



Al-Mustansiriyah

Journal of Science

ISSN 1814 - 635X

Vol. 18, No. 3, 2007



Issued by College of Science - Mustansiriyah University

AL- MUSTANSIRYA JOURNAL OF SCIENCE

Head Editor
Prof. Dr. Redha I. AL-Bayati

General Editor
Dr. Ikbāl khider Al- joofy

Editorial Board

Dr. Najat Jawed AL - Obaidi

Member

Dr. Kais Jamel Latif

Member

Dr. Iman Tarik Al -Alawy

Member

Dr. Majid M. Mahmood

Member

Dr. Inaam A- Malloki

Member

Dr. ZEKI S. TOWFIK

Member

INSTRUCTION FOR AUTHORS

1. The journal accepts manuscripts in Arabic and English languages. Which had not been published before.
2. Author (s) has to introduce an application requesting publication of his manuscript in the journal. Four copies (one original) of the manuscript should be submitted. Should be printed by on the computer by lasser printer and re produced on A4 white paper in three coppice with flopy disc should be also submitted.
3. The title of the manuscript together with the name and address of the author (s) should typed on a separate sheet in both Arabic and English. Only manuscript,s title to be typed again with the manuscript.
4. For manuscripts written in English, full name (S) of author (s) and only first letters of the words (except prepositions and auxiliaries) forming title of the manuscript should be written in capital letters. Author (s) address (es) to be written in small letters.
5. Both Arabic and English abstracts are required for each manuscript. They should be typed on two separate sheets (not more then 250 words each).
6. Figures and illustrations should be drawn using black China ink on tracing papers. Two photocopies (Plus original) of each diagram should be submitted. Captions to figures should be written on separate papers. The same information should not be repeated in tables unless it is necessary and required in the discussion.
7. References should be denoted by a number between two bracket on the same level of the line and directly at the end of the sentence. A list of references should be given on a separate sheet of paper, following the intemational style for names and abbreviations of journals.
8. Whenever possible, research papers should follow this pattem: INTRODUCTION, EXPERIMENTAL (MATERIALS AND METHODS), RESULTS, DISCUSSION and REFERENCES. All written in capital

letters at the middle of the page. Without numbers or underneath lines.

9. The following pattern should be followed upon writing the references on the reference sheet: Sumame (s), initials of author (s), title of the paper, name or abbreviation of the journal, volume, number, pages and (Year). For books give the author(s) name(s), the title, edition, pages, publisher, place of publication and (Year).
10. A publication fees in the amount of ID. 20 thousand is charged upon a Reciepet of the paper and 20 thousand upon the acceptance for publication for their ID. 40 thousand should be paid for the editorial board.

CONTENTS

ITEM	Page No.
Effect of Some Materials and Metal Ions on the Chitinase Purified from Environmental <i>Serratia plymuthica</i> Dr.Sahira N. Muslim - Allea M. Abd-alhamed	1-8
Studing the Antimicrobial Effect of Probiotics on Bacterial Causes of Acne Kawther H.Ibrahem AL- Bajelan	9-18
Prevalence of Trichomoniasis in Baquba City ادبية يوسف اسكندر - عبد الله لفته نجاح علي محمد	19-23
Peripheral Blood CD3,CD4,CD8 & CD19 Lymphocytes Percentage in Patients with Colorectal Cancer Batool H. AL-ghurabi	24-30
Further Studies On the Nonspecific Activation of Mice Peritoneal Macrophage with <i>Rhizobium trifoli</i> Polysaccharide Khedhir Hassan Ali Al-Jorany - Magdah Ibrhim Fattah	31-44
Purification And Partial Characterization Of Extracellular Lipase From <i>Pseudomonas fluorescens</i> Sahira N. Muslim	45-61
Relations among Some Types of Stochastic Orderings and Weighted Distributions ALIAH ADNAN KADHIM AL-MOUSAWI	62-67
Strongly Preopen Sets, δ -Open Sets and their Continuous Functions in Bitopological Spaces Wuria Muhammad Ameen Hussain	68-78
The Behaviour of Charged Particles around Aligned Magnetic Rotators for Pulsar Star L.M. Karim - S.A. Abdullah	79-92
Reynolds Stress and Heat Flux within and above a Neutrally Urban Boundary Layer Monim H. Al-Jiboori	93-101

Effect of Some Materials and Metal Ions on the Chitinase Purified from Environmental *Serratia plymuthica*

* Dr.Sahira N. Muslim ** Allea M. Abd-alhamed

* Dept.of Biology,College of Science / Al-Mustanairiya university.

** Dept.of Biology,College of Science / Deala university ,Deala.

(Received 23/7/2006 – Accepted 6/6/2007)

الخلاصة

تم الحصول على 18 عزلة بنسبة (75%) تعود لبكتريا *Serratia plymuthica* من بين 24 عزلة تعود لبكتريا *Serratia* من مجموع 30 عينة ماء مأخوذة من نهر ديالى. تم اختيار احدى هذه العزلات لاستخلاص وتنقية انزيم chitinase بعدة مراحل تتضمن (الترسيب بكبريتات الامونيوم، التبادل الايوني باستخدام DEAE-cellulose والترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-75، وكذلك لدراسة تأثير بعض المواد والعناصر المعدنية على فعالية انزيم chitinase حيث وجد بأن بعض العناصر المعدنية مثل الكالسيوم Ca^{++} ، الكوبلت Co^{++} ، المنغنيز Mn^{++} والنيكل Ni^{++} ادت الى زيادة فعالية انزيم chitinase الى الضعف وهذه النتيجة تؤكد بأن انزيم chitinase هو انزيم معدني. لذلك هذه التجربة قادت الى زيادة الفائدة باستخدام هذا الانزيم كعامل سيطرة بايولوجية (عامل حماية ضد الفطريات والحشرات الممرضة للنباتات)، تحضير البروتوبلاست من خلايا الفطريات و انتاج سكريات بسيطة غير معقدة كمادة فعالة بايولوجيا.

ABSTRACT

Serratia plymuthica isolates were obtained at 18(75%) isolates out of 24 *Serratia* isolates obtained out of 30 water samples from Diala River in Diala city. One of these isolates was selected to purify chitinase enzyme through several stages of purification including:(ammonium sulfate precipitation, ion exchange by DEAE-cellulose and gel filtration by Sephadex G-75), and studied the effect of some materials and metal ions on the chitinase activity, since some of metal ions such as Ca^{++} , Co^{++} , Mn^{++} and Ni^{++} led to increase chitinase activity to the double, and this indicates that chitinase is a metalloenzyme. Therefore, this experiment lead to increase interest in using the chitinase as a biocontrol agent of phytopathogenic fungi and insects (a protective agent against plant-pathogenic fungi and insects), preparation of protoplasts from fungi and production of oligosaccharides as biologically active substances.

Protein assay:

Estimation of protein concentration were carried out by the method (14) by spectrophotometric assay at 600 nm in each stage of chitinase purification.

Effect of some materials and metal ions on chitinase activity:

The following metal ions were used as chlorides or sulfates at 10mM concentrations in 0.05M phosphate buffer at pH=7.2: Mn^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Ca^{++} , Ni^{++} , Ag^+ and Hg^{++} , in addition to some materials such as triton x-100, 2-mercapto ethanol and glutathione at concentrations 1%, respectively.

1 ml of purified chitinase solution was added to 1 ml of each metal ion solution and incubated at 37°C for 1 h and then chitinase activity and amount of protein were measured to find the specific activity.

RESULTS and DISCUSSION

Isolation and characterization of *Serratia plymuthica*:

The results revealed that 24(80%) isolates of *Serratia* were obtained out of 30 water samples. Eighteen *Serratia plymuthica* isolates (75%) were obtained among 24 *Serratia* isolates, also 4 *Serratia marcescens* isolates (17%) and 2 *Serratia liquefaciens* isolates(8%). Since most of *Serratia plymuthica* strains have been isolated from fresh water and fish suggesting that may be a opportunistic pathogen for animal and humans(2). In a study done by (1) found that *Serratia plymuthica* 90% and *Serratia liquefaciens* 10% among 10 *Serratia* isolates isolated from fresh water samples.

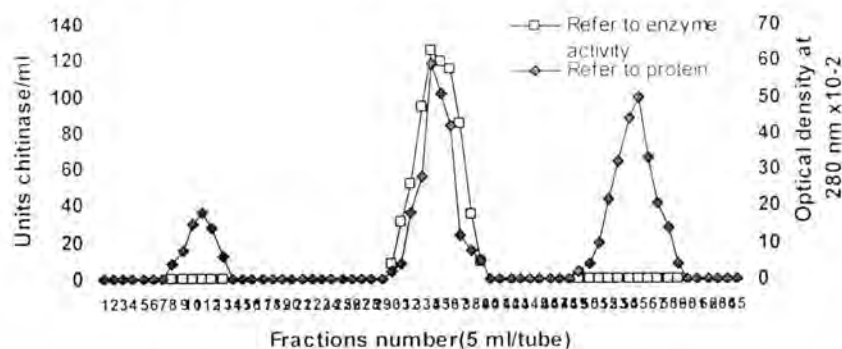
Purification:

The purification of chitinase from *Serratia plymuthica* is summarized in (table-1). Solid ammonium sulfate at 70% saturation to the crude extract lead to rise in the specific activity to 6.3 IU/mg. Ammonium sulfate precipitate revealed 2.5 fold of purification with 30% chitinase recovery before the dialysis. The precipitate was dialyzed against distilled water to remove the foreign materials and markedly increased the specific activity of chitinase.

Table(1): Purification of chitinase from *Serratia plymuthica*

Purification step	Size (ml)	Total Protein (mg)	Total Units (IU/ml)	Specific activity (IU/mg)	Purification (fold)	Total activity	Total Recovery (%)
Crude extract	90	64	88	2.5	1	7920	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	25	20	95.2	6.3	2.5	2380	30
DEAE-cellulose chromatography	15	4.4	126	23.0	9.2	1890	23.8
Sephadex G-75 chromatography	10	2.6	150	34.0	13.6	1500	18.9

Ion exchange chromatography by DEAE-cellulose column was the second purification step. When chitinase solution was passed through DEAE-cellulose column and eluted with NaCl solutions (0.2-0.4M), three peaks of protein appeared in the eluted fractions with one peak of chitinase activity located in the second protein peak (figure-1). Fold of purification was 9.2 in this step with

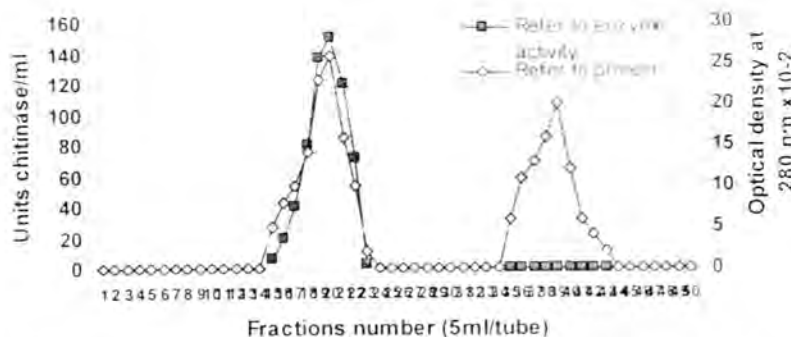


Figure(1):DEAE-cellulose chromatography of *Serratia plymuthica* chitinase

23.8% recovery. Gel filtration chromatography with Sephadex G-75 was the next step of chitinase purification. The eluted fractions of this step contained two protein peaks, only the first peak contained the chitinase activity (figure-2). Fold of purification was 13.6 and 18.9% recovery. The increase in the specific activity for chitinase may refer to the efficiency of the purification process and the decrease of the contaminating materials.

Chitinase was isolated from the culture filtrate of *Serratia marcescens*, *Fusarium* and *Streptomyces* and purified by using ion-exchange chromatography and gel filtration as mention by(8,15,16).on the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* chitinase was purified by using ammonium sulfate and DEAE-Sepharose 6B(6).*Serratia* chitinase showed high sequence homology with chitinases from *Bacillus* and *Streptomyces*(13).

The recovery of chitinase in this study was compared with other studies and it was found that it was higher than the recovery that was obtained by(7,17) which found that the recovery was equal to 12.8 and 16.5%,respectively, also this enzyme was purified from *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio harveyi* with recovery equal to 7and 10% ,espectively (6,7).



Figure(2):SephadexG-75 chromatography of *Serratia plymuthica* chitinase

Effect of some materials and metal ions on chitinase activity:

Chitinase of *Serratia plymuthica* was treated with many bivalent cationic metals. Some of these metals showed activation effect, others had inhibition effect. Hg^{++} , Ag^+ and Cu^{++} inhibited chitinase activity to 50, 50 and 20%, respectively. Also 2-mercapto ethanol and glutathione inhibited chitinase activity to 20 and 50% (table-2). While the other metal ions (Ca^{++} , Co^{++} , Mn^{++} and Ni^{++}) increased chitinase activity to the double, hence the metals can be evaluated as activator compounds for chitinase activity. In addition, Triton X-100 increased the activity to more than 20%. This result may prove that chitinase was metalloenzyme.

In a study done by (7,18) found that Ca^{++} , Co^{++} and Triton X-100 stimulated chitinase activity up to 20%, whereas Ag^+ , glutathione and iodoacetic acid inhibited the activity up to 50%.

Table(2):Effect of some materials and metal ions on chitinase activity

Material	Concentration	Remaining activity (%)
$CaCl_2$	10mM	*200
$CoCl_2$	10mM	200
$MnCl_2$	10mM	200
$NiSO_4$	10mM	200
$AgCl$	10mM	50
$HgCl_2$	10mM	50
$CuSO_4$	10mM	20
Triton X-100	1%	130
2-mercapto ethanol	1%	20
glutathione	1%	50

*the chitinase activity before treatment equals 150 IU/ml

REFERENCES

- 1- Vivas, J.; Gouzales, J. A.; Barbeyto, L. and Rodriguez, L. A. Identification of environmental *Serratia plymuthica* strains with the new combo panels type 1S. Mem. Inst. 95(2): 227-229(2000).
- 2- Ramos, J. M.; Fernandez, R.; Gadea, I.; and Cuenca, E. Nosocomially acquired bacteremia caused by *Serratia plymuthica*. Clin. Microbiol. Newsletter. 17: 156-157 (1995).
- 3- Grimont, P. A. and Grimont, F. The genus *Serratia*. In: Starr, Stolp, Truper, Balows and Schlegel (Editors). The Prokaryotes, A hand book on Habitats. Isolation and Identification of bacteria. P: 1187-1203 (1981). Springer-Verlag, New York.
- 4- Grimont, P. A. and Grimont, F. The genus *Serratia* microbes. Ann. Rev. Inc. 32: 221-248 (1978).
- 5- Wang, S. and Chang, W. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/ lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. Appl. Environ. Microbiol. 63(2):380-386 (1997).
- 6- Svitil, A. L.; Chadhain, M. S.; Moore, J. A. and Kirchman, D. L. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. Appl. Environ. Microbiol. 63(2):408-413 (1997).
- 7- Bhushan, B. and Hoondal, G. S. Isolation, purification and properties of chitinase from *Serratia* sp. Biotechnol. Lett. 20(2):157-159 (1998).
- 8- Mathivanan, N.; Kabilan, V. and Murugesan, K. Purification, characterization and antigungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. Con. J. Microbiol. 44(7):646-651 (1998).
- 9- El-katatny, M. H.; Somitsch, W.; Robra, K. H. and Gubitz, G. M. Production of chitinase and 1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food. Technol. Biotechnol. 38(3): 173-180 (2000).
- 10- Delabre, K.; Cervantes, P. and Lahoussine, V. Detection of viable pathogenic bacteria from water samples by PCR. OECD. 4(2): 1-8 (1998).
- 11- Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P.; and Swain R. H. A. "Medical Microbiology", vol. 2, 12th ed. P: 245-248, (1975). Churchill livingstone pub., London.
- 12- Holt, J. G.; Kerieg, N. R.; Seath, P. H. Staley, H. A. and Williams, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. P: 332-353 (1994). Williams and Wilkins, U. S. A.
- 13- Tsujibo, H.; Minoura, K.; Miyamoto, K.; Endo, H. and Inamori, Y. Purification and properties of a thermostable chitinase from

Streptomyces thermoviolaceus OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 59(2):620-622(1993).

14- Lowry O.H. ; Rosebrongh , N.J. ;Farr A.L.; and Randall,R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent . J. Biol. Chem.193: 265-275 (1951).

15- Ruiz-sanchez,A.;Cruz-camarillo,R. AND Barboza-corona,J.E. Chitinase from *Serratia marcescens* Nima. Biotechnol. Lett. 27(9):649-653(2005).

16- Beyer,M. and Diekmann,H. The chitinase system of *Sireptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. Appl. Microbiol. 23(2):140-146(1985).

17- Lee,H.S.; Han, D.S.; Choi,S.J.; Choi, S.W.; Kim, D.S.; Bai, D.H. and Yu, J.H. Purification, characterization and primary structure of chitinase from *Serratia* sp. Appl. Microbiol. 54(3):392-405(2000).

18- Frankowski, J. ; Lorito, M.; Scale, F.; Schmid, R. and Bahll,H. purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Archives Microbiol. 176(6):421-426(2001).

Studing the Antimicrobial Effect of Probiotics on Bacterial Causes of Acne

Kawther H.Ibrahim AL- Bajelan

Depth.of microbiology.College of Science AL- Mustansiriya university

(Received 30/7/2006 – Accepted 6/6/2007)

الخلاصة

شملت الدراسة التحري عن القابلية التثبيطية لرواشح المعززات الحيوية ضد البكتيريا المسببة لحب الشباب وخاصة البكتيريا الموجبة لصيغة غرام / *Propionibacterium acnes* , *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermidis* . أظهر فحص الحساسية للعزلات البكتيرية مقاومتها لمضاداي الامبسلين والكلنداميسين بنسبة (100%) بينما كانت نسبة مقاومتها للارثروميسين (77.7%). فيما كانت حساسة اتجاه مضادات سيفوتكسيم، افلوكسيسن، سبروفلوكسين، بيراسلين تازوبكتام. تم تنمية عزلات المعززات الحيوية في اوساطها الزرعية (GlucoseYeastExtractPepton,ManRogosaSharpebroth) لفترات زمنية مختلفة (24، 48، 72) ساعة بغية الحصول على افضل تاثير تثبيطي وتم الحصول على رواشحها التي ركزت لمرة واحدة ولمرتين كما تمت دراسة تاثير هذه الرواشح في نمو عزلات البكتيريا قيد الدراسة. اظهرت النتائج ان للرواشح الغير المركزة لعزلات المعززات الحيوية تاثير تثبيطي قليل او معدوم ضد عزلات البكتيريا خلال فترات الحضانة المختلفة في حين ادى تركيز الرواشح لمرة واحدة ولمرتين الى اظهار فعاليتها التثبيطية اتجاه عزلات البكتيريا، كما عدت فترة الحضانة (48) ساعة كافضل فترة زمنية تحتاجها المعززات لتحفيز انتاج المواد المثبطة.

ABSTRACT

The study included detecting the inhibitory ability of some probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidiobacterium bifidium*, *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*) against some acne pathogen especially gram +ve bacteria (*Propionibacterium acnes* , *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*)

Susceptibility test of bacterial isolates to some antibiotics showed a considerable resistance to Ampicillin and Clindamycin (100%) , while (77.7%) to Erythromycin. They were mainly sensitive to Cefotaxime, Ofloxacin, Ciprofloxacin and Piperacillin tazobactam (100%).

To detect the best incubation time which gives the highest inhibitory effect, probiotics isolates were grown in (Glucose Yeast extract Pepton/

and Man Rogosa sharpe) broth media for various incubation periods(24,48 and 72)hrs. to obtain the highest inhibitory effect to the probiotic filtrates and their concentrates on bacterial growth.

The result showed incubation period of (48hr.) was the best incubation period for probiotic to produce inhibitory materials against acne pathogens, while their concentrated filterates (1 and 2 folds) exhibited best inhibitory effects than unconcentrated filterates.

