kg)
248.24	CaCO ₃ (g/kg)
0.70	Total N (g/kg)
0.161	P (Cmolc/kg)
5.96	Fe (mg/Kg Soil الجاهز)
0.51	Cu (mg/kg Soil الجاهز)

المعاملات (12= 3×2×2):

1- S1 Cu0 Fe0, 2- S1 Cu1 Fe0, 3- S1 Cu0 Fe1, 4- S1 Cu1 Fe1, 5- S1 Cu0 Fe2, 6- S1 Cu1 Fe2, 7- S2 S2 Cu1 Fe2. Cu0 Fe0, 8- S2 Cu1 Fe0, 9- S2 Cu0 Fe1, 10- S2 Cu1 Fe1, 11- S2 Cu0 Fe2, 12-

اثنا عشر معاملة تم اعتمادها في التجربة ناتجة عن مستويين من النحاس (صفر) (رش ماء فقط) ، 25 ملغم Cu/ لتر بهيئة CuSO₄.5H₂O (25% نحاس) وبمعدل رشتين بعد 25 و 40 يوم من البذار) وثلاثة معاملات من الحديد وبفترتين زمنيتين مختلفتين (صفر) (رش ماء فقط) ، 60 ملغم/ لتر بعد 20 يوم من البذار ، ونفس التركيز بعد 30 يوم من البذار) باستعمال الحديد المخلبي EDTA (13% حديد) وبمعدل رشة واحدة ونوعين من بذور نباتات الفاصولياء (برازيلي (احمر) واسباني (ابيض)) تم الحصول عليها من شركة الدهلكي للمنتوجات الزراعية ، مع تلقیح البذور بخليط اللقاح الميكروبي تابع للبكتريا العقدية *Rhizobium leguminosarum* خليط السلالتين 889 و 1865 تم الحصول عليها من مركز اباء للابحاث الزراعية، حيث سمدت كل السنادين ب 125 كغم K/هـ بهيئة كبريتات البوتاسيوم (41.5%K) و 40 كغم N/هـ بشكل نترات الامونيوم (33% N) بواقع جرعة واحدة قبل البذار و 60 كغم P/هـ بهيئة السوبر فوسفات الثلاثي (20% P) بواقع جرعتين الاولى قبل البذار والثانية عند

علي وعلي وعباس وعلي

الازهار. عوملت البذور باللقاح باستعمال مادة البتموس والصمغ العربي بمقدار 30 غم/كغم بذور وبذرت عند المساء، ومورست كل الاجراءات الزراعية كازالة الاعشاب والري لحدود السعة الحقلية [12]، حيث هضمت العينات النباتية باستعمال حامض الكبريتيك والبيركلوريك لتخفف وتنقل جميعا في عبوات زجاجية سعة 50 مل وسجل عليها المعاملة والمعلومات ليتم تبريدها وقياس محتواها من النتروجين [1]، حيث تم اعتماد اجراءات قياسية حديثة لتسجيل وتحليل النتائج باستخدام Microsoft Excel 2007 وبرنامج ال SAS 2004 وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 5%.

النتائج والمناقشة

تأثير النحاس في نسبة النتروجين في النبات

اظهر جدول (2) ونتائج التحليل الاحصائي تفوق معاملة النحاس Cu1 معنوياً بالمقارنة مع باقي معاملات النحاس باحرازها اعلى متوسط نسبة نتروجين في النبات حيث بلغ 2.05 % وبفارق معنوي عن معاملة الرش بالماء فقط التي سجلت 2.01 %. اظهرت عدد من الدراسات ان نقص النحاس المبكر في التربة يتعارض مع عملية تثبيت النتروجين بواسطة العقد الجذرية الرايزوبية لنباتات الجبث الابيض والجبث (Subterranean Clover). الا ان الدور الحيوي-الكيميائي للنحاس ليس واضحاً لحد الان ويحتاج المزيد من الدراسة [5,6,13]، ولكن التغذية الارضية بالنحاس لنباتات الترمس كان له تأثير ايجابي على عملية تثبيت النتروجين الجوي بواسطة الرايزوبيا [13]، وقد حصل الاخير على نتائج معنوية في اعداد العقد الجذرية لنبات الباقلاء والترمس نتيجة اضافة النحاس الى التربة وعلى ذلك بالمشاركة المباشرة والفعالة للنحاس في التفاعلات المؤكسدة لمركبات العقد الجذرية الفينولية حيث ان المركبات الفينولية تتأكسد الى Quinones بواسطة انزيم Polyphenol Oxidase حيث تتبلر هذه الكوينونات الى مركبات الميلانين، ولكن وعلى ما يبدو ليس هناك تأثير واضح على عقد نباتات فستق الحقل، ولربما بسبب متطلبات هذا النبات العالية للحديد.

ومن المعروف ان رش الاوراق بالعناصر الغذائية يسبب ارتفاع تركيزه في النبات، حيث اشار [4] الى أن العناصر الغذائية تمتص عن طريق الاوراق بطريقتين اولها طريقة الSymplasm أي بواسطة جسور سايتوبلازمية (Ectodesmata) موجودة تحت طبقة كيو تكل خلايا بشرة الاوراق ومن ثم عن طريق الساي توبلازم الى اجزاء النباتات الأخرى ومنها الجذور، والثانية عن طريق الApo-plasm أي عن طريق الثغور أو المسافات البينية بين خلايا الورقة حتى وصول الأوعية الناقلة ثم إلى أجزاء النبات المختلفة. وبهذه الآليات يمكن التخلص من التضاد الحاصل بين العناصر الغذائية المهمة في التربة.

