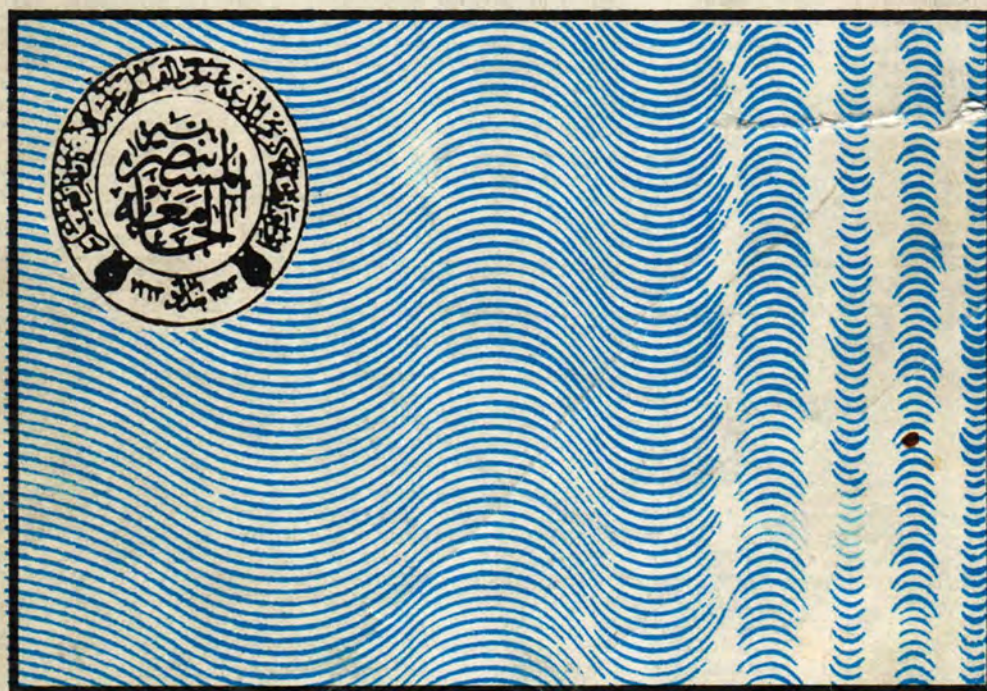


AL- Mustansiriya University  
COLLEGE OF SCIENCE

# AL-MUSTANSIRIYA

## JOURNAL OF SCIENCE



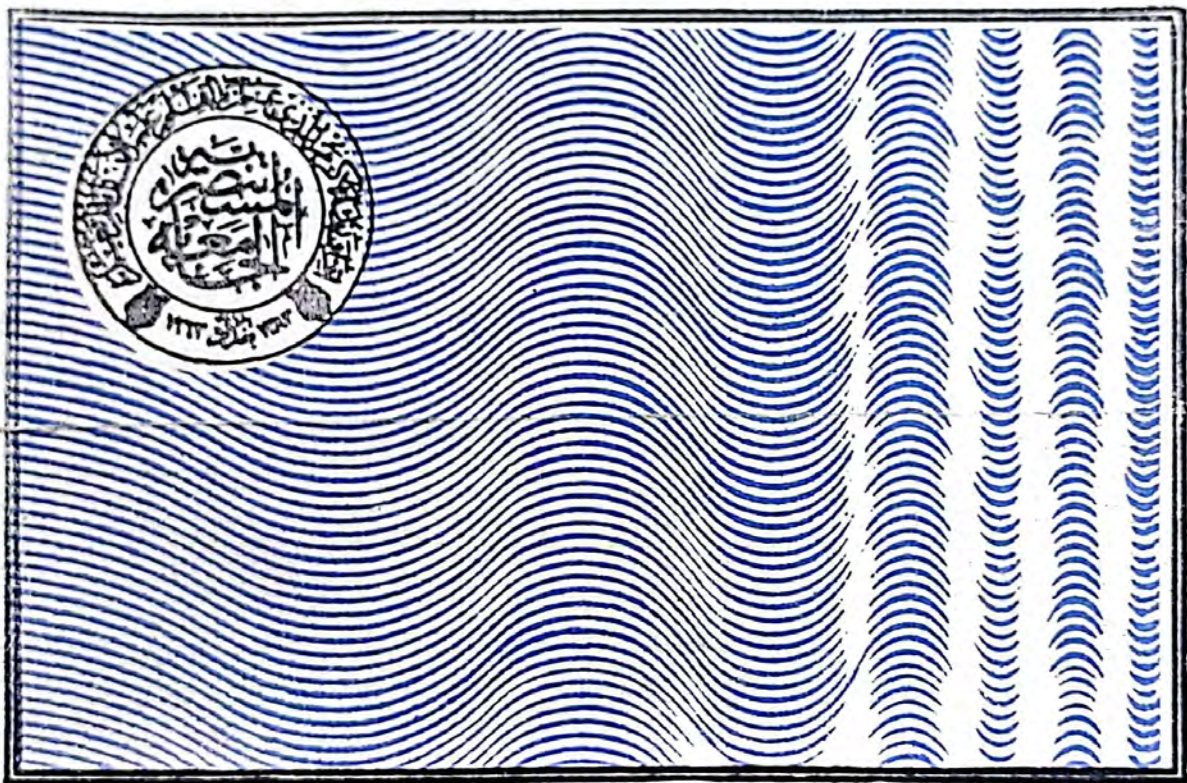
A Scientific Periodical issued by College of Science, AL-Mustansiriya University  
All correspondence should be addressed to :  
The Secretary Editor, Al-Mustansiriya Journal of Science  
College of Science, Al-Mustansiriya University.  
Al-Waziriya Baghdad Iraq  
Telex: 2566 ( MUSBAD IK )  
Phone : 4168491 or 4168500 - 1 (Ext-276 )

Volume : 10

Number( 3 )

Year : 1999

# AL - MUSTANSIRIYA JOURNAL OF SCIENCE



**A Scientific periodical issued by College of Science, Al-Mustansiriya University.**

**All correspondence should be addressed to:**

**The Secretary Editor, Al-Mustansiriya Journal of Science**

**College of Science, Al-Mustansiriya University.**

**Al-Waziriya, Baghdad, Iraq**

**Telex: 2566 (MUSBAD IK)**

**Phone: 4168491 or 4168500-1 (Ext.-276)**

<u>Subject</u>	<u>Page No.</u>
<b>Subjection of Lactic Acid Bacteria to NTG and UV for Improving Acid Production</b> ABDUL-WAHID BAQER AND NIHAYA HIKMAT ZAKI	1
<b>Effect of Soil Compaction on Growth and Mineral Distribution in Corn Plant (<i>Zea mays L.</i>)</b> ALI H. AL-BAYATI, SAADA K. AL-KHAFAJI AND MUSA F. YASEIN	13
<b>Production of Vitamin B<sub>12</sub> by Two Isolates of <i>Streptomyces griseus</i></b> ZAINAB N. HAMID, RAAD K. MUSLIH AND ABDUL-WAHID BAQIR	20
<b>Variation of Zooplankton Population in Qadisia Lake, Northwest of Iraq. III: Copepoda</b> THAER I. KASSIM, HANA H. MANGALO AND TALAL K. ABUDL KARIM	30
<b>In Vitro Activation of Mouse Peritoneal Microphases</b> IHSAN S. DAMIRDAGH AND YILDIZ M. A. AL-BANAA	40
<b>In Vivo Affect of Eserine Sulphate and Molsidomine on Acetyl Cholinesterase of Rabbit Brain and Gastrointestinal System</b> ZAHRA'A S. MUHSON, RAAD K. MUSLIH AND MOHAMMED A. AL-SHEIKHLY	49
<b>Preparation of Oxalic Acid from Local Plant</b> KHALIL KHALF ABID	55
<b>State of the Art for Simulation of Natural Treatment of Waste Water in an Open Channel</b> NARJIS D. SHEBEEB AND FARIS J.M. AL-IMARAH	58
<b>Effects Of The Effective Charge (<math>Z^*</math>) On The Corrections Of Bethe's Formula</b> KHALID A. AHMAD, NADIA A. AL-BANNA	64
<b>Optical Properties of ZnO Thin Films As a Function of Thickness and Annealing</b> ABDUL MAJEED E. IBRAHIM	72
<b>Effects Of The Effective Charge (<math>Z_1^*</math>) On The Range Of <math>\alpha</math>-Particles, Heavy Ions (<math>Z_1 &gt; 4</math>) and Fission Fragments In Different Gases</b> NADIA A AL-BANNA AND KHALID A. AHMAD	78
<b>Semi - Injectivity</b> M. S. ABBAS and S. A. ARBAH	85
<b>Derivation of Some Modified Sine-Gordon Equations and Their Exact Solutions, Using Painleve' Equations</b> INAAM A. MALOKI AND SHAHEED N. SHIMASAWI	93

## Subjection of Lactic Acid Bacteria to NTG and UV for Improving Acid Production

ABDUL-WAHID BAQER AND NIHAYA HIKMAT ZAKI

Biology Department, College of Science, Al-Mustansiriya University

(Received Feb. 24, 1999; Accepted May 16, 1999)

### الخلاصة

عرضت عزلتين من بكتريا *L. bulgaricus* و *S. thermophilus* الى التطفير بوساطة مادة (NTG) المطفرة والاشعة فوق البنفسجية (UV). ثم نمشت العزلتين الام والعزلات التي تم تطهيرها في وسط الشرش الاغشائي بحرارة (27) م لمدة (96) ساعة. بعدها قدرت كل من الحموضة الكلية (بوساطة التسحيح مع هيدروكسيد الصوديوم NaOH) وتركيز الحامض المنتج (بطرائق HPLC و TLC و IR). اظهرت النتائج ان جميع العزلات المطفرة كانت افضل من العزلتين الام في انتاجها لحامض اللاكتيك لاسيما عندما اعطت احدى عزلات بكتريا *L. bulgaricus* المطفرة بمادة (NTG) اعلى تركيز من الحامض المنتج مقارنة بالعزلات الاخرى.

### ABSTRACT

Two isolates of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* had been subjected to mutagenic treatments by nitrosoguanidine (NTG) and ultraviolet (U.V) light. Parents isolates and mutagenated isolates were propagated in the enriched when medium at 37°C for 96h. Total acidity (by titration with NaOH) and concentration of lactic acid (by HPLC, TLC, IR) were determined. Upon comparison with the parents isolates, all mutagenated isolates were superior in lactic acid production. However, highest concentration of lactic acid was achieved by a mutant resulted from treating *L. bulgaricus* isolate with NTG.

### INTRODUCTION

Using selected cultures of lactic acid bacteria in manufacturing milk-based foods is now well recognized. Although certain standards cultural are being extensively used In the dairy industry there is a need for developing more useful isolates which are charecterized by faster acid production in whey<sup>(1)</sup>. Development of production came by using stable production medium and cultured conditions. However, increasing production in this way often became narrow when compared to the production of the wanted product by controlling the gentic characteristics of the microorganism used. The later aspect could be achieved by genetic

mutation, hybridization and technology of nucleic acid recombination<sup>(2)</sup>. To preserve the production of many industrial cultures, mutation by chemical and physical means may induce bacterial mutants with great production ability<sup>(3)</sup>.

Development of biotechnology and genetic engineering were directed to obtain microbial isolates with high efficiency in producing large numbers of different industrial, nutritional and pharmaceutical agents. Lactic acid bacteria was considered to be one of the early used microorganism in dairy and pickles fermentation. Today, it is used in the industrial production of pure lactic acid and other industries<sup>(2)</sup>.

With the exception of a few reports, there is lack of information of such aspect.

This study was designed to improve the production and concentration of lactic acid by subjecting *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* local isolates to the treatment with chemical and physical mutagenic agents.

## MATERIALS AND METHODS

### Lactic Acid Isolates

*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolates were used. They were isolated from the yoghurt and dairy starter by pour-plate technique on MRS and Rogosa media<sup>(4)</sup>. The isolates were reidentified according to the standard procedure of Kandler and Weiss<sup>(5)</sup>.

### Enriched Whey Medium

Consisted of 0.3%  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ; 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5%  $\text{CaCO}_3$ , 0.2%  $\text{NaCOOH}$ ; 7.5% Lactose and 100ml Whey. After all ingredients were dissolved, in whey pH was adjusted to (6), then boiled for (5) min.<sup>(6)</sup>

### Treatment with NTG

Parent strains (*L. bulg.* & *S. therm*) were treated with 300 ug/ml of N-methyl, N-nitro-nitroso, guanidine (NTG) using the modified procedure of Adelberg et.al.<sup>(7)</sup>. After treatment for (5,10,15,20,25,30 & 40) min, cells were washed with N-thiosulfate (10%) and resuspended in MRS medium. Cells suspension was incubated at 37°C for several hours to allow growth and segregation. The suspension was then serially diluted, plated with MRS agar and incubated for 48h. at 37°C.

### Subjection to UV light

Test cultures were grown in MRS broth, harvested by a centrifuge (3000xg for 10min), washed three times with phosphate buffer (pH=6) and resuspended in the same buffer. Five ml of the cells suspension was transferred to a petri dish and exposed to (254)nm. of UV light with agitation. After exposing periods of (0.5, 1,2,3,4 and 5)min, 0.1 ml of each exposed samples and control was incubated in 10ml of MRS broth and incubated at 37°C for 48hr. viable count was

calculated<sup>(8)</sup>. An average of (5.1-6.8x10<sup>8</sup>) cells/ 1ml of each isolate was subjected to NTG and UV treatments<sup>(9)</sup>.

### Evaluation of Lactic Acid Production

Live colonies from the chemically and physically treated isolates were inoculated (after each exposure time) on MRS medium, then incubated at 37°C for 18-24h. After incubation, treatments were analyzed by HPLC for lactic acid production. Isolates which gave high efficiency in production were selected and described according to their cultural and sugar fermentation characteristics<sup>(5)</sup>.

Selected isolates were inoculated in to (100)ml of skim milk, incubate at 37°C for 72h. Enriched whey medium was inoculated with 5% of each isolation inoculum, fermented in a shaking incubator (150rpm) at 43°C/ 3-6 d. After incubation, total titrable acidity was determined according to Speck<sup>(4)</sup>, and pH was measured during fermentation. Concentration of lactic acid at the end of fermentation was evaluate by HPLC and IR<sup>(10)</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Lactic Acid Production

After treatment with NTG, 35 colonies of *L. bulgaricus* and 12 of *S. thermophilus* were separately grown in the enriched whey medium to evaluate their production of lactic acid by HPLC method. On the other hand, 22 colonies of *L. bulg.* and 10 of *S. thermophilus* were similiary grown after exposing to UV light, Table (1) shows that with the exception of four isolates of *L. bulg.* and three of *S. therm*; all other NTG and UV treated isolates were almost similar to their parents in acid production. Among those four isolates of *L. bulg.*, highest acid concentration (33.8%) was produced by isolate No. Lb/N-1 (an NTG treated isolates). St/N-3 (an NTG *S. therm.*) isolate gave highest acid conc (15.173%) among St/N-1 and St/N-2 isolates.

Concerning UV treated isolates, Lb/U-1 gave highest conc. (18.450%) and St/U-3 (11.914%) among other treated

isolates of *L. bulg.* And *S. therm* respectively.

**HPLC Chromatograms**

Obtained HPLC chromatograms (Fig 1-2) provide considerable information about the descriptive identification and quantitative estimation of separated compounds such as retaining time and spots on the stationary phase. Quantitative chromatograms are usually dependent on the comparison of height or peak area. Collins<sup>(11)</sup> and Skoog et.al.<sup>(12)</sup> mentioned that peak area is more accepted as an analytical indicator than the height due to its stability against limiting factors (e.g. temperature and sample size).

Preparing standard solution series which are closed in their structures to the tested samples is one of the important means for chromatographical quantitative analysis. In this study, the height of the peaks were drawn (as concentration indicators) after performing standard sample chromatograms. Skoog et.al.<sup>(12)</sup> insisted that sample size and injected coefficient should be taken into consideration. Moreover, such a method of analysis is characterized by high efficiency, small sample size requirement and ability to maintain the sample for long time<sup>(13)</sup>.

Table 1: Lactic acid concentration (HPLC-determined) produced by NTG and UV treated isolates of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* after grown in the enriched whey medium

NTG-treated		UV-treated	
Isolate No.	Acid Conc. (%)	Isolate No	Acid Conc. (%)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>			
Parent	8.000	Parent	7.500
Lb/N-1	33.800	Lb/U-1	18.450
Lb/N-2	23.771	Lb/U-2	18.330
Lb/N-3	21.006	Lb/U-3	15.122
Lb/N-4	20.229	Lb/U-4	14.132
Lb/N-5 to N-35	8-11	Lb/U-5 to U-32	7-9.4
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
Parent	7.107	Parent	6.717
St/N-1	12.711	St/U-1	10.300
St/N-2	12.997	St/U-2	10.719
St/N-3	15.173	St/U-3	11.914
St/N-4 to N-12	6-8.5	St/U-4 to U-12	6.8-8.7

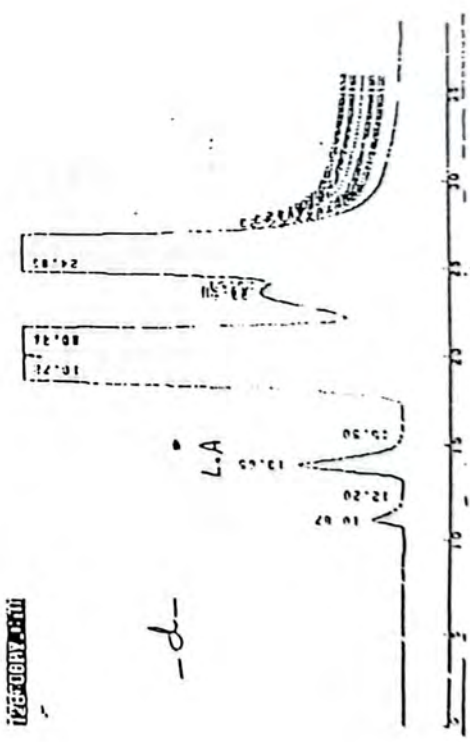
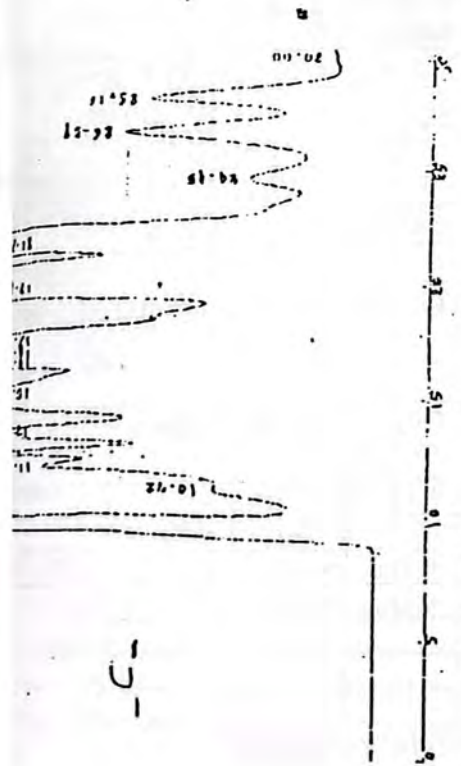
Table 2: Carbohydrates fermentation ability of NTG and UV mutagenated isolates of *L. bulgaricus*

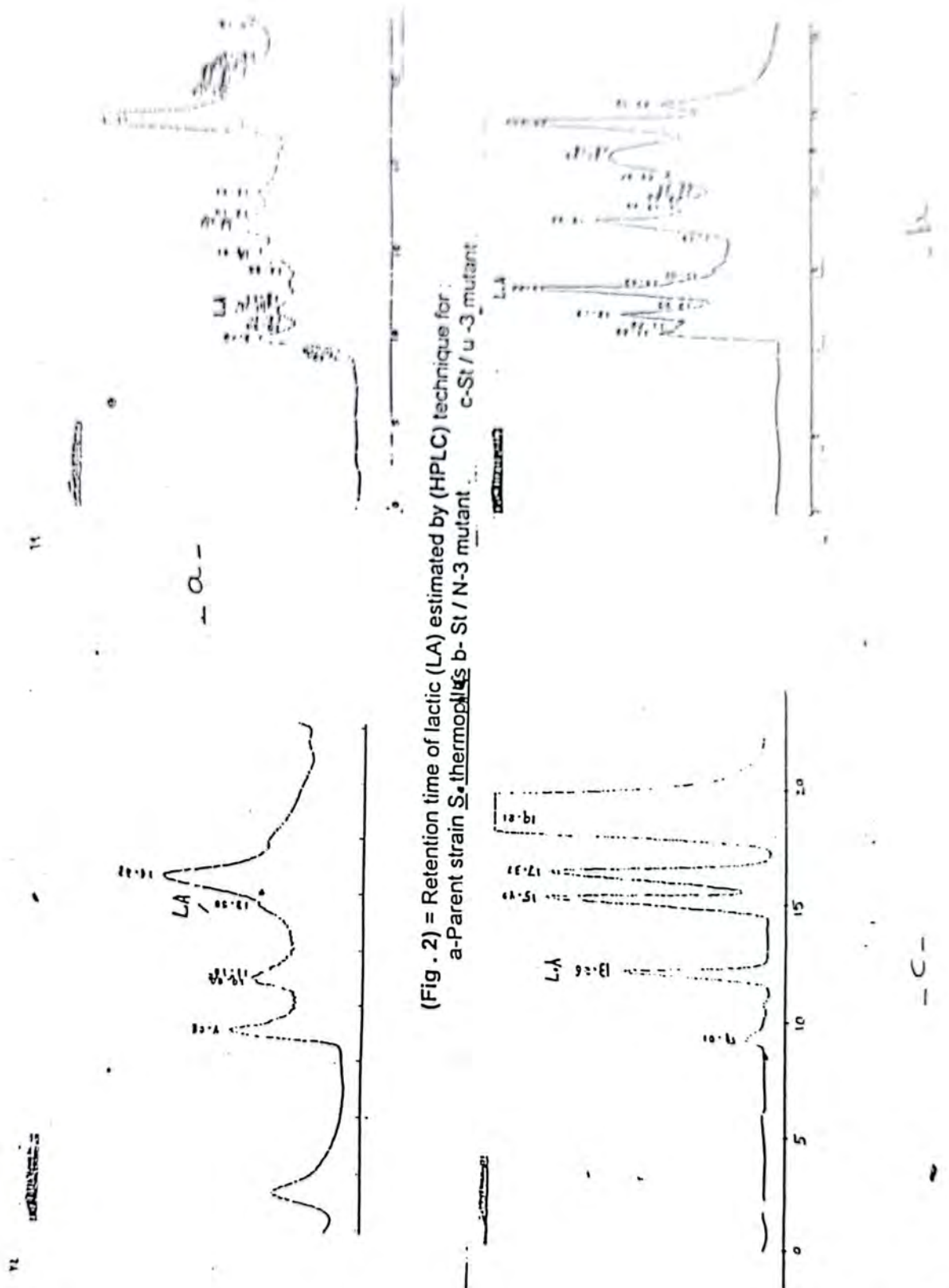
Isolate No	Fermentation ability										
	Glu	Flu	Lac	Lye	Suc	Gal	Rib	Toch	Manis	Malt	Sal
Lb/N-1	+(1)	+(4)	+(1)	+(1)	-	+(4)w	+(1)	-	-	-	-
Lb/N-2	+(1)	+(2)	+(3)	+(2)	+(1)	-	-	+(1)	+(3)	-	-
Lb/N-3	+(1)	+(4)w	+(3)	+(1)	+(2)	+(1)	+(1)	+(1)	-	-	-
Lb/N-4	+(1)	+(3)w	+(3)	+(2)	+(1)	+(2)	+(2)	+(3)	-	-	-
Lb/U-1	+(1)	+(2)	+(1)	+(2)	+(2)w	-	-	-	-	-	-
Lb/U-2	+(1)	+(3)	+(2)	+(3)	+(2)	+(3)w	-	-	-	-	-
Lb/U-3	+(1)	+(2)	+(2)	+(2)	+(3)	-	-	-	-	-	-

+Positive fermentation; w: weak fermentation - No fermentation  
(Number between parenthesis represents period of ferm in days.)

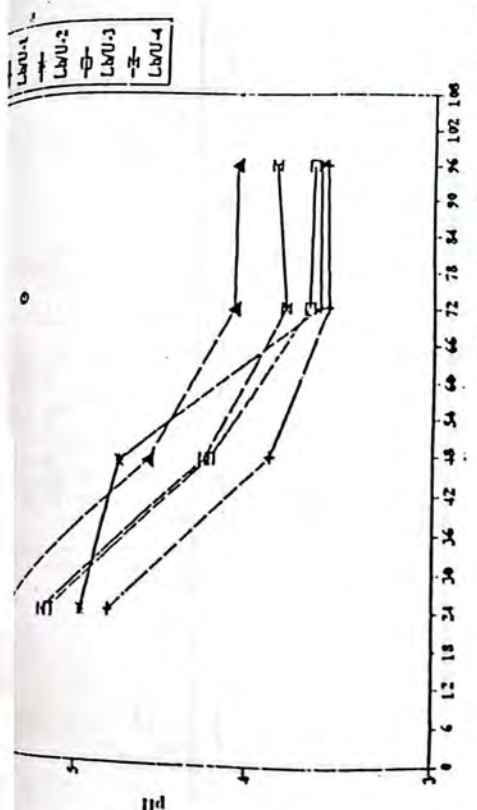
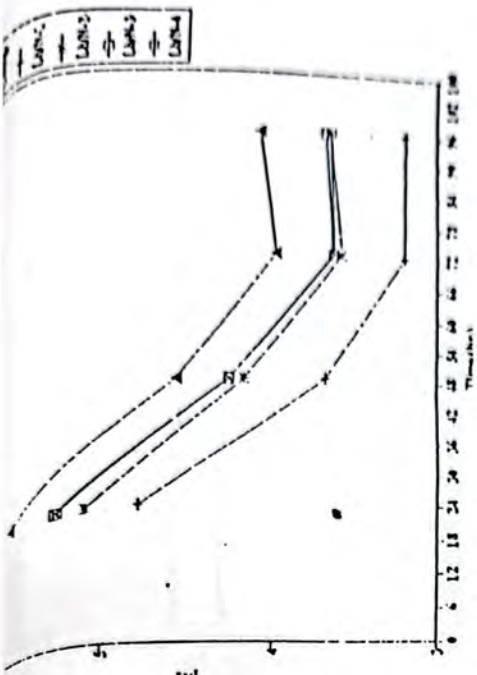


(Fig. 1) = Retention time of lactic acid (LA) estimated by (HPLC) technique for  
 a- Standard L.A 90%. b-Parent strain *L. bulgaricus*. c- Lb / N-1 mutant. d-Lb / u-1 mutant.

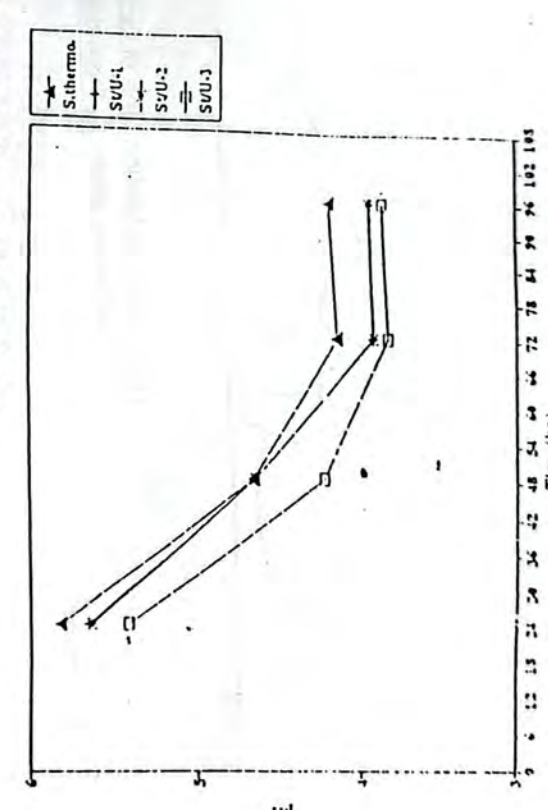
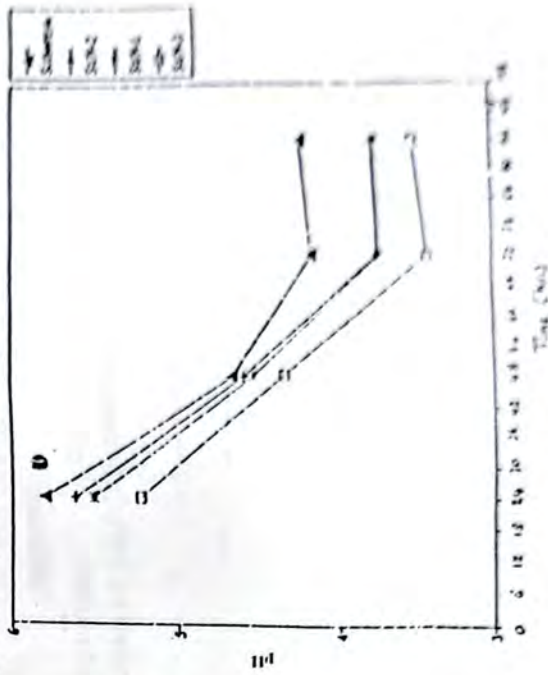




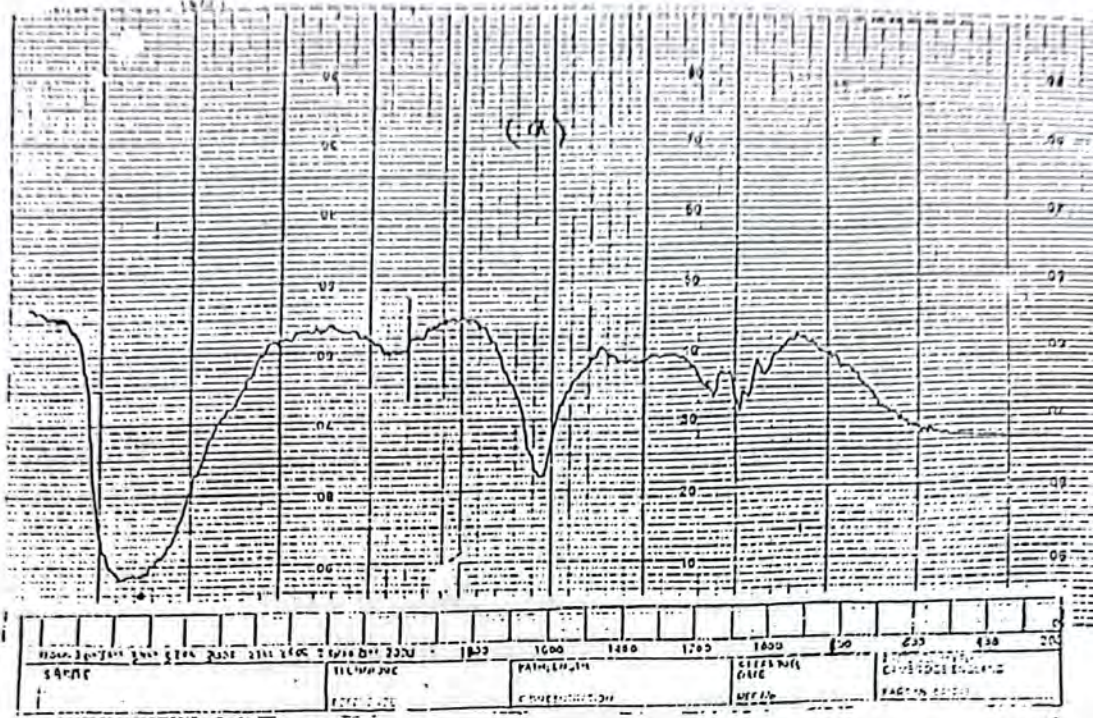
(Fig. 2) = Retention time of lactic (LA) estimated by (HPLC) technique for:  
 a-Parent strain *S. thermophilus* b- St / N-3 mutant  
 c-St / u -3 mutant



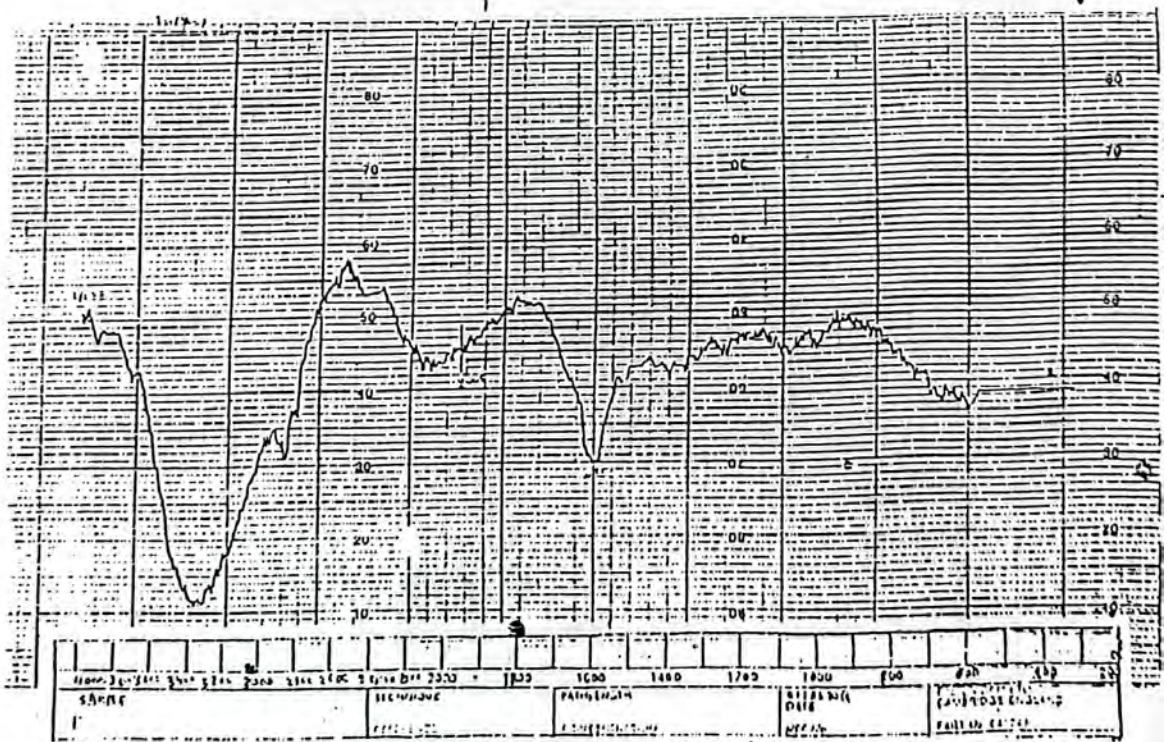
(Fig . 3) = Development of PH during Propagating L. bulgaricus. in the enriched whey medium and : a-It's NTC mutants. b-It's UV mutants.



(Fig . 4) = Development of PH during propagating S. thermophilus in the enriched whey medium and : a-It's NTC mutant . b-It's UV mutants

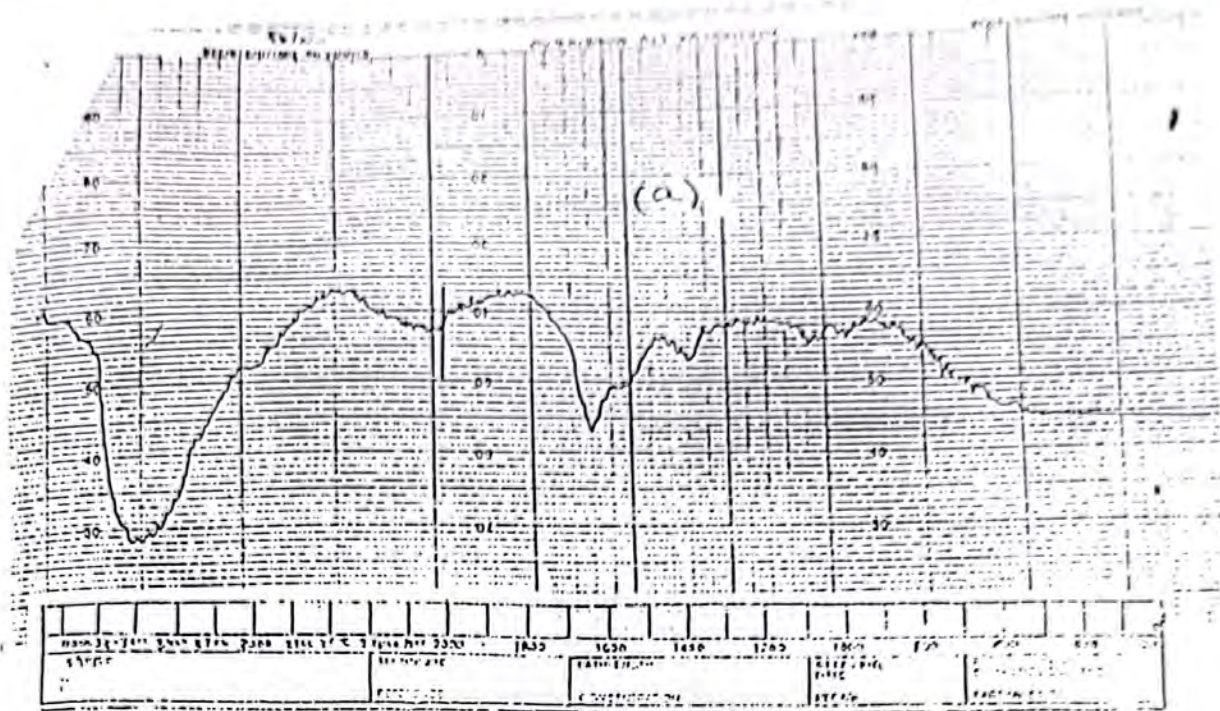


(Fig . 6) = Infrared (IR) spectrum of Lactic acid produced by *L. bulgaricus* mutants No. :  
a- Lb /N-1. b- Lb /U-1.

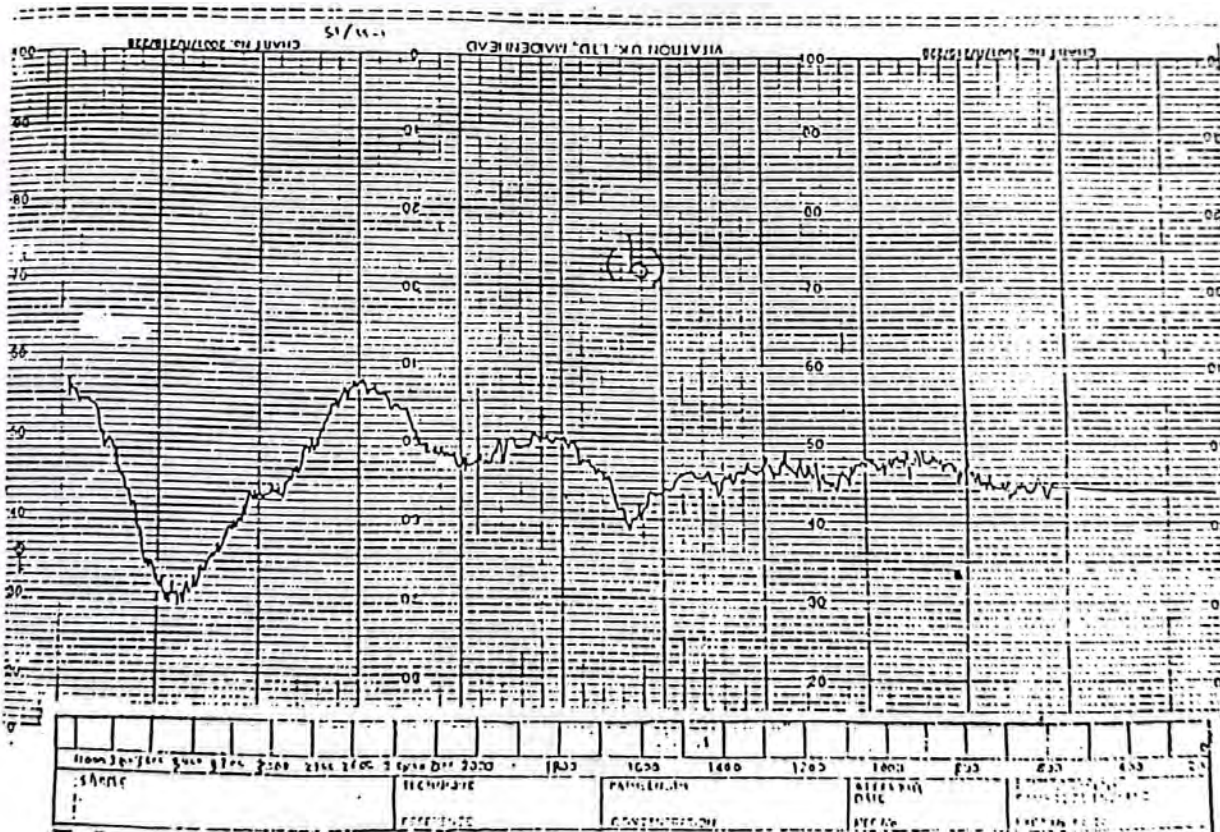


(b)

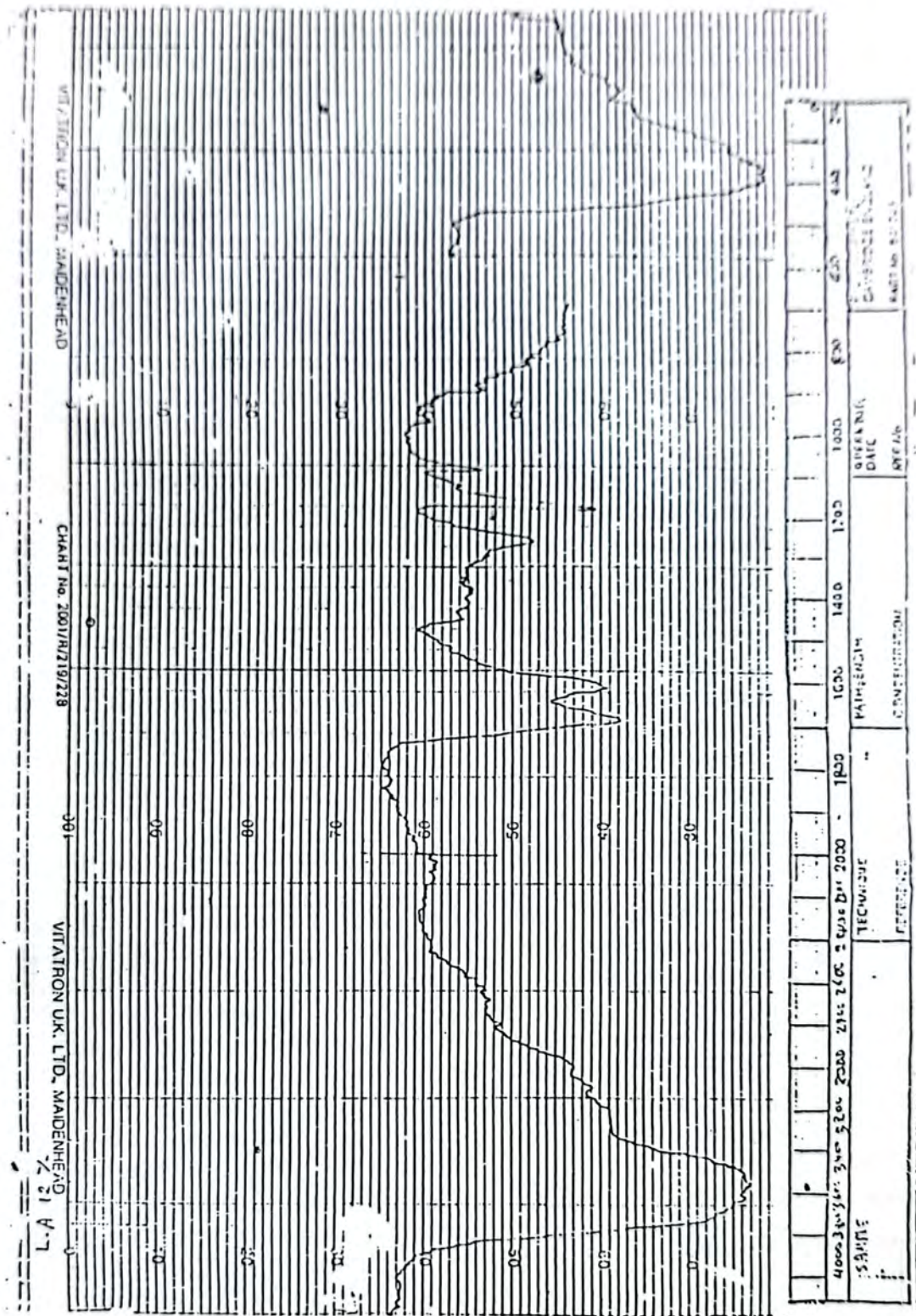
90



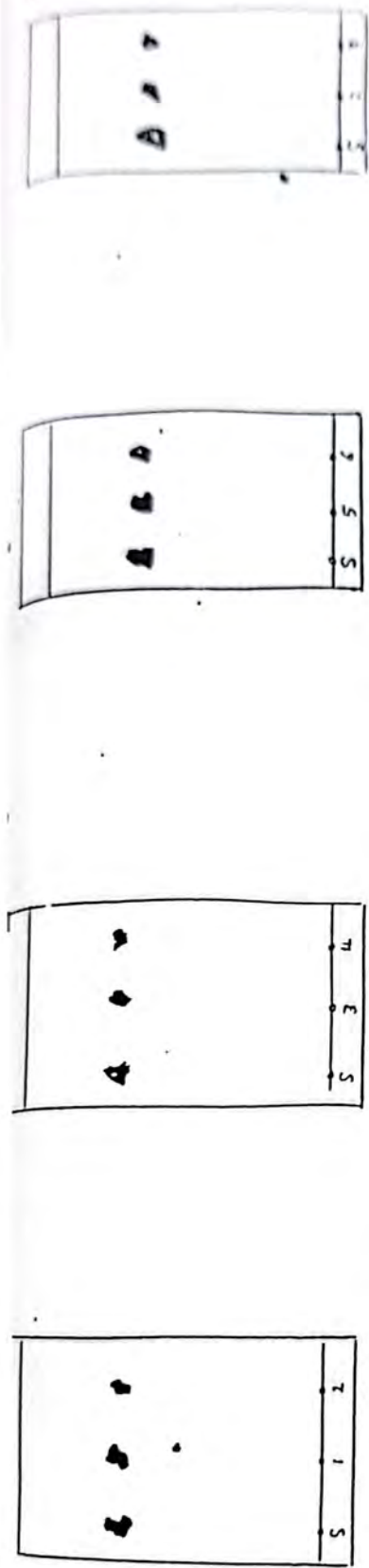
(Fig. 7) = Infrared (IR) spectrum of Lactic acid produced by *S. thermophilus* mutants No. a- St / N-1. b- st/ U-1.



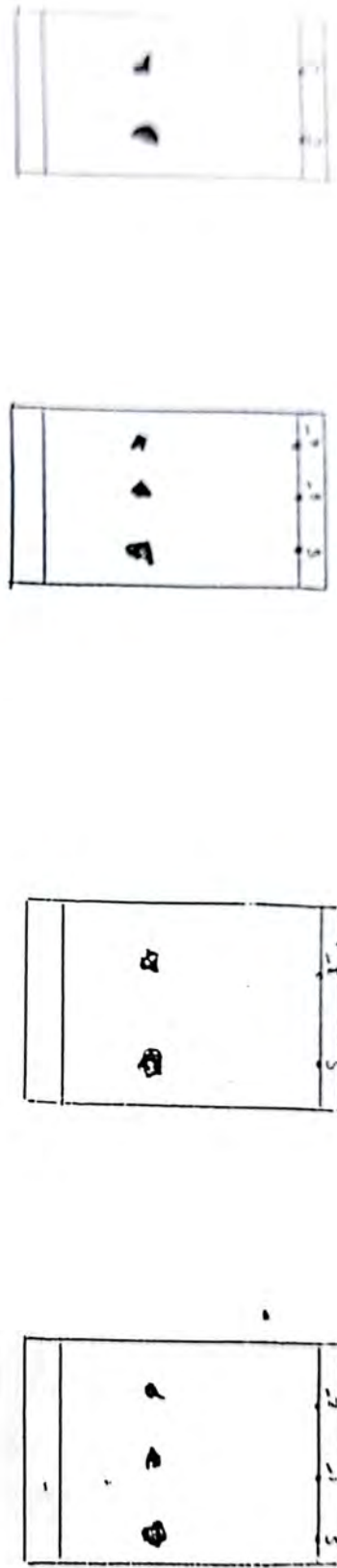
10



(Fig . 5) = Infrared (IR) spectrum of standard (12%) Lactic acid



(Fig. 8) = Thin layer chromatograms (TLC) of lactic acid produced by L. bulgaricus and it's mutants : (S= Standard, 1=Lb /N-1 ; 2=Lb /N-2 ; 3=Lb/N-3 ; 4=Lb /N-4 ; 5=Lb /U-1 ; 6= Lb /U-2 ; 7=Lb /U-3 ; 8=Lb /U-4)



(Fig. 9) = (TLC) of lactic acid produced by S. Thermophilus and it's mutants (S= Standard  
 $\hat{1}$  = St / N-1 ;  $\hat{2}$  = st/N-2 ;  $\hat{3}$  = st/N-3 ;  $\hat{5}$  = st/U-1 ;  $\hat{6}$  = st/U-2

14

### Morphological and Biochemical Characteristics of Mutants

Diameters of NTG and UV mutant colonies ranged between (0.5-1.5) and (0.5-1)mm respectively. Before treatment they were between (0.25-1)mm for the parents. Isolates of mutagenated *L. bulg.* differed in their sugars fermentation ability (table 2). In addition to glucose, fructose and lactose, Lb/N-1 (an NTG mutagenated isolate from *L. bulg.*) also was able to ferment galactose, ribose and xylose which were unfermentable by the parent *L. bulg.* Isolate no. LB/N-2 fermented mannose, sucrose, trehalose and xylose (in addition to the first three sugars). Isolates nos. Lb/N-3 and Lb/N-4 were similar in their ability to ferment glucose, fructose, lactose, galactose, ribose, sucrose, trehalose and xylose.

Isolates (Lb/U-1 and Lb/U-3) of *L. bulg.* mutagenated by UV, were similar in fermenting sucrose and xylose (in addition to the first three sugars). Ability of isolates no. Lb/U-2 to ferment lactose was weak after three days of incubation in comparison to that of isolates n. Lb/U-1 and Lb/U-3.

### Stability of pH during fermentation

Results reported in the current study (Fig. 3), show decreasing in pH by the selected NTG-induced mutants of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* as compared to the parent. Highest decrease (3.20) was observed after 96 hr of incubation by Lb/N-1, while St/N-3 dropped the pH to (3.42) after 72 hr. Similar results were obtained with the selected UV-induced mutants of same bacterial strains (Fig. 4), but values of pH were highest regarding NTG-induced mutants. Highest drop by Lb/U-1 (3.60) and St/U-3 (3.81) was recorded after 72 hr.

However, NTG and UV induced mutants showed increase in lactic acid production. These results were almost similar to those found by (14) when mutants of *L. bulg.* and *L. casei* resulted in high acid production after treatment with NTG in comparison with the parents. Similar results were obtained by (15,16) who detected

increases in lactic acid production when mutants had been grown in milk and whey.

Investigation by (17,18,219,20) showed that highest production of lactic acid was obtained at pH of (5.5-6) during the fermentation.

### Infra Red Spectrophotometry

Components of standard lactic acid which were analysed by infrared spectrophotometry (Figs 5-7) showed three spectra of absorption which differed in their deepness and sharpness. One of them (at the wave number of  $3525\text{cm}^{-1}$ ) belonged to the (O-H), bond, other one (which was appeared at  $1696\text{cm}^{-1}$ ) belonged to (C=O), while the third spectrum ( $1260\text{cm}^{-1}$ ) belonged to (C-O)<sup>(21)</sup>. Mutants had similar absorptions to the standard, particularly from the standpoint of their positions at the wave numbers, but they were different in deepness and sharpness of the wave depending on the purity of acid.

Infrared spectroscopy was used in different comparative purpose to analyze and identifying several organic compounds which gave various peaks<sup>(12)</sup>.

### Thin-Layer Chromatography (TLC)

Separated lactic acid on the silica gel after analysing the standard acid by TLC technique showed one irregular spot<sup>(22)</sup>. RF-value of the standard was (0.054)<sup>(23)</sup>. RF and location of isolation spots by mutants of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* were almost similar to that of the standard (Figs 8-9). TLC was one the simplest and economic ways for detection and separation smallest compounds in the samples, besides that it was used to determine the concentration of these components<sup>(2)</sup>.

## REFERENCES

1. Kilbey B.J., Legator M., Nichol W. and Ramel C. Handbook of mutagenicity test procedures. North-Hollands, Biochemical Press (1977).

2. Russel P.J. Lecture notes on genetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh (1982).
3. Thoma R.W. Industrial microbiology. Bowden-Hutchinson & Ross, Incl. USA : 87-94 (1977).
4. Speck M.C. Compendium of methods for the micorbiological examination of foods: 222-230. Washington American Public Health association (1976).
5. Kandler O. and Weis, N. Genus: Lactobacillus. In "Bergey manual of systematic bacteriology" (Sneath, P.H.A Mair N.S. and HOLL H.G.) Vol. 2. Williams Co., Baltimore. USA (1986).
6. Reed G. Microbial biomass, Single-Cell protein and other microbial products. In prescot and dunn's industrial microbiolyg 4<sup>th</sup> ed. 541-592. The AVI Publishing Co. New York (1982).
7. Adelberg E.A, Mandle M. and Chen G.C.C. Optimal conditions for mutagenesis by (NTG) E.coli K12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18:788-795 (1965).
8. Witkin E.M. UV-induced mutation and DNA repair. Annual Rev. Micro., 34:1110-115 (1975).
9. Sigh J. and Ranganathan, B. Acid production and proteolytic activity in milk by gamma irradiation induced mutants of lactobacilli-J. of Food Protection, 40: 600 (1977).
10. Steinsilver R.M: Bassler G.C. and Morrill T.C. Spectrometric identification of organic compounds 4<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons:. 442 (1981).
11. Collins M.D. A note on the separation of natural mixture of bacterial menaquinoues using revers-phase HPLC, J. Appl. Bacteriol. 52: 427-460 (1982).
12. Skoog D.A.; West D.M.; and Holler A. Fundamentals of analytic chemistry 5<sup>th</sup> ed., Standford University (1988).
13. McNair N.M. and Bonelli B.J. Basic gas chromatography. Walnut Greeke CA: Varian-Aezograph: 158 (1968).
14. Singh J. and Chopra A.K. Accelerated ferment of milk by NTG-induced mutants of lactobacilli, J. of food Sci 47(3) 1027-1029 (1982)
15. Dilanyan Z ; Markarian K. and Sarkisyan R. X-ray induced mutants of lactic acid bacteria 18<sup>th</sup> ed. Int Dairy Cong. 1:122 (1970).
16. Mirganieva M. Effect of  $\gamma$ -radiation on acid formation by thermophilic lactobacilli. Dairy Sci. Abst. 34: 1734 (1971).
17. Kempe L.L.; Gillies R.A ; and West R.E. Acid production by homofermentative lactobacilli at control pH as a tool for studying the unit of fermentations J. Appl. Microbiol. 4: 175-178 (1956)
18. Marshall K.R. Continuous production of lactic acid Dairy Sci. Abst. 32: 696 (1970).
19. Samuel W.A. and Lee Y.Y. Lactic acid fermentation of sorghum extract. Biotechnol. Bioeng. 22: 727-777 (1980).
20. Tiwari K.P.; and Pandey A. Influence of some physiologically important electrolyes on lactic acid fermentation of molasses by *L. bulgaricus* Indian J. Dairy Sci, abs. 31: 282-284 (1978).
21. Parikh V.M. Absorption spectroscopy of organic molecules. New York : 109-210 (1985).
22. Stahl E. Thin-layer chromatography Springer, Berlin, New York (1969).
23. Touchstoen J.G. and Rogers D. Thin layer chromatography in "Quantitive environmental and clinical applications" John-Wiley and Sons Inc. (1980).

## Effect of Soil Compaction on Growth and Mineral Distribution in Corn Plant (*Zea mays L.*)

ALI H. AL-BAYATI\* , SAADA K. AL-KHAFAJI\*\* AND MUSA F. YASEIN\*

\*Deser Study Center, Ambar University

\*\* Ministry of Higher Education and Scientific Research

(Received July 21, 1997; Accepted May 12, 1998)

### الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة في ابي غريب في 1992 لمعرفة تأثير الاجهاد الناتج عن رص التربة على نمو الذرة الصفراء وامتصاص العناصر الغذائية (النيتروجين، الفوسفور، البوتاسيوم، الحديد، المنغنيز، الزنك، النحاس) ونسب توزيعها في النبات. استخدمت في التجربة تربة مزيج طينية مصنفة Typic Torri Flovent رصت الى مستويات الكثافة الظاهرية (1.25، 1.30، 1.35، 1.40، 1.45، 1.50، 1.55، 1.60 Meg/m<sup>3</sup>). زرعت بذور الذرة الصفراء صنف تركيبي بحوث 106. اوضحت النتائج ان للرص تأثير معنوي على مؤشرات النمو المدروسة (ارتفاع النبات، المساحة السطحية الكلية للاوراق، الوزن الجاف الجزء الجذري والخضري) حيث كان التأثير ايجابيا لغاية مستوى الرص 1.40 ميكاغرام/م<sup>3</sup>، بعدها اصبح التأثير سلبيا بزيادة الرص وكان لهذا التأثير نفس الاتجاه بالنسبة لدور المجموع الجذري والخضري في انتاج المساحة السطحية للاوراق. اشارت النتائج ايضا بان هنالك تأثير معنوي للرص على توزيع العناصر الغذائية (النيتروجين، الفوسفور، البوتاسيوم، الحديد، المنغنيز) في الاجزاء النباتية (المجموع الجذري والخضري للنبات) في حين لم تظهر تأثيرا على توزيع (الزنك والنحاس).

### ABSTRACT

This study was conducted in the college of Agriculture Abu-Ghraib during 1992 to study the effect of stress caused by Soil compaction on Corn Plant (*Zea mays L.*) growth and Nutrient (N, P, K, Fe, Mn, Cu) uptake and distribution. A clay loam Soil classified Typic Torrifluvent was compacted to bulk density levels (1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.45, 1.50, 1.55, 1.60 Meg/m<sup>3</sup>). Corn Seeds (Synthetic var. 106) were planted. Results indicated that Compaction affected the studied growth indexes (Plant height, leaf area, Root & Shoot dry matter) Positively upto 1.40 Meg/m<sup>3</sup>. Then it showed negative effect as bulk density increased. N, P, K, Fe and Mn uptake and distribution affected Significantly by Compaction where as Zn and Cu distribution was not Significant.

### INTRODUCTION

Soil reclamation practices achieved by using heavy machines for land elevation, which caused high pressure between (200-500 kp) on the soil<sup>(1)</sup>, depreciated soil physical characteristics (soil pore system, soil moisture and gases content) which reflect on the rate of water and gases transposition and thermodynamic changes in the Soil, all achieved changes negative affected on soil

physical, chemical and biological characteristics<sup>(2)</sup>.

Soil compaction affect root volume (vertical & horizontal distribution) which reflect on plant growth so that plant yield. The morphological changes in root and shoot system of plant under compaction condition was related to hormonal imbalance (Production & Transistion) in the plant<sup>(3)</sup>. So using soil management system from which why can serve the root system to reduce amount of synthesis potential which the plant

se to obtain the nutrients so reflect on the field<sup>(4)</sup>. Inge and Thomas<sup>(5)</sup> studies were indicated that N, K, S percentage from the total uptake in the shoot of Pea plant reduced associated with tractor traffic in the field.

Heinzpeterken and Margitta<sup>(6)</sup> indicated that increasing of contact pressure between tractor wheel and soil from (100 to 200, 500 kp) caused negative result on the nutrients percentage Ca, Mg, N, K in Oat plants.

This study was conducted to show the effect of stress caused by soil compaction on the corn plant growth (root & shoot) and nutrients distribution in the plant.

## MATERIALS AND METHODS

A pot experiment was conducted in the college of agriculture Abu-Ghraib during 1992-1993, using clay lam soil was collected from the plow layer (0-30cm) from an experimental farm.

The soil was air dried, ground and passed through a 4mm. screen it was then analysed according to the methods described by the US Salinity laboratory staff<sup>(7)</sup>, Jackson<sup>(8)</sup> and Page<sup>(9)</sup>. Some physical and chemical characteristics of this soil are presented in table (1).

To bring up the bulk density of the soil to the required levels, optimum soil moisture for compaction was determined as suggested by ASTM (D 6988-95T) with procter instrument<sup>(9)</sup>, then number of hiting for bulk density determined to the required levels (1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.40, 1.50, 1.55, 1.60 Meg/m<sup>3</sup>) (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8) Respectively. Nitrogen fertilizer was added in amount of 240 kg N/ha using Urea (46% N) as source & 40 Kg P/ha phosphorus as Ammonium mono phosphate (21% P) and potassium as potassium sulfate (45% K) in amount of 40 kg K/ha. Micro nutrients was added to give Fe (5.0 mg/kg as FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (20% Fe), Mn (2.5 mg/kg as MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (37.5% Mn), Zn (2.5 mg/kg as ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (22.8% Zn), and Cu (1.0 mg/kg) as CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) (25.5% Cu)<sup>(10)</sup>.

Above fertilizers were dissolved in water needed to reach the optimum soil moisture for compaction

Cylindrical soil column was prepared with compaction of 10 kg air dried soil moisten to optimum soil moisture on 3cm Quartz sand to have the needed densities

A factorial experiment with a complete randomized design was conducted with three replicates corn seeds were planted (Synthetic Variety 106) and covered with 1 cm thickness soil.

Plants were irrigated with tap water to bring the soil moisture to the field capacity when 50% of the available moisture was depleted as determined by weighting.

A correction for the variation of plant weight during growing season was estimated by weighting plants grown in separate soil columns monthly.

The agronomic characters (plant high, leaf area) observed were recorded after 60 days from planting<sup>(11)</sup>. Plants aerial part were harvested and washed by distilled water and roots were separated from the soil by a steam of water was applied from a plastic hose in order to wash out the soil on 147mm screen they were oven dried at 70°C for 48hrs and weighted<sup>(12)</sup>. Plant samples digested as in (13), total nitrogen in plant material was determined by micro-kjeldahl as described by page (9), total phosphorus by Ammonium-Molybdat-Ammonium-Vanadate as in Jackson<sup>(8)</sup>, Potassium by flame photometer<sup>(7)</sup> Micro nutrients Fe, Mn, Zn and Cu was analysed by Atomic Absorption<sup>(9)</sup>.

Plant nutrients distribution calculated as percentage of total uptake of Mineral (Mineral Conc. (as in Sub. table 1) x (dry matter for each shoot & root parts)).

## RESULTS AND DISCUSSION

Results in table (2) showed significant difference to soil compaction effect on plant growth indexes (plant height, leaf area, plant shoot & root dry weight). So increasing in bulk density from 1.25 Meg/m<sup>3</sup> (B1) caused significant increased in above indexes to

compaction level B4 (1.40 Meg/m<sup>3</sup>) then Meg/m<sup>3</sup> with curve relationship (2nd degree) decrease with increased from 0.45 to 0.60 as in equations.

Table 1: Some physical and chemical properties of the soil used

Soil separates percentage		
Sand	Silt	Clay
37	33	30
Soil texture .. Clayloam		

Property	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
field capacity 33 kps	37.5	38.5	40.0	41.5	42.0	45.0	48.0	49.3
wilting point 1500 kpa	11.2	12.0	15.3	19.0	20.4	22.8	26.0	27.0
available water percentage	26.3	26.5	24.7	22.5	21.1	22.2	22.0	22.0

pH	Ece ds/m	CEC me/100g soil	gypsum	CaCO <sub>3</sub> %	O.M.
7.9	3.3	11.7	1.3	20.5	1.1

Soluble cations and anions mmole/L

Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>
10.3	4.8	0.1	2.0	5.2	1.5	9.7	0.7

Soil content of nutrients

Total N %	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu
1.9	1.8	51	7.1	8.3	4.0	1.0

Table 2: Values of some plant growth indexes

Bulk density	plant height	leaf area cm <sup>2</sup>	Root dry matter g/plant	Shoot dry matter gm/ plant	shoot/ Root ratio	total uptake gm/100 gm dry matter	Root dry matter: leaf area ratio	shoot dry matter: leaf area ratio
B1	164.0	52.32	16.2	39.4	2.4	2.6	3.09	7.53
B2	167.0	5542	16.3	43.8	2.6	2.4	2.94	7.90
B3	168.0	5917	19.5	48.5	2.5	2.5	3.29	8.19
B4	162.6	5611	22.9	46.7	2.0	2.0	4.08	8.32
B5	161.3	4712	16.0	41.8	2.6	2.0	3.39	8.87
B6	152.3	4484	10.2	32.0	3.1	2.0	2.27	7.13
B7	151.6	4237	7.3	23.9	3.3	1.7	1.72	5.64
B8	130.6	3726	4.6	9.8	2.1	1.5	1.32	2.63

L.S.D. 0.05

10.4	788	5.1	11.8	0.2	0.1	0.47	1.97
------	-----	-----	------	-----	-----	------	------

$$Y(\text{plant height}) = 21.9 + 225.4X - 89.3X^2$$

$$r = -0.822^*$$

$$Y(\text{Leaf area}) = 15810.7 - 11877.5X + 2736.9X^2$$

$$r = -0.770^*$$

$$Y(\text{root dry matter}) = 1113 + 32.5X - 22.9X^2$$

$$r = -0.822^*$$

$$Y(\text{shoot dry matter}) = 5.88 + 145.6X - 89.7X^2$$

$$r = -0.750^*$$

The results obtained was agreed with Al-ANI<sup>(14)</sup> who found that increasing of bulk density to 1.35 Meg/m<sup>3</sup> showed positive effect on Sorgam plant indexes, where as same indexes showed negative trend as bulk density increase upto 1.62 Meg/m<sup>3</sup>.

Also Al-Durrah<sup>(15)</sup> obtained same results on the Soybean. The influence of compaction on plant growth could be attributed to the mechanical impedance and water availability and soil aeration which have important role in root growth. The increasing in plant growth indexes from 1.25 to 1.40 Meg/m<sup>3</sup> (from B1 level to B4), it can be seen from the table (2) that response to increase of soil:root surface contact (Shail, 16). At compaction level above 1.40 Meg/m<sup>3</sup> (B4) there was negative effect which caused increasing in mechanical impedance it reflected on the root growth and penetration in soil (Eavis, 17) then reaching the compaction level B8 (1.60 Meg/m<sup>3</sup>) deterioration in soil aeration and water & plant nutrients availability is appear addition to mechanical impedance.

Shoot:root ratio was sensitive to all plant growth parameters and give some information on shoot:root relationships and effect of environment on plant growth (Richard & Rewe, 18). Results in table (2) showed that increasing of bulk density from 1.25 to 1.40 Meg/m<sup>3</sup> (B1 to B4) affected positively on this index as it effected by root dry matter. But when bulk density became B5 (1.45 Meg/m<sup>3</sup>) forward than compaction effected negatively on root system and its role in supplying the plant with nutrients to

shoot part so shoot:root ratio affected (Marshner, 19)

The results were similar to the results obtained by (Bertrand & Khuke, 20) who reported that bulk density increasing from 1.1 to 1.5 Meg/m<sup>3</sup> affected on shoot and root systems of corn plant. The increasing in shoot:root ratios obtained with decreasing in root dry matter that the response to high bulk density the reason was explained to decreasing in (produce and transfer) of cycocyal growth regulator from root to shoot system this response to radial restraint for roots, which determination of shoot growth (Carmi & Heuer 21).

Results in table (2) showed that soil compaction affected on transition of photosynthetic products from leaves to different parts of plant. The results showed sharign of leaf area in dry matter production with increasing compaction upto B5 level (1.45 Meg/m<sup>3</sup>) then the negative affect appeared clearly on plant dry matter as clearly reduction in plant growth (its dry matter & leaf area) (Marshner, 19) which agreed with Carmi & Heuer (21) who found that a decreasing in leaf area, root & shoot system of bean plants under compaction condition related to variation in root morphology.

Studying of root dry matter (mg/plant): leaf area (cm<sup>2</sup>/plant) indexes shwoed significant decreasing as compaction increasing (table 2) which agreed with Shall<sup>(16)</sup> who found a significant decreasing of these two indexes to tomato plant grown under root restraint conditions.

Results in figure (1) showed a significant differences among compaction treatments on Nitrogen percentage in shoot parts which decreased as compaction increases up to level B8 (1.60 Meg/m<sup>3</sup>) which agreed with Carrow & Sills<sup>(22)</sup> who found that N percentage in *Lolium perenne*

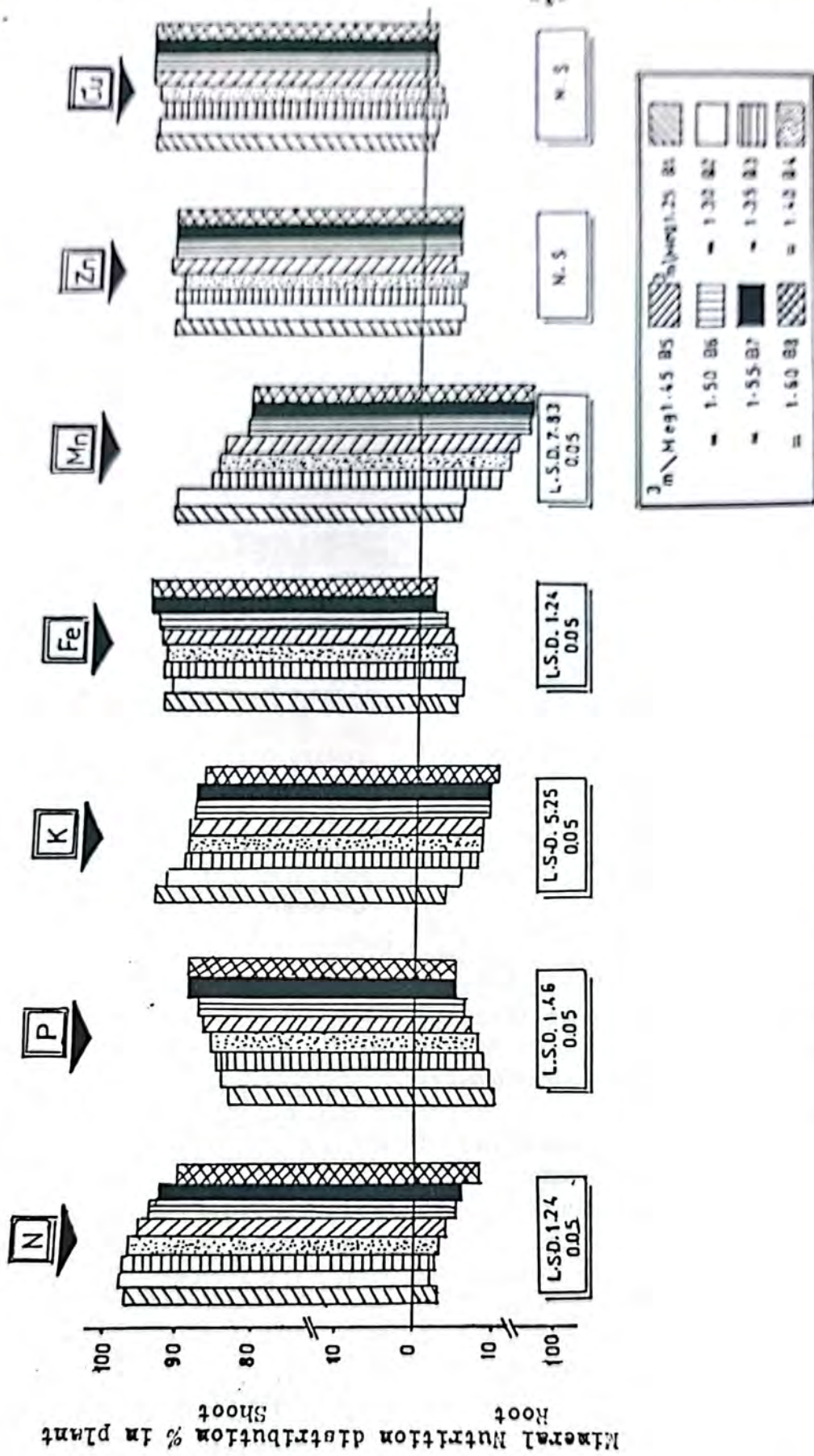


Fig. ( 1 ) Plant mineral nutrient distribution (percent of total mineral uptake) under different treatments

rye-grass) leaves decreasing with compaction.

Phosphorous distribution showed a reflex to Nitrogen distribution Figure (1). It was increased up to level B8 (1.60Meg/m<sup>3</sup>) which showed high value, phosphorous concentration in plant depend on its availability in soil. So supply the soil with adequate amount of phosphorous showed normal concentration of P in all parts. As plant root system was decreased in high compaction levels because of mechanical impedance, then P uptake recuded response, reduction in contact area between roots & soil comparative to plants grown in low compaction levels. Above conclusion agreed with Al-Rayess<sup>(23)</sup> who reported that phosphorous distribution in plant tissues showed contrast to Nitrogen in order to P role Nitrate metabolism in plant.

Potassium distribution in root system showed significant differences as compaction levels rises Figure (1). Because of accumulation of K in root tips specially in root hairs (Kirkby & Mengel<sup>(24)</sup>). As compaction caused increase in root hairs Veen<sup>(25)</sup>. So potassium percent increase in root system of plants under compaction condition in comparison to low levels of bulk density.

Iron distribution in plant increased significantly in shoots with increasing compaction levels. The reason relative to iron was velocity transfer in plant (Jacobson & Ortel<sup>(26)</sup>) the difference seem in Iron percent in root system related to differences in root dry matter.

The study of Manganese distribution showed clear significant differences, its percentage, increase in root system with increasing compaction levels. In comparison with its percent in shoot system, which might be due to Manganese mobility and transportation in the plant, (Mengel & Kirkby<sup>(24)</sup>) this was agreed with (Mazurak & Cheiniu<sup>(27)</sup>) who found that Manganese distribution in Soybean shoot system reduced with compaction. Where as its percent increased in root system with increasing of

compaction levels, as manganese increased under compaction may be due to anaerobic condition with compaction (Al-Bayati<sup>(2)</sup>)

Results in Figure (1) showed that there was no significant difference on Zinc and Copper distribution under compaction. Which agreed with Castillo et al<sup>(28)</sup> who found that there wasn't any effect to compaction on Zinc distribution in Peas and compaction increases on plant root system.

## REFERENCES

1. Rechel, E.A.B.D. Meek, W.R. Detar, and L.M. Carter. Alfalfa yield as affected by Harvest: traffic and Soil Compaction in Sandyloam prod. Agric. Vol. 4. No. 2. 233-235 (1991).
2. Soane, B.D. Compaction by agricultural Vehicles a review, Soil & Tillage. Res. 2. 3-36 (1982).
3. Brouwer, R. Some physiological aspects of the influence of growth factors in the root medium on growth and dry matter production. Physiologia Plantarum. 31. 221-224 (1963).
4. Al-Bayati, A.H. Influence of Some soil management practices on Corn growth and yield. Ph. D. thesis. Baghdad University (1993).
5. Inge, H. and thomas, G. Effect of soil compaction on development and Nutrient uptake of peas. Swedish, J. Agric. Res. 22 13-17. (1992)
6. Heinzpctelkan and D. Margitta, Effect of Repeated vehicle traffic in traffic lanes on Soil. Physical properties, Nutrient uptake and yield of Oats. Soil & Tillage Res. 15. 217-225 (1990).
7. U.S.D.A. staff, Agriculture handbook No. 60. Bovt. Prg. Office Washington D.C.U.S.A. (1954).
8. Jackson, M.L. Soil chemical analysis. Englewoods Califfs, N.J. Pentice-Hall Inc. (1973).
9. Page, R.H. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Biological properties.