INTRODUCTION

Acne is adisorder resulting from the action of hormones on the skins oil glands (sebaceous glands),which leads to plugged pores and outbreaks of lesions commonly called pimples.Acne lesions usually occur on the face,neck,back,chest and shoulders(1).

Wilson in 1842 was the first physician to use the term"Acne vulgaris(2)".The basic acne lesion called the comedo,is simply an enlarged and plugged hair follicle. there was many different treatment of acne disease,including topical cleansers,topical keratolytic agents,topical and oral antibiotics,anti-androgen agents(3)

Antimicrobial therapy was at the cross roads,drug development is palpably slowing and antimicrobial resistance is inexorably increasing,there was several non-antibiotic approaches to the treatment and prevention of infection(4).Probiotic therapy uses alive and non pathogenic microorganism that exert appositive influence on the health or physiology of the host.They consist of either yeast or bacteria,especially saccharomyces and lactic acid bacteria(5).The effect of probiotics can be direct or indirect through modulation of the endogenous flora or the immune system(6),probiotic bacterial strains,such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have demonstrated aprotective role in several animals.Several mechanisms have been proposed by probiotics may exert their beneficial activity,including competitive exclusion of bacterial adherence or translocation or both,release of bacteriocidine and lactic acid,which can inhibit the growth of pathogen,production of butyric acid and antioxidative effects (7).

The aime of this study was to detect antibacterial activity of some selectable probiotics(lactic acid bacteria and yeasts) and the best incubation period for probiotic under this study to obtain the highest inhibitory effect against some of bacterial causes of acne.

MATERIAL and METHODS

Bacterial Isolates:

A total of (22) isolates of gram +ve bacteria were collected from medical city hospital. (9) isolates from each of the following:

(4) *Propionibacterium acnes*, (3) *Staphylococcus aureus* (2) *Staphylococcus epidermidis*

Clinical isolates were identified at the lab. By classical microbiological tests (cultural, morphological and biochemical tests), to confirm our results by using API STAPH system for *staphylococcus* isolates, API20A system for *propionibacterium* isolates according to (8).

Probiotic isolates:

A commercial brand of ready powdered of probiotics were used : (*Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast), *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidiobacterium bifidum*) from College of Science-Al Mustansiriya University.

Antibiotic Susceptibility test:

Antimicrobial agents susceptibility test by disk diffusion was performed by the procedure recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (9). Interpretative chart for disk diffusion tests were these described in the current National Committee for Clinical Laboratory Standards documents (10). The following disks were used:

Clindamycin (2µg), Erythromycin (15µg), Ciprofloxacin (5µg), Ofloxacin (5µg), Piperacillin/tazobactam (100µg), Cefotaxime (30µg) and Ampicillin (10µg) (A representative disks from oxoid/England).

Determination of the inhibitory effect of probiotics

MRS broth and GYEP broth were inoculated by 1% of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidiobacterium bifidum*, *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* (baker yeast) cultures then incubated anaerobically and aerobically at 37°C for various periods of times (24, 48 and 72) hrs. respectively (11).

After incubation the culture were centrifuged at 4500 r.p.m to get supernatant which filtered through milipore filter unit (0.22µm). then the well diffusion method that mention by (12), was used on nutrient agar. the plate was inoculated with 0.1ml of pathogenic bacteria by using spreader by cork porer (5mm) wells were made in nutrient agar and filled by the filtrate of probiotic isolates before incubated at 37°C for 24hr. the inhibition area around the well was measured by (mm). the

filtrate was concentrated by the freeze-dryer (one and two fold concentration) and the well diffusion method was repeated to detect the effect of concentrated filtrate against the pathogenic bacteria.

RESULT and DISCUSSION

Out of twenty two of gram +ve bacteria obtained (9) isolates were identified including (4) *Propionibacterium acnes*, (3) *Staphylococcus aureus*, (2) *Staphylococcus epidermidis* respectively.

The antimicrobial agents susceptibility test of the isolates were performed against (7) different agents including :Ampicillin (AMP), Clindamycin(DA),Erythromycin (E),Cefotaxime (CTX), Ofloxacin (OFX),Piperacillin Tazobactam(TPZ),and Ciprofloxacin(CF).

Our results have been shown(table 1),that all bacterial isolates under this study were sensitized to ofloxacin,cefotaxime,piperacillin tazobactam and ciprofloxacin, while they were mainly resisted to clindamycin,ampicillin,and erythromycin.

Table(1):Antibiotic Susceptibility Test of Isolated Bacteria

Antibiotics Bacteria	OFX	CF	E	TPZ	DA	CTX	AMP
<i>P.acnes</i> 1	S	S	R	S	R	S	R
<i>P.acnes</i> 2	S	S	R	S	R	S	R
<i>P.acnes</i> 3	S	S	R	S	R	S	R
<i>P.acnes</i> 4	S	S	R	S	R	S	R
<i>S.aureus</i> 1	S	S	R	S	R	S	R
<i>S.aureus</i> 2	S	S	R	S	R	S	R
<i>S.aureus</i> 3	S	S	S	S	R	S	R
<i>S.epidermidis</i> 1	S	S	R	S	R	S	R
<i>S.epidermidis</i> 2	S	S	S	S	R	S	R

OFX=ofloxacin,CF=ciprofloxacin,E=erythromycin,TPZ=piperacillin tazobactam,DA=clindamycin,CTX=cefotaxime,AMP=ampicillin
R=resistance,S=sensitive

Agreat variation in the response of isolates to wards the probiotic filterates (un concentrated, concentrated (1 fold, 2 fold) was observed(table 2,3,4,5,6,7,8,9,10) .

The antimicrobial activity of probiotic isolates against testing bacteria on (MRS and GYEP)broth media under (24,48 and 72)hrs.incubation was estimated by using well diffusion method.

Bifidiobacterium bifidium and *Lactobacillus acidophilus* showed antimicrobial activity better than other probiotic (*Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*) filterates.(P4.

acnes, *P2.acnes*) isolates were the most testing bacteria effective ,while (*S2.aureus*) isolate was the least effective one(Table 2 and 3).

Otles *et al.*(13) demonstrated that probiotics strains had inhibited pathogenic bacteria both *in vitro* and *in vivo* through several different mechanisms by antagonize pathogens directly through production of antimicrobial and antibacterial compounds such as butyric acid and cytokines.

After (48)hrs. incubation, the probiotic isolates exhibited increased inhibitory effect against bacteria isolates compared with (24,72)hr. Moreover, there was an observable antimicrobial effects of *Bifidiobacterium bifidium* and *Lactobacillus acidophilus* filterates on (*P1.acnes*, *P2.acnes*, *P3.acnes*) isolates than other bacterial isolates(*S2.aureus*, *S.1epidermidis*, *S2.epidermidis*).

As a result of, incubation period (48)hr. was the best incubation period for probiotic isolates (table 6 and 7) to produce inhibitory material against pathogenic bacteria and concentrated filterates of probiotics showed highest inhibition zone against bacterial isolates under this study compared with un concentrated one (table 3,4,6,7,9,10).

Coconnier *et al.*(14) reported that the culture supernatant of the *Lactobacillus acidophilus* produced an antibacterial activity against a wide range of gram-negative and gram-positive pathogens it decreased the *in vitro* viability of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* , *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp*

As well as antibacterial compounds produced by *Bifidiobacterium* was found to be alipophilic molecules with a molecular weight of less than 3500(15).

Otherwise ,Gan *et al.*(16) hypothesized that specific probiotic strain of lactobacilli with known anti infective properties could inhibit *S.aureus* induced surgical wound infection.

Saccharomyces cerevisiae (brewers and bakers yeast) has been used in classical food fermentation applications (bread, beer, yeast extract, vitamins, wines, distilled spirits). *Saccharomyces cerevisiae* was a rich source of B- vitamins and chromium. So, Camacho-Ruiz *et al.*(17) reported the use of yeast as a potential biotherapeutic agent for chronic acne and furunculosis treatment. medicinal yeast products consist of the dried cell of *Saccharomyces cerevisiae* or their extracts, the German Commission E approved the use of brewers yeast as a supplement for treating chronic forms of acne(18).

In addition, Bornet *et al.* (19) reported that *Saccharomyces boulardii* exerted an antagonistic activity against bacterial suspensions of *K.pneumoniae*, *Ps.aeruginosa* and *S.aureus*.

Table(2):Effect of Unconcentrated Filterates of Probiotics(24hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	22	-	12	13	12	-	-	11	-
<i>B.bifidium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.boulardii</i>	16	-	14	-	16	16	-	11	15
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-)=no inhibition zone

Table(3):Effect of Concentrated Filterates(1 fold) of Probiotics(24hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	22	17	19	25	18	25	20	16	17
<i>B.bifidium</i>	23	18	20	25	23	26	20	17	18
<i>S.boulardii</i>	15	12	16	20	17	17	15	11	12
<i>S.cerevisiae</i>	16	10	18	17	15	15	15	10	13

Table(4):Effect of Concentrated Filterates (2 fold) of Probiotics(24hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	25	19	20	25	20	25	20	16	18
<i>B.bifidium</i>	25	23	21	26	25	27	20	17	21
<i>S.boulardii</i>	18	15	17	20	17	17	16	14	13
<i>S.cerevisiae</i>	21	12	19	20	15	15	18	16	16

Table(5):Effect of Un concentrated Filterates of Probiotics(48hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	-	-	20	-	-	25	-	-	15
<i>B.bifidium</i>	-	-	20	-	-	40	20	-	16
<i>S.boulardii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	20	-	-	-

(-)=no inhibition zone

Table(6):Effect of Concentrated Filterates (1 fold) of Probiotics(48hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	25	20	28	26	20	22	25	20	16
<i>B.bifidium</i>	25	15	32	28	21	21	27	16	20
<i>S.boulardii</i>	15	14	16	19	16	15	15	13	13
<i>S.cerevisiae</i>	15	13	15	16	11	15	15	14	13

Table(7):Effect of Concentrated Filterates (2 fold)of Probiotics(48hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	25	25	30	30	28	26	28	23	24
<i>B.bifidium</i>	25	26	32	30	33	31	28	26	26
<i>S.boulardii</i>	16	16	17	20	15	15	16	15	15
<i>S.cerevisiae</i>	16	18	16	17	17	19	19	16	14

Table(8):Effect of Un concentrated Filterates of Probiotics(72hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	12	-	15	12	15	16	12	15	-
<i>B.bifidium</i>	15	-	17	15	-	18	16	20	-
<i>S.boulardii</i>	-	-	-	17	-	11	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	27	-	-	-	11	-	-	-

(-)=no inhibition zone

Table(9):Effect of Concentrated Filterates (1 fold) of Probiotics(72hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	20	20	30	25	21	25	21	25	15
<i>B.bifidium</i>	20	21	29	31	25	29	12	25	16
<i>S.boulardii</i>	17	10	13	19	15	15	16	15	11
<i>S.cerevisiae</i>	17	11	-	17	14	15	-	15	10

(-)=no inhibition zone

Table(10):Effect of Concentrated Filterates (2 fold) of Probiotics(72hr) on Acne Pathogens

Acne pathogens Probiotics	Diameter of inhibition zone (mm) of acne pathogens								
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3
<i>L.acidophilus</i>	25	25	31	27	26	27	25	25	21
<i>B.bifidium</i>	27	25	32	32	31	31	20	30	22
<i>S.boulardii</i>	17	12	14	19	16	15	17	17	12
<i>S.cerevisiae</i>	17	12	-	15	15	14	10	17	10

(-)=no inhibition zone

REFERENCES

- 1-Akligman,A.M.An Overview of acne.J.Invest.Dermatol.,62:268-787(1974).
- 2-Cunliffe,W. J. and Cotterill, J. A. The Acnes. Clinical Features. Pathogenesis and Treatment. Vol(16),Major problems in Dermatology. London(1975)
- 3-Eady, E.A., Holland, K.T. and Cunliffe, W. J. Topical antibiotics in acne therapy. J. Am. Acad. Dermatol., 5:455-456(1981).
- 4-Golledge,C.L.and Riley,T.V."Natural therapy for infectious diseases.M.J.A. 164:94(1996).
- 5-Fuller,R.Probiotics in Man and animal.J.Appl.Bacteriol.,66:365-78(1989).
- 6-Marteau,Ph.R.,devrese,M.,Cellier,Ch.J.and Schrezenmeis,J.Protection from Gastrointestinal Diseases with the use of probiotics Am.J.Clin.Nutr.73:43(2001).
- 7- Dunne, C., Omahony, I., Murphy, I., Thorntong, G., Morrissey, D., Ohalloran, S. and Feeney, M.In Vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. Am.J. Clin. Nutr., 73:386-92(2001).
- 8-Baron,E.J.and Finegold,S.M."Diagnostic Microbiology",9th Ed.,Mosby Company,U.S.A.(1994).
- 9-National Committee for Clinical Laboratory Standards.Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing.Approved Standard M2-A7,7th Ed.,National Committee for Clinical laboratory Standard.(2000), Pennsylvania.
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing.12th Ed., National Committee for Clinical laboratory Standard.(2002), Pennsylvania.
- 11-Lewus,C.B.,Kaiser, A. and Montvill, T.J .Inhibition of food born bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacterial isolated from meat J.Appl. Environ. Microbiol.,57:1683-1688(1991).
- 12-Vignolo, G.M., Suriani, F., Halgado, A.P.R., and Oliver,G. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages.J.Appl.Bacteriol.,344-349(1993).
- 13-Otles,S.,Cagindi,O.,and Alkeicek,E. Probiotics and Heath.Asian Pacific J.Cancer Prev.,4:369-372(2003).
- 14-Coconnier,M.H.,Lievin,V.,Bernet,M.F.,Hudault,S., and Servin A.Anti bacterial Effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB Antimicrob.Agents and Chemother.,41:1046-1052(1997).

- 15-Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Ruchat, F., Brassart, D., Neeser, J., and Servin. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47 :646-652(2000).
- 16-Gan, B. S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P., and Howard, J.C. *Lactobacillus fermentum* RC-14 Inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J. Infect. Dis.*, 185:1369-72(2002).
- 17-Camacho-Ruiz, L., Perez-Guerra, N., and Roses, R.P. Factors effecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. *Electron. J. Environ. Agric. Food. Chem.*, 2(5):1574-4377(2003).
- 18-Blumenthal, Busse, Berg, G. *et al.* The Compleat German Commission E Monographs: Therapeutic Guid to Herbal Medicines. The American Botanical Council, Austin, TX(1998).
- 19-Bornet, M., and Pergogne, E. Bacterial growth in enterial elimination valu of the addition of *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 3:383-387(1989).

Prevalence of Trichomoniasis in Baquba City

نجاح علي محمد - اديبه يوسف اسكندر - عبد الله لفته
المعهد الطبي التقني

Received 13/9/2006 Accepted 3/4/2007

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لاستقصاء معدلات انتشار المشعرات المهبليّة في مدينة بعقوبة حيث تم أخذ مسحات مهبليّة من 200 سيّدة و من إفرازات احليليّة لـ (150) رجل ، وتم فحص مستحضرات نديّة منها وزرّعها. لقد ثبت وجود المشعرات المهبليّة في 25 (12.5%) مريضة تعاني من افرازات مهبليّة، وظهرت أكثر الاصابات بين النساء الحوامل (16.4%) وكان معدل العدوى التّالي في الارتفاع يبلغ 13.3% في سنوات الطمث بينما بلغ 4.8% بين النساء اللواتي قاربن أو تجاوزن سن اليأس، كذلك تم فحص 150 رجلاً ووجد ان 90 (60%) منهم يعانون من افرازات احليليّة و 60 (40%) أصحاء ظاهرياً ولا يبدون أية أعراض . شخّصت العدوى في 6 (6.7%) من المرضى من ذوي الافرازات الاحليليّة في مقابل مريضين (3.3%) من غير ذوي الأعراض وكانت معظم الحالات الايجابية في الفئة العمريّة 21-40 سنة.

ABSTRACT

This is study investigated the prevalence of *Trichomonas vaginalis* in Baquba city. Vaginal swabs were obtained from 200 females, urethral discharge from 150 males and examined by the wet preparation and culture methods. *Trichomonas vaginalis* was identified in 25 female subjects (12.5%) with vaginal discharge. Pregnant women showed the highest rate (16.4%). The next highest infection rate (13.3%) was noticed during the menstrual years. Women aged over 40 years showed a rate of (4.8). A total of 150 males were also investigated, 90 (60%) presented with urethral discharge and 60 (40%) were apparently healthy and asymptomatic. Among those with discharge, infection was identified in 6 subjects (6.7%), against 2 (3.3%) among the asymptomatic subjects. The majority of positive cases were in the age group 21-40 years.

INTRODUCTION

Genital trichomoniasis is a sexually transmitted disease affecting men and women. A frequency of 20%-30% in sexual partners of infected women has been reported [1]. *Trichomonas vaginalis* infection typically elicits an aggressive local cellular immune response with inflammation of the vaginal epithelium and exocervix in women and the urethra of men [2]. Most patients with trichomonas infection are asymptomatic or mildly symptomatic [3], they are likely to continue to remain sexually active in spite of infection. Studies suggest that approximately 50-70% of persons with *T. vaginalis* have subclinical infection [3]. It is rarely reported in females before puberty and after menopause, but is common during

the child-bearing years and peaks during pregnancy [1, 4]. It causes up to 15% of cases of non-gonococcal urethritis in men [4].

Men are commonly asymptomatic carriers of *T. vaginalis*. Symptoms may appear in chronic and acute forms [5]. Demonstration of this organism in men has always been difficult [5].

The present study was chosen because of the lack of information available on urogenital trichomoniasis in Iraq. Only three studies have been carried out among women, in Baghdad [7] and in Mosul [8] and in Erbil [8] provinces where incidences of 19.5%, 9.6% and 10% respectively were recorded. There have been no studies concerning urogenital trichomoniasis among males and females.

Aim of study :- Is to evaluated the prevalence of Trichomoniasis in Baquba city .

SUBJECTS and METHODS

Women: Vaginal swabs were obtained from 200 females, ages (8-59) years and 150 males ages (10-60) years with or without urethral discharge examined by the wet preparation and culture methods. Cultures were carried out on Trichomonas medium No. 2 (oxoid) incubated at 37°C and examined at 48 and 96 hours. Full information including age, gravidity, parity, complaint, marital status, family, social and past medical and obstetrical histories were reported. Samples were examined by the wet preparation and culture methods. Healthy men were screened for urogenital trichomoniasis by urine examination. After centrifugation, the sediment was examined microscopically and inoculated into the Trichomonas medium. Specimens were incubated for 4 days at 37°C and examined for the presence of *T. vaginalis*.

RESULTS

The incidence of *T. vaginalis* among women was found to be 12.5%, Table (1). Pregnant women showed the highest incidence (16.4%). A high infection rate (4.8%) was also evident during the menstrual years (11-40 years). Women near or postmenopause (over 40 years) showed an incidence of (Table 2).

Table (1): Distribution of 200 females with urethral discharge in relation to menstrual history

Menstrual history	No. examined	No. positive	% positive
Pregnant	55	12	16.4
Non-pregnant	75	10	13.3
lactating	40	4	10.0
postmenopausal	21	1	4.8
Pre-puberty	9	1	11.1
Total	200	25	12.5

Table (2): Distribution of 200 females with urethral discharge by age and by marital status

Age and marital status	No. examined	No. positive	% positive
Age (years)			
1-10	6	1	16.7
11-20	20	6	30
21-30	73	13	17.8
31-40	61	5	8.2
Over 40	40	2	5.0
Marital status			
Married	76	12	15.8
Single	18	1	5.6
Widow	6	1	16.6
Total	200	14	7.0

Of 150 males investigated at the medical clinics visits, 90 (60%) presented with urethral discharge and the remaining 60 (40%) were apparently healthy and asymptomatic. *T. vaginalis* was identified in 6 subjects (6.7%) of the symptomatic group, and in two (3.3%) of the asymptomatic group (Table 3). The majority of positive cases were in the age group 21-40 years.