اضافة الى ما سبق فان النحاس مشترك على الأقل في دزينة إنزيمات، والتي هي من نوع انزيمات الأكسدة في كل من النبات والحيوان [5]. الا ان الاهمية المباشرة للنحاس في نمو النبات وتكوين العقد الجذرية هي دوره في عملية البناء الضوئي لقيامه بنقل الالكترونات عند تحويل الطاقة الضوئية الى طاقة كيميائية (كاربونية) [7]. والتي هي اساس علاقة التعايش بين الرايزوبيا والبقول، والتي تستعمل لتنشيط الكثير من الفعاليات الحيوية كنمو المجموع الخضري والجذري وبالتالي تزداد المساحة الفعالة للاوراق والجذور، مما يشجع العلاقة التعايشية مع بكتريا الرايزوبيا الحرة المعيشة في التربة [1]. ومن ناحية أخرى فان اشتراك النحاس في تركيب انزيمات الأكسدة والاختزال التي تساهم في عمليات الأكسدة والاختزال في خلايا انسجة النبات والتي تؤدي عمليات حيوية مثل التنفس وتكوين الكلوروبلاست والبروتين (تمثيل النتروجين) واختزال النترات اثناء تثبيت النتروجين الجوي في البقوليات بالاضافة الى زيادة قابلية النبات على تكوين الاحماض النووية DNA و RNA وبالتالي زيادة الانقسام الخلوي وتحسين نمو النبات [7]، مما يزيد الطلب على النتروجين المثبت تعايشياً بواسطة الرايزوبيوم، وان هذا الطلب المتزايد يعتبر من اهم العوامل المشجعة على تنشيط وتفعيل عمل

العقد الجذرية (البكترويدات) في تثبيت النتروجين الجوي [1]، مما يزيد محتوى النبات من النتروجين.

تأثير رش الحديد في نسبة النتروجين في النبات:

ابرز جدول (2) ونتائج التحليل الاحصائي تفوق جميع معاملات الرش بالحديد Fe1 و Fe2 معنوياً على معاملة الرش بالماء (Fe0) في نسبة نتروجين النبات التي بلغت 1.93 % ، بينما سجلت معاملات الرش بالحديد Fe1 و Fe2 2.12 و 2.04 % على التوالي. ان الابحاث المنجزة في تأثير تغذية الرش بالحديد في نسبة النتروجين في نباتات الفاصولياء نادرة جداً رغم توفر العديد من الدراسات حول تأثير اضافة الحديد للتربة في كل من البقوليات والرايزوبيا [14,15]، فقد سجل احد الباحثين [16] في تجربة بيت زجاجي مع الترب الكلسية وفستق الحقل زيادة بارزة في اعداد واوزان العقد الجذرية لنباتات فستق الحقل المرشوشة بالحديد مقارنة بالنباتات غير المرشوشة بالحديد، فبعد خمسة ايام على رش الحديد اظهرت عقد النباتات المرشوشة تضاعف عدد البكترويدات (Bacteroids) بلغت 200 مرة في العقد و 14 مرة تضاعف اكثر في تركيز الهيموكلوبين في العقد الجذرية وانتهت اعراض نقص الحديد ونشط عمل انزيم النتروجينيز. وعلى ما يبدو ان الرش بالحديد احد الاساليب المهمة ذات التأثير المباشر في زيادة قابلية النباتات البقولية الحاوية على العقد الجذرية البكتيرية والمزروعة في تربة تعاني من نقص محتواها من الحديد الجاهز وكما هي الحالة في الترب العراقية ، على تحسين كفاءة عملية تثبيت النتروجين الجوي وزيادة محتواها من النتروجين. يعد الحديد ذو أهمية كبيرة لعملية تثبيت النتروجين الجوي تعايشاً في النباتات البقولية وذلك لحاجة طرفي العملية، البكتريا العقدية والنبات البقولي العائل له ، فبالنسبة للبكتريا يدخل الحديد في تركيب نوعين من البروتين (Fe-Protein، Mo-Fe-protein) المكونة لا نزيم النتروجينيز ، وفي تكوين مادة خضاب العقد (Leghemoglobin) الموجودة داخل العقد الجذرية وفي نمو هذه العقد وفعاليتها ، وكذلك يؤثر على تواجد البكتريا العقدية في التربة قبل اقامتها للعلاقة التعايشية مع النبات العائل ، كما ان له اهمية مباشرة في تكوين وبناء الكلوروفيل وفي نشاط العديد من الانزيمات المفتاحية (key enzymes) [15]. وبالاخص انزيمات نقل الالكترونات (Electron carrier ferredoxin) في النباتات [14]. لذا فان الحديد يؤدي وظائف عديدة ومهمة في نمو النبات ويعد القوة المحركة للعديد من الفعاليات الحيوية التي يقوم بها النبات [17].

ان رش الاوراق بالحديد يسبب تلبية الحاجة المباشرة لعنصر الحديد لكل من العائل البقولي والبكتريا ولعملية بناء الكلوروفيل ، مما يحفز انتاج الطاقة الكيميائية، مما يعكس ايجاباً في كل من التعايش بين الرايزوبيا والبقول، والعديد من الفعاليات الحيوية والنمو بصفة عامة وبالتالي كمية النتروجين المثبتة لصالح العائل النباتي.