- Amer. Soc. Agron. Inc. Publisher. Madison Wisconsin U S A (1982)
10. Hassawi, D.S. Influence of addition NPK and some micro Nutrients on yield and growth of *Zea mays* L. Ms. Thesis Baghdad University, College of Agriculture (1979).
  11. Jackobs, M.B. Chemical analysis of food and food products. Rober & Krieger publishing Co. Inc. Huntington No. 4. P. 727 (1958).
  12. Chapman, H.D. and P.F. Pratt. Methods for soils plant and water analysis. Califo. Univ. of Calif. (1961).
  13. Cresser, M.S. and J. W. Parsons. Sulphric-Prechloric and acid digestion of plant material for the determination Nitrogen, Phosphorous, Potassium, Classium and Mg. Analytica Chemi. Acta, 109. 431-436 (1979).
  14. Al-Ani, A.N. Root responses of sorghum to strength of soil materials. Ph.D. thesis Univ. of Nebraska (1970).
  15. Al-Durrah, M.M. Inferaction of salinity and bulk density as they effect all soybean growth M.Sc. Thesis. Univ. of Baghdad. (1971).
  16. Shall, K.G.A. Study of the effects of soil compaction on por size distribution and availability of water to plant Ph.D. thesis Univ. of Edinburg. (1974).
  17. Eavis, B.W. Soil physical conditions affectin seedling, root growth seperation of the roles of mechanical impedance, aeration and moisture stress. I . Baver , et.al. 1972. Soil physics. John Wiley and Sons, Inc. New York (1970).
  18. Richard, D. Rowe, R.N. Root-Shoot interactions in peach. The function of the root. Annals of Botany. 41. 1211-1216 (1977).
  19. Marschner, H. Mechanisms of Regulations of Mineral Nutritics in higher plants C.F. Mechanisms of Regultion of plant growth by R.L. Bieleski A.R. Ferguson & M.M. Gresswell (eds) Bulletin (1974).
  20. Bertrand H.L. and M.L. Kohuke. The effect of soil bulk density on root/shoot ratios in Corn J of Sci. and food and Agri (C F Carmi & Heuer. 1981). (1974).
  21. Carmi, A. Heuer, B The role of roots in control of bean shoot growth Annals of Botany 48. 519-527 (1981).
  22. Carrow, R.N. and Sills, M.J. Turfgrass growth, Nuse and water use under soil compaction and N fertilization. Agric. J. 75. 488-492 (1983).
  23. Al-Rayess, A.H. Abhworth, J. and Younis, M. The Phosphate and polyphosphate contend of Dicty ostelium discoideum cells during their growth and subsequent differentiation J of Kuwait Univ. Science (1980).
  24. Mengel, K. and E.A. Kirkby. Principles of plant Nutrion internaional potash institute/ Switzerland (1982).
  25. Veen, B.W. The influence mechanical impedance on the growth of maize roots. Plant and Soil. 66. 101-109. (1982).
  26. Jacobson, L. and J.J. Ortel. Plant physiol. P. 99-204 (1965).
  27. Mazurak, A.P. and L. Chesnin. Interaction of Soil Compaction from anc rate of Iron application on growth o soybean varieties. Soil Sci. VI. 588-596 (1969).
  28. Castillo, S.R. and R.H. Dowdy, J.M. Bradford, and K. Larson. Effect o Applied Mechan ical stress on plan growth and Nutrient Uptake. Agro J. Voi 74. 526-530 (1982).

## Production of Vitamin B<sub>12</sub> by Two Isolates of *Streptomyces griseus*

ZAINAB N. HAMID, \*\*RAAD K. MUSLHI AND \*ABDUL-WAHID BAQIR  
 Biology Department, College of Science, Al-Mustansiriya University  
 \* Chemistry Department, College of Science, Al-Mustansiriya University

(Received Oct. 23, 1999 ; Accepted Nov. 8, 1999)

### الخلاصة

تمت عزلتين من النوع *Streptomyces griseus* في وسطى انتاج مختلفين، واستخدمت اربع طرائق مختلفة لاستخلاص فيتامين B<sub>12</sub> من وسط الانتاج بعد انتهاء فترة التتمة، كما وتم استخلاص الـ B<sub>12</sub> من الخلايا المنتجة له بعد عزلها من وسط الانتاج. وكان وسط الانتاج الاول (الحاوي على مادة (CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) في تركيبه الأكثر ملائمة لانتاج الفيتامين من قبل العزلتين المستخدمتين، وتميزت العزلة الثانية ذات الرمز (IN) باعطائها افضل انتاج واعلى تركيز من فيتامين B<sub>12</sub>، فيما اعطت احدى طرق الاستخلاص والمذكورة من قبل Mc Cormick and Wright, 1971; Florent and Ninet, 1979. اعلى نقاوة من الفيتامين

### ABSTRACT

Two isolates of *Streptomyces griseus* were propagated in two different media. Four different methods have been used for extraction of vitamin B<sub>12</sub> from each medium after propagation. The vitamin also was extracted from the bacterial cells after propagation. The first medium (which contained CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in its formula) was more efficient for vitamin B<sub>12</sub> production by both isolates of *S. griseus*. One isolated, namely (IN) resulted in superior production and concentration of vitamin B<sub>12</sub>. More over extraction methods recommended by McCormick and Wright (1971) & Florent and Ninet (1979) resulted in the highest purity of the vitamin.

### INTRODUCTION

Vitamins are organic nutrients that required in small quantities for many different biochemical functions. Generally, they cannot be synthesized by the body and must, therefore, be supplied with the diet. Human requires either milligrams or micrograms of each vitamin per day<sup>(1)</sup>. Vitamins are classified into two main groups; water soluble, and fat soluble vitamins<sup>(1,2)</sup>. Vitamin B<sub>12</sub> belongs to the water soluble group which also includes other vitamin B complex; Thiamin, Riboflavin, Pantothenic acid, B<sub>6</sub>, Biotin, and folic acid<sup>(3)</sup>. Vitamin B<sub>12</sub> is the name which has been used since its was first introduced by Ricks and his colleagues in 1948<sup>(4)</sup>. However, the vitamin is found in

several forms such as: Cyanocobalamin, Hydroxocobalamin, Adenosylcobalamin, and Methyl cobalamin. This group of compounds has also been called cobalamins or corrinoids; the generic term used for all compounds containing a corrine nucleus<sup>(4,5)</sup>. Vitamin B<sub>12</sub> is a dark red-needle-like (crystalline) hygroscopic substance, freely soluble in water and alcohol, but in-soluble in the acetone, chloroform or ether. It is labile in strong acid, alkali and light<sup>(6)</sup>. It is stable in aqueous solution at room temperature. It may be heated to 120 °C with little loss of activity, when the pH is kept between (4-6). However, it breaks down rapidly when exposed to a pH below 2 or above 9<sup>(4)</sup>.

Rich source of vitamin B<sub>12</sub> are liver, kidney, fish, and milk products<sup>(7)</sup>. The vitamin

is entirely (or almost entirely) absent in higher plants<sup>(6,8)</sup>. Vitamin B<sub>12</sub> catalyzes three types of reactions as a coenzyme

a) Intramolecular rearrangements, as in the conversion of L-methyl malonyl CoA into succinyl (CoA) b) Methylations of homocystine to methionin, (the only known reaction dependent on coenzyme B12 in the mammals). c) Reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides<sup>(9)</sup>.

Deficiency of vitamin B<sub>12</sub> causing anaemia and megaloblastic (maturation of the red cells in the marrow).<sup>(10)</sup>

Vitamin B<sub>12</sub> has been successfully synthesized in two stages, which includes converting corrinoid (cobyrinic acid), a natural substance to vitamin B<sub>12</sub><sup>(4)</sup>.

As the researches on B<sub>12</sub> progressed, it soon became clear that its best source in nature is that produced by microorganisms. Actually, it is synthesized by a wide variety of bacteria. Significant quantities of B<sub>12</sub> have been produced by the following actinomycetes *Nocardia rugosa*; *N. gardneri*, *Streptomyces albidoflavus*, *S. antibioticus*, *S. farinosus*, *S. fradia*, *S. griseus*, *S. olivaceus*, *S. uinaceus*, and *S. roseochromogenes*<sup>(5,11)</sup>.

Isolation of the vitamin produced by the above microorganisms was carried out, and in many instances, examination of the isolated materials showed that several types of vitamin B<sub>12</sub> and/or its analogues were present<sup>(5,12)</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### Cultures activation:

Spores of two *Streptomyces griseus* isolates (JY and IN) have been separately inoculated into the activation medium of McCormick and Wieght<sup>(11)</sup>, which was prepared by dissolving (30)g soybean meal, (30)g glucose, (10)g CaCO<sub>3</sub> in (1)L of D.W, (pH be adjusted to 7.0) Cultures, then incubated in a shaking incubator (280rpm / min) at (28) C° for 5 days.

### Propagation media:

Two different media were used the first (which contained cobalt chloride in its formula) was prepared according to McCormick and Wright<sup>(11)</sup> by dissolving the following ingredients in (1)L of D.W., with pH (7.0), (30) g soybean meal, (30)g glucose, (10)g CaCO<sub>3</sub> and (0.025)g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. The second medium contained cobalt nitrate (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) and prepared according to Hollerigel et al<sup>(12)</sup> by dissolving (30)g soybean meal, (30) g glucose, (30) mg (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), which dissolving in 1L of D. W, and pH was adjusted to 7.2.

Activation and propagation media were sterilized by the autoclave at 121 C° for 15 min.

### Cultures Propagation :

Five loopful inoculation of each activated spore culture were separately inoculated into (250 ml) flasks which contained (100)ml of each media, then incubated at (28) °C in a shaking incubator (280rpm/min) for 12 days (for the first medium) and 10 days (for the second).

### Vitamin extraction :

Vitamin extracted from the fermentation medium by four extraction methods.

The first one performed according to McCormick and Wright<sup>(11)</sup> as follows :

The medium was boiled (after fermentation) in a water bath for (30) min to release the cobamide from the bacterial cells. After adjusting pH to 6.5 by 0.1N NaOH, each medium was filtered through no. (4.0) filter paper and the collected solids are discarded. Approximately (5) ml of KCN solution (5% was added to (100)ml of each culture filter then left in the shaking incubator at (25) °C for (30) min (this converts all the cobamide present to the cyanoform). One part of phenol-benzen mixture (30 parts (88% phenol + 70 parts benzen) was added to the one part of the filtrate. After shaking well in a (250) ml separating funnel, non aqueous (organic) layer which contains the cobamide

was saved. One part of the mixture of n-butanol-D.W. (two parts of n-butanol + one part of D.W) was added to one part of the organic layer, the emulsion was separated by (250) ml separating funnel, and the bottom (aqueous) layer containing the cobalamin in the fermentation samples was saved. The aqueous layer was concentrated to (3) ml by rotary vacuum evaporator at 80°C.

The second method was performed according to Florent and Ninet (13) as follows:

The medium was heated (after fermentation) in the autoclave at (121) °C for (30) min to release the vitamin from the bacterial cells, the pH was adjusted to (8.5) by (0.1N) NaOH. Approximately (5) ml of KCN solution (5%) was added to (100)ml of the medium, then agitated for 16 hours at (25) °C in a shaking incubator.

(0.294) g of Zinc chloride was added to each (100)ml of the medium, and shaken well for (30) min. pH was adjusted to (8.0) by NaOH (0.1N). The medium was filtered through a no. (4) filter papers to separate the filtrate from the supernatant. Extraction was repeated three times with (0.102) ml of cresol and carbon tetrachloride mixture (1:2 ratio).

The emulsion was separated on a (250) ml separating funnel, and the organic layer (bottom) was saved. An amount of (0.147) g of (n-butanol-D.W) mixture (2:1 ratio) was added to each (100)ml of the organic layer, the emulsion was separated by a (250)ml separating funnel, and the aqueous layer kept. Extraction was made three times with (0.102)ml of cresol-carbon tetrachloride mixture (1:2 ratio) to each (100) ml of aqueous layer, the emulsion was broken by centrifugation (5000 rpm/min) for (30) min and the organic layer (bottom) was saved. In addition was made of (0.088) ml of acetone-ether (2:1 ratio) to each (100)ml of organic layer. The mixture was concentrated by a rotary vacuum evaporator to (3) ml at (80) °C.

The third method was performed according to Freed (14) as follows:

After fermentation period, the pH of the medium was adjusted to (4.0) with HCl

(0.1 N), then boiled in a water bath for (15) min, after cooling the pH was readjusted to 7.8 by (0.1) N NaOH, then centrifuged for (30) min to remove any undissolved solids. Approximately (5) ml of KCN solution (5%) was added to each (100)ml of filtrate, agitated for (30) min at (25) °C in a shaking incubator, (10) ml of cresol (one part) + carbon tetrachloride (two parts) was added to each (100)ml of solution, the emulsion was separated on a (250)ml separating funnel for (5) min, and the organic layer (lower) was kept. Three times of extraction by adding (5)ml of carbon tetrachloride and (10)ml of n-butanol to each (100)ml of organic layer, the emulsion was separated on a (250)ml separating funnel until the upper layer was clear. The upper layer was kept and concentrated to (3) ml by a rotary vacuum evaporator at (80)°C.

The fourth method was performed according to both McCormick and Wright<sup>(11)</sup>; Florent and Ninet<sup>(13)</sup> as follows:

The medium was autoclaved (after fermentation) in a (121) °C for (30) min to release the vitamin from the bacterial cells, the pH was adjusted to (8.5) by (0.1N) NaOH. Approximately (5) ml of KCN solution (5%) was added to each (100) ml of the medium, agitated for (16) hours at (25)°C in a shaking incubator, (0.294) g of zinc chloride was added to each (100) ml of the solution, mixed well for (30) min, and the pH was adjusted to (8.0) by (0.1N) NaOH. The mixture then filtered through a no. (4.0) filter papers, in order to separate filtrate from solid materials (bacterial cells). One part of phenol-benzen mixture (30 parts (88%) phenol + 70 parts benzen) was added to the one part of filtrate, the emulsion was separated on a (250)ml separating funnel, and non aqueous layer was saved. One part of (n-butanol-D.W) mixture (2:1 ratio) was added to each part of the non aqueous layer, the emulsion was separated on a (250)ml separating funnel, and the lower layer was kept. This layer was concentrated to (3) ml by a rotary vacuum evaporator at (80)°C.

Vitamin extraction from the bacterial cells:

Methods recommended by Johansen and Escalante semerena<sup>(14)</sup> was used to extract vitamin B<sub>12</sub> from the bacterial cells as follows.

Fermented medium was filtered through no. (4.0) filter paper to separate the bacterial cells, (100)ml of sterilized salt solution (2%) was added, and shaken for (30) min. The mixture was heated in the autoclave 121°C / 30 min to release the vitamin from the bacterial cells. After cooling pH was adjusted to (8.5), and filtered through no. (4.0) filter paper, the solids part were discarded, (5)ml of KCN solution (5%) was added, and mixed with (100)ml of the supernatant, then incubated in the shaking incubator (5000 rpm/min) at (25) °C for (30) min. The mixture was concentrated to (3) ml by a rotary vacuum evaporator at 80°C, then purified by a sephadex G25 column (1×50 cm)<sup>(16,17,18)</sup>, to remove excess free vitamin B<sub>12</sub>. The flow rate was fixed to (3) ml per every (4) min, and the fractions of each samples were collected to find the value of (O.D) by spectrophotometer (4050) at (361)nm for both standard and extracted vitamin B<sub>12</sub>.

## RESULTS & DISCUSSION

Figure (1) shows that fractions which contained the extracted B<sub>12</sub> were limited between (8-20) tubes, and between (11-18) for the standard B<sub>12</sub>. After concentrating the vitamin, values of O.D were obtained from the standard curve of vitamin B<sub>12</sub> (fig 2), then vitamin concentration was estimated for all experiments as shown in (fig 3). It appears that (IN) isolate (which propagated in the first production medium and extracted by the fourth extraction method) has given highest concentration (66.5)µg /ml of B<sub>12</sub> (fig3-D2). On the other side, vitamin B<sub>12</sub> concentration of the (JY) isolate reached only (53.0) µg/ml (fig3.D1) under the same conditions.

From these results, it could be concluded that (IN) isolate is more efficient for production of vitamin B<sub>12</sub>. and the first

medium is more efficient than the second one (which resulted in only 54.9 µg / ml of vitamin B<sub>12</sub> as shown in (fig 3-E). McCormick and Wright<sup>(11)</sup> confirmed that the role of the components of the production medium ion activation of *S. griseus* to produced one of the most important derivatives of vitamin B<sub>12</sub>, (5,6 - Dimethyl benzimidazoly - cobamide). Berwick<sup>(19)</sup>, and Andersson and Roth<sup>(20)</sup> stated that B<sub>12</sub> production requires the presence of two important materials in the medium, the first is the carbon source (eg: D - glucose), and the second is the nitrogen source (eg: soybean meal).

The production of B<sub>12</sub> also requires the presence of one of the cobalts salts (eg: CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) to give the complete structure of B<sub>12</sub> (21, 22, 23).

In this study, addition of cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) to the production medium was better than cobalt nitrite (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) in production of vitamin B<sub>12</sub>, but McDaniel<sup>(24)</sup>, and Daniels<sup>(25)</sup> were found opposite results, when they were used this material. Extraction procedure must be included (KCN) in very limited amount enable converting all the cobalamin to cyano cobalamin<sup>26,27</sup>. The fourth extraction method was characterized by easy use as well as highest purity and concentration of B<sub>12</sub><sup>(23)</sup>. After extraction of B<sub>12</sub> from the bacterial cells and purified by sephadex G25 column, the fraction were collected to find the value of O.D. It was appeared that the fractions of extracted B<sub>12</sub> was located between the (8-24) tubes, when compared with (11-18) tubes for the standard B<sub>12</sub> (fig4). After concentrating the fractions, and finding the value of O.D / ml and from the standard curve of B<sub>12</sub>, the concentration of vitamin has been estimated in the two experiments (fig5). It appeared from the results that bacterial cells gave the highest concentration (38.02 µg/ml) when compared with concentration of the extract

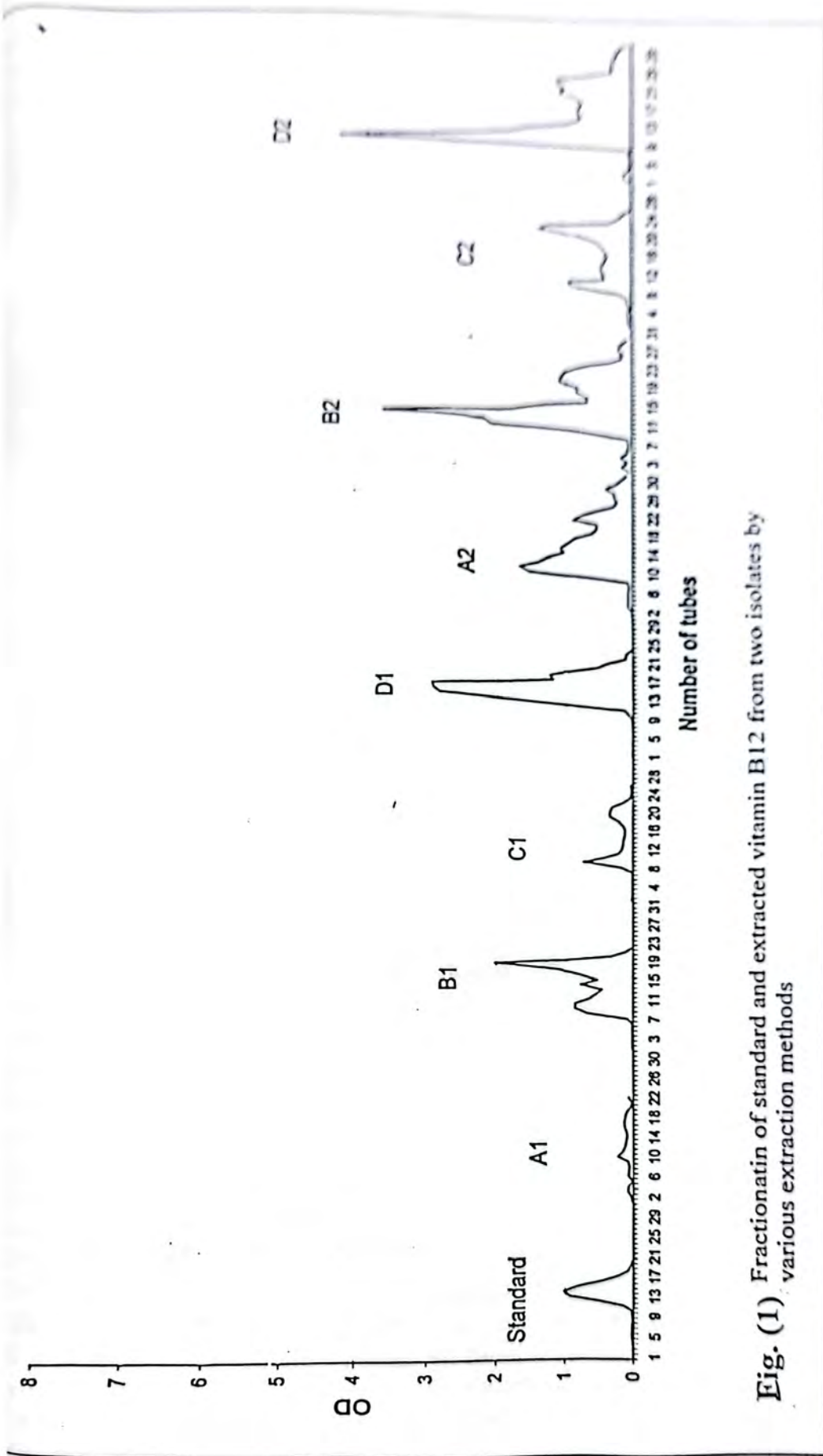


Fig. (1) Fractionation of standard and extracted vitamin B12 from two isolates by various extraction methods

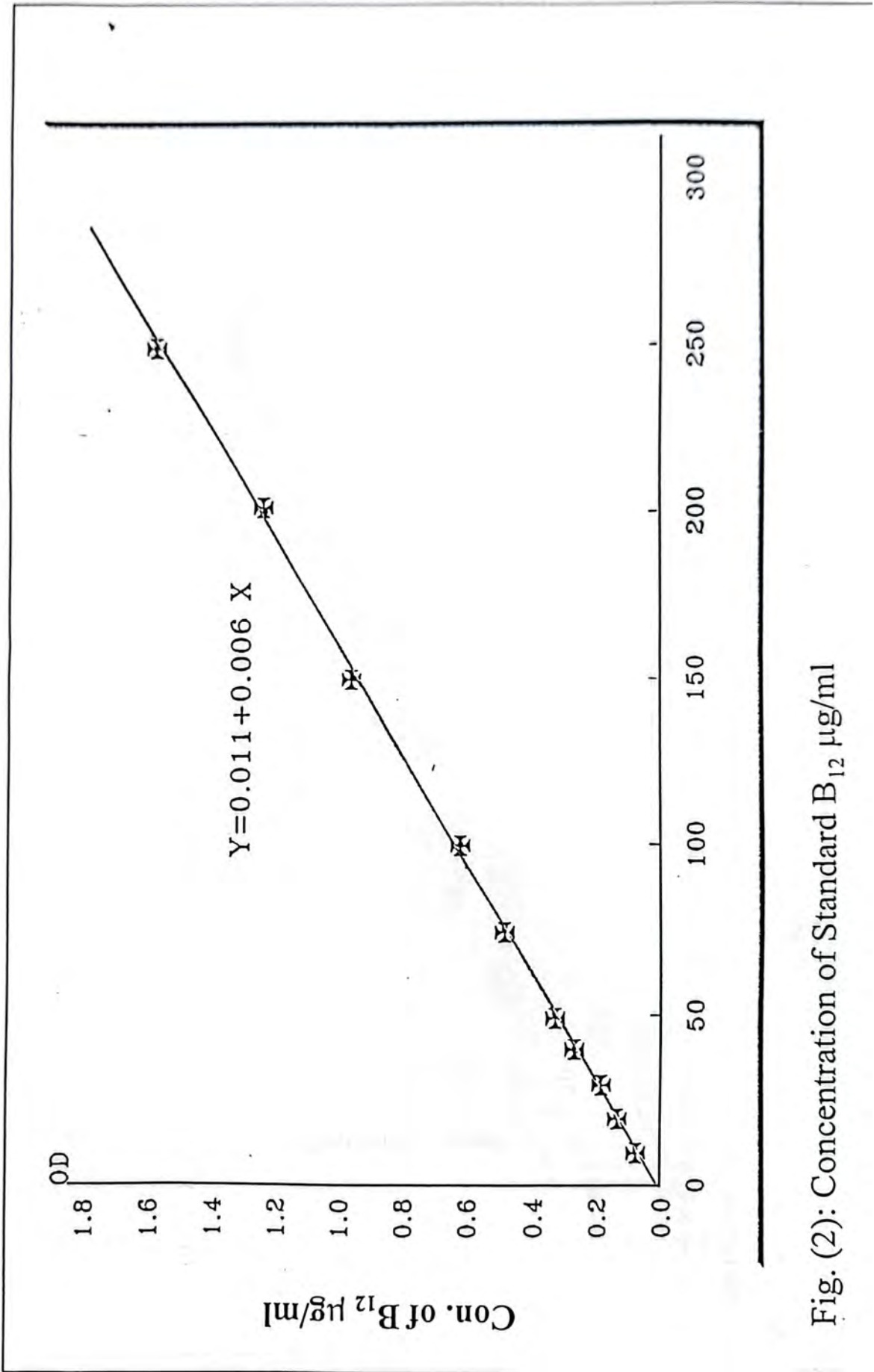


Fig. (2): Concentration of Standard B<sub>12</sub> µg/ml

- A1 : The first isolat (JY), first production medium , first extraction method
- B1: The first isolat (JY), first production medium ,second extraction method
- C1: The first isolat (JY), first production medium , thierd extraction method
- D1: The first isolat (JY), first production medium , forth extraction method
- B2: The second isolat (IN), first production medium ,second extraction method
- C2: The second isolat (IN), first production medium , thierd extraction method
- D2: The second isolat (IN), first production medium , forth extraction method
- E: The second isolat (IN), second production medium , forth extraction method

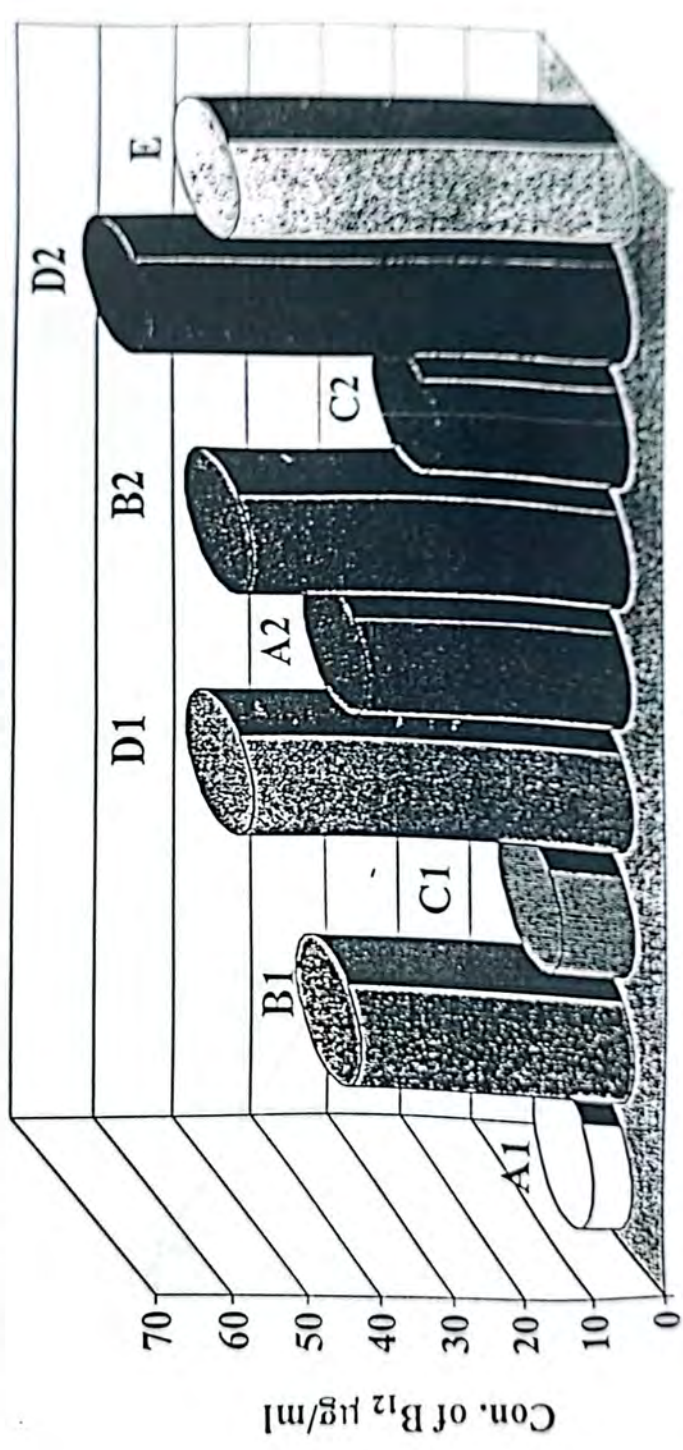


Fig. (3) Concentration of vitamin B12 extracted from two isolates by for extraction methods

Fractionation of both A: extracted from becterial cells B: extracted from the medium  
 Fig. (4)

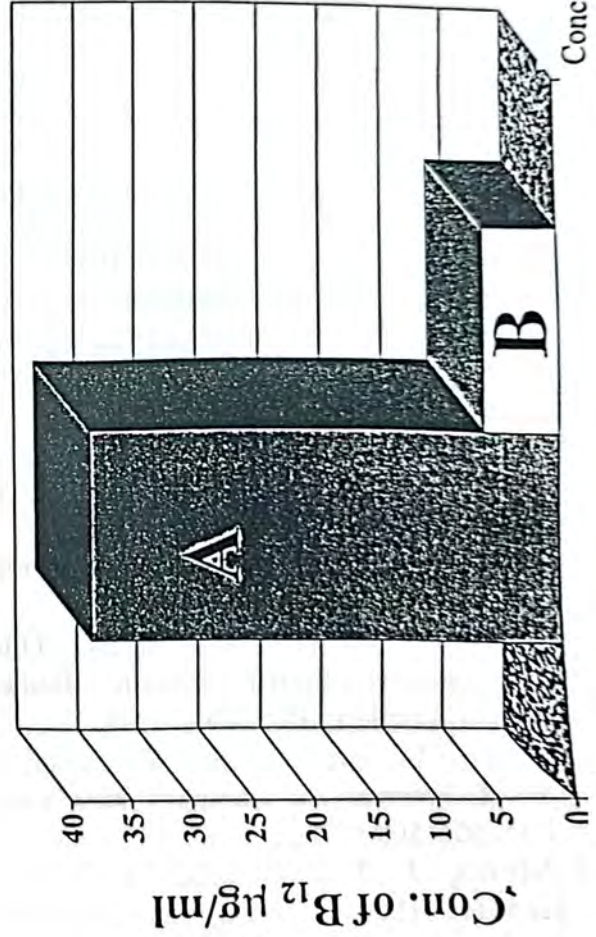
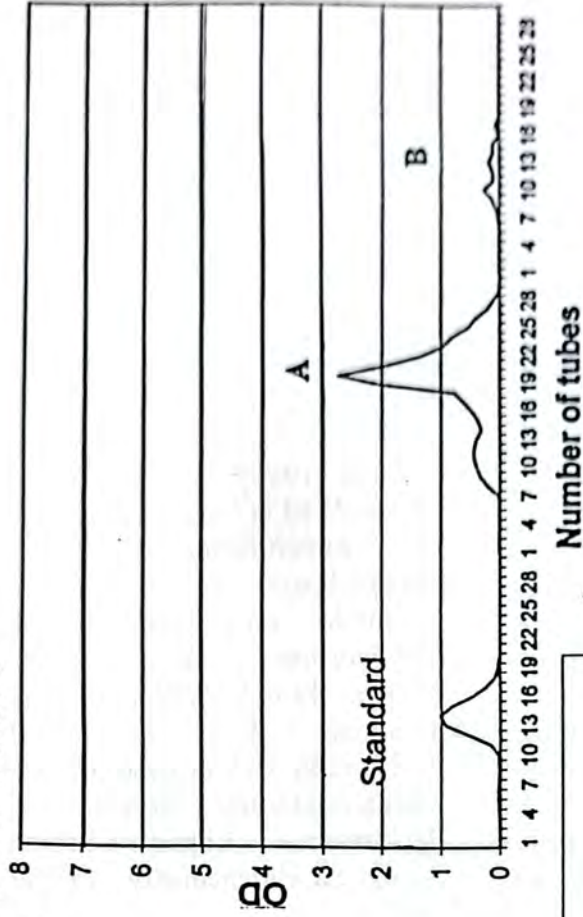


Fig. (5)

Concentration of vitamin B12 extracted from A: the cells extracted B: the

production medium (where cells removed), which reached only (6.3)  $\mu\text{g/ml}$ . It was found that vitamin is more connected to bacterial cells wall (inter-cellular) than secreted in to the medium, because the production of  $\text{B}_{12}$  took place and stored here. Also the bacterial cells consume high energy to produce a big structure like vitamin  $\text{B}_{12}$ .

## REFERENCES

1. Murray, R.K; Granner, D.K; Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. harper's Biochemistry. twenty-second edition, A Lange medical book (Appleton and Lange), New York., PP: 555-557 (1993).
2. White, A; Handler, P. and Smith, E.L. Principles of Biochemistry. Fifth edition, Brown-Hill book company / Ablakiston publication, New York., PP: 1173-1179. (1973).
3. Mathotra, V.K. and Agrwat, P.S. Bio-Chemistry for students., PP: 214-215 (1985).
4. Davis, R.E. Advances in clinical chemistry of vitamin  $\text{B}_{12}$ . Vol. 24, Academic press. Inc. New York., PP: 164-197 (1985).
5. Vandamme, E.J. Biotechnology of Vitamin, Pigments and Growth Factors, Elsevier Applied Science, London., PP: 257-284 (1989).
6. Marks, J. A guide to the Vitamins, medical and technical Publishing Co LTD, England., PP: 118-124 (1975).
7. Vitale, J.J. Vitamin, Nutrition Foundation. Inc, New York., PP: 57-67 (1976).
8. Ottaway, J. H. and Apps. D.K. Biochemisry. Fourth edition, Baillere tindall, London., PP: 279 (1984).
9. Stryer, L., Biochemistry. Third edition, W.H. Freeman and Company, New York., PP: 506-509 (1988).
10. Marks, J. The Vitamins, MTP press Limited (Falcon house), Lancaster., PP: 166-169. (1985).
11. McCormick D.B . and Wright, L.D. Methods of Enzymology. Vol. XVIII. Part C, Academic Press, New York, pp 75-82 (1971)
12. Holtriel, V, Lamm, L, Rowold, J, Horig, J. and Renz, P. Biosynthesis of Vitamin  $\text{B}_{12}$ , Different Pathway in some Aerobic and Anaorbic Microorganisms Arch Microbiol., 132: 155-158 (1982)
13. Florent, J. and Ninet, L. Vitamin  $\text{B}_{12}$  Microbial technology Seconed edition, Academic press, new York, PP 497-519 (1979)
14. Freed, M. Methods of Vitamin assay Third edition, prepared and edited by the association of Viatamin Chemistyr, Inc John Wiley and Sons, New York., pp 257-285 (1966).
15. Johnson, M.G. and Escalante-Semerena, J.C. Identification of 5,6-Diemethylbenzimidazole as the ligand of the cobamide synthesized by *Salmonella typhimurium*. J. Biological. Chemistry., 267(19): 13302-13305 (1991).
16. Whitman, W.B. and Wolfe, R.S. Purification and analysis of cobamide of Methanbacterium bryantii by High-Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry., 137(1): 261-265 (1984).
17. Ashley G.W.; Harris, G. and Stubbe, J. The mechanism of Lactobacillus leichmannii ribonucleotide reeducates. Evidence for 3'-Carbon-hydrogen bond cleavage and a unique role for coenzyme  $\text{B}_{12}$ . J. Biol.-Chem., 261(9): 3958-3964 (1986).
18. Kuno, S.; Fukui S. and Toraya T. Essential histidine residencei ncoenzyme  $\text{B}_{12}$ -dependent diol dehydrase: Dye-Sensitized Phtooxidatio nand thosxy carbonylation., Archives. Biochemistry and Biophysics., 277(1): 211-217 (1990).
19. Berwick, P.G.B-Lactam and amino Glycoside production from streptomycetes. J. Applied Bacteriology., 64(6): 9-15 (1988).
20. Andersson D.I. and Roth, J.R. Mutations affecting regulations of cobinamide biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. J.

- Bacteriology., 171(12): 6726-6733. (1989).
21. Fradiae, S. Biosynthesis of fosfomycin J. Ant Microbial Agents and Chemotherapy., 5(2): 121-132 (1974).
  22. Frey, B., McCliskey J.; Kersten W. and Kersten H. New function of Vitamin B<sub>12</sub>: Cobamid-dependant reduction of epoxy queosine to queosine in tRNA of Eschorichia coli and Salmonella typhimurium J. Bacteriology., 170(5): 2078-2082 (1988).
  23. Petrovich R.M.; Ruzicka F.J.; Reed G.H. and Frey P.A. Metal cofactors of lysine-2,3-aminomutase. J. Biol.-Chem., 266(12): 7656-7660 (1991).
  24. McDaniel L.E. Production of Cobalamins, Merck and Co. Inc. USA (1961).
  25. Daniels J.H. Some factors influencing Vitamin B<sub>12</sub> production by Pseudomonas denitrificans Can. J. Microbial., 16: 809-815 (1970).
  26. Stupperich E.; Eisinger H.J. and Krautler B. Diversity of corrinoids in acetogenic bacteria Eur. J. Biochem., 172: 459-464 (1988).
  27. Stupperich E. Corrinoid-dependent mechanism of acetogenesis from methanol, H.L., Drake (ed) acetogenesis, Chapman & Hall, New York, PP: 180-194 (1994).
  28. Toraya T. and Ishida A. Acceleration of cleavage of the carbon-cobalt bond of sterically hindered alkyl cobalamins b binding to a poprotein of diol-dehydrase. Biochemistry., 27(20): 7677-7681 (1988).

## Variation of Zooplankton Population in Qadisia Lake, Northwest of Iraq. III: Copepoda

HAER I. KASSIM, \*HANA H. MANGALO AND TALAL K. ABUDI KARIM

Research Center, P.O.Box 765, Baghdad - Iraq.

Department of Biology, College of Science, Al-Mustansiriyah University, Baghdad-Iraq.

(Received Sept. 5, 1996, Accepted Nov. 4, 1997)

### الخلاصة

تم فحص اثنان وعشرون نوع من مجموعة مجدافية الأرجل Copepoda في بحيرة القادسية شمال غرب العراق لفترة سنة (1993) في ثلاثة مواقع وكثافت الأنواع كالتالي  
*Cyclops exilis*, *C. navus*, *C. nearcticus*, *C. scutifer*, *C. venustus*, *C. vicinus*, *Cyclops sp.*,  
*Cletocamptus sp.*, *Diatomus forbesi*, *D. franciscanus*, *Ectocyclops sp.*, *Eucyclops agilis*, *E. macrurus*,  
*E. speratus*, *Ergasilus sieboldi*, *Halicyclops sp.*, *Lernae sp.*, *Mesocyclops leuckarti*,  
*M. tenuis*, *Nitocra lacustris*, *Paracyclops affinis*, *P. fimberiatius*.  
 فقد لوحظ خلال الدراسة ان الكثافة السكانية في المحطات الثلاث سجلت ذروتين في المحطة الاولى، الاولى (9 فرد/لتر) والثانية (33 فرد/لتر) خلال شهري حزيران واب على التوالي. بينما سجلت اعلى ذروة في المحطة الثانية في اب (11 فرد/لتر) والآخرى في تشرين الاول (58 فرد/لتر) بينما الكثافة السكانية في المحطة الثالثة اظهرت ذروتها الاولى في اب (59 فرد/لتر) والثانية في تشرين الثاني (10 فرد/لتر). وعلاوة على ذلك ظهر ان النسبة المئوية لهذه المجموعة في المناطق السطحية تصل الى 5.7%، 16.5%، 27% في المحطات 1، 2، 3 على التوالي. اما الكثافة السكانية في اعماق مختلفة تتراوح بين 1-20 متر فقد اظهرت تغيرات في المجموع العددي لها يتراوح بين 1-616، 3-157، 3-150، 4-46، 2-500 و 2-30 ind/l في اعماق 1، 3، 5، 10، 15 و 20 متر على التوالي. على العموم اعلى كثافة سكانية سجلت في اواخر الصيف باعداد تتراوح بين 11-616 فرد/لتر بينما سجل اقل عدد في اواخر الشتاء باعداد تتراوح بين 1-9 فرد/لتر.

### ABSTRACT

Twenty-two species of Copepoda have been identified in Qadisia lake, northwest of Iraq at three stations during a one year period (1993). These included (*Cyclops exilis*, *C. navus*, *C. nearcticus*, *C. scutifer*, *C. venustus*, *C. vicinus*, *Cyclops sp.*, *Cletocamptus sp.*, *Diatomus forbesi*, *D. franciscanus*, *Ectocyclops sp.*, *Eucyclops agilis*, *E. macrurus*, *E. speratus*, *Ergasilus sieboldi*, *Halicyclops sp.*, *Lernae sp.*, *Mesocyclops leuckarti*, *M. tenuis*, *Nitocra lacustris*, *Paracyclops affinis*, *P. fimberiatius*). Two peaks in the population density were noticed during the sampling period. One was during June (9 ind/l), and the other was during August (33 ind/l) at station (1), while at station (2), the first peak was in August (11 ind/l), and the other (58 ind/l) during October, whereas at station (3), were during August (59 ind/l) and November (10 ind/l). In addition, it was found that copepods in the surface made up to (5.7%) and (37%) at stations 1, 2 and 3, respectively. Total population in different depths (1-20m) showed fluctuans during the study period ranging from (1-616), (3-157), (3-150), (4-46), (2-500) and (2-30) ind/l at depths of 1, 3, 5, 10, 15 and 20 meters, respectively. In general, population community showed higher density during late summer ranging from (11) ind/l to (616) ind/l, while the minimum composition was recorded during late winter when the total number of individual per liter was ranging between (1-9) ind/l.

## INTRODUCTION

It is well known that the group Copepoda plays an important role in the aquatic food chain as food for fish and other organisms. In Euphrates river and Qadisia lake our knowledge of the occurrence and distribution of these microscopic crustaceans is meagre. One was study on the copepods in the Euphrates river been investigated by Mohammad<sup>(1)</sup>. Assad et al.<sup>(2)</sup> studied the sediment accumulation rate in Qadisia reservoir and little information are available on fisheries of lake Habbaniya<sup>(3)</sup>, which is formed by flooding the desert area with water of the Euphrates river.

The aim of this work to compare the Copepoda occurrence for three stations in Qadisia lake during one year in the surface and from different depths and to shade some light as the indicators of eutrophic or oligotrophic conditions.

### Study Area

Qadisia lake is a reservoir established recently (1987) within the lower Jazera district. The area is under the effect of hot desert climate with an average rainfall of 127mm per annum.

The Euphrates river passes through Qadisia lake in a width of 200-500m at low discharge ( $300\text{m}^3\text{sec}^{-1}$ ) and 600-1100m during the flood. The water level in the river ranges between 2-10m<sup>(2)</sup>. The lake dam (57m hight) captures water f 24m depth. The area of the reservoir is 503km<sup>2</sup> (max. length of 50km and max. of 20km). The lake water is well aerated. It is an alkaline fresh water. NO<sub>3</sub> is the major nitrogen form. No pronounced variations are found in nutrient values among the water column<sup>(4)</sup>.

Few aquatic plants were found. These were mainly *Myriophyllum verticatum* L., *Potamogeton crispus* L., *P. pectinatus* L. and *Najas armata* L. which located only at north and south parts of the lake.

## MATERIALS AND METHODS

From January through Decemb 1993, samples were taken at month intervals from Qadisia lake at three stations (figure 1). The first station (St. 1) was located at the north of the lake near Rav city; the second (St. 2) at middle part and the third (St. 3) just before the dam on south part. Samples from St. (2) were collected under different depths (1,3,5,10,15 and 20 meter). Quantitative samples were collected with a graduated bucket, and plankton net mesh size 55µm. At each station, 40liters water were taken, condensed and preserved in 4% formaldehyde for later identification and enumeration. Count of net organisms are expressed in number of individuals per liter.

## RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-two taxa were recorded as shown in Table (1). Three of these together at St. (2) contributed more than 20% of the individuals collected. These three individuals were the most abundant in St. (2) *Halicyclops* sp. comprised 13% of total individuals; *Paracyclops fimeriatus* comprised 6% of total individuals and *Cyclops vicinus* comprised 5% of total individuals, at Sts (1) and (3), the most abundant species were *Halicyclops* (comprised 16%) and *Diatomus franciscanus* (comprised 11%), respectively (Table 2). The seasonal density of total copepods showed fluctuations during the study period in the three stations as shown in Figure (2). There are two maxima recorded at St. (1) during summer (9 and 33 ind/l) while at St. (2), the first maxima occurred during late summer (11.4 ind/l) and the second one during early Autumn (58 ind/l). The two peaks in St. (3) were during summer (59 ind/l) and during Autumn (10 ind/l). The

Other individuals were only encountered occasionally as copepods nauplii, which were very abundant, comprising 71%, 65% and 70% of total individuals during twelve month study period at Sts. 1, 2 and 3, respectively. The seasonal variations of copepods nauplii are shown in figure (3). The population density in St. (3) was higher than that in Sts. 1 and 2 which recorded maximum density during August (50 ind/l) and minimum number record of less than one per liter. Nauplii had densities during annual cycles, which were always higher than the densities of total copepodites on the same date<sup>(5)</sup>. The populations of copepods in different depths (0-20m) showed fluctuations ranging from 1-616, 3-150, 4-46, 2-500 and 2-30 ind/l at different depths (1, 3, 5, 10, 15 and 20 meter, respectively) as shown in figure (4). *Cyclops vicinus* usually reaches the highest densities during July at depth of 10 meter (18 ind/l). *Mesocyclops leuckarti*, was found in small numbers, comprising 1% of total copepods, and showed their highest densities in July (8 ind/l) at 5m depth. *Halicyclops* reached its highest densities (128 ind/l) in August at one meter depth. *Paracyclops fimeriatus* reached maximum number (75 ind/l) during August at a depth of one meter. Apparently, the mean annual densities of *Cyclops vicinus*, *Mesocyclops leuckarti*, *Halicyclops sp.* and *Paracyclops fimeriatus* increased during fluctuated during sampling period. Two factors are probably responsible for these changes. Sand extraction may make water very turbid and hence light penetration may decrease 50% of the light absorbed at different depths<sup>(5)</sup>. This may have a negative influence on the rate of copepods population increase. There is evidence that progressive

increase in eutrophication may take place during the research period. The annual mean chlorophyll-a concentration ranged between 7.23-68.51 mg/m<sup>3</sup>, 3.75-17.91 mg/m<sup>3</sup> and 0.28-5.49 mg/m<sup>3</sup> at Sts. (1), (2) and (3), respectively<sup>(4)</sup>. *Cyclops scutifer* comprised 2% of total copepods at St. (2) and reached maximum number per liter during August in a depth of one meter, but it comprised 1.6% and 0.1% in the surface at Sts. (1) and (3), respectively. The omnivorous character of *Cyclops scutifer* is stressed and it is an indicator of oligotrophy<sup>(7)</sup>. *Diaptomus franciscanus* reached its maximum number during August (8 ind/l) in the surface. St. 3 comprised 11% of total individuals. All these species comprised a percentage higher than the others as shown in Table (2).

The population structure of the dominant species which comprised more than 10% of the total copepods showed a distinct seasonal variations among months was rather small (figure 5). It will be shown that the population is mainly influenced by three factors: the diapause mechanisms, size-dependent mortality and birth rate<sup>(5)</sup>.

In general, the number of specimens was low from winter to spring at all stations and characterized by increasing species by late summer and early Autumn<sup>(3)</sup>. In some months, there was a reduction in number of species of copepods. Such a change may be due to eutrophication, pollution and grazing by large number of zooplanktivorous fish<sup>(9)</sup>.

Finally, cyclopoids were the dominant copepods in the lake, comprising 31% of total Copepoda. The abundance of copepods was not significantly different among stations. Such case was also noticed in grass carp ponds in Florida<sup>(10)</sup>.

Table 1 : List of identified Copepoda species in the studied stations (St. 1,2, and 3) during 1993 in Qadisia lake (+ present, - absent).

Taxa	St.	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<i>Cletocamptus sp</i>	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cyclops exilis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. navus</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. nearcticus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. scutifer</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	2	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. venustus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. vicinus</i>	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cyclops sp.</i>	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Diaptomus forbesi</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>D. franciscanus</i>	1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	3	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Ectocyclops sp.</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ergasilus sieboldi</i> (male)	1	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
	2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Eucyclops agilis</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. macrurus</i>	1	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
	3	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Table 1: Continued

Taxa	St.	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<i>E. Speratus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Halicyclops sp.</i>	1	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lernaea sp. (male)</i>	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. tenuis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nitocra locustris</i>	1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Paracyclops affinis</i>	1	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fimberiatius</i>	1	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2: Percentage composition of Copepoda during 1993 at three stations in Qadisia lake.

Taxa	Stations			Taxa	Stations		
	1	2	3		1	2	3
<i>Cletocamptus sp.</i>	0.09	-	0.18	<i>E. macrurus</i>	2.49	1.5	0.54
<i>Cyclops exilie</i>	-	0.04	-	<i>E. speratus</i>	-	0.09	-
<i>C. navus</i>	0.02	-	-	<i>Halicyclops sp.</i>	15.4	12.76	8.4
<i>C. nearcticus</i>	-	0.06	-	<i>Lernaea sp.</i>	0.86	0.29	0.15
<i>C. scutifer</i>	1.6	2.05	0.09	<i>Mesocyclops leuckarti</i>	-	1.0	0.05
<i>C. venustus</i>	0.04	1.3	0.1	<i>M. tenuis</i>	-	0.04	-
<i>C. vicinus</i>	0.18	5.09	0.69	<i>Nitocra locustris</i>	0.33	1.15	0.81
<i>Cyclops sp.</i>	0.18	0.21	4.02	<i>Paracyclops affinis</i>	2.66	0.19	0.02
<i>Diaptomus forbesi</i>	-	0.01	1.25	<i>P. fimberiatius</i>	1.69	5.27	0.2
<i>D. franciscanus</i>	1.0	2.1	10.07	<i>Copepod nauplii</i>	70.95	64.86	72.73
<i>Ectocyclops sp.</i>	-	0.03	-				
<i>Ergasilus sieboldi</i>	1.38	1.15	0.71				
<i>E. agilis</i>	1.4	0.66	0.55				



FIG.(1) : Map of Iraq showing sampling stations .

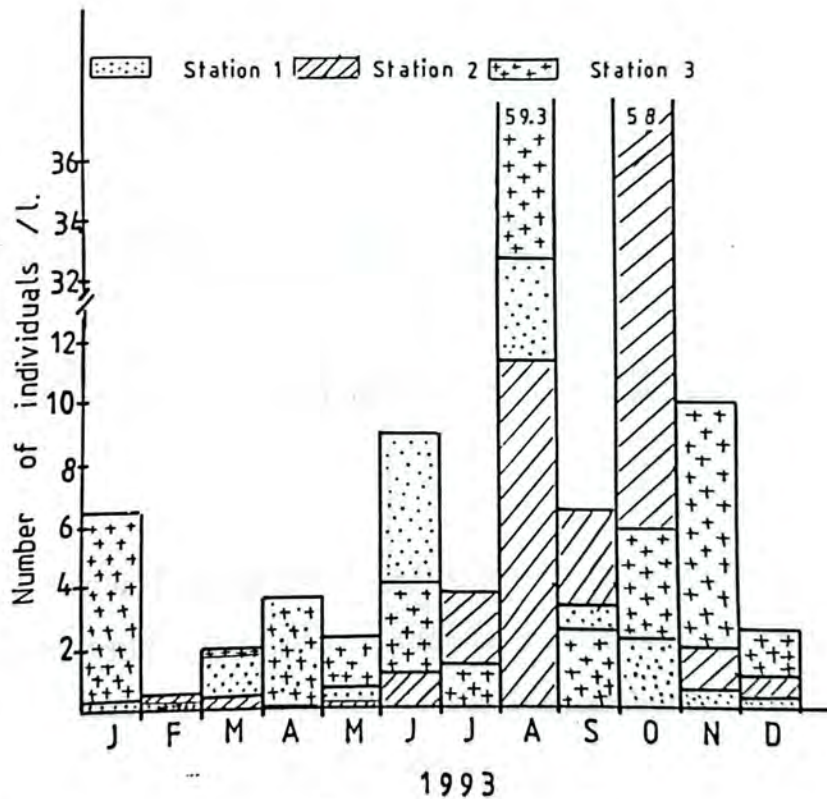
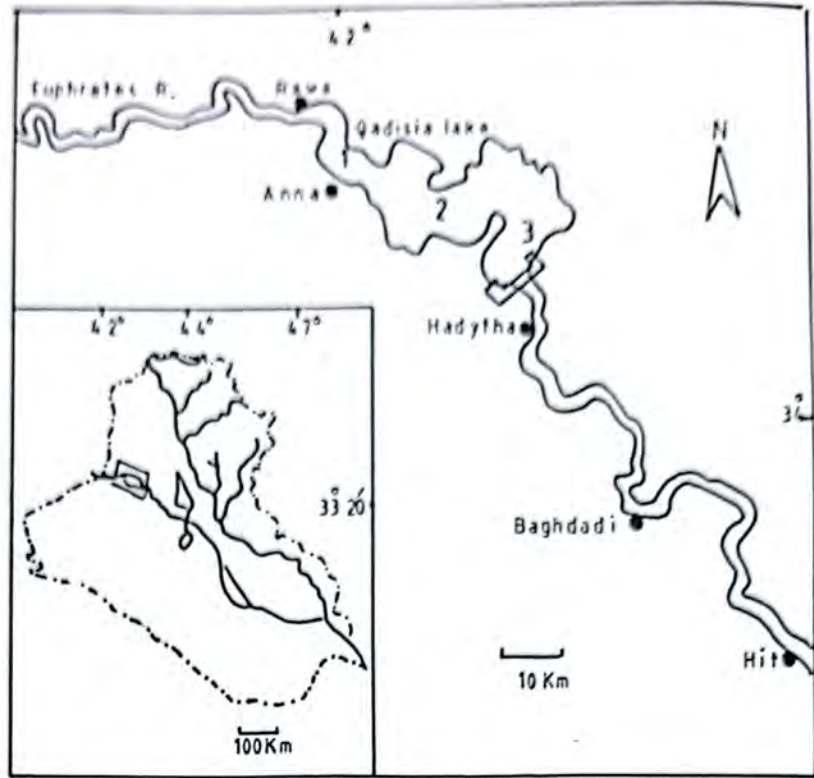


Fig.(2) : Seasonal occurrence of total Copepoda (Number of individuals /l) at the surface of three stations during 1993 in Qadisia lake .

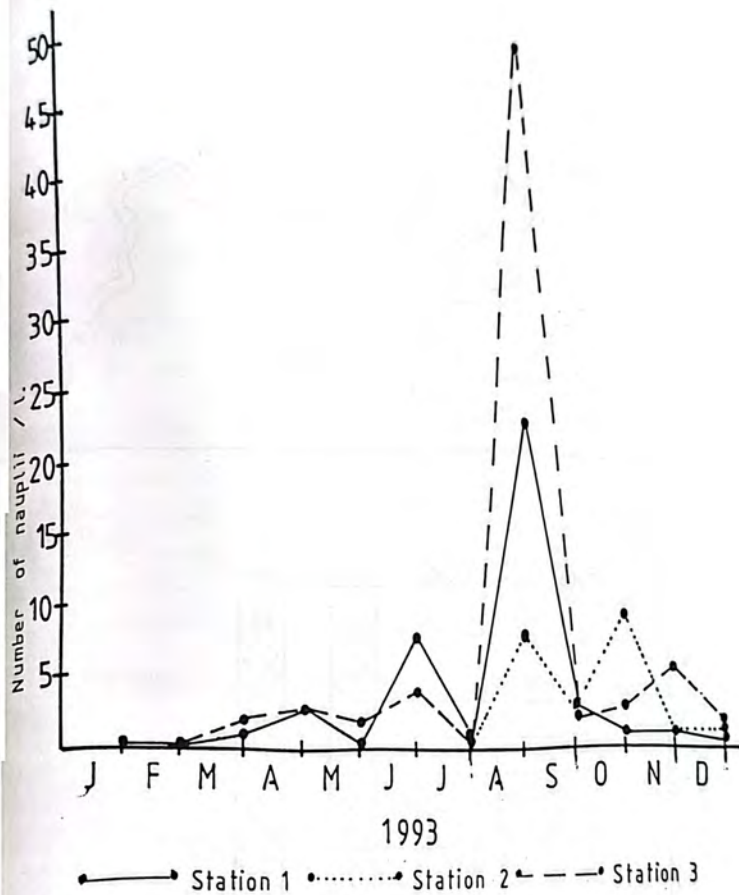


Fig.(3) : The abundance of total number of Nauplii per liter at the surface of three stations during 1993 in Qadisia lake.

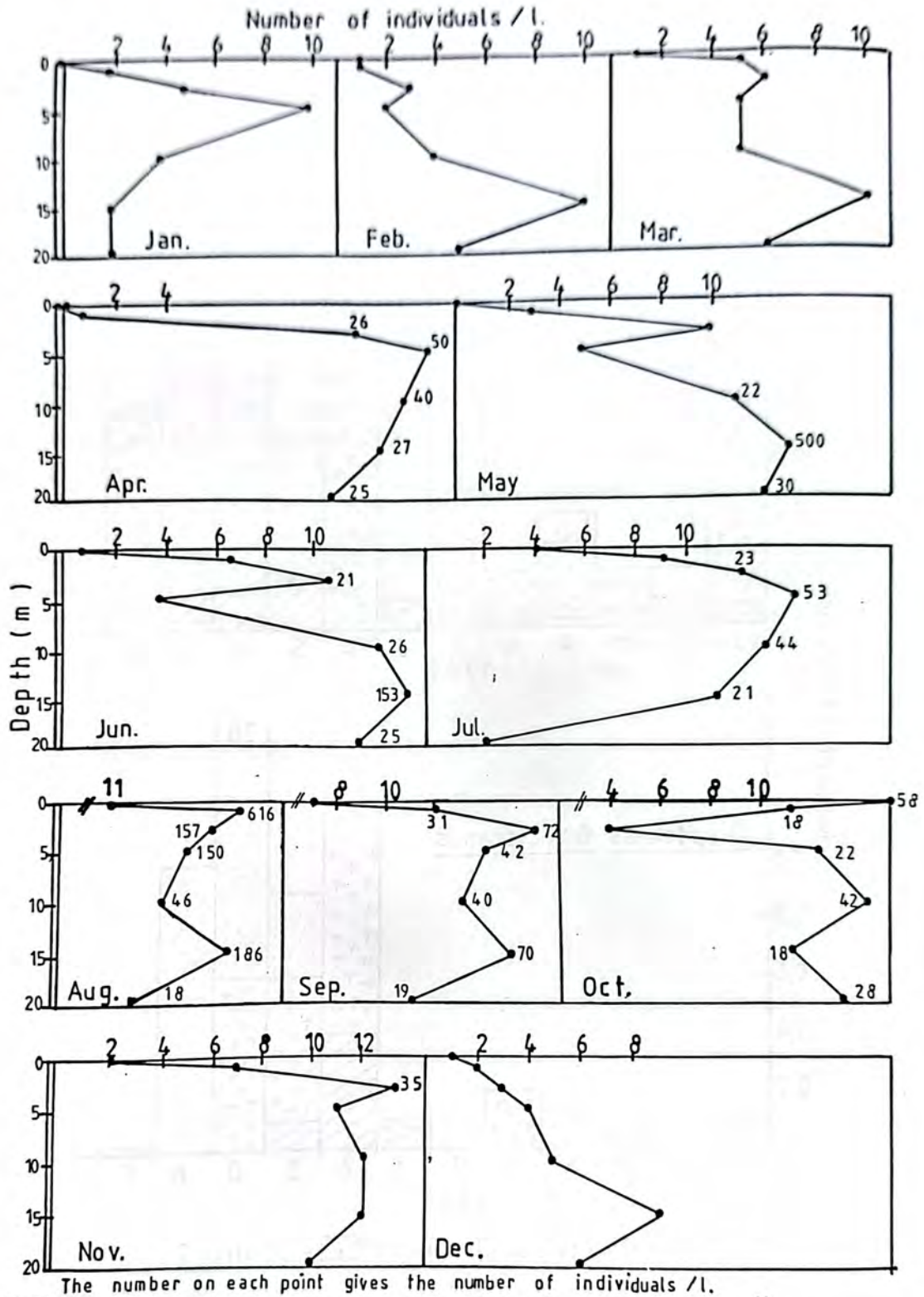


Fig.(4) : Seasonal occurrence of total Copepoda at different depths (1,3,5,10,15 and 20 meters) during 1993 in Qadisia lake .

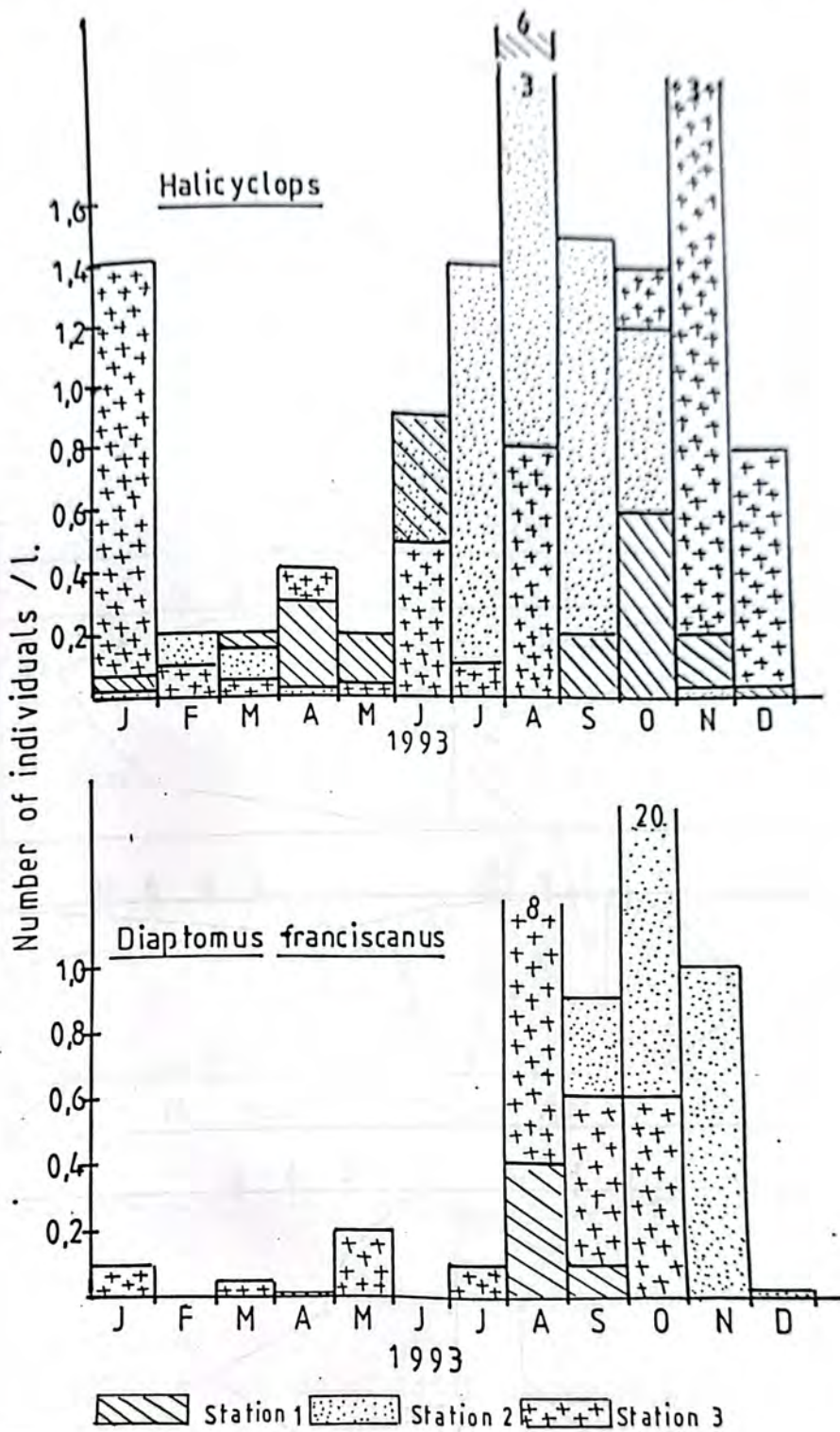


Fig.(5) : Seasonal occurrence of population densities of Diaptomus franciscanus and Halicyclops sp. at the surface during 1993 in Qadisia lake .

## REFERENCES

1. Mohammad, M. - B.B.M. Associations of invertebrates in the Euphrates and Tigris Rivers at Falluja and Baghdad, Iraq, Arch. Hydrobiol., 106 (3): 337-350 (1986).
2. Assad, N.M.; Al-Ansari N.; Hussan, S.A.; Abbas, S.M. A study on the sediment accumulation rate in Qadisia reservoir. Sci. Bull. No. 130. Ministry of Irrigation, Water and Soil Res. Institute, Baghdad (1986).
3. Anon. State and prospective of fisheries in Habbaniya lake. Final report II. Poleservice Cons. Engin. Warsaw-Poland. State Fisheries Organization, Baghdad, Iraq (1983).
4. AL-Lami A.A.; Al-Saadi, H.A. and Kassim, T.I. Limnological features of Qadisia lake, north west of Iraq. Al-Mustansiriya J. Sci. (in press).
5. Vijverberg, J. Population structure, life histories and abundance of copepods in Tjeukemeer, Netherlands. Freshwater Biol., 7: 579-597 (1977).
6. Kassim T.I., Al-Saadi, H.A.; Al-Lami, A.A. and Alwan, Y.A. Seasonal variation of phytoplankton in Qadisia lake, Iraq. (unpublished).
7. Pejler, B. Zooplanktic indicators of trophy and their food. Hydrobiologia., 101: 111-114. (1983).
8. Forro, L. and Metz, H. Observations on the zooplankton in the reedbelt area of the Neusiedlersee. Hydrobiologia., 145: 299-307 (1987).
9. Green, J. Changes in the zooplankton of lakes Mutanda, Bunyonyi and Mulehe (Uganda). Freshwater Biol., 6: 433-436 (1976).
10. Fry, D.L. and Osborne, J.A. Zooplankton abundance and diversity in central Florida grass carp ponds. Hydrobiologia., 68 (2) 145-155 (1980).

## In Vitro Activation of Mouse Peritoneal Macrophages

HSAN S. DAMIRDAGH AND YILDIZ M. A. AL-BANAA

Department of Biology, College of Science, AL-Mustansiriya University, Baghdad-Iraq.

(Received Sept. 14, 1999; Accepted Nov. 8, 1999).

## الخلاصة

عزلت خلايا البلاعم الكبيرة الصفاقية من الفئران BALB/c وتركت لتلتصق على شريحة زجاجية للمجهر الضوئي ثم جرى تفعيلها بعرضها لمدة صفر - 24 ساعة لمحلول يحتوي المستخلص المائي لبذور الحرمل. (Peganum harmala L.). تم تحضير المحلول بإذابة المستخلص المائي المجفف في داري الفوسفات الملحي ثم مزجه مع السائل RPMI 1640 للحصول على التركيز المطلوب بين صفر - 14% (وزن/حجم). تم قياس التفعيل بأربعة طرق مختلفة هي: التغيير في الشكل المظهري لخلايا البلاعم، احتساب معامل البلعمة باستعمال خلايا كانديدا البيكانس المقتولة كخلايا هدف، تكوين الفورمازان أو اختزال صبغة نيتروبلوتترازوليوم، تكوين الزهيرات باستعمال خلايا الدم الحمر المتحسسة وغير المتحسسة من خروف. أظهرت كل الاختبارات واختبار العيوشية ان مستخلص بذور الحرمل لم يكن ساما ضد البلاعم الصفاقية وانه سبب تفعيلًا لانوعيا للبلاعم. وكان أكثر التراكيز المستخدمة تف عيلا هي 7,5% و 10% وان افضل الفترات الزمنية التجريبية هي 4 ساعات و 24 ساعة (لاي من التراكيز المشار اليها).

## ABSTRACT

Mouse BALB/c peritoneal macrophages were isolated and adhered on-to microscope slides. Then were activated by exposure for 0-24 hrs. to a solution containing aqueous extract of harmala (Peganum harmal L.) seeds. The solution was prepared by dissolving the dried aqueous extract in phosphate saline buffer then mixing with RPMI 1640 to the needed concentration between 0.0-14% (w/v). The activation was measured by four different methods; morphological changes of the macrophages, phagocytotic index using killed candida albicans cells, NBT reduction (formazan formation) test, rosette formation with sensitized and non-sensitized sheep RBC. All these tests and viability test indicated that harmala seeds extract was not toxic to the macrophages and it caused non specific activation of the macrophages. The most active tested concentrations were 7.5% and 10% and best exposure times were 4 hrs and 24 hrs (for either concentration).

## INTRODUCTION

Macrophages actively involve in host defense mechanism. It has been demonstrated that macrophages are most active under disease conditions and such changes are associated with some physiological change in macrophages<sup>(1)</sup>. It is also true that engulfed pathogen may or may not be killed inside the macrophage<sup>(2)</sup> and engulfed *Candida albicans* may actually germinate and grow

inside the macrophage<sup>(3)</sup>. However, the engulfment is the first step. Several workers have shown that microbial polysaccharides enhance macrophage activity<sup>(4)</sup>.

Despite medicinal use of various plants or plant extracts<sup>(5,6)</sup> there are very few reports about the role of plant extracts in the activation of macrophage or their effect on immune system. Stimple et.al.<sup>(7)</sup> reported that polysaccharide fractions from the plant *Echinacea Purpurea* strongly activated

macrophages as indicated by their extra cellular cytotoxicity against tumor targets in vitro tests. Morioka et.al.<sup>(8)</sup> found that a protein fraction from garlic enhanced cytotoxicity and proliferation of human lymphocytes. Kumazawa et.al.<sup>(9)</sup> showed that hot water extract of seeds of *Benincasa cerifera* savi (tohgashi) activates peritoneal macrophages into antitumor macrophages. Similarly, preparations from *Echinacea purpurea* increase, the *in vitro* phagocytosis of *Candida albicans* by granulocytes and monocytes from healthy human donors<sup>(10)</sup>.

Harmala *Peganum harmala* L. has been a traditional folk medicine, and its seeds extracts have shown antibacterial and antifungal effects by invitro tests<sup>(6,11)</sup>. We also found<sup>(12)</sup> that extracts from seeds of harmala enhanced healing of experimentally induced skin lesions in guinea pigs by *Trichophyton mentagrophytes*. Here we report that aqueous extract from harmala seeds activated mouse peritoneal macrophages.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation and Viability of Macrophages

The peritoneal cavity of 5-6 weeks old white mouse BALB/C was injected with 3ml of Heparin in phosphate saline buffer (50 units Heparin per 100 ml of PBS) then the animal was killed by cervical dislocation and the injected solution was aspirated into a siliconized tube. The cells were collected and washed in phosphate saline buffer by centrifugation then suspended in RPMI 1640. Total cell count was  $1 \times 10^6$ /ml estimated by haemocytometer. The viability of the cells was estimated according to Hudson and Hay<sup>(13)</sup> by staining in 2% trypan blue (w/v in normal saline) for 3 min. at 37. The viable cells do not stain and the percent of viability (number of living cells/ total no cells) was 100%.

### Harmala Extract

Seeds of hramala (*Peganum hramala*) were crushed and soaked in distilled water (4ml/gr) in a shaking incubator at 28°C for 24 hrs. Then filtered and centrifuged and the

supernatant was filtered again. The clear solution was concentrated under vacuum at 45°C to syrupy preparation, then left in incubator at 45C till dry within two days. The dried matter was dissolved in phosphate saline buffer at the needed cooncnetration (w/v) and this solution was mixed to the needed concentration (w/v) with RPMI 1640 for the activation of the isolated macrophages.

### Toxicity of Hrmala Extract for the Macrphages

The toxicity was estimated on the basis of percentage of killed Macrphages after exposure to the extract<sup>(14)</sup>. A suspensin of the isolated cells were held in a propylene tube containign harmala extract at concentration of 0.0% (for control), 2%, 10% or 14% and incubated at 37C.

### Sensitized Red Blood Cells of Sheep

To one ml of 5% suspension of sheep RBC one ml of RBC antiserum, (prepared in a rabbit) was added and incubated at 37C for 30min. The RBCs wre centrifuged and washed twice in PBS then suspend in one ml of RPMI 1640 and to it was added one ml of 1:10 diluted mouse complement (suppllied by AL-Razy Company for sera and vaccines, Baghdad). After incubation for 30 min at 37C the cells were centrifuged and washed twice in PBAS then resuspended in RPMI 1640 and kept at 4C until used<sup>(15)</sup>.

### In Vitro Activation of Macrophages by Aqueous Extract of Harmala

A suspension of isolated macrophages was left on a microscope slide in a humid chamber at 37C for one hour, to let the macrophages adhere to the slide surface. The adhered cells were washed three times with PBS. The cells were covered by a 0.5ml of RPMI 1640 containing harmala extract at concentration of 0.0% (for control), 2.0%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, or 12% and incubated for 2hr., 4hrs., 24hrs, or 48hrs. Then washed with PBS. After this activation four different methds were followed to detect and measure

the activation. Three replicates were used for each test:

**A. Morphology of the macrophages as set by Crowle and May<sup>(16)</sup>.** The activated and washed macrophages were fixed by methanol for 7-10 min. and stained by Giemsa stain<sup>(17)</sup> for 20 min. then washed by differential solution (1ml methanol in 40ml dist. Water and 2 drops of 7.5% sodium bicarbonate) for 30 sec., then air dried and examined under oil immersion lens.

**B. Phagocytosis of killed *Candida albicans* As Target Cells:** - After activation and washing of the macrophages on the microscope slide as above a suspension of killed *Candida albicans* (by boiling for 25 min.) containing  $2 \times 10^7$  cells/ml was added. The candida was prepared according to (18,19) as follow: *C. albicans* cell were harvested by centrifugation from a sabourad's broth culture grown at 37C for 24hrs. The cells were suspend in hanks balanced salt solution HBSS containing 5m Molar of HEPES (N-2 hydroxy-ethylpeparazine-N' - 2-ethanesulfonic acid) to which was added 10ml of fetal calf serum (FCS) per 100ml of final mixture. The ratio of candida to macrophage was 4:1 and incubated at 37 for one hr. Then the cells on the slide were washed, fixed, stained with Giemsa then examined by oil immersion lens. The phagocytic index (number of phagocytic cells/ total No. of phagocytes)  $\times 100$  was calculated as well as the number of candida cells phagocyted by one macrophage.

**C. Nitroblue-tetrazolium (NBT) Reduction:-** After activation of the macrophages on slides the slide was flooded with 1.5ml of NBT for 25min. at 37C. the stain was prepared as of Csato et.al.<sup>(2)</sup>, by dissolving 0.1g in 2ml methanol then PBS was added to make 50ml. The solution was centrifuge and the clear supernatant was stored in a dark bottle at 4C until needed). Afterwards, the cells were washed, fixed, stained with Giemsa and examined under

oil immersion lens. Appearance of rough violet insoluble formazan granules in the cytoplasm is indication of NBT reduction<sup>(20)</sup>.

**D Rosette Formation an Phagocytng Sheep RBC -** After activation of the macrophages on the slides they were covered by sensitized or non-sensitized sheep RBC suspension containing RBC four times as number of macrophages, left at 37 for 20 min then wased, fixed stained with giemsa and examined under oil immersion lens. The number of Rosette forming macrophages the number of RBC in the Rosette the number phagocytng cells, tne nuber of RBC engulfed per 100 macrophages, and the total number of macrophages were recorded.

## RESULTS

### Isolation and Identification of Macrophages

The isolated peritoneal cells were identified as macrophages had typical shapes of macrophages, Kidney-shaped nuclei with cytoplasm free of rough particles, and they adhered to glass surface.

### Toxicity of Harmala Extract and the Viability of the Macrophages

The harmala extract was not toxic to macrophages. 96-99% of the macrophages isolated from white mice BALB/c remained alive at least for 48hrs in RPMI 1640 containg 10% FCS and the aqueous extract of harmala seeds. Also almost all cells remained viable after exposure for periods of 2-48hrs to 2% or 10% or 14% harmala extract. And this was similar to that without harmala.

### Activation by Harmala Extract of Macrophages as Indicated by the Morphological Types

Table 1 shows that the number of large activated macrophages increased by increasing the concentration of the harmala extract. The highest number was 100 activated macrophages after exposure for 24hrs to 7.5 or 10% of Harmala extract but

the intermediate and extended types were not seen. After 48 hrs this pattern changed and all the three types were seen as shown in table 1. It should be noticed however that a total of 100 cells were examined per one slide and the test was repeated three times, so the total number of all the tree types is 100 and a higher number of on type means lesser number of the other types. Anova test (analysis of variance) showed significant differences at less than 0.1% between the control and treatment.

#### **Effect of Harmala Extract on Phagocytosing Ability of the Macrophages**

Treating peritoneal macrophages with harmala seed extract increased their ability to ingest the target candida cells. There was a significant increase in the phagocytic index and in the average number of engulfed Candida cells by 100 macrophages as the exposure time and the concentration of the harmala increased. As seen in table 2 exposing macrophages to 10% harmala for 24hrs gave the highest phagocytic index  $78.5 \pm 2$  and highest number of engulfed Candida cells which was around  $266 \pm 2$  per 100 macrophages. Exposure to 7.5% gave almost similar results. On the other hand, exposure to 2% harmala gave no significant difference in the phagocytic index from that of the control (untreated macrophages) except for the 48 hrs of exposure. Other numbers can be evaluated from table 2.

#### **Activation of Macrophages by Harmala as Indicated by Formazan Formation (NBT Reduction Test):**

Exposing isolated macrophages to harmala extract increased their activation as indicated by increased number of formazan producing cells. This activation was dose and time dependent. Highest percentage of formazan forming cells  $47.7 \pm 2.3$  was obtained by 10% harmala for 24hrs. the second highest was 94.4 cells by 10% for 4hrs. Lower concentrations and shorter exposure time resulted in less number of formazan forming cells but still significantly

higher than the control. Also longer duration, 48hrs, resulted in less number of formazan forming cells (Table 3) in the control and in the treated cells.