Table (3): Analysis of males examined by age, presence of urethral discharge and presence of *T. vaginalis*

Age (years)	Men with urethral discharge		Apparently healthy men		Total	
	No. examined	No. (%) positive	No. examined	No. (%) positive	No. examined	No. (%) positive
15-20	15	1 (6.6)	10	0	25	1 (4.0)
21-30	32	2 (5.3)	16	1 (6.3)	54	4 (7.4)
31-40	25	2 (8.0)	26	1 (3.8)	51	4 (9.8)
Over 40	12	1 (8.3)	8	0	20	1 (5.0)
Total	90	6 (6.7)	60	2 (3.3)	150	6 (6.7)

DISCUSSION

in this study the rate are lower than those reported in various parts of the world but they still represent an important level from the public health point of view. Higher incidence has been reported in the United States [9], the United Kingdom, and Poland. This variation

may be explained by a difference in hygiene and sanitation and in sexual relations before marriage.

Screening programs using self-collected vaginal swabs [10] for culture may be responsible method for such an effort. An alternative approach would be to first use mount examination, which is relatively easily and inexpensive [11], followed by culture for specimens that are negative in wet mount. Recent development of sensitive and specific urine based diagnostic technique can enhance both the yield and ease of screening efforts [10, 11].

The wet preparations may be replaced in the near future by newer methods such as ELISA or the direct fluorescence antibody test or PCR. Until the sensitivity, specificity and cost of these newer techniques are defined outside the research arena, the wet preparation and culture methods will remain the first diagnostic tools [12].

In this study observed a higher infection rate (16.4%) in Pregnant women. This may be attributed to the hypertrophy and hyperplasia of the vaginal epithelium, as well as to the increase of glycogen deposition in such cells, produced by high estrogen levels [12, 13]. The presence of a relatively large number of positive cases among recently married females is clearly the responsibility of their husbands. In rare cases, the infection may be acquired through innocent means, such as toilet facilities, medical instruments or exchange of underclothing [13]. Other factors such as susceptibility of the host, his physiological condition, the virulence and size of the inoculum, as well as social habits and hygiene conditions, might have an effect on the pathogenesis of *T. vaginalis* [14].

The isolating *T. vaginalis* was higher when the patients presented with urethral discharge, urine examination yield low success for isolation [12, 14]. However, 34% of men affected were sexual partner of women infected with parasite.

REFERENCES

1. Cates W. Jr., "Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel". Sex transm Dis. 26 (4 suppl): S2-1, (1999).
2. Sardana S., Sodhani P., Agarwal S.S., Sehajal A., Roy M., Singh V., Epidemiologic analysis of *Trichomoas vaginalis* infection I inflammatory smears. Acta Cytol. 38: 693-7, (1994).
3. Wilkinson D., Abdool Karim S.S., Harrison A., Lurie M., Colvin M., Connolly C. "Unrecognized sexually transmitted

- infections in rural south Africans women: a hidden epidemic". *Bull World Health Organ* . 77: 22-8, (1999).
4. Hira P.R., "Observation on *T. vaginalis* infection in Zambia". *Topical diseases bulletin* . 75: 6, (1987).
 5. Wilson A., Ackers J.P., "Urine culture for the detection of *T. vaginalis* in men". *British journal of venereal disease*. 56: 46-8, (1980).
 6. Al-Shabandar N., Histopatholglcal studies on *Trichomonas*. M.Sc. Medicine College, university of Baghdad, Iraq, 1979.
 7. Al-Mallon O., Al-Janabi B.M., "The incidence of *Trichomonas vaginalis* among selected groups of women in Mosul". *Iraqi medical journa* , 31: 29-33, (1983).
 8. Kadir M.A., Salehy A.M.S., Hammad E.F., "Studies on *Trichomonas vaginalis* in Erbil teaching hospital". *Journal of the faculty of medicine, Baghdad*. 30: 83-8, (1980).
 9. Miller W.C., Swygard H., Hobbs M.M., Ford C.A., Handcock M.S., Morris M., Schmitz J.L., Cohen M.S., Harris K.M., Uday J.R., "The prevalence of *Trichomonas vaginalis* in young adults in the United States". *Sex. Transm Dis* . 32(10): 593-98, (2005).
 10. Schwebke J.R., Morgan S.C., Pinson G.B. "Validity of self obtained vaginal specimens for diagnosis of Trichomoniasis". *J Clin Microbiol*. 35: 1618-19, (1997).
 11. Ghys P.D., Diallo M.O., Ettigne Traore V., Yeboue K.M., Gnaore E., Lorougenon F., "Genital ulcers associated with human immunodeficiency virus related immuno-suppression in females sex workers in Abidjan. Ivory Coast". *J Infect Dis*., 173: 1371-4; (1995).
 12. Sparks J.M., "Vaginitis", *Journal of reproductive medicine*. 36: 745-52, (1991).
 13. Studd J., *Progress in obstetrics and gynecology*. Vol. 10., London and New York, Churchill Livingstone. (1993).
 14. Joyner J.L., Douglas J.M.Jr., Ragsdale S., Foster M., Judson F.N., "Comparative prevalence of infection with *T. vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic". *Sex. Transm. Dis*. 27: 236-40, (2000).

Peripheral Blood CD3,CD4,CD8 & CD19 Lymphocytes Percentage in Patients with Colorectal Cancer

Batool H. AL-ghurabi

Dep. Of Basic Science -College of Dentistry- University of Baghdad.

(Received 2/10/2006 – Accepted 8/5/2007)

الخلاصة

الورم الصلب يكون مصحوب بانخفاض في المناعة الخلوية و الخلطية لذلك هذه الدراسة تهدف الى تحليل التغيرات في هذه العوامل في مرضى سرطان المستقيم و القولون. تم اختبار الوظيفة المناعية قبل اجراء العملية عن طريق قياس نسبة المعلمة المناعية اللمفاوية 3، 4، 8، 8\4، 19 عن طريق اختبار التآلق المناعي المباشر في 40 مريض مصاب بسرطان المستقيم و القولون مقارنة ب 35 شخصا سليم. كانت نتائج الخلايا اللمفاوية ضمن الحد الطبيعي في كل من المرضى و مجموعة السيطرة، على كل حال مرضى السرطان اظهروا نقص في عدد الخلايا اللمفاوية غير معنوي مقارنة بمجموعة السيطرة. لم يكن هناك أي فروقات معنوية في عدد المعلمات المناعية 3 على الخلايا التائية و 19 على الخلايا البائية بين المرضى و السيطرة. بينما كان هناك نقص معنوي في عدد المعلمة المناعية 4 على الخلايا التائية وكذلك في نسبة المعلمة المناعية 8\4 و بفرق معنوي (قيمة الاحتمالية اقل من 0,001). و من جهة أخرى وجدت زيادة معنوية في عدد المعلمة المناعية 8 على الخلايا التائية (قيمة الاحتمالية اقل من 0,001). جذه النتائج اوضحت أن نشوء و تقدم ورم المستقيم و القولون ينتج عن وجود نقص وظيفي في الجهاز المناعي و تؤكد على أهمية تفسير آليات التحوير المناعي في مرضى السرطان.

ABSTRACT

Solid tumor is frequently accompanied by a depressed cellular and humoral immunity. This study analyzed changes of some of these factors in colorectal cancer patients. Immune parameters were assessed by measuring the lymphocyte percentage of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 ratio, and CD19 by direct immunofluorescence test in (40) patients with colorectal cancer compared to (35) healthy controls. Lymphocytes were in the normal range in patients and controls groups. However, tumor patients showed non-significant lymphopenia in comparison to controls group. There were no significant differences in the percentage of CD3 T-cells and CD19 B-cells between patients and controls. Whereas there were significant decrease in the percentage of CD4 T-cells and CD4/CD8 ratio ($P<0.001$), on the other hand the percentage of CD8 T-cells was

significantly increased ($P < 0.001$). These findings suggest that colorectal tumor establishment and progression results in a malfunction of the immune system, and underline the importance of elucidating in details the mechanisms of immune modulation in cancer patients.

INTRODUCTION

The interactions between host immune system and malignant tumors are very complex, and it has been reported that malignant diseases are

associated with decrease immune competence. Furthermore, changes in the immune system have also been demonstrated to influence the prognosis of the patients (1).

Lymphocytopenia in patients with neoplastic diseases has been associated with poor prognosis (2). Decrease in peripheral lymphocyte counts in patients with breast cancer had been previously attributed to the effects of radiotherapy on T-cells, similarly, lymphocytopenia primarily found in advanced carcinomatosis, had been attributed to the lymphocytotoxic effects of chemotherapy and/or radiotherapy (1).

Recently, evidence has been presented indicating that decrease in lymphocyte counts in patients with colon and breast cancer are independent of treatment and that there is an inverse correlation between tumor stage and levels of pretreatment peripheral lymphocyte counts (3&4).

Patients with malignant diseases and additional immune suppression may have an increase risk for the development of postoperative complications, particularly infections. Therefore, adequate preoperative monitoring of essential immune parameters might identify patients with suppressed immune function and help to select patients with a high risk of postoperative complications.

Furthermore, immune-modulating therapeutic strategies might lead to an improvement in the prognosis of these patients (5, 6).

PATIENTS and METHODS

Patients:

The present study included 40 Iraqi colorectal cancer (CRC) patients (18 females and 22 males; mean age 51 years, ranged between 21-81), they were attending the Gastroenterology and Hepatology Teaching Hospital. Compared with 35 healthy ages and sexes were matched control group.

Methods:

Direct Immunofluorescence Test (DIFT)

Leukocyte surface molecules (CD-antigens) were identified by DIF technique using specific fluorescein labeled monoclonal antibodies including mouse anti-human (CD3, CD4, CD8) T-cells antibodies and CD19 B-cell antibody.

The criterion for immunofluorescence positivity was the presence of numerous fluorescent spots arranged over the surface of the cell, fluorescent caps were also seen (7).

Statistical analysis:

It was assessed using paired (t-test), for exploration of the statistical significance of difference in mean between two groups.

RESULTS

Peripheral lymphocyte counts were evaluated in 40 patients with CRC compared with 35 healthy control group.

There was a slight, but not significant decreased ($p < 0.0001$) in the percentage of lymphocyte in CRC patients [2021.7 ± 960.66] as compared to control group [2289.8 ± 879.12], table-1.

Table (2) pointed out to non significant differences ($p < 0.0001$) in the means percentage of CD3 T-cell and CD19 B-cells between CRC patients [60 ± 11.3 & 18.3 ± 1.85 respectively] and healthy control [68.6 ± 12.5 & 17.6 ± 1.79 respectively]. While the mean peripheral blood of CD4 showed significant decrease in CRC patients [19.9 ± 4.1] in comparison with healthy subjects [40.9 ± 4.1]. On the other hand the mean of CD8 revealed significant increase ($P < 0.001$) among patients with CRC [34.7 ± 4.2] when compared with control group [20.0 ± 1.9].

Regarding the mean of CD4/CD8 ratio in patients and controls, the present study showed significant decrease ($P < 0.001$) in CD4/CD8 ratio among CRC patients as compared to healthy control, table 3.

Table-1: The differences in mean percentage of lymphocytes count (cell/cu.mm) between the patients with CRC and healthy group.

	Colorectal cancer cases no.=40	Healthy Control no.=35	P (t-test)
Lymphocyte count			
Minimum	230	980	
Maximum	5100	5772	
Mean	2021.7	2289.8	NS*
SD	960.66	879.12	

*NS: non significant

Table-2: The differences in mean percentage of CD3, CD4, CD8 & CD19 (cell/cu.mm) between patients with CRC and healthy group.

	Colorectal cancer cases no.=40	Healthy Control no.=35	P (t-test)
CD3 T-cell			
Minimum	57	59	
Maximum	65	72	
Mean	61.2	68.6	NS*
SD	11.3	12.5	
CD4 T-cell			
Minimum	14	38	
Maximum	28	47	
Mean	19.9	40.9	P<0.001
SD	4.1	4.1	
CD8 T-cell			
Minimum	30	18	
Maximum	45	23	
Mean	34.7	20.0	P<0.001
SD	4.2	1.9	
CD19 B-cell			
Minimum	15	12	
Maximum	22	19	
Mean	18.3	17.6	NS*
SD	1.85	1.79	

*NS: non significant

Table-3: Comparing the CD4/ CD8 ratio in the two study groups.

Study Groups	CD4 Mean	CD8 Mean	CD4 / CD8 Ratio	P (T-test)
Colorectal cancer (40)	19.9	34.7	0.5	P<0.001
Healthy control (35)	4.09	20.0	2.0	

DISCUSSION

Enumeration of T and B lymphocytes subpopulations has been reported to be useful indicators of immune modulation reflecting the stage of malignant colorectal disease (4).

The present study found that patients with colorectal cancer have a slight, but not significant decrease in the percentage of lymphocytes count (cell / cu.mm) compared to healthy control. This finding corresponds to that of other reports (8&9).

In agreement with previous studies (8, 9 &10), the present data demonstrate the presence of an immune dysfunction in patients with CRC manifesting by non significant decrease in CD3T-cells, significant decrease in CD4 T-cells and CD4/CD8 ratio, significant increase in CD8 T-cells, as well as no differences in CD19 B-cells.

Melichar and co-workers pointed out to the significant reduction in CD3, CD4, and CD4/CD8 ratio in CRC than in healthy control (11). However, it was noticed in addition to the above finding that the median number of CD4 T-cells in CRC patients with recurrences were significantly lower in comparison to patients without recurrences and healthy control, they concluded that that the reduction in CD4 T-cells occurs before detectable recurrence in CRC and therefore might be an important parameter in the early detection of tumor recurrence in CRC.

These result support hypothesis that tumor growth may cause the destruction of T-cells by a variety of different mechanisms including Fas- counterattack or antigen activation-induced cell death (9). Similarly to human immunodeficiency virus (HIV) infection, systemic immune activation may be associated with antigen activation-induced death of peripheral blood lymphocytes leading to CD4 T-cells lymphopenia (10).

Fuchs and colleagues (11) demonstrated that, similarly to patients with HIV infections, an inverse relation exists in cancer patients between peripheral blood CD4 T-cell counts and urinary concentrations of neopterin, which is a marker of systemic immune activation. On the other hand Wachter et al., (12), illustrated that the control of tumor growth by chemotherapy may also inhibit the direct or indirect destruction of T-cells. However, some T-cells may be destroyed by chemotherapy and this effect may be more visible in patients with normal CD4 T-cell number. It is likely that in patients with normal initial CD4 T-cell counts little or no tumor-induced T-cell destruction is taking place, therefore the reduction of T-cell number by chemotherapy may prevail.

In conclusion these finding suggest that colorectal tumor establishment and progression result in a malfunction of the immune

system, and underline the importance of elucidating in detail the mechanisms of immune modulation in cancer patients.

REFERENCES

1. King J, Caplehorn J, Ross W, Morris D. High serum carcinoembryonic antigen concentration in patients with colorectal liver metastasis is associated with poor cell mediated, which is predictive of survival. *Br.J. Surg.*84: 1382-85, (1997).
2. Riesco O. Five-year cancer cure relation to total amount of peripheral lymphocytes and neutrophils. *Cancer.*25:135-140, (1970).
3. Kim US, Papatestas AE, Aufses AH. Prognostic significance of peripheral lymphocyte counts and carcinoembryonic antigens in CRC. *J.Surg. Oncol.*8 (1):38-41, (1976).
4. Ordemann J, Jacobi CA, Braumann C, Muller JM. Immunomodulatory changes in patients with CRC. *Int. J. colorectal. Dis.*17:37-41, (2002).
- 5- Shibata M, Takeshi N, Kanou H. Immunomodulatory effects of low dose Cis-Diamine dichloro platinum (Cisplatin) combined with UFT and PSK in patients with advanced CRC. *Cancer-Invest.* 20 (3): 162-70, (2006).
- 6- Fukuzawa M, Taskesh N, Hisao K. Decreased production of IL-12 and type 2 immune response are marked in cachectic patients with CRC and egastric cancer. *J. Clin. Gastroentrol.* 34 (4): 416-20, (2004).
7. Winchester RJ, Ross GD. Methods for enumerating cell population by surface markers with conventional microscopy. In: Rose NB, Fridman H, Fahey JL "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 3rd .ed. 212-25, (1986). American Society for Microbiology, Washington.
8. Melichar B, Touskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky O. The phenotype of peripheral blood leukocytes and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumor. *Proc.AACR.*41:621, (2000).
9. Uzzo RG, Rayman P, Kolenko V. Mechanisms of apoptosis in T-cells from patients with renal cell carcinoma. *Clin.Cancer.Res.*5:1219-29, (1999).
10. Finkel TH, Banda NK, Cotton MF, Monks C, Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat.Med.*1:129-34, (1995).
11. Fuchs D, Banekovich M, Hausen A, Hutter J, Werner ER, Dierich MP. Neopterin estimation compared with ratio of T-cell

subpopulations in persons with HIV-1. Clin. Chem. 34:2415-17, (1988).

12. Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnigger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: Immunological basis and clinical application. Adv. Clin. Chem. 27:81-141, (1989).

Further Studies On the Nonspecific Activation of Mice Peritoneal Macrophage with Rhizobium trifoli Polysaccharide

Khedhir Hassan Ali Al-Jorany - Magdah Ibrhim Fattah

Department of Biology / Faculty of Science/University of Al-Mustansiriyah

(Received 7/11/2006 – Accepted 17/4/2007)

الخلاصة

تشارك البلاعم والخلايا الشجرية بدور مهم في المناعتين المتأصلة والمهياة. استطعنا في هذه الدراسة من إثبات أن عديد السكريد شبه المنقى من الرايزوبيوم تراكبولي، يستطيع أن يفعل البلاعم الراقدة من الجوف البطني للفأر.

فقد أثبت أن 1 مايكروغرام يحفز البلاعم بعد تعرضها ليوم أو يومين، مقارنة بالسيطرة الموجبة والبلاعم غير المحفزة.

تبين أن البلاعم كبيرة الحجم كانت الأكثر تفعيلاً مقارنة بالبلاعم ذات الأشكال الوسط والممتدة.

أظهرت النتائج أيضاً أن البلاعم المفعلة استطاعت من بلعمة وقتل هدفها الكانديدا البكنس وكانت النتائج إحصائياً ذات شأن. أكدت النتائج أن البلاعم المحفزة تعبر تعبيراً عالياً لمستقبل القطعة المتبلورة للضد IgG عند تفعيلها بذات عديد السكريد آنف الذكر.

وكانت البلاعم الكبيرة أكثر البلاعم تفعيلاً مقارنة بالأشكال الأخرى وتلى ذلك التفعيل بلعمة مناعية ذات شأن.

نوقشت النتائج في ضوء دور الخلايا المناعية المفعلة في المناعتين المتأصلة والمهياة.

ABSTRACT

Macrophage and dendritic cells play a crucial important roles in both innate and adaptive immune reponses.

We demonstrate, further, that a semipurified preparation of Rhizobium trifoli polysaccharide (RPS) was capable of activating resting peritoneal macrophage in vitro. Macrophage exposed to graded doses of the polysaccharide for either 24 hour or 48 hours, manifested a highly significant activation compared to positive and negative controls. Optimal activation occurred at 1 µg dose for 24 hour and the activation was seen in the large, intermediate as well as extended populations of macrophage. These activated cells showed enhanced Candida albicans phagocytosis and killing potentials.

In addition, the findings presented demonstrated also, an increase in Fcγ receptor expression, these activated macrophage showed highly significant enhanced immune phagocytosis compared to controls.

The significance of the results are discussed based on the role of these activated cells in innate and adaptive immunities.

INTRODUCTION

Macrophage and dendritic cells are the first immune effectors to handle antigens, macrophage play an important role in immune surveillance as well as antigenic presentation through CD1d molecules providing a first step in the activation of NKT cell and innate immunity (1), like wise macrophage are the first cell to present antigens through class – 2 and commanding the initiation of the adaptive immune response. Similar roles could be provided by dendritic cells, besides they play an essential role in tolerance maintenance (2).