أن عملية تكوين العقد الجذرية وتثبيت النتروجين تحتاج كميات من الحديد أعلى من حاجة كل من النبات نفسه والبكتريا على حده لذا فإن نمو هذه النباتات سيتأثر بشكل حاد عند نقص الحديد اذا ما قورنت بالنباتات المجهزة بمصدر نتروجيني معدني بسبب التأثير الواضح للحديد في عملية تثبيت النتروجين، حيث ان نقص هذا العنصر يسبب الانخفاض الشديد في كل من اعداد واوزان العقد الجذرية ومحتوى خضاب العقد واعداد البكترويدات في العقد وفعالية انزيم النتروجينيز [14, 15]، وبالتالي انخفاض محتوى النبات من النتروجين.

تأثير عامل الزمن وتغذية الرش بالنحاس والحديد في العلاقة بين نسبة النتروجين في النبات ومعدل وزن مئة بذرة نوعين من الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*) ملقحة ببكتريا الرايزوبيوم

علي وعلي وعباس وعلي

جدول 2- تأثير زمن الرش بالنحاس والحديد في نسبة النتروجين في النبات (%)

Cu Means	Fe Means	Cu×S Means	Fe×Cu Means	Bean Types		Cu	Fe
				S2	S1		
Cu0 2.01b	1.93 c	1.98 S1×Cu0 2.04	1.91 1.96	1.92 1.98	1.89 1.93	Cu 0 Cu 1	Fe 0
				1.95	1.91	Fe0 Means×S	
Cu1 2.05a	2.12 a	2.09 S1×Cu1 2.04	2.09 2.15	2.10 2.16	2.08 2.13	Cu 0 Cu 1	Fe 1
				2.13	2.11	Fe1 Means×S	
	2.04 b	2.07 S2×Cu1	2.01 2.06	2.05 2.08	1.97 2.04	Cu 0 Cu 1	Fe 2
				2.06	2.01	Fe2 Means×S	
				2.05A	2.01B	S Means	

LSD 0.05, S=0.0151, Fe=0.0184, Cu=0.0151, S×Fe=0.0436, S×Cu=0.0825, Fe×Cu=0.0372, S×Fe×Cu=0.0369

تأثير زمن الرش بالحديد والنحاس في نسبة النتروجين في النبات:

اظهر جدول (2) ونتائج التحليل الاحصائي تفوق مدة الرش بالحديد بعد 20 يوم من البذار (Fe1) معنوياً على مدة الرش بعد 30 يوم من البذار (Fe2) في نسبة النتروجين في النبات عند تسجيلهما 2.12 و 2.04 % على التوالي. ان التجهيز المبكر للحديد لسد حاجة عملية تكوين العقد الجذرية انعكس ايجابيا على اعداد العقد الجذرية وفعاليتها في تثبيت النتروجين الجوي محفزاً تجهيز النبات بالنتروجين بصورة ابركر ورفع نسبته في النبات، ومن ناحية اخرى ان دور النحاس في الانزيمات واختزال النترات وتكوين الكلوروبلاست والبروتين وتكوين الاحماض النووية DNA و RNA (تمثيل النتروجين) وموعد اضافته (خمسة ايام بعد رش الحديد) شجع الاستهلاك والطلب على النتروجين المثبت حيويًا لاجل استعماله في الايض والبناء الخلوي وبالتالي ارتفاع نسبته في النبات. ولعل من اسباب تفوق مدة الرش بالحديد بعد 20 يوم من البذار (Fe1) على مدة الرش بعد 30 يوم من البذار (Fe2) رغم انهما بنفس الجرعة هو ان نشاط بكتريا الرايزوبيا في التربة (اللقاح البكتيري) تبدأ بالانخفاض بعد مرور 21 يوم من بدء نشر اللقاح في التربة ، فقد اشار [18] الى أن أعداد الخلايا الحية قد ازدادت خلال مدد التحضين الأربع (3، 9، 15، 21) يوم مقارنة بالأعداد التي سجلت في بداية التجربة عند الزمن صفر وبدأت بالانخفاض قليلاً في المدة الأخيرة (21 يوم) ، وقد يعود ذلك إلى موت بعض الخلايا لتناقص العناصر الغذائية في التربة ، إضافة إلى انه بعد مرور 21 يوماً من التحضين ربما حصلت تغيرات غير ملائمة في بيئة نمو البكتريا مما ظهر في خفض أعداد البكتريا خلال مدة التحضين الأخيرة. وبناءً على ذلك فلا بد من دعم البكتريا المتكافلة مع العائل النباتي خلال مدة لا تتجاوز 21 يوماً من بدء عملية التلقيح والبذار حيث تعتبر هذه المدة مناسبة لتوفر مجموع خضري مناسب لعملية التغذية بالرش.