#### **Activation of Macrophages by Harmala Extract as Indicated by Rosette Formation and Phagocytosing Sheep RBC:**

Exposing macrophages for 24 hrs to increasing concentrations of harmala extract up to 10% resulted in increased number of active macrophages when sensitized or non-sensitized RBC were used (table 4). At 12% there was less number of active macrophages than the control. The percentages of rosette forming cells at 10% conc. For 24hrs was  $50.8 \pm 1.6$  (Average mean  $\pm$  STD. dev. of three replicates) against  $24.4 \pm 2.1$  for control. Similarly 10% harmala for 24 hrs resulted in attachment of  $349 \pm 3.5$  sensitized sheep RBC to 100 macrophages compared to  $145 \pm 2.0$  for the control. Also the number of phagocytosing cells (phagocytic index) was about twice as that in the control. Other parameters as seen in table 4 are highest with 10% harmala treatment and generally extended exposure, for 48 hrs reduced the activity, these differences were significant at 0.01 or 0.05 level. As shown in table 4 similar results were obtained using non-sensitized RBC.

## **DISCUSSION**

We believe this is the first report on the activation of macrophages by harmala extract, the plant often used in folk medicine. The presented data show that harmala seeds extract did cause activation of the isolated macrophages. The activation was demonstrable by four different tests. Although the tests did not include the killing activity after engulfment, it does not reduce the importance of the observed activities. On the other hand, it can be extrapolated on the basis of the published data, that killing activity may have also been increased. For instance, Csato et.al<sup>(2)</sup> found that several different functions were correlated with the

same polymorph nuclear leucocytes, i.e. increased adherence to plastic surface, increased NBT reduction, and increased killing activity for *C. albicans*. In fact Csato et.al.<sup>(2)</sup> stated that NBT reduction and killing activity are correlated. However, it is also true that engulfed candida cells may germinate and grow inside macrophages<sup>(3)</sup>. Futhermore, some evidences indicate that activated macrophages do not only acquire enhanced phagocytosing capacity but also become more cytotoxic to foreign cells<sup>(7)</sup>. So

the enhanced activity of the macrophages by harmala extract may be an indication of a general enhancement of the immune system. This notion is supported by the fact that harmala when applied topically had clear therapeutic effect of experimentally induced lesion in guinea pigs inoculated with *trichophyton mentagrophytes*<sup>(12)</sup>.

The present results are also in accordance with the few published data on the effect of some plant extract on peritoneal macrophages<sup>(7,10,21)</sup>.

Table 1: Morphological types of the peritoneal macrophages after exposure to the harmala extract for the indicated times and concentrations. All treatments were significantly different from the control

Harmala Conc.	Hours of exposure	Average mean (out of 100 of the morphological types ( $\pm$ ) standard)		
		Activated	Intermediate	Extended
Zero	2	21.9 $\pm$ 7.8	34.7 $\pm$ 5.0	43.3 $\pm$ 0.5
	4	27.0 $\pm$ 13.1	63.5 $\pm$ 7.8	9.3 $\pm$ 4.8
	24	57.6 $\pm$ 13.9	28.8 $\pm$ 3.5	13.4 $\pm$ 1.5
	48	22.8 $\pm$ 7.1	22.8 $\pm$ 6.0	44.8 $\pm$ 7.6
2	2	24.5 $\pm$ 1.8	63.3 $\pm$ 3.1	39.2 $\pm$ 4.3
	4	41.1 $\pm$ 5.2	42.8 $\pm$ 6.3	15.2 $\pm$ 4.6
	24	61.8 $\pm$ 20.5	7.2 $\pm$ 2.3	30.9 $\pm$ 14.2
	48	28.3 $\pm$ 11.3	40.9 $\pm$ 14.3	30.6 $\pm$ 5.1
5	2	31.9 $\pm$ 4.4	46.5 $\pm$ 6.3	21.5 $\pm$ 6.1
	4	45.5 $\pm$ 2.3	51.7 $\pm$ 3.7	2.6 $\pm$ 1.4
	24	83.2 $\pm$ 15.3	2.9 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.5
	48	38.0 $\pm$ 2.6	35.3 $\pm$ 8.4	26.5 $\pm$ 3.2
7.5	2	40.5 $\pm$ 7.0	41.7 $\pm$ 12.5	17.9 $\pm$ 5.6
	4	52.2 $\pm$ 3.5	32.1 $\pm$ 3.1	8.1 $\pm$ 2.0
	24	100.0	0.0	0.0
	48	39.3 $\pm$ 2.0	23.6 $\pm$ 2.2	36.9 $\pm$ 3.0
10	2	44.9 $\pm$ 3.4	17.9 $\pm$ 0.9	37.0 $\pm$ 6.2
	4	58.1 $\pm$ 3.6	34.4 $\pm$ 2.6	7.3 $\pm$ 0.4
	24	100.0	0.0	0.0
	48	43.0 $\pm$ 1.7	43.6 $\pm$ 3.7	14.6 $\pm$ 2.7
12	2	14.0 $\pm$ 3.0	17.7 $\pm$ 3.1	68.2 $\pm$ 16.5
	4	30.9 $\pm$ 9.5	50.7 $\pm$ 8.5	18.2 $\pm$ 7.8
	24	40.7 $\pm$ 5.5	27.7 $\pm$ 2.8	31.4 $\pm$ 3.2
	48	20.3 $\pm$ 6.1	34.2 $\pm$ 10.8	45.3 $\pm$ 10.0

Table 2: Phagocytic index and the number of phagocytosed candida cells per 100 macrophages after treatment by harmala extract at the indicated concentration and exposure times (hrs)

Concentration %	Exposure (hrs)	Phagocytic Index	Candida cells per 100 macrophages
zero	2	55.1 ± 12.9*	156 ± 30
	4	29.7 ± 8.1	43 ± 3.4
	24	52.4 ± 5.1	171 ± 7.2
	48	43.9 ± 4.3	118 ± 3.6
2	2	46.6 ± 10.9	187.0 ± 2.0
	4	39.1 ± 8.5	250.0 ± 40.0
	24	47.3 ± 6.1	184.0 ± 2.6
	48	99.8 ± 8.1	136.0 ± 3.6
5	2	68.2 ± 2.9	203 ± 12.5
	4	63.6 ± 2.9	166 ± 3.6
	24	70.6 ± 2.1	121 ± 7.9
	48	52.2 ± 1.3	75 ± 6.2
7.5	2	71. ± 2	232 ± 6.2
	4	68.5 ± 3.9	175 ± 3.6
	24	75 ± 2.6	116 ± 3.5
	48	53.4 ± 3.3	247 ± 12.5
10	2	75.9 ± 5.2	257 ± 8.8
	4	71.6 ± 3.8	122 ± 4.3
	24	78.5 ± 2.2	266 ± 10.5
	48	61.3 ± 2.5	299 ± 8.1
12	2	22.4 ± 10.9	147 ± 8.7
	4	20 ± 1.6	41 ± 13.2
	24	23.8 ± 2.5	80 ± 9.5
	48	38.1 ± 0.2	62 ± 2.6

\* Average mean of 3 experiments ± standard deviation

Table 3: Number of formazan forming macrophages out of 100 (NBT reduction test) after treatment with harmala extract at the indicated concentration (W/V) and exposure hours.

% Conc. and expos./ hrs	Formazan forming cells	% Conc. and expos./ hrs	Formazan forming cells
Zero %		7.2 %	
2 hrs	62.0 ± 14*	2 hrs	78.9 ± 3.7
4	65.0 ± 4.6	4	89.7 ± 0.6 α
24	52.8 ± 3.5	24	66.6 ± 1.4 α
48	50.0 ± 7.2	48	58.6 ± 3.4
2%		10 %	
2 hrs	48.7 ± 4.1	2 hrs	81.8 ± 1.7α
4	60.0 ± 2.0	4	94.4 ± 3.3 α
24	55.0 ± 2.6	24	97.7 ± 2.3 α
48	44.4 ± 2.6	48	64.6 ± 2.4 α

Table 3: continued

% Conc. and expos./ hrs	Formazan forming cells	% Conc. and expos / hrs	Formazan forming cells
5 %		12 %	
2 hrs	57.5 ± 3.5	2 hrs	25.0 ± 6.2 α
4	79.7 ± 3.8 α	4	42.6 ± 5.6 α
24	61.6 ± 3.6 α	24	46.2 ± 2.9 α
48	56.56.4 ± 1.5	48	62.9 ± 2.6 α

\* Average of three experiments ± standard deviation

α: The numbers are significantly different from control at 0.05% (or less) level by the t test

Table 4: Percentage of Rosette forming and phagocytosing macrophages after exposure to harmala extract at the indicated concentrations for 24 or 48 hrs

Exposure time and concentration	% Rosette forming macrophages	RBC Attached to 100 macrophages	Phagocytic index	RBC Phagocytosed by 100 Marophages
Sensitized RBC				
24 hrs				
0.0 %	24.4 ± 21 α	195 ± 2	24.5 ± 2.8	104 ± 25
2.0 %	24 ± 2	95 ± 6.2	23.5 ± 3.2	77 ± 3
5.0 %	40.1 ± 1.8	301 ± 2.6	28.5 ± 4.4	89 ± 3.6
7.5 %	42.4 ± 1.2	339 ± 3.6	36 ± 2	148 ± 3.6
10.0 %	50.8 ± 1.6	349 ± 3.5	41.9 ± 1.8	163 ± 3.5
12 %	19.1 ± 1.6	159 ± 19.3	12 ± 5.6	72 ± 7
48 hrs				
0.0 %	43.9 ± 3.38	203 ± 21.6	8.7 ± 10.1	36 ± 20.5
2.0 %	40.2 ± 0.7	201 ± 14.5	2.3 ± 3.5	16 ± 8.7
5.0 %	47.7 ± 3.8	181 ± 2.6	14.5 ± 3.5	50 ± 6.2
7.5 %	50.8 ± 0.7	278 ± 8.2	17.8 ± 7.6	55 ± 2.6
10.0 %	62.5 ± 1.3	304 ± 306	37.9 ± 5.2	82 ± 7.2
12 %	32.5 ± 3	54 ± 5.3	2.3 ± 3	40 ± 16.1
Non Sensitised RBC				
24 hrs				
0.0 %	36.6 ± 15	150 ± 13.7	7.9 ± 8.1	87 ± 4
2.0 %	22.3 ± 1.5	138 ± 6.5	5.3 ± 1	83 ± 5.3
5.0 %	47 ± 2.6	189 ± 2	6.5 ± 1.5	91 ± 1.7
7.5 %	75.5 ± 5.2	211 ± 1.5	18.9 ± 2.8	135 ± 1
10.0 %	76.4 ± 5.2	352 ± 4.3	47.5 ± 2.5	154 ± 2.6
12 %	16 ± 4.5	14 ± 1	6 ± 3	40 ± 11
48 hrs				
0.0 %	39.1 ± 4.6	156 ± 26	24.8 ± 4.1	150 ± 2.6
2.0 %	35.2 ± 1.6	100 ± 7.3	21.5 ± 2.8	24 ± 1.7
5.0 %	43.1 ± 1.6	184 ± 7	26.6 ± 1.9	23 ± 3.6
7.5 %	44.4 ± 1.6	319 ± 1	28.8 ± 1.7	59 ± 3.6
10.0 %	47.7 ± 3.8	340 ± 18.1	21.9 ± 1.8	149 ± 6.5
12 %	30.7 ± 4.1	65 ± 4.35	12 ± 1	21 ± 1.7

a: averaged mean ± std. dev. of three replicates

## REFERENCES

1. Koh, M.S.; Majewski, B.B. and Rhodes, E.L. Increased Macrophage activity in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 65: 194-148 (1985)
2. Csato, M.; Dobozy, A.; Raith, L., and Simon, N. The function of polymorphnuclear leukocytes emegrating into the skin. *Acta. Derm. Venereool.* 65: 106-110 (1985).
3. Arai, T.; Mikami, Y. and Yokoyama, K. Phagocytosis oof *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. *Sabouraudia* (1977)
4. Al-Joofy, I.K. and Mousawy, K.M. Immunopotentiating effect of semipurified Rhizobium polysaccharide in BALB/C mice. *J. Fac. Med. Baghdad* 40(No. 1): 87-94 (1998).
5. Lozoya, X.; Navarro, V.; Garcia, M. and Zurita M. *Solanum chrysostrichum* (Schldl) a plant used in Mexico for the treatment of skin mycosis. *J. Ethnopharmacol.* 36: 127-132.
6. Adday, M.H. Some observation on the reproduction toxicity of the aqueous extract of *peganum harmala* seeds. *Fitoterapia* vol. LXV(3): 219-221 (1994).
7. Stimple, M.; Proksch, A.; Wagner, H. and Matthes, M.L. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echniaceae purpurea*. *Infect. Immunit.* 46(3): 845-849 (1984).
8. Morioka N. Sze, L.L.; Morton, D.L. and Irie, R.F. A protein fraction from garlic extract enhances cytototxicity and proliferatation of human Lymphocytes and mediated by inter-leukein-2 an concavalin. *Cancer-immunol-immunother.* 37(5): 316-22 (1993).
9. Kumazawa, Y.; Nakatsuru, Y.; Yamada, A.; Yadomae, T.; Nishimura, C.; Otsuka, Y. and Nomoto, K. Immunopotentiator Separated from hot water extract of the seed of *Benincasa cerifera savi* (Tohgashi). *Cancer-immunol-immunother.* 19(2): 79-84 (Abstr. In. Medline) (1985).
10. Wildfeuer, A. and Mayerhofer, D. The effect of plant preparation on cellular function in body defence. *Arzen. Frschung.* 44(3): 361-366 (Abstr. Medline). (1994).
11. Al-Ganabi, A.A.S. Effect of some plant extracts on the Growth of some dermatophytes. M.Sc. thesis college of science Al-Mustansiriya University. Baghdad. (in arabic with english summary) (1996).
12. Al-Banaa, Y.M.A. Effect of caffeine and some plant extracts on some pathogenic fungi and bacteria and non-specific activation of macrophages M.Sc. thesis, College of science. Al-Mustansiriya University Baghdad (in Arabic with English summary) (1998).
13. Hudson, L. and Hay, F.C. *Practical immunology.* Second ed. Blacwell London (1979).
14. Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y., Nishida, G.S. and Kuwahara, S. Inhibitory effect of *pseudomonas aeruginosa* of the phagocytic and killing of rabbit polymorph nuclear leukocytes: Mechanisms of action of a polymorph nuclear leukocyte inhibitor. *Infect. Immun.* 24: 399-403 (9179).
15. Mendes, N.F; Tolani, M.E., Silveria, N.P., Cilbersten, R.B.; and Metzgar, R.S. Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) Lymphocytes. *J. Immunol.* 111: 860-867 (9173).
16. Crowle, A.J. and May, M. A hanging drop macrophage Function test. *J. Reticulendothelial society.* 24(2): 169-185 (1978).
17. Allen, J.W.; Shuler, C.F.; Menders R.W. and Latt, S.A. A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxy uridine

- tablets. Cytogenet. Cell genetic 18-231-237. (1977).
18. Chan, C.K. and Baltish, E. Inhibition of granulocyte phagocytosis of *Candida albicans* by amphotericin B. Can. J. Microbiol. 24: 363-364 (1978).
  19. Blumer, R. and Hancock, K. W. Depletion of circulating T-Lymphocytes in Pregnancy. Clin Exp. immunol. 28:302-305. (1977).
  20. Csato, M.; Dobozy, A. and Simon, N. Study of phagocytic functions with Quantitative Nitrobluetetrazolium (NBT) reduction test in diabetes mellitus Arch Dermatol. Res. 268-288. (1980)
  21. Furasawa, E and Furasawa, Sh. Anticancer of vivanatural, a dietary sea weed extract on lewis lung carcinoma in comparisn with chemical immunomodulators and on cyclosporine Accelerated AKR Leukemia. Oncol. 46: 343-349 (1989).

## In Vivo Affect of Eserine Sulphate and Molsidomine on Acetyl Cholinesterase of Rabbit Brain and Gastrointestinal System

ZAHRA'A S. MUHSON, RAAD K. MUSLHI AND MOHAMMED A. AL-SHEIKHLY  
Department of Chemistry, College of Science, Al-Mustansiriyah University

(Received July, 21, 1999; Accepted November 8, 1999)

### الخلاصة

تم دراسة وجود انزيم الاستيل كولين امستريز (AChE) الذائب في انسجة مختلفة من الارنب كالدماع والمعدة وثلاثة اجزاء من الامعاء الدقيقة: Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C)، حيث كانت اعلى فعالية في انزيمية في الدماغ، A,C,B، ثم المعدة. لقد تسبب حقن محلول Eserine Sulphate داخل الجوف (i.p.) (0.5 ملغم لكل كغم من وزن الكائن الحي وبحجم 1 مل لكل 0.5 ملغم) بنسبة تثبيط واضحة في نشاط الانزيم (52.06 الى 72.25)%. اما حقن محلول Molsidomine داخل الجوف (i.p.) (0.5 ملغم لكل كغم من وزن الكائن الحي وبحجم 1 مل لكل 0.5 ملغم) لم يلاحظ له تأثير معنوي على نشاط الانزيم في الانسجة تحت الدراسة. ان حقن الدوائين معا بشكل متعاقب وباستحقاق الفترة الزمنية لكل منهما تسبب باعادة فعالية الانزيم بنسب تتراوح بين (162.07 الى 486.99)% حسب النسيج المدروس، كما ان حقن الدوائين معا بتعاقب يعاكس التعاقب الاول وكل حسب فترته الزمنية المحددة تسبب باعادة فعالية الانزيم بنسب تتراوح بين (190.76 الى 441.16)% حسب النسيج المدروس.

### ABSTRACT

Soluble acetylcholinesterase (AChE) was isolated from rabbit brain, stomach and its distribution along small intestine (dudenum (A), jejunum (B) and ileum (C)) was studied. The higher enzyme activity was in brain, B,C,A and stomach. Pronounced inhibition of enzyme activity (52.06-72.25)% caused by (i.p) injection of eserine sulphate solution (0.5mg/kg body weight and volume of 1ml/ 0.5mg drug) was observed. Molsidomine solution (i.p. injection of 0.5mg/ kg body weight and volume of 1ml/0.5mg drug) did not affect the enzyme activity significantly. However, when they consequented at intervals, they caused reactivation of the inhibited enzyme (162.07 to 486.99)% in target tissues. When the sequence was reversed an increase in enzyme activity (190.76 to 441.16)% in target tissues was observed.

### INTRODUCTION

AChE; acetylcholinesterase (EC.3.1.1.7) is present in all conducting fibers of nerve and muscle in the pre- and post synaptic membrane of junctional site in both the central and peripheral nervous system and in variable concentrations in most other tissues<sup>(1)</sup> particularly in excitable tissues as soluble and membrane bound<sup>(2,3)</sup>. It is also found in various non-neuronl tissues such as stomach<sup>(4,5,6)</sup> and intestinal epithelial cells of different vertebrate species<sup>(7,8)</sup>.

AChE (true or specific chE) and BuchE (psedue or non specific chE) are 2 cholinesterase groups which are capable of hydrolyzing Ach. The two groups may be differentiated by their different substrate specificity, inhibitors and their distribution in different tissues<sup>(9)</sup>.

The distribution of AChE in the nervous system contributes to its physiological importance, the nervous system acting through A.N fibers, can exert rapid and effective control of many if not most of visceral function of the body<sup>(10)</sup>.

Gastrointestinal tract has two networks of nervous fibers are added to the parasympathetic N.S.<sup>(11,12)</sup> Ach is released at the sympathetic and parasympathetic nerve endings in the A.N.S., once it has been secreted, it is hydrolyzed by AchE of the synaptic area<sup>(10,13)</sup>.

The enzyme is inhibited by anti-chE agents which react essentially in the same way as Ach. Therefore the active site of the enzyme is effectively blocked when an inhibitor-enzyme complex is formed, as a result, Ach will accumulate at cholinergic receptors sites, causing excessive stimulation of the receptor through central and peripheral N.S.<sup>(14,15)</sup>. This accumulation if repeated can cause death due to muscular spasm which smothers the person even if few nerve impulses reach the muscle<sup>(15,16)</sup>.

In the present work the reactivating potency in vivo of one of the (N=0) donors (molsidomine) was tested on the carbamylated AchE of rabbit brain, stomach and 3 parts of small intestine (duodenum (A) jejunum (b) and ileum(c).

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Acetylthioiodidecholine (AsIch) and bovine serum albumine was obtained from BDH CO., 5,5-Di-thio bis 2-nitro benzoic acid (DTNB), eserine sulphate and moslidomine from Sigma chemical Co., St. Louise.

### Animals

Newzeland rabbits of 2-3 months old and 500-750gm body weight were chosen for this study. They were sacrificed by decapitation after the specified period of drugs incubation; brain, stomach and small intestine were used as a source of soluble AchE.

### General outline of Inhibition and Reactivation Experiments

Animals were subjected to intraperitoneal (i.p.) injection of drugs in

dose of (0.5mg/kg body weight) and volume of (1ml/0.5mg drugs)

Rabbits (n=6) were injected by the inhibitor eserine sulphate solution and left (10-15) min before decapitation.

Rabbits (n=7) were injected by the activator molsidomine solution and left (20-30)min before decapitation. Reactivation tests were studied by:

1. Each animal (n=7) recieved 2 (i.p) injection, first with eserine sulphate solution for (10-15) min, second with molsidomine solution for (20-30) min before decapitation.
2. Each animal (n=8) recieved 2(i.p) injection: first by molsidomine solution and the animal left over night before decapitation, second with eserine sulphate solution for (10-15)min. Normal saline (0.9%, 1ml) was injected in control cases (n=9) and left (5-10) min before decapitation.

### Extraction of Soluble AchE

Extraction method was carried out according to Yashikawa et.al<sup>(17)</sup>.

All steps were at 4°C, the whole brain was removed and homogenized in 5ml of 10mM k-phosphate buffer pH=7.8 containing 30mM KCl by glass homogenizer with Teflon pestle operating at 1500 rpm for 5min. Stomach was removed, opened along the greater curvature and the mucosa was scraped off with a glass slide. The intestinal canal was divided into the following segments: duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C). These segments were thoroughly washed by normal saline 0.9%, longitudinally opened and mucosal cells were gently scraped off by means of 2 glass slides<sup>(7)</sup>.

The mucosa was homogenized in 1.5ml of 10mM K-phosphate buffer pH=7.8 containing 30mM KCl at 1500 rpm for 5min. Soluble enzyme extract of all fractions was obtained after cooling centrifugation at 20000g for 1 hr.

### Enzyme Assay

AchE activity was measured by the calorimetric method of Ellman et al.<sup>(18)</sup>

One enzyme unit was expressed as micromoles of hydrolyzed substrate per hour per ml enzyme.

### Protein Estimation

Protein concentration was measured according to Folin Lowry method<sup>(19)</sup> using bovine serum albumine as a standard protein.

### Statistical Analysis:

All data are expressed as mean of triplicate reading  $\pm$  SD. of the mean. The student's t. test and ANOVA test were used to test the significance. P value  $< 0.05$  was considered statistically significance and (n) refers to the animals number used.

### Results and Discussion

The AchE specific activity of rabbit brain, stomach and its distribution along small intestine are shown in (fig. 1) where the higher enzyme activity shown in brain (4.217 U/mg  $\pm$  0.457), B (1.869 U/mg  $\pm$  1.026), C (1.551 U/mg  $\pm$  0.825), A (1.016 U/mg  $\pm$  0.388) and St. (0.647 U/mg  $\pm$  0.272), Coontrl results are in agreement with that given by Sin. et.al<sup>(7)</sup> where AchE activity was higher in B than C and A of rabbit small intestine, and with that obtained by Gabriel. et.al.<sup>(4)</sup> where AchE activity of frog intestine was higher than that in stomach.

Brain has greater enzyme activity and this is normal, since it is considered neurotransmitter source.

Eserine sulphate injection caused the following signs on the treated animals : pronounced salivation, hyperventilation, defecation, myoclonus, tremor, muscular weakness and abdominal cramp.

The target tissues AchE activity was inhibited significantly ( $p < 0.01$ ), table 1, fig. 1. Brain enzyme is more sensitive to inhibition than other fractions and that could be attributed to the fact that eserine is a centrally active carbamate; can cross the blood brain barrier and enter the C.N.S., in

turn, it dramatically reverses the central as well as the peripheral signs of anticholinergic toxicity<sup>(20)</sup> However, the different inhibition rates of enzyme may be due to different absorption rates in different intestinal region, that B absorbed the inhibitor higher than C and A.

On the other hand, when rabbits received molsidomine injection, a slight inhibition of A,B and C enzyme activity and a slight activation of brain and stomach enzyme activity occurred, table 1, fig. 1. However our results are statistically unacceptable ( $p > 0.5$ ). Molsidomine effectiveness on the studied tissues AchE was approximately close to control values.

### Reactivation Experiments

The pronounced signs appeared on the animal treated by the inhibitor are eliminated gradually when rabbit received molsidomine solution.

In addition, it caused significant reactivation in enzyme activity of fractions St., A,B and C and highly significant reactivation in brain enzyme activity, table 1, Fig. 1. This reactivation may be due to interaction of eserine with cholinergic receptors and affect the uptake and release of Ach<sup>(21)</sup>. Administration of molsidomine, could mediate that effect, since the (N=0) donor caused inhibition of electrically evoked Ach release<sup>(22,23)</sup> via activation of Ca<sup>++</sup>- K<sup>+</sup> channels which could cause hyperpolarization of vascular muscle and this lead to inhibition of Ach release<sup>(23)</sup>. Resistance of enzyme to inhibition may be associated also with an increase in amount of Ach, since (N=0) increases cGMP level by activation of guanylyl cyclase and this leads to the enhancement in basal Ach release<sup>(23,24)</sup>. As a result, the enzyme affinity to the inhibitor decreases. Eserine is readily absorbed from gastrointestinal tract<sup>(20)</sup>, causing increase intestinal motility and tone. This effect is blocked by the administration of molsidomine since exogenous (N=0) causes inhibition of gastrointestinal motility<sup>(22)</sup>.

Administration of molsidomine prior to eserine produces the following observations on the treated animal: mild salivation, hyperventilation, muscular collapse, tremor and muscular weakness. These symptoms gradually disappeared after 5 min. of its appearance.

AchE activity significantly reactivated in St., A and B, and highly significant reactivation in brain and c was observed.

This reactivation may be explained by increased molsidomine metabolism and (N=0) liberation in the presence of the eserine.

In conclusion, initial work showed the presence of AchE in rabbit stomach and gut displaying a maximum enzyme activity in B and minimum in stomach.

Eserine sulphate acts as a significant inhibitor ( $p < 0.01$ ) of AchE activity, causing moderate to severe symptoms of cholinergic hyperactivity. Molsidomine does not significantly activate AchE ( $p > 0.5$ ) but is found to antagonise the eserine induced tremor, defecation, poly urea or so, with pronounced enzyme activity inhibition.

There are no significant differences between the two reactivation ways of AchE of all fractions ( $p > 0.1$ ), except in brain where (inhibitor + reactivator) injection causes significant reactivation ( $p < 0.01$ ). Finally, no information found where molsidomine was used as AchE reactivator, therefore the reactivation results in this work considered original.

#### Acknowledgments

We are grateful to AL-Rakaba Al-Dowaiea office for supplying animals and to Dr. Walied Arif, College of Medicine, Al-Mustansiriya University for his expert statistical analysis assistance.

#### REFERENCES

1. Francis F., Aszallos A., Foldes F. Enzyme in Anesthesiology; Springer-Verlag. New York Inc. (1978).
2. Cambon C., Declume C., and Derache R., Arch Toxicol 45: pp. 257-262 (1986).

3. Tennyson V., Brazin M., and Kremzner L., J Histochem Cytochem 21 pp 634-652 (1973)
4. Gabriel R. and Budai D., J.A.N.S. 40: pp 223-228 (1992)
5. Miyazaki H., Nakamura-H. Taneike T., and Ohga A., Comp Biochem Physiol 89 c(1): pp. 87-92 (1988)
6. Slawomir M., Grazyna C. and Danuta M. Acta physiol. Pol. 30. pp. 5-6 (1979)
7. Sin J., Ferrand R., and Colas B. Comp Biochem. Physiol. 91 c(2) pp. 597-602 (1988).
8. Sin J., Ferrand R. and Colas B. Mol. Cell. Biochem. 108: pp. 145-149 (1991).
9. Andersen R. and Mikalesn A., Gen Pharmac. 9: pp. 177-181 (1978).
10. Greager J. Human anatomy and physiology. Wadsworth publishing Comp. Division of Wadsworth, Inc. Belmont. California (1983).
11. Furness J., Costa M., Neurosci. 5: p. 1 (1980).
12. Ganong W. Review of medical Physiology. 12th ed. Middle est. edition, type press, Lebanon (1985).
13. Gyton A. Text book of Medical Physiology. 7th ed. W-B. Saunders Comp., West Washington Square. Philadelphia, PA. 19105 (1986).
14. Tripathi K. Essentials of Medical Pharmacology. 3rd ed. Medical Publishers (p) Ltd. New Delhi/ India. (1994).
15. Korol Kovas A. Essentials of Medicinal Chemistry 2nd. ed. John Wiley and Sons, New York (1988).
16. Niday E., Wang C. and Alaupovic P. Biochimica et Biophysica Acta; 469: pp. 180-193 (1977).
17. Yashikawa T., Naito Y. and Kishi A., Gut; 34; pp. 732-737 (1993).
18. Ellman G., Courtney K., Andres V. and Featherstone R.; Biochem. Pharmacol.; 7; pp. 88-95 (1961).
19. Lowry O., Prosebrough N., Farr A. and Randall R.; J. Biol. Chem.; 193; pp. 265-275 (1951).

Table 1: Effect of eserine sulphate and molsidomine on AChE activity of rabbit brain, S, A, B and C, Corresponding to controls

Effectiveness	Brain	S	A	B	C
Control (Activity U/mg)	4.217±0.457 (n=6)	0.647±0.272 (n=8)	1.016±0.38 (n=9)	1.87±1.026 (n=9)	1.551±0.852 (n=9)
I (Activity U/mg)	1.171±0.453 (n=6)	0.261±0.088 (n=6)	0.487±0.12 (n=6)	0.515±0.101 (n=5)	0.455±0.092 (n=6)
Inhibition %	72.25% (**S)	59.81% (**S)	52.06% (**S)	72.66% (**S)	70.66% (**S)
R (Activity U/mg)	4.229±0.411 (n=6)	0.772±0.315 (N=7)	0.892±0.315 (n=5)	1.572±0.175 (n=6)	1.411±0.387 (n=6)
Activation % ▲	0.28% N.S	19.32 % N.S	-12.20% N.S	-15.93% N.S	-9.02% N.S
I+R (Activity U/mg)	5.222±0.739 (n=7)	0.684±0.195 (n=7)	1.305±0.715 (n=7)	3.023±1.567 (n=7)	1.276±0.379 (n=7)
Reactivation % ▲	345.94% (***)S	162.07% (**S)	167.96% (*S)	486.99% (**S)	180.43% (**S)
R+I (Activity U/mg)	3.967±0.756 (n=8)	0.798±0.191 (n=7)	1.708±0.727 (n=8)	2.787±1.172 (n=7)	1.323±0.245 (n=7)
Reactivation % ▲	238.77% (***)S	205.74% (**S)	250.72% (**S)	441.16% (**S)	190.76% (***)S

Data are presented as the mean  $\pm$ S.D. Student's t-test and ANOVA test were used to test the significance. The negative signs in activation % refer to the percentage of negative activation of enzyme respect to the free enzyme. I = Eserine sulphate; R = mlsidomine.

(\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $0.0001 < p < 0.001$ ; (\*\*\*)  $p < 0.00005$

S = significant; N.S = Nonsignificant. = Significancy is respect to inhibited enzyme.

Reynolds J.; Matridale, the  
extrapharmacopeia 30th ed.;The  
Pharmaceutical Press-London. (1993).  
0. Hakansson H.; Acta Neurol-Scand.  
Supp.; 149; pp. 7-9 (1993).  
1. Hryhorenko L., Woskowska Z. and Fox  
Threlkeld J.; J. Pharma. Ex. Ther.; 271(2);  
pp. 918-926 (1994).

22. Wiklund C., Olgart C., Wiklund N. and  
Gustafsson L.; Br. J. Pharmacol.; 110, pp.  
833-839 (1993b).  
23. Kilbinger H.; J. Klein and K. Ioffelhos  
(Eds), 109; pp. 219-224 (1996)  
24. Sorensen K., Gentinetta R. and Brodbeck  
U.; J. Neurochem. 39(4), pp. 1050-1060  
(1982).

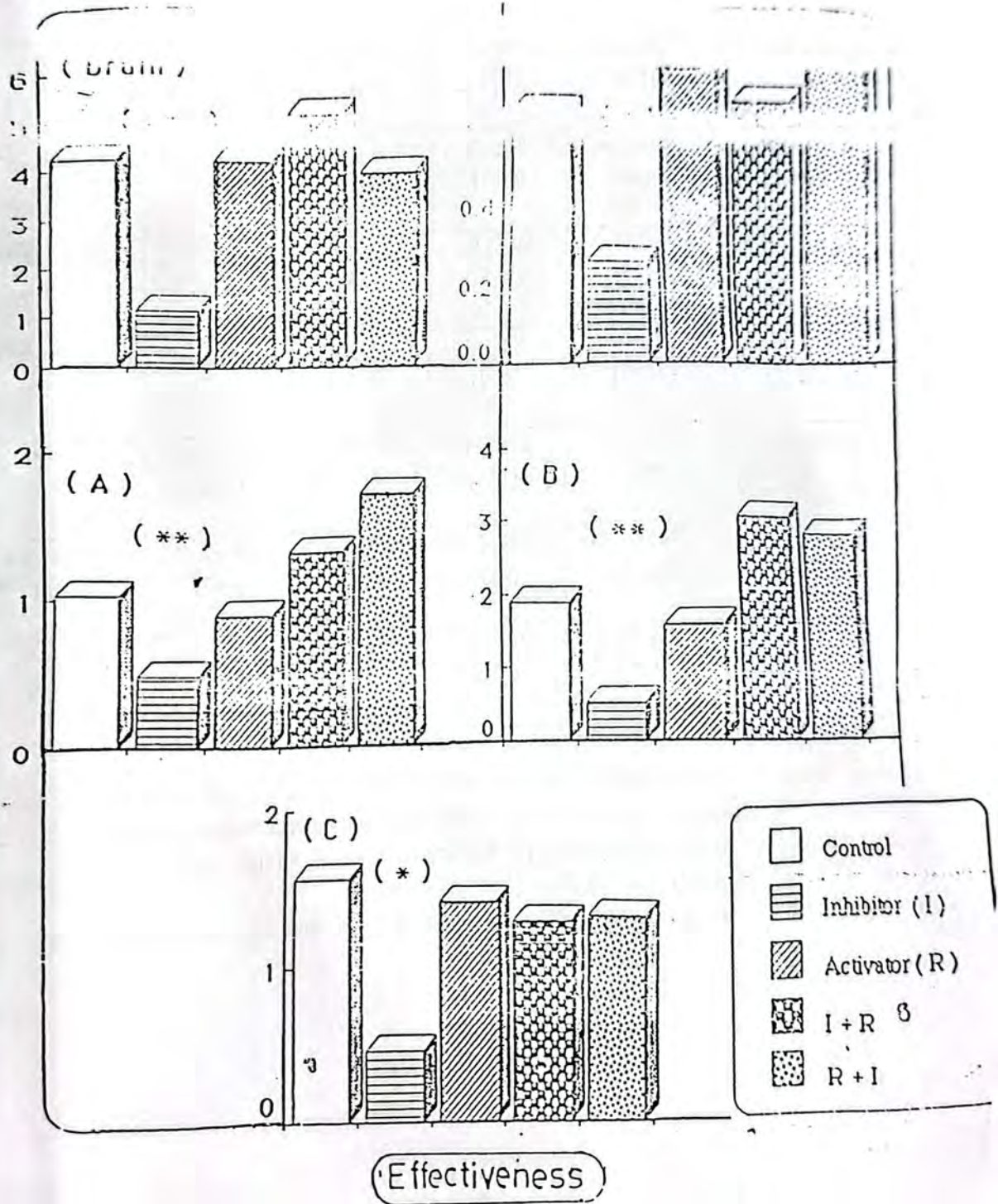


Figure 1: Activity of rabbit brain, S,A,B and C AChE and the effect of each of eserine sulphate and molsidomine either separately or in combination (\*) P,0.01; (\*\*)p<0.005

## Preparation of Oxalic Acid from Local Plant

KHALIL KHALF ABID

Chemistry Department, College of Science, Al-Mustansiriyah University

(Received March 16, 1997, Accepted Nov. 1, 1997)

### الخلاصة

يمكن تحضير حامض الأوكزاليك وبنسبة ناتج عالية وبتكاليف قليلة من خلال أكسدة بعض المخلفات النباتية المتواجدة مثل قصب النخلة، سيقان الخروع، اليوكالبتوس والصنوبر. باستخدام حامض النيتريك المركز وبوجود فترات الامونيوم كعامل مساعد. حامض النيتريك المستخدم يمكن استرجاع معظمه من خلال امتصاص وأكسدة الغازات الناتجة من عملية الأكسدة.

### ABSTRACT

Oxalic acid can be prepared in high yield with low cost by oxidation of some local plant dust "corn, castor, pine tree and eucalyptus", with conc. nitric acid in the presence of ammonium vanadate as a catalyst. Most of nitric acid used in the oxidation can be recovered by absorption and oxidation of the nitrogen oxide gases been evolved from the preparation process.

### INTRODUCTION

Oxalic acid is one of the dicarboxylic acid with the formula  $(\text{COOH})_2$  for the anhydrous form, m.p 187C, and the dihydrate form  $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , m.p 101 C. Oxalic acid crystallizes from water as the dihydrate, but readily loses its water of crystallization when heated rapidly. Its solubility in water increases with temperature. The pure crystals are of white colour, odorless and hygroscopic. Soluble in alcohol, insoluble in benzen.

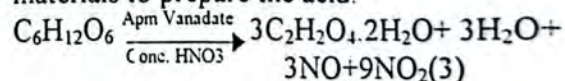
The acid has different industrial applications, some of them are; metal cleaning, textiles, dyeing, metal treatment, oxalate coating and in the preparation of phenolic resins. Moreover it can be used instead of sulfuric acid in the preparation of super phosphate fertilizers<sup>(1)</sup>.

There are three main processes in the preparation of oxalic acid which are<sup>(2)</sup>:

1. Fusing carbohydrates with sodium hydroxide.

2. Oxidation of carbohydrates by conc. nitric acid.
3. Reaction between sodium hydroxide and carbon monoxide.

We neglected the first and the third processes because of their high cost, and accordingly we chose the second process because it is less costly, and we can use local materials to prepare the acid.



In this process it is possible to recover the nitric acid by oxidation of the collective nitrogen oxide gases.

### EXPERIMENTAL

#### Raw Material

- a. Nitric acid; chemical pure concentrated 70%
- b. Carbohydrate wastes, which should be reduced to a fine dust of 20-30mesh. The material was dried overnight in an air oven at

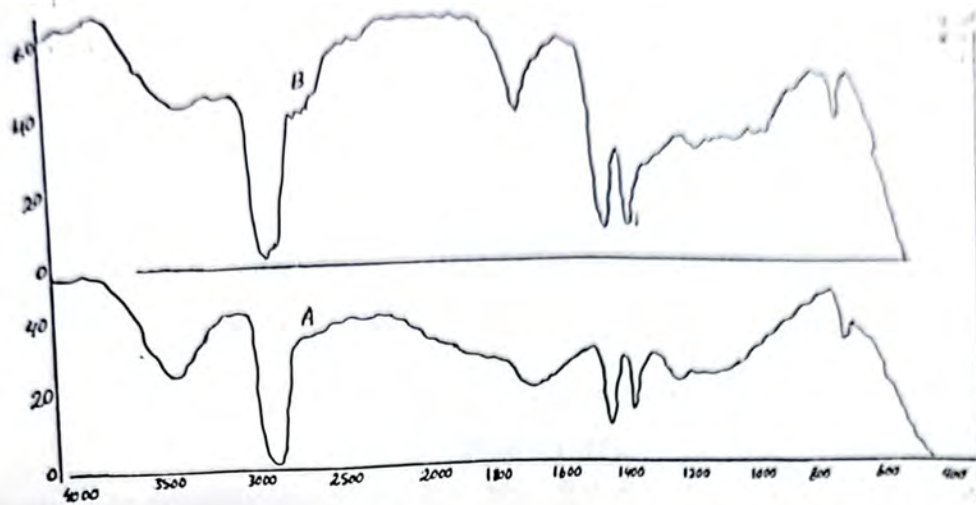


Figure 1: I.R. Spectrum of Oxalic Acid by using Nujol

A) Control

B) Acid produced from Oxidation

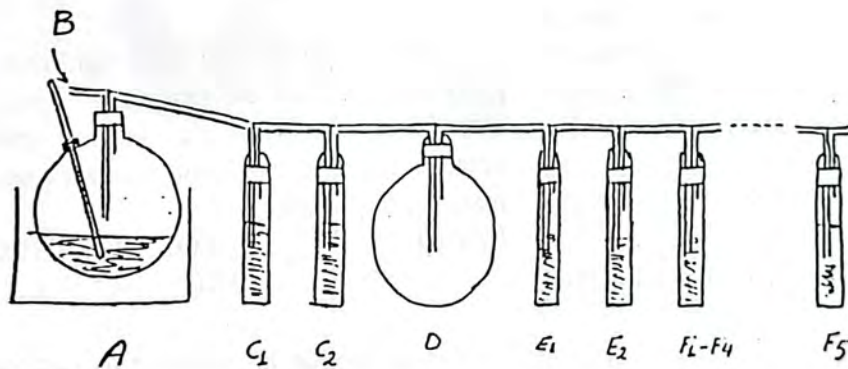


Figure 2: Recovery of nitric acid

100c° four local plant were used which had the following typical analytical figures

1. Corn cans, hemicelluloses 41%, celluloses 32%, lignin 22%
  2. Castor legs, hemicelluloses 42%, celluloses 35%, lignin 20%
  3. Pine treelegs, hemicelluloses 30%, celluloses 34%, lignin 35%
  4. Eucalyptus legs, hemicelluloses 28%, celluloses 30%, lignin 38%
- C. Ammonium vanadate

Twenty five grams of dried castor legs dust placed in a three necked round bottomed flask and to it was added 200gm of conc. nitric acid in small portions with 0.003% of the catalyst "ammonium vanadate". The reaction is exothermic, so the temp. should not be exceed 90c°. After 3hrs the reaction is finished, and the mixture was cooled to room temp. and filtered the precipitate "20gm" is oxalic acid dihydrate. m.p is about 101 c°

Some procedure was carried out for the other plants. and the best yields were obtained from 25gm of the carbohydrate materials been used in the reaction were as follows:

	yield
1. corn cans	75%
2. castor legs	80%
3. pine tree legs	80%
4. eucalyptus legs	80%

In the absence of catalyst, oxalic acid yields are about 8gm "32%", increasing of the catalyst conc. reduced the yield of the product.

#### Spectroscopic Studies

The I.R. spectrum of resulting acid was quite close to that of standard material "see figure 1". Strong broad band  $\sim 3000\text{cm}^{-1}$  for O-H stretching, the C=O band is at  $1700\text{cm}^{-1}$ , while O-H bending band at  $1420\text{cm}^{-1}$  and C-O stretching band at  $1240\text{cm}^{-1}$ . The physical properties e.g. m.p. and solubility were consisted with reported properties for oxalic acid.

#### Recovery of Nitric Acid

During oxidation of the carbohydrate materials nitrogen gases evolved from the reaction. These gases were bubbled under its own pressure through a series of flasks. These gases can be converted to nitric acid by oxidation procedure as shown in fig. 2

A represents the main reactor, while C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> were filled with water to absorb the gases. D left empty, the water filled again in E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, while KmnO<sub>4</sub> solution in concentration of 4% been used in F<sub>4</sub>. All containers in the system were connected to a vacuum pump in order to pull the gases from the main reactor and to allow for the air to enter from B hole. When the reaction been complete, the solution in the containers E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> been collected the lost nitric acid is largely converted into nitrogen dioxide, which in the presence of air, it is absorbed in water as nitric acid without the formation of nitrous acid.

Low concentration of the nitric acid been gained can be concentrated afterword by other processes<sup>(4)</sup>.

#### REFERENCES

1. Faith, Keyes and Clardk: Industrial Chemicals, 3rd edition, 549, John Wiley and Sons. Inc. N.Y. (1965).
2. Othmer D.F. and Jacobs J.J. "Oxalic acid from sawdust" Industr. Engng. Chem., 34 262 (1942).
3. Kirk-Othmer, Oxalic acid Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd edition, 365 John Wiley and Sons. Inters N.Y. (1967).
4. Bailey R.W. "The production of oxalic acid from New Zeland plant wastes" J App. Chem. 4, 549, October (1954).

## State of the Art for Simulation of Natural Treatment of Waste Water in an Open Channel

NARJIS D. SHEBEEB AND \*\*FARIS J.M. AL-IMARAH

\* Computer Science Unit, College of Law, University of Basrah

\*\* Marine Science Centre, University of Basrah, Basrah-Iraq

(Received March 7, 1998; Accepted Oct. 4, 1998)

### الخلاصة

تم استقراء تراكيز المحددات البيئية الملوثة في قناة تصريف مفتوحة من معمل الاسمدة عند اطوال مختلفة حتى نقطة التصريف في خور الزبير. استخدم نموذج رياضي لحساب طول القناة المقترحة للمعالجة الطبيعية للمياه المصرفة بمساعدة الحاسبة والطرق الرياضية الملائمة لحساب وخرن القيم التي يمكن استخدامها للسيطرة على تلوث مياه التصريف الصناعية. من خلال استخدام الحاسب يتم الحصول على مخرجات بيئية رسوم بيانية تتيح للباحث فرصة التوصل الى افضل استقراء من اجل بناء نموذج يقرب النظام من النتائج المضمونة والتي تتلائم مع القيم المعطاة من الاستقراء بالحساب الرياضي اضافة الى الدقة والسرعة في استخدام الحاسب.

### ABSTRACT

The concentrations of environmental polluted parameters in the effluent discharge by an open channel from fertilizer factory have been predicted at different outlet lengths until its discharge point at Khor Al-Zubair. Modeling has been used to compute proposed length of the channel for natural treatment of waste water, and to assess the relative merits of computer and mathematical procedures which might be used to control pollution in industrial discharge waste. By using the computer, immediate output in a graphical form permit the analyst to seek for more simulation and verification results to build a model to bring it to the guaranteed results to fit the values given by a mathematical computation of the simulation.

### INTRODUCTION

The pollutants from industries are treated by chemical, biological or physical processes. The existing pollutants in an open field under certain weather conditions could be treated naturally due to the effects of temperature, light, microorganisms...etc. This situation could be handled mathematically by employing a model of treatment depending upon simulation. The limit of this treatment can be estimated by processes which must be included in either a deterministic or empirical model depending to some degree on the

nature of the problem of interest<sup>(1)</sup>. However, achievement of the desired prediction might require inclusion of other terms. It is possible to describe a process in terms of the physical mechanisms within the process rather than by some empirical relationship between cause and effect.

Experimental results need a mathematical simulation for the approval of activity limit in the treatment and investigation requirements for improvements<sup>(2)</sup>.

Researchers must access to easy means of solving questions once the

questions have been properly formed. For instance, the equation described below my fit solving the studied problem of pollution<sup>(3)</sup>

$$\frac{dC}{dL} = -KC \quad \dots (1)$$

where K= decay coefficient which depend upon many factors among them are light, temperature, diffusion, wind, flow rate micro-organisms, ... etc.

C= concentration of degradable constituent at any given L value

and L= length of discharge channel

This expression has been found useful in most environmental pollution applications<sup>(3)</sup>. The solution of eq. 1 is given by

$$C = C_i e^{-KL} \quad \dots (2)$$

where C<sub>i</sub> = initial concentration of any constituent at L = 0.

In order to make the solution acceptable for the formulation of the problem, tables should be provided to hold the calculated values of the pollutants given by the analyst, and which also be important to the use of computer for simulation<sup>(4)</sup>. The simultaneous solution of equation and immediate output in graphical form require the speed and storage capacity of the digital computer<sup>(5)</sup>.

Looking for a suitable length of the open channel, the state of art appears to be further advanced to give several situations for which lengths can be estimated. Extensive field studies are required in order to obtain enough data for a simultaneous determination of the K's coefficients which were found to be extremely variable. So the equation along with the boundary conditions constitute a model of the system.

## METHOD

The model of the system of evaluating an accurate and suitable length of an open channel for natural treatment of waste water is based on the solution of eq.1 which is given by eq.2 depending upon the initial

concentration C<sub>i</sub> of each parameter at the beginning of the discharge channel.

The solution of the problem is started by establishing tables of two-dimension to hold the values of concentrations of chosen parameters mainly ammonia, nitrate, nitrite, urea and biological oxygen demand (BOD) representing the main constituent of fertilizer factory waste. They have been adopted from previous study during two seasons, summer and winter<sup>(6)</sup>.

A written program has been made to predict different values of C (i.e. concentration) at certain lengths of the discharge channel, and accordingly the calculated values were compared with experimental ones.

The use of real time and graphical display are advantageous to enhance the results, also the built-in computer programmes for rapidly converting vast arrays of digits to graphical form or vice versa.

## RESULTS

The decay constant which is expected to be a function of temperature, light flux, flow rate of the discharge channel and other factors depending upon each pollutant have been simulated and used throughout the calculations. The major factor taking in consideration in this study mainly affecting the estimated K's is the temperature neglecting other factors.

The predicated (calculated) concentrations of pollutants in the discharge waste from fertilizer factory gained from a built-in programme based upon eq.1 and its solution eq.2 are listed in Table 1 together with the experimental values measured for two temperatures during summer and winter.

Although, the model employed is exponential, for reliable comparison, tabulated values for studied pollutants are plotted as a function of discharge lengths of the channel by employing a linear fit and shown in figures 1 (A-E).

## DISCUSSION

Most of computational studies of pollution in an open sea concerned with effects of physical conditions upon diffusion and turbulence which are represented as major factors affecting the distribution and transportation of pollutants. The situation is different in an outlet shallow channel of one direction in which diffusion is limited.

When designing an industrial discharge one has to select such an outlet length that harmful concentrations in the effluent do not reach the water resources.

Processes affecting the reduction of the contaminant admixture may be of different factors, many of these, such as photooxidation, biodegradation, diffusion<sup>(7)</sup>... etc. are most important in all stages of distribution and transportation of waste discharge in any field. These factors could be handled experimentally or theoretically.

Universal solutions in attempts to find accurate measurements have encountered with certain difficulties:

1. Numerical solutions require simultaneous treatment of many variables all of which vary with time and are interdependent.
2. The nonlinearity of any process, which may lead to different errors.

These complex problems have been handled by computational models<sup>(8)</sup> in which the expression in eq.1 has been used and found useful in the open discharge channel where it is concerned with the effect of temperature as a major factor.

For simulation of any system, greater advantages are provided when there are only few dependent variables and demand for accuracy are not high. The results of manipulation of concentration in the channel showed an immediate output in a graphical form which allowed a considerable flexibility in simulation and verification.

The estimated values of  $K$  vary with temperature. It is higher at summer for pollutants affected by temperature and photooxidation such as  $NH_3$ ,  $NO_2$  and  $NO_3$

while the reverse is true for BOD which could be affected by different factors

For both experimental and calculated concentrations of studied pollutants, it is convenient to plot them linearly against length of the channel. Eventhough, the calculated values did not coincide with experimental ones, the graphical forms showed a coincidence in the shape of decay between experimental and calculated values, hence, factors other than temperature should be taken into consideration. These results will make the situation easy for the analyst to govern which length is the best to choose for application.

The outlet effluent from fertilizer factory contributes to about 80% nitrogen compounds discharge into Khor Al-Zubair. They reduce in concentration along the channel, when reaching the discharge point they become very low, and further reduction is taking place due to mixing with Khor Al-Zubair water which has a high dilution factor<sup>(6)</sup>.

The suggested model is applied for the pollutants at any point of the discharge channel, while in Khor Al-Zubair (after a length of 7km) the properties will change completely, hence another model should be applied depending upon any variable such as time, distance ...etc.

In conclusion for a case of continuous release of industrial effluents into water way shoreline:

1. Despite the physical nature of the shoreline, concentrations of pollutants should be comparable or less at the discharge point.
2. Selection of outlet length in which shoreline concentration do not exceed the threshold value (THV).
3. Test results show that this model can be used for computation of pollutant concentrations at any given length during the suggested channel only.
4. Level of any pollutant could be predicted at a certain point of outlet length (discharge channel) aided by certain informations.

C O N C E N T R A T I O N ( p p m )

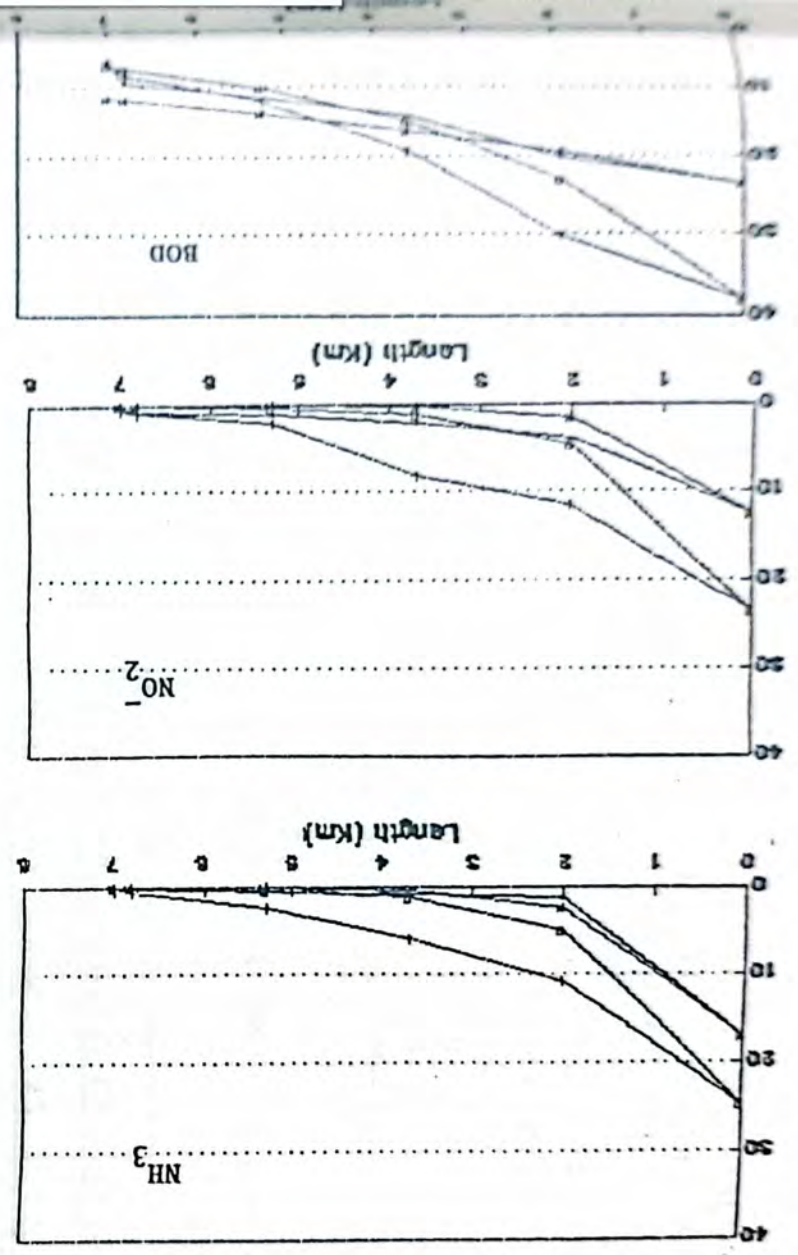
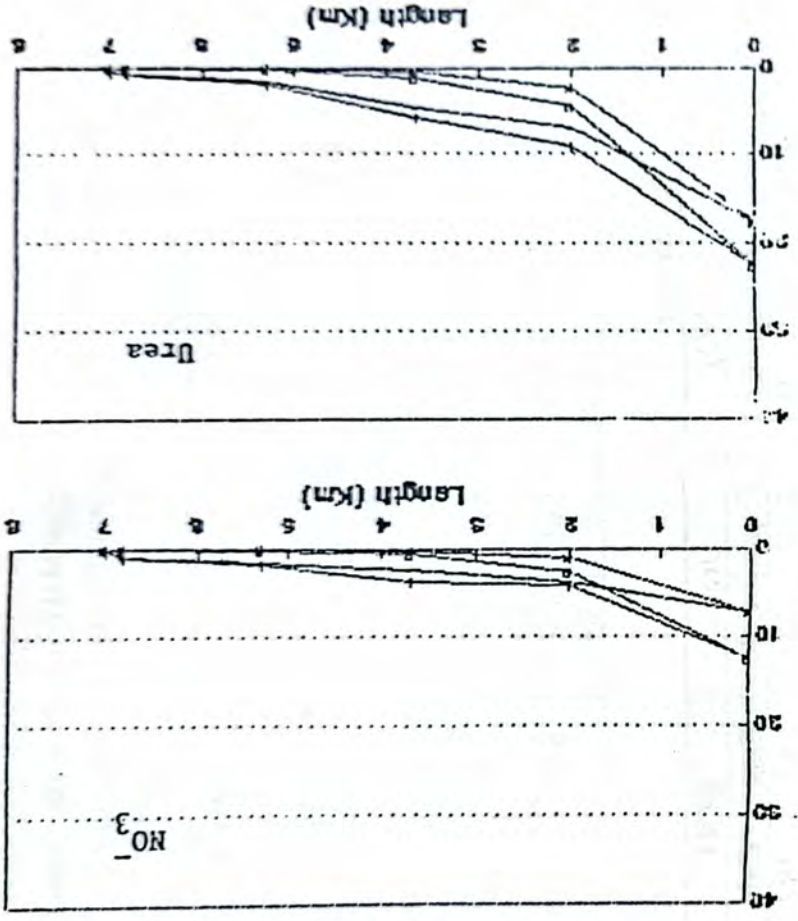


Fig.1. Concentration decay as a function of length in the discharge channel. (•) Experimental & (o) Calculated during Summer, (Δ) Experimental & (▽) Calculated during Winter.



5. Industrial measurements are primarily motivated to clean up pollutants, therefore, mathematical simulation techniques should be available for economic analysis.

Table 1: Experimental and calculated values in ppm for environmental pollutants in the channel of Fertilizer waste effluent at different lengths for two seasons, summer and winter.

Summer										
Length Km	NH <sub>3</sub>		NO <sub>3</sub>		NO <sub>2</sub>		Urea		BOD	
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
0	17	17	7.2	7.2	12.5	12.5	17.6	17.6	23.8	23.8
2	1.2	2.3007	3.8	0.9744	4.0	1.6916	7.14	2.3819	20.2	19.49
3.7	0.88	0.4203	2.46	0.1780	2.1	0.3070	4.82	0.4351	14.28	16.44
5.3	0.56	8.4857 E-02	1.6	3.5939 E-02	1.2	6.2394 E-02	1.52	8.7852 E-02	11.6	14.01
6.8	0.22	1.9934 E-02	0.02	8.0191 E-03	0.01	1.3922 E-02	0.01	1.9602 E-02	9.5	12.06
7	0.04	1.5501 E-02	0.02	6.5655 E-03	0.01	1.1398 E-02	0.01	1.6049 E-02	6.33	11.81

Winter										
Length Km	NH <sub>3</sub>		NO <sub>3</sub>		NO <sub>2</sub>		Urea		BOD	
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
0	24.75	24.75	12.63	12.63	23.5	23.5	22.6	22.6	38.3	38.3
2	10.8	4.9969	4.2	2.54	11.6	4.7445	9.2	4.5628	30.2	23.23
3.7	6.0	1.2825	3.7	0.6544	8.36	1.2177	6.0	1.1711	19.3	15.19
5.3	2.46	0.3565	1.8	0.1819	2.2	0.3385	2.0	0.3256	12.1	10.18
6.8	0.57	0.1074	0.98	5.4807 E-02	1.0	0.1019	0.9	9.8072	8.2	6.99
7	0.11	9.1522 E-02	0.45	4.6704 E-02	0.56	8.6899 E-02	0.61	8.3571 E-02	6.0	6.65

REFERENCE

1. J.H. Mathews. Numerical methods for computer science, engineering, and mathematics. Prentice-Hall International Edition. California State University, Fullerton, pp 173-180, (1987).
2. S. Baase. Computer algorithms introduction to design and analysis. Addison-Wesley Publishing Company. San Deigo State University, pp. 99-107, (1978).
3. D.J. Baumgartner and R.J. Callaway. "State of the art of simulation of pollution problems and controls in estuaries". Marine Pollution and Sea Life, M. Ruivo (Ed.), Fishing News Books Ltd., Surrey, pp. 140-146 (1972).
4. R.J. Baron and L.S. Shapiro. Data structures and their implementation. Van Nostrand Reinhold/ University Computer Science Series. Litton Educational Publishing, Inc. pp. 268-287, (1980).
5. T.K. Abdel-Hamid and S.E. Madnick. "The dynamics of software project scheduling", Communications of the ACM, 26(5), pp. 340-346, (1983).
6. F.J.M. AL-Imarah, M.K. Al-Asadi, S.Y. Mutter and I.D. Issaq. "Evaluation of the effect of industrial effluent waste upon Khor Al-Zubair environment". Special Report, Marine Science Centre, University of Basrah, 45 p., (1996).

7. O.C. Zafiriou. "Marine organic photochemistry previewed". Mar. Chem 5 pp. 497-522 (1977).
8. P.M. Wolf, W. Hansen and J. Joseph. "Investigation and prediction of dispersion of pollutants in the sea with hydrodynamical numerical (HN) models". Marine Pollution and Sea Life, M. Ruivo (Ed.), Fishing News Books Ltd., Surrey pp. 146-150, (1972).

## Effects Of The Effective Charge ( $Z^*$ ) On The Corrections Of Bethe's Formula

KHALID A. AHMAD, NADIA A. AL-BANNA\*  
 Department of Physics, College of Science, Al-Mustansiriya University  
 \*Department of Physics, College of Science, Baghdad University

(Received Oct. 6, 1998 ; Accepted Jun. 27, 1999)

### ABSTRACT

The effects of the effective charge ( $Z^*$ ) on the corrections of Beth's formula ( $L_1$ ,  $L_2$  and  $C/z_2$ ) have been studied theoretically in the case of the penetration of energetic heavy charged particles, such as ( $\alpha$ -particle with energy range (0.9 to 3MeV), heavy ions ( $Z>4$ ) like (Ne, Cu, Ar, Kr) with energy range (2 to 13 Mev), heavy and light fission fragments of  $Cf^{252}$  ( $H_2$ , He, O<sub>2</sub>, Ne, Ar, Kr, and Be) and cpmounds (CH<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>, CO<sub>2</sub> and CF<sub>4</sub>). A semi-empirical equation have suggested to calculate the effective charge parameter ( $\gamma$ ) for the interaction of  $\alpha$ -particles and heavy ions in gaseous, similar to the formula of the solid targets. A comparison between our results and experimental worker show a good agreement, when we take in the consideration the effects of the effective charge ( $Z^*$ ).

### الخلاصة

أن تأثير الشحنة الفعالة على التصحيحات في معادلة بيتا ( $L_1, L_2, C/2$ ) درست نظرياً في حالة نفاذ الجسيمات المشحونة الثقيلة مثل (جسيمات الفا بمدى طاقات (0.9 - 3MeV) والايونات الثقيلة ( $Z>4$ ) مثل (Ne, Cu, Ar, Kr) بمدى الطاقات (2-13 KeV) وشظايا الانشطار الخفيفة والثقيلة المنبعثة من عنصر  $Cf^{252}$  بمدى (80-106KeV) في الاهداف الغازية ( $H_2, He, O_2, N_2, Ar, Kr, Be$ ) والمركبات الغازية ( $CH_4, C_4H_{10}, CO_2, CF_4$ ). اقترحت معادلة شبه تجريبية لحساب معامل الشحنة الفعالة ( $\gamma$ ) لتفاعل جسيمات الفا والايونات الثقيلة في المواد الغازية. تمت المقارنة ما بين هذه النتائج مع النتائج لباحثين اخرين واعطت المقارنة تطابق جيد عندما أخذت الشحنة الفعالة بنظر الاعتبار.

### INTRODUCTION

When a heavy charged particles interact with matter, they loss energy by electronic collisions; (collisions with atomic electrons) and by nuclear collisions; (collisions with atoms) in the velocity region  $v \leq 2v_0Z_1$ , where  $v_0$  is Bohr velocity and equal  $2.1856 \times 10^6$  m/s.

The atomic charge of incident heavy charged particles is less than the atomic number ( $Z_1$ ) because of the capture and loss of electrons in collisions, so that we have to replace the atomic number ( $Z_1$ ) by its

effective charge ( $Z_1^* = \gamma Z_1$ ) where ( $\gamma$ ) is the effective charge parameter.

Northclife<sup>[1]</sup> and Ziegler<sup>[2]</sup> assumed that the stopping cross-section ( $S$ ) proportional with ( $Z_1^{*2}$ ), so that for proton ( $S_P$ ) and heavy ion ( $S_{HI}$ ) at the same velocity interact with the same target satisfy the following equation :

$$S_{HI} = S_P Z_{HI}^{*2} = S_P (\gamma_{HI} Z_{HI})^2 \quad (1)$$

Where the effective charge of hydrogen ( $\gamma=1$ ) i.e ( $Z_P^* \rightarrow 1$ , is fully stripped). Anthony<sup>[3]</sup> suggests a semi-empirical formula to calculate the effective charge

parameter for solid targets with atomic number  $Z_1$ .

$$\gamma = 1 - A \exp(-\lambda v/v_0 Z_1^{2/3}) \quad (2)$$

where

$$A = 1.16 - 1.91 \times 10^{-3} Z_2 + 1.26 \times 10^{-5} Z_2^2$$

and

$$\lambda = 1.18 - 7.5 \times 10^{-3} Z_2 + 4.53 \times 10^{-5} Z_2^2 \quad (3)$$

where

$Z_2$  is the atomic number of the target.

The propose of the present work is to find the parameters of a semi-empirical formula similar to equation (2) for gaseous targets and to study the effects of the effective charge ( $Z_1^*$ ) on the corrections of Beth's formula ( $L_1$ , Barkas effect), ( $L_2$ , Bloch correction) and ( $C/Z$ , shell correction).

#### Semi-Empirical Forumla of ( $Z^*$ ) For ( $\alpha$ -Particle, Heavy Ions ( $Z$ )4) And Fission Fragments In Different gaseous.

To find the parameters ( $A$  and  $\lambda$ ) of equation (2), a computer program (ZEEF) has been wirtten in FORTRAN-77 based on the least square method<sup>[4]</sup>, using experimental data for stopping cross-section of heavy charged particles with atomic number ( $2 \leq Z_1 \leq 36$ ) in gaseous together with eqs. (1) and (2). The parameters ( $A$  and  $\lambda$ ) are given below:

$$A = 1.293 - 0.0703 Z_2 + 0.365 \times 10^{-2} Z_2^2 - 0.4722 \times 10^{-4} Z_2^3$$

$$\lambda = 1.199 - 0.440 \times 10^{-1} Z_2 + 0.2193 \times 10^{-2} Z_2^2 + 0.2805 \times 10^{-4} Z_2^3 \quad (4)$$

and for the interaction of heavy ions with ( $Z_1 > 36$ ) like fission fragments emitted from  $Cf^{252}$ , the parameters ( $A$  and  $\lambda$ ) are given by :

$$A = 1.707 - 0.2922 Z_2 + 0.402 \times 10^{-1} Z_2^2 - 0.1416 \times 10^{-2} Z_2^3$$

$$\lambda = 2.9237 - 0.9404 Z_2 + 0.1266 Z_2^2 - 0.4355 \times 10^{-2} Z_2^3 \quad (5)$$

#### The Corrected Bethe's Formula

The theoretical energy loss or stopping power for the interaction of heavy charged particles with matter has been derived by Bethe's formula<sup>[3]</sup>.

$$(dE/dX) = -N.S = -N.Z_2 \frac{4\pi^4 Z_1^2}{mn^2} L \quad (6)$$

where ( $L$ ) is the stopping number depends on the velcity of incident ion and on the material of the target, expressed as follows :

$$L = L_0 + Z_1 L_1 + Z_1^2 L_2 \quad (7)$$

Where ( $L_0$ ) is Born correction, ( $L_1$ ) represent Barkers effects and ( $L_2$ ) is Bloch correstions.

$$L_0 = \ln \left( \frac{2mv^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 - C/Z_2 \quad (8)$$

Where ( $I$ ) is the mean ionization potential, and  $C/Z_2$  is the shell correction from Ziegler<sup>[3]</sup>. ( $\beta = v/c$ ). Barkers correction  $L_1$  is calculated by Jackson and McCarthy ( $L_1^{JM}$ )<sup>[6]</sup>.

$$L_1^{JM} = \frac{F_1(V)}{Z_2^{1/2}} L_0 \quad (9a)$$

where  $V = v/v_0 Z_2^{1/2} (1-\beta^2)$  and the function  $F(V)$  is given by [6]. Barkers effects also calculated by Ashley et al ( $L_1^{ARB}$ )<sup>[7]</sup>.

$$L_1^{ARB} = \frac{k(b,x)}{x Z_2^{1/2}} L_0 \quad (9b)$$

where  $x = v^2/v_0 Z_2$  and the function  $k(b,x)$  i given in [7]. Lindhard<sup>[8]</sup> calculates th correction  $L_1^L = 2L_1^{JM}$  (9c)

Block correction  $Z_1^2 L_2$  will be explained in section (3.2), so that the corrected Bethe's formula becomes :

$$S = \frac{4\pi e^4 Z_1^2 Z_2}{mv^2} \left[ \ln \left( \frac{2mv^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 - \frac{C}{Z_2} \right] + Z_1 L_1 + Z_1^2 L_2 \quad (10)$$

To study the effects of the effective charge ( $Z_1^*$ ) on the corrections of Bethe's formula, eq. (7) becomes :

$$L = L + Z_1^* L + Z_1^{*2} L$$

**The Effects Of The Effective Charge ( $Z^*$ ) On The Shell Correction ( $C/Z$ )**

By using experimental data for stopping cross section  $S_{exp}$  and reduced stopping power ( $x$ ) from eq. (10) :

$$x = \ln \left( \frac{2mv^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 - \frac{C}{Z_2} \quad (11)$$

$$\text{And } x = \frac{C}{Z_2} + \ln(I) - Z_1 L_1 - Z_1^2 L_2 \quad (12)$$

$$\therefore \frac{C}{Z_2} = x - \ln(I) + Z_1 L_1 + Z_1^2 L_2 \quad (13)$$

The shell correction  $C/Z_2$  arises when the projectile velocity ( $v$ ) smaller than the orbital velocity of the bound electrons ( $v_0$ ), (i.e  $v \leq v_0$ ).

To study the effect of the effective charge, replace  $Z_1$  by  $Z_1^*$   
 $\therefore$  eqs. (12) and (13) become :

$$\frac{C}{Z_2} = X - \ln(I) + Z_1^* L_1 + Z_1^{*2} L_2 \quad (14)$$

and

$$\frac{C}{Z_2} = X - \ln(I) + \gamma Z_1 L_1 + \gamma^2 Z_1^2 L_2 \quad (15)$$

Where

$$\left( \frac{C}{Z_2} \right)_P = X_P - \ln(I) + \gamma_P L_1 + \gamma_P^2 L_2^2 \quad \left. \begin{array}{l} \text{(for proton)} \\ \text{and} \end{array} \right\} \quad (16)$$

and

$$\left( \frac{C}{Z_2} \right)_{He} = X_{He} - \ln(I) + 2\gamma_{He} L_1 + 4\gamma_{He}^2 L_2^2 \quad \left. \begin{array}{l} \text{(for helium)} \end{array} \right\}$$

We get some difference in calculation between eq (13) eq (14) and as shown in Fig(1). This means that the effective charge is better to be taken in the consideration.

**Effects Of The Effective Charge ( $Z^*$ ) On Bloch Correction ( $L_2$ )**

Bloch correction is the third of eq. (7) which treated the transition from the first Born approximation to classical scattering at lower velocities and obtained a correction to be the stopping function proportional to  $Z^*$  for velocity ( $v/v_0(2Z_1 Z_2)$ ).  $L_2$  is a function of ( $y = Z_1 v_0/v$ ).

$$\text{When } y < 1, L_2(y) = \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \zeta(2n+1) y^{2n} \quad (n = 1, 2, 3 \dots) \quad (17)$$

$$(Z_1^2 L_2)^L \sim 1.202 y^2 \quad \text{(Lindhard [8])} \quad (18)$$

Besenbacher et al<sup>[9]</sup> used an expression up to third order for comparison of low energy helium stopping powers with Bonderip's shell correction<sup>[10]</sup>.

$$L_2^B = -1.202 Y^2 + 1.037 Y^4 - 1.008 Y^6 \quad (19)$$

Bichsel<sup>[11]</sup> suggest the following formula :

$$(Z_1^2 L_2)^B = -Y^2 (1.20206 - Y^2 (1.042 - 0.8549 Y^2 + 0.343 Y^4)) \quad (20)$$

when ( $Y > 1$ ),

$$(Z_1^2 L_2) = -Y^2 \sum_{n=1}^{\infty} n^{-1} (n^2 + Y^2)^{-4} \quad \text{where } (n = 1, 2, 3,) \quad (21)$$

Effects of the effective charge ( $Z_1^*$ ) on the Bloch correction ( $L_2$ ) for the interaction of heavy ions and fission fragments, are shown in Fig.(2)

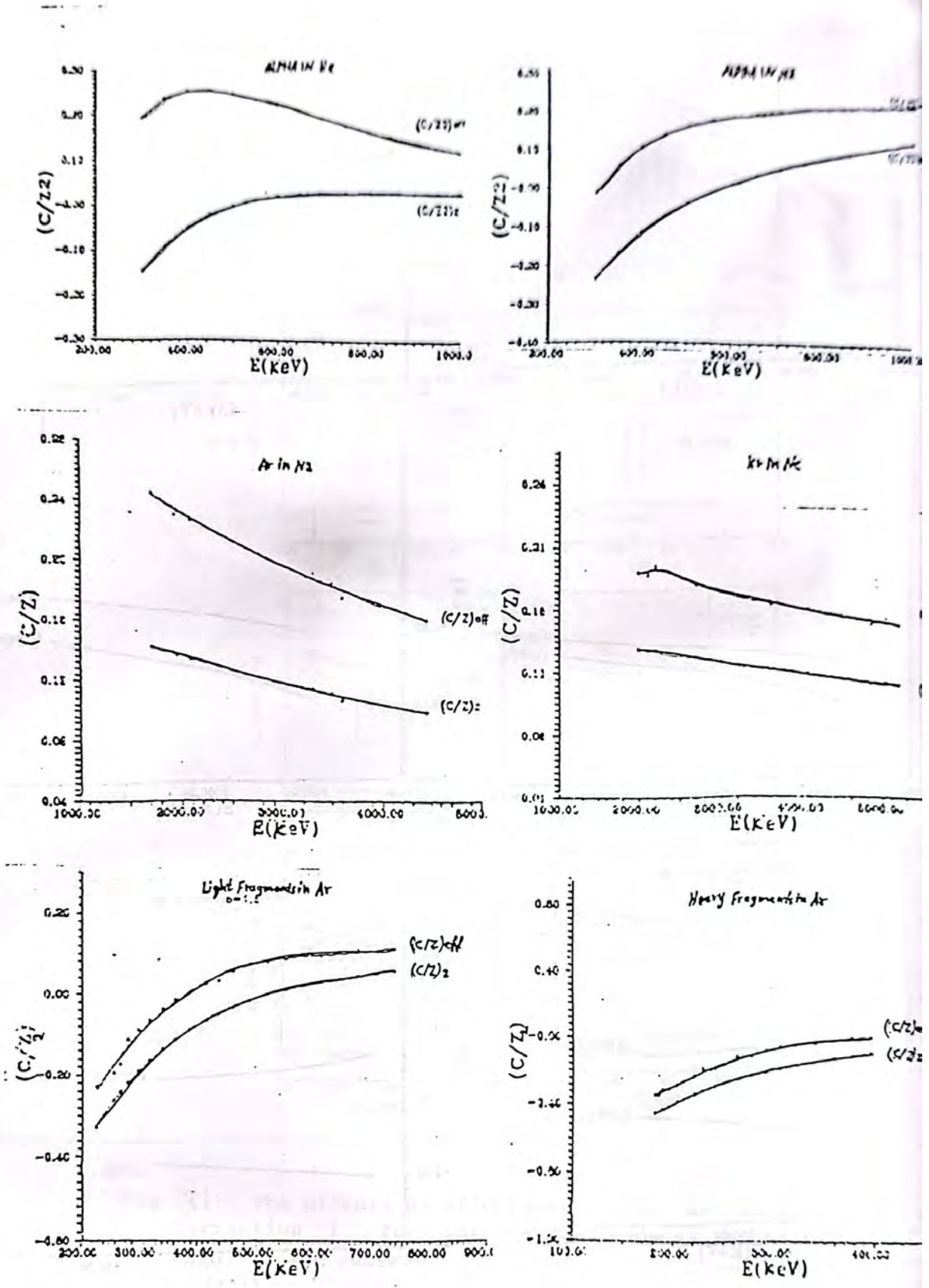


Fig.(1). The effects of effective charge on shell correction  $C/Z_2$  for the interaction of Alpha particle, Heavy ions ( $Z>4$ ) and fission fragments in gases.