Immune adjuvants could enhance macrophage function that could be used to help irradiate nonself (3-4), tumor cells, and many other immune functions.

Previously we showed an adjuvant activity in Rhizobium trofoli polysaccharides (5-6).

Further, we extended our observations and we demonstrated here, that macrophage exposed to this polysaccharide showed enhanced nonimmune as well as immune functions.

MATERIALS and METHODS

Mice

Eight – ten weeks Balb/c mice of both sexes were used in all experiments.

Rhizobium polysaccharide

The material was prepared essentially as in (6), and stocked in ethanol, Salmonella abortus LPS (Sigma, Germany) was used as positive control stimulator, doses of the polysaccharide was prepared in RPMI – 1640 medium (Flow Laboratories, Scotland), containing 5-10% fetal calf serum, and antibiotics.

Mice peritoneal macrophages were obtained by injecting 3 ml of the medium alone containing 5 IU/ml heparin into the peritoneal cavity followed by massaging the abdomen and collecting the exudate cells. The viability (Trypan blue) as well as counting were done using conventional methods.

Macrophage activation

Microtitration plate of 24 wells (Flow labs, Scotland) were used to culture macrophage. Wells containing round coverslips were loaded with 1 ml of exudate cells containing 10⁶ cells/ml. Macrophages were allowed to adhere for 1 hour at 37°C in a humidified CO₂ incubator, washed with phosphate buffered saline and exposed to polysaccharide doses in RPMI - medium.

This cultivation procedure was used to study macrophage activation (forms populations), according to (7), study phagocytosis and Fc γ receptor expression as will be seen below.

Macrophage phagocytosis of *Candida albicans* and candidicidal activity was done according to (8).

Fc γ expression was done using commercial anti – D to coat O+ RBCs, and as follows: the red blood cells were sensitized with subagglutinating quantity of anti – D, washed thrice, and prepared in RPMI –1640 medium. A ratio of 5:1 RBCs:macrophage was used to study receptor Fc receptor expression as well as phagocytosis. For Fc R expression study, the interaction of anti – D sensitized RBC with macrophage was allowed for 20 minutes and slides were prepared for Giemsa stain. However, for phagocytosis, the interaction of RBCs with macrophage was allowed for 1 hour.

Both nonsensitized and sensitized RBCs interaction with macrophage were run in parallel. Rosetting and nonrosetting macrophages were fixed with 4% glutaraldehyde in PBS, and stained with Giemsa, 100 cells were counted and percent rosetting cells as well as percent phagocytic cells were calculated accordingly.

Statistical analysis was done using t-test.

RESULTS

Activation of macrophage with graded doses of *Rhizobium* polysaccharide

Peritoneal macrophages exposed in vitro to graded doses of *Rhizobium* polysaccharide (RPS), showed activation manifested through their morphological changes. Table 1. the degree of activation was highly significant $P < 0.001$ at $1 \mu\text{g}$ and 24 hour treatment, compared to *Salmonella* lipopolysaccharide (LPS) at $1 \mu\text{g/ml}$ or untreated control cells. The activation is seen in the large peritoneal macrophage population 62.4 ± 1.4 vs 41.3 ± 2.8 LPS treated control and 61.6 ± 1.4 untreated control. The mean number as well as the degree of significant results were also demonstrated at the intermediate and extended forms of the macrophage. However, at 48 hours, there was still activation but less than the 24 hour exposure time.

Induction of activated, candidicidal macrophage

To determine further that the activated macrophage got the ability to engulf and destroy *Candida albicans*. Macrophages were exposed to graded doses of RPS, then assessed for their phagocytosis as well as candidicidal activities.

As shown in table 2, there seems a dose dependent increase in ingestion and the intracellular killing of yeast cells 24 hours post activation. An optimal dose was $1 \mu\text{g}$ RPS, and % phagocytosis of test was 71.3 ± 7 vs 55 ± 4.5 of control $P < 0.05$.

In addition % candidicidal activity was 57.3 ± 3.2 of test vs 25.6 ± 5.6 of control $P < 0.05$. This was accompanied by increased in number of engulfed *Candida* as criterion for activation. $482 \pm 2.6/200$ counted cells of test vs $351 \pm 7.0/200$ counted cells of control $P < 0.001$.

The degree of phagocytosis and killing decreased at 48 hours post activation, with a significant result at $1 \mu\text{g}$ treatment dose also.

Increased expression of Fc gamma receptor (FcγR) in activated macrophage

The degree of FcγR expression in RPS activated macrophage was studied. Red blood cells sensitized with an IgG anti – D antibody were used and the criterion of rosette formation was assessed.

As shown in table 3, an optimal dose of 1 μg was shown to affect a significant $P < 0.05$ increase in resettle macrophage number. 63.7 ± 4.6 in test vs 47 ± 3.0 in control, and the same dose affected a significant $P < 0.05$ increase in % phagocytosis as well as immune adherence. $1264 \pm 18.2/100$ macrophages vs $542 \pm 15.6/100$ macrophages of control $P < 0.001$. The significant activation proceeded during the 48 hours postactivation.

In table 4, shown the nonimmune attachment of non – IgG – sensitized RBCs. The results presented in this table show that 1 μg activated macrophage brought about increase in % resettle forming cells, % phagocytosis attachment in the test compared to control, in both the 24 and 48 hrs. postactivation.

In addition, 1μg activated macrophage showed an increase adherence to sensitized O – RBCs compared to nonsensitized O – RBCs and the activated form was the highly potent compared to intermediate and extended forms (Fig.1).

DISCUSSION

Several reports described the nonspecific activation of macrophage and many stimuli were used as activators (adjuvants) including LPS from *Escherichia coli* (9), glucan from yeast (10), however, toxicity of lipid A in *E. Coli* LPS (Kiener et al 1988) and difficulty in extracting yeast adjuvant components encouraged to search for alternative. In our previous reports *Rhizobium* polysaccharide fulfilled the need for easy source of activating adjuvant (5-6), in this report we extend our previous findings. The results shown in table 1 provide evidence that there is a dose dependent activation of resting peritoneal macrophage, which means that there is a target for the RPS used in the macrophage, however, in-depth experiment, are required to address this notion. Nonetheless, a dose of 1 μg was potent to activate a population of large macrophage and the polysaccharide used was superior to that of *Salmonella* LPS used as positive activator, at a comparable dose. (Table 1), the activation and its association with macrophage volume was demonstrated (11).

In further subsequent experiments, optimally activated macrophage showed enhanced phagocytic activity, associated with increased killing of target (Candida albicans yeast form).

The increased phagocytosis and candidicidal activity were statistically significant compared to Salmonella LPS activated macrophage and untreated control macrophage (table 2).

The killing of yeast was shown to go parallel with increased in O₂ – burt microbicidal activity in th RPS activated macrophage (data not shown) and may be also linked to another, yet undefined mechanisms.

In another set of experiments, the upregulation of FcγR was demonstrated in table 3.

FcγR (CD16a) is expressed in neutrophil, macrophage and NK cell, these cells are a crucial part of innate immunity (1-2), and the receptor is an essential part that is engaged in phagocytosis and ADCC. The activation seen in macrophage that accompanied by increas in FcγR will potentiate the immune function of macrophage and propably neutrophil and NK cells. Signal delivered to macrophage by RPS immunomodulator is not known, however, LPS – activated macrophage demonstrated an active role of serine kinase that phosphorylate P65/L – plastin in macrophage (12).

The signal provided by RPS stimulation is not Known. However sugar moiety in the polysaccharide could play a role. In addition molecular pattern provided by the polysaccharide could furnish the required ligand for Toll Like Receptors (TLR) in the macrophage (2). This pathway is a crucial part in the innate nonspecific immune reponse pathway, that if triggered will turn on and amplify the adaptive specific immune response (1). The fact that neutrophil, macrophage, and NK cells share the same FcγR and most of these cells have TLRs, will provide some clue to the nonspecific activation of the innate macrophage cells shown in this report. Additional studies are needed to reach to a conclusion.

In another experiments, the adherance of antibody sensitized and nonsensitized red blood cells to activated forms of macrophages was studied. After 24 hours activation with RPS, the optimal dose was 1 µg and the most form demonstrated adherance was the large population of macrophage Fig. 1. In this figure also shown the fraction of nonsensitized red blood cells contribution to the

adherence phenomenon (15 ± 0.0 RBCs/macrophage when using sensitized RBCs vs 8.6 ± 0.5 when using nonsensitized RBCs), at $1 \mu\text{g}$ activation dose. In the same figure there is an overall increase order of adherence in large, intermediate as well as extended forms of activated macrophage.

In subsequent experiments, the degree of FcR expression was enumerated after 1 hour incubation of sensitized RBCs and macrophage.

The findings (data not shown) gave enhanced, significant receptor expression, adherence then phagocytosis. These data signify that adherence was followed by phagocytosis.

The immunomodulating activity of RPS to the innate immune system will provide ways to potentiate the cells of the system in tumor immunotherapy as well as other areas.

Table 1: Effect of different doses of Rhizobium polysaccharide on macrophage activation, manifested by forms changes.

<u>Rhizobium</u> PC $\mu\text{g}/\text{r.l}$	Means $\pm$ S.D. of macrophages		
	Large	Intermediate	Extended
Activation for 24 hrs.			
10	49.6 $\pm$ 3.4	27.2 $\pm$ 4.3***	23.3 $\pm$ 7.2**
1	62.4 $\pm$ 6.3***	23.1 $\pm$ 1.8***	14.6 $\pm$ 6.7**
0.1	32.2 $\pm$ 1.2	48.3 $\pm$ 7.7**	19.4 $\pm$ 7.8**
0.01	16.5 $\pm$ 8.8	72.6 $\pm$ 6.0	10.8 $\pm$ 3.9
LPS	41.3 $\pm$ 2.8**	48.3 $\pm$ 7.7**	10.42 $\pm$ 4.9
Control	16.6 $\pm$ 1.4	80.5 $\pm$ 1.3	2.8 $\pm$ 3.5
Activation for 48 hrs.			
10	29.4 $\pm$ 3.0**	54.1 $\pm$ 5.4	16.5 $\pm$ 3.6**
1	31.8 $\pm$ 6.6**	56.8 $\pm$ 5.7	11.4 $\pm$ 1.0**
0.1	18 $\pm$ 3.5**	74.9 $\pm$ 3.6	6.9 $\pm$ 1.8
0.01	11.4 $\pm$ 2.9**	80.4 $\pm$ 3.3	8.3 $\pm$ 2.2
LPS	19.6 $\pm$ 3.6**	73.6 $\pm$ 6.2	6.8 $\pm$ 3.5
Control	9.5 $\pm$ 2.8	84.7 $\pm$ 0.9	5.8 $\pm$ 2.1

** Significant at $P < 0.05$ *** Highly significant at $P < 0.001$

Table 2: Phagocytic and candidicidal activities of macrophages exposed to Rhizobium polysaccharide doses for 24 and 48 hours.

RPS Concentratioon µg/ml	%		Mean number of candida/200 macrophage±S.D.
	Phagocytosis	Candidicial activity	
Activation for 24 hrs			
10	70.3±7.2	40.6±5.5**	466±11.7***
1	71.3±7**	57.3±3.2**	482±2.6***
0.1	58±3.0	37±6.2	391±3.6***
0.01	53.6±5.0	30±2.0	378±6.0**
LPS	61.3±8.9	39±7.2	478±4.3
Control	55±4.5	25.6±5.6	351±7.0
Activation for 48 hrs.			
10	52.6±7.7	37.6±4.6**	386±3.5***
1	60.3±4.0**	37.6±4.1**	398±3.4***
0.1	47.6±11.5	30±1.0	366±14.1**
0.01	45.3±4.9	24.3±1.5	346±7.2**
LPS	53.6±7.5	31±2.0	384±10.8**
Control	43.3±5.8	25.6±4.0	324±6.5

** Significant at $P < 0.05$

*** Highly significant at $P < 0.001$

Table 3: The activity of RPS activated macrophage to express Fc receptor and engulf antibody sensitized red blood cells.

RPS Concentration $\mu\text{g/ml}$	%Rossette forming cells	%Phagocytosis	Mean number of adhered RBCs/100 macrophage(mean $\pm$ S.D.)
Activation for 24 hrs.			
10	56.3 $\pm$ 1.5**	9 $\pm$ 1.0**	1189 $\pm$ 8.3***
1	63.7 $\pm$ 4.6**	12.3 $\pm$ 1.5**	1264 $\pm$ 18.2**
0.1	59.7 $\pm$ 1.5**	3.6 $\pm$ 2	709 $\pm$ 35.2**
0.01	50 $\pm$ 5.5	3.3 $\pm$ 1.5	701 $\pm$ 25.3***
LPS	55.6 $\pm$ 3.2**	3.6 $\pm$ 2.0	904 $\pm$ 23***
Control	47 $\pm$ 3.0	4.3 $\pm$ 1.1	542 $\pm$ 15.6
Activation for 48 hrs.			
10	51.3 $\pm$ 1.5***	4.3 $\pm$ 2**	802 $\pm$ 8.6***
1	56.3 $\pm$ 3.2***	5.7 $\pm$ 2.0**	889 $\pm$ 7.5***
0.1	43 $\pm$ 3.6	1.3 $\pm$ 2.5	560 $\pm$ 8.7***
0.01	33 $\pm$ 2	1.2 $\pm$ 0.2	546 $\pm$ 4.5***
LPS	44.6 $\pm$ 4.1**	3.3 $\pm$ 1.5**	584 $\pm$ 7.8***
Control	35.7 $\pm$ 2.5	0.7 $\pm$ 0.5	450 $\pm$ 8.7

** Significant at $P < 0.05$ *** Highly significant at $P < 0.001$

Incubation of antibody + sensitized RBCs with macrophage was for 20 minutes

Table 4: The activity of RPS activated macrophage to adhere to nonsensitized red blood cells (spontaneous rosetting) and subsequent engulfment.

RPS Concentration $\mu\text{g/ml}$	%Rossette forming cells	%Phagocytosis	Mean number of adhered RBCs/100 macrophage(mean $\pm$ S.D.)
Activation for 24 hrs.			
10	46 $\pm$ 2**	4 $\pm$ 0.5	245 $\pm$ 4.5**
1	54.7 $\pm$ 6.5**	3.6 $\pm$ 1.0	262 $\pm$ 2.6***
0.1	33.6 $\pm$ 2.8**	1.6 $\pm$ 1.5	210 $\pm$ 5.5
0.01	29.6 $\pm$ 3.5	1.3 $\pm$ 0.5	199 $\pm$ 78
LPS	34.7 $\pm$ 5.6	6.3 $\pm$ 0.5**	225 $\pm$ 4.5**
Control	29 $\pm$ 6.5	2.6 $\pm$ 0.5	195 $\pm$ 12.2
Activation for 48 hrs.			
10	26 $\pm$ 4.5	0	209 $\pm$ 6.9***
1	32 $\pm$ 2.6***	0	221 $\pm$ 8.1***
0.1	32.6 $\pm$ 3.5**	0	185 $\pm$ 7.2**
0.01	26 $\pm$ 4.5	0	161 $\pm$ 5.2**
LPS	26 $\pm$ 2	0	178 $\pm$ 8.1**
Control	20.3 $\pm$ 3.2	0	151 $\pm$ 2.6

** Significant at $P < 0.05$ *** Highly significant at $P < 0.001$

Incubation of non-sensitized RBC's with macrophage was for 20 minutes

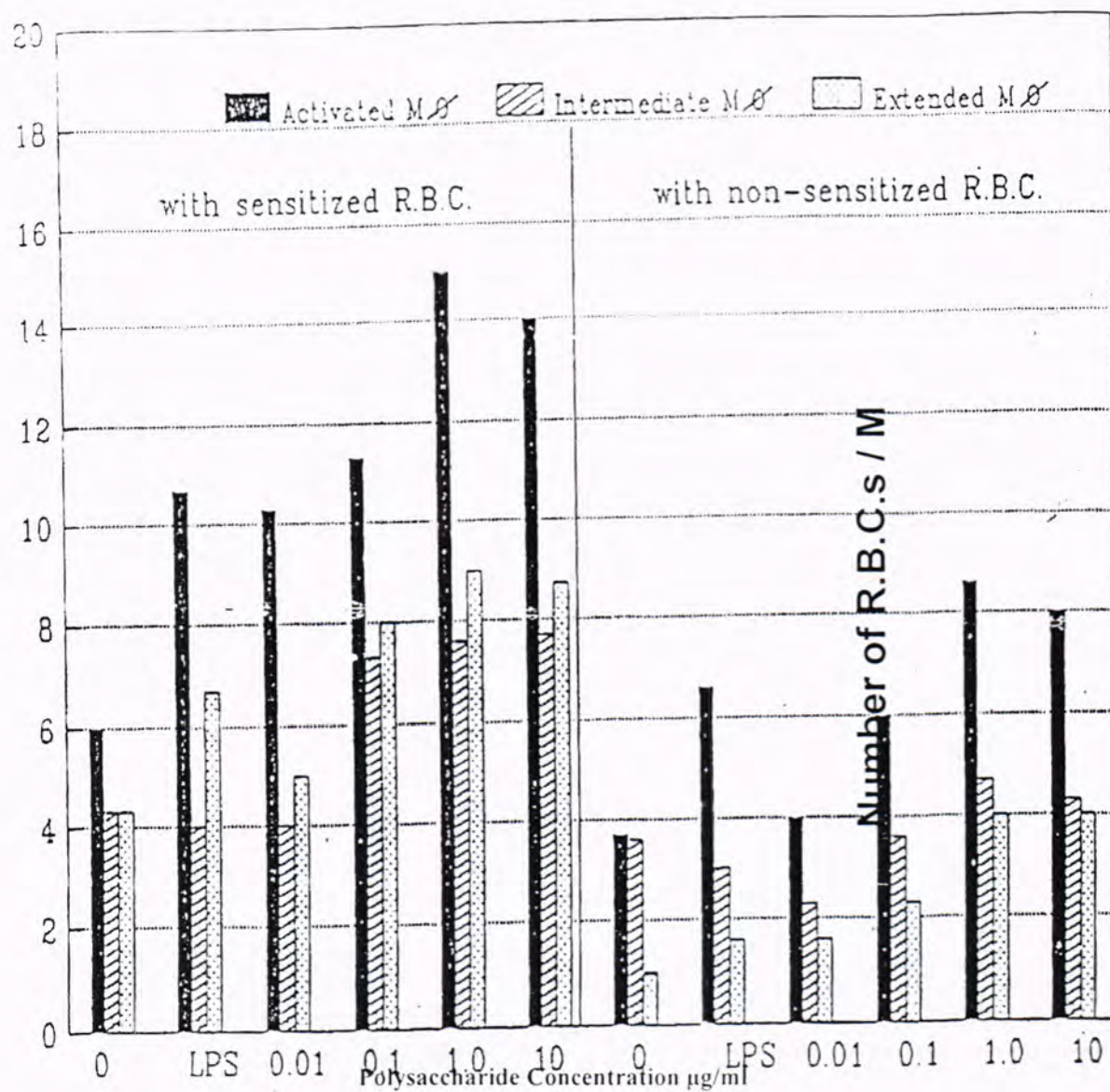


Figure 1: Number of (sensitized and non – sensitized) RBCs attached to each form of 24 hrs. activated macrophages by different concentrations of Rhizobium polysaccharide.