تأثير نوع البذور (العامل الوراثي-البيئي) في نسبة النتروجين في النبات:

يمكن الاستنتاج من جدول (2) تفوق النباتات الناتجة عن البذور صنف اسباني (S2) معنوياً في نسبة النتروجين في النبات على النباتات الناتجة عن البذور صنف برازيلي (S1) في نسبة النتروجين ، حيث سجل الاول 2.05 % والاخير 2.01 % رغم انهما يعودان الى نفس النوع النباتي. وعلى ما يبدو ان توافق اللقاح البكتيري مع النوع الاول (S2) كان بدرجة معنوية اكبر من الاخير (S1)، ذلك ان التعايش هي وظيفة مستجيبة بصورة فعلية لحوافز وراثية وبيئية عديدة [19]. فقد وجد [20] اختلافاً وراثياً بين أصناف الفاصولياء الكفوءة وغير الكفوءة في مدى الانتفاع من التلقيح والمغذيات المتوافرة والمرتبطة مع البنية الوراثية للعائل النباتي (كثافة انتشار الجذور والاوراق). والشيء نفسه بالنسبة للشريك البكتيري التعايشي إذ إن بكتريا الرايزوبيا تتنوع وتختلف وراثياً ايضا [21].

ان تأثير العامل الوراثي النباتي يختلف ضمن الصنف الواحد من النبات في نوع افرازات الجذور وكثافة انتشار الجذور في التربة والمساحة السطحية الفعالة للجذور والتي تعد من اهم العوامل التي تؤثر في عملية تكوين العقد بعد تثبيت عامل القاح على كلا اصناف البذور في التجربة، ومن المعروف ان تحسن تكوين العقد يزيد كمية النتروجين المثبتة والمجهزة للنبات ونسبته في النبات. ومن ناحية اخرى فان تأثير العامل البيئي لمنشأ البذور له تأثير مهم حيث ان بيئة البرازيل استوائية او شبه استوائية بينما البيئة الاسبانية تقع ضمن مناخ البحر الابيض المتوسط الذي يقع العراق ضمن مناخه، وعلى ما يبدو ان الصنف الاسباني كان اكثر ملائمة للبيئة العراقية من الصنف البرازيلي [1].

تأثير التداخل بين النحاس والحديد في نسبة النتروجين في النبات $Fe \times Cu$:

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجدول (2) تفوق معاملة التداخل $Fe1 \times Cu1$ معنوياً في نسبة النتروجين في النبات على باقي معاملات تداخل الحديد والنحاس اذ بلغت 2.15 % تبعها وبفارق معنوي معاملة التداخل $Fe1 \times Cu0$ التي احرزت 2.09 % والتي لم تسجل فروق معنوية مع معاملة التداخل $Fe2 \times Cu1$ اذ بلغت 2.06 % حيث تفوقت هذه المعاملات معنوياً على معاملة المقارنة التي بلغت 1.91 %. أن أسباب ارتفاع نسبة النتروجين في النبات عند التداخل بين النحاس والحديد يعود إلى تأثير هذين العنصرين المهمين في الكثير من الفعاليات الحيوية لكل من بكتريا الرايزوبيا والعائل النباتي والعلاقة التعايشية بحد ذاتها، إذ أن تأثير الرش المتتابع بهما زمنياً قد زاد على ما يبدو هذا التأثير وبالتالي اثر إيجاباً في نسبة النتروجين في النبات.

تأثير التداخل بين صنف البذور والنحاس في نسبة النتروجين في النبات $Cu \times S$:

بينت النتائج في جدول (2) والتحليل الإحصائي تفوق معاملة تداخل صنف البذور والنحاس $Cu1 \times S2$ معنوياً في نسبة النتروجين في النبات على معاملة المقارنة وعدم تسجيل فروق معنوية بين المعاملات الاخرى حيث بلغا 2.07 و 1.98 % على التوالي.

تأثير التداخل بين صنف البذور والحديد في نسبة النتروجين في النبات $Fe \times S$:

تعرض نتائج التحليل الاحصائي وجدول (2) تأثير التداخل بين صنف البذور والحديد إذ وصلت نسبة النتروجين في النبات إلى ذروتها عند معاملة التداخل $S2 \times Fe1$ التي سجلت 2.13 % تلتها وبدون فارق معنوي معاملة التداخل $S1 \times Fe1$ التي سجلت 2.11 % ، الا انهما تفوقتا معنوياً على باقي معاملات تداخل صنف البذور والحديد وعلى معاملة المقارنة التي سجلت 1.91 %. ان عدم وجود فروق معنوية عند التداخل بين صنف البذور عند تطبيق نفس مستوى الحديد (بعد 20 يوم) ربما يعود الى دور الرش بالحديد وملائمة زمن تطبيقه في تنشيط علاقة التعايش وتثبيت النتروجين حيويًا وتقليل تأثير العامل البيئي - الوراثي على كمية النتروجين المثبت بواسطة بكتريا الرايزوبيا.

تأثير التداخل بين صنف البذور والنحاس والحديد في نسبة النتروجين في النبات:

لخص جدول (2) نتائج التحليل الإحصائي التي بينت تفوق معاملة تداخل صنف البذور والنحاس والحديد $Fe1 \times Cu1 \times S2$ معنوياً على جميع معاملات تداخل صنف البذور والنحاس والحديد عند بلوغها 2.16 % تلتها وبدون فارق معنوي معاملة التداخل $Fe1 \times Cu1 \times S1$ التي سجلت 2.13 % واللذان تفوقتا على معاملة المقارنة التي سجلت 1.89 %، وكما ذكرنا سابقاً فإن التأثير المتداخل لكل من النحاس والحديد اضافة الى صنف البذور المناسب والرش المتتابع بهما زمنياً قد زاد على ما يبدو هذا التأثير وبالتالي اثر معنوياً في نسبة النتروجين في النبات.