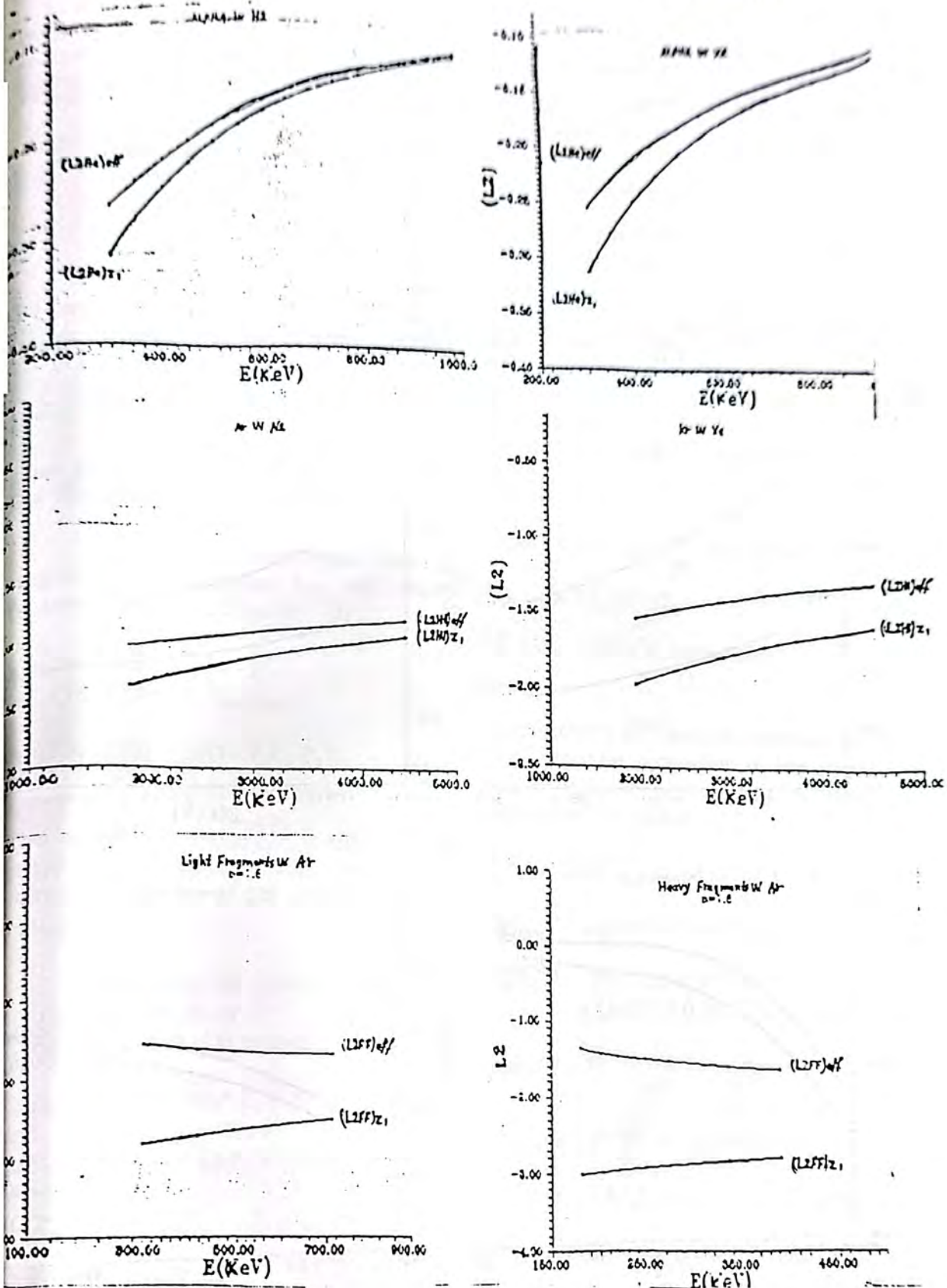


Fig.(2.) The effects of effective charge on Bloch correction  $L_2$  for the interaction of Alpha particle, Heavy ions ( $Z > 4$ ) and fission fragments in gases.

$L_1$  theor:  $\begin{cases} \text{---} & L_1 \text{ ARD} \\ \text{---} & L_1 L \\ \text{---} & L_1 J \\ \text{---} & L_1 \text{ Jeff} \end{cases}$   
 $L_1$  exp:  $\begin{cases} \text{---} & \text{Ricker} \end{cases}$

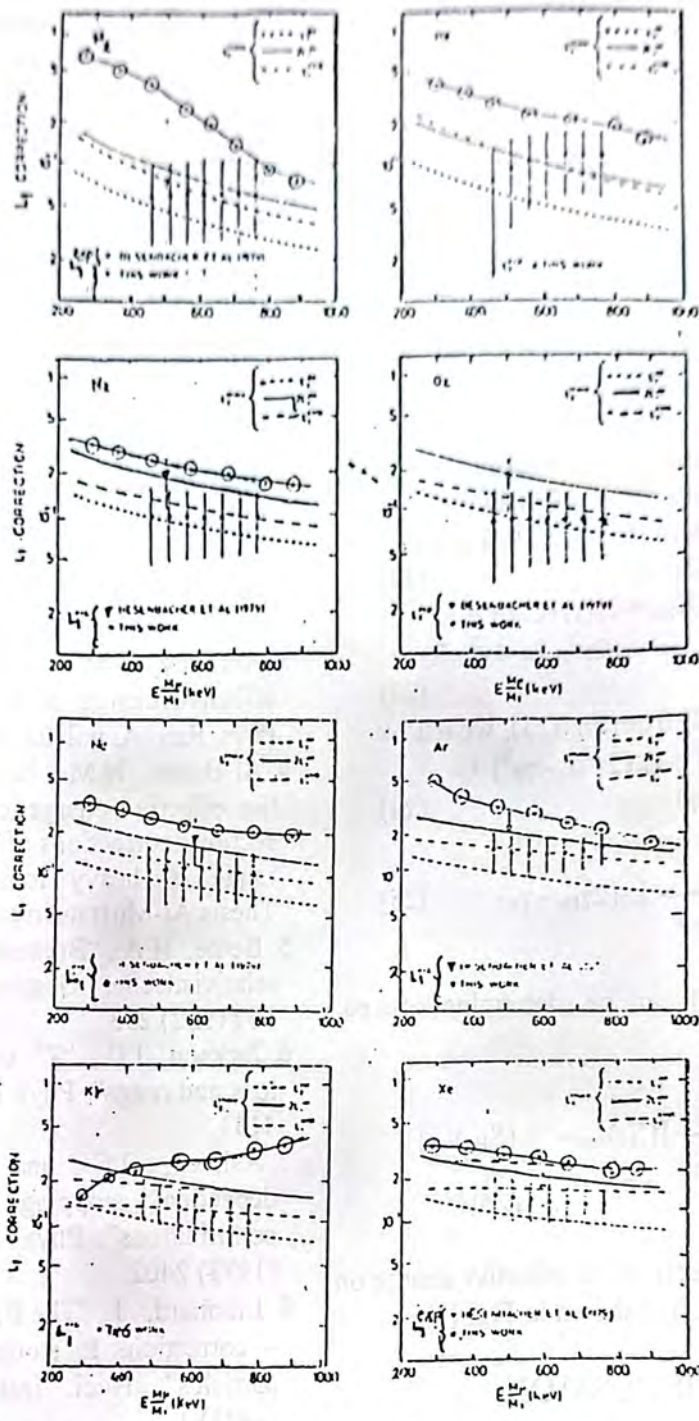


Fig. (3) The effects of effective charge on Barkas correction  $L_1$  for the interaction of Alpha particle in gases.

## Effects Of The Effective Charge ( $Z^*$ ) On Barkas Effect ( $L_1$ )

Barkas correction ( $L_1$ ) is represent by the second term of eq. (8). It's arise from the fact that there is an influence of the projectile charge on the electrons of the target atom or molecule resulting in a polarization of the target which influences the strength of the interaction.

This has been observed for th first time by Barkas<sup>[12]</sup> in range studies of  $\pi$  projectiles and later by Anderson<sup>[13]</sup> by comparing precisely the measured stopping cross sections of proton and helium.

For Proton  $X_P = \ln(I) + X/Z_2 - \gamma_P^2 L_1 - \gamma_P L_2$   
where ( $Z_1=1$ ) (22)

and for helium  $X_{He} = \ln(I) + C/Z_2 - 2\gamma_{He}^2 L_1 - 4\gamma_{He}^2 L_2$   
where ( $Z_1=2$ ) (23)

Subtract eq. (22) from eq. (23), we get  $\Delta X$ .  
 $\Delta X = (X_P - X_{He}) = L_1(2\gamma_{He}^2 - \gamma_P^2) + L_2(4\gamma_{He} - \gamma_P)$  (24)

$L_1 = \frac{\Delta X}{(2\gamma_{He} - \gamma_P)} - L_2(2\gamma_{He} - \gamma_P)$  (25)

$\Delta X = (X_P - X_{He})$  can be determine from eq. (11), where

$$\Delta X = \frac{mv}{4\pi e^4 Z_2 K^2} [(S_P)_{exp} - \frac{1}{4} (S_{He})_{exp}]$$
 (26)

The effects of the effective charge on Barkas effect ( $L_1$ ) is shown in Fig. (3).

## DISCUSSION

The effects of the effective charge ( $Z_1^*$ ) for heavy charged particles ( $\alpha$ -particles, heavy ions ( $Z > 4$ ) and fission fragments). Which interacts with gaseous have been studied carefully.

The parameters ( $A$  &  $\lambda$ ) of the effective charge parameter ( $\gamma$ ) for heavy charged particles ( $\alpha$ -particles and heavy ions with ( $Z_1 > 4$ ) interact with gaseous are

different from the parameters of the fission fragments with ( $4 < Z_1 < 36$ ). The effects of the effective charge ( $Z_1^*$ ) of ( $\alpha$ -particles and heavy ions  $Z_1 > 4$ ) on the results is small and becomes more significant for fission fragments. This means that it is important to take the effective charge ( $Z_1^*$ ) of the heavy cahrged particles in the consideration when calculate the stopping cross-section and the corrections of Bethe's formula ( $L_1, L_2, C/Z_2$ ).

## REFERENCES

1. Northcliff, L.C., passage of heavy ions through matter' Annual Review of Nucl. Science. Vol. 13 (1963) 67.
2. Ziegler, J.F., "Helium stopping power and tange in all elements (1978).
3. Anthony, J.M., "Stopping power and effective charge of heavy ion in solids", Phys. Rev. A. vol. 25 No. 4 (1982) 1868.
4. Al-Banna, N.M., "Studying the effect of the effective charge on the stopping cross section, corrections of Bethe's formula and range of heavy ions in gases". M.Sc. Thesis Al-Mustansiriyah University (1996).
5. Bethe, H.A., "Bremsfornal for elektronen relativistischer Geschwindikeit", Z-Physik 76 (1932) 293.
6. Jackson, J.D., " $Z^3$  corrections to energy loss and range", Phys. Rev. B vol. 6 (1972) 4131.
7. Ashlley, J.C. and Ritchie. R. " $Z^3$  dependent stopping power and range contributions". Phys. Rev. A. vol. 8 No. 6 (1973) 2402.
8. Lindhard, J., "The Barkas effect- $Z_1^3, Z_1^4$  - corrections to stopping of sift charged particles". Nucl. Inst. And Meth. 132 (1975) 1.
9. Besenbacher, F., "Stopping power of solid Argon for helium ions". Nucl. Inst. and Meth. 188 (1981) 657.
10. Bonderup, E. and Dan., K. "Stopping of swift protons evaluated from statistical atomic model", Vi dens selsk. Matt. Fys. Medd. 35 (1967) No. 17.
11. Bichsel, H., "The stopping of protons and alpha particles in  $H_2, He, N_2, O_2, CH_4$  and air", Phys. Rev. A25. No. 5 (1982) 2499.

12. Barkas, H., "Nuclear Research Emulations" (Academic Press, New York, (1963) vol. 1.
13. Andersen, H. H. and Ziegler, J.F., "Hydrogen : Stopping powers and ranges in all elements, Pergamon press, New York. (1977).

# Optical Properties of ZnO Thin Films As a Function of Thickness and Annealing

ABDUL MAJEED E. IBRAHIM

Physics Department, College of Education Al-Mustansiriya University

(Received April 13, 1999; Accepted July 3, 1999)

## الخلاصة

تم تحضير اغشية رقيقة من مادة اوكسيد الزنك ZnO بطريقة لترسيب الكيمياء الحراري وعلى قواعد زجاجية مسخنة الى درجة 600°C وكانت الاغشية المحضرة ذات سمك مختلف (1500, 2179, 2724Å). تم فحص التركيب البلوري للاغشية المحضرة من خلال دراسة نمط حيود الاشعة السينية اذ اظهرت نتائج الفحص ان الاغشية المحضرة ذات تركيب متعدد البلورات. كما تضمن البحث دراسة تأثير السمك وتأثير المعاملة الحرارية للاغشية المحضرة على كل من فجوة الطاقة الممنوعة وعلى الثوابت البصرية مثل معامل الامتصاص ومعامل الخمود.

## ABSTRACT

Thin films of ZnO are prepared by chemical deposition method with different thickness (1500, 2179, 2724Å). The prepared films were examined by X-Ray diffraction technique, which showed that all prepared films are polycrystalline. The effect of thickness and annealing on energy gap and optical constant were studied.

## INTRODUCTION

Zinc oxide is colorless material, its molecular weight is 81.37, the density of ZnO is (5.6)gm/cm<sup>3</sup> with melting point (1975)C°, this material is dissolved in acids and alkalies but it doesn't dissolve in alcohol<sup>(1)</sup>. It is decomposes at high temperature<sup>(2)</sup>.

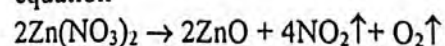
ZnO is a large band gap semiconductor (3.2-3.3) eV with high optical transmission values in the visible region. This material has hexagonal structure with lattice parameters (a=3.25)Å and (c=5.21)Å<sup>(2,3)</sup>. ZnO is an n-type semiconductor.

Nowadays the thin film studies are important because of their wide range of applications in technology. The films, which prepared in this study, were made by low cost technique. ZnO films were chemically

deposited using the spray pyrolysis technique, which is practically simple, fast, vacuumless, and low cost and consequently suitable for mass production.

## EXPERIMENTAL

Zinc oxide thin films were prepared by using aqueous solution of zinc nitrate Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, which prepared with molarity 0.1mol/liter by dissolving (7.436gm) of Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in (250ml) of distilled water with slowly dissolving using magnetic stirrer at room temperature. Using nozzle sprayer on to (350C°) heated glass substrates immediately sprayed the obtained solution. ZnO was obtained according to chemical equation



The resulting films were transparent, colorless, stable, and have very good adhesive properties.

Thicknesses of prepared films were measured by weight method using sensitive balance (mettler AE 160) with sensitivity ( $10^{-4}$ gm). The selected thicknesses were (2724, 2179, 1500)Å.

The structural characteristics of deposited films were studied by X-Ray diffraction using  $\text{CuK}\alpha$  radiation, which showed that ZnO thin films are polycrystalline and the values of interplaner spacing and intensity ratios are the same as those of ASTM data. Fig (1) shows the X-ray diffraction pattern ZnO films.

The prepared thin films were annealed at (600C°) for half an hour.

The absorbance and transmittance of films before and after annealing were measured by using Pu 8800-Uv/vis spectrophotometer and in the wavelength range (300-900)nm.

## RESULTS

### Absorption Coefficient

Absorption coefficient ( $\alpha$ ) of prepared thin films was calculated from the equation<sup>(4)</sup>

$$\alpha = 2.303 \times A/d \quad \dots (1)$$

where A: Absorbance of thin films

A =  $\log 1/T$ ; transmittance

d: thickness of thin film

Fig. (2) show the variation of absorption coefficient with photon energy for three different thicknesses, from fig (2) we can see that at the low energy region, the absorption coefficient of ZnO has a small change, but near the absorption edge above (3eV) the absorption coefficient is increased rapidly, we can also see that the absorption coefficient increase as the thickness increasing.

While from fig. (3) we can see that the annealing cause a decreasing in absorption coefficient.

### Energy Gap

The energy gap of direct allowed transition of prepared thin films was calculated from equation<sup>(5)</sup>

$$\alpha h\nu = A(h\nu - E_g)^{1/2} \quad \dots (2)$$

where A: constant

$h\nu$ : energy of incident photon

$E_g$ : energy gap for direct allowed transition

The plot of  $(\alpha h\nu)^2$  versus photon energy is shown in fig (4) and the intercept of the straight line extrapolation with the energy axis gives a value of 2.231 eV which represents energy gap of ZnO film with 1500 Å thickness, the direct allowed energy gap for other thicknesses was calculated by the same way fig. (5,6), shows that the energy gap doesn't affect by the thickness of the film. Fig (7) show the calculation of direct allowed energy gap after annealing, it is seemed that the energy gap doesn't change by annealing.

The values of energy gap for direct allowed transitions of prepared films before and after annealing are listed in table 1.

### Width of Tail of Localized States

Width of tail of localized states in the gap region was calculated from the well-known urbach rule<sup>(6)</sup>

$$\alpha(\nu) = \alpha_0 \exp(h\nu - h\nu_0)/E_e \quad \dots (3)$$

where  $\alpha_0$ : Constant

$E_e$ : energy of tail width of localized states.

Figs. (8,9,10) show the method of urbach tail calculation from the slope of the exponential edge in absorption curve by plotting  $\ln\alpha$  versus photon energy, then take the slope of exponential part of this relation, energy of tail width equal 1/slope.

Fig. (11) show the urbach tail for the film after annealing. We can see that the width of tail was decreased after annealing. The values of tail width for prepared film before and after annealing are listed in table (1). From this table we can notice the small value of tail width which means that the

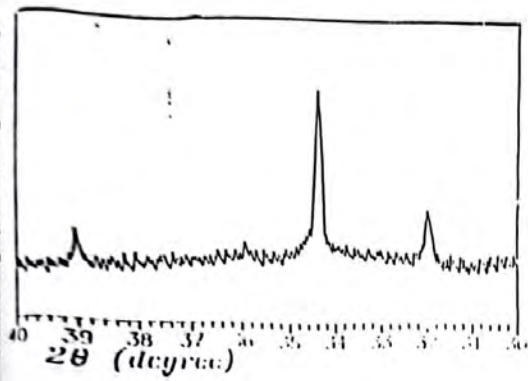


Fig (1) X-Ray Mode of ZnO film.

The absorbance and transmittance of films before and after annealing were measured by using Pu 8300.0V/vis spectrophotometer and in the wavelength rang:(300-900) nm.

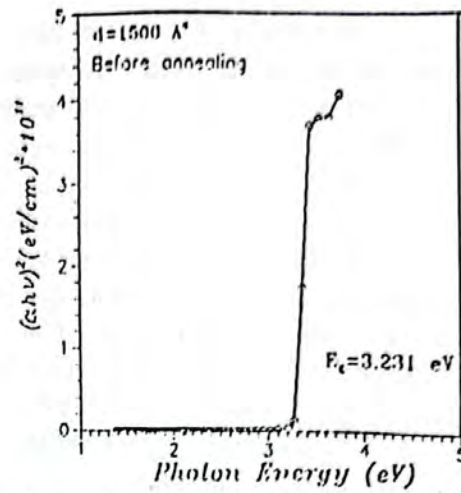
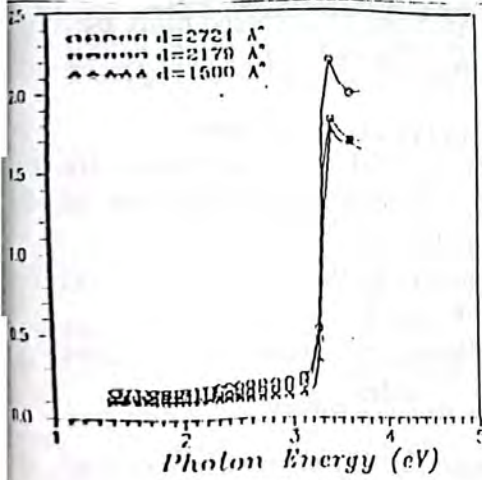


Fig (1)  $(\alpha h\nu)^2$  versus photon energy to find the energy gap of direct allowed transition of ZnO film, with thickness 1500 Å.



(2) Absorption coefficient of ZnO films as a function of photon energy for three different thicknesses.

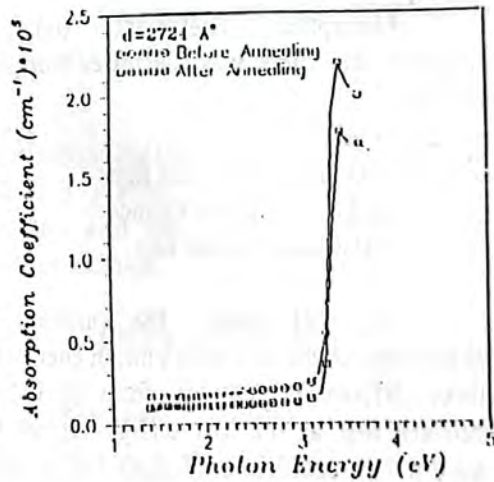
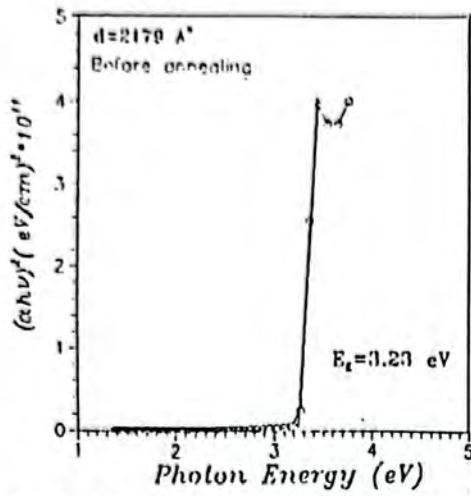
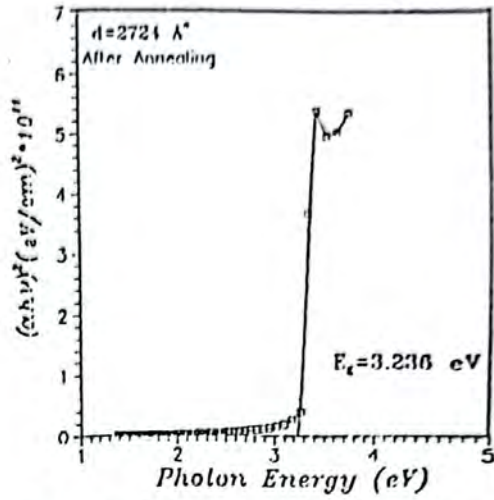


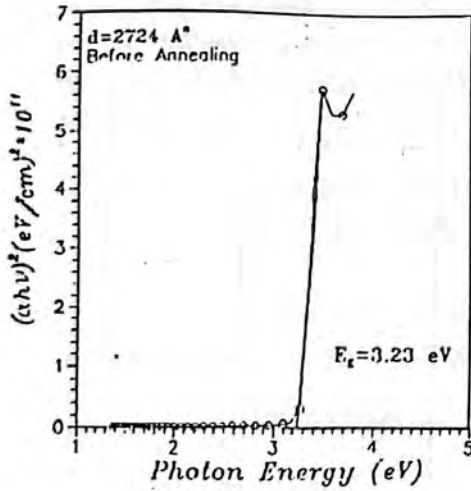
Fig.(3) Absorption coefficient as a function of photon energy of ZnO films with thickness 2724 Å before and after annealing.



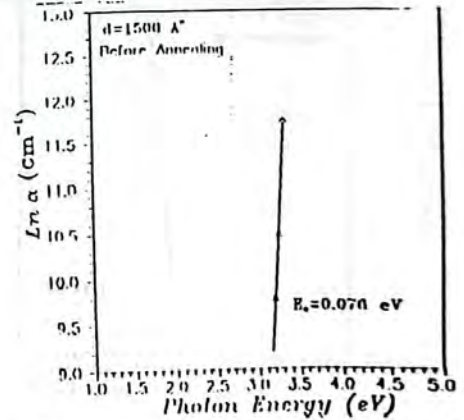
Fig(5)  $(\alpha h\nu)^2$  versus photon energy to find the energy gap of direct allowed transition of ZnO film, with thickness  $2170 \text{ \AA}^*$ .



Fig(7)  $(\alpha h\nu)^2$  versus photon energy to find the energy gap of direct allowed transition of ZnO film, with thickness  $2724 \text{ \AA}^*$  after annealing.



Fig(6)  $(\alpha h\nu)^2$  versus photon energy to find the energy gap of direct allowed transition of ZnO film, with thickness  $2724 \text{ \AA}^*$  before annealing.



Fig(8)  $\text{Ln } \alpha$  versus photon energy to find tail width of ZnO with thickness  $1500 \text{ \AA}^*$ .

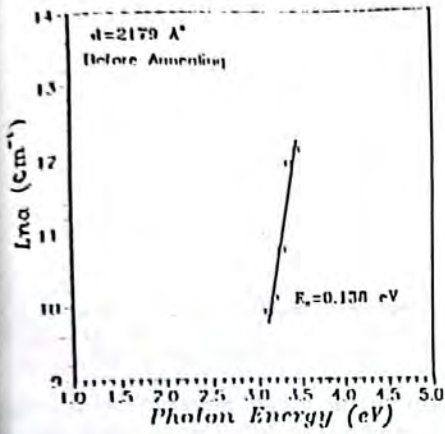


Fig (9)  $\ln \alpha$  versus photon energy to find tail width of ZnO film with thickness  $2179 \text{ \AA}$ .

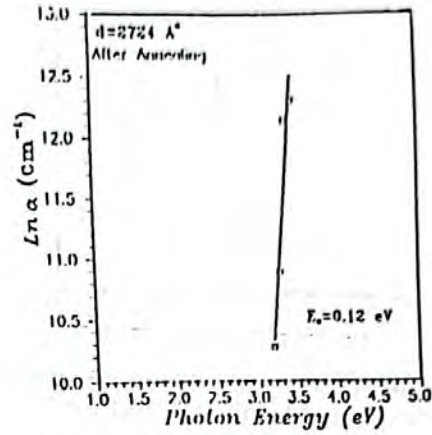


Fig (11)  $\ln \alpha$  versus photon energy to find tail width of ZnO film with thickness  $2724 \text{ \AA}$  after annealing.

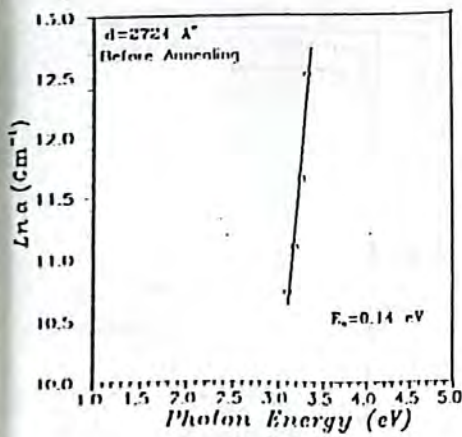


Fig (10)  $\ln \alpha$  versus photon energy to find tail width of ZnO film with thickness  $2724 \text{ \AA}$  before annealing.

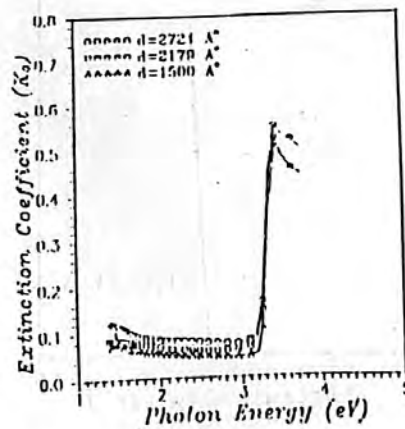


Fig (12) Extinction coefficient of ZnO film as a function of photon energy for three different thicknesses.

density of localized state in energy gap region in polycrystalline materials is very small.

Table 1: Values of energy gap and urbach tail before and after annealing for different thickness

d(Å)	Eg(eV) before annealing	Eg(eV) after annealing	Ec(eV) before annealing	Ec(eV) after annealing
2724	3.23	3.236	0.14	0.12
2179	2.23	2.237	0.138	0.12
1500	3.231	2.236	0.076	0.064

#### Extinction Coefficient

Extinction coefficient (k) of prepared films was calculated from the equation<sup>(7)</sup>

$$k = \frac{\alpha\lambda}{4\pi} \quad \dots (4)$$

where  $\lambda$ : the wavelength of incident photon

From fig.(12) we can see that the extinction coefficient behavior is similar to that of absorption coefficient, so we can notice that the extinction coefficient increase with the thickness increasing.

Fig (13) show the effect of annealing on the extinction coefficient, we can see that the extinction coefficient decreases after annealing.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this work it is found that the increasing of absorption coefficient with thickness is due to the direct proportionality relation between thickness and absorbance which cause increasing of absorption coefficient. The absorption edge doesn't affected by the thickness which mean that the energy gap doesn't affected by the thickness increasing.

On the other side it is found that the absorption coefficient decrease after annealing of the prepared films, we found that there is no clear change in energy gap by annealing, the annealing may be cause a decreasing of localized states in energy gap and recrystalization of atoms in the film which

we found from the results of tails width which decrease by annealing.

It is found that the extinction coefficient has the same behavior of absorption coefficient because it depends on that coefficient.

## REFERENECES

1. Weast R.C. and Astle M.J. "Hand book of chemistry and physics", CRC press (1979).
2. Jarzebski Z.M., "Oxide semiconductor", Pergomon press (1973).
3. Kittel C. "Introduction to solid state physics", John Wiley & Sons Inc. 5th ed. (1976).
4. Abass A.K., Ahmed Z.A. and Tahir R.E., J. Appl. Phys. 61(6), 2339-41 (1987).
5. Koffyberg F.P., Dwight K. and Wold A. Solid state comm., Vol 30, (433-7) (1979).
6. Mott N.F. & Davis E.A. "Electronic Processes in non crystalline materials" (1979).
7. Clark A.H., "Polycrystalline and Amorphous Thin films and Devices", Academic press (1980).

## Effects Of The Effective Charge ( $Z_1^*$ ) On The Range Of $\alpha$ -Particles, Heavy Ions ( $Z_1 > 4$ ) and Fission Fragments In Different Gases

NADIA A AL-BANNA\* AND KHALID A. AHMAD  
Al-Mustansiriyah University, College of Science, Department of Physics  
\*University of Baghdad, College of Science, Department of Physics

(Received Jun. 8, 1998 ; Accepted Oct. 3, 1998)

### ABSTRACT

The range of  $\alpha$ -particles ( $Z_1 = 2$ ) in the energy range (0.9 to 3MeV), heavy ions ( $Z_1 > 4$ ) in the energy range (2 to 13 MeV) and fission fragments from  $Cf^{252}$  source with energy (80 to 106 MeV) in gaseous elements and compounds like ( $H_2$ , He, N, Ne, Ar,  $CH_4$ ,  $C_4H_{10}$ ,  $CO_2$ ,  $CF_4$ ) were calculated taking into consideration the effects of effective charge ( $Z_1^*$ ) of the incident heavy charged particles or ions. A semi-empirical formula for the effective charge parameter ( $\gamma$ ) was used to calculate the effective charge ( $Z_1^*$ ) in gaseous targets. A comparison between the theoretical and experimental values for the range with those calculated by other workers shows a good agreement when the atomic number ( $Z_1$ ) is replaced by the effective charge ( $Z_1^*$ ).

### الخلاصة

حُصبت مديات جسيمات الفا ذات الطاقات (0.9 – 3MeV)، والأيونات الثقيلة ( $Z_1 > 4$ ) ذات الطاقات (2 – 13 MeV) وشظايا الانشطار من عنصر الكفورنيوم  $Cf^{252}$  ذات الطاقات (80-106 MeV) في مواد غازية ومركبات مثل ( $CH_4$ ,  $C_4H_{10}$  m  $CO_2$ ,  $CF_4$ ) اخذين بنظر الاعتبار تأثيرات الشحنة الفعالة ( $Z^*$ ) للجسيمات المشحونة الثقيلة الساقطة او الأيونات استعملت معادلة شبه تجريبية لحساب معامل الشحنة الفعالة ( $\gamma$ ) ومن ثم لحساب الشحنة الفعالة ( $Z^*$ ) للاهداف الغازية ثم مقارنة النتائج مع نتائج عملية مقاسه واطهرت المقارنة تطابق جيد مع نتائج العملية عند ابدال العدد الذري للجسيم الساقط ( $Z_1$ ) بشحنته الفعالة  $Z_1^*$ .

### INTRODUCTION

Knowing that charged particles lose their energy in matter a natural question to ask is : How far will the particles penetrate before they lose all of their energy ? Moreover, if we assume that the energy loss is continuous, this distance must be a well defined quantity for the same type material. This quantity is called the range of particles and depends on the type of material, the type of particle and its energy.

Experimentally, the range can be measured by passing a beam of particles with the desired energy through different thicknesses of material. Theoretically,

$$R = \int_0^E \frac{dE}{(dE/dX)} \quad (1)$$

where ( $E$ ) is the average energy and ( $dE/dX$ ) is the stopping power. Because the value of the integral in eq. (1) is undefined when ( $E = 0$ ), equation (1) becomes :

$$R = -\frac{1}{N} \left[ \int_0^{E_{min}} \frac{dE}{S} + \int_{E_{min}}^E \frac{dE}{S} \right] \quad (2)$$

where ( $E_{min}$ )  $\sim$  1 MeV, for ( $\alpha$ -particles) and  $dE/dX = - N.S$ , where ( $N$ ) is the atomic density and ( $S$ ) is the stopping cross section.

## 2. Range – Energy Relation

To be more accurate in the calculation of the range for heavy charged particles, ( $\alpha$ -particles, heavy ions ( $Z_1 > 4$ ) and fission fragments) we have to take the effects of energy on the integration of equation (1). The stopping power can be expanded in the following ways:

### (i) Ziegler's Formula

The semi-empirical formula of Ziegler<sup>[1]</sup>, which applies at low and high energy for heavy and light elements, is based on the equation:

$$\frac{1}{S} = \frac{1}{S_{Low}} + \frac{1}{S_{High}} \quad (3)$$

where  $S_{Low}$  and  $S_{High}$  are the low energy and high energy stopping cross sections respectively, and are given by:

$$S_{Low} = A_1 E^{A_2}$$

$$\text{and } S_{High} = \frac{A_3}{E} \ln \left( 1 + \frac{A_4}{E} + A_5 E \right),$$

Where  $A_1, A_2, A_3, A_4$  and  $A_5$  are Ziegler's parameters<sup>(1)</sup>. Then, from equation (2) we obtain

$$R = -\frac{1}{N} \left[ \int_0^{E_{min}} \frac{dE}{S_{Low}} + \int_{E_{min}}^E \frac{dE}{S_{High}} \right] \quad (4)$$

or,

$$R = -\frac{1}{N} \left[ \int_0^{E_{min}} \frac{dE}{A_1 E^{A_2}} + \int_{E_{min}}^E \frac{dE}{\frac{A_3}{E} \ln \left( 1 + \frac{A_4}{E} + A_5 E \right)} \right] \quad (5)$$

hence,

$$R = -\frac{1}{N} \left[ \frac{1}{A_1 (1-A_2)} E^{1-A_2} \Big|_0^{E_{min}} + \int_{E_{min}}^E \frac{E}{\left( \frac{A_3}{E} \ln \left( 1 + \frac{A_4}{E} + A_5 E \right) \right)} \right] \quad (6)$$

The second term in equation (6) can be solved numerically by Simpson's rule<sup>[2]</sup>, for which a computer program called RANGE has been written in FORTRAN-77<sup>[3]</sup>.

### (ii) Lindhard and Bethe's Formula

The stopping power of a projectile can be studied in three velocity regions<sup>[4]</sup> as shown in Fig (1).

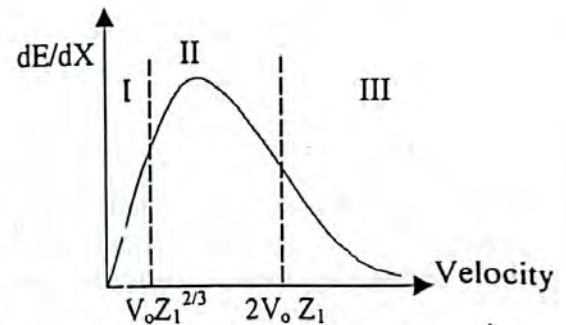


Fig. (1) The variation of energy loss as a function of velocity

These regions are:

- 1- Region (I) (low velocity region ( $V < V_0 Z_1^{2/3}$ )).
- 2- Region (II) (intermediate velocity region ( $V_0 Z_1^{2/3} \leq V < 2V_0 Z_1$ )).
- 3- Region (III) (high velocity region ( $V > 2V_0 Z_1$ )).

For this reason, eq. (2) becomes:

$$R = -\frac{1}{N} \left[ \int_0^{E_{min}} \frac{dE}{S_{Lindhard}} + \int_{E_{min}}^E \frac{dE}{S_{Bethe}} \right], \quad (7)$$

where  $S_{Lindhard} = S_e + S_n$

$$\text{And } \left. \begin{aligned} S_e &= e_e x \\ S_n &= f_n x^{2(1-2/s)} \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

(s) is a parameter, such that  $s > 1$

$$f_e = 8\pi e^2 k a_0 \frac{Z_1^{7/6} Z_2}{(Z_1^{2/3} + Z_2^{2/3})^{3/2}}, x = v/v_0 \quad (9)$$

$$f_n = \left(\frac{\pi}{s-1}\right) (Z_1 Z_2 e^2)^{2/s} \left(\frac{M_1(3s-1)}{M_2(2s^2)}\right) (a_{12} v^{1/2})^{2(1-2/s)} \quad (10)$$

$$f_n = f_0 (0.5 M_1 V_0^2)^{2(1-2/s)},$$

and,

$$S_{\text{Bethe}} = \frac{\pi Z_1 Z_2 e^4 k^2}{m v^2} \left[ \ln \left( \frac{2m v}{(1-\beta^2)} - \beta^2 - C/Z_2 \right) - Z_1 L_1 - Z_1^2 L_2 \right] \quad (11)$$

The quantities  $S_e$  and  $S_n$  are the electronic and nuclear cross-section derived by Linhard<sup>[4]</sup> and  $S_{\text{Bethe}}$  is the electronic cross-section derived by Beth<sup>[5]</sup>. Then, the total range in eq. (2) becomes :

$$R = \frac{0.5 M_1 V_0^2}{N} \left[ \int_0^{x_{\min}} \frac{dx}{f_e + f_n x^{2(1-2/s)}} + \int_{x_{\min}}^x \frac{dx}{S_{\text{Bethe}}} \right] \quad (12)$$

In the first region, where ( $v < v_0$ ) we have ( $S_n > S_e$ ), but ( $S_n$ ) decreases when velocity increases. For that reason, we can use the first term of eq. (7) only. In the second region ( $v_0 Z_1^{2/3} < v \leq 2v_0 Z_1$ ) we have to use the two terms in eq. (7), which contain Bethe's corrections (Barkas effect,  $L_1$ , Bloch correction,  $L_2$  and shell correction,  $C/Z_2$ ). In the third region ( $v \geq 2v_0 Z_1$ ) the velocity becomes so high; the effects of Bethe's corrections becomes small and the electronic stopping cross-section is much greater than ( $S_n$ ).

### (iii) Effective charge formula

To study the effects of effective charge on the range of heavy charged particles we have to use eq. (7) and replace ( $Z_1$ ) by ( $Z_1^*$ ) where a semi-empirical formula was taken from ref.[3].

## RESULTS OF CALCULATIONS

The range-energy relation of alpha particles, heavy ions like Ne and light and heavy fission fragments in gaseous elements like  $H_2$ , He,  $N_2$ , Ne, Ar and Kr and in gaseous compounds like  $CO_2$  and  $CH_4$  are presented in Figs. 2a, 2b and 2c. The range,  $R_{\text{Ziegler}}$ , was calculated from Lindhard's and Bethe's stopping cross sections formula. Eq. 7<sup>[4, 5]</sup>, taking into the consideration the effective charge  $Z_1^*$ . A comparison was done with the experimental data of Bimbot<sup>[6]</sup> as shown in Fig. 2a. There is a difference in the calculations of the range,  $R_{\text{eff}}$ , with effective charge ( $Z_1^*$ ) and the calculations of the range,  $R$ , with atomic number ( $Z_1$ ) as shown in Fig. (2). These differences in the values of  $R_{\text{eff}}$  and  $R$  versus energy increase with the energy increase, especially, in targets of small atomic number  $Z_2$  as shown in Fig. (2).

## CONCLUSIONS

- (a) From the calculation of the range for heavy charged particles we conclude that, it is very important to take the energy limit into consideration, so that the intergration in the range formula is partitioned into two terms: (i) Lindhard's equation at low energy (ii) Bethe's formula at high energy with corrections (Barkas effect,  $L_1$ , Bloch correction,  $L_2$  and shell correction,  $C/Z_2$ ) in the velocity range ( $V_0 Z_1^{2/3} \leq V \leq 2V_0 Z_1$ ). At low velocity ( $V \leq V_0$ ), the nuclear cross-section  $S_n$  is dominant, while the electronic contributions,  $S_e$ , decreases with decreasing ion velocity. This is important for charged particles heavier than alpha particles. At the maximum stopping cross section region ( $E \leq \text{Mev}$  for alpha particles) the electronic and nuclear cross-sections contribute together to energy loss shown in Fig. (2), and the electronic cross-section  $S_e$  is given by eq. (3).
- (b) In the case of interaction of heavy charged particles it is important to take the effective charge  $Z^*$  into consideration

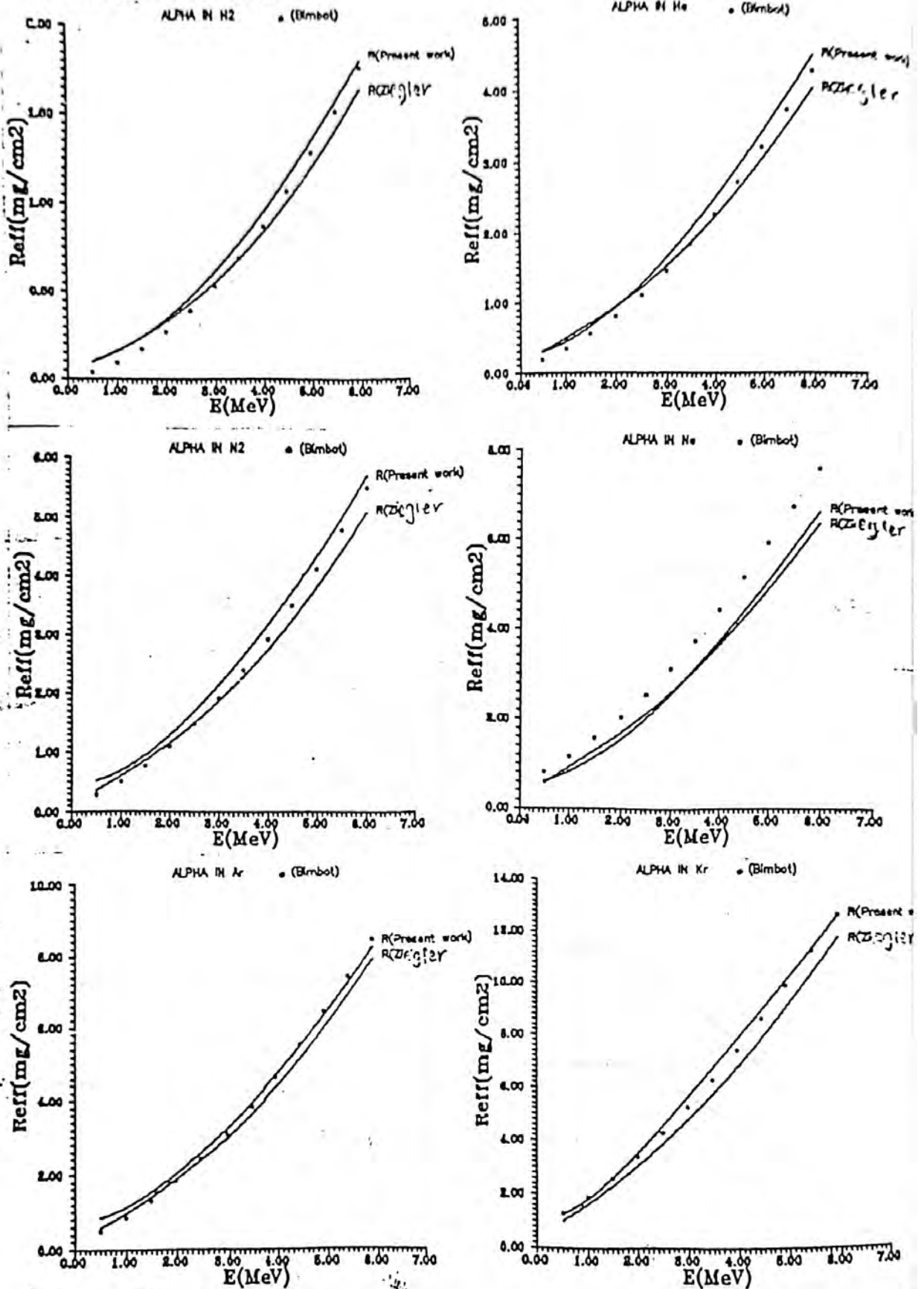


Fig.(2-a) The effects of effective charge on the range of Alpha particle in gases

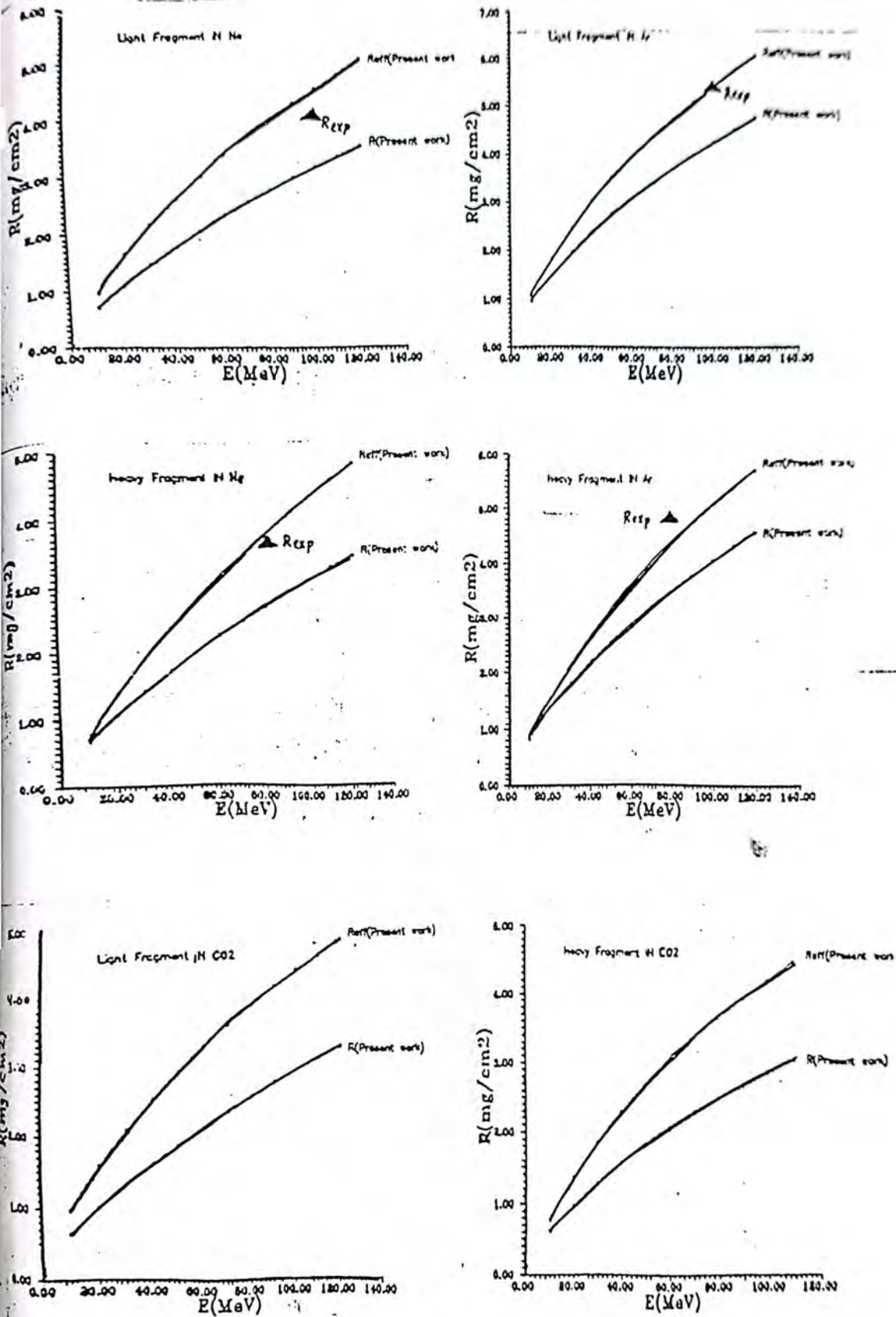


Fig.(2-c) The effects of effective charge on the range of fission fragments in gases.

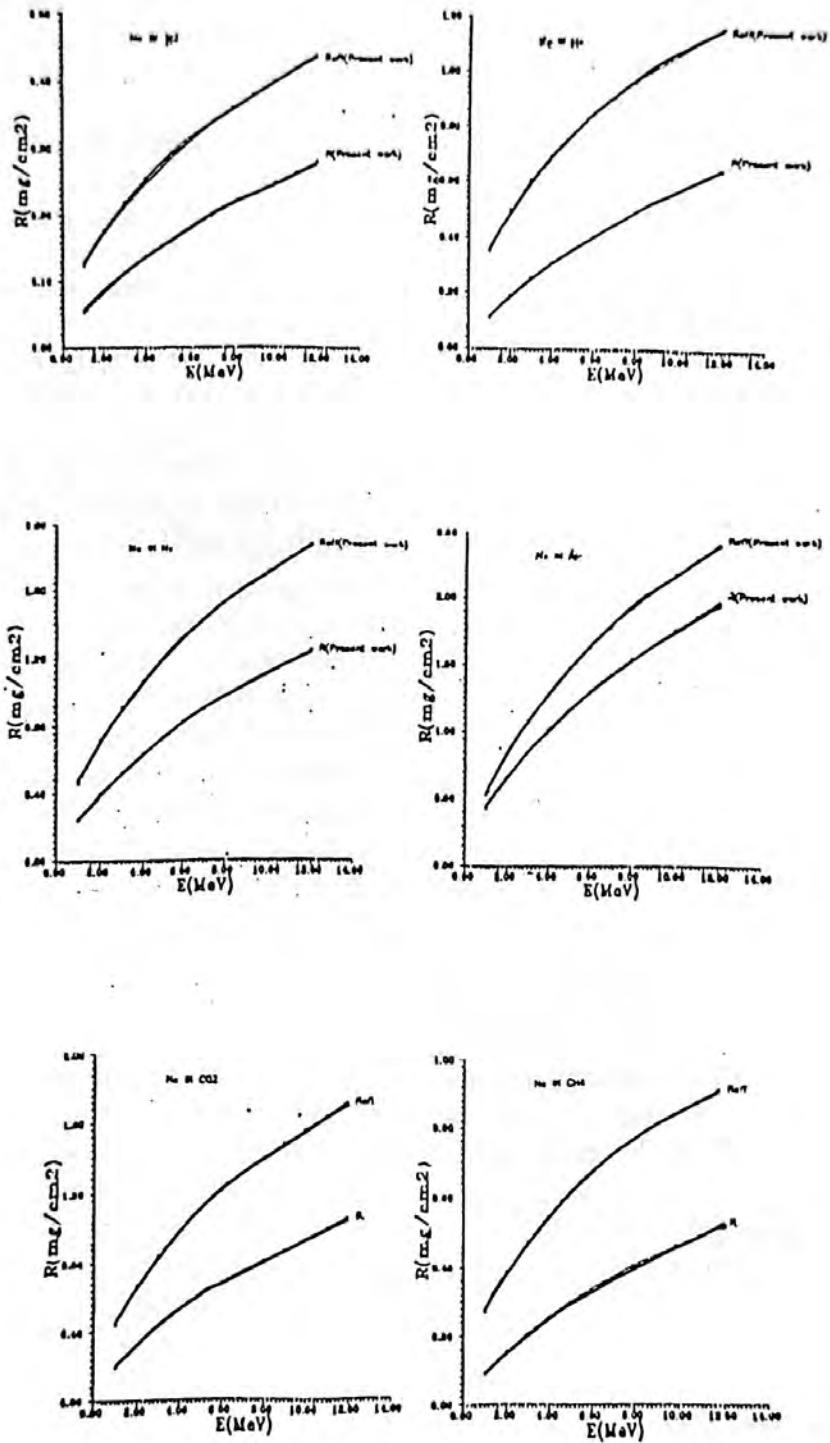


Fig.(2-b) The effects of effective charge on the range of heavy ions in gases.

instead of the atomic number of the incident projectile because the incident ionic charge of the particle will decrease as its velocity decreases. This is caused by electron capture and loss processes. (c) For future work, the range straggling of heavy charged particle is of interest.

### REFERENCES

1. Ziegler, J., "Hydrogen Stopping Powers And Ranges in All Elements", *Apply. Phys. Lett.* 31 , 544 (1977).
2. McCracken-D. and W.S.Dorn, "Numerical Methods with Fortran (IV) Case-Studies", John Wiley and Sons, Inc (1972).
3. Al-Barana, N., "Studying The Effective Charge on the Stopping Cross-Section, Corrections of Bethe's Formula and range of Heavy Ions in gases", M.Sc. Thesis University of Al-Mustansiriyah (1996).
4. Lindhard, J., Scharff, M. and Schiott, H.E., "Range concepts and heavy ion ranges", *mat. Fys-Medd. Dan.Vid Selsk* 33 No 14 (1963).
5. Bethe, H., Blöch., "Beth-Blöch stopping power parameters for light projectiles at energies near the stopping maximum", *Nucl. Istr. & Meth.* B12 50 (1985).
6. Bimbot, R., "Stopping power of gases for heavy ions: gas-solid effect (I) (2-13) Mev/u Ne and Ar projectile". *Nucl. Instr. & meth.* B44 1-18 (1990)

## Semi - Injectivity

M. S. ABBAS and S. A. ARBAH

(Received Apr. 18, 1999 ; Accepted July. 31, 1999)

### ABSTRACT

In this note the concept of semi-injective modules is introduced as a generalization of quasi-injective modules. Analogical properties of quasi-injectivity are given for semi-injectivity. A decomposition of semi - injective modules is studied. Conditions are considered which versus semi - injectivity to quasi - injectivity. Quasi - Frobenius rings are characterize in terms of self semi - injective rings.

### INTRODUCTION

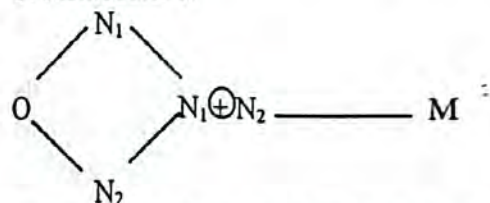
The concept of injective modules introduced by B-Edcmann and A. Schöpf<sup>[3]</sup> is among the most fundamental tools in modules and ring theory. A generalization of injective modules noted quasi-injective is introduced by R.E. Johnson and E.T. Wong<sup>[9]</sup>. An R-module M is called quasi-injective if for any submodule N of M each R-homomorphism of N into M extends to an R-endomorphism of M. Here we introduce a class of modules which contains both injective and quasi-injective modules. An R-module M is said to be semi-injective if every R-endomorphism of each submodule of M can be extended to one of M. This is equivalent to saying that every R-endomorphism of each essential submodule of M extends to an R-endomorphism of M. It is clear that quasi-injective (and hence injective) modules are trivial examples of semi-injective modules. In fact semi-injectivity is a proper generalization of quasi-injectivity, as an infinite cyclic group is semi-injective but not quasi-injective. We remark that R in this work stands for commutative ring with identity and all modules are unital left R-modules.

#### Semi-Injective Modules

First in the following lemma we construct an R-module which is not semi-injective.

#### Lemma 1.1

Let M be an R-module whose lattice of submodules is



where  $N_1$  is not isomorphic to  $N_2$ . Then M is not semi-injective.

#### Proof

S. Jain and S. Singh in [ ] showed that any non-zero endomorphism of M is either isomorphism or have kernel equal to  $N_1 + N_2$ . The natural projection of  $N_1 + N_2$  onto  $N_1$  (considered as endomorphism of  $N_1 + N_2$ ) can not be extended to an endomorphism of M. Therefore M is not semi-injective.

R-Hallett in [6] gives an example which satisfies the conditions of the above lemma.

#### Definition 1.2

Let M be an R-module.  $E = E(M)$  be its injective envelope. An R-endomorphism  $f \in S = \text{End}_R(E)$  is said to be essential endomorphism (simply ess-endomorphism) if there exists an essential submodule N of M such that  $f(N) \subseteq N$ .

Put  $K = \{f \in S \mid f(N) \subseteq N \text{ for some essential submodule } N \text{ of } M\}$  the set of all ess-endomorphisms of  $S$ .

It is clear that  $K$  is a non-empty subset of  $S$  but it is not an ideal of  $S$ . Faith in [ ] has shown that if  $M$  is an  $R$ -module, then the Jacobson radical of  $S$  is  $J(S) = \{\alpha \in S \mid \ker(\alpha) \text{ is essential submodule of } E\}$ . Let  $\alpha \in J(S)$ , then  $\ker(\alpha) \cap M$  is an essential submodule of  $M$  and  $\alpha(\ker(\alpha) \cap M) \subseteq \ker(\alpha) \cap M$ , thus  $\alpha \in K$ . Therefore  $J(S) \subseteq K$ . In fact  $J(S) \neq K$ , since otherwise the trivial endomorphism of  $E$  is invertible in  $S$ .

It is well-known that  $M$  is quasi-injective if and only if  $SM \subseteq M^{(9)}$ . The following theorem is the analogous result for semi-injective modules.

**Theorem 1.3**

Let  $M$  be an  $R$ -module,  $E$  be its injective envelope and  $S = \text{End}_R(E)$ . Then  $M$  is semi-injective and  $J(S)M \subseteq M$  if and only if  $KM \subseteq M$ .

**Proof**

Assume that  $KM \subseteq M$ , then  $J(S)M \subseteq M$ . Let  $N$  be an essential submodule of  $M$  and  $f$  be an  $R$ -endomorphism of  $N$ , then there exists  $h: E \rightarrow E$  such that  $h(N) = f(N) \subseteq N$ , thus  $h \in K$ ,  $h|_M: M \rightarrow M$  is an extension of  $f$ . Conversely, let  $\alpha \in K$ , then there exists an essential submodule  $N$  of  $M$  such that  $\alpha(N) \subseteq N$ . Semi-injectivity of  $M$  implies that  $\alpha$  is extended to  $\beta: M \rightarrow M$ . By injectivity of  $E$ ,  $\beta$  extends to an element  $\gamma \in S$  such that  $\gamma(M) = \beta(M) \subseteq M$ . So  $(\alpha - \gamma)(N) = (0)$ , thus  $N \subseteq \ker(\alpha - \gamma)$  which implies that  $\alpha - \gamma \in J(S)$ . By hypothesis  $(\alpha - \gamma)(M) \subseteq M$ . for each  $x$  in  $M$ ,  $(\alpha - \gamma)(x) = m$  for some  $m$  in  $M$ , hence  $\alpha(x) = m + \gamma(x) \in M$ . Therefore  $\alpha(M) \subseteq M$ .

For any submodule  $N$  of  $M$  and every element  $m$  in  $M$ . It is well-known that the set defined by  $[N:m] = \{r \in R \mid rm \in N\}$  is an ideal of  $R$ .

**Proposition 1.4**

Let  $M$  be a non-singular  $R$ -module, then the only endomorphism whose kernel is

essential submodule is the zero endomorphism.

**Proof**

For each  $\alpha: M \rightarrow M$  with  $\ker(\alpha)$  is essential submodule of  $M$ , let  $g = 1 - \alpha: M \rightarrow M$ . To show that  $g = 1$ . For each  $x \in M$ , there is a non-zero element  $t \in R$  such that  $tx (\neq 0) \in \ker(\alpha)$ ,  $tg(x) = g(tx) = tx - \alpha(tx) = tx$ , then  $\text{ann}_R(g(x) - x) \supseteq [ker(\alpha):x]$ , thus  $\text{ann}_R(g(x) - x)$  is essential in  $R$  and hence  $g(x) - x \in Z(M) = (0)$ .

**Corollary 1.5**

Let  $M$  be a non-singular  $R$ -module, then  $M$  is semi-injective if and only if  $KM \subseteq M$ .

**Proof**

Let  $E = E(M)$ , since  $Z(M) = M \cap Z(E)$ , then  $Z(E) = (0)$ . Proposition (1.4) implies that  $J(\text{End}_R(E)) = (0)$ . Thus theorem (1.3) completes the proof.

**Proposition 1.6**

Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module,  $E$  is an essential extension of  $M$  and  $f$  be an ess-endomorphism of  $E$ . If for each  $x \in M$  there is a positive integer  $t$  such that  $f^{t+1}(x) = f^t(x)$ , then  $f(M) \subseteq M$ .

**Proof**

$f$  is ess-endomorphism of  $E$ , there exists an essential submodule  $H$  of  $M$  such that  $f(H) \subseteq H$ . Let  $N$  be the submodule of  $M$  which is the sum of all submodules  $N'$  of  $M$  with  $f(N') \subseteq N'$ . Then  $N$  is essential submodule of  $M$  and  $f(N) \subseteq N$ . Assume that  $N \neq M$ , then there is  $y \in M$  such that  $y \notin N$ .  $B = N + Ry$  is a submodule of  $M$  containing  $N$  properly. Since  $f^n(N) \subseteq N$  for all  $n \geq 1$ , it follows by semi-injectivity of  $M$  the existence of endomorphism  $g_n$  of  $M$  which extends  $f^n$  for all  $n \geq 1$ .

Define  $h_n: M (= M/N) \rightarrow E$  by  $h_n(m+N) = (f^n - g_n)(m)$  for all  $m \in M, n \geq 1$ ,  $h_n$  is well-defined  $R$ -homomorphism.  $N \cap \text{Im}(h_n)$  is essential in  $\text{Im}(h_n)$  for each  $n$ . By the hypothesis there exists a positive integer  $t$

such that  $f^{t+1}(y)=f^t(y)$ , then  $\bar{A}_i=h_i^{-1}(N \cap \text{Im}(h_i))$  is essential submodule of  $M$  ( $i=1,2,\dots,t$ ). Thus  $\bar{A} = \sum_{i=1}^t \bar{A}_i$  is an essential submodule of  $M$ . But

$B$  is a non-zero submodule of  $\bar{M}$ , then  $\bar{A} \cap \bar{B} \neq (0)$ . There exists  $r \in R$  such that  $r\bar{y}(\neq 0) \in \bar{A}$ . By the definition of  $\bar{A}_i$  we have  $h_i(r\bar{y}) \in M$  for  $i=1,\dots,t$ , but  $g_m(ry) \in M$  for all  $m \geq 1$ . Now, if  $y_1 = ry$ , then  $h_i(y_1)=f^i(y_1)-g_i(y_1) \in M$  so  $f^i(y_1) \in M$  for  $i=1,\dots,t$ . Hence  $f^{t+1}(ry)=rf^{t+1}(y)=rf^t(y)=f^t(ry)$ , it follows that  $f^m(y_1) \in M$  for all  $m \geq 1$ . Set  $N_1=N+\sum_{i=0}^{\infty} f^i(Ry_1)$ , then  $N_1$  is a submodule of  $M$  and  $f(N_1) \subseteq N_1$ , since  $f(N_1) = f(N) + \sum_{i=0}^{\infty} f^{i+1}(Ry_1) \subseteq N + \sum_{i=0}^{\infty} f^i(Ry_1) = N_1$ . But  $N_1 \subseteq N$  which contradicts the choice of  $N$ . Therefore,  $f(M) \subseteq M$ .

Recall that an  $R$ -module  $M$  is said to be max-E module if  $M$  satisfies the ascending chain condition on essential submodules<sup>(2)</sup>.

**Theorem 1.7**

Let  $M$  be an  $R$ -module such that  $E=E(M)$  is max-E module. Then  $M$  is semi-injective if and only if  $KM \subseteq M$ .

**Proof**

Let  $S=\text{End}_R(E)$ , by using theorem (1.3), it is enough to show that  $J(S)M \subseteq M$ . For each  $f \in J(S)$ ,  $\ker(f)$  is an essential submodule of  $E$ . Consider the ascending chain  $\ker(f) \subseteq \ker(f^2) \subseteq \ker(f^3) \subseteq \dots$  of submodules of  $E$ , then there exist  $n_0 \in \mathbb{Z}^+$  such that  $\ker(f^{n_0+1}) = \ker(f^{n_0})$  for all  $n \geq n_0$ ,  $\text{Im}(f^{n_0}) \cap \ker(f^{n_0}) = (0)$ . For each  $x \in M$ ,  $x-f(x) \in E$  and  $0=f^{n_0}(x-f(x))=f^{n_0+1}(x)-f^{n_0}(x)$ , hence  $f^{n_0+1}(x)=f^{n_0}(x)$  for all  $n \geq n_0$ . By proposition (1.6) we have  $f(M) \subseteq M$ .

Goldie in [5] defined for each submodule  $N$  of  $M$  a submodule of  $M$  as follows,  $\text{cl}(N)=\{m \in M \mid [N:m] \text{ is an essential ideal of } R\}$ ,  $\text{cl}(N)$  is called the closure of  $N$ . Clearly  $N \subseteq \text{cl}(N)$ . In particular  $\text{cl}(0)=Z(M)$  and we define  $\text{cl}(\text{cl}(0))=Z_2(M)$ .  $N$  is called closed submodule in case  $N=\text{cl}(N)$ . We need the following lemma<sup>(4)</sup>.

**Lemma 1.8**

Let  $N$  be a submodule of an  $R$ -module  $M$ . Then

- i) if  $N$  is essential in  $M$ , then  $[N:M]$  is essential in  $R$  for each  $x \in M$ .
- ii) if  $N$  is essential in  $M$ , then  $\text{cl}(N)=M$ .

**Proposition 1.9**

Every closed submodule of a semi-injective module is a direct summand.

**Proof**

Let  $N$  be a closed submodule of semi-injective  $R$ -module  $M$  and  $B$  be a relative complement of  $N$  in  $M$ . Put  $A=N+B$ , then the natural projection  $p$  of  $A$  onto  $N$  extends to an endomorphism of  $M$ . Since  $g(B)=p(B)=(0)$ , then  $B \subseteq \ker(g)$ . It is easy to show that  $N \cap \ker(g)=(0)$ , then  $B=\ker(g)$ . But  $A$  is essential in  $M$ , by lemma (1.8)  $\text{cl}(A)=M$  and  $L=[A:x]$  is essential in  $R$  for each  $x \in M$ ,  $Lx \subseteq A$ , thus  $Lg(x)=g(Lx)=p(Lx)$ . But  $N=\text{cl}(N)$ , so  $g(x) \in N$  and  $g(M)=N$ . It is an easy matter to see that  $M=g(M)+g^{-1}(0)=N+B$ .

The following lemma follows from the definition.

**Lemma 1.10**

If the direct sum  $R$ -modules  $\{M_i \mid i \in I\}$  is semi-injective, then so is  $M_i$  for each  $i \in I$ .

**Corollary 1.11**

Every closed submodule of semi-injective module is semi-injective.

The following lemma appeared in<sup>(7)</sup>

**Lemma 1.12**

Let  $M$  be an  $R$ -module, then

- i)  $Z_2(M)$  is a closed submodule of  $M$
- ii) Every closed submodule of  $M$  contains  $Z_2(M)$ .
- iii) For every submodules  $N_1, N_2$  of  $M$ .  $\text{cl}(N_1 \cap N_2) = \text{cl}(N_1) \cap \text{cl}(N_2)$ .

In the following, we give a decomposition of semi-injective modules in term of the singular submodules and the double singular submodules.

**Theorem 1.13**

Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module and  $M_0$  be a submodule of  $M$  which is maximal with the property  $Z(M_0) = (0)$ . Then  $M = M_0 + Z_2(M)$ . In addition, a submodule  $N$  of  $M$  is closed if and only if  $N$  contains  $Z_2(M)$  and  $M_0 \cap N$  is a direct summand of  $M_0$ .

**Proof**

$Z_2(M)$  is a closed submodule of  $M$ . Since  $Z(M_0) = (0)$ , then  $Z_2(M_0) = Z(M_0) = (0)$ , but  $Z_2(M_0) = M_0 \cap Z_2(M)$ , then  $M_0$  is a complement of  $Z_2(M_0)$ . Thus  $M = M_0 + Z_2(M)$  (see the proof of proposition (1.9)). If  $N$  is a closed submodule of  $M$ , then  $Z_2(M) \subseteq N$ , hence  $N = (N \cap M_0) + Z_2(M)$ . Since  $M_0$  is closed submodule of  $M_0$ . But  $M_0$  is a direct summand of  $M$ , then by lemma (1.10)  $M_0$  is semi-injective. Proposition (1.9) implies that  $N \cap M_0$  is a direct summand of  $M_0$ . Conversely, assume that  $Z_2(M) \subseteq N$  and  $N \cap M_0$  is a direct summand of  $M$ , then  $M_0 = (N \cap M_0) \oplus N_1$  for some submodule  $N_1$  of  $M$ . Considering  $M_0$ ,  $M_0 = \text{cl}(M_0) = \text{cl}(N \cap M_0) + \text{cl}(N_1)$ , but  $\text{cl}(N \cap M) \cap \text{cl}(N_1) = \text{cl}((N \cap M_0) \cap N_1) = \text{cl}(0) = (0)$ . Therefore  $M_0 \subseteq \text{cl}(N \cap M_0) \cap \text{cl}(N_1)$ , thus  $N \cap M_0$  is closed submodule of  $M_0$ . To prove  $\text{cl}(N) = N$ , let  $x \in \text{cl}(N) \subseteq M$ , then there exist  $m_0 \in M_0$  and  $y \in Z_2(M)$  such that  $x = m_0 + y$ , further  $Lx \subseteq N$  for some essential ideal  $L$  of  $R$ . Then  $Lm_0 = Lx - Ly \in N \cap M_0$ , but  $N \cap M_0$  is closed in  $M_0$ , thus  $m_0 \in N \cap M_0$ . Hence  $x = m_0 + y \in N \cap M_0 + Z_2(M) \subseteq N$ , so  $x \in N$ .

**Semi-Injective Modules Over QE-Noetherian Rings**

V. Dung, D. Huynh and R. Wisbauer in [2] studied a generalization of Noetherian modules namely is modules with ascending chain condition on essential submodules. We introduce here the concept of QE-Noetherian modules which include both of them.

**Definition 2.1**

An  $R$ -module  $M$  is said to be quotient-essential Noetherian (simply QE-Noetherian) if for each ascending chain

$L_1 \subseteq L_2 \subseteq L_3 \subseteq \dots$  of submodules of  $M$  with  $L_{i+1}|L_i$  is essential submodule of  $M|L_i$  for each  $i$ , there exist a positive integer  $k$  such that  $L_{n+1} = L_n$  for  $n \geq k$ . A ring  $R$  is QE-Noetherian if it is QE-Noetherian  $R$ -module.

Clearly each Noetherian module is QE-Noetherian, further the class of QE-Noetherian modules contains the class of modules with ascending chain condition on essential submodules.

**Examples and Remarks 2.2**

- i) Every semi-simple module is QE-Noetherian. More generally, every module whose factors are semi-simple is QE-Noetherian.
- ii) Let  $T$  be a simple  $R$ -module and  $M = \sum M_i$  be infinite direct sum of  $M_i$  where  $M_i = T$  for each  $i$ . Then  $M$  is QE-Noetherian but not Noetherian module.
- iii) If  $M$  is QE-Noetherian  $R$ -module and  $N$  is any submodule of  $M$ , then  $M|N$  is QE-Noetherian.
- iv) Every cyclic module over QE-Noetherian ring is QE-Noetherian module
- v)  $Z_2^\infty$  is not QE-Noetherian  $Z$ -module.

If  $N$  is a submodule of QE-Noetherian module  $M$ , then  $N$  may not be QE-Noetherian. This motivates the following:

**Definition 2.3**

A non-zero submodule  $N$  of an  $R$ -module  $M$  is said to be pre-essential if  $N|L$  is essential submodule of  $M|L$  for each submodule  $L$  of  $N$ .

Clearly, every pre-essential submodule is essential but the converse may not be true. For example in the  $Z$ -module  $Z_{12}$ , the only essential submodule is  $2Z_{12}$ . Let  $L = 6Z_{12}$  and  $Z = 3Z_{12}$ , then it is easy to see that  $(2Z_{12}/6Z_{12}) \cap (3Z_{12}/6Z_{12}) = (0)$ , thus  $2Z_{12}$  is not pre-essential submodule.

**Lemma 2.4**

Let  $M$  be a QE-Noetherian  $R$ -module, then every pre-essential submodule  $N$  of  $M$  is QE-Noetherian.

**Proof**

Let  $N_1 \subseteq N_2 \subseteq N_3 \subseteq \dots$  be a.c. of submodules of  $N$  with  $N_{i+1}/N_i$  is essential submodule of  $N/N_i$  for each  $i$ . But  $N$  is pre-essential thus  $N_{i+1}/N_i$  is essential in  $M/N_i$ , hence there is a positive integer  $k$  such that  $N_{n+1} = N_n$  for all  $n \geq k$ .

It is clear that if  $M$  is uniform  $R$ -module, then  $M$  is Noetherian if and only if  $M$  satisfies a.c.c on essential submodules. On the other hand if  $M$  with the property that each pre-essential submodule of  $M$  is essential then  $M$  is QE-Noetherian if and only if  $M$  satisfy a.c.c on essential submodule.

**Proposition (2.5) :** If  $N$  is QE-Noetherian submodule of an  $R$ -module  $M$  and  $M/N$  is Noetherian then  $M$  is QE-Noetherian.

**Proof :** Let  $P_1 \subseteq P_2 \subseteq P_3 \dots$  be a.c. of submodules of  $M$  with  $P_{i+1} | P_i$  is essential of  $M/P_i$  for each  $i$ , then  $P_1 \cap N \subseteq P_2 \cap N \subseteq \dots$  is an a.c. of submodules of  $N$ . We claim that  $(P_{i+1} \cap N) | (P_i \cap N)$  is essential submodule of  $N | (P_i \cap N)$  for each  $i$ . For define  $\alpha : N | (P_i \cap N) \rightarrow M/P_i$  by  $\alpha(n + (P_i \cap N)) = n + P_i$ . Clearly  $\alpha$  is well - defined  $R$ -homomorphism. Then  $\alpha^{-1}(P_{i+1}|P_i)$  is essential submodule of  $N|(P_i \cap N)$ , but  $\alpha^{-1}(P_{i+1}|P_i) = (P_{i+1} \cap N) | (P_i \cap N)$ , there is a positive integer  $k$  such that  $P_{s+1} \cap N = P_s \cap N$  for all  $s \geq k$ . On the other hand there is positive integer  $n$  such that  $(P_{i+1} + N) | N = (P_i + N) | N$  for all  $t \geq n$ . Put  $a = \max \{k, n\}$  so  $P_{w+1} = P_w$  for all  $w \geq a$ .

In the following two theorems we established a characterization of semi-injective modules over QE-Noetherian ring analogous to that of Quasi-injective modules in [9].

**Theorem (2.6) :** Let  $M$  be a module over the QE-Noetherian ring  $R$  and  $S = \text{End}_R(E(M))$ , then for each  $f \in S$  with  $\ker(f)$  is an essential submodule of  $E(M)$  there is a positive integer  $n$  such that  $f^n(x) = 0$  for each  $x \in E(M)$ .

**Proof :** Let  $E_0 = 0$ ,  $E_1 = \ker(f)$  and  $E_{n+1} = f^{-1}(E_n \cap f(E))$ , then  $E_0 \subseteq E_1 \subseteq E_2 \subseteq \dots$  is a.c. of

submodule of  $E=E(M)$ . We claim that  $E_{n+1}|E_n$  is essential submodule of  $E|E_n$ , we shall prove this by induction on  $n$ . Clearly the statement is true for  $n=1$  since  $\ker(f)$  is essential in  $E$ . Suppose that  $E_k|E_{k-1}$  is essential in  $E|E_{k-1}$ , define  $\alpha: E|E_k \rightarrow E|E_{k-1}$  by  $\alpha(x+E_k) = f(x) + E_{k-1}$  for each  $x$  in  $E$ ,  $\alpha$  is well-known  $R$ -homomorphism, then  $\alpha^{-1}(E_k|E_{k-1})$  is essential in  $E|E_k$ . Let  $y \in E_{k+1}|E_k$ , then  $xy = e_{k+1} + E_k$  for some  $e_{k+1} \in E_{k+1}$  hence  $f(e_{k+1}) \in E_k \cap f(E)$ , therefore  $\alpha(y) = f(e_{k+1}) + E_{k-1} \in E_k|E_{k-1}$  so  $y$  in  $\alpha^{-1}(E_k|E_{k-1})$  conversely let  $z \in \alpha^{-1}(E_k|E_{k-1})$  and  $z = e + E_k$  for some  $e \in E$ , then  $\alpha(z) = \alpha(e + E_k) = f(e) + E_{k-1} \in E_k|E_{k-1}$ , thus  $f(e) \in E_k \cap f(E)$  and  $z \in E_{k+1}|E_k$ . Thus  $E_{k+1}|E_k|E_{k-1}$  is essential in  $E|E_k$ .