REFERENCES

- (1) Seino, K.I. and Taniguchi, M. NKT cells : A regulator in both innate and aquired immunity. *Curr. Med. Chem – Anti – Inflammatory and Anti – Allergy Agents*, 4:59-64, (2005).
- (2) Lipscomb, M.F. and Masten B.J. Dendritic cells : immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.*, 82:97-130. (2002).
- (3) Yan, J.; Vetvicka, v.; Xia, Y.; Coxon, A.; Carroll, M.C.; Mayadas, T.N. and Ross, G.D. β – Glucan a specific biologic response modifier that uses antibodies to target tumor for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J.Immunol.*, 163:3045-3052,. (1999).
- (4) Xia, Y.; Vetvicka, v.; Yan, J.; Hanikyrova, M.; Mayadas, T.N. and Ross, G.D. The β – Glucan binding lectin site of mouse CR₃ (CD11b/CD18) and it's function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC_3b – opsonized target cells. *J.Immunol.*, 162:2281-2290, (1999).
- (5) Al-Jorany, K.H.A. and Al-Ani, R.A. The role of Rhizobium polysaccharides in the activation of the phagocytic system. *Kufa Med. J.*, 1:63-71, (1989).
- (6) Al-Jorany, K.H.A.; Al-Ani, R.A. and Al-Shanawi F. Increased candidicidal and leishmanicidal activities of macrophages exposed to a semipurified Rhizobium polysaccharide in vivo. *Iraqi. J. Biol. Sci.*, 11:77-86, (1991).
- (7) Crowle, A.J. and May, M. A hanging drop macrophage function test. *J. Reticuloendothelial. Soc.*, 24:169-185, (1978).
- (8) Cline, M.J. and Lehrer, R.I. Phagocytosis by human monocytes. *Blood*, 32:423-435. (1968).
- (9) Ellner, J.J. and Spagnoulo, P.J. Suppression of antigen and mitogen induced human T-lymphocyte DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharides : mediation by monocyte activation and production of prostaglandins. *J. Immunol.*, 123:2689-2695, (1979).
- (10) Schultz, R.; Papamatheakis, J. and Chirigos, M. Tumoricidal effect in vitro of peritoneal macrophages from mice treated with glucan. In *Immune Modulation and Control of*

Neoplasia by Adjuvant Therapy. Ed Chirigose, M. pp. 241-248. Raven Press. N.York (1978).

- (11) Bernaudin, J.F.; Hamauchi, K.; Wewers, M.D.; Tocci, M.J.; Ferrans, V.J. and Crystal, R.G. Regulation of cell volume and amount of mRNA of IL-1 synthesis in LPS activated macrophages. *J. Immunol.*, 140:3822-3829, (1988).
- (12) Hagi, A.; Hirata, H.; Shinomiyah, H. Analysis of a bacterial LPS – activated serine kinase that phosphorylate P65/L – platin in macrophage. *Microbiol. Immunol.*, 50:331-335, (2006).

Purification And Partial Characterization Of Extracellular Lipase From *Pseudomonas fluorescens*

Sahira N. Muslim

Dept. of Biology, College of Science / Al-Mustanairiya university, Baghdad-Iraq .

(Received 10/4/2007 – Accepted 6/6/2007)

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحصول على 12 عزلة بنسبة 34% تعود لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* من مجموع 35 عينة ماء مأخوذة من نهر دجلة. تم اختبار العزلة التي أنتجت إنزيم lipase بكمية عالية لاستخلاص وتنقية ذلك الإنزيم بمرحلتين هما الترسيب بالايثانول والتبادل الأيوني باستخدام DEAE-sephadex A-25 وبحصيلة نهائية 33%. تم توصيف إنزيم lipase المنقى ووجد بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم lipase هو 8 وباستخدام الرقم الهيدروجيني 9 فإن الإنزيم فقد 64% من فعاليته الأصلية. ووجد بأن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم lipase هي 30°م، بينما في درجة الحرارة 50°م فإن الإنزيم فقد 94% من فعاليته الأصلية. فضلا عن ذلك تم دراسة تأثير بعض العناصر المعدنية والمذيبات العضوية على فعالية إنزيم lipase ووجد بأن بعض العناصر المعدنية مثل الكالسيوم Ca^{2+} كان أكثر تأثير من المغنيسيوم Mg^{2+} في زيادة فعالية إنزيم lipase وهذه النتيجة تؤكد بأن إنزيم lipase هو إنزيم معدني، كذلك وجد بأن المذيب العضوي هكسان n-hexane أدى إلى زيادة الفعالية إلى 180%. لذلك هذه التجربة قادت إلى زيادة الفائدة باستخدام إنزيم lipase كدواء لعلاج القصور البنكرياسي، التليف الكيسي، القولون المشلول، مرض كرونز ومرض سلياك، هضم الدهون، تحويل الدهون إلى طاقة وتنظيف الاوردة والشرابين المعرقة.

ABSTRACT

Twelve *Pseudomonas fluorescens* isolates (34%) were obtained out of 35 water samples from Tigris River. The isolate that produced lipase enzyme in higher level was selected to purify lipase enzyme through two stages of purification including: (ethanol precipitation and ion exchange chromatography by DEAE-sephadex A-25) with almost 33% recovery. The purified lipase was characterized: the optimum activity for lipase was reached at pH= 8 and lost most of its activity (64%) at pH= 9. The optimum temperature was observed at 30°C and lost most of its activity (94%) at 50°C. The effect of some cationic metals and organic solvents on lipase activity was also studied, since the presence of Ca^{2+} was shown to be more effective than that of Mg^{2+} in increasing lipase activity, and this indicates that lipase is a metalloenzyme. Also shown that n-hexane led to increase lipase activity to 180%. Therefore, this experiment lead to increase benefit in using the lipase as a drug for treatment the pancreatic insufficiency, cystic fibrosis, spastic colon, Crohn's disease and celiac disease, digestion of fats, conversion of fats to energy and cleaning the clogged veins and arteries.

INTRODUCTION

The bacterial genus *Pseudomonas* includes different species such as *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* which are common inhabitants of soil and water (1). *Pseudomonas fluorescens* a non fermentative gram negative bacilli, motile and produced pyoverdine (fluorescein), a yellow fluorescent, and water-

soluble(but not chloroform soluble) pigment under iron-limited conditions (2,3).

This bacterium in nature might be found in a biofilm, attached to some surface or substrate, or in a planktonic form, as a unicellular organism, actively swimming by means of its flagellum. *Pseudomonas fluorescens* is one of the most vigorous, fast-swimming bacteria seen in pond water samples(4). It has a predilection for growth in moist environments, which is probably reflection of its natural existence in soil and water (4).

Pseudomonas fluorescens is a very virulent opportunistic pathogen, that causes gastrointestinal infections, urinary tract infections, respiratory system infections, dermatitis, bacteremia and a variety of systemic infections(1). In addition, there are extracellular enzymes, which are produced by this bacterium, such as esterase, lipase and protease(5). It is isolated from skin rashed and ear infections associated with recreational water(6). Spread occurs by the ingestion of contaminated foods and water(4), besides to contamination of wounds with mud, soil or water(1).

Lipases are widely distributed among animals, plants and microorganisms (7). Lipases (triacylglycerol acylhydrolases) are enzymes that hydrolyse fatty acyl ester bonds of acylglycerols at the interface between oil and water(8,9). Interest in lipase began with the discovery that lipase supplements benefit in digestion of fats, conversion fats to energy, cleaning the clogged veins and arteries, and treatment the pancreatic insufficiency, cystic fibrosis, spastic colon, Crohn's disease and celiac disease(10,11,12,13). For this reason, the aim of present work was to

purify lipase and to study the effect of pHs, temperatures, cationic metals and organic solvents on lipase activity.

MATERIALS and METHODS

Samples collection:

Thirty-five water samples (500ml) were collected in sterile containers (1 liter) from the Tigris River in Baghdad city. The water samples were filtered through 0.45 μ m pore size nitrocellulose filters, the filters are then vortexed in peptone broth for recovering the bacteria. After removing the filters, the bacteria were incubated at 30°C for 20 hours and then centrifuged (14).

Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens*:

Samples were plated on blood agar and MacConkey's agar plates. Plates were incubated at 30°C for 18-24h. (2). Several biochemical tests were done to differentiate *Pseudomonas fluorescens* from the other species. These include the following tests: inability to ferment lactose, a positive oxidase reaction, its fruity odor and its ability to grow at 42°C. Also *Pseudomonas fluorescens* is easily recognized as it secretes large amounts of fluorescent pigment called pyoverdine (fluorescein), a yellow, fluorescent and water-soluble pigment which fluoresces under short wave-ultraviolet light at 254 nm (2,15). Besides API 20E identification to differentiate *Pseudomonas fluorescens* from the other types.

Lipolytic activity on media:

Lipase indicator plates were prepared by addition of 15 ml of an emulsion of 50% (vol/vol) tributyrin and 5% (wt/vol) gum

arabic to 500 ml of molten nutrient broth agar medium.tributyrim was emulsified by sonication for 3 min at 75W(duty cycle 100%).Lipase activity was indicated by the formation of clear halos around the colonies of *Pseudomonas fluorescens* (16)

Purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*:

Pseudomonas fluorescens extracellular lipase was purified by a modification of the method (17).Cells were grown in a medium containing 8g of nutrient broth and 4g of NaCl per liter in a 500ml flask and incubated at 30°C in shaking incubater for 18-24h(18).Supernatants were carefully removed after centrifugation at 10000xg for 30min at 4°C and filtered through 0.22µm Millipore filters.Lipase activity in supernatant was assayed.The supernatant was treated with ethanol at ratio of saturation 60%.The mixture was centrifuged, then to the supernatant lipase activity was assayed.The supernatant was dialazed against distilled water and the lipase activity was assayed.

The supernatant was loaded on chromatographic column (2.5 by 25cm) containing 100ml of diethyl aminoethyl(DEAE)-sephadex A-25 which has been equilibrated with 20mM Tris buffer, pH=8.The column was washed with 5 to 10 volumes of the above buffer.The enzyme was eluted with a gradient elution from 0.2-0.5M NaCl solutions.The fractions(5ml) were collected and assayed for lipase activity.

Lipase assay:

Lipase assay was conducted by a modified method based on (16).30 mg of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) was dissolved in 10ml of 2-propanol at 60°C and added to 90ml of 100mM

potassium phosphate buffer (pH= 7.0) containing 10mM MgSO₄ to yield a final concentration of 1mM *p*NPP. Culture supernatant (5-50μl) was added to the substrate solution to give a final volume of 2.5ml, the solution was incubated for 15min at 37°C and the absorbance was measured at 410 nm. One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme that produced an absorbance at 410 nm equivalent to 1μmol of *p*-nitrophenol in one min under the assay conditions.

Protein assay:

Analysis for protein was carried out by the method(19) by spectrophotometric assay at 600 nm in each stage of lipase purification.

Effect of pH on lipase activity:

Lipase activity was assayed at different pH values ranging from 4 to 9 by using *p*NPP as substrate. The buffers used were the following: for pHs 4 and 5, 25mM acetate buffer; for pHs 6 and 7, 25mM phosphate buffer; and for pHs 8 and 9, 25mM Tris-HCl buffer and lipase activity was measured at 30°C.

Effect of temperature on lipase activity:

Lipase activities were assayed in reaction mixtures of *p*NPP containing Tris-HCl pH =8 at a range of temperatures from 10 to 50°C to determine the optimum lipase activity.

Effect of some cationic metals and organic solvents on lipase activity:

The purified enzyme was diluted with cations (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and K⁺) and organic solvents (acetone, n-propanol, n-hexane and 1-pentanol) in the following

concentrations:(1mM,5mM and 10mM) and (10,20,30,40 and 50%(v/v)), respectively.After 1 hour of incubation with constant shaking at 30°C, the lipase activity was measured.

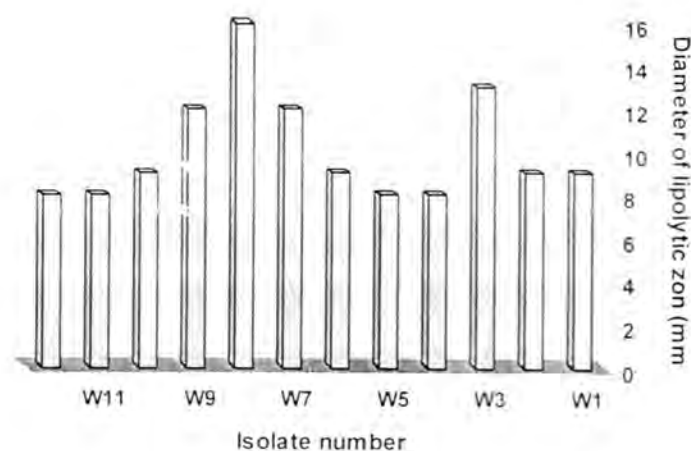
RESULTS and DISCUSSION

Isolation and Characterization of *Pseudomonas fluorescens*:

The results revealed that 12(34%) isolates of *Pseudomonas fluorescens* were obtained out of 35 water samples. Most microbial water borne pathogens such as *Vibrio* species and *Pseudomonas* species of concern originate in the enteric tracts of humans or animals and enter the aquatic environment via fecal contamination, also the type of water contact diseases most frequently indeveloped countries are those associated with recreational water exposure to contaminated marine water, fresh water, lakes, ponds, creeks or rivers(20).*Pseudomonas* has a predilection for growth in moist environments,which is probably a reflection of its natural existence in soil and water(4).

Lipolytic activity on media:

The lipolytic activity for 12 *Pseudomonas fluorescens* isolates was measured by detection the diameter of a clear zone of lysis in lipase indicator plates. Colonies with extracellular lipase activity formed clear halos on these plates (figure-1).



Figure(1):Diameter of clear zones of lysis for all *Pseudomonas fluorescens* isolates

From this figure am can see that *Pseudomonas fluorescens* W8 produced lipase enzyme in higher level than the other water isolates, thus, this isolate was chosen for purification step.

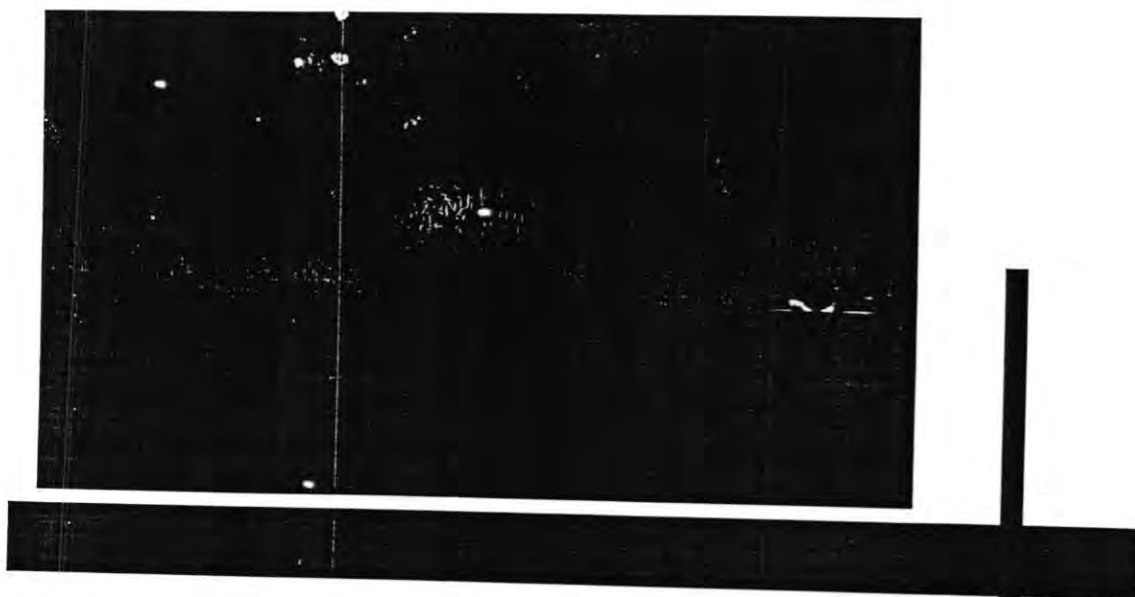
Purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*:

A two-step purification procedure consisting of ethanol precipitation and ion exchange chromatography was developed to obtain a highly purified lipase from *Pseudomonas fluorescens*. The effectiveness of each purification step is given in table(1). Ethanol solution at 60% saturation to the crude extract lead to rise in the specific activity to 6.1U/mg and revealed 4.3 fold of purification with 47% lipase recovery before the dialysis. Lipase could be rapidly and almost completely harvested from the cell-free culture medium by ethanolic precipitation with alginate (about 95% of the original exolipase activity was coprecipitated)(21).

Table(1): Purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*

Purification step	Size (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Lipolytic activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Total activity	Total Recovery(%)
Crude extract	90	42	62	1.4	1	5580	100
Ethanol precipitation	25	17	105	6.1	4.3	2625	47
DEAE-Sephadex G-75	12	5.5	152	27.6	19.7	1824	32.6

Ion exchange chromatography by DEAE-sephadex A-25 column was the second purification step. When lipase solution was passed through DEAE-sephadex A-25 column and eluted with NaCl solutions (0.2 - 0.5M), two peaks of protein appeared in the eluted fractions with one peak of lipase activity located in the second protein peak (figure-2). Fold of purification was 19.7 in this step with 32.6% recovery. Coprecipitation to lipase and polysaccharide could be easily separated by ion exchange chromatography, the coprecipitation method was also successfully applied to exolipases produced by *Pseudomonas* spp. and *Chromobacterium viscosum* (21).



The 19.7-fold purification achieved in this procedure is compared to that obtained with other bacterial lipases. A survey of lipase literature showed a range of purification levels achieved from 23-fold for a lipase from *Chromobacterium viscosum* (22) to 957-fold for lipase from *Staphylococcus aureus* (23).

The recovery of lipase in this study was compared with other studies and it was found that it was higher than the recovery that was obtained by (18,24) which found that the recovery was equal to 15 and 21%, respectively. Our results were lower than the recovery that was obtained by (25) who found it equaling 42%. Lipase was purified from *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* with recovery equal to 45 and 100%, respectively (26,23).

Lipase was purified from *Serratia marcescens* by ion exchange and gel filtration chromatography, from *Staphylococcus aureus* either by ion exchange chromatography (27), or by

ammonium sulphate precipitation and adsorption chromatography on octyl-sepharose (23).

The isolation source, the type of culture medium that was used for growth of bacteria and the procedure that was used for purification of enzyme have effect on the enzyme activity, fold of purification and the recovery of purified enzyme(21).

Effect of pH on lipase activity:

The lipase activity was evaluated at different pH values at 30°C using pNPP as substrate (figure-3).The optimum activity for pNPP hydrolysis of 125U/ml was reached at pH=8 in 25mM Tris-HCl buffer, but in pH values that were lower or higher than this value the lipase activity decreased.

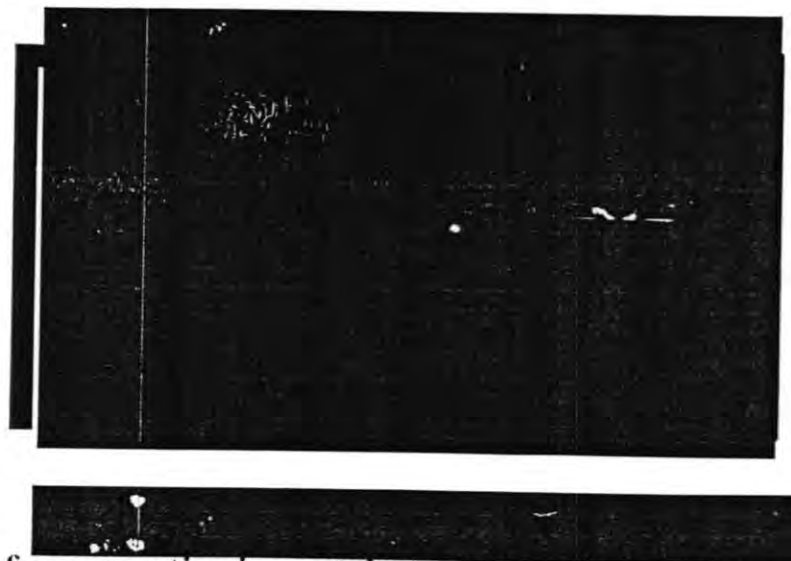


In a study done by (28) reported that the optimal pH for lipase activity was 8 and the activity reduced below this value. The optimum pH for *Serratia marcescens* lipase was likely between 8 and 9 and the enzyme showed about 70% of its activity at pH = 6.6 (26). *Fusarium solani* lipase was also reached to its optimum activity at pH = 8.6 (8).