تأثير النحاس في معدل وزن مئة بذرة:

ان معدل وزن مئة بذرة هو دليل على مدى جودة محاصيل البذور البقولية مرتفعة البروتين ولا يعتبر دليلاً على كمية الحاصل وان هناك علاقة ارتباط معنوية عالية بين وزن البذور وتغذية النبات الجيدة بالنتروجين (المثبت حيويًا في البحث الحالي) الذي يخزن في البذور بهيئة بروتين مما ينعكس على وزن البذرة وجودتها صناعياً وزراعياً، كما استعمل في إحدى الدراسات لتقييم انبات البذور البقولية بهدف الاكثار ، وقد يحدث ارتفاع في كل من كمية الحاصل ومعدل وزن مئة بذرة عند اتباع التغذية المتكاملة مع باقي العناصر الغذائية المهمة. يظهر جدول (3) ونتائج التحليل الاحصائي وتفوق معاملة النحاس CuI معنوياً مقارنة بباقي معاملات النحاس باحرازها اعلى معدل وزن مئة بذرة بلغ 27.63 غم وبفارق معنوي عن معاملة الرش بالماء فقط التي سجلت 26.86 غم. وعلي ما يبدو لا توجد دراسات مماثلة حول تأثير الرش بالنحاس على معدل وزن مئة بذرة، الا ان احد الباحثين [13] حصل على نتائج معنوية نتيجة اضافة النحاس الى التربة في النمو العام للنبات والوزن الجاف للمجموع الخضري لنبات الباقلاء والترمس. كما اظهرت عدد من الدراسات ان نقص النحاس المبكر في التربة يتعارض مع عملية تثبيت النتروجين الجوي تعايشياً ، والذي يعتبر من اهم عوامل النمو الخضري للعائل البقولي وتحسن صفات الحاصل. كما في نباتات الجبب الابيض والجبب [13,6,5]، حيث ان التغذية الارضية بالنحاس لنباتات الترمس له تأثير ايجابي على عملية تثبيت النتروجين الجوي تكافلياً بواسطة بكتريا الرايزوبيا [13]. اذ ان رش الاوراق بالنحاس يسبب تلبية الحاجة المباشرة للعنصر لكل من العائل البقولي والبكتريا لعملية البناء الضوئي وتركيب انزيمات الاكسدة والاختزال، مما يحفز انتاج الطاقة الكيميائية، وعملية تمثيل النتروجين وبالتالي زيادة الانقسام الخلوي والطلب على النتروجين المثبت وتحسين نمو النبات عامة والمجموع الخضري خاصة [7]. مما ينعكس على وزن وجودة الحاصل والبذور.

تأثير رش الحديد في معدل وزن مئة بذرة:

يظهر جدول (3) ونتائج التحليل الاحصائي تفوق جميع معاملات الرش بالحديد FeI وFe2 معنوياً على معاملة الرش بالماء فقط (Fe0) في وزن مئة بذرة التي بلغت 26.16 غم ، بينما سجلت معاملات الرش بالحديد FeI وFe2 28.14 و27.43 غم على التوالي. ان الابحاث المنجزة في تأثير الرش بالحديد في معدل وزن مئة بذرة نباتات الفاصولياء لم يتم الحصول عليه او غير موجودة اصلاً ، الا انه توجد عدد من الدراسات حول تأثير اضافة الحديد للتربة في كل من البقوليات والرايزوبيا [14] ، فقد حصل [15] على زيادة معنوية على مستوى 0.05 في معدل وزن مئة بذرة لنباتات الحمص نتيجة اضافة الحديد للتربة بالمقارنة مع السيطرة، وقد عزى ذلك الى دور الحديد في زيادة كفاءة عملية تثبيت النتروجين الجوي وزيادة نمو النبات ومحتواه من النتروجين والذي قد يكون أحد الأسباب الرئيسية التي أدت الى زيادة معدلات هذه الصفة. بينما حصل [22] على زيادة معنوية في معدلات كافة القياسات النباتية لنباتات فستق الحقل وفي تقليل معدل نسبة البذور الضامرة وفي زيادة معدل نسبة تصافي الحاصل نتيجة التأثير المتداخل للتلقيح بالبكتريا العقدية واطافة الحديد للتربة. أن هذه النتائج تعكس لنا استجابة النباتات البقولية لأضافة الحديد بشكل كبير من خلال تأثيره على عملية تكوين العقد الجذرية وفعالية أنزيم النتروجينيز وبالتالي التأثير على كفاءة عملية تثبيت النتروجين الجوي، وبفعل هذه الزيادة سيدفع النبات لامتصاص عناصر غذائية أخرى بكمية أعلى ونتيجة ذلك ستتعاكس ايجاباً في نمو النبات بصورة أفضل ووزن وجودة الحاصل والبذور [5]. وقد وجد عدد من الباحثين [23, 24] زيادة معنوية نتيجة استعمال الرش بالحديد المعدني في معدل وزن الالف حبة والنسبة المئوية لبروتين حبوب الحنطة الخشنة والناعمة ، وقد عزوا ذلك إلى دور الحديد في فعالية العديد من الأنزيمات مثل Dehydrogenase وProtease وPeptidase وHexokinase وغيرها. حيث يعد الحديد ذو أهمية كبيرة ومباشرة في تكوين

وبناء الكلوروفيل وفي نشاط العديد من الانزيمات المفتاحية [15]، مثل Nitrogenase, Peroxidase, Catalase, Cytochrome Oxidase, Aconitase and Aminolvalinate Dehydrates [7]. وبالأخص انزيمات نقل الالكترونات في النباتات [14]. أذ ان الحديد يساعد في تكوين المركبين amino Laevulinic وProtochlorophyllic وهما مركبان أساسيان في سلسلة بناء الكلوروفيل وأن 80 % من الحديد الموجود في النبات يكون في البلاستيدات الخضراء. ومن ناحية أخرى، ان التغذية الورقية تؤدي الى منع حدوث Depletion أي عملية فقد أو سحب العناصر من الاوراق والتي تؤثر سلبا في عملية البناء الضوئي خلال مرحلة امتلاء الحبة [25].