For each  $x \in E$ , let  $A = Rx$  by Remark (2.2) (iv).  $A$  is QE-Noetherian  $R$ -module. Put  $A_0=0$ ,  $A_1=A \cap \ker(f)$ , ...,  $A_n = A \cap E_n$ , then  $A_0 \subseteq A_1 \subseteq A_2 \subseteq \dots$  is an a.c. of submodules of  $A$ .

We claim that  $A_{n+1}|A_n$  is an essential submodule of  $A|A_n$ . For define  $\beta: (A \cap E) | (A \cap E_n) \rightarrow E|E_n$  by  $\beta(a + (A \cap E_n)) = a + E_n$  for each  $a \in A \cap E$ ,  $\beta$  is well-define  $R$ -homomorphism, by the first claiming  $E_{n+1}|E_n$  is essential submodule of  $E|E_n$ , therefore  $(A \cap E_{n+1}) | (A \cap E_n) = \beta^{-1}(E_{n+1}|E_n)$  is essential submodule of  $(A \cap E) | (A \cap E_n)$ . But  $A$  is QE-Noetherian, then there is a positive integer  $t$  such that  $A_{n+1} = A_n$  for all  $n \geq t$ . i.e  $A_{n+1}|A_n$  is essential submodule of  $A|A_n$  for all  $n \geq t$ . This is equivalent to  $A_n = A$  for all  $n \geq t$ , therefore  $A = A_n = A \cap E_n$  hence  $A \subseteq E_n$ , but  $x \in A$ , then  $f(x) \in E_{n-1} = f^{-1}(E_{n-2} \cap f(E))$  thus  $f^2(x) \in E_{n-2}$  and so on we have that  $f^n(x) = 0$ .

**Theorem (2.7) :** Let  $M$  be a module over QE-Noetherian ring  $R$ . Then  $M$  is semi-injective if and only if  $M$  is invariant over  $K$ .

**Proof :** By theorem (1.3) it is enough is show that  $J(S) M \subseteq M$ . Let  $f \in J(S)$ , then  $f$  has essential kernel, thus by theorem (2.6) there exists a positive integer  $n$  such that  $f^n(x) = 0$  for each  $x \in E(M)$ . In particular for each  $m \in M$  we have  $f^n(m - f(m)) = 0$ , thus  $f^{n+1}(m)$

$= f^n(m)$  using proposition (1.6) we have  $f(M) \subseteq M$ .

**Corollary (2.8) :** Let  $R$  be a Noetherian ring. Then an  $R$ -module is semi-injective if and only if  $M$  is invariant over  $K$ .

It is well-known that in Artinian ring the Jacobson radical is nil ideal. On the other hand a self-injective Noetherian ring is Artinian. However we have the following corollary which follows by theorem (2.6).

**Corollary (2.9) :** Let  $M$  be a module over the QE-Noetherian ring  $R$  and  $S = \text{End}_R(E(M))$ , then  $J(S)$  is nil ideal of  $S$ . In particular, if  $R$  is self-injective QE-Noetherian ring, then  $J(R)$  is nil.

$M$ . Harada in [7] gives a representation of quasi-injective module over Noetherian ring, he proved that each module is a direct sum of indecomposable quasi-injective modules. In the following part we consider semi-injective modules over Noetherian ring.

**Theorem (2.10) :** Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module and  $S = \text{End}_R(E(M))$  then  $f(M) \subseteq M$  for each idempotent  $f$  of  $S$ .

**Proof :** Let  $f (= f^2) \in S$ . We claim that  $f(M \cap f^{-1}(M)) \subseteq M \cap f^{-1}(M)$ . Let  $x \in f(M \cap f^{-1}(M)) \subseteq f(M) \subseteq M \cap f(E) \subseteq f(M) \cap M$ , then  $x = f(m) \in M$  for some  $m \in M$ .  $f(x) = f(f(m)) = f(m) = x \in M$ , hence  $x \in M \cap f^{-1}(M)$ . Therefore  $f: M \cap f^{-1}(M) \rightarrow M \cap f^{-1}(M)$ . Semi-injectivity of  $M$  induce an  $R$ -homomorphism  $h: M \rightarrow M$ . By injectivity of  $E(M)$ , there is  $g \in S$  such that  $g(M) = h(M) \subseteq M$ , also  $(g-f)(M \cap f^{-1}(M)) = 0$ . Since  $g(M) \subseteq M$  we have  $M \cap (g-f)^{-1}(0) \subseteq M \cap f^{-1}(M) \subseteq \ker(g-f)$ , thus  $(g-f)(M) \cap M = (0)$  but  $M$  is essential in  $E(M)$ , then  $(g-f)(M) = 0$  and hence  $f(M) = g(M) \subseteq M$ .

**Proposition (2.11) :** Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module and  $E$  be its injective envelope. If  $E = \bigoplus_{\alpha \in \Lambda} E_\alpha$ , then  $M = \bigoplus_{\alpha \in \Lambda} (M \cap E_\alpha)$ .

**Proof :** Let  $\pi_\alpha: E \rightarrow E_\alpha$  be the projection of  $E$  onto  $E_\alpha$  by theorem (2.10)  $\pi_\alpha(M) \subseteq M$  for each  $\alpha$ . Now for each  $x \in M \subseteq E$ .  $x = (e_1, \dots, e_\alpha, 0, \dots)$  so  $x = \sum_{\alpha \in \Lambda} (\pi_1(x), \pi_2(x), \dots, \pi_\alpha(x), 0, \dots)$  belongs to  $\bigoplus_{\alpha \in \Lambda} (M \cap E_\alpha)$ . Thus  $M \subseteq$

$\bigoplus_{\alpha \in \Lambda} (M \cap E_\alpha)$ . The other direction is obvious.

**Theorem (2.12) :** Let  $M$  be a semi-injective module over Noetherian ring  $R$ . Then  $M$  is a direct sum of indecomposable semi-injective modules.

**Proof :**  $E(M) = \bigoplus \overline{M}_i$  by [10] where  $\overline{M}_i$  is indecomposable injective  $R$ -module. Put  $M_i = M \cap \overline{M}_i$ , then by (2.11)  $M = \bigoplus M_i$ . Hence  $M_i$  is a direct summand of  $M$  for each  $i$ , thus  $M_i$  is semi-injective, it is clear that  $M_i$  is indecomposable.

**Proposition (2.13) :** Every indecomposable semi-injective module is uniform.

**Proof :** Let  $M$  be an indecomposable semi-injective module. We claim that  $E(M)$  is indecomposable, if not, then  $E(M) = N_1 \oplus N_2$  for some non-zero submodules  $N_1, N_2$  of  $E(M)$ . By proposition (2.11)  $M = (N_1 \cap M) \oplus (N_2 \cap M)$  which contradicts the hypothesis. Thus  $E(M)$  indecomposable and therefore  $M$  is uniform.

The following corollary follows immediately from theorem (2.12) and proposition (2.13).

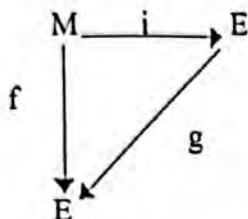
**Corollary (2.14) :** Every semi-injective module over Noetherian ring  $R$  is a direct sum of uniform semi-injective modules.

### § 3. Semi-injectivity versus Quasi-injectivity

In this section we investigate conditions under which semi-injective modules are quasi-injective.

**Proposition (3.1) :** Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module,  $E=E(M)$  be its injective envelope and  $S = \text{End}_R(E)$  with  $J(S) M \subseteq M$ . If there is an essential epimorphism  $f$  from  $M$  onto  $E$ , then  $M$  is injective.

**Proof :** Consider the following diagram



where  $i$  is the inclusion mapping of  $M$  into  $E$ . Injectivity of  $E$  implies that there is  $g \in S$  such that  $goi = f$ . By hypothesis there exists an essential submodule  $N$  of  $M$  such that  $f(N) \subseteq N$ . Therefore  $g(N) = goi(N) = f(N) \subseteq N$ . So  $g \in K$  and by theorem (1.3) we have  $g(M) \subseteq M$ . Thus  $E=f(M) = goi(M) = g(M) \subseteq M$ , therefore  $M=E$  and  $M$  is injective.

Proposition (3.1) and theorem (2.7) give the following result

**Corollary (3.2) :** Let  $R$  be a QE-Noetherian ring such that there exists an essential epimorphism of an  $R$ -module  $M$  onto its injective envelope. Then the following statements are equivalent

- (1)  $M$  is semi-injective.
- (2)  $M$  is quasi-injective.
- (3)  $M$  is injective.

**Proposition (3.3) :** Let  $M$  be an  $R$ -module such that each element of  $S$  is idempotent, then following are equivalent

- (1)  $M$  is semi-injective.
- (2)  $M$  is quasi-injective.

**Proof :** Assume that  $M$  is semi-injective, since for each  $\alpha \in S$ ,  $\alpha(M) \subseteq M$  by theorem (2.10), then  $M$  is invariant under element of  $S$ . Hence  $M$  is quasi-injective.

**Proposition (3.4) :** Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module and  $J(S) M \subseteq M$ . If  $M$  contains an essential quasi-injective submodule, then  $M$  is quasi-injective.

**Proof :** Let  $N$  be an essential quasi-injective submodule of  $M$ , then  $N$  is an essential submodule of  $E$ , hence  $E(M)=E(N)$  thus  $\text{End}_R(E(N)) = S$ , but  $N$  is quasi-injective, then  $SN \subseteq N$ . For each  $\alpha \in S$  we have just shown that  $\alpha(N) \subseteq N$  so  $\alpha \in K$ . Thus  $K=S$ . By theorem (1.3) we have  $SM=KM \subseteq M$ . Therefore  $M$  is quasi-injective.

**Corollary (3.5) :** Every semi-injective module over QE-Noetherian ring with non-zero socle is quasi-injective.

**Proposition (3.6) :** Every finitely generated semi-injective module over an Artinian ring is quasi-injective.

**Proof :** Let  $M$  be a finitely generated module over Artinian ring  $R$ , then  $R$  is QE-Noetherian. By theorem (2.7) we have  $J(S) M \subseteq M$ . Since  $R$  is Artinian, then it has non-zero socle. Corollary (3.5) implies that  $M$  is quasi-injective.

It is well-known that a ring  $R$  is quasi-Frobenius if it is Noetherian and self-injective. In the following we give another characterization of quasi-Frobenius rings in terms of self semi-injective rings.

**Proposition (3.7) :** The following conditions are equivalent for a ring  $R$

- (1)  $R$  is quasi-Frobenius.
- (2)  $R$  is Artinian and self semi-injective.

**Proof :** (1)  $\Rightarrow$  (2) It follows from the fact that every quasi-Frobenius ring is Artinian.

(2)  $\Rightarrow$  (1) Assume that  $R$  is Artinian self semi-injective ring, then by proposition (3.6) we have  $R$  is self-injective and hence quasi-Frobenius.

A submodule  $N$  of an  $R$ -module  $M$  is said to be stable if  $\alpha(N) \subseteq N$  for each  $\alpha \in$

$\text{Hom}_R(N, M)$ . The module  $M$  is called fully stable if all its submodules are stable<sup>[1]</sup>. This is equivalent to saying that all its cyclic submodule are stable.

**Proposition (3.8)** : Let  $M$  be a semi-injective  $R$ -module, then every essential quasi-injective submodule of  $M$  is stable.

**Proof** : Let  $N$  be an essential quasi-injective submodules of  $M$  and  $f : N \rightarrow M$  be any  $R$ -homomorphism. Let  $N' = f^{-1}(N)$ , then  $f|_{N'} : N' \rightarrow N$  can be extended to  $R$ -endomorphism  $g$  of  $N$ . Since  $M$  is semi-injective, there exists  $h : M \rightarrow M$  which extends  $g$  and hence  $f|_N$ . We claim that  $(h-f)(N) = (0)$ , if not, then  $(h-f)(N) \cap N \neq (0)$ . Thus there are non-zero elements  $x$  and  $y$  in  $N$  such that  $y = (h-f)(x) = h(x) - f(x) = g(x) - f(x)$ , thus  $f(x) = g(x) - y \in N$  hence  $x \in N'$  so  $y = -$  which is a contradiction.

**Corollary (3.9)** : Every quasi-injective submodules of semi-injective modules is stable.

**Propositin (3.10)** : Every essential fully stable submodule of a semi-injective module is quasi-injective.

**Proof** : Let  $N$  be any essential fully stable submodule of semi-injective  $R$ -module  $M$ . For each essential submodule  $L$  of  $N$  and each  $R$ -homomorphism  $f : L \rightarrow N$ , then  $L$  is essential in  $M$ . Full-stability of  $N$  implies that  $f(L) \subseteq L$ .  $f : L \rightarrow L$  extends and  $R$ -endomorphism  $g$  of  $M$ . Again full stability of  $N$  implies that  $g|_N : N \rightarrow N$  which estends  $f$ .

**Corollary (3.11)** : let  $M$  be a semi-injective module over the QE-Noetherian ring  $R$ . If  $M$  contains an essential fully stable submodule, then  $M$  is quasi-injective.

## BREFERENCES

1.M.S. ABBAS : On fully stable modules, PH. D. thesis, Univ. of Baghdad (1990).

- 2.N.V. Dung, D.V. Huynh, R. Eisbauer : Quasi-injective modules with a.c.c. on essential submodules, Arch. Math., 153 (1989), 252-255.
- 3.B.Fdcmann and A. schopf : Ueber injective Modules . Archiv der Math. 4 (1953) 75-78.
- 4.C. Faith : Lectures on injective modules and quotient rings, springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, (1967).
- 5.A.W. Goldie : Torsion free modules and rings, J. Algebra, 1 (1964) , 264-287.
- 6.R.R. Hallett : Injective modules and their generalization, Ph.D. thesis, Univ. of British Columbia, Vancouver, Dec. (1971).
- 7.M. harada : Note on quasi-injective module, Osaka J. Math., 2 (1965) 351-356.
- 8.S.K. jain, S. Singh : Quasi-injective and pseudo-injective modules, Canada Math., Bull., 18(1975) 359-366.
- 9.R.E. Johnson, E.T. Wong: Quasi-injective modules and irreducible rings, J. London Math. Soc., 39 (1961) 260-268.
- 10.Matlis : Injective modules over Noetherian rings, pacific J. Math., 8 (1958). 511-520.

## Derivation of Some Modified Sine-Gordon Equations and Their Exact Solutions, Using Painleve' Equations

INAAM A. MALOKI AND SHAHEED N. SHIMASAWI

Department of Mathematics University of Al-Mustansiriya, Baghdad-Iraq

(Received Apr. 18, 1999; Accepted Nov. 15, 1999)

### الخلاصة

ان عددا كبيرا من المعادلات الجزئية غير الخطية لا يمكن ايجاد الحل التام لها الا بعد اجراء تحويل معين، هذا التحويل قد يكون للمتغيرات المستقلة او للمتغيرات المعتمدة او لكليهما. ان معادلات تفاضلية جزئية جديدة غير خطية يمكن اختزالها الى معادلات تفاضلية اعتيادية من النوع (P) تم اشتقاقها، في هذا البحث من خلال احد التحويلات المهمة لمعادلة ساين جوردين (SGE)

$$\phi_{xx} - \phi_{tt} = \sin \phi$$

ورضعت الحلول التامة لها ولمعادلات اخرى اشتقت منها. كما تم اشتقاق التحويل العام لعمل SGE في صيغتها المعروفة الاخرى.

### ABSTRACT

A large number of nonlinear partial differential equations, (NPDEs) while not exactly solved in their original forms, may be solvable after a transformation. The transformation can involve only the independent variable, only the dependent ones, or more usually, a combination. In this paper new NPDEs, reducible to the ordinary differential equations (ODEs) of the p-type, are derived through a transformation for Sine Gordon equation (SGE). Exact solutions to these equations and other equations derived from them, are presented. The general transformation for SGE to be in other known forms, is found.

### INTRODUCTION

Interest in nonlinear or, to be more precise, quasilinear wave equations has focused in recent years on the Sine Gordon equations (SGE),

$$\phi_{xx} - \phi_{tt} = \sin \phi \quad \dots (1)$$

Where  $\phi_{(x,t)}$  is a scalar field in one space and one time (t) dimension and the subscripts denote partial derivatives of  $\phi$  with respect to x and t. This equation has many applications in physics<sup>(4)</sup>. It was discovered that it belong to a special kind of NPDEs, possessing "soliton" solutions. Hence most of the research done on the SGE and its applications has been concerned, with the

soliton solution using three kinds of transformations:

#### 1. Independent Variable Transformation (IVT)

It is interesting to note that, by simple change of independents<sup>(7)</sup>, the SGE can be transformed in to

$$\phi_{xt} = \sin \phi \quad \dots (2)$$

which was studied many years ago in connection with the theory of pseudospherical surfaces or in to:

$$\phi_{xt} + \phi_{tt} = \sin \phi \quad \dots (3)$$

which has been useful as a guide to solution of the self induced transparency equations.

Interesting and important solutions to the SGE are the travelling waves or "waves of permanent profile" of the form,

$$\phi = \phi(x-ut)$$

such solutions are functions of the single independent variable<sup>(2)</sup>,

$$\zeta = x - ut, \text{ u is constant}$$

Thus (1) reduces to the ODE

$$\frac{d^2\phi}{d\zeta^2} (1-u) = \sin \phi$$

Similarity solution of SGE,

$$\phi = f(s); S = \frac{1}{2\alpha} \left[ \frac{\alpha}{2} (x^2 - t^2) - \beta x + \delta t - \frac{1}{2\alpha} (\delta^2 - \beta^2) \right]$$

where  $\alpha, \beta$  and  $\delta$  are constants has been investigated by [5]

## 2. Depended Variable Transformations (DVT)

Let  $\Psi(x,t)$  be the new dependent variable, using the DVT,  $\phi = g(\Psi)$  equation (1) will be

$$(\Psi_{xx} - \Psi_{tt})g' + (\Psi^2_x - \Psi_t^2)g'' = \sin g \dots (4)$$

where (') indicates the derivative of  $g$  with respect to  $\Psi$ . Equation (4) can be considered either as an ODE for  $g$  or a PDE for  $\Psi$ . Osborne<sup>(6)</sup> for example had used (4) as an ODE and found the general form of  $g$  that makes SGE separable. Lamb used the following transformation<sup>(2)</sup>,

$$g(\Psi) = 4 \tan^{-1} \Psi; \Psi(x,t) = \frac{X(x)}{T(t)}$$

where  $X$  and  $T$  satisfy the following ODEs:

$$X'^2 = kX^4 + mX^2 - n \dots (5a)$$

$$T'^2 = -kT^4 + (m-1)T^2 - n \dots (5b)$$

where  $k, m$  and  $n$  are arbitrary constants. Lamb's transformation became of great importance, many solutions result as special cases of this transformation, here are some:

i) the solitary wave solution:

$$\text{if } k=n=0 \text{ and } m = \frac{1}{1-c^2}$$

then

$$\phi = 4 \tan^{-1} \left[ \exp\left(\pm \frac{x-ct}{\sqrt{1-c^2}}\right) \right] \dots (6)$$

the parameter  $c$  denotes the constant velocity of the soliton. This velocity can take any value between -1 and 1, i.e.  $-1 < c < 1$ <sup>(7)</sup>

If  $k=0, m=n$ , then

$$\phi = 4 \tan^{-1} \frac{c \sinh(x/\sqrt{1-c^2})}{\cosh(ct/\sqrt{1-c^2})} \dots (7)$$

this solution is found by Perring and Skyrme in 1962<sup>(8)</sup>.

There are other solutions like soliton-anti soliton solution:

$$\phi = 4 \tan^{-1} \frac{\sinh(ct/\sqrt{1-c^2})}{c \cosh(x/\sqrt{1-c^2})} \dots (8)$$

## 3. Mixed variable transformations (MVT):

Using the (IVT)  $z = tx$ , when SGE in light cone coordinates (2), we have

$$z\phi'' + \phi' - \sin \phi = 0$$

if  $w = \exp(i\phi)$ , then

$$w'' - \frac{1}{w} w'^2 + \frac{1}{2} w - \frac{1}{2z} (w' - 1) = 0$$

This is PIII equation, (') means derivative with respect to  $z$

## Derivation of some modified formulas for the SGE using P-type equations

Before we discuss the derivation of some modified equations of the SGE, we draw upon the fact discussed extensively by Ablowitz<sup>(1)</sup> and others that there is a close connection between soliton bearing nonlinear equations on one hand, and a nonlinear ordinary differential equations with out movable critical points (P-Type equations) on the other hand. The general form for a second order ODE of P-type is<sup>(3)</sup>:

$$w'' = L(z,w)w'^2 + M(z,w)w' + N(z,w) \dots (9)$$

where  $L=0$  or one of the following forms:

$$L(z,w) = -\frac{m+1}{m(w-a_1)} + \frac{m-1}{m(w-a_2)} \quad m \geq 1$$

$$L(z,w) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^4 \frac{1}{w-a_n}$$

$$L(z,w) = \frac{2}{3} \sum_{n=1}^2 \frac{1}{w-a_n}$$

$$L(z,w) = \frac{3}{4} \left( \frac{1}{w-a_1} + \frac{1}{w-a_2} \right) + \frac{1}{2} \left( \frac{1}{w-a_3} \right)$$

$$L(z,w) = \frac{1}{6} \sum_{n=1}^3 \frac{n+2}{w-a_n}$$

where  $a_n$  arbitrary functions of  $z$ . this is the first necessary condition. The second necessary condition is that the coefficients  $M$  and  $N$  must be of the forms

$$M(z, w) = \frac{m(z, w)}{l(z, w)}, \quad N(z, w) = \frac{n(z, w)}{l(z, w)}$$

where  $l(z, w)$  is a polynomial of degree  $l$  which is the least common denominator of the partial fractions of  $L$ .

In this section, new NPDES are derived through the transformation

$$\phi = 4 \tan^{-1} u(X); \quad X = \frac{x - ct}{\sqrt{1 - c^2}} \quad \dots (10)$$

Let, the general form of modified SGEs be:

$$\phi_{xx} - \phi_u - \sin \phi = H(x, t, \phi, \phi_x, \phi_t) \quad \dots (11)$$

it is clear that, when  $H=0$ , eq. (11) will be SGE.

Remark 1: using (10) in (11) then the variable  $x$  and  $t$  either do not appear explicitly in  $H$  or they appear in the form  $x-ct$ .

Remark 2: The effect of (10) in  $\phi_x$  or  $\phi_t$  is the same (up to constant).

Hence we consider  $H$  as a function of  $\phi$  and  $\phi_x$  only. Consequently, eq. (11) will be:

$$\phi_{xx} - \phi_u - \sin \phi = H(\phi, \phi_x) \quad \dots (12)$$

which is transformed to the ODE

$$u_{xx} = \frac{2uu_x^2}{1+u^2} + \frac{u(1-u^2)}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F(u, u_x) \quad (13)$$

where  $F$  is the resulting function of (10) in  $H(\phi, \phi_x)$ . The question then is, can  $F$  be chosen such that the two necessary conditions for the absence of movable critical points will be satisfied?. For the first necessary condition, eq. (13) must be written as the general form of the equation free from movable critical points (9), so let

$$F(u, u_x) = F_1(u)u_x^2 + F_2(u)u_x + F_3(u) \quad \dots (14)$$

Substituting (14) in (13) yields:

$$u_{xx} = \left( \frac{2u}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_1 \right) u_x^2 + \left( \frac{1+u^2}{4} F_2 \right) u_x + \left( \frac{u(1-u^2)}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_3 \right) \quad \dots (15)$$

comparing equation (15) by equation (9) yields:

$$L(X, u) = \frac{2u}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_1 \quad \dots (16a)$$

$$M(X, u) = \frac{1+u^2}{4} F_2 \quad \dots (16b)$$

$$N(X, u) = \frac{u(1-u^2)}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_3 \quad \dots (16c)$$

there are two cases:

Case 1 ( $L=0$ ):

If  $L = 0$  then  $M, N$  must be two polynomials of  $u$  of degrees one and three respectively, i.e.:

$$\frac{2u}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_1 = 0 \quad \dots (17a)$$

$$\frac{1+u^2}{4} F_2 = A_1 u + B_1 \quad \dots (17b)$$

$$\frac{u(1-u^2)}{1+u^2} + \frac{1+u^2}{4} F_3 = C_1 u^3 + D_1 u^2 + E_1 u + F_1 \quad (17c)$$

Where  $A_1, B_1, C_1, D_1, E_1, F_1$  are arbitrary functions of  $X$  only, and  $A_1, C_1$  take the following special values:

a)  $A_1 = 0, C_1 = 0$     b)  $A_1 = -2, C_1 = 0$

c)  $A_1 = -3, C_1 = -1$     d)  $A_1 = -1, C_1 = 1$

e)  $A_1 = 0, C_1 = 2$

using eqs. (17), we calculate  $F(u, u_x)$  in (14) as:

$$F(u, u_x) = \frac{1}{2} u \left( \frac{4u_x}{1+u^2} \right)^2 + (A_1 u + B_1) \frac{4u_x}{1+u^2} + \frac{4u(1-u^2)}{4(C_1 u^3 + D_1 u^2 + E_1 u + F_1)(1+u^2)^2} \quad (18)$$

Consequently

$$H(\phi, \phi_x) = \frac{c^2 - 1}{2} \phi_x^2 \tan \frac{\phi}{4} + (A \tan \frac{\phi}{4} + B) \phi_x + \frac{C \tan^3 \frac{\phi}{4} + D \tan^2 \frac{\phi}{4} + E \tan \frac{\phi}{4} + F}{\sec^2 \frac{\phi}{4}} - \sin \phi \quad (19)$$

where  $A, B, C, D, E, F$  are the new constants,  $A$  and  $C$  take special values depending on the special values given above which give ten forms of  $H$  leading to ten PDEs reducible to the P-Type equations.

Let us, first, consider the case

(1)  $A=B=C=D=E=F=0$ , then

$H(\phi, \phi_x)$  will be  $\frac{c^2}{2} \phi_x^2 \tan \frac{\phi}{4} - \sin \phi$  and this

means that, under the transformation (10) the first PDE obtained is :

$$\phi_{xx} - \phi_u = \frac{c^2 - 1}{2} \phi_x^2 \tan \frac{\phi}{4} \quad \dots (20)$$

and this will be reducible to the following P type eq.:

$$u_{xx} = 0 \quad \dots (21)$$

The general solution for (21) in terms of  $x$  and  $t$  is

$$u(x, t) = k_1 x + k_2 t + K_3$$

where  $k_i$  ( $i=1,2,3$ ) are arbitrary constants. Exact solution for (20) is  $\phi(x,t) = 4 \tan^{-1}(k_1x + k_2t + k_3)$  From the transformation (10) we obtain

$$u = \frac{4u_x}{\sqrt{1-c^2}(1+u^2)}$$

since the first integral of (21) is  $u_x = k$ , where  $k$  is arbitrary constant, this leads to

$$u = \frac{4}{\sqrt{1-c^2}} \cos^2 \frac{\phi}{4} \quad (22)$$

Substituting (22) in eq. (20), we obtain the second PDE

$$\phi_{xx} - \phi_{tt} = -k^2 \left( \sin \phi + 2 \sin \frac{\phi}{4} \right) \quad (23)$$

This is a double SGE, when  $k^2 = \pm 1$ . This equation is of important application in nonlinear optics. An exact solution for (23) can be obtained if we integrate (22) as

$$\sec^2 \frac{\phi}{4} d\phi = \frac{4k}{\sqrt{1-c^2}} dx$$

$$\tan \frac{\phi}{4} = \frac{kx}{\sqrt{1-c^2}} + f(t)$$

where  $f$  is arbitrary function of  $t$ , so the exact solution will be

$$\phi(x,t) = 4 \tan^{-1} \left\{ \frac{kx}{\sqrt{1-c^2}} + f(t) \right\}$$

The results obtained from other cases are shown in the following.

2)  $A = B = C = F = 0$  and  $D = 24$ .

$$\text{PDE: } \phi_{xx} - \phi_{tt} = \frac{c^2-1}{2} \phi_x^2 \tan \frac{\phi}{4} - 12 \cos \frac{\phi}{2} + 12 \quad (24)$$

P-type ODE :  $u_{xx} = 6u^2$

Exact solution of eq. (24) :

$$\phi(x,t) = 4 \tan^{-1} [\wp(c+k_1x+k_2t, o, k)]$$

where  $c, k, k_1, k_2$  are arbitrary constants and  $\wp$  is a Weierstrass's elliptic function. 2<sup>nd</sup> PDE :

$$\phi_{xx} - \phi_{tt} = 4 \cos \frac{\phi}{4} - 4 \cos \phi - 2k \sin \frac{\phi}{2} - k \sin \phi \quad (25)$$

Exact solution of eq. (25) :

$$\phi(x,t) = 4 \tan^{-1} \left[ \left( \frac{x}{\sqrt{1-c^2}} + h(t) \right)^{-1} \right]$$

Case 2 ( $L \neq 0$ ) In this case  $L$  takes many forms leading to forty P-type equation. As an example if we compare eq. (13) by the following P-type eq.

$$u_{xx} = \frac{1}{u} u_x^2$$

we have

$$F(u, u_x) = \frac{4(1-u^2)}{u(1+u^2)^2} u_x^2 - \frac{4u(1-u^2)}{(1+u^2)},$$

$$H(\phi, \phi_x) = \frac{1-c^2}{2} \phi_x^2 \cot \frac{\phi}{2} - \sin \phi$$

1<sup>st</sup> PDE :

$$\phi_{xx} - \phi_{tt} = \frac{1-c^2}{2} \phi_x^2 \cot \frac{\phi}{2} \quad (26)$$

Exact solution of eq. (26) :

$$\phi = 4 \tan^{-1} \left\{ k_1 \exp \left[ k \left( \frac{x-ct}{\sqrt{1-c^2}} \right) \right] \right\}$$

where  $k_1, k_2$  are arbitrary constants

$$2^{\text{nd}} \text{ PDE : } \phi_{xx} - \phi_{tt} = k^2 \sin \phi \quad (27)$$

Exact solution of eq. (27) :

$$\phi = 4 \tan^{-1} \left\{ \exp \left( \frac{kx}{\sqrt{1-c^2}} + g(t) \right) \right\}$$

### 3. General Transformation for SGE :

The SGE (1) can be transformed into (2) or (3) by using general linear transformation in the following theorem:

#### Theorem

Suppose that  $\zeta = \zeta(x,t)$ ,  $\eta = \eta(x,t)$  are the new independent variables.

(1) Equation (1) will be of the form (2) iff,

$$\zeta = k_1(x + \epsilon_1 t) + c_1; \epsilon_1 = \pm 1 \quad (28a)$$

$$\eta = \frac{1}{4k_1}(x + \delta_1 t) + d_1; \delta_1 = \pm 1 \quad (28b)$$

where  $k_1, c, d_1$  are arbitrary constants and  $\epsilon_1, \delta_1 = -1$ ,

(ii) Equation (1) will be of the form (3) iff

$$\zeta = \frac{1}{2(k_2 - \epsilon_2 \delta_2 \sqrt{k_2^2 - 1})} (x + \epsilon_2 t) + c_2 \quad (29a)$$

$$\eta = k_2 x + \delta_2 \sqrt{k_2^2 - 1} t + d_2 \quad (29b)$$

where  $k_2, c_2, d_2$  are arbitrary constant and  $\epsilon_2 = \pm 1, \delta_2 = \pm 1$

Proof:

By using the new independent variable  $\zeta, \eta$  for SGE, we obtain

$$(\zeta_x^2 - \zeta_t^2) \phi_{\zeta\zeta} + (\eta_x^2 - \eta_t^2) \phi_{\eta\eta} + (2\zeta_x \eta_x - 2\zeta_t \eta_t) \phi_{\zeta\eta} + (\zeta_{xx} - \zeta_{tt}) \phi_{\zeta} + (\eta_{xx} - \eta_{tt}) \phi_{\eta} = \sin \phi \quad (30)$$

To prove (i) comparing equation (30) and equation (2) :

$$\zeta_x^2 - \zeta_t^2 = 0 \quad (31a)$$

$$\zeta_{xx} - \zeta_{tt} = 0 \quad (31b)$$

$$\eta_x^2 - \eta_t^2 = 0 \quad (31c)$$

$$\eta_{xx} - \eta_{tt} = 0 \quad (31d)$$

$$\zeta_x \eta_x - \zeta_t \eta_t = \frac{1}{2} \quad (31e)$$

the general solution for (31a) and (31c) are respectively :

$$\zeta = F_1(x + \epsilon_1 t) \quad ; \epsilon_1 = \pm 1 \quad (32)$$

$$\eta = G_1(x + \delta_1 t) \quad ; \delta_1 = \pm 1 \quad (33)$$

where  $F_1, G_1$  are arbitrary functions of  $x + t$  or  $x - t$  and this lead to satisfy (31b) and (31d). While equation (31e) leads to  $\epsilon_1 \delta_1 = -1$  and :

$$\frac{dF_1}{d(x - \epsilon_1 t)} \cdot \frac{dG_1}{d(x + \delta_1 t)} = \frac{1}{4} \quad (34)$$

This means

$$\frac{dF_1}{d(x + \epsilon_1 t)} = k_1 \quad (35a)$$

$$\frac{dG_1}{d(x + \delta_1 t)} = \frac{1}{4k_1} \quad (35b)$$

where  $k_1$  is arbitrary constant.

By solving (35a), (35b) and substituting in (32), (33) yields that  $\zeta$  and  $\eta$  satisfy (28a) and (28b) respectively.

To Proof (ii),

Comparing equation (30) and equation (3) we obtain the relations (31) it self accept the relation (31c) which it takes the form :

$$\eta_x^2 - \eta_t^2 = 1 \quad (31c')$$

the general solution for (31a) and (31c') at respectively:

$$\zeta = F_2(x + \epsilon_2 t) \quad ; \epsilon_2 = \pm 1 \quad (36)$$

$$\eta = kx + \delta_2 \sqrt{k^2 - 1} t + d_2 \quad ; \delta_2 = \pm 1 \quad (37)$$

where  $F_2, G_2$  are arbitrary functions of  $x + t$  or  $x - t$  and  $k_2$  is arbitrary constant.

The equation (31e) leads to :

$$\frac{dF_2}{d(x + \epsilon_2 t)} = \frac{1}{2(k_2 - \epsilon_2 \delta_2 \sqrt{k_2^2 - 1})} \quad (38)$$

solving (38) and substituting in (36) yield that  $\zeta$  and  $\eta$  satisfy (29a) and (29b) respectively

Remark :

In (i) :

$$\zeta = \frac{1}{2} (x + t)$$

$$\eta = \frac{1}{2} (x - t)$$

In (ii)

$$\zeta = \frac{1}{2} (x + t)$$

$$\eta = x$$

## REFERENCES

1. ABLOWITZ, M. J., RAMANI, A. and SEGUR, H., Lettere Al Nuovo Cimento, Vol. 23, No. 9, pp. 333-338 (1978).
2. BARONE, A., ESPSITO, F., MAGEE, C.J. and SCOTT, A.C., Rivista Del Nuovo Cimento Vol. 1, No.2, pp. 227-267 (1971).
3. DAVIS, H.T., Introduction to Nonlinear Differential and Integral Equations, Dover publ. New York, (1962).
4. KLEIN, J.J., Geometrical interpretation of the solutions of the Sine-Gordon equation J. Math. Phys. Vol. 29, No. 9 (1985), p. 2181.
5. LAKSHMANAN, M. and KALIAPPAN, P., Lie transformation, nonlinear evolution equations, and painleviforms. J. Math. Phys. Vol. 24, No. 4 (1983). pp. 795-803.
6. OSBORNE, A.D. and STUART, A.E.G., On the Separability of the Sine-Gordon Equation and Similar Quasilinear Partial Differential Equations. II Dependent and

Independent variable Transformations, J. math. Phys. Vol. 21, No. 4, (1980) pp. 726-734.

7. SCOTT, A.C., CHU, Y.F. and MCLAUGHLIN, D.W., The solutions : A New concept in Applied Science, Proc. IEEE, Vol. 61, No. 10, (1973), pp. 1443-1483.
8. WHITHAM, G.B. Linear and Nonlinear Waves, Wiley-Inter Science Publ. John Wiley and Sons, New York (1973).

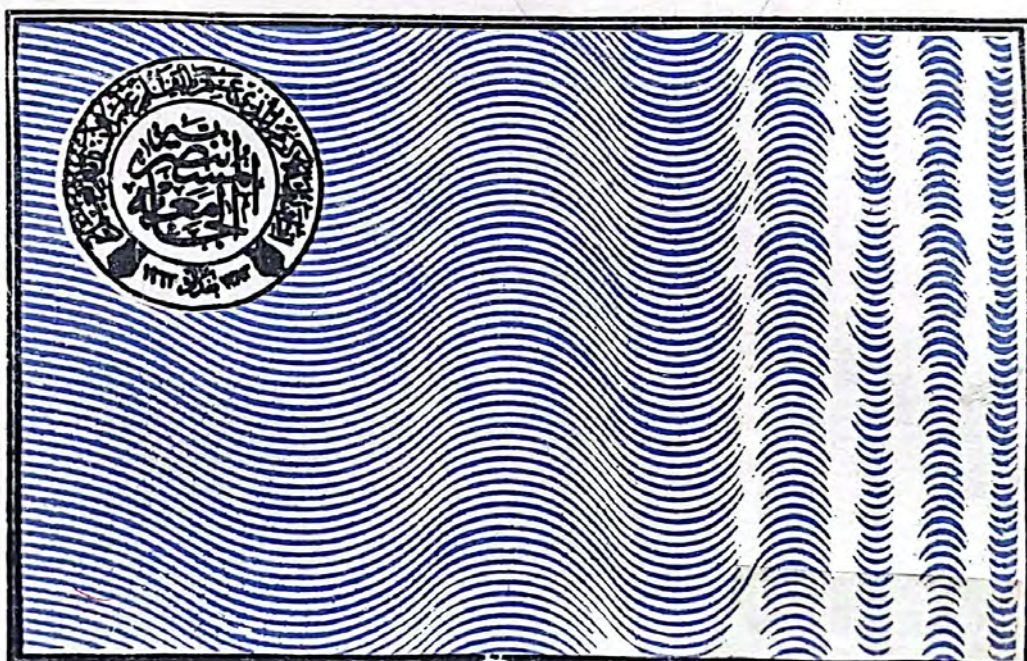
كشافة  
٤٣/د

الجامعة المستنصرية  
كلية العلوم

١٤٩٠  
٤٩

مجلة

علوم المستنصرية



جلد  
١  
٢  
سنة:  
١٩٩٩

مجلة علمية دورية تصدرها كلية العلوم في الجامعة المستنصرية  
تتكون كالة المراسلات الى : سكرتير هيئة تحرير مجلة علوم المستنصرية  
كلية العلوم - الجامعة المستنصرية  
الوزيرية - بغداد - جمهورية العراق  
تلکس : ٢٥٦٦ (مسباد - عراق)

هاتف : ٤١٦٨٤٩١ أو ٤١٦٨٥٠٠ (بدالة) خط ٢٧٦

١٩٩٩  
مجلة علوم المستنصرية  
١٣/د  
٤٣/د

مدير التحرير  
الدكتور عبد الواحد باقر  
أستاذ - علوم حياة

رئيس التحرير  
الدكتور رعد كاظم المصلح  
أستاذ مساعد - كيمياء

### هيئة التحرير

أستاذ - كيمياء	الدكتور رضا إبراهيم البياتي
أستاذ مساعد - حاسبات	الدكتور عبد السميع عبد الرزاق الجنابي
أستاذ مساعد - رياضيات	الدكتور علي حسن جاسم
أستاذ مساعد - أنواع جوية	الدكتور قيس جويل لطيف
أستاذ مساعد - فيزياء	الدكتور ماشم حميد جواد

١. تقوم المجلة بنشر البحوث الرصينة التي لم يسبق نشرها في مكان اخر بعد احضاءها للتقويم العلمي من قبل مختمين وبأي من اللغتين العربية او الانجليزية.
٢. يقدم الباحث او الباحثون طلبا تحريريا لنشر البحث في المجلة على ان يكون - وفقا بثلاث نسخ من البحث مطبوعة على الالة الكاتبة بترك فراغين (double space) بين سطر واخر على ورق ابيض قياس (A4) من النوع الجيد وتترك مسافة (٢,٥) سم على جانبي كل صفحة.
٣. يطبع عنوان البحث واسماء الباحثين (كاملة) وعناوينهم باللغتين العربية والانجليزية على ورقة منفصلة شرط ان لا تكتب اسماء الباحثين وعناوينهم في اي مكان اخر من البحث وتعاد كتابة عنوان البحث فقط على الصفحة الاولى من البحث.
٤. تكتب اسماء الباحثين كاملة بحروف كبيرة (capital) في حالة استخدام اللغة الانجليزية وكذلك الحروف الاولى فقط من الكلمات (عدا حروف الجر والاضافة) المكونة لعنوان البحث، وتكتب عناوين الباحثين بحروف اعبادية صغيرة (small letters).
٥. تقدم خلاصتان وفتتان لكل بحث، احدهما بالعربية والاخرى بالانجليزية وتطبع على ورقتين منفصلتين بما لا يزيد على (٢٥٠) كلمة لكل خلاصة.
٦. تقدم الرسوم التوضيحية منفصلة عن مسوده البحث، وترسم على ورق شفاف (tracing paper) بألحبر الصيني الاسود، وترفق ثلاث صور لكل رسم وتكتب المعلومات عنها على ورقة منفصلة، ولا يجوز تكرار المعلومات ذاتها في الرسوم والجداول في وقت واحد الا اذا اقتضت ضرورة المناقشة ذلك.
٧. 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 المجالات.
٨. يفضل قدر الامكان تسلسل البحث ليتضمن العناوين الرئيسة الاتية: المقدمة، طرائق العمل، النتائج والمناقشة، الاستنتاجات، المصادر، وتوضع هذه العناوين دون ترقيم في وسط الصفحة ولا يوضع تحتها خط وتكتب بحروف كبيرة عندما تكون بالانجليزية.
٩. يتبع الاسلوب الاتي عند كتابة المصادر على الصفحة الخاصة بالمصادر، ترقم 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 والمؤلفين عنوان الكتاب، الطبعة، الصفحات، (السنة)، الشركة الناشرة، مكان الطبع.

سنة : ١٩٩٩

سنة : ١٩٩٩

العدد : ٢٢

رقم الايداع في دار الكتب ووثائق بغداد ٢٧٨ لسنة ١٩٩٠

## رقم الصفحة

## الموضوع

- ١ عزز الاضداد IgA, IgM, Igg, Igg ضد الاطفال المصابين بالتهاب السحايا البكتيري حمود مجيد البواتي و مي عامر الدهان
- ٧ حساسية انواع بكتيرية مختلفة للكولور هكسامين عباس صبري المزرقعي
- ١٤ الكثافة العددية للفطر *Fusarium Spp.* في ترب المعهد الفني / كوفة عبد علي عبيد عبيس
- ١٨ التأثير المثبط والقاتل للايثانول على بعض الخمائر الصناعية صدام حسن جبر ومثلى كاظم جواد وماجد محمد محمود
- ٢٥ دراسة الصفات الفيزيائية والكيميائية للبكتين المستخلص من قشور البصل المحلي منتهي عبد الكريم الصفار
- ٢٩ القابلية التطفيرية والتسرطنية للكوسيبول عبد الجليل ابراهيم الموسوي و رجوة حسن، عيسى الربيعي و زهرة محمود الخفاجي
- ٣٧ كفاءة الانظمة المائية ثنائية الطور في فصل البروتين القاعدي الدنج من سلالة محلية للجنس *Aspergillus Oryzae* شذى سلمان حسن
- ٤٤ تحديد المحتوى البلازميدي لبكتريا الايشريشيا القولونية ولة محليا باستخدام مركب SDS مستخلصات نبات الحناء والكجرات. سلوى جابر العوادي
- ٥٥ قياس تأثير اشعة كاما على خضاب الدم البث باستخدام الطيف المرني الاعتيادي والمشتق (أ) عند مدى الجرعة الواظنة 0.25-1.0 سرامي حسين الجبوري و محمد عبد الستار الشخيلي
- ٦٦ تأثير اشعة كاما على خصائص تيار-فولتية لوصلة السيليكون  $P^+n^+$  مثنى محمد محمود
- ٧١ دراسة نظرية لمستويات الطاقة ونسبها لنظير Se - 70 باستخدام نموذج (IBM - 1) خالد سلمان ابراهيم ، ايمان طارق العلوي . نعم حاتم خضير

## عوز الاضداد IgA, IgM, IgG, IgG عند الاطفال المصابين بالتهاب السحايا البكتيري

حميد مجيد البياتي، و مي عامر الدهان

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية

(استلم بتاريخ ١٩/١/١٩٩٥ وقبل للنشر في ٢٤٩/١٩٩٦)

## الخلاصة

تمت دراسة (65) طفل مصاب بالتهاب السحايا البكتيري تراوحت اعمارهم بين يوم واحد وعشرة سنوات ادخلوا الى مستشفى صدام للطفل في بغداد للفترة من 1992/10/6 ولغاية 1993/12/31. تم قياس تراكيز الاضداد IgA, IgM, IgG في مصل الدم بطريقة الانتشار الشعاعي المناعي (RID) باستخدام اطباق Partigen (المجهزة من قبل شركة Biomerieux) وكما هو متوقع عند الاصابة بالمرض وجد ارتفاع في مستوى هذه الاضداد عن المستوى الطبيعي عند (47) طفل (72.3%) من جميع الفئات العمرية المدروسة اما (18) طفل الباقيين (27.7%) فكان مستوى الاضداد عندهم اقل من المستوى الطبيعي. وشكل عوز IgG عندهم نسبة 55.5% وتوزع في الفئات العمرية: (اسبوع - 1 شهر) و (1 شهر - 6 شهر) و (5 سنوات - 10 سنة). كما شكل عوز IgM عندهم نسبة 16.6% وتوزع على الفئات العمرية: (1 شهر - 6 شهر) و (6 شهر - 12 شهر) و (1 سنة - 5 سنة). وشكل العوز المزدوج نسبة 11.1% وتوزع على الفئات العمرية: (1شهر - 3 شهر) و (3 شهر - 6 شهر). كما اظهرت نتائج البحث ان حالات العوز في هذه الاضداد كانت مترافقة مع الاصابة بالـ بكتريا.

## المقدمة

الجنين عبر المشيمة. ان جهاز المناعة للطفل يبدأ بتكوين IgG قبل الولادة بشهر تقريباً وبكميات قليلة ثم يزداد تركيزه بشكل تدريجي في الاشهر الثلاثة الاولى من العمر ويصاحب هذه الزيادة في تركيز IgG الصمغ من قبل الطفل نقص في تركيز IgG المنتقل من الام عبر المشيمة لتفكيكه بشكل طبيعي بعد ثلاثة اشهر (Duerden وجماعته 1987).

يبدأ تركيز IgG بالازدياد بعد الثلاثة اشهر من العمر حتى يصل الى مستوى تركيزه عند البالغين بعد ان يتجاوز عمر الطفل الثلاث سنوات.

اما تركيز IgM فيصل الى 50% من مستوى تركيزه عند البالغين خلال الستة اشهر الاولى من العمر ويصل تركيزه الى مستوى البالغين في الشهر التاسع من

هناك علاقة وثيقة بين تراكيز الاضداد المختلفة وبين الفئات العمرية وهذا ما يتماشى مع تطور جهاز المناعة عند الانسان (Stites; 1988, Roitt; 1983, Barrett وجماعته 1980, 1987 Parker; 1980 Fundenberg).

ان تسلسل انتاج الاضداد في الجنين هو IgM ← IgG ← IgA ويبدأ الجنين بتكوين IgM في الشهر اسابع من الحمل ثم يبدأ بتكوين IgG بعد الشهر الثامن من الحمل. اما IgA فيتكون بعد الولادة (Duerden وجماعته 1987).

ان معظم IgG في مصل الطفل الحديث الولادة (Neonate) مصدره الام حيث انه ينتقل من الام الى

## المواد وطرق العمل

### المرضى patients

تم اجراء البحث على (65) طفل مصاب بالمرض تراوحت اعمارهم بين يوم واحد وعشرة سنوات منهم (47) ذكور و (18) اناث ادخلوا مستشفى صدام للطفل خلال الفترة من 92/10/6 ولغاية 93/12/31.

### قياس تركيز الاضداد

تم سحب 5ml من الدم من وريد الساعد او من وريد الرقبة وترك الدم ليتخثر لفصل المصل.

تم قياس تركيز الاضداد في المصل بطريقة الانتشار المناعي الشعاعي (RID) باستخدام Partigen المجهزة من شركة Biomerieux وحسب خطوات العمل المحددة من قبل الشركة المجهزة.

### النتائج

يوضح الجدول (1) تركيز الضد IgG عند المصابين في جميع الفئات العمرية ومنه نلاحظ ان التركيز ضمن الفئة العمرية الواحدة للمصابين كان اعلى من التركيز الطبيعي لتلك الفئة.

ويبين الجدول ايضا ان التركيز يزداد بتقدم العمر من 694.8 dl/mg في الفئة العمرية الاقل من شهر الى 1189.5 dl/mg في الفئة العمرية الاكبر من ثلاث سنوات.

يوضح الجدول (2) تركيز الضد IgA عند المصابين في جميع الفئات العمرية وفيه نلاحظ ان التركيز يزداد بتقدم العمر من 16.8 dl/mg الى 144.4 dl/mg كما نلاحظ ان التركيز ضمن الفئة العمرية الواحدة للمصابين اعلى من التركيز الطبيعي لتلك الفئة.

يوضح الجدول (3) تركيز الضد IgM عند المصابين في جميع الفئات العمرية ومنه نلاحظ ان التركيز يتفاوت من فئة عمرية الى اخرى ولكن تركيزه

اعمر (1983 barrett, Stites وجماعته 1987 Duerden وجماعته 1987).

اما تركيز IgA في الدم فانه يزداد تدريجياً ويطء منذ الولادة ولا يصل الى مستوى تركيزه عند البالغين الا حوالي السن الرابعة عشر. ويصل تركيزه الى 50% من مستواه عن البالغين بعد عمر سنة واحدة.

ونظراً لما تقدم نرى ان الطفل الحديث الولادة يمتلك حماية كافية ضد البكتريا القمية التي تتأثر بالـ IgG والذي ينتقل من الام عبر المشيمة ولكنه لا يمتلك حماية ضد g بكتريا التي تتأثر بالـ IgA, IgM لان هذه الاضداد لا تنتقل عبر المشيمة.

ويعد نقص تركيز IgA من اكثر انواع العوز المناعي البدئي شيوعاً في العالم بينما يعد نقص تركيز IgM ثاني اكثر انواع العوز المناعي البدئي شيوعاً في العالم (Goldblum وجماعته 1977).

ان فترة المحصورة بين فقدان المناعة المنفصلة من الام وبين تكون المناعة الفعالة للطفل هي فترة حرجة بالنسبة للاطفال جميعاً وان العيوب الوراثية الخلقية في جهاز المناعة تتكشف بشكل اصابات متكررة بالبكتريا بعد ان يتجاوز عمر الطفل الثلاثة اشهر (Trollfors وجماعته 1987).

ان سباب الاصابة خلال الثلاثة اشهر الاولى من العمر هي:

- 1- عدم انتقال IgG من الام الى الجنين عبر المشيمة بشكل كاف.
- 2- سوء تغذية الام والطفل.
- 3- الولادة المبكرة.
- 4- تعسر الولادة.

ان الهدف من البحث هو دراسة المرض خلال فترة الحرجة للاصابة لان العيوب الوراثية في جهاز مناعة تتكشف في جهاز المناعة تتكشف خلالها كما يهدف البحث الى دراسة علاقة العوز في الاضداد خلال هذه الفترة والفترات التي تليها بنوع البكتريا المسببة للمرض.

كما بينت نتائج الدراسة بأن تركيز IgM و IgA كان اعلى من التركيز الطبيعي عند 95.4% من المصابين وهذا متوقع نتيجة للاستجابة المناعية لديهم. كما لوحظ انخفاض في تركيز IgA ، IgM عند 4.6% من المصابين وخاصة في الفئة العمرية الأقل من سنة واحدة.

ان العوز في الاضداد IgM و IgA يؤدي الى الاستعداد للاصابة بالمسحيا الناتجة عن g بكتريا (1987, Duerden, 1985, Meade).

بينت النتائج ان 3.1% من المصابين كان لديهم عوز مزدوج في تراكي (IgA, IgM) او (IgG, IgA). وبينت النتائج ان العامل المسبب الرئيسي في حالات عوز الاضداد IgG, IgM, IgA كان g بكتريا (الدهان 1993).

يتضح مما سبق ان الفترة الحرجة للاصابة بالتهاب السحايا البكتيري تقع ضمن الفئة العمرية الاقل من سنة واحدة حيث ان 70% من الاصابات حصلت في هذه الفئة العمرية لان العيوب المناعية الوراثية للطفل تتكشف خلال هذه الفترة بعد ان يبدأ IgG المنتقل من الام الى الجنين عبر المشيمة بالتفكك ويبدأ الطفل بالاعتماد على نفسه في صنع الاضداد. كما ان الاصابة في الفئة العمرية ١ شهر - 3 شهر تكشف عن عجز الام امداد الطفل IgG الكافي اما بسبب سوء تغذيتها او بسبب العوز المناعي عندها.

واوضحت الدراسة ان g بكتريا هي العالم المسبب الرئيسي في حالات عوز IgG, IgA, IgM (الدهان 1993).

نرى ان اعطاء المريض هذه الاضداد كجزء من علاج اضافة الى المضادات الحيوية قد ينفع في شفائه من المرض.

ضمن الفئة العمرية الواحدة للمصابين اعلى من التركيز الطبيعي لتلك الفئة.

يوضح الجدول (4) انواع الاضداد الناقصة التركيز عن المستوى الطبيعي حيث وتوضح ان 62.5% من هؤلاء لديهم نقص في IgG، كما وجد ان 18.8% من المصابين لديهم نقص في تركيز IgA وان 18.8% ايضا من المصابين لديهم نقص في تركيز IgM.

يوضح الجدول (4) انواع العوز في تركيز الاضداد IgG, IgM, IgA وفيه نلاحظ ان العوز في الاضداد وجد في 18 طفل مصاب (27.7%). وشكل العوز في IgG نسبة 15.4% وتوزع في الفئات العمرية الثلاثة (اسبوع - ١ شهر) و (١ شهر - ٦ شهر) و (٥ سنة - ١٠ سنة).

كما العوز في IgA فشكل نسبة 6.4% وتوزع على الفئات العمرية (١ شهر - ٢ شهر) و (٢ شهر - ٦ شهر).

### المناقشة

ان التركيز الطبيعي للاضداد عند القوقاسيين والعرب بمختلف الفئات العمرية معروف (Wallach; 1984, Ravel ; وجماعته Al-Agidi, 1969, Lynch; 1983, Tietx; 1979, Tilkian; وجماعته 1978).

اوضحت هذه الدراسة ان تركيز IgG عند 84.6% من المصابين كان اعلى من التركيز الطبيعي لمختلف الفئات العمرية وهذا متوقع نتيجة للاستجابة المناعية لديهم.

ولوحظ انخفاض في تركيز IgG عند 15.4% من المصابين وخاصة في الفئة العمرية (١ شهر - 3 شهر) مما يدل على وجود نقص واضح في تركيزه عند الام او عيوب وراثية مناعية عند الطفل او كليهما معاً. Goldman وجماعته (1977, Gotschlich; وجماعته 1969 : Ritzmaun, 1982).

جدول (1)

تركيز IgG عند المصابين حسب الفئات العمرية

تركيز IgG (dl/Mg)				
'P' Value	المصابين	X ± S عند المصابين	X ± S الطبيعي	الفئة العمرية
P < 0.001	10	694.8 ± 360.1	1031 ± 200	> 1 شهر
P < 0.001	14	751.9 ± 375.9	430 ± 119	1 شهر - 3 شهر
P < 0.05	13	702.4 ± 472.3	427 ± 186	3 شهر - 6 شهر
P < 0.001	16	927.3 ± 250	661 ± 219	6 شهر - 12 شهر
	4	885 ± 290.4	762 ± 209	1 سنة - 3 شهر
P < 0.001	8	1189 ± 373.5	929 ± 228	< 3 سنة

جدول (2)

تركيز في IgA عند المصابين حسب الفئات العمرية

تركيز IgG (dl/Mg)				
'P' Value	المصابين	X ± S عند المصابين	X ± S الطبيعي	الفئة العمرية
P < 0.001	10	16.8 ± 17.4	2 ± 3	> 1 شهر
P < 0.001	14	42.1 ± 31.5	21 ± 13	1 شهر - 3 شهر
P < 0.05	13	47 ± 31	28 ± 18	3 شهر - 6 شهر
P < 0.05	16	62.9 ± 47.6	37 ± 18	6 شهر - 12 شهر
	4	62.3 ± 22.6	50 ± 24	1 سنة - 3 شهر
	8	144.4 ± 77.8	93 ± 27	< 3 سنة

جدول (3)

تركيز IgM عند المصابين حسب الفئات العمرية

تركيز IgG (dl/Mg)				
'P' Value	المصابين	X ± S عند المصابين	X ± S الطبيعي	فئة العمرية
P < 0.001	10	121.6 ± 51.5	11 ± 5	> 1 شهر
P < 0.001	14	99.8 ± 53.3	30 ± 11	1 شهر - 3 شهر
P < 0.05	13	98.2 ± 81.4	43 ± 17	3 شهر - 6 شهر
P < 0.05	16	131.2 ± 92.4	54 ± 23	6 شهر - 12 شهر
	4	113 ± 101.6	58 ± 23	1 سنة - 3 شهر
P < 0.001	8	159 ± 50.1	56 ± 18	< 3 سنة

## جدول (4)

موزة لامتداد في لغات العمرية المختلفة

'P' Value	تركيز (dl/Mg) IgG			الفئة العمرية
	العصابين	X ± S عدد العصابين	X ± S الطبيعي	
-	-	-	-	> 1 شهر
-	-	-	6	1 شهر - 3 شهر
2	1	1	2	3 شهر - 6 شهر
-	1	1	-	6 شهر - 12 شهر
-	-	1	2	1 سنة - 5 شهر
-	-	1	2	< 5 سنة
18/2	18/3	18/9	18/10	العدد
%11.1	%16.6	%16.6	%55.5	النسبة

9. Berrett, J.T. "Textbook of Immunology" 4<sup>th</sup> ed. Mosby (1983).
10. Stites, DP; Stabo, JD; Wells, JV. (ed.) "Basic & Clinical Immunology" Appleton and Lange. (1987).
11. Roitt, I.M. "Essential Immunology" 6<sup>th</sup> ed. Black Well. (1988).
12. Lynch, MJ; Raphael, SS; Mellor, LD; Speta, PD, Inwood, MJ "Medical Laboratory Technology & Clinical Pathology" 2<sup>nd</sup> ed. (1969).
13. Al-Agidi, S.K. "Serum Protein level in Iraq" Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74(3): 355 (1980).
14. Ritzmann, S.E. "Physiology of Immunoglobulin" Vol. I, II" Alan R. Liss (1982).
15. Fudenberg, H.H. "Basic clinical Immunology" 3<sup>rd</sup> ed. Lange (1980).
16. Parker, C.W. "Clinical Immunology" Saunders. (1980).
17. Mease, R.H. "Bacterial Meningitis in Neonatal infant" Med. Clin. N. Amer. 69: 257 (1985).

## REFERENCES

1. Duerden, B.I. "Textbook of Microbial and Parasitic infection" Arnold. (1987).
2. Trollfors, BC; Clacsson, K; Strangers, K.; Tavangers, J "H. influenzae meningitis in Sweden". Arch. Dis. Chld. 62: 1220. (1987).
3. Goldman, A.S. and Golbdlum, R.M. "Primary deficiencies in humoral immunity" Pediatr. Clin. N. Am. 24: 280. (1977).
4. Gostschlich, EE; Tehyunglin, MD; Arteusten, M. "Human Immunity to Meningococcus" J. Exp. Med. 129: 1349. (1969).
5. Ravel, R. "Clinical Laboratory Medicine" 4<sup>th</sup> ed. Yerar Book. (1984).
6. Wallach, J. (ed.) "Interpration of diagnostic tests" 3<sup>rd</sup> ed. Little Brown (1978).
7. Tilkian, S.M. (ed.) "Clinical in plications of Laboratory tests" 2ns ed. Mosby. (1979).
8. Tietz, N.W. (ed.) "Clinical guide to Laboratory tests" (1983).

## المراجع العربية

١٨. الدهان - مي عامر "تقييم الكلوبيولينات المنمنعة وبعض اجزاء المتمم في حالات السحايا البكتيرية عند الاطفال" اطروحة ماجستير - كلية العلوم - الجامعة المستنصرية، (1993).
١٩. الشماع ، ساجدة مجيد "دراسة عيارية الاشخاص الملقحين بلقاح الكربوهيدرات المستخلصة من بكتريا *N. meningitidis* للمجموعتين C, A وتواجد هذه البكتريا في الحاملين. اطروحة ماجستير مقدمة الى كلية العلوم ، جامعة بغداد. (1978).

## حساسية انواع بكتيرية مختلفة للكلور هكسيدات

عباس صبري المزرقي

جامعة بغداد، كلية طب الاسنان، فرع العلوم الطبية الاساسية

(استلم بتاريخ ٨/١٠/١٩٩٦ وقبل للنشر في ١٩/٢/١٩٩٧)

## الخلاصة

هدف البحث هو دراسة فعالية الكلور هكسيدات ضد انواع بكتيرية مختلفة. عزلت بكتريا *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* من خمجات الجروح بعد العمليات لسبعة وعشرون مريض من الراديين في مستشفى الكندي واليرموك. وعزلت بكتريا من *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli spp.* سطوح اسنان اربعة عشر متطوع. حددت قيم الجرعة المثبطة الدنيا (MIC) للكلور هكسيدات. اظهرت النتائج ان الكلور هكسيدات ابدى فعالية ضد كلاً من البكتريا الموجبة والسالبة لصيغة كرام، الا ان قيم الـ MIC ضد البكتريا الموجبة لصيغة كرام بصورة عامة كانت اقل.

## ABSTRACT

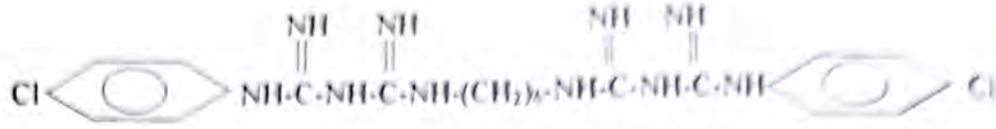
This study is determined the susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.* Were isolated from clinical specimens (27 patients) of postoperative wounds infection and *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Loctobacilli* isolated from teeth surface of 14 volunteers. Dilution tube method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of chlorhexidine. There was abroad spectrum of susceptibility to chlorhexidine among both Gram-positive and Gram-negative strains. However the MIC-values of G+ve were less than G-ve bacteria.

## المقدمة

على انه ذوبان لطبقة المينا enamel وازالة املاح الكالسيوم من هذه الطبقة الخارجية للسن بفعل الحامض المنتج من الجراثيم المتواجدة بالفم والقادرة على تمثيل الكربوهيدرات المتناولة (20,5) ان المراحل الاولى لتسوس الاسنان تسبقها زيادة باعداد كل من (*S. mutans*) و***Streptococcus mutans*** و***Streptococcus mutans*** و***Lactobacilli***. وان بكتريا العصيات اللبنية ***Lactobacilli*** تزداد بشكل كبير بالصفحة الجرثومية plaque بعد ظهور التسوس بشكل واضح، وان التسوس ممكن ان يحدث بغياب بكتريا العصيات اللبنية ولكنه لا يحدث بغياب بكتريا *S. mutans* (22). 1,6-di-(4-

تتصف معظم الامراض الجرثومية المكتسبة داخل المستشفى بكونها ذاتية المصدر endogenous. وذلك لعدم مراعاة الطرق الصحية والتطهيرية اللازمة اثناء مدة الرقود في المستشفيات. اما الاعراض المكتسبة الباقية فتكون خارجية المصدر exogenous (1). وقد اشارت Hamoudi (17) الى ان اكثر الانواع البكتيرية شيوعاً في خمجات الحروق هي بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* يعرف التسوس

(شكل ١) chlorophenyl diguanidophenone وهو الـ chlorhexidine الذي يمتدح جاريأ باسم Hibitane (26)



شكل (١) الصيغة الكيميائية للكلور هكسديد

عن Gjerme (15)

وتوسع التمسوس عند الاثمان والمعزولة محلياً. وبالتالي يمكننا وضع برنامج وقائي للحد من التلوث الجرثومي لجروح العمليات وتجويف الفم.

#### المواد وطرائق العمل

اخذت مسحات swab (خلال شهر حزيران 1996) من مناطق خمجات جروح بعد العمليات (خاصة العمليات الجراحية في الصدر والبطن) من 27 مريض بمختلف الاعمار والراقدين في مستشفى الكندي واليرموك في بغداد. تم تخطيط هذه المسحات على سطح الاوساط الزرعية الاتية Blood Agar, MacConkey. حضنت كافة الاطباق هوائياً بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. شخصت المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية الصلبة وفقاً لما اورده Fingold & Baron (13) وقد تضمن هذا التشخيص الفحوص البايوكيميائية الضرورية الاتية, urease, catalase, oxidase, IMVIC, TSI, Lactose fermentation. اضافة الى شكل ولون المستعمرات colony morphology النامية على سطح الوسط الزرعى الصلب.

اخذت مسحات من سطوح اسنان (14) متطوع بعمر 20-25 سنة نقلت محتويات كل مسحة الى انبوبة اختبار حاوية على 2ml من phosphate-Buffer salin (pH=7.3) رججت الانابيب بشكل جيد لضمان انزال معظم المحتوى الميكروبي في المسحة. ثم نشر 0.1ml منه على سطح

ان المشحة الموجبة لجزينات الكلور هكسديد في ذلك التباطؤ مع المجاميع سالبة المشحة على سطح في الجرثومية وبشكل رئيسي مجاميع الفوسفات ضمن عند المسكر ايد النشحي ومجاميع الكاربوكسيل وبنات (14). ان امتزاز الكلور هكسديد على سطح في الجرثومية يسبب اضراراً للغشاء الساييتوبلازمي ثم يتداخل مع نفاذية ووظيفة هذا الغشاء مسبباً ح محتويات الخلية ذات الازان الجزئية الواطنة. وان زيادة تركيز الكلور هكسديد تؤدي الى زيادة الممتزة على سطح الخلايا الجرثومية من جهة اى كمية محتويات الساييتوبلازم الناضجة للخارج اى اخرى لزيادة التأثير القاتل للمظهر وترسب نات الساييتوبلازم (26). وقد اوضح كل من Longu (26), Hugo (21) ان الكلور هكسديد يثبط ATPase المرتبطة بالغشاء الخلوي وبالتالي يلية الحصول على ايونات البوتاسيوم واستبدالها ات الصوديوم والهيدروجين. ولهذا يكون هكسديد تأثير مثبط Bacteriostatic عند التركيز في حين يصبح التأثير قاتلاً Bacteriocidal التركيز حيث يتوغل الكلور هكسديد الى داخل سيباً ترسيب الساييتوبلازم وموت الخلية (19).

أن الهدف من البحث هو دراسة فعالية هكسديد ضد الأنواع البكتيرية المحلية والمسببة لخمجات الجروح بعد العمليات Post-operative wounds infective وكذلك وع البكتيرية المسؤولة بشكل معنوي على نشوء

تخافيف من 0.5-50 مثيروغرام /مل<sup>(4)</sup> لقيحت كافة الانابيب من مزارع بكتيرية عمرها 24 ساعة في وسط BHI السائل وبحجم لقاح قدره 0.1 مل. حصنت كافة انابيب التجربة هوائياً عدا الانابيب الملقحة بانواع بكتيريا الـ Streptococci فحضنت لاهوائياً بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، تم تحديد قيم الـ MIC وهي اقل تركيز من الكلورمكسدين ثبط النمو البكتيري ومنع ظهور عكرة واضحة بالوسط الزرعى السائل مقارنة بأنابيب السيطرة السالبة والموجبة.

### النتائج

عزلت الانواع البكتيرية الاتية من خمجات

جروح بعد العمليات :

*Klebsiella spp, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, proteus spp., E. coli* وسادت بكتريا *P. aeruginosa* لوحدها وشكلت اعلى نسبة تواجد 29.6% من مجموع المرضى الخاضعين للدراسة. اما بكتريا *E. coli* لوحدها فقد شكلت اقل تواجد 7.4% كما وعزلت اصابات مختلفة Mixed infection من بعض المرضى (جدول 1).

الوسط الزرعى Mitis-Salivarius الحساوي على [Unit - International Unit (iu) ] 200 unit/L المضاد الـ Bacitracin 200 g/L من الـ (MSB) sucrose وكذلك على وسط MSA الخالي من المضاد والحساوي على 50g/L فقط من الـ sucrose<sup>(10)</sup>. نقل 0.1 ml من كل نموذج وزرع بطريقة صبب الاطباق Pouring plate method باستخدام الوسط الزرعى الخاص Rogosa Agar. حصنت كافة الاطباق MSA, MSB لاهوائياً باستخدام gas Pak (نجهز من شركة الرازي). اما اطباق الـ Rogosa فحضنت هوائياً لمدة 48 ساعة بدرجة 37°م. شخصت المستعمرات النامية على وسط MSA, MSB وفقاً لما اورده : <sup>(8)</sup>Edwardsson; <sup>(16)</sup>Gold et al.; <sup>(10)</sup>Emilson; اما المستعمرات النامية على وسط Rogosa Agar والتي اعطت كشافاً سالباً للكاتاليز Catalase واطهر الفحص المجهرى انها عصيات موجبة لصبغة كرام غير مكونة للسيورات شخصت على انها بكتريا <sup>(22, 23)</sup> Lactobacilli<sup>(28)</sup>. تم تحديد قيم الجرعة المثبطة الدنيا (MIC) Minimal inhibitory concentration باستخدام طريقة التخافيف المتسلسلة بالوسط السائل Dilution methos. حضرت تخافيف من المطهر Chlorhexidine gluconate باستخدام وسط Brain-heart infusion broth (BHI) حيث تم تحضير

جدول (1) الانواع البكتيرية المعزولة من خمجات الجروح بعد العمليات والنسب المئوية لتواجدها

النسبة المئوية لتواجدها	تكرار عزلها من المرضى	الانواع البكتيرية
29.6	8	<i>P.aeruginosa</i>
18.5	5	<i>Staph. Aureus</i>
14.8	4	<i>Proteus spp</i>
11.1	3	<i>Klebsiella spp.</i>
7.4	2	<i>E. coli</i>
7.4	2	<i>Psudomonas + staph</i>
7.4	2	<i>Pseudomona + Klebsiella+ E. coli</i>
3.7	1	<i>Pseudomonas+Klebsiella</i>
%100	27	

مايكروغرام / مل) وهي بهذا تشابه حساسية بعض سلالات الانواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام لهذا المطهر. ذكر Longworth<sup>(26)</sup> ان الكلوروكسيدين من المطهرات غير السامة نسبياً بالتراكيز العالية، ويمكن استخدامه لتطهير الانسجة السطحية والانسجة المبطننة لتجفيف الفم وله فعالية عالية ضد الخلايا المكروبية فهو يسبب نضوح المحتوى الخلوي للجزيئات الممتصة لطول موجي 260nm بتراكيز تقدر 1-3 مرات اكبر من قيمة الـ MIC ويقل هذا النضوح بزيادة التركيز وتترسب بروتينات السايوتوبلازم عند التركيز 200-500 مايكروغرام/مل. ان معدل النمو البكتيري وحجم اللقاح الميكروبي ودرجة الحموضة الـ pH ونوع الوسط الزراعي والظروف الزرعية كلها عوامل تؤثر على حساسية البكتريا للمضادات الميكروبية<sup>(4)</sup>.

ان الاختلاف في قيم الجرعة المثبطة الدنيا MIC للانواع البكتيرية المختلفة بالفم يمكن ان يسبب تغييراً واضحاً في المحتوى الميكروبي بالفم بعد استعمال الكلوروكسيدين لفترة طويلة وقد اوضح Hamp & Emilson<sup>(18)</sup> ان استعمال الكلوروكسيدين للكلاب لفترة طويلة يؤدي الى سيادة العصيات السالبة لصبغة كرام في الصفيحة الجرثومية مثل *Citrobacter*, *Klesiella*, *Proteus*. وان استخدام هذا المطهر من قبل الانسان فان نسبة تواجد بكتريا *S. mutans* تقل بينما تزداد نسبة بكتريا *S. sanguis*<sup>(12)</sup>. ان لبكتريا *S. mutans* دوراً فعال في نشوء تسوس الاسنان<sup>(22)</sup> في حين بكتريا

وقد تواجدت انواع بكتريا Streptococci وبكتريا Lactobacilli على مسطوح اسنان كافلة لمتطوعين الخاضعين للدراسة. ولم يتم تحديد نسبة تواجد كل نوع من هذه الانواع البكتيرية. اظهرت بكتريا *S. mutans* حساسية عالية للكلوروكسيدين اذ بلغت قيم الـ MIC لعزلاتها مقدار 3-0.5 مايكروغرام / مل في حين بلغت قيم MIC لعزلات *S. sanguis* مقدار 3-20 مايكروغرام / مل (جدول 2) وبهذا شكلت بكتريا *S. sanguis* اكثر انواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقاومة للكلوروكسيدين. اما ضمن لبكتريا السالبة لصبغة كرام فان بكتريا *E. coli* اظهرت حساسية اعلى للكلوروكسيدين مقارنة ببقية انواع البكتريا السالبة اذ بلغت قيم الـ MIC 2-4 مايكروغرام / مل. في حين اظهرت بكتريا *P. aeruginosa* مقاومة واضحة للمطهر وانعكس هذا على ارتفاع قيم الـ MIC للكلوروكسيدين ضد هذه البكتريا اذ بلغ 4-50 ميكروغرام/مل (جدول 3).

### المناقشة

اظهرت هذه الدراسة ان الانواع البكتيرية المختلفة ابدت حساسية مختلفة ومدى واسع من الـ MIC تظهر الكلوروكسيدين وقد بينت هذه الدراسة فعالية اطي للكلوروكسيدين ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقارنة بالبكتريا السالبة لها. وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره لأن Hennessey<sup>(19)</sup> وEmilson<sup>(11)</sup>. ومع هذا فلن من سلالات بكتريا *S. sauguis* اظهرت مقاومة نسبية للكلوروكسيدين وارتفاع قيم الـ MIC (2-2)

جدول (2) قيم الجرعة المثبطة الدنيا MIC للكور هكسدين ضد البكتريا الموجبة لصيغة كرام

Strain	No. of strain	قيم الجرعة المثبطة الدنيا MIC بالـ $\mu\text{g/ml}$											
		0.5	2	3	4	6	15	20	30	50			
<i>S. mutans</i>	8	4	2	2									
<i>S. sanguis</i>	5		1	1			2	1					
<i>S. salivarius</i>	2		1				1						
<i>Staph aureus</i>	5		2	1	2								
<i>Lactobacilli</i>	4				3	1							
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

جدول (3) قيم الجرعة المثبطة الدنيا MIC للكور هكسدين ضد البكتريا السالبة لصيغة كرام

Strain	No. of strain	قيم الجرعة المثبطة الدنيا MIC بالـ $\mu\text{g/ml}$												
		0.5	2	3	4	6	1	2	3	5				
<i>P. aeruginosa</i>	6				2									
<i>Klebsiella spp.</i>	5			2	1		1	1						
<i>E. coli</i>	4		1	2	1									
<i>Proteus spp.</i>	4		1						2	1				
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	

المصادر

1. Al-Jebouri, M.M. Medical Bacteriology. 1<sup>st</sup> Ed. Higher education press, Mosul. (1990).
2. Al-Mizraqchi, A.S. and Khaki, I. (A) Synergistic effect between chlorhexidine and ethanol against Streptococcus mutans J. of faculty of medicine, Baghdad In press (1996).
3. Al-Najjar, A.R. and Quesnel, L.B. Synergism between chlorhexidine and polymyxin against Pseudomonas aeruginosa. J. Appl. Bact, 47:469-476 (1979).
4. Barry A.L. The antimicrobial susceptibility test : principles and practices Lea & Febiger, Philadelphia. (1976).
5. Burnett, G.W. and Scherp, H.W. Pral microbiology and infections disease. 2<sup>nd</sup> Ed. Williams & Wilkins company, USA (1962).
6. Davies, A. The mode of action of chlorhexidine J. periodont. Res. 8 (suppl. 12) : 68-75 (1973).
7. Davies, G.E. Francis, J.; Martin, A.R.; Rose, F.L. and Swain, G. 1:6-Di-4 chlorophenyl diguanido hexane (Hibitane) Laboratory investigation of anew antibacterial agent of high potency. Brit. J. Pharmacol., 9:192-196. (1954).
8. Edwardsson, S. Characteristics of caries-inducing human Streptococcal resembling Streptococcus mutans. Archs. Oral Biol., 13: 637-646. (1968).
9. Edwardsson, S., Koch, G. and Obrick, M. Strept. Sanguis, Strept mutans and Strept salivarius in salvia. Prevalence and relation to caries increment and prophylactic measures. Odontol Revy., 23: 279-296 (1972).
10. Emilson, C.G. Prevalence of Streptococcus mutans with different colonial morphologies in human plaque and saliva. Scand. J. Denl. Res., 91 26-32. (1983).