Effect of temperature on lipase activity:

From studying the effect of temperatures on lipase activity, the results showed that lipase activity reached its maximum value at 30°C with activity 152U/ml and lost most of its activity at 10, 18 and 50°C (figure-4).According to these results, 30°C gave higher activity for lipase and lost most of its activity at very low or high temperatures.

Pseudomonas fragi lipase displayed highest activity at 29°C(28).The optimum temperature for *Serratia marcescens* lipase was observed at 37°C (26).In contrast, *Fusarium solani* lipase presented two peaks of optimum temperature at 25 and 45°C (8). Different proteins have differing E_{act} (energy of activation), and so the midpoints of their denaturation curves will vary widely. Consequently it is possible to choose a temperature that completely denatures one protein, while leaving over 95% of another protein unaffected(29).



Effect of some cationic metals and organic solvents:

Pseudomonas fluorescens lipase was treated with many monovalent and bivalent cationic metals. Some of these metals

showed activation effect, other had inhibition effect. 10mM Mg^{2+} and Ca^{2+} increased lipase activity to 130 and 150 %, respectively. The other metals (10 mM K^{+} and Zn^{2+}) inhibited lipase activity to 25 and 10 %, respectively (figure-5-a). The presence of Ca^{2+} was shown to be more effective than that of Mg^{2+} in increasing lipase activity. Thus, the lipase seems to be dependent on Ca^{2+} on its activity and in this way, for further enzyme purification $CaCl_2$ (10mM) might be included in the culture medium as well as in the purification buffers in order to increase the total activity and yield (30).



From studying the effect of organic solvents on lipase activity, the results showed that n-pentanol completely abolished lipase activity at 10%(v/v) lipase enzyme maintained 40 and 20% of its activity at 10 and 20%(v/v) acetone, while n-propanol maintained 35% of activity at 10%(v/v). At 30 and 20%(v/v), the last two solvents completely inhibited lipase activity. Two solvents completely

inhibited lipase activity. In contrast, n-hexane increased lipase activity to 180 of its initial activity at 40%(v/v) solvent concentration (figure-5-b). This effect has been discussed by (8) as an increase of the reaction mixture emulsification by n-hexane, an water-immiscible solvent, promoting the best contact between enzyme and substrate, also lipase activity depends on the quality of an oil-water interface. Since lipase from *Pseudomonas fluorescens* has been shown to be stimulated by the addition of n-hexane, the enzyme might be useful for transesterification and ester synthesis.

REFERENCES

- 1-Anone. *Pseudomonas aeruginosa*. Honey:1-4. (2000).
- 2-Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P.; and Swain R.H.A. "Medical Microbiology" Vol.2, 12th ed. P: 245- 248, (1975). Churchill livingstone pub., London.
- 3-Anone. *Pseudomonas*. En.Wikipedia. 8(29): 1-2.(2005).
- 4-Anone. *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.:1-10.(2004).
- 5-Woods, R.G.; Burger, M.; Beven, C.A. and Beacham, I.R. The apr - X- lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metaloprotease and lipase production. Microbiol. 147: 345-354.
- 6-Anone.(2003). *Pseudomonas*. Moldlab:1-4.(2001).
- 7-Stahmann, K.P.; Boddecker, T. and Sahm, H. Regulation and properties of fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid. Eur.J.Biochem. 244:220-224.(1997).

- 8- Maia,M.M.D.;Morais,M.M.C.;Jr,M.A.M.;Melo,E.H.M. and Filho,J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Rev. Microbiol. 30(4): 1-11.(1999).
- 9-Anone. Lipase. En.Wikipedia.20(57):1-2. (2005).
- 10-Anone. Lipase enzymes and supplements.NutraSanus:1-1. (2004).
- 11-Anone. Lipase.Healthnotes:1-3. (2004).
- 12-Anone. Lipase.UMMC.:1-4. (2004).
- 13-Anone. Supplements.Aliisa Cohen:1-7. (2003).
- 14-Delabre,K;Cervantes,P, and Lahoussine,V.Detection of viable pathogenic bacteria from water samples by PCR.OECD. 4(2): 1-8 (1998).
- 15-Holt,J.G.; Kerieg,N.R. Seath,P.H.; Staley,H.A.; and Williams,S.T Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. P: 332-353 (1994).Williams and Wilkins , U. S. A.
- 16-Wilhelm,S.;Tommassen,J. and Jaeger,K.E. A novel lipolytic enzyme located in outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J.Bacteriol.181(22):6977-6986. (1999).
- 17-Wingender,J.;Voltz,S. and Winkler,U.K. Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:139-145. (1987).
- 18-Stuer,W.;Jaeger,K.E. and Winkler,U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.168(3): 1070-1074. (1987).

- 19-Lowry,O.H.;Rosebrongh,N.J.;FarrA.L.;and Randall,R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent . J. Biol .
Chem.193 : 265-275 (1951).
- 20-Hurst,C.J.; Knudsen,G.R.; Mcinerney,M.J.; Stetzenbach,L.D.
and Walter,M.V. Manual of Environmental Microbiology. P:136-
140. (1997).ASM Press.U.S.A.
- 21-Saxena,R.K.; Sheoran,A.; Giri,B. and Davidson, W.S.
Purification strategies for microbial lipases.J.Microbial. Meth.52:1-
18. (2003).
- 22-Sugiura,M.;Isobe,M.;Muroya,N. and Yamaguchi,T.
Purification and properties of *Chromobacterium* lipase with a high
molecular weigh.Agric. Biochem. 38:947-952. (1974).
- 23-Rollof,J.; Hedstom,S.A. and Nilsson,P. Purification and
characterization of a lipase from *Staphylococcus aureus*. Biochem.
Biophys.Acta.921(2):364-369. (1987).
- 24-Sztajer,H. and Bryjak,M. Capillar membranes for purification
of *Pseudomonas fluorescens* lipase. Bioprocess. Eng.4:257-259.
(1989).
- 25-Kojima,Y.;Yokoe,M. and Mase,T. Purification and
characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas*
fluorescens AK 102. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58:1564-1568.
(1994).
- 26-Abdou,A.M. Purification and partial characterization of
Serratia marcescens lipase. J. Dairy Sci..86:127-132. (2003).
- 27-Kotting,J.;Jurgens,D. and Huser,H. Separation and
characterization of two isolated lipases from *Staphylococcus*
aureus(TEN5).J.Chromatogr.281:253-261. (1983).

- 28-Alquati,C.; Gioia,L.D.; Santarossa,G.; Alberghina,L. and Lotti,M. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Eur.J.Biochem.269:3321-3328.(2002)
- 29-Scopes,R.K.Protein Purification.2nd ed . P:65-66(1987).Springer-Verlag. Berlin. NewYork.
- 30- Secades,P.;and Guijarro,J.A. Purification and characterization of extracellular lipase from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl.Environ.Microbiol.65(9):3969-3975. (1999).

Relations among Some Types of Stochastic Orderings and Weighted Distributions



ALIA' A ADNAN KADHIM AL-MOUSAWI
AL-MUSTANSIRIYA UNIVERSITY

(Received 16/4/2006 – Accepted 8/5/2007)

الخلاصة

في جزء من هذا البحث اقترحنا شروطاً بموجبها برهنا صحة معكوس العلاقات الآتية:-

$$Y \geq_{lr} X \rightarrow Y \geq_{mrl} X$$

$$Y \geq_{fr} X \rightarrow Y \geq_{mrl} X$$

في الجزء الآخر من هذا البحث حصلنا على بعض النتائج التي تخص الترتيبات التصادفية للتوزيعات المرجحة.

ABSTRACT

In a part of this work, we suggest conditions under which we prove results showing the validity of the reverse of the following relations:

$$Y \geq_{lr} X \rightarrow Y \geq_{mrl} X$$

$$Y \geq_{fr} X \rightarrow Y \geq_{mrl} X$$

In the other part of this work, we obtain some results concerning stochastic ordering for weighted distributions.

INTRODUCTION

In this paper we deal with some types of stochastic orderings. We recall their definitions and some of their properties, a random variable Y is said to be stochastically larger than a random variable X (written $Y \geq_{st} X$) if $\bar{G}(t) \geq \bar{F}(t), \forall t \in R$, where $\bar{F} := 1 - F$ and $\bar{G} := 1 - G$ are the survival functions of the random variables X and Y , respectively [1]. Another stronger orderings are the failure rate ordering and the reversed failure rate ordering, we say that Y is greater than X in the

failure rate ordering sense (written $Y \geq_{fr} X$) if $\frac{\bar{G}(t)}{F(t)}$ is an increasing

function of t [2]. In case the failure rates $r_X(t) = \frac{f(t)}{F(t)}$ and

$r_Y(t) = \frac{g(t)}{G(t)}$ exist, it is easy to see that $Y \geq_{fr} X$, if and only if,

$r_X(t) \leq r_Y(t)$ for every t , where f and g are the density functions of X and Y , respectively. Also, we say that Y is greater than X in the

reversed failure rate ordering sense (written $Y \geq_{rfr} X$) if $\frac{G(t)}{F(t)}$ is an

increasing function of t [3]. In case the reversed failure

rates $\tilde{r}_X(t) = \frac{f(t)}{F(t)}$ and $\tilde{r}_Y(t) = \frac{g(t)}{G(t)}$ exist, it is easy to see that $Y \geq_{rfr} X$, if and

only if, $\tilde{r}_X(t) \geq \tilde{r}_Y(t)$ for every t . Another ordering is the mean residual

life ordering, a random variable Y is said to be larger than

X according to mean residual life ordering (written $Y \geq_{mrl} X$) if

$\mu_{\bar{G}}(t) \geq \mu_{\bar{F}}(t), \forall t \geq 0$, where $\mu_{\bar{F}}(t) = \frac{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}{\bar{F}(t)}$ and $\mu_{\bar{G}}(t) = \frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\bar{G}(t)}$ are the

mean residual life functions of X and Y , respectively [1]. It is

immediate to notice that $Y \geq_{mrl} X$, if and only if, $\frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}$ is increasing

in t . An even stronger ordering is given by the likelihood ratio

ordering, well-defined when the random variables are absolutely

continuous; we write $Y \geq_{lr} X$ if the ratio of the densities $\frac{g(t)}{f(t)}$ is

increasing in t [1].

There are some relations among these types of stochastic

orderings. From [1], it is known that the following relations are valid:

$$Y \geq_{lr} X \xrightarrow{(1)} Y \geq_{fr} X$$

$$Y \geq_{fr} X \xrightarrow{(2)} Y \geq_{mrl} X$$

$$Y \geq_{fr} X \xrightarrow{(3)} Y \geq_{rfr} X$$

$$Y \geq_{fr} X \xrightarrow{(4)} Y \geq_{mrl} X$$

$$Y \geq_{fr} X \xrightarrow{(5)} Y \geq_{lr} X$$

In fact, the reverse of some of the above relations is not necessarily true as mentioned in [1] and [4], to prove the validity of the reverse of the above relations some conditions must be put.

In [5], some conditions were put to prove the validity of the reverse of the relations (1) and (3). In a part of this work, we suggest conditions under which we prove results showing the validity of the reverse of the relations (2) and (4).

Also, in our work the idea of weighted distributions is considered, if we let $w: R \rightarrow R^+$ be a function for which $0 < E[w(X)] < \infty$. Then

$$\hat{F}_w(x) = \frac{1}{E[w(X)]} \int_{-\infty}^x w(u) dF(u) = \frac{1}{E[w(X)]} \int_0^{F(x)+1} wF^{-1}(z) dz$$

is a distribution function, so called the weighted distribution associated with F . If a density f exists, then

$$\hat{f}_w(x) = \frac{w(x)f(x)}{E[w(X)]}$$

is a density of $\hat{F}_w$.

We assume X to be a random variable with distribution function F and $\hat{X}_w$ to be a random variable with distribution function $\hat{F}_w$.

Statistical applications of weighted distributions, especially to the analysis of data relating to human populations and ecology, can be found in Patil and Rao [6] and [7]. Pakes et al. [8] studied relations between length-biased distributions and infinite divisibility. Gupta and Keating [9] obtained relations for reliability measures of the length-biased distribution and some characterization results. Jain et al. [10], Bartoszewicz and Skolimowska [11] and Belzunce et al. [12] studied relations of weighted distributions with classes of life distributions. Navarro et al. [13] developed characterizations through reliability measures from weighted distributions.

Some of known and important distributions in statistics and applied probability may be expressed as weighted distributions, e.g. truncated distributions, the equilibrium renewal distribution, distributions of order statistics, distributions in proportional hazards and proportional reversed hazards models; for details see Bartoszewicz and Skolimowska [11].

In the other part of our work, we obtain some results concerning stochastic ordering for weighted distributions.

THE MAIN WORK

In the next result of ours, we put the condition $\frac{\mu_F(t)}{\mu_G(t)}$ is increasing in t and we show the validity of the reverse of the relation (4).

RESULT-1-

If $X \leq_{ml} Y$, $\frac{\mu_F(t)}{\mu_G(t)}$ is increasing in t , then $X \leq_{lr} Y$ and hence $X \leq_{st} Y$.

Proof:

Assume that $X \leq_{ml} Y$, this means $\frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}$ is increasing in t .

Also, assume that $\frac{\mu_F(t)}{\mu_G(t)}$ is increasing in t .

Now,

$\frac{\bar{G}(t)}{\bar{F}(t)} = \frac{\bar{G}(t)}{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx} \cdot \frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx} \cdot \frac{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}{\bar{F}(t)}$ is an increasing function of t , and

this is nothing but $X \leq_{lr} Y$ and from relation (5), we can have $X \leq_{st} Y$.

◁

THEOREM-1- [5]

If $X \leq_{lr} Y$, then $\hat{X}_w \leq_{lr} \hat{Y}_w$, for every w increasing.

By using result (1), theorem (1) above and relations (4), (5), we can immediately obtain the following result.

RESULT-2-

If $X \leq_{ml} Y$, $\frac{\mu_F(t)}{\mu_G(t)}$ is increasing in t , then $\hat{X}_w \leq_{lr} \hat{Y}_w$ and hence $\hat{X}_w \leq_{ml} \hat{Y}_w$ and $\hat{X}_w \leq_{st} \hat{Y}_w$, for every w increasing.

Now, in the next result we suggest the condition $\frac{r_{i+}(t), \mu_{i+}(t)}{r_{i-}(t), \mu_{i-}(t)}$ is increasing in t and we show how the mean residual life ordering implies the strongest ordering called the likelihood ratio ordering.

RESULT-3-

If $X \leq_{mrl} Y$, $\frac{r_{i+}(t), \mu_{i+}(t)}{r_{i-}(t), \mu_{i-}(t)}$ is increasing in t , then $X \leq_{lr} Y$.

Proof:

Assume that $X \leq_{mrl} Y$, this means $\frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}$ is increasing in t .

Also, assume that $\frac{r_{i+}(t), \mu_{i+}(t)}{r_{i-}(t), \mu_{i-}(t)}$ is increasing in t .

Now,

$\frac{g(t)}{f(t)} = \frac{g(t)}{G(t)} \cdot \frac{\bar{G}(t)}{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx} \cdot \frac{\int_t^\infty \bar{G}(x) dx}{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx} \cdot \frac{\int_t^\infty \bar{F}(x) dx}{F(t)} \cdot \frac{F(t)}{f(t)}$ is an increasing function of

t , and this is nothing but $X \leq_{lr} Y$.

◁

THEOREM-2- [5]

If $X \leq_{lr} Y$, then $\hat{X}_w \leq_{lr} \hat{Y}_w$.

By using result (3), theorem (2) above and relations (2), (3), we can immediately obtain the following result.

RESULT- 4 -

If $X \leq_{mrl} Y$, $\frac{r_{i+}(t), \mu_{i+}(t)}{r_{i-}(t), \mu_{i-}(t)}$ is increasing in t , then $\hat{X}_w \leq_{mrl} \hat{Y}_w$ and hence $\hat{X}_w \leq_{eq} \hat{Y}_w$ and $\hat{X}_w \leq_{mrl} \hat{Y}_w$.

REFERENCES

- [1] Alia'a Adnan Kadhim . Comparison of Redundancy Levels Using Stochastic Orderings. M.Sc. thesis, Department of Mathematics, College of Science, Baghdad University,(2004)
- [2] Boland, P.J., El-Newehi, E. Component redundancy vs system redundancy in the hazard rate ordering. IEEE Trans. Reliability, vol.44, No.4, pp 614-619,(1995).
- [3] Dykstra, R., Kocher, S.C. and Rojo, J. Stochastic comparisons of parallel systems of heterogeneous exponential components. J.Statist. Plann. Inference, vol.65, pp203-211, (1997).
- [4] Boland, P.J., EL-Newehi, E. and Proschan, F. Applications of the hazard rate ordering in reliability and order statistics. J. Appl. Probab.vol.31, pp 180-192, (1994).
- [5] Bartoszewicz, J. and Magdalena Skolimowska. Stochastic ordering of weighted distributions. Mathematical Institute, University of Wroclaw, (2004).
- [6] Patil, G.P., Rao, C.R. The weighted distributions: A survey and their applications. In Applications of Statistics (ed. P.R. Krishnaiah), 383-405. North-Holland Publ. Co. Amsterdam ,(1977).
- [7] Patil, G.P., Rao, C.R. Weighted distributions and size biased sampling with applications to wild-life populations and human families. Biometrika 34. 179-189,(1978)
- [8] Pakes, A.G., Sapatinas,T., Fosam, E.B. Characterizations, length-biasing and infinite divisibility. Statist. Papers 37, 53-69, (1996).
- [9] Gupta, R.C., Keating, J.P. Relations for reliability measures under length biased sampling. Scand. J. Statist. 13, 49-56, (1986).
- [10] Jain, K., Singh, H., Bagai, I. Relations for reliability measures of weighted distributions. Comm. Statist. Theory Methods 18, 4393-4412, (1989).
- [11] Bartoszewicz, J., Skolimowska, M. Preservation of classes of life distributions under weighting. Submitted to Statist. Probab. Lett, (2004).
- [12] Belzunce, F., Navarro, J., Ruiz, J.M., del Aguila, Y. Some results on residual entropy function, Metrika 59, 147-161, (2004).
- [13] Navarro, J., del Aguila, Y., Ruiz, J.M. Characterizations through reliability measures from weighted distributions. Statist. Papers 42, 395-402, (2001).

Strongly Preopen Sets, δ -Open Sets and their Continuous Functions in Bitopological Spaces

WURIA MUHAMMAD AMEEN HUSSAIN

Department of Mathematics / College of Science /Salahaddin-Arbil University

(Received 11/12/2006 – Accepted 17/4/2007)

الخلاصة

في هذا البحث تناولنا نوعين جديدين حسب علمنا من المجموعات المفتوحة في الفضاءات ثنائية التوبولوجي (X, τ_1, τ_2) واسميناها sp_{ij} -open و δ_{ij} -open ورمزنا لهما بـ $SP_{ij}O(X)$ و $\delta_{ij}O(X)$ على التوالي ودرسنا بعض الخواص لتلك المجموعتين ومقارنتهما مع بعض المفاهيم الموجودة سابقا في الفضاءات ثنائية التوبولوجي. وكذلك عرفنا نوعين جديدين حسب علمنا من انواع الدوال المستمرة باستخدام تلك المجموعتين في الفضاءات ثنائية التوبولوجي واسميناها sp_{ij} -continuous و δ_{ij} -continuous مع ايجاد بعض الخواص والعلاقات مع دوال مستمرة معروفة مسبقا في الفضاءات ثنائية التوبولوجي.

ABSTRACT

In this paper, we introduce new types to the best of our knowledge of strongly preopen sets and δ -sets in bitopological spaces (X, τ_1, τ_2) which are called sp_{ij} -open and δ_{ij} -open sets and the class of them are denoted by $SP_{ij}O(X)$ and $\delta_{ij}O(X)$ respectively, some of their properties and relations with other concepts in bitopological spaces are investigated, also we define continuous functions in bitopological spaces by using these sets which are called sp_{ij} -continuous and δ_{ij} -continuous functions and give some of their properties.