جدول 3- تأثير زمن الرش بالنحاس والحديد في متوسط وزن مئة بذرة (غم)

Cu		Fe		Cu×S		Fe×Cu		Bean Types		Cu	Fe
Means		Means		Means		Means		S2	S1		
Cu0	26.16			26.62		25.29		25.75	24.83	Cu 0	Fe 0
26.86b		c		S1×Cu0		27.02		27.58	26.47	Cu 1	
				27.31				26.66	25.65	Fe0 Means×S	
Cu1	28.14			S1×Cu1		27.99		28.07	27.91	Cu 0	Fe 1
27.63a		b		27.10		28.29		28.45	28.13	Cu 1	
				S2×Cu0				28.26	28.02	Fe1 Means×S	
		27.43		27.94		27.30		27.49	27.11	Cu 0	Fe 2
		a		S2×Cu1		27.57		27.79	27.34	Cu 1	
								27.64	27.23	Fe2 Means×S	
								27.52A	26.97B	S Means	

LSD 0.05, S=0.1393, Fe=0.1706, Cu=0.1393, S×Fe=0.7239, S×Cu=0.9693, Fe×Cu=0.4863, S×Fe×Cu=0.3413

تأثير زمن الرش بالحديد والنحاس في معدل وزن مئة بذرة:

بينت نتائج التحليل الاحصائي وجدول (3) تفوق مدة الرش بالحديد بعد 20 يوم من البذار معنوياً على مدة الرش بعد 30 يوم من البذار في معدل وزن مئة بذرة عند تسجيلهما 28.14 و 27.43 غم على التوالي. وللأسف أيضاً وعلى ما يبدو لا توجد دراسات حول تأثير زمن الرش بكل من الحديد والنحاس في معدل وزن مئة بذرة ، الا ان التجهيز المبكر للحديد لسد حاجة عملية تكوين العقد الجذرية انعكس ايجابيا على اعداد العقد الجذرية وفعاليتها في تثبيت النتروجين مما حفز تجهيز النبات بالنتروجين بصورة ابرك داعماً نمو المجموع الجذري والخضري وبالتالي ازدياد المساحة الفعالة للجذور والاوراق وازدياد كثافة انتشار مواقع الاصابة على الجذور وشجع تطور الاصابة الاولى في الجذور بواسطة بكتريا اللقاح ، كما ان دعم المجموع الخضري للنبات بصورة عامة يحسن انتاج وتجهيز الطاقة لوحداث تثبيت النتروجين البكتيرية والذي يعد من اهم عوامل تطور الاصابة الاولى في نسيج لحاء الشعيرات الجذرية. وان دور النحاس في الانزيمات ودعم تمثيل النتروجين المثبت وموعد اضافته (خمسة ايام بعد رش الحديد) شجع الاستهلاك والطلب على النتروجين المثبت في الوقت المناسب لاجل استعماله في الايض والبناء الخلوي. كما ان تحسن نمو المجموع الجذري دعم بصورة مباشرة امتصاص العناصر الغذائية المهمة الاخرى لنمو النبات بصورة عامة ، وان ازدياد امتصاص العناصر الغذائية وبالأخص ازدياد كمية النتروجين المثبت بسبب العوامل المذكورة في اعلاه انعكس بصورة ايجابية على جودة ووزن الحاصل والبذور. وان تفوق مدة الرش بالحديد بعد 20 يوم على مدة الرش بعد 30 يوم من البذار رغم انهما بنفس الجرعة، كان بسبب ان نشاط اللقاح البكتيري في التربة يبدأ بالانخفاض بعد مرور 21 يوم من بدء نشره في التربة ، بسبب موت الخلايا البكتيرية لانخفاض مستويات العناصر الغذائية في التربة، وحصول تغيرات غير ملائمة في بيئة نمو البكتريا [18].

تأثير نوع البذور (العامل الوراثي-البيني) في معدل وزن مئة بذرة:

يظهر جدول (3) تفوق النباتات الناتجة عن البذور صنف اسباني (S2) معنوياً على النباتات الناتجة عن البذور صنف برازيلي (S1) في معدل وزن مئة بذرة ، حيث سجل الاول 27.52 غم والاخير 26.97 غم رغم انهما يعودان الى نفس النوع النباتي. وعلى ما يبدو لا توجد دراسات حول تأثير نوع بذور الفاصولياء في معدل وزن مئة بذرة ، الا انه وكما ذكرنا سابقا ان توافق اللقاح البكتيري مع النوع الاول (S2) كان بدرجة معنوية اكبر من الاخير (S1) ، ذلك ان التعايش هي وظيفة مستجيبة بصورة فعلية لحوافز وراثية وبيئية عديدة [19]. فقد وجد [20] اختلافاً وراثياً بين أصناف الفاصولياء الكفوءة وغير الكفوءة في مدى الانتفاع من التلقيح والمغذيات المتوافرة والمرتبطة مع البنية الوراثية للعائل النباتي.