*S. sanguis* (23) ليس لها دوراً معنوياً في نمو الاسنان (24) لذا فإن استخدام الكلور هكسدين ضد بؤدي السى السيطرة وانخفاض نسبة حدوث التسوس. ان قيم الـ MIC للكلور هكسدين ضد بكتريا Oral lactobacilli كانت عالية نسبياً مقارنة ببقية البكتريا الموجبة لصبغة كرام (عدا بكتريا *S. sanguis* وهذا يتفق مع نتائج (24) Kohlar et al الذي اظهر ان المعاملة بالكلور هكسدين لا تؤثر على تعداد العصيات اللبنية بالفم، وذلك بسبب قلة حساسية هذه البكتريا للكلور هكسدين (11) ضمن البكتريا السالبة لصبغة كرام والمعزولة من خمجات الجروح بعد العمليات اظهرت بكتريا *P. aeruginosa* وبكتريا *Proteus spp* مقاومة نسبية للكلور هكسدين مقارنة ببقية الانواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام. وقد بين Linton (25) ان بكتريا *Pseudomonas* تبقى حية في المحلول المائي للكلور هكسدين بتركيز 1/5000 والمحفوظ في قناني ذات سدادة فلينية وقد فسر ذلك الى ان المادة الفلينية تضعف فعالية الكلور هكسدين المطهرة إضافة الى قدرة هذه البكتريا على مقاومة هذا المطهر. وقد اشار Davies et al (7) ان للكلور هكسدين فعالية قاتلة وله القدرة على تدمير (99.9% قتل) بكتريا *P. pyocyanea*, *E. coli*, *Strept pyogenes*, *Staph. Aureus*, *Salmonella typhi* باستخدامه بتركيز 1/17. 500, 1/50.000, 120.000, 1/400.000 , 1/125,000 على التوالي، وقد استخدم الكلور هكسدين منذ فترة طويلة كمادة معقمة ومظهرة للجلد فهو ذو فعالية عالية ضد البكتريا الموجبة والسالبة والخمائر. ولزيادة فعالية الكلور هكسدين ممكن خلطه مع مضادات اخرى للحصول على فعل تآزري مثل خلطه مع الـ Sulphadiazine ضد بكتريا الـ *Pseudomonas* والـ *Proteus* والـ *Staphylococcus* (27) او خلطه مع الـ Polymyxin ضد بكتريا *Pseudomonas* (3) كما وان الكلور هكسدين يعمل تآزرياً مع الايثانول ضد بكتريا *S. mutans* المعزولة من الفم (2).

- vegetative microbes (skinner, F.A. and Hugo, W.B. Eds.) Acadme. Press, London (1976).
22. Ikeda, T.; Sandham, H.J. and Bradley, E.L. Changes in Streptococcus mutans and Lactobacilli plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. Archs. Oral Biol., 18 : 555-566. (1973).
  23. Klock, B. and Krasse, B. Caries status and microbial conditions in children in 1973 and 1984. Scand. J. Dent. Res. 95: 13-17. (1987).
  24. Kohler, B.; Andreen, I.; Jonsson, B. and Hultquist, E. Effect of caries preventive measures on Streptococcus mutans and lactobacilli in selected mothers. Scand. J. Dent. Res., 90: 102-108. (1982).
  25. Linton, K.B. Inactivation of chlorhexidine (Hibitane) By Bark corks. Lancet, 1: 1353-1355 (1966).
  26. Longworth, A.R. Chlorhexidine. In : Inhibition and destruction of the microbial cell (Hugo, W. B. Ed.) Academic press, London (1971).
  27. Quesnel, L.B.; Al-Najjar, A.R. and Buddhavadhikrai, P. Synergism between Chlorhexidine and Sulphadiazine. J. Appl. Bact., 45:397-405 (1978).
  28. Rogosa, M.; Mitchell, J. A. and Wiseman, R.E. Aselective medium for the isolation and enumeration of Oral Lactobacilli. J. Dent. Res., 30: 682-689 (1951).
  29. Stoppelaar, J.D.; Houte, J. Van and Dirks, O.B. The relationship between extracellular polysaccharide-producing Streptococci and smooth surface caries in 13-Year-old children. Caries Res., 3: 190-199. (1969)
  11. Emilson, C.G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand. J. Dent. Res. 85; 255-265 (1977).
  12. Emilson, C.G. and Fornell, J. The effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora. Oral hygiene and caries. Scand. J. Dent. Res. 84 : 308-319 (1976).
  13. Fingold, S. M. and Baron, E.J. Baily and Scotts Diagnostic microbiology. 7<sup>th</sup>. Ed. C.V. Mosby company, saint louis (1986).
  14. Gjeramo, P. Chlorhexidine and compounds. J. Dent. Res., 68 (spec. Iss.); 1602-1608 (1989).
  15. Gjeramo, P. Chlorhexidine in dental practice. J. clinical Periodont., 1 : 143-152 (1974).
  16. Gold, O.G.; Jordan, H.V. and Houte, J. van. Aselective medium for Streptococcus mutans. Archs. Oral Biol., 18: 1357-1364 (1973).
  17. Hamoudi, N.M. Isolation and identification of bacteria causing burn wound infections and their response to antimicrobial agents. M. Sc. Thesis Al-Mustansiriya university (1992).
  18. Hamp, S.E. and Emilson, C.G. Some effects of chlorhexidine on the plaque flora of the Beagle dog. J. Periodontal. Res., 8(Suppl. 12): 28-35 (1973).
  19. Hennessey, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J. Periodont. Res. 9supple. 12) : 61-67 (1973).
  20. Hoover, C.I.; New brun, E.; Mettraux, G. and Graf, H. Micro flora and chemical composition of dental plaque from subject with hereditary fructose intolerance. Infect. Immun., 28:853-859 (1980).
  21. Hugo, W.B. Non-Antibiotic antibacterial agents. In. inhibition and Inactivation of

الكثافة العددية للفطر *Fusarium Spp.* في ترب المعهد الفني / كوفة

عبد علي عبيد عبيس

المعهد الفني / الكوفة - العراق

(استلم بتاريخ ١٠/١٦/١٩٩٦ وقبل للنشر بتاريخ ١/٢٧/١٩٩٧)

## ABSTRACT

Density of *Fusarium* species in Technical Institute of Kufa soils. The density of *Fusarium spp.* in kufa soils differed according to the depth from which the soil samples were taken and crops were grown. The results revealed that the population of *Fusarium spp.* is high at depth of 22-30cm. Also the results showed that *F. oxysporum*; *F. moniliforme* and *F. graminearum* were more frequently isolated than other species.

## الخلاصة

تختلف الكثافة العددية للفطر *Fusarium spp.* في التربة حسب العمق المأخوذة منه نماذج التربة ونوع المحصول المزروع. اظهرت النتائج ان اعلى كثافة عددية هو على عمق ٢٢-٣٠ سم وان الانواع السائدة هي *F. oxysporum*; *F. moniliforme* *F. graminearum* وذلك باستخدام اوساط انتقائية وطرق عزل مختلفة.

## المقدمة

يحدد الانواع المعزولة، وقد ظهرت اوساط انتقائية Selective media عديدة لعزل انواع الفطر *Fusarium*<sup>(١٠،١١،١٢)</sup> ولتقدير الكثافة العددية للفطر في التربة يستحسن استعمال طرق عزل مختلفة مع اوساط انتقائية متعددة<sup>(١٤)</sup> ونظرا لعدم وجود دراسات عن الكثافة العددية للفطر *Fusarium* في الترب العراقية ومنها تربة المعهد الفني في الكوفة والتي بموجبها يمكن ان نتوقع حدوث الاصابة للانواع المرضية اجريت هذه الدراسة.

الفطر *Fusarium spp.* من الفطريات المحولة في التربة<sup>(٢٠)</sup> وتحمل بعض انواعه في الهواء<sup>(١٠)</sup> او في لنور<sup>(٢)</sup> ويوجد في التربة على شكل كونيديا كلبيومبيورات او مايسيليوم. ان الكشف عن انواع *Fusarium* تتاثر بالتقنية المستعملة في العزل لاسيا وان انواعه تستوطن مواقع مختلفة في التربة اغلب طرق العزل تعتمد على طريقة واحدة هي Dilution plate technique<sup>(١١،١٢)</sup> او Warcup's soil plate technique<sup>(١٦)</sup>. كما ان هناك دراسات عديدة تضمنت لشمال كلا التقنيين<sup>(١٣،١٥)</sup>. وجد Snyder و Smith<sup>(١٣)</sup> ان لفطر *F. oxysporum* F.S.P. Vansinfectum في التربة يتواجد باعداد اكثر في اجزاء النبات المحمولة في تربة صا في عينات التربة حيث كانت نسبته ٩٢% من لولات الفطر في حين كانت نسبته ٢٨،٩% في التربة لاسواع الفطر *Fusarium* متطلبات غذائية مختلفة<sup>(١٨،١٧،١٥،١٢،١١)</sup> ولهذا فالوسط المستعمل للعزل قد

## طرائق العمل والمواد المستعملة

## اخذ النماذج

اختيرت ثلاثة قطع كانت مزروعة بالرز والذرة ومحاصيل خضر مختلفة على التوالي مساحة كل قطعة ثلاثة دونم، قسمت كل قطعة الى ثلاثة اقسام متساوية واخذ من كل قسم وبخسة اعماق مختلفة نماذج من التربة والاعماق هي:

وتشخيصها استنادا الى النظام التصنيفي المؤخوذ من قبل Gordon<sup>(١)</sup> ودراسة شكل الكونيديا وحامل الكونيدات.

صفر	-	٨ سم
٨	-	١٦ سم
٢٢	-	٣٠ سم
٣٦	-	٤٤ سم
٦٥	-	٧٢ سم

## النتائج والمناقشة

باستعمال كلا التقنيتين Soil plate technique

وتقنية Dilution plate technique على الاوساط الانتقائية تم الكشف عن انواع الفطر Fusarium وبلعداد مختلفة وحسب العمق الماخوذ منه النموذج، حيث ظهرت اعداد قليلة على عمق صفر-٨ سم، ٦٥-٧٢ سم بينما اظهرت النتائج زيادة عدد المستعمرات النامية على عمق ٢٢-٣٠ سم ولجميع المواقع والتي كانت تتراوح بين ٢٢٢-٢٤٢، ٤١٦-٤٢٠، ٥٠٠-٥٦٢ مستعمرة لكل غم تربة جافة في مواقع الرز، الذرة ومحاصيل الخضر على التوالي جدول رقم (١). وهذا يدل على ان انواع الفطر Fusarium يستوطن ببيئات مختلفة وانواعه تتطلب مواد غذائية مختلفة<sup>(١٠١)</sup> لم تظهر النتائج اختلافات واضحة باستعمال أي من الطريقتين في العزل حيث استعملت اوساط انتقائية نفسها. ان انخفاض الكثافة العددية للفطر في الطبقات السطحية من التربة يدل على ان الظروف البيئية غير ملائمة لنموه كدرجات الحرارة والضوء. تزايد اعداد الفطر لحد عمق ٤٤ سم يشير الى تطفل الفطر على اجزاء النبات الموجودة في التربة كالجذور ومخلفات النبات المطمورة فيها. وعند استعمال طريقة Plating of sieved debris لمعرفة الانواع السائدة جدول رقم (٢) تبين ان الفطر *F. oxysporum* هو السائد من بين انواع الفيوزيريوم الاخرى في النماذج الماخوذة من مواقع محاصيل الخضر في حين كان النوعين *F. gramine arum*، *moniliforme* هما الاكثر تكرار من النماذج الماخوذة من مواقع محصولي الرز والذرة. نستنتج من ذلك ان السلالات الفسيولوجية للفطر Fusarium تصيب محصول معين وان متطلبات أي نوع من الفطر الغذائية تختلف عن الانواع الاخرى. ان معرفة الكثافة العددية للفطر في التربة له علاقة بنسبة الاصابة

اخذت العينات بعناية تامة واقتصر اخذها على الاعناق المحددة لها بحيث لم يسمح للطبقات العليا من التربة ان تختلط في الطبقات السفلى منها، كما نظفت ادوات اخذ العينات وغمرت بـ ٥% من محلول الفورمالديهايد قبل اخذ النماذج، حفظت النماذج في اكياس نايلون معقمة وخرنت في الثلجة على درجة حرارة ٥°م لحين استعمالها.

## تقنيات العزل

استخدمت طريقتان للكشف عن الفطر Fusarium وحساب كثافته العددية في التربة هما ١. Soil Plating طريقة Warcup<sup>(١١)</sup> ٢. Dilution plate technique طريقة Worf<sup>(١٢)</sup>. ولمعرفة الانواع السائدة من الفطر في النماذج الماخوذة استعملت طريقة Sieved Debris or Plating الموصوفة من قبل Tio وجماعته<sup>(١٤)</sup> حيث تم زرع (١٠٠) قطعة لكل نموذج توزعت على (٢٥) طبق.

## الايوساط الانتقائية Selective media

استخدمت الاوساط التالية

١. Martins rose bengal agar<sup>(١)</sup>.

٢. Komado medium<sup>(٤)</sup>

واستعمل وسط Potato-dextrose agar

لغرض حفظ العزلات على شكل Slants

## التشخيص Identification

حضنت جميع الاطباق على درجة ٢٠-٢٤م لمدة ٧-١٠ ايوم، استخرجت الاطباق لغرض حساب المستعمرات النامية من الفطر *Fusarium spp.*

المستعمل حيث أن كمية الفلاح الموجود مستخدم نسبة  
الهدية ومستجزي دراسات لاحقة بشأن ذلك.

جدول رقم ١: الكثافة العددية للفطر *Fusarium spp.* من عم/ تربة جافة باستعمال تقنيتين للعزل واساط انتقائية

المعدل	Soil k.m	Plate method m.r.b.a	المعدل	Dilution komado medium	Method plate martins rose bengal agar	العمق
٣٣	٢٨	٣٨	٤٥	٤٨	٤٢	صفر-٨سم
١٣٢	١١٨	١٤٥	٧٩	١٨١	١٧٦	٨-٦سم
٣٢١	٣٤٤	٢٩٨	٧٣٢	٤٠٥	٣٤٩	٢٢-٣٠سم
٢٣٢	٢٤٦	٢١٨	٢٤٢	٢٣٤	٢٥٠	٣٦-٤٤سم
٦١	٥٨	٦٤	٦٧	٦٢	٧٢	٦٥-٧٢سم
٣٩	٤٦	٣١	٤٩	٤٢	٥٦	صفر-٨سم
٢٠١	٢٠٤	١٩٨	٢٢٤	٢٣٠	٢١٨	٨-٦سم
٤١٦	٤٢٢	٤١٠	٤٢٠	٤٢٢	٤١٨	٢٢-٣٠سم
٢٥٣	٢٤٥	٢٦٠	٢٢٦	٢٣٤	٢١٧	٣٦-٤٤سم
٦٩	٦٥	٧٢	٥٩	٥٦	٦١	٦٥-٧٢سم
٧٢	٦٨	٧٠	٨٤	٨٦	٨٢	صفر-٨سم
٢٢٧	٢٣٤	٢١٦	٢٤٧	٢٤٤	٢٥٠	٨-٦سم
٥٠٠	٥١٠	٤٨٩	٥٦٢	٥٨٠	٥٤٤	٢٢-٣٠سم
٣٨٧	٣٧٦	٣٩٨	٤٠٠	٣٨٨	٤١٢	٣٦-٤٤سم
٦٩	٨٢	٥٦	٨٩	٧٨	١١٠	٦٥-٧٢سم

جدول رقم ٢: تكرار انواع الفطر *Fusarium* في ١٠٠ مستعمرة من كل موقع باستعمال

Planting of sieved debris

انواع اخرى	انواع الفطر			الموقع
	<i>F. graminearum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	
٢٧	٢١	٤١	١١	الرز
٢١	٣٢	٣٨	٩	الذرة
٤٠	٨٨	١٤	٤٨	بيل الخضر

المصادر

- 12 Parkinson, D Techniques for the study of soil fungi Bull Ecol Res Comm (Stockholm) 17 29-36 (1973)
- 13 Smith, S.N and Snyder W.C Persistence of *Fusarium oxysporum* f.sp vasinfectum in fields in the absence of cotton Phytopathology 65: 190-196 (1975).
- 14.Tio, M.; Burgess, L.M., Nelson P.E. and Toussoun T.A. Techniques for the isolatoin, culture and preservation of the fusaria. Austr. Plant Pathol. Soc. Newsl. 6: 11-13 (1977).
- 15.Tsao, P.H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol 8: 157-186 (1970).
- 16.Warcup, J.H. The soil plate method for isolation of fungi from soil, Nature (Lond.) 166: 117 (1950).
- 17.Warcup, J.H. Isolatin of fungi from hypae present in soil. Nature (Lond.) 175: 953-954 (1955).
- 18.Warcup. J.H. Methods for isolation and estimation of activity of fungi in soil. Pages 3.21 in: the Ecology f fungi, D. Parkinson and J.S. Waid, eds. Liverpol Univ. press, Liverpool, England. 324pp. (1960).
- 19.Worf, G.L. and Hagederon, D.J. A technique for studying relative soil populations of two fusarium pathogens of garden peas. Phytopathology 51: 805-806 (1961).
1. عصوي، محمد نظري محمد. على خمسين لغسون، امراض النباتات، مطبعة دار الحكمة (1990).
2. ديوان، محمود متعب. على خمسين البهادلي، امراض النبات، مطبعة مؤسسة المعاهد الفنية (1985).
- 3 Gordon W.L. The occurrence of fusarium species in Canada V Txonomy and geographic distribution of fusarium species in soil. Can. J. Bot. 34: 833-846 (1956).
- 4.Komado, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. plant prot. Res. 8: 114-125 (1975).
- 5.Kreutzer, W.A. Fusarium spp. as colonists and potential pathogens in root zones of grassland and plants. Phytopathology. 62: 1066-1070 (1972).
- 6.Martin J.P. Use of acid, rosebengal and antimicrobial in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci. 69: 215-232 (1950).
- 7.Mathur, S.K. Selection of seed brne fungi in sorghum and location of Fusarium moniliforme the seed. Sorghum and Millet Abstracts 1976 Vol. 1, P. 71-72 (1975).
- 8.McMullen, M.P. and Stack, R.W. Effects of isolation techniques and media on the differential isolation of *Fusarium* species. Phytopathology 73: 458-462. (1983).
- 9.Nash, S.M., and Snyder, W.C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot fusarium in field soil. Phytopathology 52: 567-572 (1962).
- 10.Ooka, J.J., and Thor K. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* corn fields. Phytopathology 67: 1023-1028 (1977).
- 11.Papavizas, G.C. Evaluation of various media and streptomycin agents for isolatoin of fusarium from soil. Phytopathology 57: 848-852 (1967).

## التأثير المثبط والقاتل للايثانول على بعض الخمائر الصناعية

مستلم حسن جبر ومثلثي كاظم جواد وماجد محمد محمود\*

قسم علوم الحياة، كلية التربية، ابن الهيثم، قسم الكيمياء

\* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، بغداد

(استلم بتاريخ ١١/٢/١٩٩٦ وقبل للنشر في ١/٢٧/١٩٩٧)

## ABSTRACT

Six industrial strains were grown in medium containing 20% sucrose with  $10^6$  cell per ml and  $30^{\circ}\text{C}$  for 48 hr. to compare ethanol production. It is found that non-flocculant Baker yeast *Saccharomyces cerevisiae* is more efficient to produce ethanol than the other strains. The tolerance of the same strains to ethanol was tested using yeast extract liquid medium with pH 4.5 and  $30^{\circ}\text{C}$  for 5 days. It is found that non-flocculant Baker yeast *Saccharomyces cerevisiae* is more tolerant than the other strains and the minimal inhibitory and killing effect depends on the cell number per ml. for all of the strains.

## الخلاصة

تمت سبعة سلالات خمائر صناعية في وسط التخمر الحاروي على ٢٠% سكروز باستخدام  $10^6$  خلية/مل ودرجة حرارة  $30^{\circ}\text{C}$  لمدة ٤٨ ساعة لمقارنة إنتاجيتها للايثانول فوجد بان سلالة الخبز عديمة التلبد *Saccharomyces cerevisiae* هي اكثر هذه السلالات انتاجا للايثانول ثم اختبرت مقاومة نفس السلالات للايثانول في وسط مستخلص لخيرة السائل ذو الرقم الهيدروجيني ٤,٥ ودرجة حضانة  $30^{\circ}\text{C}$  لمدة ٥ ايام، فوجد بان سلالة خميرة الخبز عديمة التلبد *Sacc. cerevisiae* هي اكثر السلالات مقاومة للايثانول وان التأثير المثبط والقاتل للايثانول يعتمد على تركيز الخلايا في الملتتر الواحد لكافة السلالات.

## المقدمة

وقد اكتسبت صناعة الكحول الايثلي اهمية كبيرة في مطلع القرن الحالي بسبب استخداماته الواسعة في مختلف الصناعات الكيماوية والصيدلانية مثل صناعة الادوية ومواد التجميل والتعقيم في المستشفيات، وانتاج المشروبات الروحية المتنوعة، وقد اكدت العديد من البحوث بان امكانية خميرة على انتاج الايثانول لاتعتمد على درجة تحملها له حيث وجدت انواعا من الخمائر تتحمل تراكيز عالية من الايثانول ولكنها ضعيفة الانتاج

يعد الكحول الايثلي من اهم المواد الايضية لنتجة من قبل انواع معينة من الخمائر المتباينة في انتاجها للكحول، حيث تعد خميرة *Saccharomyces cerevisiae* اكثر الانواع انتاجا ومقاومة له<sup>(١)</sup>.

(٢) خميرة الخبز نوع *Saccharomyces cerevisiae* من معمل خميرة الخبز في الموصل بنوعين:  
(ج) خميرة عديمة التلبد (مشتقة)  
(د) خميرة ملبده

(٣) خميرة *Schizosaccharomyces pombe* قسم التقنية الحياتية في كلية العلوم بنوعين:

(هـ) النوع البري ٩٧٢٥

(و) الطفرة الحساسة للايثانول

- الاوساط الزراعية:

(١) الوسط المستخدم من قبل (٩) المكون من ٥ غم مستخلص الخميرة السائل Yeast extract انتاج شركة Merk ٣٠ غم كلوكوز D-glucose شركة Fluka ويكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

(٢) مائل اكر مستخلص الخميرة نفس مكونات الوسط الاول مضافا له ٢% اكر من شركة Maknur.

(٣) وسط التخمر ويتكون من:

- ٢٠% Sucrose مضافا له ٠,٢% مستخلص الخميرة و ٠,٣% مستخلص المالت انتاج شركة BDH و ٠,٥% بتون انتاج شركة Maknur.

- تعقم الاوساط في جهاز التعقيم البخاري Autoclave بضغط ١٥ باوند/ انج مربع انتاج شركة Hirayama

- عدل الرقم الهيدروجيني للاوساط بوساطة جهاز قيم الرقم الهيدروجيني (pH-meter شركة Melrohm) الى ٤,٥ لكل وسط.

- تقدير السكر في وسط التخمر

اتبعت طريقة 1970 McCready<sup>(١٠)</sup> في تقدير

السكر المستهلك من قبل الخميرة في وسط التخمر، وقيس

السكر المتبقي بوساطة جهاز بركس Brix المنتج من

شركة Bs Ltd.

- تقدير الايثانول

اتبعت الطريقة الحجمية المذكورة في

A.O.A.C.<sup>(١١)</sup>

- قياس حساسية الخميرة للايثانول

لهذه المادة<sup>(١)</sup>، وفي دراسة اخرى وجد بان الايثانول انتج بصورة جيدة من بعض السلالات الحساسة له<sup>(٢)</sup>، حيث اوضحت العديد من الدراسات بان للايثانول تاثيرات مختلفة على خلايا الخميرة خاصة والاحياء المجهرية الاخرى عامة، فهو يهاجم الخلية من الداخل ويؤدي الى تثبيط معدل النمو وعملية التخمر<sup>(١)</sup> وتتخلص تاثيراته بما يلي:

١. يعمل على تغيير الخواص الطبيعية لجزيئة البروتين عندما يوجد بتركيز عالية حيث تتكسر الجزيئة البروتينية الى تراكيب ثنائية وثلاثية عن طريق كسر الاواصر الهيدروجينية والكبريتيدية الرابطة لتراكيب البروتين<sup>(٥)</sup>.

٢. يعمل الايثانول على سيولة الغشاء البلازمي ويسبب تسرب المكونات الساييتوبلازمية للخلايا الى الخارج<sup>(٦)</sup>.

٣. يحدث الايثانول تغييرا في تركيب الاحماض الدهنية لاغشية الخلايا فيتغير تركيب الاحماض الدهنية كاستجابة وتكيف لتاثير الايثانول نتيجة للتداخل الفسلجي والكيميائي مع الغشاء<sup>(٧)</sup>.

كما ان التراكيز الواطنة منه تذيب طبقة الدهن الثانية للغشاء البلازمي وبالتالي تلف الخلايا<sup>(٨)</sup>.

وقد جاءت هذه الدراسة بهدف:

١. دراسة التاثير المثبط والقاتل للايثانول وقل وقت كافي للقتل لبعض سلالات الخمائر الصناعية.

٢. اجراء المقارنة بين حساسية هذه السلالات للايثانول وعلاقتها بانتاجيته.

٣. علاقة تحمل الخلايا للايثانول بعدد الخلايا في الوسط

## المواد وطرائق العمل

### السلالات

استخدمت ٤ سلالات صناعية وهي:

(١) خميرة البيرة *Brewing yeast* نوع *Saccharomyces uvarum* بنوعين:

(أ) خمير جيدة التلبد من مركز بحوث اباء للابحاث

(ب) خميرة ضعيفة التلبد (كلية العلوم-جامعة بغداد)

العالية للإيثانول التي بلغت ٨,٠% حجم / حجم تليها خميرة البيرة، ضعيفة التلبد من حيث سرعتها في استهلاك السكر التي بلغت ٨٣% ونتاجها ٧,٥% إيثانول أما السلالتين الملبدتين للخبز والبيرة فقد كانتا متقاربتين في استهلاك السكر ونتاج الكحول كما لوحظ بأن الطفرة الحساسة للكحول كانت اكفا في انتاج الايثانول من السلالة البرية التابع للجنس *Schizosaccharomyces pombe* وهذه النتيجة مشابهة لما توصل اليه الباحث (٣) عندما وجد بان الطفرة الحساسة للإيثانول اعطت نسبة انتاج مقارنة للسلالة الام.

جدول رقم ١: انتاج الايثانول من سلالات الخمائر بوجود ٢٠% سكر وبدرجة ٣٠م ورقم هيدروجيني ٤,٥ وفترة حضن لمدة ٤٨ ساعة وباستخدام ١٠<sup>١</sup> خلية/مل

السلالة	انتاجية الايثانول % حجم/حجم	السكر المستهلك %	السكر المتبقي %
خميرة الخبز المشتتة	٨,٠	٩٠	١٠
خميرة البيرة ضعيفة التلبد	٧,٥	٨٣	١٧
خميرة البيرة جيدة التلبد	٦,٢٥	٦٥	٣٥
خميرة الخبز الملبدة	٦,٠٣	٦٠	٤٠
الطفرة الحساسة	٣,١	٣٥	٦٥
السلالة البرية	٢,٧	٢٠	٨٠

تأثير التراكيز المختلفة من الايثانول في وسط مستخلص الخميرة السائل على نمو الخمائر عند الحضن في حرارة ٣٠م لمدة خمسة ايام وباستخدام ١٠<sup>٣</sup> خلية / مل كلقاح اولي.

يلاحظ في الجدول رقم (٢) بان السلالات الاربعة المتمثلة بسلالة الخبز المشتتة وسلالة البيرة ضعيفة التلبد والسلالة البرية والطفرة الحساسة قد قلومت تركيز ٦% من الكحول المضاف الى الوسط في حين لم تقاوم السلالتين الاخرتين المتمثلتين بخميرة الخبز الملبدة وخميرة البيرة جيدة التلبد سوى ٤% من الايثانول المضاف لوسط التتمية وهذه النتيجة تؤكد العلاقة بين

تم قياس التركيز الادنى المثبط والقابل للإيثانول والوقت لازم لقتل الخميرة بالطريقة التي استعملها زيودي (١٢).

- اعداد اللقاح

تم اعداد المنحنى القياسي لحساب عدد الخلايا في اللقاح، وذلك باخذ سلسلة من التخفيفات للقاح المحضو بالوسط الزراعي السائل YE وحساب عدد الخلايا في كل تخفيف بواسطة شريحة عد الخلايا Heamocytometer يتبعها قراءة الكثافة الضوئية لكل تخفيف في جهاز Spectrophotometer على طول موجي ٥٨٠ نانوميتر ومن ثم رسم العلاقة بين عدد الخلايا والكثافة الضوئية.

- حفظ المزارع وادامتها

زرعت سلالات الخمائر في انابيب اختيار تحتوي على الاكار المائل للوسط الزراعي YE ثم حضنت في حرارة ٢٥م لمدة ٤٨ ساعة وبعد انتهاء فترة الحضن حفظت في التلاجة على درجة ٤م لحين الاستعمال وكانت لمزارع تتشط مرة واحدة كل اسبوعين للحفاظ على حيويتها ونشاطها.

- ظروف التتمية

تمت المزارع في دوارق سعة ٢٥٠مل وضع في كل دورق ١٠٠ مل من الوسط السائل الملقح بسلالات المذكورة انفا وحضن في مزارع هزازة بسلالات المذكورة انفا وحضن في مزارع هزازة Orbital shaker incubator الجهاز من شركة Gallenkamp وبدرجة حرارة ٣٠م.

## النتائج والمناقشة

انتاج الايثانول من سلالات الخمائر بوجود ٢٠% سكر وبدرجة ٣٠م ورقم هيدروجيني ٤,٥ وفترة الحضن لمدة ٤٨ ساعة وباستخدام ١٠<sup>١</sup> خلية / مل. لقد تم درج السلالات في الجدول رقم (١) حسب تسلسلها في سرعة استهلاك السكر ونتاجها العالي للإيثانول حيث يلاحظ في الجدول الاستهلاك السريع للسكر من قبل خميرة الخبز المشتتة حتى بلغ ٩٠% من السكر ونتاجيتها

انتاجية الكحول ودرجة تحمل الخميرة فقد اشار (١٢) الى الاختلاف بين حساسية السلالات المثقلة لخميرة Sacch. cervisiae اذ وجد ان التركيز المثبط لنمو السلالة NCYC 366 هو ٧% والمثبط لنمو السلالة NCYC 478 هو ١٢% من الايثانول كما وجد بان الخمائر المنتقاة من معامل انتاج الايثانول تكون اكثر تحمل لايثانول بالنسبة للخمائر الاخرى من نفس النوع.

جدول ٢: تأثير التراكيز المختلفة للايثانول على نمو الخميرة في درجة حرارة ٣٠ م لمدة ٥ ايام وباستخدام ١٠<sup>٢</sup> قليلة

مل

الطفرة الحساسة	السلالة البرية	سلالة البيرة ضعيفة التلبد	سلالة البيرة جيد التلبد	سلالة الخبز الملبدة	سلالة الخبز المشتتة	تركيز الايثانول %
+	+	+	+	+	+	١
+	+	+	+	+	+	٢
+	+	+	+	+	+	٣
+	+	+	+	+	+	٤
+	+	+	-	-	+	٥
-	+	+	-	-	+	٦
-	-	-	-	-	+	٧
-	-	-	-	-	-	٨
-	-	-	-	-	-	٩
-	-	-	-	-	-	١٠

السلالات وهي نتيجة متفقة مع ما توصل اليه معظم الباحثين حيث ذكر (١٣) و (١٤) بأن زيادة عدد خلايا اللقاح تؤدي الى زيادة التركيز الادنى للمواد المثبطة، حيث ان زيادة عدد الخلايا تقلل من تأثير الايثانول لأن هذا التأثير يتوزع على عدد كبير من الخلايا. كما أن تحمل التراكيز العالية نسبياً من الايثانول من قبل بعض السلالات يعود الى طبيعة السلالة وقدرتها على تحمل التراكيز العالية للايثانول جدول رقم (٣).

-تأثير الايثانول المثبط لسلالات الخمائر المنمأة في الوسط السائل YE عند الحضان في درجة 30 م لمدة 5 ايام وباستخدام أعداد مختلفة للخلايا في اللقاح.

يلاحظ في الجدول رقم 3 بأن سلالة البيرة ضعيفة التلبد كانت اكثر السلالات تحملاً للايثانول حيث قاومت الايثانول لغاية التركيز 8% عندما كان عدد خلايا اللقاح 10<sup>3</sup> فيما تشابهت نسبة الايثانول المثبط للنمو في سلالة البز المشتتة وسلالة البيرة جيدة التلبد والسلالة البرية حيث بلغت 6% في حين كانت نسبة الايثانول المثبطة لنمو الطفرة الحساسة 3% وهي أضعف السلالات مقاومة للايثانول عندما كانت عدد الخلايا في اللقاح 10<sup>3</sup>. كما يلاحظ من الجدول بأن زيادة تحمل السلالات للايثانول يزداد بزيادة عدد الخلايا في اللقاح ولكافة

وقد تكون لهذه الاختلافات في قابلية الخميرة على تحمل التراكيز العالية للأيثانول تطبيقات مهمة عند اختيار الخميرة المناسبة لإنتاج الأيثانول.

جدول (٣) تأثير الأيثانول المثبط لسلاسل الخمائر عند الحضانة في درجة حرارة 30م لمدة 5 أيام وباستخدام أعداد مختلفة للخلايا في التفاعل.

السلالة	عدد الخلايا/خلية / مليلتر		
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
١- خميرة البيرة ضعيفة التلبد	١٤	١٠	١٨
٢- خميرة البيرة جيدة التلبد	١١	٨	٦
٣- خميرة الخبز المشتة	١٥	١٣	٦
٤- السلالة البرية	٩	٨	٦
٥- خميرة الخبز الملبدة	١٣	١١	٤
٦- الطفرة الحساسة	٨	٥	٣

جدول (٤) تأثير الأيثانول القاتل لسلاسل الخمائر عند الحضانة في درجة حرارة 30م لمدة 5 أيام وباستخدام أعداد مختلفة للخلايا في التفاعل.

السلالة	عدد الخلايا/خلية/مليلتر		
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
١- خميرة البيرة ضعيفة التلبد	٢٠	١٦	١٢
٢- خميرة البيرة جيدة التلبد	١٧	١٤	٩
٣- خميرة الخبز المشتة	١٩	١٤	٨
٤- السلالة البرية	١٤	١٣	٩
٥- خميرة الخبز الملبدة	١٥	١٢	٧
٦- الطفرة الحساسة	٨	٦	٤

تأثير الأيثانول القاتل عند استخدام أعداد مختلفة من الخلايا في الملتر الواحد من التفاعل والحضانة في درجة حرارة 30م لمدة 5 أيام.

ولمعرفة فيما إذا كانت تراكيز الأيثانول المستعملة قاتلة أم مثبطة لخلايا الخمائر الناتجة من تحرية السابقة فقد أخذت نماذج من أوساط التفاعل لحاوية على تراكيز الأيثانول الدنيا المثبطة للنمو أو أكثر. زرعت في وسط مستخلص الخميرة السائل الخالي من الأيثانول فوجد بان السلالات تباينت أيضا في درجة تحملها للأيثانول القاتل حسب التسلسل المبين في الجدول رقم (٤) بسبب الاختلاف في طبيعة هذه السلالات وقابليتها في تحمل التراكيز العالية للأيثانول حيث نمت هذه الخمائر التي لم تنمو في التراكيز المثبطة للأيثانول كما لم تنمو في التراكيز الأكثر من ذلك وهذا يشير الى ان التراكيز المثبطة في هذا الجدول هي بمثابة تراكيز قاتلة وليست مثبطة للنمو فحسب.

- تعيين الحد الأدنى للوقت اللازم لقتل الخلايا بوساطة الأيثانول عند الحضانة بدرجة حرارة 30م وباستخدام 10<sup>6</sup> خلية/مل

استعملت هذه الطريقة من قبل الزيدي<sup>(١١)</sup> اذ بين بانها اكثر دقة واقل خطأ من بقية الطرائق الاخرى في تحديد التركيز القاتل. حيث تحضر تراكيز مختلفة من الأيثانول في انابيب اختبار معقمة ويكمل الحجم بالماء المقطر الى 9,9مل وتترك في حمام مائي بدرجة حرارة 30م ثم تلقح الانابيب باضافة 0,1مل من مزرعة السلالة المستخدمة ويؤخذ 0,5مل من خليط التفاعل بعد كل ساعة ويضاف الى انابيب تحتوي على الوسط السائل YE وتحضن بدرجة 30م ويلاحظ النمو يوميا. فكانت النتائج كما بينها الجدول رقم (٥).

ان 20% من الكحول الايثيلي قد استغرق 22 ساعة لقتل سلالة الخبز المشتة واستغرق نفس التركيز من الأيثانول 19 ساعة لقتل سلالة الخبز الملبدة بينما استغرق تركيز 15% من الأيثانول 23 ساعة لقتل سلالة البيرة جيدة التلبد و 20 ساعة لقتل سلالة البيرة ضعيفة التلبد باستخدام نفس التركيز من الأيثانول.

كما بين الجدول رقم (٤) بان نسبة التراكيز قاتلة من الأيثانول تزداد بزيادة عدد الخلايا في الملتر لوحد حتى اصبح الارتفاع واضح عند زيادة عدد الخلايا الى 10<sup>4</sup> ولكافة السلالات وهي نتيجة متفقة مع النتيجة التي حصلنا عليها في الجدول رقم (٣)

3. Ibrahim, M.A.K.; Al-Shahwani, M.F.; Kaddari, N. and Abdul-Aziz G.M. "Isolation and characterization of flocculent mutant of *Schizosaccharomyces pombe*". The fifth scientific conference of the scientific research council. Baghdad April 28th. May 2nd. (In press) (1989).
4. Brown, S.W. and Oliver, S.G. "The effects of temperature on the ethanol tolerance of the yeasts, *Saccharomyces uvarum*" Biotechnol. Lett. 4: 269-274 (1982).
5. Hill, M.W. "The effect of anaesthetic like molecules on the phase transition in semectic mesophases of Dipalmitoyl lecithin the normal alcohol up to C=9 and three inhalation anaesthetics". Biochem. et Biophys. acta 356: 117-124 (1974).
6. Ingram, L.O. "Adapatation of membrane lipid to alcohols" J. Bac. 125: 670-678 (1976).
7. Ingram, L.O. and Vreeland, N.S. "Differential effect of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cel envelop"; J. Bact. 144: 481-488 (1980).
8. Clark, D.P. and Beard, J.P. "Altered phospholipid composition in mutants of *Escherichia coli* sensitive or Resistant to organic solvents" J. Gen. Microbiol. 113: 267-274 (1979).
9. Gutz, H.; Hestot, H.; Leupold, U. and Loprieno, A. *Schizosaccharomyces pombe*. Cited in King R.C. Handbook of Genetics, Vol. 1, Plenum press, New York (1974).
10. McCready, R.M. "Monosaccharides. Cited in Joslyn M.A. Method in food analysis. Academic press New York (1970).
11. A.O.A.C. Association of official Analytical chemists official methods of analysis 12th. ed. Washington, DC. USA (1975)
12. Al-Zaidy, H.M. "Study of the antimicrobial activity of some Alcohols" Ph.D. Thesis heriot-Watt Univ. Edinb. (1975).
13. Bulger, R. and Washington, J.A. "Effects of mocolum size and B-lactamase

فيما استغرق قتل سلالة البرية ١٧ ساعة باستخدام تركيز ١٥% من الايثانول و ١٣ ساعة لقتل السلالة الحساسة تطلب تركيز ١٠% من الايثانول، ويعود سبب هذا الاختلاف في مقاومة السلالات للايثانول، كما اشار اليه (١٥) ان الغشاء البلازمي للخميرة التي تتحمل تراكيز عالية من الايثانول يكون اقل نفاذية بسبب الـ Plasmolysis اما غشاء الخلايا الحساسة فيكون اقل صلابة لان الخلايا تنفجر ويتحرر السايثور بلازم ويبقى الجدار فقط بعد معاملتها بالايثانول - كما اوضح الباحث في المرجع (١٦) بان الغشاء البلازمي للخميرة التي تتحمل تراكيز عالية من الايثانول قابل للتكيف بصورة افضل للايثانول خلال النمو مقارنة بالغشاء البلازمي للخميرة التي تتحمل التراكيز الواطئة من الايثانول.

جدول (٥) تعيين الحد الأدنى للوقت اللازم لقتل سلالات الخمائر بواسطة الايثانول وبدرجة ٣٠ م وباستعمال ١٠<sup>٦</sup> خلية/مل

الوقت /ساعة	تركيز الايثانول /حجم/حجم	السلالة
٢٢	٢٠	خمير الخبز المشتتة
١٩	٢٠	خميرة الخبز ملبدة
٢٣	١٥	خميرة بيرة جيد التلبد
٢٠	١٥	خميرة بيرة ضعيفة التلبد
١٧	١٥	السلالة البرية
١٣	١٠	الطفرة الحساسة

### المصادر

1. Gokhale, D.V., Rao, B.S. and Sivaromakrishnam, S. "Alcohol dehydrogenase and invertase activities in Ethanol tolerant yeasts"; Enzyme Microb. Technol. 8: 623-626 (1986).
2. Benites T.; Gastillo, L.; Aguilera, A. ; Conde, J. and Cerdeolmedo, E. "Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of Ethanol and Sucrose"; Appl. and Environ. Microbiol. 45: 1429-1436 (1983).

growth in the proteolipid supplemented media" Agri. Biol. Chem. 39: 1025-1031 (1975).

16. Gimenez, J. and Benitez, T. "Adaption of yeasts cell membranes to Ethanol Appl." Environ. Microbiol. 53: 1196-1198 (1987).

production on in vitro activity of new cephalosporins against Haemophilus species" Antimicrob Agents Chemother 17: 393-396 (1980).

14. Hugo, W.B. and Russell, A.D. "Pharmaceutical microbiology Blackwell Scientific Application, London (1977)

15. Hayashida, S. Feng, D. and Hongo, M. Physiological properties of yeast cell

## دراسة الصفات الفيزيائية والكيميائية للبكتين المستخلص من قشور البصل المحلي

منتهى عبد الكريم الصفار

قسم صحة المجتمع - المعهد الطبي الفنى - بغداد

(استلم بتاريخ ١٤/٣/١٩٩٩، قبل للنشر بتاريخ ٢/١١/١٩٩٩)

## ABSTRACT

Different solutions were used to extract pectin from onion skins (*Allium cepa Linn.*) included (distilled water, 0.1N hydrochloric acid and 0.5% (W/V) ammonium oxalate). The higher yield of pectin (35%) was extracted with 0.5% ammonium oxalate. The values of jelly grade, molecular weight were 210 and 53000 dalton respectively. The degree of esterification, specific viscosity methoxyl content were 60%, 3.10 and 7.78%, respectively. The results were showed good relationship between intrinsic viscosity, jelly grade & molecular weight of the pectin.

## الخلاصة

استخدمت محاليل مختلفة في استخلاص البكتين من قشور البصل (*Allium cepa Linn.*) شملت الماء المقطر، حامض الهيدروكلوريك ٠,١ عياري، واوكزالات الامونيوم ٠,٥% (وزن/حجم). بلغت نسبة البكتين المستخلص بواسطة محلول اوكلالات الامونيوم ٠,٥% (وزن/حجم) ٣٥%. كما قدرت درجة التهليم والوزن الجزيئي للبكتين الناتج فكانت ٢١٠ و ٥٣٠٠٠ دالتون على التوالي. اما درجة الاسترة واللزوجة النسبية ومحتوى الميثوكسيل فكان ٦٠% و ٣,١٠ و ٧,٧٨% على التوالي. واطهرت النتائج وجود علاقة وثيقة بين اللزوجة النسبية ودرجة التهليم والوزن الجزيئي للبكتين قيد الدراسة.

## المقدمة

القوام المتماسك، اما في مجال الصناعات الدوائية فيستخدم كمواد منظمة للامعاء في الادوية المضادة للاسهال وفي خفض مستوى الكولسترول في الجسم (٣). وقد بين (٤) بان اوكلالات الامونيوم كانت اكثر كفاءة في استخلاص بكتين الثوم باستخدام محلول حامض الهيدروكلوريك المخفف والذي احتوى على درجة عالية من بكتين الميثوكسيل بمقدار ٧,٨٩.

هدفت الدراسة الحالية الى استغلال قشور البصل في تحضير البكتين منها ودراسة خواصه الكيميائية والفيزيائية لانتاجه مستقبلا، وبيان المجالات الملائمة لاستعماله فضلا عن تقليل مشاكل التلوث البيئي.

يعتبر محصول البصل (*Allium cepa Linn.*) من المحاصيل الحقلية الواسعة الانتشار التي يكثر زراعتها في قطرنا ويمتاز بقيمة غذائية عالية بالطعم والرائحة المميزتين له<sup>(١)</sup>. ان الاتجاه الحالي في العالم هو استغلال المخلفات العرضية في الزراعة والصناعة لانتاج مواد ذات قيمة اقتصادية ومنها البكتين الذي يستخلص من قشور الفواكه (الحمضيات) بالدرجة الاولى وكذلك قشور البصل وخصوصا الانواع الغنية به<sup>(٢)</sup>، كما يستخدم البكتين في مجال الصناعات الغذائية لاعطاء المنتج

## المواد وطرق العمل

### استخدام البكتين

محتوى المثيوكسيل وذلك باستخدام نصف جرام من البكتين المستخلص، اما درجة الاسترة فقد تم حسابها وفقا لطريقة (٧)، قدرت اللزوجة باستخدام جهاز الانبوبة الشعرية (Ostwald viscometer) من نوع CRFC حجم ٧٥. وكان نموذج محلول البكتين ٠,٥% مذابة في محلول فوسفات الصوديوم السداسية ١% عند رقم هيدروجيني ٤,٥. قدر الوزن الجزيئي للبكتين عن طريق حساب اللزوجة النسبية وفقا لطريقة (٨).

### درجة البكتين (Pectin grade)

قدرت وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (٩) وذلك بتحضير هلام قياسي نسبة المواد الصلبة الكلية فيه ٦٥%، حلت قيم طرق الاستخلاص احصائيا وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (١٠).

### النتائج والمناقشة

من اجل التعرف على المكونات الاساسية في قشور البصل الاحمر، يوضح الجدول رقم (١) بان محتوى الرماد في قشور البصل ٣,١٠%، اما محتوى البروتين ٠,٧٥%، قدر محتوى الرطوبة لقشور البصل بمقدار ٩% وجاءت هذه النتائج مطابقة لما اورده (١١) والتي كانت ٩% في قشور البصل الحمراء و ١٢,٤١% في قشور البصل الابيض.

جدول ١: المكونات الاساسية لقشور البصل

المكونات	النسبة المئوية (%)
الرماد	٣,١٠
الرطوبة	٩,٠٠
الدهن الكلي	٣,٢٠
البروتين الكلي	٠,٧٥

ولغرض التعرف على افضل طريقة لاستخلاص البكتين من قشور البصل فقد تم استلصه بمحاليل ثلاثة

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (٥) وذلك بنقع قشور البصل الحمراء الجافة في ٨٠% كحول ايثيلي بدرجة ٨٠م و لمدة ٢٠ دقيقة للتخلص من اكبر قدر ممكن من المواد الذائبة غير البكتينية والصبغات الملونة، بعدها جففت القشور للتخلص من الكحول ايثيلي ثم استخلصت مواد البكتينية باستخدام المحاليل الثلاثة التالية كل على تراك (او كالات الامونيوم ٠,٥% (وزن/حجم)، حامض ليهيدروكلوريك (٠,١) عياري والماء المقطر. وضعت المحاليل اعلاه في حمام مائي بدرجة ٨٠م بدون استخدام تبريد لمدة ساعتين وكررت العملية اربعة مرات للمينة نفسها لاستخلاص اكبر كمية ممكنة من المواد البكتينية. جمعت المستخلصات ورشحت خلال ورقة الترشيح من نوع واتمان رقم ١. و اضيف الى الراشح خليط من الايثانول ٩٥% و ٠,١ عياري حامض الهيدروكلوريك، ترسيب المادة البكتينية ورشح الراشح وغسل بمحلول الايثانول ٩٥% للتخلص من ايونات الكلوريد، بعدها غسل لراشح بالاسيتون وتثاني اثيل اثير ثم جففت في فرن بخلل الضغط بدرجة ٦٠م و قدر وزنه.

### تقدير الرماد

تمت عملية تقدير الرماد وفقا للطريقة المتبعة<sup>(١)</sup> وذلك باستخدام فرن (Muffle furnace) على درجة ٦٠٠م لمدة ٤ ساعات.

### تقدير النتروجين الكلي:

قدر النتروجين الكلي في قشور البصل باستخدام طريقة مايكروكلدال ومنها تم ايجاد البروتين الكلي وذلك باستخدام العامل ٦,٢٥.

### تقدير الرطوبة

قدرت الرطوبة على درجة ١٠٥م لمدة ٣ ساعات ولحين ثبات الوزن. اتبعت طريقة (٧) لتقدير

قدرت اللزوجة النسبية لبكتين قشور البصل المستخلصة بهذه الدراسة اذ بلغت ٢,٥ سنتي بويل، اما الوزن الجزيئي فقد قدر اعتمادا على اللزوجة النسبية وبلغ ٥٣٠٠٠ دالتون. تعتمد نوعية المواد البكتينية للاستعمالات الصناعية على مقدار درجة البكتين pectin grade اذ بلغت ٢١٠ درجة. وتتناسب قوة الهلام مع الوزن الجزيئي للبكتين طرديا حيث كلما كان وزنه على كان الهلام الناتج اقوى وكذلك فان سرعة تكون الهلام تعتمد على مجاميع الميثوكسيل ولا تتأثر قوة تركيز الهلام بنسبة مجاميع الميثوكسيل<sup>(١٦)</sup>.

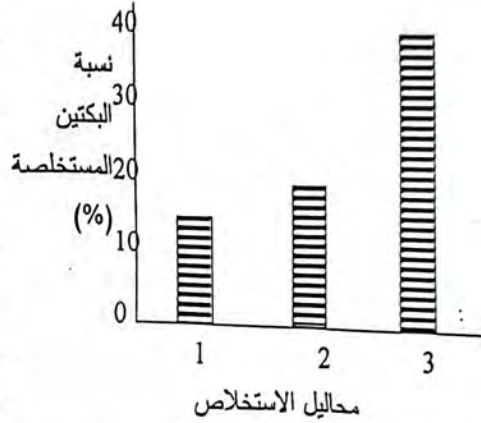
كما اظهرت النتائج بان البكتين المستخلص من قشور البصل لم يظهر فيه طعم البصل كذلك كان لونه وردي شاحب وهو اللون الطبيعي للبكتين ويتميز بمسوع الانتشار والاذابة في الماء<sup>(٢)</sup>. ويمكن اجراء دراسات مستقبلية على صفات البكتين الاخرى وكذلك اجراء دراسات تطبيقية على استخدام البكتين المنتج في مجالات الغذائية والطبية والصيدلانية.

جدول ٣: صفات بكتين قشور البصل المستخلص باوكزالات الامونيوم ٠,٥%

الصفات	القيم
الرماد (%)**	٠,٩١
درجة الجلي (البكتين)	٢١٠,٠٠
درجة الاسترة (%)	٦٠,٠٠
الوزن الجزيئي	٥٣٠٠٠,٠٠ دالتون
الميثوكسيل (%)	٧,٨٧
اللزوجة النسبية (سنتي بويل)	٢,٥٠
اللزوجة النوعية (سنتي بويل)	٣,١٠
اللون	وردي شاحب
الرائحة	متعادل

قدرت على اساس الوزن الجاف  
\* معدل ثلاثة قراءات

كما موضحة في الشكل (١)، حيث بلغت اقصى نسبة استخلاص ٣٧% باستخدام محلول اوكزالات الامونيوم ٠,٥%، اما حامض الهيدروكلوريك ٠,١ عياري اعطى نسبة استخلاص ١٨% وكانت اقل نسبة استخلاص عند استخدام الماء المقطر فبلغت ١٣%. وتشير النتائج بان هناك اختلافات معنوية بين الطرق الثلاثة على مستوى ٥% هذه النتائج جاءت مطابقة لما اوجده (١٢)، (٥)، (٢) و (١).



الشكل (١) محاليل استخلاص البكتين المختلفة

١. ماء مقطر ٢. حامض الهيدروكلوريك (٠,١ ع)
٣. اوكزالات الامونيوم (أ،ب،ج تعني معدلات الاختلافات المعنوية على مستوى ٠,٠٥)

نتائج التحليل الكيمائي للبكتين موضحة في الجدول (٣)، حيث بينت بان محتوى الرماد الكلي في قشور البصل المستخلصة باوكزالات الامونيوم كانت ٠,٩١% وهذه النتائج جاءت مطابقة لما اوجده (٣) بان قيم الرماد تكون عالية في البكتين المستخلص من مصادر مختلفة، بلغت درجة المثيلة (Methoxyl degree) والاسترة لبكتين قشور البصل ٧,٨٧% و ٦٠% على التوالي ويعتبر بكتين قشور البصل من الانواع الواطنة في مجاميع الميثوكسيل والتي تستخدم في انتاج الاغذية قليلة المحتوى السكري<sup>(١٣)</sup>. وهناك علاقة طردية بين درجة المثيلة والاسترة والنوعية العالية للبكتين المستخلص<sup>(١٥،١٤)</sup>

المصادر

7. Schultz, T.H. Methods in carbohydrate chemistry. Vol. V Whistler, R.L. ed. Academic Press, New York.
8. Chirstensen, P. and Pederson, K. Methods of grading pectin in relation to the molecular weight (intrinsic viscosity) of pectin. Food Res. 19: 163-166, (1954).
9. Kertesz, Z.I. The pectic substances. Interscience publishers, Inc. New York (1951).
10. Steel, R.G.D. and Trrie, T.H. Principle and procedures of statistics. 2nd, ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., Toronto (1980).
11. Alexander, M.M. and Suledbe, G.A. Pectic substances in onion and garlic skins. J. Sci. Food Agric., 24: 611-615 (1973).
12. Abdel-Fattah, A.F. and Edrees, M. Chemical investigations on some constituents of pigmented onion skins. J. Sci. Food Agric., 22: 298-300. (1971).
13. Dalaly B.K. and Rikabi, K.A. Food Chemistry Mosul University (In Arabic).
14. Abdel-Fattah A.F. and Edrees, M. A study on the composition of garlic skins and the structural features of the isolated pectic acid. J. Sci. Food Agric., 23: 871-877. (1988).
15. Black, S.A. and Smith C.J.B. The grading of low ester pectin for use in desert gels. J. Food Sci., 37: 726 (1972).
16. Dalaly, B.K. Selected Topic in Biotechnology. Mosul University (In Arabic).
1. Ismail, A.S.; Bakr, A.A. and Edrees, F.M. Studies on the extraction & technological evaluation of pectin from orange & onion wastes. Menofiya J. of Agriculture Research 20(4)P. 1529-1537, (1995).
2. Sajet, A.S. The extraction of pectin from sour orange peels and evaluation of its physical and chemical properties M.Sc. thesis. College of Agric., Baghdad. Univ. Baghdad. Iraq. (In Arabic) (1988).
3. Al-Badawy A.M. Extraction and studying of the characters of three local substitutes for color materials in food technology. The Iraqi J. of Agric. Sci. 24 (2): 134-141 (1993).
4. Abdel-Fattah, A.F. and Khaireldin A.A. J. Chem. U.A.R. 13, 27. Cited by Abdel-Fattah, A.F. and Edrees, M. (1972). A study on the composition of organic skins and the structural features of the isolated pectic acid. J. Sci. Food Agric. 23: 871-877 (1970).
5. Askery, M. Extraction of Iraqi sunflower heads pectins and studying their physico-chemical properties. M.Sc. thesis, Coll. of Agriculture. Baghdad University. Iraq. (In Arabic) (1979).
6. Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) Methods of Analysis, 13th, ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D.C.

## القابلية التطفيرية والتسرطنية للكوسيبول

\* عبد الجليل ابراهيم الموسوي و \*\* رجوة حسن عيسى الربيعي و \*\*\* زهرة محمود الخفاجي  
 \* قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، ابو غريب، العراق.  
 \*\* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق  
 \*\*\* قسم اصناعات الغذائية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، ابو غريب، العراق  
 (استلم بتاريخ ١٩/٥/١٩٩٧ وقبل للنشر في ٣٠/٤/١٩٩٨)

## ABSTRACT

The results obtained in this study revealed that the mortality of mice fed cotton seeds was increased as the concentration of gossypol (an important constituent of cotton seed) was increased. The mutagenicity of gossypol was studied using *Salmonella typhimurium* strains TA97, TA98, TA100 which characterized by their ability to detect mutagens of different types. Results showed that gossypol is very potent mutagen. The effect of gossypol on mammalian cells and their chromosomes was studied by using bone marrow cells of fumer bone of treated mice. The results indicated an incridible increament in the number of sisted chromatide exchange, and also increased the mitotic index (MI). Gossypol had a clear effect on the replication mechanism as it caused an increament in the number of cells in the first division cycle and reduction the number of cells in the third division cycle and therefore dropping the replication index (RI) to level resulted from carcinogenic materials, all the last three parameters are characters of carcinogens.

## الخلاصة

اظهرت نتائج هذه الدراسة الى ان اطعام الفئران نماذج متلفة من بذور القطن الحاوية على الكوسيبول (الذي يعتبر من المكونات المهمة في بذور القطن) يؤدي الى زيادة الهلاكات في الفئران بشكل يتناسب طرديا مع كمية البذور المعطاة وعدد مرات الاطعام. كما درس تأثير الكوسيبول التطفيرية باستعمال سلالات خاصة من بكتريا *Samonella typhimurium* للكشف عن قابلية المواد على التطفير وهي TA97, TA98, TA100. وقد وجد ان للكوسيبول تأثير كبير في ارجاع هذه السلالات الى حالتها الطبيعية أي انها مادة مطفرة. اما تأثيره على المواد الوراثية للبانن فقد درس على خلايا وكروموسومات خلايا نخاع عظم الفئران المحقونة بتركيز مختلفة في غشاء الخلب. وقد اسفرت النتائج عن ان حقن الفئران ادى الى زيادة اعداد التبادل الكروماتيدي الشقيقي. كذلك زيادة معامل الانقسام للخلايا. كما ان حقن الفئران بالكوسيبول ادى الى اضطراب حركات التضاعف في الخلايا حيث زادت من اعداد الخلايا من الدورة الانقسامية الاولى وخفضت اعداد الخلايا في الدورة الانقسامية الثالثة كما انها خفضت من معامل التضاعف بشكل مشابه لتأثير المواد المسرطنة على المؤشرات الثلاث الاخيرة.

## المقدمة

المثال وصل انتاجها سنة ١٩٦٠-١٩٦١ الى اكثر من ٢٣ مليون طن في الولايات المتحدة فقط<sup>(٢٠١)</sup>. وتستهلك بذور القطن في تغذية الانسان كما هي الحال في امريكا اللاتينية ضمن برامج منظمات Aid, UNICEF

تشكل بذور القطن حوالي ثلثي حاصل القطن الزهر وبعد عمليات الحلج تفرز بكميات كبيرة فعلى سبيل

ثم الحصول على المواد اللازمة للتطهير كما في دراسات مشابهة<sup>(1,2)</sup> وكذلك فيما يخص السواد اللازمة لدراسة التأثيرات الحاصلة على المواد الوراثية في نخاع عظام فخذ الفئران<sup>(3)</sup>.

أما الأسترون والأيزوبروبيل والأنيلين (Aniline) المستعملة في تقدير الكوسيبول فقد تم الحصول عليها من شركة (BDH).

استعملت ذكور الفئران البيضاء السلالة العالمية AB من مختبرات قسم علوم الحياة/ الجامعة المستنصرية وهي بعمر 2-3 أشهر وبمعدل وزن 20 غم.

تقدير الكوسيبول الحر باتباع طريقة AOAS (Ba. 7-58)<sup>(4)</sup>.

### تجارب التطهير

استعملت سلالات إيميس المذكورة أعلاه بعد التأكد من ثبات صفاتها الوراثية وفق الطرق المتبعة في هذا المجال<sup>(1,2,3)</sup> وأجريت عمليات التطهير وفق الطوق الموصى بها من قبل د. إيميس ومعاونيه، واستعمل الأسترون المائي كسيطرة سالبة ومادة (NTG) Nitrosoguanidine بتركيز 5 مايكروغرام/ طبق كسيطرة موجبة. وقد أجريت عمليات التطهير بشكل مباشر أو بشكل غير مباشر باستعمال نظام التشييط اللباني S<sub>q</sub> بمقدار 10 مايكروليتر/ طبق محضر من أكباد جردان محرصة باستعمال مادة الفينوباربيتال وكان المستحضر يحوي على 40 ملغم/ ملتر بروتين.

### تأثير الكوسيبول في أنظمة اللبائن

حققت الفئران بمستخلص الكوسيبول في الأسترون المائي بتركيز متلفة في غشاء اللب ودراسة تأثير اطعام بذور القطن كوكر 310 للفئران فقد استعملت مجموعتان من الفئران كل مجموعة مؤلفة من خمسة فئران، اطعمت الاولى (1) غم من النموذج والمجموعة الثانية (2) غم وخمسة فئران استعملت كمجموعة سيطرة. وقد تم تسجيل بعض المؤثرات في خلايا نخاع العظام للفئران ومنها التحري عن التبادل الكروماتيدي

(Agency for International Development)<sup>(1)</sup>، ذلك لأن السواد الحاصل من البذور من القطن، ونحوه، بذور القطن على صبغة متعددة اللون (Gossypol) توجد داخل عدد خاص تنتشر في جميع أجزاء النبات وتتركز في الجذور والبذور. وتتأثر بدرجة الصبغة بالصفات الوراثية ومواعيد الزراعة وغيرها من الظروف<sup>(2)</sup>. وتصل نسبة الصبغة إلى 2% من وزن البذور<sup>(3)</sup> وحوالي 20-40% من ووزن العود<sup>(4)</sup>. وتتكوّن الكوسيبول مادة سامة وقد يكون تأثيرها تراكمي لغير إسمرات، والملاحظ بصورة عامة أن زيادة تراكيزها يمكن أن يسبب اضطرابات في القلب الذي قد يؤدي إلى موت نتيجة فشل الدورة الدموية<sup>(1)</sup>. ومن جهة أخرى نجد أن التراكيز العالية تؤدي إلى تأثيرات غير مرغوب فيها وذلك بتداخله مع البروتينات أثناء عمليات التصنيع مما يؤدي إلى تقليل نوعية البروتين وذلك بتقليله جاهزية اللابسين الحيوية<sup>(2)</sup>.

وهذه الدراسة تناولت نواحي أخرى لتأثيرات الكوسيبول مثل تأثيره على المادة الوراثية للبانن وكذلك تأثيره التطهيرية للانظمة البكتيرية، كما تناولت الدراسة أيضاً تأثير اطعام الفئران من بذور القطن المعتمدة زراعته وهو كوكر 310 الذي يعود إلى النوع *Gossypium hirsutum*.

### المواد وطرق العمل

#### بذور القطن

تم الحصول على بذور قطن الكوكر 310 من قسم المحاصيل/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد.

وتم الحصول على السلالات البكتيرية TA100, TA98, TA97 التي تعود للجنس *Salmonella typhimurium* والخاصة للكشف عن قابلية المواد لتطهيرية من د. إيميس.

Dr. B.N. Ames, Dept. of Biochemistry, University of California Berkeley, CA 94720, USA

شكل كيميائي وفق الظروف المحيطة به<sup>(١١)</sup>، وهو جزيء  
تركيب الصيغة يحوي العديد من العناصر الفعالة حسب  
درجات إحدى الدراسات وجود ١-٦ مجاميع من  
الهيروكسيل.

في هذه الدراسة تم قياس كمية الكوسبيول في  
صنف القطن كوكو ٣١٠ المائدة لزارعته في العراق في  
الوقت الحاضر وكانت ٤٢٠ مايكروغرام/ غم من  
مسحوق بذور القطن المقشرة<sup>(١٢)</sup>، وفي اختبار سمية هذا  
البذور يوضح جدول (١) نسبة هلاك الفئران التي تحسبت  
ببذور قطن الكوكو ٣١٠ بظروف مختلفة وقد قسمت إلى  
مجاميع:

المجموعة الاولى: اطعمت الفئران (١) غم او (٢) غم  
من بذور القطن غير المقشرة ثلاث وجبات يوميا.  
المجموعة الثانية: اطعمت الفئران (١) غم او (٢) غم  
بذور القطن المقشرة ثلاث وجبات يوميا.

المجموعة الثالثة: اطعمت الفئران (١) غم الى (٢) غم  
من بذور القطن المقشرة وجبة واحدة في اليوم.

المجموعة الرابعة: اطعمت (١) غم او (٢) غم من بذور  
القطن المقشرة وجبة صباحية واخرى مسائية.

المجموعة الخامسة: اطعمت الفئران (١) غم او (٢) غم  
من مسحوق بذور القطن المقشرة ثلاث مرات يوميا.

المجموعة السادسة: اطعمت الفئران (١) غم او (٢) غم  
من مسحوق بذور القطن بعد خلطه مع العليقة.

وتم مراقبة الفئران لمدة ٣-١٠ ايام، وقد ظهرت  
زيادة على وزن الفئران خلال فترة المراقبة حيث ازيد  
معد الوزن من ٢٠ غم الى ٢٣ غم وهذا بطبيعة الحال يعود  
الى كون بذور القطن تحوي على تراكيز عالية من  
الدهون والبروتينات<sup>(١٧)</sup>، كما لوحظ اصابة بعض الفئران  
بالاسهال، ومن الملاحظ من جدول (١) ان اطعام الفئران  
بنماذج مختلفة من بذور القطن له تأثير واضح كما قس  
المجموعة الاولى والثانية حيث كان طعام الاولى يحوي  
على القشور الخارجية للبذرة والذي بدوره يقلل من كمية  
الكوسبيول الماودة ضمن كمية محددة من البذور وهي  
١ غم في حين زادت نسبة الهلاكات الى ٨٠% عند  
اطعامها ١ غم من بذور مقشرة، وتوضح نتائج الجدول

التالي Sister chromatic (SCE) ونسب طريقة  
Allen<sup>(١٨)</sup> واستعمل الاميتون المائي كسيطرة موجبة<sup>(١٩)</sup>.

تم قياس معامل الانقسام Mitotic Index  
(MI) بحساب مائة خلية وتحديد عدد الخلايا التي هي في  
مرحلة انقسام ثم حسب معامل الانقسام وفق المعادلة الآتية:  
عدد الانقسامات

$$\text{معامل الانقسام (MI)} = \frac{\text{عدد الخلايا}}{100} \times 100$$

واستعمل الاميتون المائي كسيطرة سالبة ومادة  
Mitomycin C بتركيز ٢ ملغم/ كغم من وزن الحيوان  
كسيطرة موجبة<sup>(٢٠)</sup>.

اما تأثير الكوسبيول على حركات الانقسام  
الخلوي في نخاع عظام فخذ الفئران فتم بقياس معامل  
تضاعف الخلايا Replication Index (RI) بعد تتبع  
الخلايا ثلاث دورات انقسامية متتالية وحسب تضاعف  
الخلايا وفق المعادلة الآتية:

$$RI = \frac{(1 \times M_1) + (2 \times M_2) + (3 \times M_3)}{100}$$

وتمثل  $M_1$  عدد الخلايا في الدورة الانقسامية  
الاولى،  $M_2$  عدد الخلايا في الدورة الانقسامية الثانية و  
 $M_3$  عدد الخلايا في الدورة الانقسامية الثالثة<sup>(١٤،١٥)</sup>.

وقد تم استحصال ثلاث فئران لكل تركيز عند  
قياس كل مؤشر من المؤشرات المذكورة بالاضافة الى  
استعمال ثلاث فئات للسيطرة السالبة وثلاث للسيطرة  
الموجبة.

### التحليل الاحصائي

تم تحليل التباين لاستخراج اقل فرق معنوي على  
مستوى ٠،٠٥، ٠،٠١، ٠،٠٥<sup>(١٦)</sup>.

### النتائج والمناقشة

مجلات الكثير من الدراسات سمية الكوسبيول  
للغران<sup>(٢١)</sup>، كما ان الكوسبيول يمكن ان يوجد باكثر من

استفوتة التي ان نسبة هلاك الفئران تتناسب طرديا مع زيادة كمية بذور القطن وبالتالي زيادة الكومسيبول اثناء التوتير.

ودرس التأثيرات التطفورية للكومسيبول على السلالات ايموس التي تحتاج الى الهستيدين، ففي البداية تم تصنيف مسمومة النماذج للبيكتريا باختبار البقعة<sup>(١١)</sup> وقد تبين ان كل من مستخلص البذور في الاميتون المائي او استعمال مسحوق بذور القطن وهي ٤٠٠ ملغم. ويوضح جدول (٣) تأثير مستخلص الكومسيبول في الاميتون المائي (الحاوي على ٢,١ مايكروغرام/ ملتر) من الكومسيبول الحر وكذلك تأثير اضافة ٠,١ غم من مسحوق بذور القطن/ الطبق. ونلاحظ من النتائج ان الكومسيبول لا يحتجج لاي تنشيط حيث لم تكن هناك فروق بين اعداد الطفوات لراجعة/ للتطبيق بوجود نظام التنشيط اللبائني (S9) او عدم وجوده<sup>(١٢)</sup>. وتوضح النتائج ان وجود مستخلص الكومسيبول ادى الى مضاعفة اعداد الطفوات الراجعة لكل من السلالتين TA98, TA97 مقارنة بالسيطرة السالبة التي استخدم فيها الاميتون المائي وهو مادة غير مطفرة<sup>(١٣)</sup>، اما عند استخدام مسحوق بذور القطن (٤٢ مايكروغرام/ طبق) قد ادى الى زيادة عدد الطفوات الراجعة الى حد بعيد مقارنة بالسيطرة السالبة التي وصلت الى سبعة اضعاف في السلالة TA100 في حيث تضاعفت الاعداد اربعة مرات في السلالتين الاخرى. وفي جميع الاحوال نجد ان استعمال مسحوق بذور القطن قد ادى الى زيادة تفوق السيطرة الموجبة وعابه فالمادة تعتبر مطفرة اذا كان تردد الطفوات المسحوبة وفق المعادلة ادناه يساوي ١ او اكثر<sup>(١٤)</sup>.

$$\text{تردد الطفوات} = \frac{\text{عدد الطفوات المستحثة}}{\text{عدد الطفوات التلقائية}}$$

ومن نتائج دراسة التطهير يمكن الاستنتاج ان الكومسيبول يمارس تأثيره التطهيري باليات مختلفة في الجين His<sup>(١٥)</sup>. وهذا متوقع لان الكومسيبول يحوي عددا غير قليل من المجاميع الفعالة بالاضافة الى انه يتغير من شكل الى اخر وفقا للظروف المحيطة<sup>(١٦)</sup>.

ومن جدول (٢) يمكن التدرج الى احتمالية تأثير الكومسيبول على العادة الوراثية في احياء اخرى مثل البائين حيث وجد ان حوالي ٨٥% من المواد المطفرة هي مواد مسرطنة وذلك لان الاثنين يشتركان في كونهما تغيرات تطلرا على كروموسومات خلايا نخاع عظم الفخذ في الفئران التي حقنت بتركيز مختلفة من الكومسيبول محسوبة على اسا كغم من وزن الحيوان. ويوضح الشكل (١) تأثير الكومسيبول على اعداد التبادل الكروماتيدي الشقيقي، ويلاحظ ان زيادة تراكيز الكومسيبول تؤدي الى زيادة اعداد التبادل الكروماتيدي الشقيقي بشكل يكاد يكون طرديا وان اعلى تركيز استعمل وهو ٤٠٠ ملغم من مسحوق البذور المقشرة (الحاوية على ١٦٨ مايكروغرام من الكومسيبول الحر) ادى الى زيادة اعداد التبادل الكروماتيدي الشقيقي فاق السيطرة الموجبة Cyclophosphamide بتركيز ٢٠ ملغم/ كغم من وزن الحيوان.

وقد كانت لافروق معنوية على المستويين ٠,٠١ و ٠,٠٥ بين الاعداد التي نجت من استعمال تراكيز مختلفة والسيطرة السالبة ولكنها لم تكن معنوية فيما بين التراكيز المستعملة. فالتبادل الكروماتيدي الشقيقي يحدث بشكل طبيعي اثناء الانقسامات الخلوية ولكن بتردد واطى<sup>(١٧)</sup> وهو من القواعد الاساسية لدراسة التغيرات التي تحصل للمواد الوراثية نتيجة المعاملات<sup>(١٨,١٩,٢٠,٢١,٢٢)</sup>.

بالاضافة الى ما ذكر اعلاه نلاحظ ان حقن الحيوانات بتركيز متزايدة من الكومسيبول يؤدي الى زيادة معامل الانقسام الخيطي للخلايا كما موضح في الشكل (٢) وقد كانت الفروق معنوية جدا بين السيطرة السالبة او الحالة الاعتيادية وبين استعمال الكومسيبول بتركيزه المختلفة. اما فيما بين المعاملات فلم تكن الفروق معنوية، ولكن الملاحظ ان بعض التراكيز ادت الى زيادة تفوق السيطرة الموجبة، وهذا بدوره يعكس ان استعمال الكومسيبول ادى الى زيادة انقسامات الخلايا وهي اهم ظواهر عملية التسرطن.

وقد قس معامل تضاعف الخلايا لمعرفة تأثير الكومسيبول على حركات تضاعف الخلايا وبالتالي

التضاعف في الحالة الطبيعية (١,٧٤) قد تدهور الى (١,٤٤) وهي قيمة مقارنة للقيمة المسجلة للحاد المسرطنة (السيطرة الموجبة) كما موضح في الشكل.

ومما ذكر اعلاه من نتائج نجد ان الكوسبيول باعتباره مادة ذات مجاميع فعالة كثيرة<sup>(١)</sup> يمكن ان يهاجم المادة الوراقية بالاضافة الى تأثيراته الخارجية الملحوظة على الحيوانات، وعليه يجب الحذر من بقايا الكوسبيول في الزيوت او علائق الحيوانات، بولارغم ان التوصيات المقدمة من ان سمية الموسبيول يمكن ان تختفي بتسخين البذور وتحميصها بشكل مباشر او بواسطة البخار<sup>(٢,٣)</sup> لكن لاتوجد اي دراسات حول تأثير المواد التي تنتج من تسخين البذور وتفكك الكوسبيول الحر والمقيد<sup>(٤)</sup> وعليه فان مثل هذه التوصيات يجب ان تكون مبنية على دراسات دقيقة وموثقة.

حركات انقسامها، ويوضح الشكل (٣) تأثير التراكيز المختلفة على اعداد الخلايا التي هي في مراحل مختلفة من الانقسام ومن المعروف ان المواد المسرطنة تزيد من عدد الخلايا التي هي في الدورة الانقسامية الاولى ( $M_1$ ) وتخفض اعداد الخلايا التي هي في المراحل الانقسامية الثالثة ( $M_3$ ) كما في استعمال Mitomycin C وهي مادة مسرطنة<sup>(٥)</sup> فقد ادى استعمال (١٠٠ ملغم مسحوق بذور القطن/ كغم من وزن الحيوان) الى زيادة اعداد الخلايا في الدورة الانقسامية الاولى ( $M_1$ ) بشكل يفوق السيطرة الموجبة، كما انخفضت اعداد الخلايا في الدورة الانقسامية الثانية ( $M_2$ ) فهي لاتعتبر مؤشرا هاما في هذا المجال.