Key words and phrases: strongly preopen set, δ -open set, pairwise sp -continuous and pairwise δ -continuous functions in bitopological spaces

INTRODUCTION

Chandan Chattopadhyay [1] introduced the concept of strongly preopen sets in topological spaces, Chattopadhyay and Bandyopadhyay [2] defined and studied δ -sets in topological spaces, Kelly J.C. [3] introduced the concept of bitopological spaces. A triple (X, τ_1, τ_2) constitute of a nonempty set X with two topologies τ_1 and τ_2 on X is said to be a bitopological space, where no separation axioms are assumed between them. Maki H. et al [4] introduced bicontinuous functions and investigate some of their properties. Abdullah A. [5] introduced some nearly open sets and some nearly continuous functions in bitopological spaces.

Throughout this paper, we write the word BS to refer to a bitopological space and $i, j \in \{1, 2\}, i \neq j$. Where (X, τ_1, τ_2) is a BS and $E \subset Y \subset X$, $\text{Int}_i E$ and $\text{Cl}_i E$ denote respectively the interior and the closure of E with respect to the topology τ_i on X , and $\text{Int}_{i(Y)} E$ and $\text{Cl}_{i(Y)} E$ denote respectively the interior and the closure of E with respect to the induced topology on Y .

1-Preliminaries

In this section, we take the following definitions and results to use in this paper: -

Definition 1.1: In a topological space (X, τ) , a subset E of X is said to be: -

- i- Preopen if $E \subset \text{intcl}E$. [6]
- ii- δ -set if $\text{intcl}E \subset \text{clint}E$. [2]
- iii- Strongly preopen if E is preopen and $E = U \cap B$, where U is open, and $\text{int}B = \text{intclint}B$. [1]

The following definitions and results are given in [5]

Definition 1.2: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS. A subset E of X is said to be $\tau_i\alpha$ - (respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) open set with respect to τ_j if $E \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E$ (respectively $E \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j E$, $E \subset \text{Cl}_j \text{Int}_i E$ and $E \subset \text{Cl}_j \text{Int}_i \text{Cl}_j E$). A subset F of X is said to be $\tau_i\alpha$ - (respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) closed set with respect to τ_j if $X - F$ is $\tau_i\alpha$ - (respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) open set with respect to τ_j .

pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) open set with respect to τ_j or equivalently $Cl_i Int_j Cl_i F \subset F$ (respectively $Cl_i Int_j F \subset F$, $Int_j Cl_i F \subset F$ and $Int_j Cl_i Int_j F \subset F$).

The class of all $\tau_i\alpha$ -(respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) open sets with respect to τ_j is denoted by $\tau_i\alpha O(X) \tau_j$ (respectively $\tau_i PO(X) \tau_j$, $\tau_i SO(X) \tau_j$ and $\tau_i\beta O(X) \tau_j$). The class of all $\tau_i\alpha$ -(respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -) closed sets with respect to τ_j is denoted by $\tau_i\alpha C(X) \tau_j$ (respectively $\tau_i PC(X) \tau_j$, $\tau_i SC(X) \tau_j$ and $\tau_i\beta C(X) \tau_j$).

The following implications follow from *Definition 1.2*, [5]

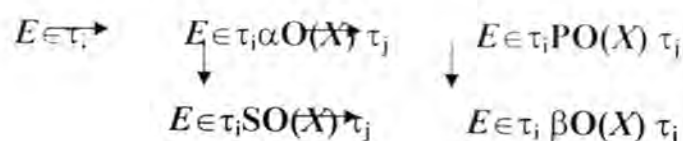


Diagram (1)

Theorem 1.3: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, then $E \in \tau_j\beta C(X) \tau_i$ if and only if $Int_i E = Int_i Cl_j Int_i E$.

Theorem 1.4: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, if $A \in \tau_i PO(X) \tau_j$ and $B \in \tau_1 \cap \tau_2$, then $A \cap B \in \tau_i PO(X) \tau_j$.

Theorem 1.5: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset Y \subset X$, if $E \in \tau_i PO(X) \tau_j$, then $E \in \tau_i PO(Y) \tau_j(Y)$.

Remark 1.6: The converse of *Theorem 1.5* is true if $Y \in \tau_1 \cap \tau_2$.

Theorem 1.7: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset Y \subset X$, where $Y \in \tau_1 \cap \tau_2$, if $E \in \tau_i\beta O(X) \tau_j$ (respectively $E \in \tau_i\beta C(X) \tau_j$), then $E \in \tau_i(Y) \beta O(Y) \tau_j(Y)$ (respectively $E \in \tau_i(Y) \beta C(Y) \tau_j(Y)$).

Definition 1.8: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, the $\tau_i\alpha$ -(respectively τ_i -pre-, τ_i -semi-) interior of E with respect to τ_j which is denoted by ${}_\alpha\text{-}Int_{i(j)}E$ (respectively ${}_p\text{-}Int_{i(j)}E$ and ${}_s\text{-}Int_{i(j)}E$) is defined as follows: ${}_\alpha\text{-}Int_{i(j)}E = \bigcup \{G \subset X \mid G \in \tau_i\alpha O(X) \tau_j \text{ and } G \subset A\}$ (respectively ${}_p\text{-}Int_{i(j)}E = \bigcup \{G \subset X \mid G \in \tau_i PO(X) \tau_j \text{ and } G \subset A\}$ and ${}_s\text{-}Int_{i(j)}E = \bigcup \{G \subset X \mid G \in \tau_i SO(X) \tau_j \text{ and } G \subset A\}$).

Theorem 1.9: In a BS (X, τ_1, τ_2) , ${}_\alpha\text{-}Int_{i(j)}E = E \cap Int_i Cl_j Int_i E$, ${}_p\text{-}Int_{i(j)}E = E \cap Int_i Cl_j E$ and ${}_s\text{-}Int_{i(j)}E = E \cap Cl_j Int_i E$, for any $E \subset X$.

Definition 1.10: Let (X, τ_1, τ_2) and (Y, σ_1, σ_2) be two BS's. A function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is said to be pairwise α -(respectively pairwise pre-, pairwise semi- and pairwise β -) continuous, briefly $P_{\alpha,c}$ (respectively $P_{p,c}$, $P_{s,c}$ and $P_{\beta,c}$) if the inverse image of each σ_i -open set is $\tau_i\alpha$ -(respectively τ_i -pre, τ_i -semi and $\tau_i\beta$ -)open set with respect to τ_j .

Theorem 1.11: A function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is $P_{\beta,c}$ if and only if $f^{-1}(\text{Int}_i B) \subset \text{Cl}_j \text{Int}_i \text{Cl}_j f^{-1}(B)$, for all $B \subset Y$.

Definition 1.12 [6]: Let (X, τ_1, τ_2) and (Y, σ_1, σ_2) be two BS's. A function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is said to be bicontinuous if both functions $f: (X, \tau_1) \rightarrow (Y, \sigma_1)$ and $f: (X, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_2)$ are continuous.

The following implications follow from *Definition 1.10* and *Definition 1.12*, [5]

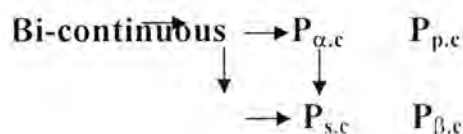


Diagram (2)

Definition 1.13 [7]: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS. A subset E of X is said to be (τ_i, τ_j) -gsh-closed set if $\text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E \subset E$, whenever $E \subset G$ and G is τ_i -open set.

2. sp_{ij} -open sets and δ_{ij} - open sets

In this section, we define strongly preopen sets and δ -open sets in a BS and study some of their properties with other concepts in BS.

Definition 2.1: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS. A subset E of X is said to be τ_i strongly preopen with respect to τ_j , briefly sp_{ij} -open set, if: -

- 1- $E \in \tau_i \text{ PO}(X)_{\tau_j}$
- 2- $E = G \cap B$, whenever $G \in \tau_i$ and $B \in \tau_j \beta C(X)_{\tau_i}$.

A subset K of X is said to be τ_i strongly preclosed with respect to τ_j , briefly sp_{ij} -closed set if $X-K$ is sp_{ij} -open, or equivalently:-

- 1- $K \in \tau_i \text{ PC}(X) \tau_j$ and
- 2- $K = F \cup D$, whenever F is τ_i -closed set and $D \in \tau_j \beta \text{O}(X) \tau_i$.

Let the class of all sp_{ij} -open sets and the class of all sp_{ij} -closed sets be denoted by $\text{SP}_{ij}\text{O}(X)$ and $\text{SP}_{ij}\text{C}(X)$ respectively.

A subset E of X is called pairwise sp -open (respectively pairwise sp -closed) if $E \in \text{SP}_{12}\text{O}(X)$ and $E \in \text{SP}_{21}\text{O}(X)$ (respectively $E \in \text{SP}_{12}\text{C}(X)$ and $E \in \text{SP}_{21}\text{C}(X)$).

Remarks 2.2: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS: -

- (i) The class $\text{SP}_{ij}\text{O}(X)$ is properly placed between the classes τ_i -open sets and $\tau_i \text{ PO}(X) \tau_j$.
- (ii) The union and the intersection of two sp_{ij} -open subsets of X need not be sp_{ij} -open set.

Example 2.3: Let $X = \{a, b, c, d, e\}$, $\tau_1 = \{\emptyset, \{a\}, \{a, c\}, \{a, b, d\}, \{a, b, c, d\}, X\}$ and $\tau_2 = \{\emptyset, \{c, e\}, \{c, d, e\}, \{b, c, e\}, \{b, c, d, e\}, X\}$. Now for (i) in **Remarks 2.2**, we have $\{b, c\} \in \text{SP}_{12}\text{O}(X) - \tau_1 \alpha \text{O}(X) \tau_2$, and $\{a, b, c\} \in \tau_1 \alpha \text{O}(X) \tau_2 - \text{SP}_{12}\text{O}(X)$, and for (ii) in the same remark, we have $\{a, b, c\} \notin \text{SP}_{12}\text{O}(X)$, whenever $\{a\}$ and $\{b, c\}$ are sp_{12} -open sets. On the other hand $\{a, b, d\}$ and $\{a, b, e\}$ are sp_{12} -open sets, but $\{a, b\} \notin \text{SP}_{12}\text{O}(X)$.

Theorem 2.4: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, if E is τ_j -closed set and τ_i preopen subset of X with respect to τ_j , then $E \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$, but not conversely.

Proof: We can take $E = \text{Int}_i \text{Cl}_j E \cap E$, and from **Diagram (1)**, $E \in \tau_j \beta \text{C}(X) \tau_i$, so $E \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$. For the converse, in **Example 2.3**, we see that $\{b, c\} \in \text{SP}_{12}\text{O}(X)$, but it is not τ_2 -closed set.

Theorem 2.5: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, if $A \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$ and $B \in \tau_1 \cap \tau_2$, then $A \cap B \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$.

Proof: From **Theorem 1.4**, $A \cap B \in \tau_i \text{ PO}(X) \tau_j$, since $A \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$, then $A = G \cap M$ for some $G \in \tau_i$ and $M \in \tau_j \beta \text{C}(X) \tau_i$, so $A \cap B = G \cap M \cap B = (G \cap B) \cap M$, and $G \cap B \in \tau_i$, hence $A \cap B \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$.

Corollary 2.6: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $A \subset X$, if A is pairwise sp -open and $B \in \tau_1 \cap \tau_2$, then $A \cap B$ is pairwise sp -open.

Proof: Proof is analogous to **Theorem 2.5**.

Theorem 2.7: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $Y \in \tau_1 \cap \tau_2$, if $E \in \tau_i \cap \beta O(Y) \cap \tau_j$ (respectively $E \in \tau_i \cap \beta C(Y) \cap \tau_j$), then $E \in \tau_i \cap \beta O(X) \cap \tau_j$ (respectively $E \in \tau_i \cap \beta C(X) \cap \tau_j$).

Proof: It is enough to prove one of them, let $E \in \tau_i \cap \beta O(Y) \cap \tau_j$, now since $Y \in \tau_1 \cap \tau_2$, then for $i=1, 2$, $\text{Int}_i(Y) E = \text{Int}_i E$, for any subset E of Y , hence $E \subset \text{Cl}_j(Y) \cap \text{Int}_i(Y) \cap \text{Cl}_j(Y) E \subset \text{Cl}_j \cap \text{Int}_i \cap \text{Cl}_j E$.

Theorem 2.8: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset Y \subset X$, $Y \in \tau_1 \cap \tau_2$, then $E \in \text{SP}_{ij} O(X)$ if and only if $E \in \text{SP}_{ij} O(Y)$.

Proof: Let $E \in \text{SP}_{ij} O(X)$, so $E \in \tau_i \cap \text{PO}(X) \cap \tau_j$ and $E = G \cap B$, whenever $G \in \tau_i$ and $B \in \tau_j \cap \beta C(X) \cap \tau_i$, now from Theorem 1.5, $E \in \tau_i \cap \text{PO}(X) \cap \tau_j$, since $E = E \cap Y = G \cap B \cap Y = (G \cap Y) \cap (B \cap Y)$, and $B \cap Y \supset \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i B \cap Y = \text{Int}_i(\text{Cl}_j \text{Int}_i B \cap Y) = \text{Int}_i(\text{Cl}_j \cap \text{Int}_i B) \supset \text{Int}_i(\text{Cl}_j \cap \text{Int}_i(B \cap Y)) = \text{Int}_i \cap \text{Cl}_j \cap \text{Int}_i(B \cap Y)$, that means $B \cap Y \in \tau_j \cap \beta C(Y) \cap \tau_i$.

The converse can be proved by using Remark 1.6 and Theorem 2.7.

Theorem 2.9: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, if $E = G \cap B$, where $G \in \tau_i$ and $B \in \tau_j \cap \beta C(X) \cap \tau_i$, then ${}_{\alpha}\text{-Int}_i \cap \text{Int}_i E = \text{Int}_i E$.

Proof: It is enough to show that ${}_{\alpha}\text{-Int}_i \cap \text{Int}_i E \subset \text{Int}_i E$. Now ${}_{\alpha}\text{-Int}_i \cap \text{Int}_i E = E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E \subset G \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i B$ and from Theorem 1.3, we get ${}_{\alpha}\text{-Int}_i \cap \text{Int}_i E = G \cap \text{Int}_i B = \text{Int}_i(G \cap B) = \text{Int}_i E$.

Remark 2.10: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS: -

- (i) In general $\text{SP}_{12} O(X) \neq \text{SP}_{21} O(X)$, for this in Example 2.3, $\{a, b, c\} \in \text{SP}_{21} O(X) - \text{SP}_{12} O(X)$.
- (ii) If $\tau_1 = \tau_2$, then $\text{SP}_{12} O(X) = \text{SP}_{21} O(X)$ and each of them coincides with the strongly preopen sets in Definition 1.1.

Definition 2.11: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS. A subset E of X is said to be δ_{ij} -open set, if $\text{Int}_i \text{Cl}_j E \subset \text{Cl}_j \text{Int}_i E$. Let the class of all δ_{ij} -open subsets of X be denoted by $\delta_{ij} O(X)$. A subset E of X is called pairwise δ -open set if it is both δ_{12} -open and δ_{21} -open. Clearly a subset E of X is δ_{ij} -open set if and only if $X - E$ is δ_{ji} -open set.

Proposition 2.12: In a BS (X, τ_1, τ_2) , if $E \in \tau_i \cap \text{SO}(X) \cap \tau_j$, then $E \in \delta_{ij} O(X)$.

Proof: Let $E \in \tau_i \cap \text{SO}(X) \cap \tau_j$, so $\text{Int}_i \text{Cl}_j E \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Cl}_j \text{Int}_i E \subset \text{Cl}_j \text{Int}_i E$.

Remark 2.13: In *Example 2.3*, $\{b, c\} \in \tau_1 PO(X) \tau_2 - \delta_{12} O(X)$, and $\{a, d\} \in \delta_{12} O(X) - \tau_1 \beta O(X) \tau_2$.

Remark 2.14: The following implication follows from the preceding examples, remarks and results: -

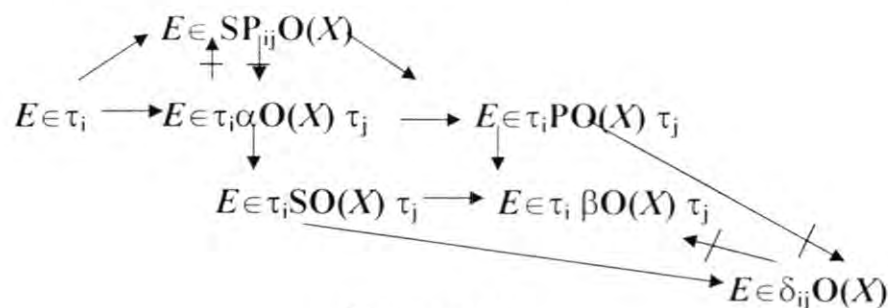


Diagram (3)

Theorem 2.15: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, if E be both τ_i preopen set with respect to τ_j and δ_{ij} -open set, then it is τ_i semi-open set with respect to τ_j .

Proof: Obvious.

Remark 2.16: In a BS (X, τ_1, τ_2) , the union and the intersection of two δ_{ij} -open sets need not be δ_{ij} -open set.

Example 2.17: Let $X = \{a, b, c\}$, $\tau_1 = \{\phi, \{a\}, \{b, c\}, X\}$ and $\tau_2 = \{\phi, \{b\}, \{a, c\}, X\}$. Now $\{a\}$ and $\{b\}$ are δ_{12} -open sets, but $\{a, b\} \notin \delta_{12} O(X)$, on the other hand, $\{a, c\}$ and $\{b, c\}$ are δ_{12} -open sets, but $\{c\} \notin \delta_{12} O(X)$.

Remark 2.18: In a BS (X, τ_1, τ_2)

- (iii) In general $\delta_{12} O(X) \neq \delta_{21} O(X)$, for this in *Example 2.17*, $\{a\} \in \delta_{12} O(X) - \delta_{21} O(X)$.
- (iv) If $\tau_1 = \tau_2$, then $\delta_{12} O(X) = \delta_{21} O(X)$ and each of them coincides with the δ -sets in *Definition 1.1*.

Theorem 2.19: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, if E is δ_{ij} -open set, then ${}_{\alpha}\text{-Int}_{i(j)} E = {}_p\text{Int}_{i(j)} E$.

Proof: It is enough to show that ${}_p\text{Int}_{i(j)} E \subset {}_{\alpha}\text{-Int}_{i(j)} E$. Now ${}_p\text{Int}_{i(j)} E = E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j E = E \cap \text{Int}_i \text{Int}_i \text{Cl}_j E \subset E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E = {}_{\alpha}\text{-Int}_{i(j)} E$.

Theorem 2.20: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, a subset E of X is τ_i -open set if and only if it is both sp_{ij} -open set and δ_{ij} -open set.

Proof: Let $E \in \text{SP}_{ij}\text{O}(X)$ and $E \in \delta_{ij}\text{O}(X)$, so by *Theorem 2.9* and *Theorem 2.19*, we get ${}_p\text{Int}_{i(j)} E = \text{Int}_i E$, since $E \in \tau_i\text{PO}(X) \tau_j$, then ${}_p\text{Int}_{i(j)} E = E$, hence E is τ_i -open set, the other part follows from Diagram (3).

Theorem 2.21: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS such that $\tau_i \subset \tau_j$, $E \subset X$:-

- i- $\text{Int}_i \text{Cl}_j (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E) = \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E$.
- ii- ${}_p\text{Int}_{i(j)} ({}_s\text{Int}_{i(j)} E) = {}_\alpha\text{Int}_{i(j)} E$.
- iii- If $E = G \cap K$, where $G \in \tau_i$ and $K = \text{Cl}_j \text{Int}_i K$, then E is δ_{ij} -open set.