تأثير التداخل بين النحاس والحديد في معدل وزن مئة بذرة $Fe \times Cu$:

يلخص جدول (3) نتائج التحليل الإحصائي التي أفرزت تفوق معاملة تداخل النحاس والحديد $Fe1 \times Cu1$ معنوياً في معدل وزن مئة بذرة على باقي معاملات تداخل الحديد والنحاس عدا معاملة التداخل $Fe1 \times Cu0$ عند تسجيلهما 28.29 و 27.99 غم على التوالي ، بينما بلغ متوسط وزن مئة بذرة عند معاملة المقارنة 25.29 غم . أن أسباب زيادة معدل وزن مئة بذرة عند التداخل بين النحاس والحديد يعود إلى تأثير هذين العنصرين المهمين في الكثير من الفعاليات الحيوية للعائل النباتي والعلاقة التعايشية بحد ذاتها، إذ أن تأثير الرش المتتابع بهما زمنياً قد زاد على ما يبدو هذا التأثير.

تأثير التداخل بين صنف البذور والنحاس في معدل وزن مئة بذرة $Cu \times S$:

يظهر جدول (3) ونتائج التحليل الإحصائي تفوق معاملة تداخل صنف البذور والنحاس $Cu1 \times S2$ معنوياً على معاملة المقارنة في معدل وزن مئة بذرة وعدم وجود فروق معنوية فيما بين معاملات التداخل الأخرى . حيث سجلا 27.94 و 26.62 غم على التوالي.

تأثير التداخل بين صنف البذور والحديد في معدل وزن مئة بذرة $Fe \times S$:

يبين جدول (3) تأثير التداخل بين صنف البذور والحديد إذ وصل معدل وزن مئة بذرة إلى ذروتها عند معاملة التداخل $S2 \times Fe1$ التي سجلت 28.26 غم ، تلتها وبدون فارق معنوي معاملتي التداخل $S1 \times Fe1$ ومعاملة التداخل $S2 \times Fe2$ حيث سجلتا 28.02 و 27.64 غم على التوالي، الا انها تفوقت معنوياً على باقي معاملات تداخل الحديد والبذور ومن بينها معاملة المقارنة التي سجلت 25.65 غم. ان هذه النتائج تظهر اختلاف استجابة اصناف الفاصولياء لتغذية الرش بالحديد ومدى الانتفاع من عملية الرش وتفوق تأثير نوع البذور على تأثير استجابة الرش بالحديد.

تأثير التداخل بين صنف البذور والنحاس والحديد في معدل وزن مئة بذرة:

اظهرت نتائج جدول (3) والتحليل الإحصائي تفوق معاملة تداخل صنف البذور والنحاس والحديد $Fe1 \times Cu1 \times S2$ معنوياً في معدل وزن مئة بذرة على جميع معاملات تداخل صنف البذور والنحاس والحديد عدا معاملة التداخل $Fe1 \times Cu1 \times S1$ عند تسجيلهما 28.45 و 28.13 غم على التوالي ، بينما احرزت معاملة المقارنة 24.83 غم. وكما ذكرنا سابقاً فإن التأثير المتداخل لكل من النحاس والحديد اضافة الى صنف البذور المناسب والرش المتتابع بهما زمنياً قد زاد على ما يبدو هذا التأثير.

العلاقة بين نسبة النتروجين المثوية في النبات ومعدل وزن مئة بذرة:

ان النتائج في الجدولين (2, 3) تظهر ارتباط ايجابي معنوي فيما بين نسبة النتروجين المثوية في النبات ومعدل وزن مئة بذرة بلغ 0.67 ، إذ ان رش نباتات الفاصوليا بالعناصر الصغرى (النحاس والحديد) في المدة المناسبة مع التلقيح البكتيري أدى الى تحسين صفاتها

الانتاجية (معدل وزن مئة بذرة) وهذا يعود الى دور تلك العناصر في حصول النبات على جميع حاجاته من العناصر الغذائية الأخرى وخصوصا النتروجين مما أدى الى رفع كفاءة عملية البناء الضوئي ومن ثم زيادة النمو الخضري للنبات مما كان له تأثير ايجابي في تنشيط العلاقة التعايشية وتحسين نسبة عقد البذور وزيادة معدل وزن مئة بذرة ، ان الزيادة الحاصلة في جاهزية العناصر الغذائية ادت الى زيادة كفاءة امتصاصها من قبل النبات ومن ثم زيادة كفاءة عملية البناء الضوئي وفعالية الانزيمات وتمثيل الكربوهيدرات والبروتينات (تمثيل النتروجين) فازداد بذلك النمو الخضري وهذا أدى بدوره الى تحسن صفات الحاصل والبذور. ومن ناحية أخرى فان نقص الاوكسجين يخفض من معدل امتصاص الاوراق للمغذيات ، اذ ان الامتصاص يعتمد على الطاقة الناتجة من التمثيل الضوئي والتنفس وان رش المحلول المغذي على المجموع الخضري يزيل الغبار منه فتزداد كفاءة النبات على تبادل الغازات من البيئة المحيطة فيتوفر للبلاستيدات الخضراء الماء وثنائي اوكسيد الكربون والطاقة ومن ثم يتمكن النبات من انتاج الاوكسجين والطاقة اللازمة لامتصاص المغذيات وبكفاءة اعلى من الجذور.

[25].