ونجد ان معامل التضاعف قد تآثر بشكل كبير عند استعمال الكوسبيول كما موضح في الشكل (٤) مقارنة بالسيطرة السالبة والموجبة فنجد ان معامل

## جدول ١

تأثير ادخال بذور اقطن (الحاوية على الكوسبيول) على هلاكات الفئران المتغذية عليه

المجموعة	النسبة المئوية للهلاكات		المجموعة	النسبة المئوية للحياء		المجموعة	النسبة المئوية للهلاكات	
	١غم	٢غم		١غم	٢غم		١غم	٢غم
الاولى	٤٠	٦٠	الرابعة	٤٠	٦٠	الاولى	٤٠	٦٠
الثانية	٨٠	٨٠	الخامسة	٢٠	٢٠	الثانية	٨٠	٨٠
الثالثة	٢٠	٢٠	السادسة	٨٠	٨٠	الثالثة	٢٠	٢٠

يراجع المتن حول تقسيم الفئران الى مجموعات

استعملت ٥ فئران لتركيز ١ غم، ٥ فئران لتركيز ٢ غم، ٥ فئران للسيطرة الموجبة

جدول ٢: التأثير التطويري للكوسيبول على معدلات ابيض

عدد المستعمرات الراجعة للنوع الطبيعي/ العلق الواحد*						المسوح
TA100		TA98		TA97		
-	+	-	+	-	+(1)	
٠,٤+٩٥	٠,٦+٩٧	٠,٧+١٢٢	١+١٢٠	٠,٥+٩٥	٠,٦+٩٣	السيطرة المعالجة (٢)
٠,١+١٤٩	٠,٥+١٥٠	٠,٣+٢٤٩	٠,١+٢٥٠	٠,٢+١٩١	١+٢٠٠	مستخلص البذور (٣) بذور القطن ٢,١ مايكروغرام **
٠,٣+٧٠٠	٠,٣+٧٠٥	٠,١+٥٠٠	٠,٢+٥٠١	٠,٤+٣٩٠	٠,٤+٤٠٠	مسحوق (٤) بذور القطن ١٦٨ ميكروغرام **
١+٥٩٠	٠,٥+٥١٠	٠,٢+٤٠٢	١+٤٠٢	٠,٥+٢٥١	١+٢٥١	السيطرة (٥) الموجبة

استعملت ثلاثة اطباق لكل نموذج \*\* تمثل التراكيز الفعلية للكوسيبول الحر في النماذج المستعملة

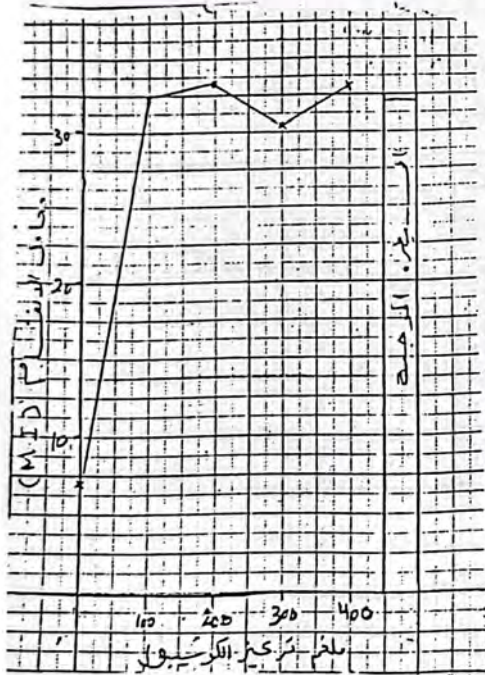
(١) (+) وجود نظام التنشيط اللباني S9 (-) عدم وجود S9

(٢) الاميسيتون المائي/ مذيب استعمل في عملية الاستخلاص

(٣) مستخلص البذور يحوي ٢,١ ميكروغرام/ ملتر من الكوسيبول الحر

(٤) مسحوق بذور القطن ٠,١ غم يحوي على ٤٢٠ ميكروغرام/ غم من الكوسيبول الحر

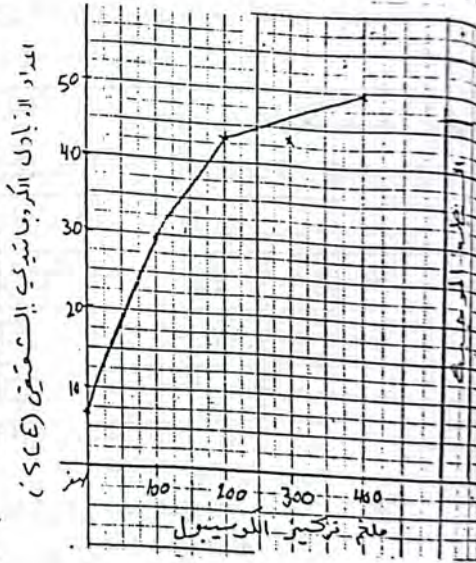
(٥) NTG بتركيز ٥ ميكروغرام للطبق.



$$٨,١١ = LSD_{٥.٠٥}$$

$$٦,٧٥ = LSD_{٥.٠٥٥}$$

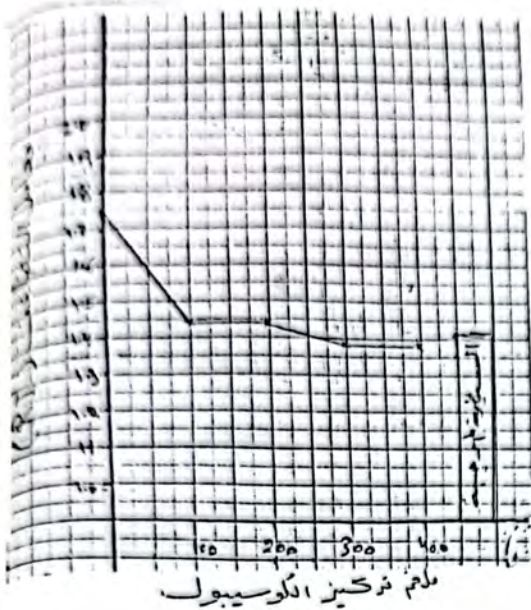
شكل ٢: تأثير تراكيز الكوسيبول المتتفة على معامل انقسام خلايا نخاع العظم في الفئران السيطرة الموجبة : ٢ ملغرام/مايتومايسين (C) // كغم من وزن الحيوان



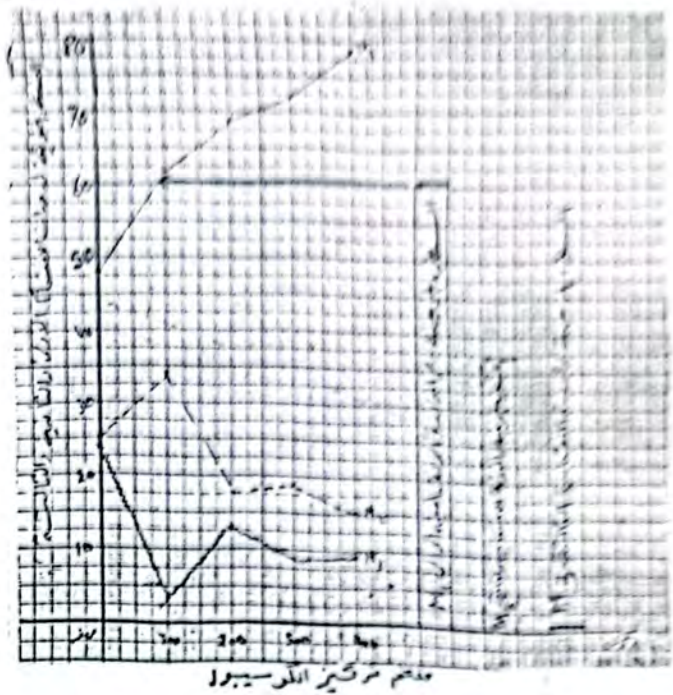
$$١٤,٧٢ = LSD$$

$$١٠,٩١ = LSD$$

شكل ١: اعداد التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCE) في خلايا العظم في الفئران المعاملة بالكوسيبول بالتراكيز المختلفة السيطرة الموجبة: ٢٠ ملغرام/ سايكولوفوسفومايد/ كغم من وزن الحيوان



شكل ٤: تأثير تراكيز الكوسيبول المختلفة على  
معامل التضاعف السيطرة الموجبة: ٢٠ ملمغ  
سايلوفوسفومايد / كغم من وزن الحيوان



شكل ٣: تأثير تراكيز الكوسيبول المختلفة على معامل  
التضاعف والدورات الانقسامية الثلاثة  
(M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>) السيطرة الموجبة: ٢٠ ملمغ  
سايلوفوسفومايد / كغم من وزن الحيوان

Publishers. Inc.: New York and London.  
(1948).

٥. عيسى، رجوة حسن والخفاجي، زهرة محمود. القابلية  
التطهيرية لبعض المواد العضوية المستعملة او  
الموجودة في الاغذية. مجلة العلوم الزراعية العراقية،  
مجلد ٢٣ / العدد الثاني / ص ١٩٢ (١٩٩٢).

٦. عيسى، رجوة حسن. دراسات كيميائية حياتية ووراثية  
على البايوسين (R) وتأثيراته على عملية البلعمة  
رسالة دكتوراه. قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة  
بغداد، العراق (١٩٨٦).

7. Shubber, E.K. The genetic hazard of ten  
antiparasitic drugs compared to radiations.  
Ph.D. thesis. Boston, Massachusetts USA.

8. A.O.C.S. Official and tentative methods of  
Americal Oil Chemists. Free Gossypol. Ba  
7-58.

9. Ames, B.N. Mc Cann, J. and Yamasaki, E.  
Methd for detecting carcinogens and  
mutagens with *Salmonella* mammalian

## REFERENCES

1. Berardi, L.C. and Goldblatt L.A. Gossypol  
in "Toxi Constituents of Plant Foodstuffs"  
Ed. I.E. Liener. Academic press. New  
York and London (1960).

2. Lambou, M.G., Shaw, R.L., Decossan,  
K.M. and Vix, H.L.F. Cottonseed's role in  
a hungry world. Econ. Botany. 20: 256-  
257 (1966).

٣. الحلفي، انتصار هادي حميدي. تأثير مواعيد الزراعة  
ومعاملات الجني في نوعية وحاصل القطن  
(*Gossypium hirsutum* L) صنف كوكر ٢١٠.  
اطروحة ماجستير / قسم المحاصيل الحقلية كلية  
الزراعة / جامعة بغداد / العراق. (١٩٩٤).

4. Boatner, C.H. Pigments of Cottonseed. In  
"Cottonseed and Cottonseed Products"  
Their Chemistry and Chemical  
Technology. Ed. A.E. Bailey. Interscience

19. Hartman, P.E., Ames, B.N., Roth, J.R., Barnes, W.M. and Levin, D.E. Target sequences fore mutagenesis in *Salmonella* histidine-requiring mutants. Environ. Mut. 8: 631-641. (1986).
20. Levin, D.I., Ymasaki, E. and Ames, B.N. A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. Mut. Res. 94: 315-330. (1982).
21. McCoy, E.O., Anders, M. and Prosenkranz, H.S. The basis of th e insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA 98/ 1,8-DNP<sub>6</sub> to the mutagenic action of nitroa renes. Mut. Res. 121: 17-23 (1983).
22. McCann, J., Chal, E., Ymasaki E. and Ames B.N. Detection of carcinogena as mutagens in the *Salmonella* microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 5135-5139 (1975).
23. Wolf, S. The sister chromatid exchange in "Short term tests for chemical carcinogens" Ed. H.F. Stich and R.H.C. San. Springer-Verlag: New York and Berlin. (1981).
24. Wolff, S. Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and the lesions that produce them. In "Sister chromatid exchange" Ed. S. Wolff, John Wiley and Sons, New York. (1982).
25. Stich, H.E. and San, R.H.C. (Eds). Short-Term tests for chemical carcinogens" Springer-Verlag: New York and Berlin (1981).
26. Schneider, E.L., Stenberg, H. and Tice, R.R. *In vivo* analysis of cellular replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 2041-2044 (1977).
- microsome mutagenicity test. Mut. Res. 31: 347-364.
10. Kier, L.D. Brusick, D.J., Aluletta, A.E., Von Halle, E.S., Brwon, M.M., Simon, V.F., Dunkel, V., Mc Cann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray, V. The *Salmonella typhimurium*/ Mammalian microsomal assay Mut. Res. 168: 69-240 (1986).
11. Maron, D.M and Ames, B .N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. Mut. Res. 113: 173-215 (1983).
12. Allen, J.W., Shuler, C.F., Menders, R.W. and Latt, S.A. A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5-Bromodeoxyuridine tablets. Cytogent. Cell. Genetic 18: 231-237.
13. Korenberg, J.R. and Freedlender E.F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchange. Chromosoma 48: 355-360 (1974).
14. Tice, R., Schneider, E.L. and Rary J.M. The utilization of Bromodeoxy-uridine incorporation in the DNA for the analysis of cellular kinetics, Expt. Cell. Res. 102: 232-236.
15. Steel, R.G>D. and Torrie, J.H. Principles and Procedures of statistics McGraw Hill: New York (1980).
١٦. المرسومي، عبد الجليل ابراهيم. دراسة مستويات الكوسبيبول في خمسة عشر صنفاً من القطن في العراق. مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد ٢٨
١٧. مرسي، مصطفى علي وعبد الجواد، عبد العظيم. محاصيل الحقل، الجزء الثاني. مكتبة الانجلو المصرية. القاهرة/ مصر. (١٩٦٢).
18. Hill, M.J. Microbes and human carcinogenesis. Edward Arnold: London (1986).

## كفاءة الانظمة المائية ثنائية الطور في فصل البروتيز القاعدي المنتج من سلالة

محلية للعفن *Aspergillus Oryzae*

شذى مملسان حنمن

قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة بغداد

(استلم بتاريخ ١٩٩٧/٧/٢٩ وقبل للنشر في ١٩٩٧/١١/٢٩)

## ABSTRACT

An aqueous two phase system of 15% PVP (6000) and 20% Dextran T-70 was used with different concentration of NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to separate the alkaline protease produced by a local stain of *A. oryzae*. Partition coefficient (K), enzyme activity and specific activity varied with variation of types and concentrations of salts. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> showed the higher partition coefficient (3.2) at 0.05M. There were more than one peak of specific activity in the examined systems which indicates the presence of more than one form of alkaline protease or different kinds of proteases in the crude extract.

## الخلاصة

استخدم النظام المائي ثنائي الطور المكون من 15% PVP (2500-3000) و 20% Dextran T-70 بدون ومع اضافة تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم (NaCl) وفوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) وكبريتات الصوديوم (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) في فصل البروتيز القاعدي المنتج من سلالة محلية للعفن *A. oryzae*، ولوحظ اختلاف في الفعالية الانزيمية والفعالية ومعامل الفصل (Partition coefficient) مع اختلاف نوع وتركيز الملح المضاف للنظام. كانت اعلى قيمة لمعامل الفصل 3.2 عندما اشيف للنظام فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين بتركيز 0.05 مولار، وظهرت اكثر من قمة للفعالية النوعية في طوري النظام مما يشير الى وجود امثر من صورة لبروتيز القاعدي او وجود انواع اخرى من البروتيز في محلول الانزيم الخام.

## المقدمة

المائية ثنائية الطور شيوياً النظام المكون من الدكستران

والاثيرين كليكول المتعدد Polyethylene glycol,

(PEG) والنظام المكون من الاثيرين كليكول التعدد

والملح، ومن السميات الايجابية لهذه الانظمة امكانية

استخدامها بنطاق واسع لفصل البروتينات وانخفاض

كلفتها وسهولة اجرائها.

استخدمت عدة انواع من الانظمة المائية ثنائية

الطور منها النظام المؤلف من (8000) PEG و

Polyvinyl alcohol (PVA 14000) لانتاج انزيم

الببتا - كلوكو سيديز (Persson et (β-glucosidase)

تعد الانظمة المائية ثنائية الطور (Aqueous

Two - Phase systems) المؤلفة من مزج محاليل

مائية لبوليمرات مختلفة محبة للماء من السوائل الناجحة

في فصل الدقائق البايولوجية والجزئيات الكبيرة

(macromolexules)، ويعتمد الفصل في هذه الانظمة

على الصفات الفيزيائية والكيميائية للمواد كالكراهية

للماس (hydrophobicity) والالفة (Affinity)

والشحنات (charges) والانزيمات، ومن اكثر الانظمة

ب. تقدير فعالية البروتينات القاعدية : أتبعنا الطريقة الموصوفة من قبل (Murachi, 1970) حيث أضيف 0.2 مللتر من المعشخلص (الأنزيم الخام) الى 1.8 مللتر من محلول 1% كازين مذاب في محلول البورات ائداري، برقم هيدروجيني 9.0، وحضن بدرجة 35°م لمدة 10 دقائق ثم اوقف التفاعل باضافة 3 مللتر من محلول 5% ثلاثي كلورحامض الخليك (Trichloroacetic acid) (TCA) ونبد المحلول وتم قياس امتصاص الضوء في المحلول العلوي الرائق بطول موجي 275 نانوميتر وحسبت فعالية الأنزيم بالمقارنة مع المنحنى القياسي للتايروسين. وتعرف وحدة فعالية بانها كمية الأنزيم التي تحور 1 مايكرومولار من التايروسين في الدقيقة تحت ظروف القياس.

ج. تقدير البروتين : أتبعنا الطريقة الموصوفة من قبل (Whitaker & Granum, 1980).

د. تحضير الانظمة المائية ثنائية الطور : حضرت عدة انواع من الانظمة المائية ثنائية الطور لانتخاب النظام الذي يعطي فصلاً جيداً للطورين بغية فحص كفاءتها في فصل البروتينات القاعدية المنتجة من العفن *A. oryzae* وتضمنت هذه الانظمة:-

1- نظام الاثيلين كلايكول المتعدد (PEG) والكاربوكسي مثيل سليولوز (CMC) :- اضيف 60% من الاثيلين كلايكول المتعدد (PEG - 6000) الى 4% من الكاربوكسي مثيل سليولوز (الذائب - متوسط اللزوجة) بنسب تراوحت من 1:1 - 1:6 (وزن : وزن).

2- نظام الاثيلين كلايكول المتعدد ومحلول فوسفات البوتاسيوم :- مزج الاثيلين كلايكول المتعدد المحضر بتركيز 60% مع محلول 20% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) بنسبة 1 : 1 (وزن : وزن) واطيف للمزيج حجم معينة من محلول 4 مولار كلوريد الصوديوم للحصول على

1989). والنتيجة المتكون من صمغ الاكاسيا والنظام المتكون من DEAD- dextran و hydroxypropyl dextran لفصل البروتينات الحامضية (البومين) (Chen, 1989) وقد تطورت تقنيات هذه الانظمة وتوسعت استخداماتها حتى شملت استخدام ربانط ذات غرورية (metal affinity ligands) في نظام مائي ثنائي الطور متكون من PEG وكبريتات الصوديوم لصل الهيموغلوبين والبومين مصصل الاثمنان بخطوة واحدة (Plunkett & Arnold, 1990)، واستخدام الاثيلين كلايكول المتعدد بعد تنقيته بالايوكسي و اوكسيران (epoxy - oxirane) والايكلورهايدين (epichlorohydrin) لفصل بروتينات مختلفة (Andrews et al., 1990)، واطيف الستراتيون (Triton x-114) الى نظام مائي ثنائي لتكوين نظام مائي ثلاثي الطور لدراسة انفصال انزيم (Grag et al., 1994) lactate dehydrogenase.

وقد تناولت هذه الدراسة استخدام عدة انواع من الانظمة المائية ثنائية الطور لمعرفة كفاءتها ومدى ملائمتها لفصل وتنقية البروتينات القاعدية المنتجة من سلالة محلية للعفن *A. oryzae*.

## المواد وطرائق العمل

أ. الكائن المجعري (Microorganism) : عزله محلية من العفن *A. oryzae* انتخبت من بين احدى وثمانين عزلة محلية من *Aspergillus* لانتاجها العالي للبروتينات القاعدية في وسط نخالة الحنطة (حسن، 1996). نمين العزلة في وسط التخمر الصلب (نخالة الحنطة) وحضنت بدرجة 30°م لمدة اربعة ايام ثم استخلص الأنزيم باضافة محلول خلات الصوديوم الداري بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 الى المزرعة وترشيحها من خلال عدة طبقات من الشاش.

أوحظ تغير معامل الفصل (K) بتغير تركيز وتركيز الملح المضاف الى النظام حيث تراوحت قيمه المعامل بين (0.5-2.1)، وبين (0.5-3.2) وبين (0.4) عند اضافة تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكافيين الصوديوم (شكل 1) على التوالي، ويبدو ان قوسه المستخدمة في فصل البروتين حيث ظهر اعلى معامل للفصل (3.2) عندما احتوى النظام على 0.05 مول منها.

ظهرت اعلى فعالية للبروتين القاعدي في الطور العلوي للنظام المحتوي على 0.05 مول كلوريد الصوديوم وكانت 280 وحدة / مل و 229 وحدة / مل في الطور السفلي عندما احتوى النظام على 0.2 مول الصوديوم (جدول 1)، في حين بلغت أعلى قيمة لفعالية الانزيم 149 وحدة / مل في الطور العلوي عندما احتوى النظام على 0.2 مول فوسفات البوتاسيوم ، و 152 وحدة / مل في الطور السفلي للنظام بدون اضافة الملح (جدول 2)، اما في النظام المضاف اليه كبريتات الصوديوم فقد كانت اعلى فعالية 140 وحدة / مل في الطور العلوي عندا احتوى النظام على 0.1 مول من الملح و 216 وحدة / مل في الطور السفلي عندما احتوى على 0.2 مول من الملح (جدول 3).

أن هذا التباين في فعالية الانزيم مع تباين تركيز الملح ونوعه يعود الى اختلاف توزيع الانزيم بين الطورين مع اختلاف تركيز ونوع الملح اللذان يؤثران في الخواص السطحية للبروتين (الانزيم) كتوزيع الشحنات ونوع الايونات المقابلة (Counter ions) والصفات الهيدروجينية (hydrophobic properties) فضلاً على تأثيرهما في كثافة الشحنات في كلا الطورين مما يغير من توزيع جزيئات البروتين (Rostogi and Chand, 1989; Baskir et al, 1989).

ظهرت اكثر من قمة للفعالية النوعية للانزيم في الانظمة المستخدمة حيث ظهرت قمة واحدة في الطور العلوي عندما احتوى 0.05 مول من كلوريد الصوديوم

تركيز متدرجة من الملح في النظام تستراوح من صفر - 0.25 مولار .

4- نظام الدكستران والفينول بايروليدون المتعدد (Polyvinyl pyrrolidone) : مزج الدكستران (Dextran T-70) المضهر بتركيز 20% مع 15% من محلول (PVP : MW 25000-30000) بنسبة 1 : 1 (وزن : وزن) و اضيف للمزيج حجم معين من محلول 4 مولار كلوريد الصوديوم للحصول على تراكيز متدرجة من الملح في النظام تتراوح من صفر - 0.25 مولار

5- النظام السابق (3) مع اضافة حجم معين من محلول 2 مولار كبريتات الصوديوم ( $Na_2SO_4$ ) للحصول على تراكيز متدرجة من الملح في النظام تتراوح من صفر - 0.25 مولار .

: انتخبت الانظمة التي اعطت فصلاً واضحاً للطورين وهي النظام 3 و 4 و 5 و اضيف لها محلول الانزيم بنسبة 1 : 3 (حجم : وزن) وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الطورين العلوي والسفلي وتم حساب قيمة معامل الفصل (Partition Coefficient (K)) من النسبة بين الفعالية الانزيمية في الطور العلوي والفعالية الانزيمية في الطور السفلي، كما تم حساب الفعالية النوعية للانزيم (وحدة / ملغم بروتين) في الطورين العلوي والسفلي لكل نظام.

### النتائج والمناقشة

لم يلاحظ فصل جيد للطورين في النظام المتكون من PEG (6000) و CMC ولا في النظام المتكون من PEG (6000) و  $KH_2PO_4$  وهو من الامور الواردة اذ لا تصلح جميع الانظمة لاعطاء فصل جيد للطورين (Chen, 1989) في حين ظهر فصل واضح للطورين في النظام المتكون من PVP و Dextran T-70 لذا انتخب هذا النظام لدراسة كفاءته في تنقية البروتين القاعدي.

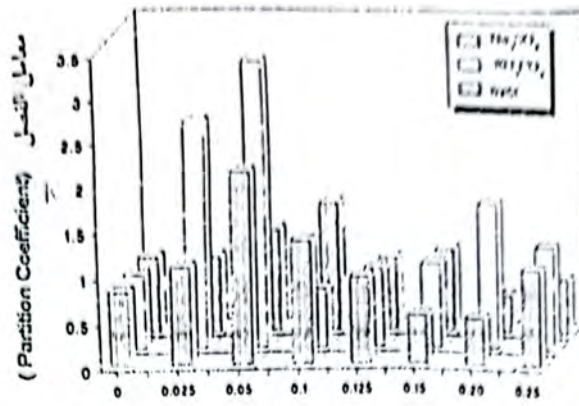
جدول (1) فعالية البروتياز القاعدي في النظام المائي ثنائي الطور المكون من 15% و 20% Dextran T-70 عند اضافة تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

فعالية الانزيم (وحدة / مل)		تركيز NaCl (مولار)
الطور السفلي	الطور العلوي	
152	122	0.0
159	170	0.025
132	280	0.05
200	273	0.10
122	118	0.125
215	118	0.15
229	119	0.20
200	213	0.25

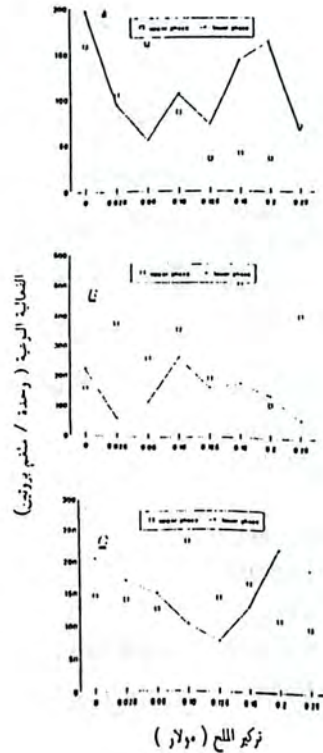
جدول 2 :- فعالية البروتياز في النظام المائي ثنائي الطور المكون من 15% PVP و 20% Dextran T-70 عند اضافة تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ )

فعالية الانزيم (وحدة / مل)		تركيز $KH_2PO_4$ (مولار)
الطور السفلي	الطور العلوي	
152	122	0.0
123	57	0.025
40	128	0.05
110	70.5	0.10
109	95	0.125
103	96	0.15
91	149	0.20
131	149	0.25

وقسمت في الطور السفلي الاولى عند احتواءه على 0.1 مولار والثانية عند احتواءه 0.2 مولار من هذا الملح (شكل 2a) في حين ظهرت اربع قسم للفعالية النوعية في الطور العلوي عند اضافة 0.025 و 0.1 و 0.15 و 0.25 مولار من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، وقمة واحدة في الطور السفلي عندما احتوى على 0.1 مولار من نفس الملح (شكل 2 b). أما في النظام المضاف اليه كبريتات الصوديوم فقد ظهرت قمة واحدة في الطور العلوي عند احتوائه على 1. مولار من الملح وقمة واحدة في الطور السفلي عند احتواءه 0.2 مولار من الملح (شكل 2c). يستنتج من هذه الاشكال احتمال وجود اكثر من صورة لانزيم البروتياز القاعدي او ان هناك اكثر من نوع من انواع انزيمات البروتياز في المستخلص الخام تتفصل عن بعضهما بتأثير تركيز الملح ونوعه وتأتي هذه النتائج متوافقه مع النتائج المستحصلة من استخدام عمودي المبادل الايوني DEAD-cellulose والمبادل الايوني CM-cellulose في تنقية هذا الانزيم (حسن، 1996) اذ ظهرت عدة قسم لفعالية لبروتياز عند امرار محلول الانزيم في العمودين واسترداده باضافة تراكيز متدرجة من محلول كلوريد صوديوم مما يشير الى وجود اكثر من نوع للبروتياز او عدة صور للبروتياز القاعدي في المستخلص الخام ومن المعروف أن سلالات الاعفان التابعة لمجموعة A. *flavus oryzae* تنتج انواعاً مختلفة من انزيمات لبروتياز عند تنميتها في اوساط التخمر الصلبة والسائلة (Berghvist, 1963; Impoolsup et al., 1981).



شكل (1) : معامل التصل (K) لانزيم البروتيناز القاعدي المنتج من العفن *A. oryzae* في النظام المائي ثنائي الطور المتكون من 15%PVP و 20% Dextran T-70 عند اضافة تراكيز مختلفة من (كلوريد الصوديوم) وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات الصوديوم الى النظام.



شكل 2A,B,C: الفعالية النوعية للبروتيناز القاعدي المنتج من العفن *A. oryzae* في طوري النظام المائي ثنائي الطور المتكون من 15% PVP و 20% Dextran T-70 عند اضافة تراكيز مختلفة من (a) كلوريد الصوديوم و (b) فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و (c) كبريتات الصوديوم

في الطورين العلوي والسفلي عند تغيير تركيز الملح في النظام.

ان استخدام تقنية الانظمة المائية ثنائية الطور تختصر الوقت اللازم لفصل الانزيمات ونقل الخطوات مما يساهم في المحافظة على فعالية الانزيمات الحساسة كما في انزيم البروتيز الذي يتعرض للهضم الذاتي بمرور الزمن، فضلاً على سهولة اجرائها مقارنة بالتقنيات الاخرى. ويمكن استخدام مثل هذه الانظمة بنطاق واسع في الخطوات الاولية لتقنية الانزيمات.

### المصادر

- 1- Albertson, P.A. Partition of Cell Particles and Macromolecules. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley (Interscience) New York. (1986).
- 2- Andrews, B.A.; Head D.M. and Asenjo, J.A. PEG activation and ligand binding for the affinity partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. Biotech. Tech 4(1) : 49-54 (1990).
- 3- Baskir, J.N. Hatton, T.A. and Suter, U.W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. Biochnol. Bioeng. 34(4) : 541-558 (1989).
- 4- Bergkvist, R. The proteolytic enzyme of *Aspergillus oryzae*. 1. The methods for estimation and isolation of proteolytic enzymes. Acta. Chem. Scand. 17(6) : 1521-1540 (1963).
- 5- Chen, J.P. partitioning of acid proteases in aqueous two-phase systems containing a charged polymer. Biotech. Tech. 3(2): 131-134. (1989).
- 6- Garg, N.; Galaev, J. Yu-and Mathiasson, B. Use of a temperature – induced phase forming detergent (Triton X-114) as ligand carrier for affinity partitioning in an aqueous three-phase system. Biotech. Appl. Biochem. 20: 199-215 (1994).
- 7- Impoolsup, A.; Bhumiratana, A. and Flegel, T.W. Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var. *coumunaris*, a soy sauce Koji mold. Appl. Environ. Microbiol. 42(4): 619-628 (1981).

جدول 3 فعالية البروتيز القاعدي في النظام المائي ثنائي الطور المكون من 20% Dextran T- و 15% PVP عند اضافة تراكيز مختلفة من كبريتات الصوديوم

(Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )		تركيز Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (مولار)
الطور السفلي	الطور العلوي	
152	122	0.0
142	114	0.025
112	120	0.05
103	140	0.10
131	101	0.125
118	102	0.15
216	85	0.20
114	70.5	0.25

استخدمت الانظمة المائية ثنائية الطور في فصل بعض انواع انزيمات البروتيز كانزيمات البروتيز الحامضية (الببسين والكايوسين) باستعمال النظام المكون من DEAD- dextran و hydroxypropyl dextran ولوحظ ان عدم احتواء النظام على الملح يعطي فصلاً عالياً للانزيمين فقد كان معامل الفصل للببسين والكايوسين 0.016 و 0.063 على التوالي، وعندما اضيف كلوريد الصوديوم وكبريتات الامونيوم كان هناك اختلاف في تأثيرهما في النظام وكانت هناك زيادة في معامل الفصل مع زيادة تراكيز الملح في كلا النظامين (Chen, 1989).

### الاستنتاجات

يستنتج من البيانات السابقة ان الانظمة المائية ثنائية الطور المستخدمة في هذه الدراسة يمكن ان تعطي معلومات عن وجود اكثر من صورة للانزيم في المستخلص الخام، ويمكن رفع كفاءة الفصل بتغيير تركيز ونوع الملح ففي النظام المستخدم لوحظ ان فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين تفوقت في قيمة معامل الفصل عن الملح الاخرين كما يتغير انفصال الانزيم

- aqueous two-phase system based on gum acacia (Acacia senegal) a naturally occurring polysaccharide and polyethylene glycol. *Biotech. Tech.* 3(1): 33-38 (1989).
- 12- Whitaker, I.R. and Granum, P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109: 150-159 (1980).
- ١٣- حسن، ش. س. ١٩٩٦. إنتاج وتنقية وتوصيف البروتين القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة. أطروحة دكتوراه. قسم علوم الحياة. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- 8- Murachi, T. Bromelain enzymes. In: *Methods in enzymology* (eds. G.E. Perlman and L. Lorand) Vol. 19: 273-284. Academic Press. New York (1970).
- 9- Persson, I., Tjerneld, F. and Hagerdal, B.H. Production of  $\beta$ -Glucosidase with *Aspergillus phoenicis* QM 229 in aqueous two-phase systems. *Biotech. Tech.* 3(4): 265-270 (1989).
- 10- Plunkett, S.D. and Arnold, F.H. Metal affinity extraction of human hemoglobin in an aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems. *Biotech. Tech.* 4(1): 45-48 (1990).
- 11- Rastogi, A. and Chand, S. Characterization and application of a new

تحييد المحتوى البلازميدي لبكتريا الاشرشيا القولونية المعزولة محليا باستخدام مركب SDS  
مستخلصات نبات الحناء والكجرات.

سليوى جابر العوادى

The Use of SDS, Hanna and Rosella Extracts For Plasmid Curing of *E. coli*  
Local Isolat

Salwa Jabir Al-Awadi  
Genetic Engineering and Biotechnology Department,  
College of Science , University of Baghdad

(استلم بتاريخ ١٩٩٧/٧/٢٩ وقبل للنشر في ١٩٩٨/١/١٧)

ABSTRACT

10 strains of *E. coli* were isolated from Children suffering from diarrhoea, from Central child Hospital in Baghdad. The stains were found to be resistant nearly to all antibiotics under study. One of the stains contained one plasmid and revealing resistance to 7 antibiotics was selected for molecular study. The effect of SDS, Hanna extract and Rosella extracts on the plasmid content and growth were investigated. It was found that by increasing SDS concentration in the selective media containing antibiotic markers there was an apparent influence in the colony number that could indicate the contribution of SDS in plasmid curing. In contrast Hanna extract had no effect neither on the growth of bacteria nor plasmid content however, Rosella extract had an effect on the growth of bacteria at a concentration of 2% whereas it had no effect on plasmid content at this concentration.

الخلاصة

تم الحصول على عشر عزلات مرضية من بكتريا الاشرشيا القولونية (*E. coli*) من مرضى يعانون من الاسهال في مستشفى الطفل المركزي في بغداد، وقد وجد ان العزلات كانت مقاومة لمعظم المضادات الحيوية قيد الدراسة. انتخبت عزلة واحدة حاوية على بلازميد واحد تظهر صفة المقاومة لسبعة مضادات حيوية ودرس تأثير مركب SDS ومستخلص نبات الحناء والكجرات عليها وجد ان عدد المستعمرات النامية في الاوساط الانتقائية والتي سبق ان عولمت بتركيز 0.01%، 0.02%، 0.04% من مركب الـ SDS ينخفض مقارنة بعدد المستعمرات النامية على الاوساط الخالية من المضادات الحيوية (السيطرة) مما يشير الى احتمال تأثيره في تحييد المحتوى البلازميدي لهذه العزلة على العكس فان نبات الحناء لم يبد أي تأثير سواء في نمو البكتريا او في المحتوى البلازميدي لها في حين كان تأثير نبات الكجرات واضحا على النمو البكتيري عند استخدامه بتركيز 2%. بينما لم يكن له أي تأثير في تحييد البلازميدات دون هذا التركيز.

المقدمة

البلازميدات رغم مخاطرها. وقد أشار Sonstein and Baldwin<sup>(2)</sup> بأن مركب SDS له قابلية على تحييد البلازميدات بكفاءة اعلى من بروميد الايثيديوم او المعاملة الفيزيائية باستخدام درجات الحرارة، كما أشار Trevors<sup>(3)</sup> بأن بروميد الايثيديوم والاكريدين البرتقالي والميتومايسين C لها القابلية على التحييد أيضاً

تعرف عملية التحييد بأنها عملية فقدان البلازميدات (أو اجزاء منها) من البكتريا باستخدام معاملات فيزيائية أو كيميائية (Bguanchand et al.<sup>(1)</sup>). وتلعب المواد الكيميائية دوراً في تحييد

## ٢- تأثير المضادات الحيوية :

استخدمت المضادات الحيوية المجهزة من شركة سامراء للأدوية على شكل اقراص وحسب التراخيص المؤشرة ازاء كل واحدة منهما.

Cephalothin (Cf-30), Ampicillin (Am-10), Tetracycline (Tc-30), Gentamicin (Gm10), Chloramphenicol (Cm-30), Carbenicillin (Cb-30), Erthromycine (Er-15), Rifampicin (Ra-30), Kanamycin (Kn-30), Nalidixic acid (Na-30), Streptomycin (Sm-10), Clindamycin (Cl-2), Trimeethoprim (Tm-5)

توضع الاقراص المشار اليها اعلاه بعد زرع البكتريا على الوسط المغذي وتحضن الاطباق لمدة ٢٤ ساعة وتسجل النتائج على اساس وجود النمو حول القرص او عدمه (8) Eswin H. et al (9) Bayer et. al.

## ٣- تحضير الدنا البلازميدي :

تم استخلاص الدنا البلازميدي بالطريقة القاعدية الموصوفة من قبل Kieser (10) بعد تسمية السلالات على الوسط المغذي السائل.

## ٤- الهجرة الكهربائية باستخدام هلام الاكاروز :

تم التحري عن وجود الدنا البلازميدي باستخدام الهجرة الكهربائية في هلام الاكاروز وحسب طريقة maniat et. al (11) وتم حساب الوزن الجزيئي للبلازميدات المعزولة بمقارنتها بدنا قياسي pBR322 للسيطرة وقد تم عمل الهجرة الكهربائية لمدة 3 ساعات ربامبيرية 30 ملي امبير.

## ٥- المواد المستخدمة في تجارب التحديد :

استخدمت نبات الحناء (Lawsonia inermis) ونبات الكجارات (Hibiscus sabdariffa) في هذه الدراسة والذي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية في بغداد أما مركب Sodium Dodecyl Sulfate SDS فقد تم تجهيزه من شركة (BDH). وقد اخذ 100 غم من كل نبات وخط مع 500 مليلتر من الماء المقطر، مزجت

وبترجأت متقارنة. كما وجد بان بعض المضادات الحيوية لها تأثير على الدنا البلازميدي مما تسهل عملية فقدان تلك البلازميدات كالترياقاميسين والنوفلوباوميسين Johnston and Richmond (4) كما تلعب مركبات Quinolone وخصوصاً خامض النالديكس دوراً في تحييد البلازميدات من خلال تأثيرها في انزيم Topoisomerase II .Sarker and Raichomdhuri

علاوة على ذلك فقد وجد بان بعض السمخلصات النباتية لها دور في تحييد البلازميدات فقد أشار Lakshami et. al. (6) بأن مركب plumbagin المستخلص من نبات Phmbage (L.) له القبلية على تحييد البلازميدات الموجودة في في الايشرشيا القولونية بكفاءة اعلى من مركب SDS والاكردين البرتقالي.

أما المعاملات الفيزيائية فكانت ذات كفاءة اقل من المعاملات الكيميائية، فقد اشار May et al (7) بأن استخدام درجة الحرارة العالية في تحييد البلازميدات ذو كفاءة اقل من المعاملات الكيميائية وان تحييدها يعتبر جزئياً. على العموم فإن عملية التحييد تحصل كنتيجة للتأثير في عملية التخليق الحيوي للحمض النووي أو في نفاذية الغشاء الخلوي (3) Trevors. أن الهدف من هذا البحث هو مقارنة تأثير مركب SDS ومستخلص نبات الحناء والكجرات على تحييد بلازميدات بكتريا الايشرشيا القولونية المعزولة من حالات الاسهال في الاطفال.

## المواد وطرائق العمل

### ١- السلالات البكتيرية :

جمعت بكتريا الايشرشيا القولونية E.coli من مستشفى الطفل المركزي في بغداد من ١٠ اطفال لحد عمر 5 سنوات يعانون من حالات اسهال حاد تسببها هذه البكتريا حيث اخذت عينات الخروج في حاويات معقمة وتم تشخيصها في مختبر المستشفى المذكور.

التركيز المستخدمة (1%، 1.5%، 2%) على النمو البكتيري وعند التحري عن تأثير مستخلص هذا النبات في تحييد البلازميد وحد ان المستعمرات المنتخبة (500 مستعمرة) قد نمت على الوسط الانتقائي الحاوي على المضادات الحيوية (Sm, Cm, Kn, Tc, Am) بصورة منفصلة اسوة بالنمو على اوساط السيطرة (الخالية من المضاد) وعند التحري عن المحتوى البلازميدي لوحظ عدم تأثيره بمستخلص النبات (جدول رقم 2-). مما يشير الى عدم قابلية هذا النبات في التأثير على النمو البكتيري او في المحتوى البلازميدي.

ولوحظت النتائج نفسها عند استخدام مستخلص نبات الكجرات حيث وجد ان التراكيز دون 2% لم تؤثر على النمو البكتيري، كذلك على المحتوى البلازميدي في حين سببت التراكيز اعلى من 2% تثبيطاً تاماً للنمو البكتيري والذي يعود الى حامضية مستخلص نبات الكجرات الذي لايسمح بنمو البكتريا عند اضافته للوسط.

ب- أن التراكيز الواطنة من مركب SDS تسبب انخفاض في عدد المستعمرات النامية على الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحيوية. فقد وجد ان هذا المركب بتركيز 0.04% سبب تثبيطاً لنمو (23) مستعمرة من مجموع 500 مستعمرة، أما عند استخدام التركيز 0.02% فقد سبب انخفاضاً في قابلية بكتريا الايشرشيا القولونية في النمو في الاوسط الانتقائية بفعل مركب SDS الذي له القابلية في تحييد بلازميدات البكتريا وتتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه كل من (3) Trevor و (2) Sonstein and Baldwin الى قابلية هذا المركب في تحييد البلازميدات بكفاءة عالية من خلال تأثيره على الجدار الخلوي البكتيري للمستعمرات غير النامية. وعند التحري عن المحتوى البلازميدي لوحظ فقدان ذلك البلازميد الذي تحويه هذه العزلة مقارنة بالسيطرة (شكل رقم 1-1) مما يؤكد دوره في عملية التحييد.

جودا بالمستخدم حامضه هزازة في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة وشح المحلول بورقة الترشيح من نوع Whatman No 1 ثم جفد الراشح بجهاز التجفيد (Lyophilizer) وقد حضرت تراكيز من المحلول الاصلي لكل من مستخلص نبات الحناء والكجرات كل على انفراد (0.5%، 1%، 1.5%، 2%). ومركب SDS (0.01%، 0.02%، 0.04%). نقلت 500 مستعمرة من المستعمرات النامية في اوساط الاكار المغذي الصلب الحاوي على المستخلصات المشار اليها اعلاه وبطريقة Picking and patching على اوساط انتقائية حاوية على المضادات الحيوية لمعرفة دور هذه المستخلصات ومركب SDS في تحييد بلازميدات المقاومة.

## النتائج والمناقشة

### 1- نتائج فحص الحساسية :

اظهرت نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات العشرة مقاومتها لاغلب المضادات المختارة. تم اختيار عزلة واحدة (3) اظهرت مقاومتها لسبعة مضادات حيوية وهي Cb, Tc, Am, Sm, Cl, Cm, Kn (جدول رقم 1-1).

### 2- نتائج النسق البلازميدي :

تم التحري عن بلازميدات المقاومة لهذه المضادات للعزلات العشرة، وجد انها تحوس على بلازميد واحد على الاقل (1-5 بلازميدات) كما مبين في (الجدول رقم 1) وقد تم اختيار عزلة واحدة (العزلة رقم 3) مقاومة لاقل عدد من المضادات الحيوية وتحتوي على بلازميد واحد لتجارب التحييد.

### 2- نتائج التحييد :

أ- درس تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص نبات الحناء والكجرات على نمو بكتريا الايشرشيا القولونية، لوحظ أن مستخلص نبات الحناء لم يؤثر باي تركيز من

جدول ١-١ يبين مقاومة العزلات للمضادات الحيوية وعدد البلازميدات

عدد البلازميدات	صفة المقاومة	رقم العزلة
ثلاث	Cl, Tc, Er, Na, Cm, Am, Ra, Kn, Sm, Gm,	عزلة رقم 1
ثلاث	Er, Tc, Cl, Cm, Am, Cb, Ra, Tm, Kn, Sm	عزلة رقم 2
واحد	Kn, Cb, Tc, Am, Sm, Cl, Cm	عزلة رقم 3
خمسة	Tm, Na, Gm, Cb, Am, Cl, Ra, Cm, Er, Kn, Sm	عزلة رقم 4
اثنان	Gm, Kn, Sm, Cb, Am, Na, Cm, Cl, Er	عزلة رقم 5
اربعة	Tc, Cf, Gm, Tm, Sm, Cb, Am, Na, Er, Tc, Cm, Kn, Cl	عزلة رقم 6
ثلاث	Er, Tc, Cb, Am, Cm, Sm, Kn, Ra, Gm, Cl, Tm	عزلة رقم 7
اثنان	Am, Cb, Tc, Sm, Kn, Gm, Na, Cf, Er, Tm	عزلة رقم 8
ثلاث	Ra, Am, Cb, Cf, Tc, Sm, Gm, Am, Kn, Er, Cl, Cm, Tc	عزلة رقم 9
اثنان	Am, Cb, Tc, Cm, Er, Kn, Sm, Cl, Tm, Cf, Na, Ra	عزلة رقم 10

جدول ٢-٢ تأثير التراكيز المختارة لكل من نباتي الحناء والكجرات ومركب الـ SDS على نمو عزله الاشرشيا القولونية المختارة وعلى المحتوى البلازميدي

عدد المستعمرات التي فقدت بلازمياتها	النمو	تركيزها	المادة :
*-	*+	%0.5	١- الحناء Lawsonia inermis
-	+	%1	
-	+	%1.5	
-	+	%2	
-	+	%0.5	الكجرات Hibscus Sabdariffa
-	+	%1	
-	+	%1.5	
-	*-	%2	
-	+	%0 01	مركب SDS
فقدت عشرة / 500 مستعمرة	+	%0.02	
فقدت 500/23 مستعمرة	+	%0 04	

\*+ نمو  
\*- لا يوجد نمو  
\* لم تفقد البلازميد  
بد المعاملة

Dodecyl Sulfate. J. bact. Jan: 262-265. (1972).

- 3- Trevors, J. Plasmid curing bacteria. FEMS. Micro. Rv. 32: 149-157 (1986).
- 4- Johnston, J. and Richmond, M. The increased rate of loss of Pencillinase plasmide from *S. aureus* in the presence of Rifampcin. J. Gen Micro. 60: 137-139.(1970).

## REFERENCES

- 1- Bguanchand, D.H. Scavizzi, Y.R. and Chabbert, M.A. Elimination by Ethidium bromide of antibiotic Resistance in enterobacteria and Staphylococci. J. Gen., Micro 54: 417-425. (1969).
- 2- Sonstein, A. and Baldwin, J.N. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with Sodium

- Manual of clinical Microbiology 4<sup>th</sup> ed P. 978 American Society for Microbiology Washington DC (1985)
- 9- Bayer, A W, Kirby, W M, Sherris, J C and Turek, N Antibiotic susceptibility testing standardized single disk Method Am J clin Path 45: 493-496 (1966)
  - 10- Kieser, T. factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* Plasmid 12: 19-36 (1984).
  - 11- Mainatis, T. frirsch, E.F. and Sambrook, J. Molecular cloning a laboratory Manual Cold spring Harbor Laoratory, Cold Spring harbor. New York (1982).
  - 5- Sarker, R and Raichomdhuri, A M. B. Factors in entropathogenic *Escherichia coli* Associated with diarrhoeal disease in children Ind J Med Res 72 Aug 174-178 (1980)
  - 6- Lakshami, V V. Sridhar Padma, and Poolasa, H. Elimination of multidrug resistant plasmid in bacteria by plumbagin a compound derived from a plant. *Current Micro.* 16.: 159-161.91987)
  - 7- May, J.W. Houghton, R.H. and Perret, C.J. The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus* J. Gen. Micro 37: 157-169.(1964)
  - 8- Edwin H. lenette, Albert Balows, Wiliam J. Hausler, jr. H. Jean Shadomy



شكل رقم ١: تأثير مركب SDS على المحتوى البلازميدي لبكتريا الايشوشيا القولونية

١. المسار الاول بلازميد pBR322
٢. المسار الثاني بلازميد العزلة المنتخبة *E. coli* قبل المعاملة
٣. المسار الثالث فقدان البلازميد بعد استخدام مركب SDS
٤. المسار الرابع فقدان البلازميد بعد استخدام مركب SDS
٥. المسار الخامس فقدان البلازميد بعد استخدام مركب SDS
٦. المسار السادس فقدان البلازميد بعد استخدام مركب SDS

إنتاج الإدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP من خميرة *Candida tropicalis* المعزولة محليا

٢- استخلاص وتنقية وتثبيت ATP

مستشار فاضل الجمولي / دكتور صباح الشبيكلي

معهد الهندسة الوراثية والتنقية الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق

(استلام تاريخ ١٩٩٩ / ٢ / ١٠ وقبل النشر في ١٩٩٩ / ١ / ٢٢)

## ABSTRACT

Extraction ATP from yeast cells by using distilled water gives results compared with potassium phosphate buffer (0.1 M) pH 6.8, when preserved ATP in the solution buffer at 4 C showed constant towards hydrolysis for a longer period than when preserved it in the distilled water at the same temperature. Using ion-exchange chromatography on Dowex 1 (chloride) column purified the ATP. The purified ATP has examined by the way including several steps, Thin-layer chromatography, drawing the curve of absorption spectrum, testing hydrolysis by acid and testing it's biological activity.

## الخلاصة

تم استخلاص ATP من الكتلة الحيوية للخميرة *Candida tropicalis* SAO13 باستخدام عدة محاليل (الماء المقطر، محلول فوسفات البوتاسيوم الدائري بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6.8) تم حفظ ATP بمحلول دائري الفوسفات بدرجة 4°م وأعطى ثباتاً تجاه التحلل لفترة زمنية اطول مقارنة بالماء المقطر. نقي ATP المنتج من العزلة المحلية بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني (Dowex 1 (chloride)، وتم تشخيصه بعدة طرائق شملت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ورسم منحني طيف الامتصاص واختبار ثباتيته تجاه التحلل بالحلمض وقياس فعاليته الحيوية.

## المقدمة

استخدمت تقنيات مختلفة لغرض تنقية مركب

ATP اعتمدت على صفاته كالوزن الجزيئي وقابلية

الذوبان والقطبية والشحنة والفعالية الحيوية وتعد طريقة

كروماتوغرافيا التبادل الايوني من الطرائق الأوسع

انتشاراً على نطاق تطبيقي باستخدام Dowex 1 بشكل (Chloride) (3,2).

كما استخدمت طرائق مختلفة لتشخيصه التي

تعتمد على الصفات المميزة التي يمتلكها هذا المركب

وحسب التقنيات التي تستند عليها ومن أبرزها طريقة

كروماتوغرافيا الورق Paper chromatography

والتي تعد كإحدى طرائق الفصل والتقدير الكمي للـ

بعد مركب الادينوسين ثلاثي الفوسفات ATP

الصيغة الكيميائية لحفظ الطاقة في الخلية، ويدخل في

العديد من الأبحاث الكيميائية والطبية المتعلقة بالخلايا

المسرطنة، ولكون الخمائر لا تفرزه الى وسط النمو

بكميات محسوسة، فقد استخدمت طرائق عديدة

لاستخلاصه تعتمد على تكسير الخلايا حيث تختلف من

ناحية كفاءتها، وكلفتها الاقتصادية ودرجة نقارة ATP

المستخلص منها (1).

اضيف حامض البيروكلوريك المبرد بتركيز 5% الى معلق خلايا الخميرة (حجم / حجم) ووضع العزيج في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة مع التحريك ونبذ بسرعة 6000 xg لمدة 10 دقائق عدل بعدها الرقم الهيدروجيني للرائق باستخدام محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 3 عياري ثم قيس الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانومتر لتعيين كمية ATP.

### تنقية للـ ATP

استخدم عمود المبادل الايوني من نوع Dowex 1 بابعاد (1x8 سم) وبسرعة جريان 1 مللتر / دقيقة وحسب الطريقة الموصوفة من قبل (10).

### تشخيص للـ ATP

- 1- التشخيص بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)  
جرت العملية حسب الطريقة الموصوفة من قبلي (3) باستعمال نظام الفصل المكون من حامض الايزو - بيوترك وهيدروكسيد الامونيوم بتركيز 0.5 عياري (3:5) (حجم / حجم) ، شخست مواقع حزم ATP بواسطة الاشعة فوق البنفسجية.
- 2- التشخيص برسم منحى طيف الامتصاص .  
جرت عملية التشخيص باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي المجهز من شركة Pye-Unicam موديل 8800 عند اطوال موجية مختلفة من 200-400 نانوميتر .

### 3- التحلل الحامضي للـ ATP

اخذت عينتان بحجم 10 مللتر لكل من ATP و AMP بتركيز 10 ملي مولار بعد اذابتها في حامض البيروكلوريك بتركيز 6 مولار ووضعتا في حمام مائي بدرجة حرارة 30° م مع التحريك المستمر ثم سحبت من العينتان 1 مللتر وعلى فترات زمنية منتظمة (ساعة) اضيف اليها 5 مللتر ماء مقطر مبرد وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 باضافة قطرات من محلول

ATP<sup>(3)</sup> فضلا عن كونها استخدمت كمؤشر لقياسه لبيوكيولونودات المفصولة<sup>(4)</sup> على الرغم من اختلاف أنظمة الرابطة والاسماليوها التي اجرت بها. أما الطرائق الكيميائية فلها تعتمد على تقدير كمية الفسفور اللاعضوي أو مجموعة البايروفوسفات المتحررة خلال التحلل الحامضي لمركب ATP<sup>(5,6)</sup> حيث تستخدم فيها الحوامض الكحولية مثل حامض البيروكلوريك وحامض الكبريتيك وحامض البيروكلوريك<sup>(7,3)</sup>.

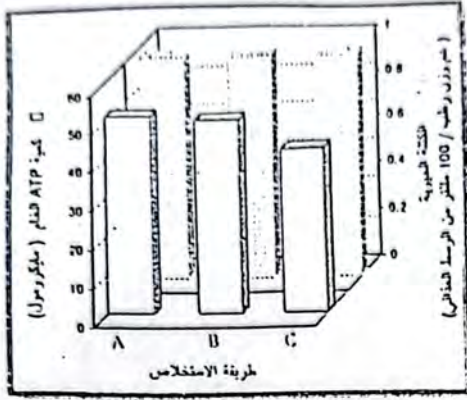
هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على افضل لطرائق المستخدمة في استخلاص لمركب ATP المنتج من العزلة المحلية لخميرة *C. tropicalis*، كذلك اختبار ثباته تجاه التحلل بالحامض ثم قياس فعاليته البايولوجية.

### المواد وطرائق العمل

عزل الخميرة : نمت عزلة خميرة *C. tropicalis SAO13* (تم الحصول عليها من قسم التقنيات الاحيائية - كلية العلوم) هوانيا في الوسط الغذائي لمعقم المكون من الكلوكوز 2%، مستخلص الشعير 1% والبيتون 1% ذو رقم هيدروجيني 5.5 من خلال تحضير 100 مللتر ونقلت اليه خلايا الخميرة بعد تنشيطها على وسط سابرويد دكستروز الصلب وتم الحضان عند درجة حرارة 37°م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة ولمدة 48 ساعة أي عند دخول الخلايا بداية طور الثابت تم حصدها بالنبذ المركزي المبرد 6000 xg لمدة 10 ثم غسلت بالماء المقطر.

عملية الاستخلاص : جرت عملية الاستخلاص وفق الطريقة الموصوفة من قبل (8) مع اجري التحوير التالي وذلك باستخدام المحاليل التالية (الايثانول والمحلول الدارئ، الايثانول والماء المقطر، وحامض البيروكلوريك) في عملية الاستخلاص وتقدير تركيز الـ ATP المقارنة مع المنحنى القياسي للـ ATP، وكذلك تحوير الطريقة الموصوفة من قبل (9) في توصيف الـ ATP حيث

(الشكل 1)، وتعتمد كفاءة الايثانول في الاستخلاص في كونه يعمل على زيادة نضوحية الغشاء البلازمي للجزيئات الكبيرة مثل النيوكليوتيدات بعمله على تحطيم الغشاء (12).



الشكل (1) تأثير طرائق الاستخلاص في المحصلة النهائية الـ ATP المنتج من العزلة المحلية *Candida tropicalis* SAO13 حيث أن :

- A : طريقة الاستخلاص باستخدام الايثانول والمحلول الدائري.
- B : طريقة الاستخلاص باستخدام الايثانول والماء المقطر.
- C : طريقة الاستخلاص باستخدام حامض البيروكلوريك.

عند دراسة تأثير كل من المحلول الدائري المستخدم في الطريقة الاولى والماء المقطر المستخدم في الطريقة الثانية في ثباتية ATP عند حفظه في كل منهما ولمدة 14 يوما (الشكل 2) وجد ان حفظ ATP في المحلول الدائري ابدى ثباتا تجاه التحلل لفترة اطول مما هي عليه في الماء المقطر، والذي قد يعزى الى ان ATP يبقى محافظا على ثباتيته لمدة اسبوع تقريبا عند حفظه في المحاليل المتعادلة بدرجة 4م (13).

هيدروكسيد البوتاسيوم 10 مولار في حمام ثلجي ونبذ المزيج بسرعة 5000 xg لمدة 10 دقائق واضيف للرائق حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2 مولار لتعديل الرقم الهيدروجيني الى 3.5 ثم ترك بعدها لمدة 20 دقيقة بعد اضافة 0.6 عم من الفحم المنشط ونبذ المزيج بسرعة 5000 xg لمدة 15 دقيقة ورشح السائل العلسوي على مرشح غشائي (0.45 مايكرومتر) عدل بعدها الرقم الهيدروجيني للرائق الى 7 ونبذ مرة ثانية واخذ الرائق ثم عينت كمية الفسفور اللاعضوي للعينات اعلاه وفق الطريقة الموصوفة من قبل (11).

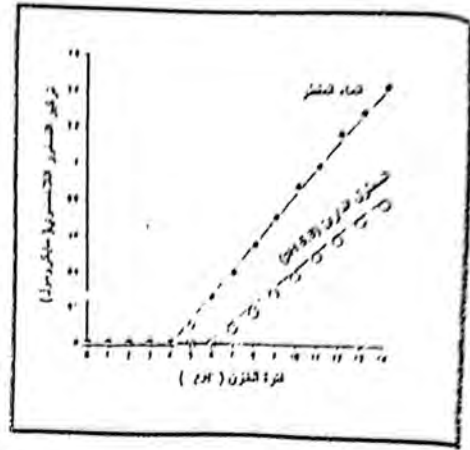
#### 4- تقدير الفعالية الحيوية للـ ATP

تم تمينيت خلايا الخميرة لمدة 24 ساعة في وسط سايرويد - دكستروز السائل عند درجة حرارة 37م وبسرعة تحريك 150 دورة / دقيقة . ثم نبذت الخلايا بسرعة 6000 xg لمدة 10 دقائق بدرجة 4م ثم غسلت بالماء المقطر ونقلت بعد ذلك الى وسطين حاويين على ATP بتركيز 10 ملي مولار بوجود الكلوكوز وغيابه وبما يعادل 50 ملغم وزن رطب / 10 مللتر من الوسط وحضنت عند درجة 37م مع التحريك ثم سحبت نماذج من الوسطين اعلاه على فترات زمنية منتظمة (ساعة) بحجم 1 ملتر ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق لايقاف التفاعل، نبذ المحلول بسرعة 6000 xg لمدة 10 دقائق وعين تركيز الفسفور اللاعضوي في الرائق كما سبق اعلاه.

#### النتائج والمناقشة

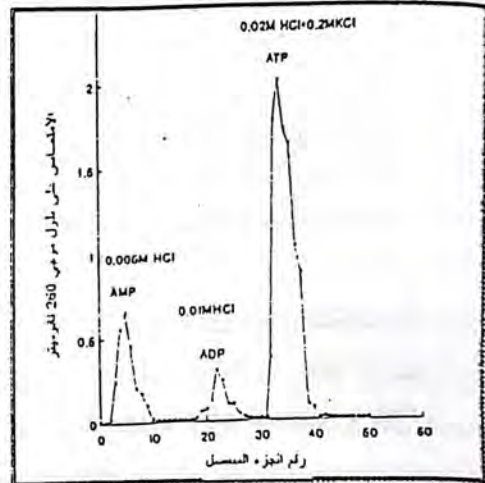
اظهرت النتائج كفاءة الطريقتين الاولى والثانية في استخلاص ATP من خلايا العزلة *Candida tropicalis* SAO13 حيث بلغ تركيز ATP في المستخلص الخلوي 51 و 50 مايكرومول عند استخدام كل منهما على التوالي بينما بلغ تركيزه 42 مايكرومول عند استخلاصه باستخدام محلول حامض البيروكلوريك

كما تضمنت الدراسة استخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتتقية ATP المنتج من العزلة *Candida tropicalis SAO13* باستخدام المبادل الايوني Dowex 1 (8x1 سم) . حيث اظهرت النتائج (الشكل - 3) وجود ثلاث قمم تمثل القمة الاولى مركب الاديوسين احادي الفوسفات (AMP) ، اما القمة الثانية فانها تمثل مركب الاديوسين ثنائي الفوسفات (ADP) في حين ان القمة الثالثة تعود الى مركب الاديوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) على التوالي.



الشكل (2) : تأثير استخدام محاليل مختلفة لاستخلاص ATP على ثباتيته خلال خزنه لمدة 14 يوم.

اكنت نتائج تشخيص الـ ATP (الشكل 4) كفاءة استخدام عمود المبادل الايوني Dowex 1 في فصل وتنقية النيوكليوتيدات الثلاثة (ATP, ADP, AMP) وذلك من خلال مقارنة قيم RF التجريبية لهذه المركبات مع قيم RF قياسية، حيث كانت قيمة RF لعينة ATP المراد تشخيصها مساوية لقيمة EF لعينة ATP القياسية والبالغة 0.32 ويعود سبب اختلاف مواقع الحزم الممثلة لكل من النيوكليوتيدات الثلاثة الى اختلافهم في عدد مجاميع الفوسفات الداخلة في تركيب كل منهم وبالتالي اختلافهم في الوزن الجزيئي (14).



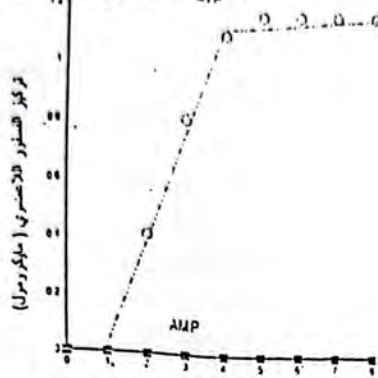
الشكل (3) : كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتتقية نيوكليوتيدات المنتج من العزلة *C.tropicalis SAO13* باستخدام عمود المبادل الايوني Dowex (chloride) (8x1 سم) الذي تمت موازنته بمحلول 0.005 مولار حامض الهيدروكلوريك ثم الاسترداد بمحاليل ذات تدرج بالقوة الايونية (محلول حامض الهيدروكلوريك 0.005 مولار - محلول حامض الهيدروكلوريك 0.01 مولار - محلول حامض الهيدروكلوريك 0.02 مولار مع محلول كلوريد البوتاسيوم 0.2 مولار). سرعة الجريان 1 مللتر / دقيقة (حجم الجزء المسترد 5 مللتر).



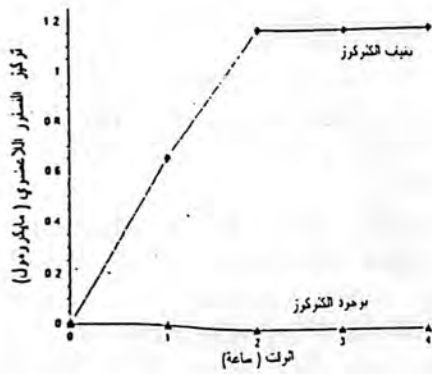
الشكل (4) : نمط الترحيل لنيوكليوتيدات الاديوسين الاحادية والثنائية والثلاثية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (نظام الفصل مكون من حامض الايزو - بيوتيريك وهيدروكسيد الامونيوم بنسبة (5.3) حجم / حجم) وعلى التوالي . حيث ان : S عينة ATP القياسية 1, 2, 3 : عينات ATP, ADP, AMP التي تم تنقيتها باستخدام المبادل الايوني Dowex 1 على التوالي.

يمثل الاصرة (P-O) في مركب AMP من ناحية قوتها وثباتها تجاه التحلل الحامضي (7).

من خلال النتائج الموضحة بالشكل (7) وجد ان حضان ATP مع خلايا الخميرة بوجود الكلوكون سوف يؤدي الى تحلله الى AMP في حين ان حضان ATP مع خلايا الخميرة بغياب الكلوكون سوف يؤدي الى تحلله الى AMP والفسفور اللاعضوي الناتج من تحلل مجاميع الفوسفات التابعة لمركب ATP.



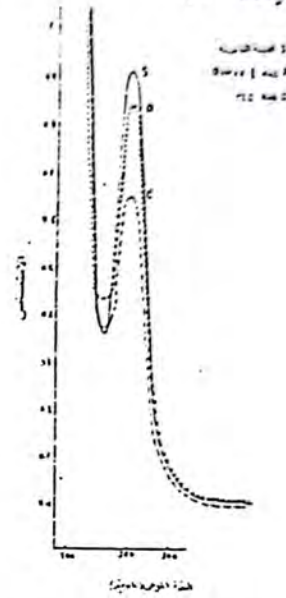
الشكل (6) : منحني التحلل الحامضي لمجاميع الفوسفات لكل من مركب ATP و AMP بتركيز اولي 10 ملي مولار بفعل حامض البيروكلوريك. بتركيز 6 مولار عند درجة حرارة 30° م.



الشكل (7) : منحني التحلل لمجاميع الفوسفات التابعة لمركب عند حضانته مع خلايا العزلة عند درجة حرارة 37° م وبتركيز اولي 10 ملي مولار بوجود الكلوكون او بغياها

أن عدم تحرر الفسفور اللاعضوي في الحالة الاولى قد يعزى الى كون خلايا الخميرة تستغل الطاقة المتحررة من تحلل ATP في فسفرة الكلوكون والذي سوف يعطي طاقة

لما الشكل (5) فتمثل أطوار الامتصاص لكل من العينات المراد تمييزها وعينة ATP القياسية، ويلاحظ ان اعلى قيمة امتصاص سجلت للعينات اعلاه كانت عند الطول الموجي 260 نانوميتر والذي يشابه الطول الموجي الذي سجلت عنده عينة ATP القياسية اعلى امتصاص، ان السبب في امتصاص النيوكليوتيدات للأشعة فوق البنفسجية يعود في احتوائها على القواعد النيتروجينية (Adenine) والتي تمتلك الخاصية لامتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانوميتر (11) والذي له اهميته في التحليل الكمي لهذه النيوكليوتيدات (14).



الشكل (5) : طيف الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية لعينات مركب عند اطوال موجية مختلفة من 200-400 نانوميتر عند الرقم الهيدروجيني المتعادل.

كذلك تبين النتائج سرعة تحلل مجاميع الفوسفات التابعة لمركب ATP (الشكل 6-) بالمقارنة مع مركب AMP الذي ابدى ثباتاً تجاه التحلل الحامضي والذي لم تتحرر أي مجموعة فوسفاتية منه يمكن ان يعود ذلك الى ان تحرر مجموعة الفوسفات الطرفية التابعة لمركب ATP يكون اسرع واسهل مقارنة مع المجموعتين الداخليتين والذي يعزى الى ان تحلل الاصرة (P-O) عند الموقع كما يكون اسهل يليه الموقع بيتا (3) بالمقارنة مع الموقع الفا الذي يكون ثابتاً تجاه التحلل الحامضي والذي

- 9- Emerich, D.W.; Ruiz-Argueso, T.; Ching, T. M. and Evans, H.J. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *rhizobium japonicum*. Bacteroids. J. Bacteriol. 137 (1) : 153-160 (1979).
- 10- Benson, A.A. Sugar phosphates paper and colum chromatograh. In : Methods in Enzymology (eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) vol III : 110-128 Academic Press, Inc. New York (1957).
- 11- Yousif, S.I. and Elumary, M.R. Manual of clinical chemisrty Baghdad University (1988).
- 12- Osman, Y.A. and Ingram, L.O. Mechanism of ethanol inhibition of ferenatation in *Zymomonas mobilis* COP4. J. bacteriol 164: 173-180. (1985).
- 13- Bermeyer, H.U. Methods of enzymatic analysis. Vol. 1. Verlag. Chemie weinheim. United State America. (1974).
- 14- Calvin, M. and Pryor, W.A. Organic chemistry of life. W.H. Freeman and Company, San Francico, U.S.A. (1973).
- 15- Dounce, A.L.; Rohstein, A.; Beyer, T.G. ; meler, R. and Freer, M.R. Adetailed procedure for the preparation of highly purified adenosine triphosphate J. Bio. Chem. 174 (1) : 361-370 (1948).
- ووجود مجاميع الفوسفات اللاعضوية فانها سوف تستغل من قبل خلايا الخميرة لبناء جزئيات جديدة من ATP (17).
- المصادر
- 1- Thomas, K.C. and Dawson, P.S. Variations in the aadenylate energy charge during phased growth (cell cycle) of *Candida utilis* under energy excess and energy - limiting growth conditions. J. Bacteriol 132 (1) : 36-43 (1977).
- 2- Tarr, H.L. A> Enzymic degradation of glycogen and adenosine 5' triphophate in fish muscle. Candidian J. Biochem. Physicl. Res. 45: 26-31 (1963).
- 3- Tani, Y. Microbial production of ATP. In Biotechnology of vitamins pigments and growth factor (ed. Vandamme, E.J.) pp. 337-350 Elsevier Applied Science. London and New York (1989).
- 4- Hurlbert, R.B.. Preparation of nucleoside diphosphates and triphophates in Methods in Enzymology (eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) vol. III : 785-805 (1957).
- 5- Strehler, B.L. and Totter, J.R. Determination of ATP and related compounds in : methods of biochemical analysis (ed. Glickm, D.) vol. I. Inter scinence publishers, Inc. New York (1961).
- 6- Plummer, D.T. In introduction to practical biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed., McGraw-Hill Book Company UK. Limited. Maidenhend, Berkshire, England.
- 7- Hutchings, G.J.; Banks, B.E.; Mruzek, M.; Ridd, J.H. and Vernon, C.A. Mechanisms of hydrolysis of adenosine 5' -triphosphate, adenosine 5'-diphosphatr, and inorganic pyrophosphate in aqueous perchloric acid. Biochemistry 20 : 5809-5816. (1981).
- 8- Ciriacy, M. and Bretenbach, I. Physiclogical effects of seven differrent bloks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol 139 (1) : 152-160 (1979).

قياس تأثير اشعة كاما على خضاب الدم البشري باستخدام الطيف المرئي الاعتيادي والمشتق

(أ) عند مدى الجرعة الواطنة 0.25-1.0 غراي

حسين الجبوري و محمد عبد الستار الشيكلي

قسم الفيزياء، كلية التربية، الجامعة المستنصرية ومركز البحوث النووية ص.ب. ٧٦٥ نويثة، بغداد العراق

(استلم بتاريخ ١١/٢٩/١٩٩٧ وقبل للنشر في ٧/٣١/١٩٩٩)

### ABSTRACT

The effect of low gamma radiation in range (0.25-1.0 Gy) on ( $2 \times 10^{-4}M$ ) human hemoglobin (Hb) was measuring by using the change in normal spectrum at 414nm, in first: second and fourth derivative spectrum at 650:593, 610 and 650nm respectively. (Hb) which preservative 2h before irradiation when increase in irradiatin dose from 0.25 to 1.0Gy perform to; 1) Decreasing in the net of optical density at 414nm;  $\Delta(O.D.)_{414}$  which measuring by direct method (D.M.) and double wavelength method (D.W.M.) with 68%, 30%, repectively from control sample, which indicate there is decreases in heme group bond and can attribute to hydrogen bond splitting. 2) Stability in increasing of the net of first derivative spectrum at 650nm;  $(dA/d\lambda)_{650}$  with radiation dose at 0.5 Gy indicated to increasing of Methmoglobin (MetHb) forming at 650nm. 3) Stability in increasing of ferric to ferrous ions factore ( $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ ) with irradiation dose at 0.5Gy. 4) Increasing percent in vibration of fourth derivaative spectrum at 650nm;  $(d^4A/d\lambda^4)_{650}$ , and the maximum level percent of vibration stablized in the range (0.5-1.0Gy), which definite there is change in Hb molecule shape as aresult of change in ionic state of iron atom of Hb direct effect of radiation. Some equations determined from this research and ability to using these equations for calculate; i) Total Hb(THb) from reciprocal of the absorption net between 610 and 593nm;  $1/\Delta(O.D.)_{593,610}$ . ii)MetHb% which formed as a result of radiation from reciprocal of the fourth derivative spectrum net between 525 and 534nm;  $1/\Delta(d^4A/d\lambda^4)_{534,525}$  and from fourth derivative spectrum at 650nm;  $(d^4A/d\lambda^4)_{650}$ . This study conclude that change in derivative spectrum may be using as a sensitive method to measuring gamma radiation effect on (Hb) and may by using (Hb) molecule as a biological probe for exposure doses.

### الخلاصة

استخدم التغيير الحاصل في الطيف المرئي عند القمة 414 ن م وفي مشتقات الطيف الاولى والثانية والرابعة عند القمم 650; 610, 593; 650 ن م على التوالي لقياس تأثير اشعة كاما (0.25-1.0 غراي) على جزئية خضاب الدم البشري ( $2 \times 10^{-4}$  مول). وادت الزيادة في الجرعة الاشعاعية الى: (أ) هبوط في صافي الكثافة الضوئية عند القمة 414 ن م:  $\Delta(O.D.)_{414}$  بالمقاسة بالطريقة المباشرة (D.M.) وطريقة الطول الموجي المضاعف (D.W.M.) وينسب 68% و 30% عن قيمة نموذج السيطرة على التوالي، مما يؤكد هبوط في رابطة مجموعة الهيم وتكسر الروابط الهيدروجينية. (ب) استقرار الزيادة في قيمة صافي المشتقة الاولى عند القمة 650 ن م:  $\Delta(dA/d\lambda)_{650}$  مع الجرعة الاشعاعية عند الجرعة 0.5 غراي مما يشير الى زيادة في تكوين الميثاموغلوبين - MetHb عند القمة 650 ن م. (ج) استقرار الارتفاع في نسبة ايونات الحديدك الى الحديدوز ( $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ ) مع الجرعة الاشعاعية عند القيمة 0.5 غراي. (د) زيادة في قيمة النسبة المنوية لتذبذب امتصاصية المشتقة الرابعة للطيف عند القمة 650 ن م:  $(d^4A/d\lambda^4)_{650}$  حتى تصل الى اقصى نسبة تذبذب في مدى الجرعة 0.5-1.0 غراي مما يؤكد التغيير في شكل جزئية الخضاب الناتج عن تغير التكافؤ لذرة الحديد في الخضاب. واستخرج من الدراسة علاقات رياضية يمكن من خلالها

يوجد كمية الخضاب الكلية -THb من مغلوب صافى الامتصاص بين القمتين 610، 593 ن م:  $1/\Delta(O.D.)_{593,610}$  والنسبة المئوية لتكوين الميتاموغلوبين %MetHb نتيجة التثعوب من قيمتي مغلوب صافى قيم المشتقة الرابعة بين القمتين 534,525 ن م:  $(d^4A/d\lambda^4)_{610}$ . واستخلص اخيرا بانه يمكن اعتبار التغير الحاصل في مشتقة الطيف المرسي طريقة حساسة في قياس اثر اشعة كاما على جزيئة الخضاب وامكانية اعتماد الجزيئة كمجراع حيوي في دراسات التعرض الاشعاعي غير المحتسب.

## المقدمة

استخدام مشتقة الطيف الاعتيادي نفسه<sup>(١٤)</sup>. حيث استخدم (Haver, 1978)<sup>(١)</sup> اشتقاق الطيف في القياسات السريرية تبعه في ذلك اخرون عند المشتقة الاولى<sup>(١١-١٥)</sup> واستخرج نسب MetHb من خلال الانحراف في نقطة التقاطع الصفرية Zero crossing point للطيف المشتق<sup>(١١)</sup>. كما استخدمت المشتقة الثانية للطيف لقياس كمية الخضاب البلازمي سريريا<sup>(١١)</sup> او قياس الخضاب الكربوني<sup>(١٢)</sup>. ودخلت مشتقة الطيف في دراسات دقيقة اخرى كفصل بعض المركبات مثل Bilirubin من الخضاب<sup>(١٤)</sup> او ايجاد ثابت الاتزان في حالة Eosin وحساسيتها للظروف المختبرية<sup>(١٥)</sup> مثل الحامضية والرقم الهيدروجيني<sup>(١١)</sup>.

في هذه الدراسة سيتم ايجاد بعض الدوال المشتقة لطيف الخضاب المعرض سابقا لاشعة كاما بجرع تتراوح 0.25-10 غراي واستخراج العلاقات الرياضية التي تفسر التأثير الاشعاعي للخضاب من التغير الحاصل في بعض المعاملات الطيفية او التغير في نسب MetHb، وذلك لكون الاخير يرافق تكوينه عملية التثعوب الاشعاعي للخضاب وتكوين ايونات الحديدك  $Fe^{+3}$  نتيجة التثعوب<sup>(١١)</sup>.