المصادر

1. Al-Sadi A. S., Effect of Potassium and Cobalt on *Rhizobium* Efficiency and on Growth and Yield of Bean. M.Sc. thesis, College of Agriculture - University of Baghdad, Iraq. , 4-5(2007).
2. Zahran, H. H. *Rhizobium-Legume Symbiosis and Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate*. Department of Botany, Faculty of Science, Beni-Suef, 62511 Egypt. Microbiology and Molecular Biology Reviews. American Society for Microbiology, 63(4): 968-969(2000).
3. FAO, Fertilizers and their Use. A pocket guide for extension officers, 4th edition. Roma , Italy, 7-9(2000).
4. Al-Sahaf, Fadhel Husain Redha, Practical Plant Nutrition. University of Baghdad, Ministry of Higher Education, Iraq. , 98-99(1989).
5. O'Hara, G. W. Nutritional Constraints on Root Nodule Bacteria Affecting Symbiotic Nitrogen fixation: a Review. Centre for *Rhizobium* Studies, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Murdoch, Australia. Aust. J. of Exp. Agri., 41: 417-433(2001).
6. O'Hara, G. W., N. Boonkerd and M.J. Dilworth. Mineral Constrains to Nitrogen Fixation. Plant and Soil, 108, 93-110(1988).

7. Amadi, Tarq Hassan, Micronutrient in Agriculture. Soil & Water Science, College of Agriculture, University of Baghdad, IRAQ., 93-108(1991).
8. Al-Taher, faysal mahbas madlol, Effect of Different Foliar Nutrition of Iron, Zinc and Potassium on the Growth and Yield of Wheat. M.Sc. thesis, College of Agriculture - University of Baghdad. Iraq, 5-9(2005).
9. Hussein, M.M., Abd El-Kader, A.A. and Mona A. M., Mineral Status of Plant Shoots and Grains of Barley under Foliar Fertilization and Water Stress. Research J. of Agri. and Bio. Sci., 5(2), 108-115(2009).
10. Nasef, M.A.; Nadia, M. B. and Amal, F. A., Response of Peanut to Foliar Spray with Boron And / or *Rhizobium* inoculation. J. of Appl. Sci. Res., 2(12), 1330-1337(2006).
11. Kassab, O.M., Soil Moisture Stress and Micronutrients Foliar Application Effects on the Growth and Yield of Mungbean Plants. J. Agric. Sci., Mansoura University, 30, 247-256(2005).
12. Beck, D.P; L. A. Materon and F.A . Fadi., Practical *Rhizobium* Legume Technology Manual. Technical No:19 . ICARDA, Syria, 52-99(1993).
13. Seliga, Henryka. Physiological Aspects of Nitrogen Fixation Response to Copper Nutrition in Several Grain Legume Species. In: Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment. Ando et al (Eds.), 1997. 699-702(1997).
14. Osotsapar Y., Micronutrients in Crop Production in Thailan. Department of Soils, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Sean, Nakorn Pathom 73140, Thailand, 7-10(2005).
15. Alkrtani, R. Effect of Iron and Phosphorus on *Rhizobium* Efficiency and on Growth and Yield of Cowpea. M.Sc. Thesis, College of Agriculture - University of Baghdad. Iraq, 13-18(2005).

16. Parkpian, P. and N. Boonkerd. Involvement of Iron in Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation in Groundnut. In :The Proceedings of National Groundnut Conference .Roi-et., Thailand, 23-25(1989).
17. Focus The Importance of Micronutrients in the Region and Benefits of Including them in Fertilizers. Agro-chemicals report .111(1), 15 – 22(2003).
18. Abdulameer, Ali Sabeeh, Effect of Time Factor, Molybdenum and Potassium on *Rhizobium* Growth in the Al-jaderya Sterilized Soil. Baghdad Science Journal, 7(3): 1091-1097(2010).
19. Vance, C. P. Agronomy and Ecology of Nitrogen Fixation. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Science Research Unit, Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA. 27-35(2001).
20. Shea, P. F., G. C. Gerloff and W. ZH. Gabelman, Differing Efficiencies of Potassium Utilization in Strains of Snapbeans. Departments of Horticulture and Botany, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. Plant and Soil, XXVIII, 2: 337-346(1968).
21. Elmerich, C.; A. Kondorosi and W. E. Newton, Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Paris, 197-207(1998).
22. Yousef, Amal Naom, Abass Fadhel Ali, The Role of Fertilization by Root Nodules Bacteria and Iron on the Growth and Yield of *Arachis hypogaea* L. Plants. Ebaa Journal for Agricultural Research, 11(2): 20-29(2001).
23. Humadi, Khaled Bader and Adel Abdula Al-Kafaje. Effect of Foliar Addition by Iron and Zinc on the Growth and Yield of *Triticum aestivum* L. Plants in the Calcareous Soil. Iraqi Agricultural Science Journal, 30(1): 58-69(1999).

24. Gheith, E.S., Abdel-Hafith, A.A., Khalil.N.A. and Abdel-shaheed, A., Effect of nitrogen and some micronutrients on wheat .Annal of Agric .Sci Moshtohor .20 (5), 255 -268(1989).
25. Ahmed, Firas Wa`dallah, Effect of Fertilizers Addition of K and Mg in Soil and Foliar Application on Tomato Growth and Yeild Under Plastic House Conditions. M.Sc. Thesis, College of Agriculture - University of Baghdad. Iraq, 22-26(2006).