## المواد وطريقة العمل

### تحضير نماذج الخضاب

يؤخذ الدم الوريدي المسحوب حديثا والخالي من الامراض السارية والمعدية ويوضع في حاويات مانعة للتخثر (حاوية على ١% مادة EDTA) وتصل البلازما عن كريات الدم الحمراء بالنبذ المركزي ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ويستخدم المحلول الفيزيولوجي

يتواجد خضاب الدم بانواع مختلفة على اساس الحالة الالكترونية لذرة الحديد او المجاميع المضافة لتجزيئة الاصلية منها الخضاب المختزل Hb والميتاموغلوبين MetHb والخضاب المؤكسج  $HbO_2$  والخضاب الكاربوني HbCO بالاضافة الى السلفوموغلوبين HbS. ولكل هذه الانواع طيف امتصاص ضوئي بقم معينة تتداخل معظم الاحيان مع قم اطيايف الانواع الاخرى<sup>(١)</sup>، مما يؤدي الى صعوبة في تحديد قم انواع الخضاب وبالتالي صعوبة في قياس نسب هذه الانواع بطرق القياس المباشر للطيف. وان تحديد هذه النسب مهم في دراسات الكيمياء-السريرية<sup>(٢)</sup>، وذلك لتثبيت طرق روتينية دقيقة للقياس<sup>(٣)</sup>، لكل نوع نتيجة تتداخل قم طيف الانواع مع بعضها مما يجعل عملية القياس غير دقيقة وباطيايف مشوهة. فقد تم استحداث طرق اخرى للقياس من خلال الطيف الاعتيادي مثل طريقة الطول الموجي المضاعف Double-wavelength method, D.W.M<sup>(٤)</sup> في حساب تركيز HbCO او استخراج معادلات عند قم تعود لنوع الخضاب لتحديد نسب<sup>(٥-١)</sup> او تركيز<sup>(٦)</sup> بعض انواع الخضاب الموجودة في نماذج الدم.

كما استخدمت لهذا لغرض طرق اكثر تطورا للقياس المباشر للطيف الاعتيادي مثل محلل الطيف البصري العكسي Reversed optics spectrophotometer<sup>(٧)</sup> او محلل طيف الاطوال الموجية الستة Six wavelength photometer<sup>(٨)</sup> على غرار مطيافية الطول الموجي المتعدد<sup>(٩)</sup> وصولا الى

حساب نسبة التحول الكلية للخضاب بحالة  $Fe^{+3}$  على أساس التحول الكامل للخضاب الى MetHb مقارنة بالخضاب الغير مثنول  $Fe^{+2}$ .

وتم حساب التذبذب في طيف العنقثة الرابعة عند القمة 650 ن م من خلال مقدار الامتصاصية لاطولى واقصى قيمة لـ  $(d^4A/d\lambda^4)_{650}$  في حدود القمة 650 ن م ومثلت اقصى تذبذب (~10%) عند حالة الاستقرار مع الجرعة الاشعاعية المعطاة للخضاب.

### النتائج والمناقشة

(شكل-١) يبين اطياف انواع الخضاب المتداخلة وصعوبة فرزها في حالة تواجدها مشتركة في النموذج الواحد ويلاحظ تداخل MetHb مع السلفوموغلوبين HbS في المدى ٦٠٠-٦٥٠ ن م. (شكل-٢) يبين تأثير فترة الحفظ من تحضير الخضاب وتكوين MetHb، حيث وجد انه ترتبط النسبة المئوية لتكوين الميثاغلوبين MetHb% مع فترة الحفظ بالمعادلة (١)

$$MetHb\% = 1.529 \ln(\text{Time, h}) + 21.39 \quad (1)$$

ويلاحظ استقراره خلال ٢٤ ساعة من التحضير وامكن تحديد فترة اجراء القياسات اللاحقة على الخضاب خلال (١-٢ ساعة) من التحضير لكونه لا يؤثر على تغير الخضاب.

كما ترتبط كمية الخضاب الكلية THb الموجودة في الدم (غرام / ملتر) مع التغير في صافي الكثافة الضوئية للطيف المباشر عند القمم 610,593 ن م والمعروف بـ  $\Delta A_{593,610}$  (شكل-٣) بالمعادلة (٢).

$$THb (\text{gm}/100\text{ml}) = 0.1963 (1/\Delta A_{593,610}) + 6.30 \quad (2)$$

تمثل القمة 593 ن م الواردة في المعادلة اعلاه قمة الخضاب من النوع corprophyrin<sup>(٢٥)</sup>، لذا فانه انفرد هذا النوع من الخضاب بان له دور في ايجاد THb.

(شكل-٤) يبين صافي التغير في الكثافة الضوئية عند القمة 414 ن م؛  $\Delta(O.D.)_{414}$  يهبط مع الجرعة الاشعاعية المعطاة للخضاب حتى الجرعة 10

(NaCl ٠.٩%) بعد فصل العائق (البارمسا) لتعمل الكريات المعرسة.

وبعد عزل الكريات والتبذ المركزي وتعمل بنفس الطريقة السابقة لثلاث مرات متوالية، تعلق الكريات بالمحلول الفيزيولوجي لتكوين محلول عائق حاوي على الكريات ثم يخفف المحلول بالماء الخالي من الأيونات بنسبة (١:١٠) ويترك لمدة خمسة دقائق. يحضر الخضاب تركيز (١٠×٢<sup>-١</sup> مول) باستخدام طريقة (Anderson, 1972).

### تشعيع نماذج الخضاب

تشعيع نماذج الخضاب تركيز (١٠×٢<sup>-١</sup> مول) المحضرة مسبقا باستخدام مصدر التشعيع <sup>60</sup>Co ذو معدل الحرارة ٠.٥ غراي / دقيقة و ٤.١ غراي / دقيقة مقارنة باستخدام طريقة فوك<sup>(٢٦)</sup> لمدى التشعيع بالجرع الوطنية (0.25-10 غراي) والعالية (250-500 غراي) على التوالي. تم التشعيع بوجود تيار من الهواء الرطب لضمان تواجد الاوكسجين اثناء التشعيع مع ثبوت الحرارة عند 1±30 درجة مئوية.

### قياس طيف الخضاب

استخدام مطياف UV-visible recording spectrophotometer موديل U/V-160A لقراءة ورسم الطيف الاعتيادي واخذ دوله المشتقة بمدى طول موجي (٥٠٠-٦٥٠ ن م) و (٢٠٠-٦٠٠ ن م) لمدى الجرع الوطنية والعالية على التوالي.

استخدمت الطريقة المباشرة (D.M.) في حساب صافي الكثافة الضوئية عند القمة 414 ن م واستخدمت طريقة الطول الموجي المضاعف (D.W.M.)<sup>(٢٧)</sup> التي اعتمد فيها تغاير القمة 414 ن م نسبة الى القمة 575 ن م لازالة التداخل في الطيف.

تم حساب تركيز MetHb باستخدام طريقة (Simon, 1985) التي تعتمد على المشتقة الاولى للطيف (dA/dλ) نسبة الى قرينها عند تحويل الخضاب كليا الى MetHb باستخدام محلول  $K_3Fe(CN)_6$ <sup>(٢٨)</sup>. كما تم

MetHb% ترتبط مع الجرعة الإشعاعية المعطاة للخضاب من خلال (الشكل ٩)، وتقدر النسبة عند الجرعة ٠,٥ غراي.

(شكل ١٧) بين طيف المشتقة الرابعة للخضاب بمدى (٥٠٠-٦٥٠ ن م) حيث وجد ان التغير في مقلوب قيمة صفائي المشتقة الرابعة بين القمتين 523, 534 ن م للطيف المشتق:  $1/(\Delta d^4A/d\lambda^4)_{534,523}$  يرتبط مع النسبة MetHb% المتكونة نتيجة التشعيع (شكل ١٧) بالمعادلة الآتية:

$$1/(\Delta d^4A/d\lambda^4)_{534,523} = 0.082 \text{ MetHb\%} + 1.96 \quad (٥)$$

ولكون القمة 534 ن م تمثل قمة امتصاص الخضاب الكربوني HbCO الذي يعتبر قرين الخضاب المؤكسج HbO<sub>2</sub> في احتوائه على الحديد بحالة Fe<sup>2+</sup> (١٣) لذا فان المعادلة الاخيرة تؤكد ان تكوين MetHb نتيجة التشعيع يرافق هبوط في نسبة HbCO (١٠) من خلال المشتقة الرابعة للقمة 534 ن م.

كما رافق المشتقة الرابعة ايضا تذبذب طيفي عند القمة 650 ن م:  $(d^4A/d\lambda^4)_{650}$  مع زيادة الجرعة الاشعاعية للخضاب (شكل ٨) حتى يصل الى اقصى نسبة تذبذب طيفي عند النسبة ٦٧% من نسبة تذبذب طيف الميثاموغلوبين وفي مدى الجرعة ٠,٥-١,٠ غراي (شكل ٩). ومن خلال المشتقة الرابعة امكن استخراج النسبة MetHb% بالمعادلة الآتية:

$$\text{MetHb\%} = (0.144 - (d^4A/d\lambda^4)_{650})/0.0027 \quad (٦)$$

ان ارتباط التغير في مشتقات الطيف المرئي للخضاب يمكن اعتماده كطريقة حساسة في ايجاد اثر اشعة كاما على الخضاب بالاضافة الى امكانية اعتماد الخضاب كمجراحي حيائي في دراسات التعرض الاشعاعي للاشعة المؤينة غير المحتسب.

من اولى مشتقات هبوط ٦٨% ، ٣٠% على قيمها عند الجرعة ٠,٥ غراي لكلا الطريقتين (D.M) و (D.W.M) على التوالي.

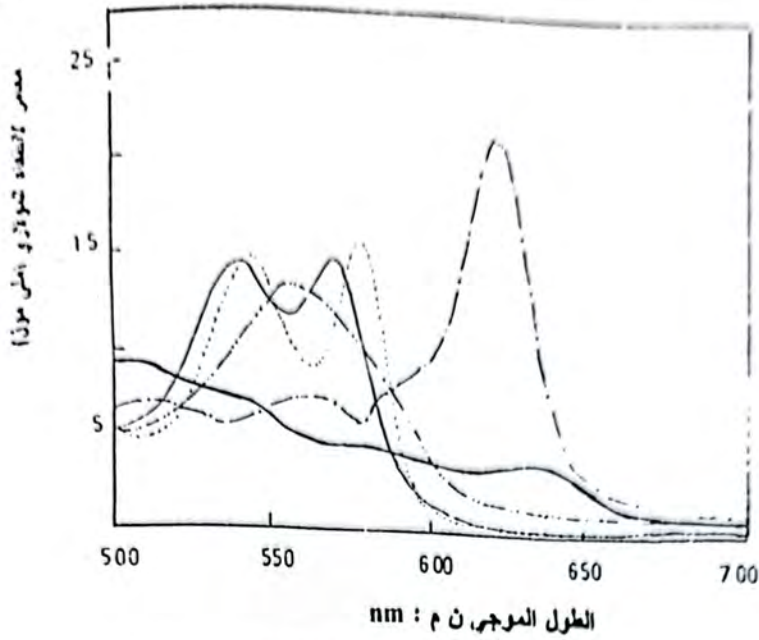
تبين ان الهبوط في  $\Delta(O.D.)_{414}$  عند (D.M) يكون اكثر وضوحا من (D.W.M) لان ذلك لا يمكن اعتاده بسبب الانحراف الاحصائي للقراءات عند الجرعة (٥) كما يؤكد هبوط الكثافة اعلاه قلة تربط مجاميع هيم في الخضاب بعد تكسر روابط (H-H) خاصة من الهبوط فسر من قبل (Grasbeck, 1981) بقلة محتوى مجاميع الهيم الكلي بوحدة (مايكرومول  $\mu\text{M}$ )، معتبرا ان اقصى امتصاصية لـ  $\Delta(O.D.)_{414}$  هي ٠,٩٥. ينال مستوى هيم مقداره ٤,٨ مايكرومول لتستقر بعدها الامتصاصية مع زيادة محتوى الهيم، مما يؤكد ان الهبوط يلاحظ عند 414 ن م في (شكل ٤) كان بسبب قلة محتوى الهيم الكلي في الخضاب نتيجة التشعيع واستقرارية التحول بعد جرعة معينة من التشعيع بحدود ٠,٥-١,٠ غراي.

ويمكن استخراج قيمة الجرعة الامتصاصية لخضاب من خلال  $\Delta(O.D.)_{414}$  باستخدام المعادلتين (٣) و (٤) لكلا من الطريقتين (D.M.) و (D.W.M.) على التوالي.

$$\Delta(O.D.)_{414} = -0.0250 \ln(\text{Dose}) + 0.31 \quad (٣)$$

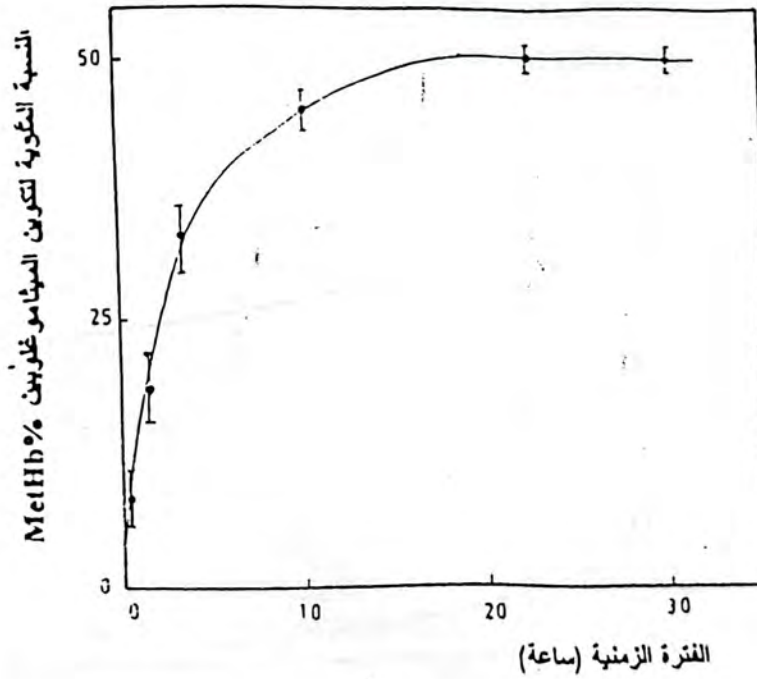
$$\Delta(O.D.)_{414} = -0.0168 \ln(\text{Dose}) + 0.15 \quad (٤)$$

وجد ان صفائي المشتقة الاولى عند القمة 650 ن م  $\Delta(dA/d\lambda)_{650}$  يرتبط مع زيادة الجرعة الاشعاعية لخضاب لغاية الجرعة ١٠ غراي (شكل ٥) مع حصول حلة الاستقرار بعد الجرعة ٠,٥ غراي، وهنا يمثل تكوين MetHb نتيجة التشعيع من خلال زيادة صفائي لمشتقة الاولى  $\Delta(dA/d\lambda)_{650}$ ، علما بان استدام المشتقة الاولى تم من قبل (Simon, 1985) في قياس MetHb% كما ان نسبة ايونات الحديد الى الحديدوز ( $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ ) المتكونة نتيجة التشعيع بعد تكوين

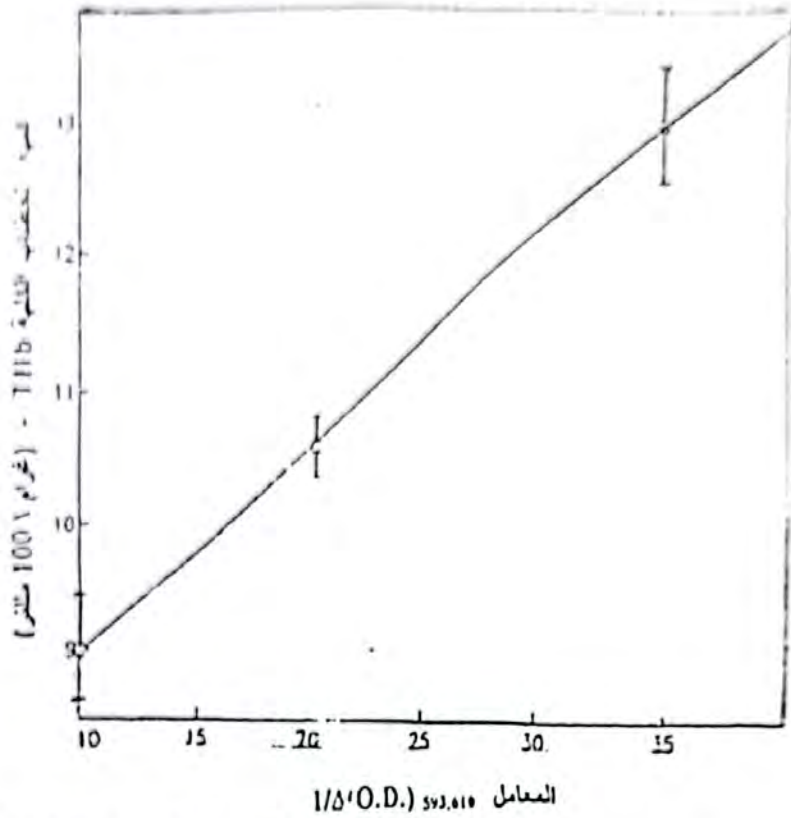


- Hb- الخضاب المعتزل
- ..... HbO<sub>2</sub>- الخضاب المؤكسج
- HbCO- الخضاب الكاربوني
- MetHb- الميثاموغلوبين
- · — · — SulHb- السلفوموغلوبين

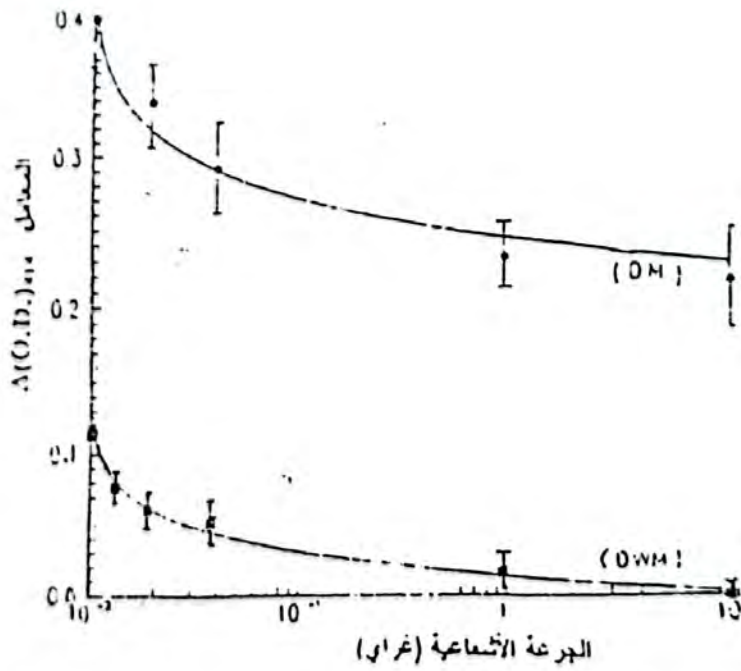
(شكل 1) طيف انواع الخضاب وتداخلها ضمن المدى (500-700 ن م).



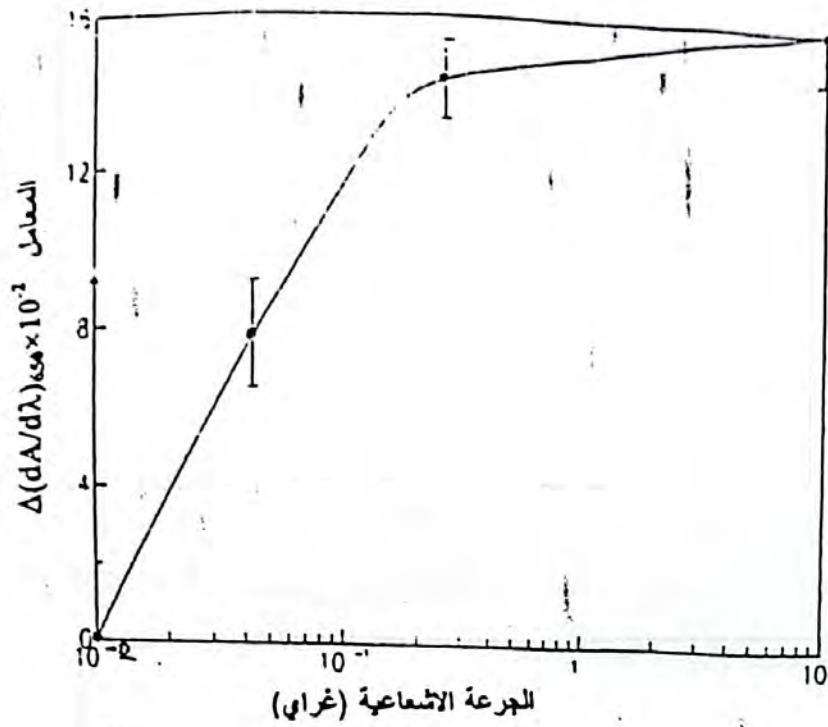
(شكل 2) العلاقة بين النسبة المئوية لتكوين الميثاموغلوبين % MetHb والفترة الزمنية المارة على تحضير الخضاب.



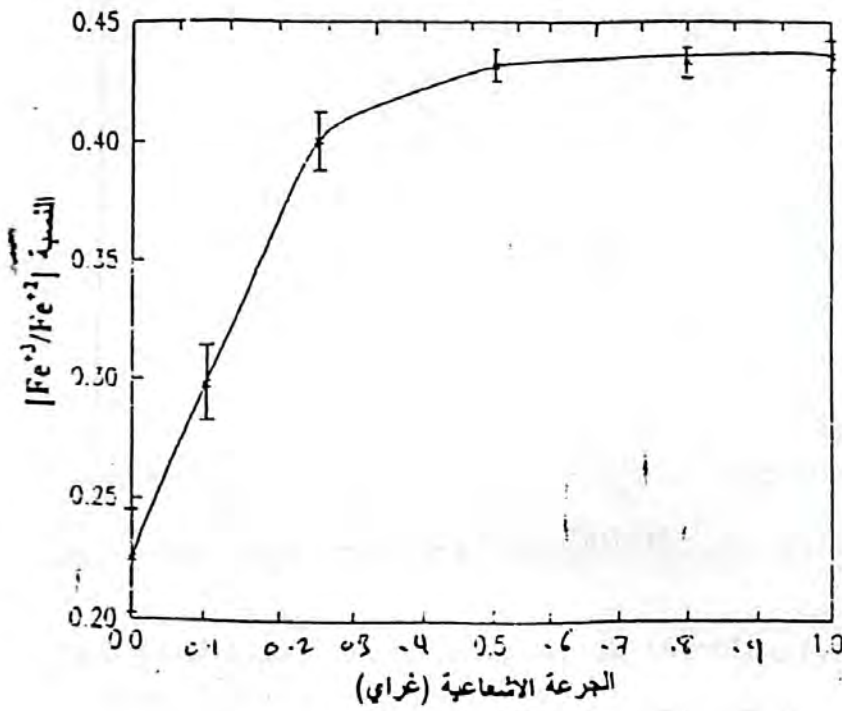
(شكل - 3) علاقة كمية الخضاب الكلية THb (غرام 100 ملتر) مع مقلوب صافي الكثافة الضوئية عند القمتين 593 ، 610 ن م  $(1/\Delta(O.D.)_{593,610})$  للطيف الاعتيادي للخضاب.



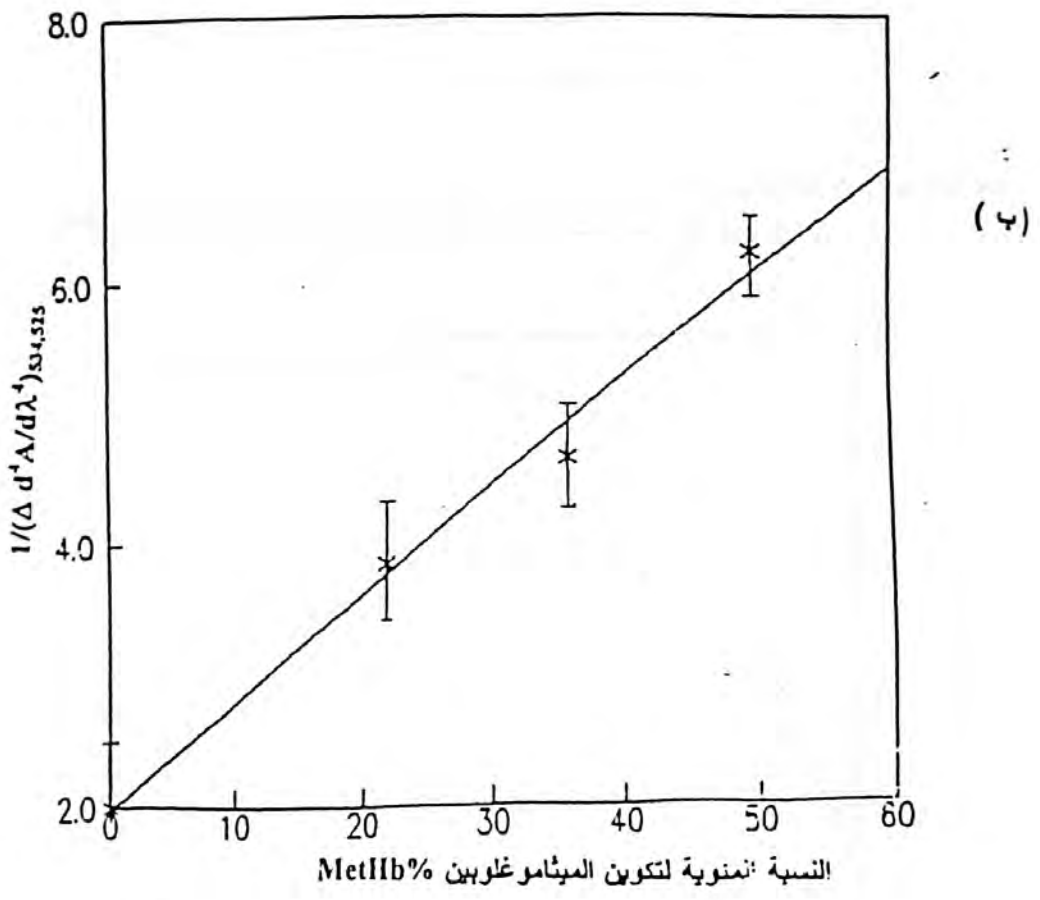
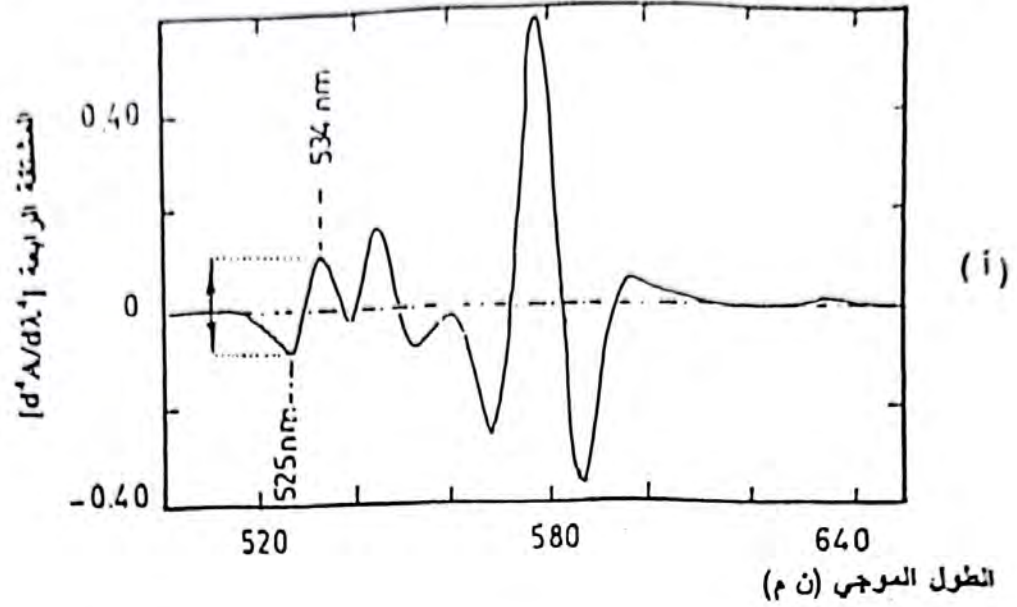
(شكل - 4) علاقة صافي الكثافة الضوئية عند القمة 414 ن م  $\Delta(O.D.)_{414}$  المستخرج بطريقة المباشرة (DM1) وطريقة الطول الموجي المضاعف (DM2) مع الجرعة الإشعاعية (غراي) المعطاة للخضاب



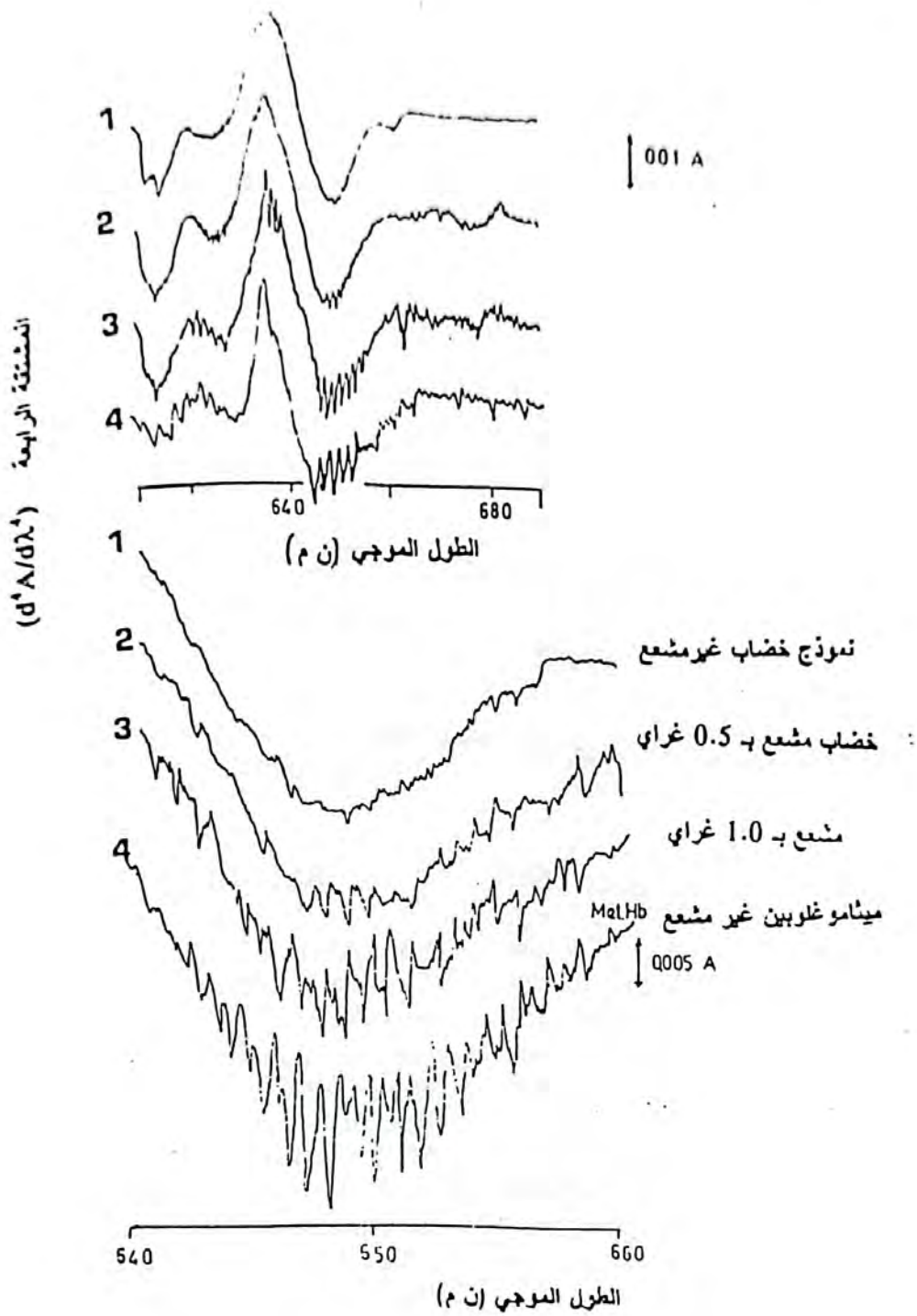
(شكل- 5) العلاقة بين صالبي المشتقة الأولى لطيف الخضاب عند القمة 650 ن م  $|(dA/d\lambda)|_{650}$  والجرعة الإشعاعية (غراي) المعطاة للخضاب لغاية 10 غراي



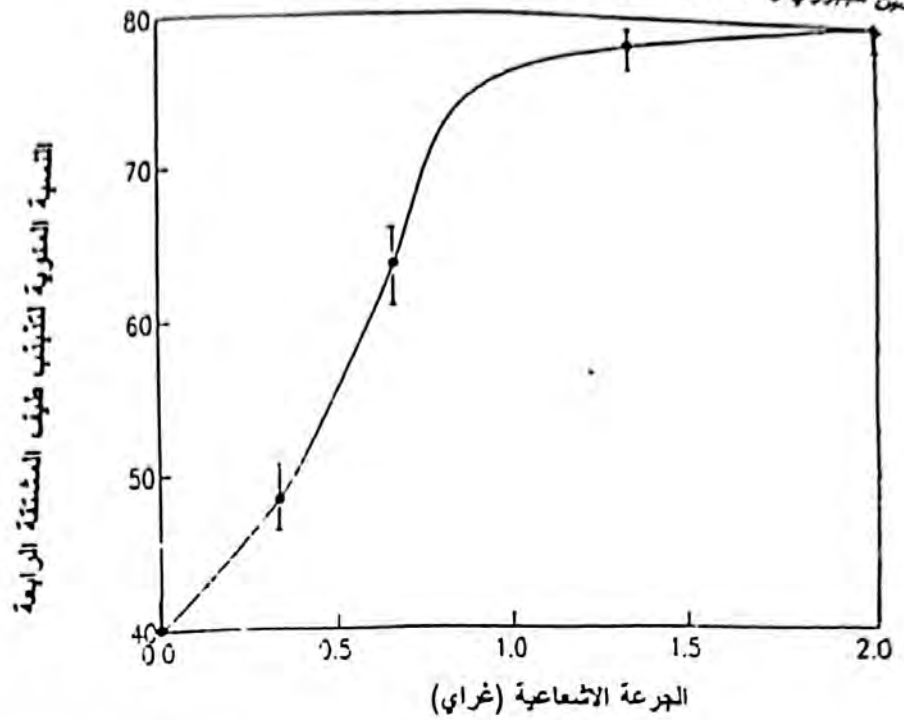
(شكل- 6) نسبة تكون أيونات الحديدك الى الحديدوز  $[Fe^{+3}/Fe^{+2}]$  في الخضاب مع الجرعة الإشعاعية المعطاة للخضاب لغاية الجرعة 1.0 (غراي) .



7- أ: طيف المشتقة الرابعة ( $d^4A/d\lambda^4$ ) للخصاب بمدى طيفي 500-650 ن م يلاحظ القمتين 525, 534 ن م التي أخذت بالاعتبار.  
 ب: العلاقة بين مقلوب صافي المشتقة الرابعة عند القمتين 525 ، 534 ن م  $|1/(\Delta d^4A/d\lambda^4)_{525,534}|$  والنسبة المئوية لتكوين الميثاموغلوبين MetHb% نتيجة التوسع .



(شكل - 8) تنهذب طيف المشتقة الرابعة (d<sup>4</sup>A/dλ<sup>4</sup>) مع الجرعة الأشعاعية للخضاب .



(شكل - 9) تغير النسبة المئوية للمنتج المشتمل على طيف المشتقة الرابعة مع الجرعة الاشعاعية المعطاة للغضاب لغاية الجرعة 2.0 غراي .

- analysis of hemoglobin mixtures, Anal. Biochem. 55: 245-248 (1973).
6. Dodova, G.S. Mishurov, E.A. and Khairullina, A.Ya. Millimolar absorption-parameter spectra of whole-blood methemoglobins in the wavelength range 660-1000 nm, Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii 44(3): 446-449 (1986).
  7. Zwart, A., Busursma, A., Kampen E.J.U. and Zijlstra, W.G. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics spectrophotometer, Clin. Chem. 30(3): 373-379 (1984).
  8. Zijlstra, W.G., Bunrsma, A. and Zwart, A. Perormance of an antomated six wavelength photometer (Radiometer OSM3) fro routine measurement of hemoglobin derivatives, Clin. Chem. 34(1): 149-152 (1988).
  9. Haver, T.C.O. Potential clinical application of derivative and wavelength-modelation spectroscopy, Clin. Chem. 25/9: 1548-1553 (1978).
  10. Simon, J.R.H. and Benuett, J. The determination of methemoglobin levels by

## REFERENCES

1. Brown, L.J. A new instrument for the simultaneous measurement of total hemoglobin, % oxyhemoglobin, % carboxyhemoglobin, % methemoglobin, and oxygen content in whole blood, IEEE transaction on biomedical engineering Vol. 27(3): 132 (1980).
2. Zwart, A. Analysis of hemoglobin and its derivatives in clinical laboratory. Spectra 2000 (111 supp.) 39-43 (1986).
3. Zwart, A. Results of routine determination of clinically significant hemoglobin derivatives by multicomponent analysis, Clin. Chem. 32(6): 972-978 (1986).
4. Ramieri, A. Jatlow, Jr. P. and Seligson, D. New method for rapid determination of carboxyhemoglobin by use of double-wavelength spectrophotometry, Clin. Chem. 20(2): 278-281 (1974).
5. Benesch, R.E., Benesch, R. and Yung, S. Equation for the spectrophotometric

- human hemoglobin, I-Spectral characterization of irradiated deoxyhemoglobin, *Radiat. Environ. Biophys* 28(1): 39-46 (1989).
18. Zdravko, B.I. and Panasyak, E.N. Special investigation of hemoglobin in the dynamics of acute radiation sickness, *ZPSBA* 45 (6): 971-975 (1986).
19. Zdravko, B.I. and Panasyak, E.N. Special investigation of hemoglobin in the course of acute radiation sickness *J. Appl. Spectrosc.* 45(6): 971-975 (1986)
20. Abd-El Baset, M.S. Effect of ultraviolet irradiation on the stabilization of oxyhemoglobin, *Photobiochem. Photobiophys.* 11: 209-215 (1986).
21. Grasbeck, R. Majuri, R. Koavonen, I. and Tenhunen, R. Spectral and other studies on the intestinal heme receptor of the pig, *Biochimica Biophysica Acta* 700: 137-142 (1981).
22. Spinks, J.W.T. and Wood, J.J. An introduction to radiation chemistry, P: 93-102, New York (1976).
23. Anderson, O.S., Pederson, B.N. and Rem, J. *Clinica. Chem. Acta*, 42:85-100 (1972).
24. Sato, K., Katsmata, Y. Aoki, M. Oya, M. and Yada, S. *Forensic Sci. Int.* 17(2): 177-184 (1981).
25. Tietz, N.W. Biochemical aspects of hematology in "Text book of clinical chemistry" P: 64-65, 153-154 (1986).
- first-derivative spectroscopy, *Clintea. Chimica Acta* 153: 253-257 (1985).
11. Taulier, A., Levillain, P. and Lemonnier, A. Determining methamoglobin in blood by zero-crossing point first-derivative spectrophotometry *Clin. Chem.* 33(10): 1770-1767 (1987).
12. Sanderink, G. Jan, C.M., Van-Rijn, H. Quantitative measurement of plasma hemoglobin by second derivative spectrophotometry, *J.M. Clin. Chim. Acta.* 146(1): 65-74 (1985).
13. Parks, J. and Worth, G.J. Carboxyhemoglobin determination by second derivative spectroscopy, *Clin. Chem.* 31/2; 279-281 (1985).
14. Kip-Amazon, M.D., Soloni, F., Arkadi, M., and Rywlin, M.D. Separation of bilirubin from hemoglobin by recording derivative spectrophotometry, *Amer. Soc. Clini. Patho.* 75: 519-523 (1981).
15. Levillain, P. and Fompeydie, D. Determination of Equilibrium constants by derivative spectrophotometry, Application to the PKaS of Eosin *Anal. Chem.* 27: 2561-2563 (1985).
16. Marinh, H.M. Plasmatic hemoglobin assay as a biological indicator for low-level radiation, *Arq. Biol. Tecnol.* 26(2): 301 (1983).
17. Lewand, Z.S., Puchala, M., Osmulsk, P.A. Radiation-induced changes of structural and functional properties of

تأثير اشعة كاما على خصائص تيار-فولتية لوصلة السيليكون  $P^+n n^+$ 

مثنى محمد محمود

قسم الفيزياء ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية

(استلم بتاريخ ١٩٩٧/٣/٢٩، قبل للنشر بتاريخ ١٩٩٨/١١/٤)

## ABSTRACT

The effects of  $\gamma$ -rays on the parameters of current-voltage for silicon  $pnn^+$  diodes were studied in the present work.  $Co^{60}$  was used for the irradiation of silicon diodes on p-side at room temperature and at different fluences (500, 1000 and 1500 rad). A comparison has been done between the values of saturation current ( $I_s$ ), ideality factor ( $\eta$ ) and ohmic contact for reverse current ( $R_r$ ) and for forward current ( $R_f$ ) before and after irradiation the irradiation by  $\gamma$  do not effect on the barrier potential ( $V_b \approx 0.89$  volts). The present work is one of the application in the semiconductor detectors.

## الخلاصة

وصلة السيليكون نوع  $P^+n n^+$  استخدمت في هذا البحث لدراسة تأثير اشعة كاما على معاملات قياس التيار-الفولتية، حيث انها شععت باشعة كاما من عنصر كوبلت -٦٠ من جهة  $P^+$  وبدرجة حرارة الغرفة بجرع مختلفة هي ٥٠٠، ١٠٠٠، ١٥٠٠ rad وتم مقارنة تيار الاشباع  $I_r$ ، معامل التصحيح  $\eta$  ومقاومة التماس للتيار العكسي  $R_r$  وللتيار الامامي  $R_f$  قبل وبعد التشعيع. لقد تبين ان قيمة حاجز الجهد ٠.٨٩ فولت ولا تتاثر باشعة كاما. ويعتبر هذا البحث هو احدى التطبيقات لعدادات اشباه الموصلات. درس الباحثان جوانك و سو (١٩٨٩) الخصائص الالكترونية لتماس  $Al/n-Gasb$  وتم ايجاد معامل المثالية ( $\eta$ ) بدرجة حرارة الغرفة (٣٠٠K) وبدرجة (٧٧K)<sup>(١)</sup>.

## المقدمة

الفجوات، لذا تكون المنطقة المتاخمة للحد الفاصل للمفوق منطقة خالية من الشحنات وتدعى طبقة الاستنزاف (Depletion Layer) او منطقة شحنة الحيز (Space Charge Region)<sup>(٢)</sup>.

## خصائص التيار - الفولتية للمفوق p-n

ان نشوء طبقة الاستنزاف يرافقه ظهور حاجز الجهد  $V_{bo}$  الذي يعيق انتشار الحاملات الالكترونية وصولا الى حالة التوازن الحركي للمفوق p-n حيث يكون التيار المار خلال المفوق مساويا الى الصفر وذلك لكون حاجز الجهد سيأخذ دائما تلك القيمة التي تكفي

ان التركيب الشائع في اشباه الموصلات هو مفوق pn والذي يتكون من طبقة انتقالية بين منطقتين ذات نوعيتي توصيل متعاكسة. فاضافة الشوائب بصنفيها المانح والقابل على جانبي البلورة اثناء عملية التصنيع لتثاني المفوق سيؤدي الى حدوث حالة انحدار في تركيز الناقلات الاكثريه للشحنة في كلا النوعين وعليه ستحدث عملية الانتشار (Diffusion) مكونة طبقة في مفوق p-n متكونة من ازواج الايون السالب والايون الموجب والنتيجة من حركة الالكترونات واقتناصها من قبل

### الانحياز الامامي للمفروق

عندما تكون الفولتية المسلطة موجبة ( $V > 0$ ) فانها تعمل على تقليل حاجز الجهد عبر المفروق كما هو موضح في الشكل (1) حيث تعمل على دفع او حفر Injection الفجوات من المنطقة p الى n وكذلك الالكترونات من منطقة (n) الى منطقة (p)<sup>(4)</sup>، وعليه ينمو تيار الانتشار اما تيار الانجراف فانه يتغير تقريبا لانه يمثل تيار الاقلية الناشئ من الالمكترونات في (p) والفجوات في (n) فلا يتاثر بالفولتية لذا معادلة (1) تصبح:

$$I_f = I_o [\exp (qV/\eta KT) - 1] \quad (3)$$

حيث  $\eta$  تمثل معامل المثالية (Ideality Factor) وهي قيمة تجريبية تعمل على تصحيح حالة اللاتوافق بين الجزء النظري والعملي لفولتية انحياز امامي عند ( $V > 0$ )<sup>(5)</sup>، وفي معظم الحالات يكون  $qV/KT \gg 1$  لذا معادلة (3) تصبح:

$$I_f = I_o \exp (qV/\eta KT) \quad (4)$$

ان اهم عاملين يؤثران في معادلة التيار الامامي هما

### (i) تيار الاشباع (Saturation Current)

يتم تحديد تيار الاشباع العكسي على معادلة الانبعاث الايوني الحراري Thermionic Emission وعلى النحو التالي<sup>(6)</sup>:

$$I_o = aA * T^2 \exp (-qV_{bo}/KT) \quad (5)$$

حيث ان (a) تمثل مساحة الشائني،  $A^*$  يمثل ثابت ريتشارسون

ان تيار الاشباع لايعتمد كلياً على الفولتية<sup>(7)</sup> وانما يعتمد على درجة الحرارة، ثابت ريتشارسون الفعال  $A^*$  يتم ايجاده من العلاقة التالية<sup>(8)</sup>:

$$A^*/A = m^*/m_o \quad (6)$$

حيث ان (Barber)<sup>(10)</sup>  $m^*/m_o = 2.2$

المقدار (A) فهو ثابت ريتشارسون للالكترونات الحرة وهو بقيمة  $120A/(cm^2.k^2)$  للسيليكون.

$m^*$  تمثل الكتلة الفعالة،  $m_o$  تمثل كتلة الالكترونات الحرة

التعامل بين تيار الانحراف والانتشار حيث يتساويان بالمقدار ويتعاكسان بالاتجاه<sup>(9)</sup>، لذا ففي حالة تسليط جهد خارجي عبر المفروق p-n يؤدي الى تخلخل حالة التوازن الدقيق لكل من تيار الانتشار وتيار الانجراف للالكترونات والفجوات<sup>(2)</sup>.

ان هذا الجهد الخارجي يكون اما مشابهاً لحاجز الجهد {Vbo} فيسمى انحياز عكسي،  $V_f$  (Reverse Bias) ويسمى انحياز امامي (Forward Bias) لذا يتم دراسة المفروق السليكوني تحت تأثير هذين النوعين من الانحياز لتحديد خصائص التيار والفولتية حيث يعزى سريان التيار الامامي لهذا المفروق من انتشار الناقلات الاقلية خارج منطقة الاستنزاف وكذلك الى اعادة الانتعاش Recombination للناقلات في منطقة الاستنزاف بينما يكون سريان التيار العكسي لنفس المفروق ناشئ على الاغلب من توليد Generation الناقلات في منطقة شحن الحيز<sup>(4)</sup>.

ان الاشتقاق النظري لخصائص التيار - الفولتية من مفروق p-n يعطى بالصيغة التالية<sup>(5)</sup>:

$$I = I_o [\exp (qV/K.T) - 1] \quad (1)$$

حيث ان I: التيار المار بالشائني،  $I_o$ : تيار الاشباع  
V: الفولتية المسلطة حسب نوع الانحياز  
q = شحنة الالكترونون = K = ثابت بولتزمان

### الانحياز العكسي للمفروق

عند تسليط فولتية عكسية ( $V < 0$ ) فان الفولتية المسلطة تزيد من حاجز الجهد عبر منطقة الاستنزاف كما يوضحها الشكل (1) مما يؤدي الى تقليل الناقلات الاكثرية في الاتجاهين ولذلك يتناقص التيار الانتشاري الناشئ عنها، وبما ان فرق الجهد لا يؤثر على تيار الانجراف وهو تيار الاقلية الناشئ من انتقال الالكترونات من n الى p والفجوات من (n) الى (p) لذا فان التيار المار خلال المفروق هو تيار الاقلية تيار الانجراف<sup>(1)</sup> فلكون فولتية الانحياز المسلطة ( $V < 0$ ) فان تيار الاشباع  $I_o$  يكون سالب<sup>(2)</sup> فان معادلة (1) تصبح

$$I_r = I_o [1 - \exp (-qV/KT) - 1] \quad (2)$$

تم تشيع العينات من مصدر الكوبلت  $Co^{60}$  على حجم  $P^+$  وبجرعة انسيابية  $55 rad/min$  وبدرجة حرارة الغرفة وفق الترتيب التالي:

الجرعة (بالراد)	٠	٥٠٠	١٠٠٠	١٥٠٠
رقم العينة	١	٢	٣	٤

قياسات التيار-الفولتية تمت باستعمال 619 Keithly من شركة Electronmeter/ Multimeter استخدمت مقاومة  $R=1.2k\Omega$  مع مراعاة حالة الزيادة المتمثلة بجهد الانكسار Breakdown Voltage حيث يزداد التيار عنده ويزداد تبعاً له مما يؤدي الى تلف العينة.

### النتائج العملية والمناقشة

تم تحليل قياسات التيار - الفولتية للعينات المشعة باشعة كما باستعمال الحاسوب بلغة الفورتران وطريقة التقريب العدد المصغر (Least Square Method (L.S.M.)) لحساب المعاملات كتيار الاشباع  $I_0$ ، معامل التصحيح  $\eta$  وارتفاع حاجز الجهد  $V_b$  باعتماد المعادلات (٢)، (٤) تستقر قيم ارتفاع حاجز الجهد  $V_{b0}$  عند قيمة ثابتة تقريباً لكل العينات قبل وبعد التشيع حيث كانت بمعدل  $0.89 \pm 0.004$ .

جدول (١) يبين مقدار تغير تيار التشيع  $I_0$  ومقاومة التماس للتيار العكسي ( $R_r$ ) لعينات السليكون قبل وبعد التشيع باشعة كما بجرع مختلفة، حيث نلاحظ ان تيار التشيع  $I_0$  يزداد بعد اول تشيع بمقدار  $4.07\%$  ومن ثم يستمر تيار التشيع بالازدياد مع زيادة جرعة التشيع ولكن بنسبة اقل، بينما مقاومة التماس للتيار الامامي ( $R_f$ ) يكون تصرفها بالشكل المعاكس أي انها تقل بزيادة الفولتية الامامية على عينات السليكون قبل وبعد التشيع يوضحها الجدول (٢)، حيث انه يوضح مقدار تغير معامل التصحيح  $\eta$  ومقاومة التماس للتيار الامامي ( $R_f$ ) مع جرعة التشيع.

### (ii) المعامل المثالي (Ideality Factor $\eta$ )

يمثل معامل المثالية او التصحيح حالة خاصة بالاشيائ الامامي ويعطى بالمعادلة (٤)، ان  $\eta$  هي صيغة تجريبية بدون وحدات وتعتمد على عملية التوالد واعادة الاتحام في منطقة الاستنزاف وتأخذ القيم التالية<sup>(١)</sup>:

عندما يكون تيار الاتحام هو التيار السائد  $2=\eta$ ، وعندما يكون تيار الانتشار هو السائد فان  $1=\eta$  بينما عندما يتساوى التياران فان  $1<\eta<2$ .

ومن المعاملات التي يمكن استنتاجها من قياس تيار - الفولتية هي مقاومة التماس (Ohmic Contact,  $R_c$ ) للتيار العكسي والامامي حيث ان:

$$R_c = \partial V / \partial I | V=0$$

من المعادلتين ٢ و ٤ نحصل على

$$R_f = \eta (KT/qI_0)$$

$$\therefore R_f = \eta R_r$$

(7)

حيث ان  $R_f$ ،  $R_r$  هما مقاومة التماس للتياران الامامي والعكسي<sup>(٢)</sup>.

تم حساب معاملات التيار - الفولتية  $R_f$ ،  $V_0$ ،  $I_0$ ،  $\eta$  وكذلك لعينات السليكون نوع  $n^+p$  قبل تشيع وبعد تشيعها باشعة كما بدرجة حرارة الغرفة بجرع مختلفة.

### التقنية العلمية

لقد جهزت العينات المستخدمة من قبل شركة ماركوني في المملكة المتحدة Marconoi Electronic Devices Ltd., U.K. تم تصنيع الثنائيات Pnn من سيليكون نوع (n) ذو مقاومة  $35\Omega.cm$  وباستخدام طريقة Float Zone Silicon حيث صنعت عن طريق الانتشار العميق على جانبي الكاليوم، فالفسفور سوف يدفع الى الجانب الاول والبورون نحو الجانب الثاني كما هو موضح في الشكل (٢). شكل العينة تكون ذات سطح سداسي وقياس ثابت لجانبه  $2mm$  وبسمك  $220\mu m$  ومساحة  $6.3mm^2$ ، وان عمق الوصلة  $n^+p$  هو  $6.4\mu m$ ، ثم غسل العينات بمادة الاسيتون المخفف بالماء قبل اجراء القياسات.

( ومقاومة  $\eta_1$  جدول ٢: يبين القيم العددية لمعامل التصحيح  
لثنائيات السيليكون ذات الانحياز (Rf) التماس الامامية  
الامامي قبل وبعد التشعيع

جرعة التشعيع (RAD)	معامل التصحيح ( $\eta_1$ )	مقاومة التماس الامامية	معامل التصحيح ( $\eta_2$ )	مقاومة التماس الامامية
0	1.90± 0.07	65.72	---	---
500	2.198 ± 0.01	37.69	2.27± 0.01	38.97
1000	2.306 ±0.006	34.4	2.10± 0.02	31.42
1500	2.415 ±0.005	30.49	---	---

### المصادر

Sze, S.M., Physics f Semiconductors  
Devices, 2nd. edition, Awiley-Interscience  
Publication (1981).

٢. صبحي سعيد الراوي، فيزياء الالكترونات، ووزارة  
التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة الموصل  
(١٩٨٧).

٣. أس. أم. زي. تباطؤ اشباه الموصلات، فيزياء وتقنية  
ترجمة فهد غالب حياني- وحسين علي احمد- ووزارة  
التعليم العالي والبحث العلمي. (١٩٩٠).

١. Bakanowski, A.E., and Foster, J.H., The  
Beli System Tech., J., January P. 87  
(1960).

٥. Anderson, R.L., Solid-State electronics 5;  
P. 341 on (electrons structure of  
semiconductor hetrojunction pergamon  
press) (1962).

٦. وكاع فرمان الجبوري وفهد غالب حياني، الخواص  
الكهربائية والمغناطيسية للمواد، وزارة التعليم العلمي  
والبحث العلمي/ جامعة الموصل. (١٩٨٥).

٧. Smith, R.A., Semiconductors, 2nd  
Edition, Cambridge University Press.  
(1978).

٨. Many A.Y., Gldstein and N.B. Grver,  
Semiconductor Surface North - Holland  
Publishing Company-Amsterdm (1965).

فيامتمعال طريقة التربيع الصغرى (L.S.M.)  
ومعادلة (٤) تم حساب معامل التصحيح ومقاومة التماس  
الامامي للتيار الامامي (Rf) قبل وبعد التشعيع لعينات  
السيليكون، ونلاحظ من قيم معامل التصحيح ان تيار  
الانتشار هو المساند لهذه العينات وان قيم معامل التصحيح  
تعتمد على قيم الفولتية الامامية المسلطة على العينة حيث  
ان ( $\eta_1$ ) تزداد بزيادة جرعة التشعيع بينما ( $\eta_2$ ) تقل  
بزيادة جرعة التشعيع، معامل التصحيح يحتاج لمزيد من  
البحث والدراسة بان يتم التشعيع بطاقات مختلفة وذلك  
لملاحظة تغير معامل الامتصاص لعينات السيليكون كذلك  
ان تتم دراسة العينات المشعة على جهد ( $n^+$ ) او  
تشييعها على الجهتين ( $P^+$  او  $n^+$ ).

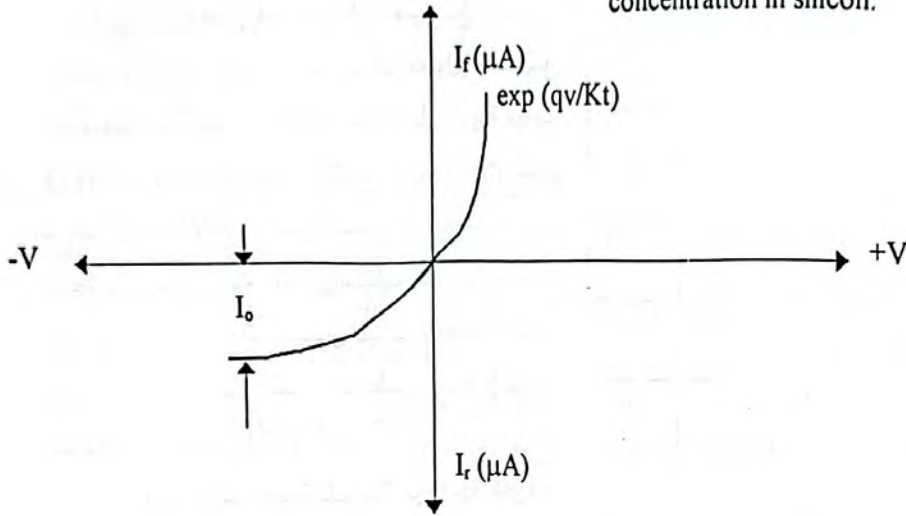
ومن العوامل المهمة بالدراسة هو درجة الحرارة  
حيث انه من الممكن دراسة هذه المعاملات للتيار -  
الفولتية للعينات المشعة بدرجة النيتروجين السائل (77k)  
ومقارنتها بدرجة حرارة الغرفة.

جدول ١: يبين القيم العددية لتيار التشعيع ( $I_0$ ) والمقاومة  
العكسية ( $R_r$ ) لثنائيات السيليكون ذات الانحياز العكسي  
قبل وبعد التشعيع

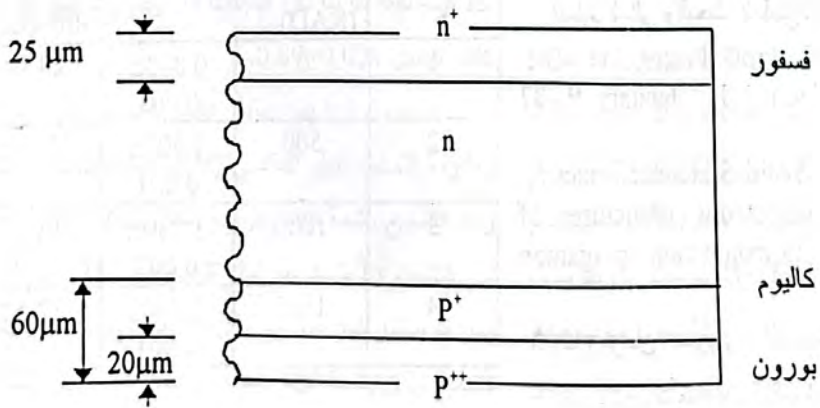
رقم العينة	جرعة التشعيع (RAD)	تيار الاشباع $I_0$ (nA)	مقاومة التماس $R_r$ (Mohm)
1	0	0.893± 0.001	28.94
2	500	1.508± 0.001	17.145
3	1000	1.730± 0.002	14.93
4	1500	2.040± 0.001	12.62

9. Rhoderick E.H. and R.H. Williams, Metal - Semiconductor (1978).

10. Barber H.D., Solid-State electronic 10, 1039 (1967). Effective mass and intrinsic concentration in silicon.



شكل ١: مخطط خصائص التيار الفولتية للانحياز الامامي والعكسي



شكل ٢: تركيب ثنائيات السيليكون

## دراسة نظرية لمستويات الطاقة ونسبها لنظير Se - 70 باستخدام نموذج (IBM - 1)

خالد سلمان ابراهيم ، ايمان طارق العلوي ، انعام حاتم خضير

قسم الفيزياء / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

(استلم بتاريخ ١٥/١٠/١٩٩٨ وقبل للنشر في ٢٤/١/١٩٩٩)

## ABSTRACT

The interacting boson model (IBM-1) was used in the present work to investigate the theoretical values to the energy levels and their ratios for the isotope  $^{70}\text{Se}_{36}$ . A comparison between our results and experiment results has been made and indicated very good agreement.

## الخلاصة

نموذج البوزونات المتفاعلة الأول (IBM-1) استخدم في البحث لايجاد القيم النظرية لمستويات الطاقة ونسبها

لنظير السيلينيوم  $^{70}\text{Se}_{36}$  لقد تمت مقارنة نتائجنا مع النتائج العملية المتوفرة لدينا فكانت بحالة توافق جيد جداً.

## المقدمة

وتسمى (d-bosons). وجاءت تسميته IBM نتيجة

لجسيمات بوز المتفاعلة والناجمة من ازدواج جسيمات فيرمي (Fermi particles) كما وان هذا النموذج له اربعة اشكال هي :

(IBM - 1,2,3,&4) والذي يعني في بحثنا هذا هو الأول (IBM-1) فقط. (7,6,4)

## الجزء النظري

ان نموذج (IBM) (4,3) يعطي وصفا لخصائص النوى الثقيلة والمتوسطة الكتل الزوجية - زوجية (Heavy and Medium even - even nuclei) ذات مستويات الطاقة الواطئة (Low lying states) والتي تشغل البوزونات فيها مستويين فقط حسب افتراضات هنا النموذج المستوي الاول هو مستوي الحالة الارضية (s-boson) والذي يعرف بالبوزون أحادي القطب

إن دراسة الحركة الدائمة والمعقدة لنيوكلونات (Neucleons) داخل النواة نالت اهتمام الكثير من الباحثين في مجال التركيب النووي (3,2,1) وذلك باستخدام نماذج نووية مختلفة (5,4) وجميعها لم تتوصل الى تقديم دراسة متكاملة للتركيب النووي وفي عام 1974 اقترح Arima & Iachello نموذجاً جديداً وهو نموذج البوزونات المتفاعلة (IBM) حيث انه يفسر بعض الصفات النووية التي لم تستطع النماذج السابقة تفسيرها وبموجب هذا النموذج تعامل النيوكلونات الواقعة خارج القشرة المغلقة (Closed shell) وكأنها أزواج من البروتونات او النيوترونات او البروتونات والنيوترونات وهذه الأزواج سميت بالبوزونات (bosons) (4,3).

إن هذه البوزونات تكون على نوعين اما بوزونات من نوع s وتسمى (s-bosons) أو من نوع d

$\hat{Q}$  = يمثل مؤثر عزم رباعي القطب (Quadrupole Operator)  
 $\hat{L}$  = يمثل مؤثر الزخم الزاوي (Angular momentum Operator)  
 $\hat{T}_3$  = يمثل مؤثر ثماني القطب (Octupole Operator)  
 $\hat{T}_4$  = يمثل مؤثر سداسي القطب (Hexadecapole Operator).

### النتائج والمناقشة

خلال دراستنا النظرية هذه تم التعرف على بعض الخصائص النووية للنظير Se - 70 باستخدام نموذج (IBM-1) حيث تم حساب مستويات الطاقة لهذا النظير بالاعتماد على دالة مؤثر هاملتون معادلة (2) ضمن برنامج حسابي يدعى (IBM-1) يحتوي على العديد من البرمجيات الفرعية يمكن من خلالها الحصول على القيم الذاتية (Eigen Values) والمتجهات الذاتية (Eigen Vectors) للمستويات ذات التماثل الموجب (Positive Parity) وذلك بعمل (Diagonalization) لدالة مؤثر هاملتون الخاصة ببرنامج (IBSI.for) تشير نتائجنا الى ان الاطياف التي يتصف بها هذا النظير تظهر بين اكثر من غاية معينة. يبين الجدول (1) قيم معاملات دالة مؤثر هاملتون التي تم الحصول عليها لهذا النظير. يبين الجدول (2) مقارنة مستويات الطاقة وانتقالاتها (pw) مع القيم العملية المتوفرة ويظهر ان هناك توافقا جيدا بينهما.

يبين الشكل (1) مستويات الطاقة التي حصلنا عليها (pw) مقارنة مع مستويات الطاقة العملية كما مؤثر ازاء كل منها. حيث تبين ان هناك توافق جيد في سلوكية اغلبها مع القيم العملية ويعزى الاختلاف الضئيل الذي يظهر في الشكل الى نسب الخطأ في القياسات العملية.

الجدول (3) يبين قيم نسب الطاقات المثالية<sup>(17,14)</sup> لكل غاية (Limit) استخدمت في معرفة تصرف هذا النظير والى أي تحديد منها ينتمي.

(monopole boson) زخمه الزاوي المداري  $L = 0$  والمستوي الثاني هو مستوى الحالة المتهيجة (d-boson) والذي يعرف بالبوزون رباعي القطب (quadrupole bosons) وزخمه الزاوي المداري  $L = 2$ . وباستخدام ستة درجات من الحرية (degrees of freedom) يمكن تمثيلها بدلالة مؤثرات لفاء والتوليد (annihilation & creation operators) كما انه يأخذ بنظر الاعتبار الزمر الوحدوية (Unitary group) في موضوع التركيب النووي. ان المفهوم الفيزيائي<sup>(12,11,4)</sup> الذي اعتمد عليه (IBM-1) هو عدم التمييز بين بوزونات البروتونات ( $N_\pi$ ) وبوزونات النيوترونات ( $N_\nu$ ) لذلك يكون التعامل مع العدد الكلي للبوزونات ( $N = N_\pi + N_\nu$ ) حيث انه تحسب لأقرب قشرة مغلقة<sup>(15,14,13)</sup>. ان دالة مؤثر هاملتون (Hamiltonian Operator) وفق نموذج (IBM-1) تكتب بالصيغة التالية<sup>(17,4)</sup>:

$$H^0 = \sum_{i=1}^N \epsilon_i + \sum_{i<j}^N V_{ij} \quad (1)$$

حيث أن

$$\epsilon_i = \text{طاقة البوزون المنفرد}$$

$$V_{ij} = \text{طاقة تفاعل بوزون - بوزون}$$

$$N = \text{العدد الكلي للبوزونات}$$

تحتوي معادلة (1) على حدين الاول يمثل طاقة الجسيم المنفرد اما الحد الثاني فيمثل طاقة تفاعل جسامين (two-body Interaction)

هناك صيغة اخرى لمؤثر دالة هاملتون<sup>(17,14)</sup> هي :

$$\hat{H} = \epsilon_d \hat{n}_d + a_1 \hat{P} \cdot \hat{P} + a_2 \hat{L} \cdot \hat{L} + a_3 \hat{Q} \cdot \hat{Q} + a_4 \hat{T}_3 \cdot \hat{T}_3 + a_5 \hat{T}_4 \cdot \hat{T}_4 \quad (2)$$

حيث ان :

$$\epsilon_d = \text{يمث طاقات البوزون المنفرد من نوع (d-boson)}$$

$$\hat{P} = \text{يمثل مؤثر الأزواج (Pairing Operator)}$$

يوضح الشكل (2) ان القيم النظرية والعملية للنظير (Se-70) متوافقة بشكل جيد جداً من حيث قيمة نسبها الطاقة  $E(4_1^+)/E(2_1^+)$  كما ان الاشكال (4,3) تبيين ان هناك توافق جيد في سلوكية النظير (Se-70) عند مقارنة القيم الحالية مع القيم العملية.

الجدول (5) يوضح الخاصية او الغاية التي ينتمي اليها هذا النظير.

يبين الجدول رقم (4) قيم نسب الطاقات التي تم حسابها بين اول مستوي رابع واول مستوي ثاني و بين اول مستوي سادس واول مستوي ثاني وكذلك بين اول مستوي ثامن واول مستوي ثاني لهذا النظير ومقارنتها مع القيم العملية المتوفرة لدينا اذ تبين نسبة خطأ بين النتائج الحالية (pw) والقيم المقارن بها تتراوح بين 2%-10%.

الاشكال (4,3,2) تبين قيم نسب الطاقات

النظرية (pw) ومقارنتها مع القيم العملية المتوفرة اذ

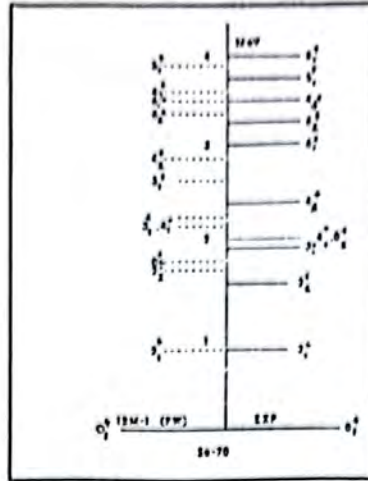
الجدول (1) قيم معاملات موثر هاملتون

isotope	[N]	Eps	$\hat{P} \cdot \hat{P}$	$\hat{L} \cdot \hat{L}$	$\hat{Q} \cdot \hat{Q}$	$\hat{T}_3 \cdot \hat{T}_3$	$\hat{T}_4 \cdot \hat{T}_4$	CHI
Se-70	7	0.6000	0.9900	0.0900	0.0000	0.0000	0.0000	-0.0800

جدول (2) قيم مستويات الطاقة النظرية مقارنة مع القيم العملية للنظير Se-70 عند الغاية SU(5) – O(6)

$I^\pi$	Energy Levels MeV		Spin Sequences	Transitions Energy MeV		Multipolarity
	Exp. (8)	IBM-1 (Pw)	Ref. (8)	Exp. (8)	IBM-1 (Pw)	Ref (8)
$0_1^+$	0.0000	0.0000	$2_1^+ - 0_1^+$	0.9454	0.9161	E2
$2_1^+$	0.9454	0.9161	$2_2^+ - 2_1^+$	0.6559	0.7687	M1,E2
$2_2^+$	1.6013	1.6848	$2_2^+ - 0_1^+$	1.6014	1.6848	E2
$0_2^+$	2.0112	1.6945	$0_2^+ - 2_1^+$	1.0658	0.7784	E <sub>2</sub>
$4_1^+$	2.0396	2.0767	$4_1^+ - 2_1^+$	1.0942	1.1606	E2
$4_2^+$	2.3842	2.8653	$4_2^+ - 2_1^+$	1.4388	1.9492	E2
$5_1^+$	3.0042	3.4811	$4_2^+ - 2_2^+$	0.7829	1.1805	E2
$4_3^+$	3.5250	3.6734	$6_1^+ - 4_1^+$	0.9640	1.4044	E2
$5_1^+$	3.7898	3.9533	$4_3^+ - 4_1^+$	1.4854	1.5967	-
$8_1^+$	4.0390	4.1289	$5_1^+ - 4_3^+$	0.2640	0.2799	-
$3_1^+$	1.9890 <sup>(a)</sup>	2.1414	$8_1^+ - 6_1^+$	1.0348	0.6478	-
$6_2^+$	3.2880 <sup>(a)</sup>	3.8292				
$10_1^+$	-	6.1582				
$9_1^+$	-	6.0081				
$2_3^+$	-	1.6600				
$6_3^+$	-	5.3658				
$8_2^+$	-	6.0568				
$8_3^+$	-	7.1143				
$10_2^+$	-	7.9423				
$7_1^+$	-	6.6258				

(a)Ref. No. (9)



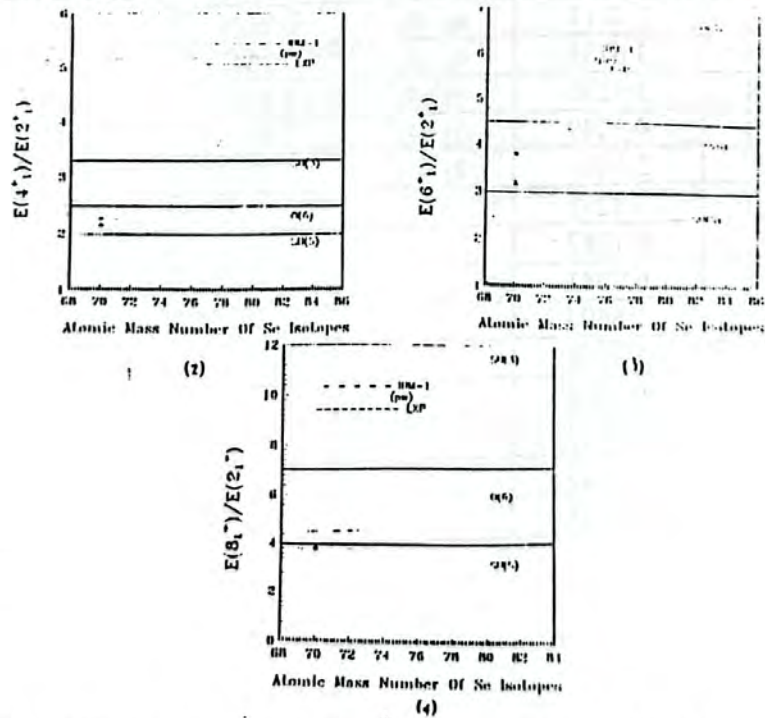
الشكل (1) : قيم مستويات الطاقة النظرية مقارنة مع القيم العملية

جدول (3) : قيم نسب الطاقات المثالية (14),(17)

Limit	$E(4_1^+)/E(2_1^+)$	$E(6_1^+)/E(2_1^+)$	$E(8_1^+)/E(2_1^+)$
SU(5)	2	3	4
O(6)	2.5	4.5	7
SU(3)	3.33	7	12

جدول (4) : قيم نسب الطاقات العملية والنظرية

isotope	$E(4_1^+)/E(2_1^+)$		$E(6_1^+)/E(2_1^+)$		$E(8_1^+)/E(2_1^+)$	
	Exp (8,9,10)	IBM-1 (Pw)	Exp (8,9,10)	IBM-1 (Pw)	Exp. (8,9,10)	IBM
Se-70	2.1573	2.2668	3.1777	3.7999	3.8004	4



الشكل (2,3,4) : قيم نسب الطاقات النظرية مقارنة مع القيم العملية لنظائر السيلينيوم

جدول (5) : يوضح تحديد الخاصية

[N]	مستويات الطاقة Energy Levels	نسب الطاقات Energy Ratios	حزم الطاقة Energy bands	احتمالية الانتقال الكهربائي رباعي القطب B(E2)	تحديد الخاصية النهائية	الملاحظات
7	SU(5)	SU(5)	SU(5)-O(6)	SU(5)-O(6)	SU(5)-O(6)	متفق مع (8)

1. K.P. Lieb and J.J. Kolata: Ground-state band in Se-72. Phys. Rev. C15, 939 (1977).
2. J.H. Hamilton, H.L. Crowell, R.L. Robinson, A.V. Ramayya, W.E. Collins, R.M. Ronningen, V. Maruhn-Rezwani, J.A. Maruhn, N.C. Singhal, H. J. Kim, R.O. Sayer, T. Magee, and L.C. Whitlock: Lifetime Measurements to test the coexistence of spherical and deformed shapes in Se-72; Phys. Rev. Letts. 36, 340 (1976).
3. R.B. Piercey, A.V. Ramayya, R.M. Ronningen, J.H. Hamilton, V. Maruhn-Rezwani, R.L. Robinson, and H.J. Kim: In-Beam gamma-ray spectroscopy of Se-74 following the  $^{60}\text{Ni}(^{16}\text{O}, 2\text{p})$ ,  $^{64}\text{Ni}(^{12}\text{C}, 2\text{n})$  and  $^{65}\text{Cu}(^{11}\text{B}, 2\text{n})$  reactions. Phys. Rev. C19, 1344 (1979).
4. J.C. Wells, R.L. Robinson, H.J. Kim, R.O. Sayer, R.B. Piercey, A.V. Ramayya, J.H. Hamilton, and C.F. Maguire: High-spin states and structure in Se-76. Phys. Rev. C22, 1126 (1980).
5. T. Matsuzaki and H. Taketani: Band structures of Se-76 and Se-78. J. Phys. Nucl. Phys. A390, 423 (1982).
6. D.L. Watson and H.T. Fortune:  $^{76}\text{Se}(t,p)^{78}\text{Se}$  reaction at 17MeV. Phys. Rev. C35, 430 (1987).
7. R.F. Casten and D.D. Warner: The Interacting Boson Approximation. Rev. Mod. Phys. 60, 2, 390 (1988).

## REFERENCES

1. W. Meyerhof: Elements of nuclear physics. Pub. New York M. Graw-Hill (1967).
2. A. Bohrand and B.R. Mottelson: Nuclear structure. Vol. II, Pub. Benjamin W.A. New York. 375 (1975).
3. D. Bonatsos: Interacting Boson Models of Nuclear Structure. Ed. Hodgson P.E.; Pub. Clarendon Press Oxford (1988).
4. F. Iachello and A. Arima: The Interacting Boson Model. Pub. Cambridge University Press Cambridge (1987).
5. S.F. Almoney and G.J. Borse: Anharmonic effects in spherical nuclei. Nucl. Phys. A171, 660 (1971).
6. F. Iachello and A. Arima: Boson symmetries in vibrational nuclei. Phys. Letts. B53, 309 (1975).
7. Iachello: The shell model and the interacting boson model. Nucl. Phys. A507, 43C (1990).
8. A. Ahmed, A.V. Ramayya, D.L. Sastry, J.H. Hamilton, R.B. Piercey, H. Kawakami, A.P. Delima, C.F. Maguire, R. L. Robinson, H.J. Kim, J.C. Wells, and A.C. Rester: Level structure of Se-70. Phys. Rev. C24, 1486 (1981).
9. Sakai M.: Quasi-bands in even even nuclei. Atomic Data and Nuclear Data Tables. 31, 399 (1984).
10. C.M. Lederer, E. Brown, N. Snihab. Table of Isotopes 7<sup>th</sup>. Edition New York; Wiley (1978).