Proof:-

- i- $\text{Int}_i \text{Cl}_j (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E) \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j (\text{Cl}_j \text{Int}_i E) = \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E$. On the other hand $\text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E = \text{Int}_i \text{Cl}_j E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E = \text{Int}_i (\text{Cl}_j E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E) \subset \text{Int}_i (\text{Cl}_j (E \cap \text{Int}_j \text{Cl}_j \text{Int}_i E))$, because $\tau_i \subset \tau_j$, consequently $\text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E)$.
- ii- ${}_p\text{Int}_{i(j)} ({}_s\text{Int}_{i(j)} E) = {}_s\text{Int}_{i(j)} E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j ({}_s\text{Int}_{i(j)} E) = (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E) \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E) = (E \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i E) \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E = E \cap \text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i E = {}_\alpha\text{Int}_{i(j)} E$.
- iii- $\text{Int}_i \text{Cl}_j E = \text{Int}_i \text{Cl}_j (G \cap K) = \text{Int}_i \text{Cl}_j (\text{Int}_i G \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i K) \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j (\text{Int}_j G \cap \text{Cl}_j \text{Int}_i K)$, because $\tau_i \subset \tau_j$, hence $\text{Int}_i \text{Cl}_j E \subset \text{Int}_i \text{Cl}_j (\text{Cl}_j (\text{Int}_j G \cap \text{Int}_i K)) \subset \text{Cl}_j (\text{Int}_i G \cap \text{Int}_i K) = \text{Cl}_j \text{Int}_i E$.

Theorem 2.22: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $E \subset X$, consider the following statements:-

- (i) $E \in \tau_i$.
- (ii) $E \in \tau_i \alpha \text{O}(X) \tau_j$ and $E = G \cap F$, where $G \in \tau_i$ and F is τ_j -closed set.
- (iii) $E \in \tau_i \text{PO}(X) \tau_j$ and $E = G \cap F$, where $G \in \tau_i$ and F is τ_j -closed set.
- (iv) $E \in \tau_i \text{PO}(X) \tau_j$ and $E = G \cap K$, where $G \in \tau_i$ and $K = \text{Cl}_j \text{Int}_i K$.

Then the following implications are true: (i) $\rightarrow$ (ii) $\rightarrow$ (iii) $\rightarrow$ (iv)

Proof: (i) $\rightarrow$ (ii): Choose $G = E$ and $F = X$.

(ii) $\rightarrow$ (iii): straightforward.

(iii) $\rightarrow$ (iv): Take $K = \text{Cl}_j \text{Int}_i F$.

Theorem 2.23: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS such that $\tau_i \subset \tau_j$, then the following statements are equivalent:-

- (i) $E \in \tau_i$.
- (ii) $E \in \tau_i \alpha \text{O}(X) \tau_j$ and $E = G \cap F$, where $G \in \tau_i$ and F is τ_j -closed set.

- (iii) $E \in \tau_i \text{PO}(X) \setminus \tau_j$ and $E = G \cap F$, where $G \in \tau_i$ and F is τ_j -closed set.
- (iv) $E \in \tau_i \text{PO}(X) \setminus \tau_j$ and $E = G \cap K$, where $G \in \tau_i$ and $K = \text{Cl}_j \text{Int}_i K$.
- (v) $E \in \text{SP}_{ij} \text{O}(X)$ and $E \in \delta_{ij} \text{O}(X)$.

Proof: (iv) $\rightarrow$ (v): since K is a τ_j -closed set, so from Diagram (1), $K \in \tau_j \beta C(X) \setminus \tau_i$, hence $E \in \text{SP}_{ij} \text{O}(X)$ and from Theorem 2.21 (iii), $E \in \delta_{ij} \text{O}(X)$.

(v) $\rightarrow$ (i): Follows directly from Theorem 2.20 without using $\tau_i \subset \tau_j$.

Theorem 2.24:- Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $x \in X$, then either $\{x\}$ is τ_i -closed or $X - \{x\}$ is (τ_i, τ_j) -shg-closed set.

Proof: If $\{x\}$ is not τ_i -closed set, then X is the only τ_i -open set containing $X - \{x\}$, hence $X - \{x\}$ is (τ_i, τ_j) -shg-closed set.

Corollary 2.25: Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $x \in X$, if $X - \{x\} \notin \text{SP}_{ij} \text{O}(X) \cap \delta_{ij} \text{O}(X)$, then it is (τ_i, τ_j) -shg-closed set.

Proof: Follows directly from Theorem 2.20 and Theorem 2.24.

Theorem 2.26:- Let (X, τ_1, τ_2) be a BS, $x \in X$, if $\{x\}$ is δ_{ij} -open set, then it is τ_i -open set or (τ_i, τ_j) -shg-closed set.

Proof: Let $\{x\}$ not τ_i -open set, since $\{x\}$ is δ_{ij} -open set, then $\text{Int}_i \text{Cl}_j \{x\} = \emptyset$, hence $\text{Int}_i \text{Cl}_j \text{Int}_i \{x\} = \emptyset$, consequently $\{x\}$ is (τ_i, τ_j) -shg-closed set.

3-PSP-continuous and $P\delta$ -continuous Functions

In this section, we introduce pairwise sp-continuous and pairwise δ -continuous functions in a BS and investigate some of their properties and relate with other continuous functions in BS which are given in the first section.

Definition 3.1: Let (X, τ_1, τ_2) and (Y, σ_1, σ_2) be two BS's. A function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is said to be: -

- i- SP_{ij} -continuous, briefly SP_{ij-c} if the inverse image of each σ_i -open set is sp_{ij} -open.
- ii- Pairwise sp-continuous, briefly $P_{\text{sp-c}}$, if it is both SP_{12-c} and SP_{21-c} .
- iii- δ_{ij} -continuous, briefly δ_{ij-c} if the inverse image of each σ_i -open set is δ_{ij} -open set.

iv- Pairwise δ -continuous, briefly $P_{\delta-c}$, if it is both δ_{12-c} and δ_{21-c} .

Theorem 3.2: Let $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ be a function, then: -

- (i) f is SP_{ij-c} if and only if the inverse image of each σ_i -closed set is sp_{ij} -closed.
- (ii) f is δ_{ij-c} if and only if the inverse image of each σ_i -closed set is δ_{ji} -open.

Proof: (i) Obvious.

(ii) Let f be δ_{ij-c} and F be σ_i -closed set, so $Int_i Cl_j f^{-1}(F^c) \subset Cl_j Int_i f^{-1}(F^c)$, or $Int_j Cl_i f^{-1}(F) \subset Cl_i Int_j f^{-1}(F)$, hence $f^{-1}(F)$ is δ_{ji} -open set. Conversely, let G be a σ_i -open set, then by hypothesis, $Int_j Cl_i f^{-1}(G^c) \subset Cl_i Int_j f^{-1}(G^c)$, or $Int_i Cl_j f^{-1}(G) \subset Cl_j Int_i f^{-1}(G)$, so $f^{-1}(G)$ is δ_{ij} -open set.

Theorem 3.3: Let $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ be a function, then: -

- (i) f is τ_i -continuous if and only if it is both SP_{ij-c} and δ_{ij-c} .
- (ii) f is bicontinuous if and only if it is both P_{sp-c} and $P_{\delta-c}$.

Proof: (i) Follows directly from *Theorem 2.20* and *Definition 3.1*.

(ii) Straightforward.

Theorem 3.4: If a function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is $P_{\beta-c}$ and $P_{\delta-c}$, then it is P_{s-c} .

Proof: Let G be a σ_i -open set, then $Int_i Cl_j f^{-1}(G) \subset Cl_j Int_i f^{-1}(G)$, or $Cl_j Int_i Cl_j f^{-1}(G) \subset Cl_j Int_i f^{-1}(G)$, now since f is $P_{\beta-c}$, then from *Theorem 1.11*, we get $f^{-1}(Int_i G) = f^{-1}(G) \subset Cl_j Int_i f^{-1}(G)$, that means f is P_{s-c} .

Corollary 3.5: If a function $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ is bicontinuous and $P_{\delta-c}$, then it is P_{s-c} .

Proof: Follows directly from *Diagram (2)* and *Theorem 3.4*.

Example 3.6: Consider the topological space (X, τ_1, τ_2) in *Example 2.3*, $Y = \{0, 1, 2, 3\}$, $\sigma_1 = \{\emptyset, \{1, 2\}, Y\}$, $\sigma_2 = \{\emptyset, \{0, 2\}, Y\}$. Let $f: (X, \tau_1, \tau_2) \rightarrow (Y, \sigma_1, \sigma_2)$ be a function: -

- (i) If $f(a)=3, f(b)=1, f(c)=2, f(d)=3$ and $f(e)=0$, then f is P_{sp-c}, P_{p-c} but it is neither $P_{\alpha-c}$ nor $P_{\delta-c}$.
- (ii) If $f(a) = f(b) = 1, f(c) = 2, f(d) = 3$ and $f(e) = 0$, then f is $P_{\alpha-c}$, but it is not P_{sp-c} .

- (iii) If $f(a)=1, f(b)=3, f(c)=f(e)=0, f(d)=2$ and, then f is $P_{\delta-c}$, but it is not P_{p-c} .

Remark 3.7: - From the preceding Examples and results, we get the following implications: -

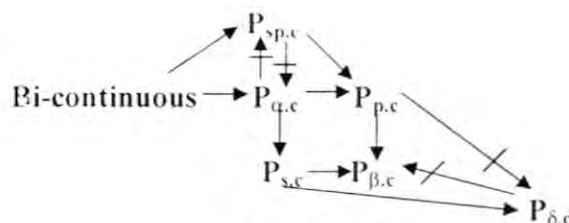


Diagram (4)

REFERENCES

- [1] Chattopadhyay C., *On strongly pre-open sets and a decomposition of continuity*, МАТЕМАТИЧКИ ВЕСНИК, 57, 121-125, (2005).
- [2] Chattopadhyay C. and Bandyopadhyay C., *On structure of δ -sets*, Bull. Cal. Math. Soc. 83, 281-290, (1991).
- [3] Kelly J.C., *Bitopological spaces.*, Proc. London Math. Soc., (3), 13, 71-89, (1963).
- [4] Maki H., Sundaram P. and Balachandran K., *On generalized continuous maps and pasting Lemma in bitopological space*, Bull. Fukuoka University. Ed. Part III, 40, 23-31, (1991).
- [5] Abdullah A., *On Some Application of Special Subsets in Bitopological Space*. PH.D. Thesis. Tanta University, (1986).
- [6] Mashour A.S, Abd El-Monsef M.E and El-Deeb S.N., *On pretopological spaces*, Bull. Math. De la Soc. R.S. de Roumanie 28(76), 39-45, (1984).
- [7] Hussain W. M., *On (τ_i, τ_j) -gsh-closed sets, $SH(\tau_i, \tau_j)$ - σ_k -continuous functions and T_{gsh} -spaces in bitopological spaces*, Al-Mustansiriya J.sci. Vol. 17 No. (2), 60-73, 2006.

The Behaviour of Charged Particles around Aligned Magnetic Rotators for Pulsar Star

L.M. Karim - S.A. Abdullah

Department of Astronomy, College of Science, University of Baghdad

(Received 9/12/2006 – Accepted 6/6/2007)

الخلاصة

تم وصف بعض العمليات الاشعاعية حول النجم النابض ضمن حدود نصف قطر الاسطوانة الضوئية ($R_L = 2 \times 10^8 \text{ m}$) باستخدام نموذج (Goldreich and Julian). طاقة الجسيمات المشحونة المتدفقة حول خطوط المجال المغناطيسي للنجم النابض تم الحصول عليها كدالة للمسافة على امتداد التفاعلات الاشعاعية. تم استخراج قيمة اللمعانية للنجم بتبني احدى العلاقات الرياضية المعروفة. قيمة المجال المغناطيسي حول النجم تم حسابها وكانت بحدود ($B = 10^8 - 10^{12} \text{ Gauss}$) باستخدام اللمعانية المرصودة. فورنت النتائج مع نموذج (Roberts and Sturrock) وبيئت ان تعجيل الشحنات يحصل على المجال المغناطيسي وان لمعانية النجم تزداد عند الاقتراب من الفتحة القطبي للنجم وعند حدود الاسطوانة الضوئية ان هذه الشحنات تمتلك طاقة عالية جدا تقترب من سرعة الضوء بسبب التعجيل العالي جدا. وكذلك بيئت النتائج ان لمعانية النجم النابض لاتعتمد على ميكانيكية خسائر الطاقة الاشعاعية للشحنات.

ABSTRACT

Some processes of emission about a pulsar star within light cylinder radius limit ($R_L = 2 \times 10^8 \text{ m}$) according to (Goldreich and Julian) model were illustrated.

The energy of charged particles flow along magnetic field lines of pulsar, were obtained as a function of distance along the trajectory with radiation reactions. The luminosity is then obtained using a well defined adopted formula. The surface magnetic field is also estimated and found to be ($B = 10^8 - 10^{12} \text{ Gauss}$) from the observation luminosity.

In comparison with Roberts and Sturrock model, it is found that the accelerated charges take place on the magnetic field and the luminosity of pulsar increase by reaching the polar within the limit of light cylinder with high energy approaching the velocity of light due to a very high acceleration. Also it is found that the pulsar luminosity does not depend on the energy loss mechanisms of radiated charges.

INTRODUCTION

Pulsars are celestial radio source neutron stars emitting short bursts of radio emission. These objects had been discovered by Hewish and Bell in the end of 1967 [1]. Gold was the first who suggested that pulsars were single rotating neutron stars and considered an aligned rotator [2]. A spinning magnetized neutron

star generates huge potential differences between different parts of its surface. Near the neutron star charged particles can flow only along magnetic field lines. Charged particles are flow out from the pulsar to the neighborhood of the light cylinder (where the co-rotational velocity is the velocity of light) [1,3]. Sturrock considered electron positron production from the curvature radiation of electrons (and protons) flowing out of stellar surface [4]. The trapped particles in the lines magnetic field that close inside the speed-of- light cylinder will form a co-rotating magnetosphere, as shown in Fig.(1). The picture of co-rotational atmosphere obviously breaks down within the light cylinder. It has been shown by Hinata and Jackson, that no such atmosphere can exist, if the electromagnetic fields are required to vanish at infinity [4]. Therefore Goldriech and Julian model is more reliable [1].

The potential drop across the polar cap which is generated by unipolar induction ,drives the poloidal current out of the star.

The poloidal current in turn generates the electromagnetic torque at the stellar surface. The approximation which limits the motion of charges on the magnetic field surface at distances, ($r_c = 2 \times 10^4$, 2×10^6 and 2×10^8 m) from the center of the star will be shown. The magnetic field configuration needed in order to determine the luminosity and braking index. This is because the acceleration of charges is a measure for the determination the luminosity and braking index take place within a short distance above the polar cap, where the stellar magnetic field is expected to be small.

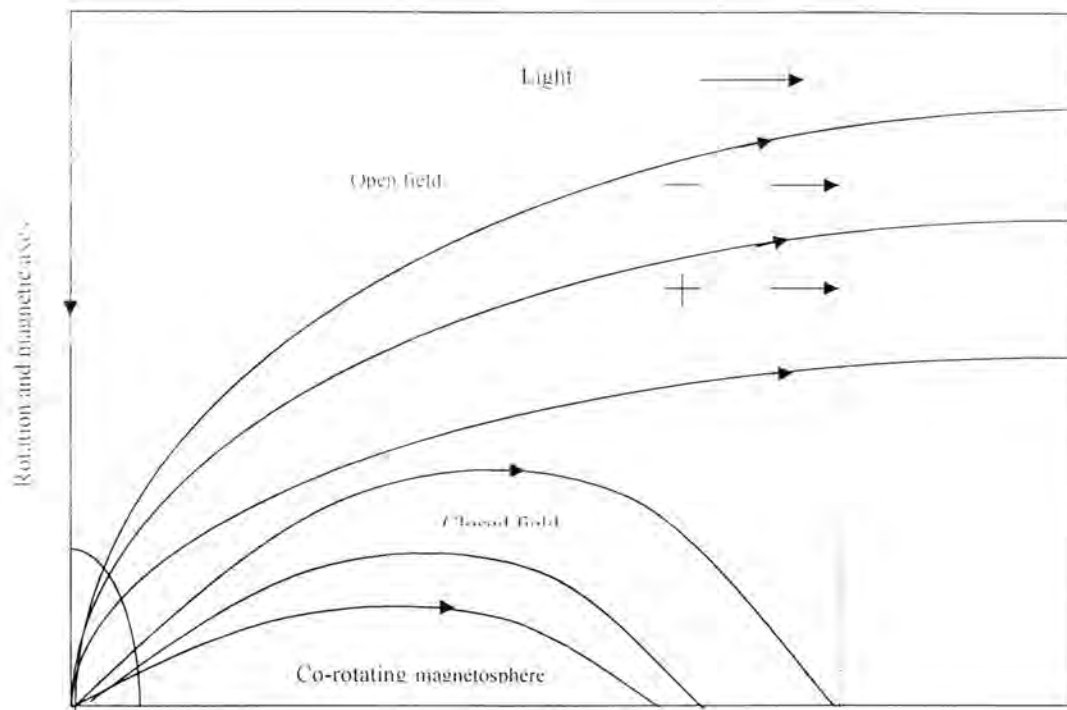


Fig.(1) The predicted positive and negative charges that pulled out of the surface and accelerated along the open field line,[6]

The Standard Model Definitions

Goldreich and Julian model indicated the characteristic of the co-rotating magnetosphere surrounding an ax symmetric neutron star with aligned magnetic moment and rotation axes. They assumed that:

- The neutron star can supply the necessary negative charges and positive charges (ion and positrons) required to fill and maintain the magnetosphere with $E \cdot B = 0$, where E and B are the electric and magnetic fields, respectively.
- The currents in the magnetospheres are negligible [1, 2].

Magnetic Field and Radiation Mechanism

Pulsars have strong magnetic field it is about 10^{12} G times the original value during the formation of a neutron star. Most pulsar models are based on the postulate that the axis of magnetic dipole field is nearly perpendicular to the pulsar axis of rotation (non-aligned). In this work the case when the magnetic dipole moment is aligned with the rotation axis of the star is taken. According to the "polar cap model" if the particles are accelerated near the polar cap

then because of the strong magnetic field they will be constrained to move along the open field lines like(beads – on – a string) [1,3]. Since the field lines diverges from the polar cap, these particles will emit curvature radiation [4,5]. This radiation will be linearly polarized parallel to the projected magnetic field. The very high energy particles accelerated along the open field lines will produce very high energy gamma rays [3]. The dipole field that rotates with the star becomes the source of an intense electromagnetic wave, which is emitted with the stars rotation frequency. This emission of radiation leads to a slow down of the pulsar rotation [6]. It is perhaps that emitted electromagnetic wave provides the energy that makes the nebula surrounding the pulsar shine [7]. The pulsar mechanism it self, i.e., the star's emission of regular signals can probably be imagined by comparing the two rotating magnetic poles of the pulsars to the two rotating lights of light house.. While they rotate they emit a light cone that extends from one or both poles and reaches the earth [8]. The light cylinder is an imaginary cylinder with an axis along the pulsar rotation axis and with a radius extending out to the distance at which the co-rotation velocity attains the speed of light [4,6], see Fig.(1).

The magnetic field decreases from 10^4 G for pulsars stars by 3 to 4 orders of magnitude during or after the recycling process [8].

Mathematical Derivations, Calculations, and Results:

1 :- Equation of the dipole magnetic field for pulsars:

In cosmic bodies the magnetic field for these stars considered to be as a magnetic dipole field [9]. Therefore we shall consider a magnetic dipole field model to study the magnetic field for pulsar star. The magnetic dipole is generated by a closed current loop of dipole moment m ($m = iA$) where, A is the area of the loop. Solution of Biot-Savart Law may be the way to determine the field B at a given point (p). In astrophysics there are many properties of solutions according to the wanted accuracy [6]. The magnetic field (B) equation is given by:

$$B = (\mu/4\pi) \int (J \times r) / r^3 dv \quad \text{-----}(1)$$

Where, B : is the magnetic field induction produced a current density J at point P , r : is the vector that directed from the point of integration (source point of J) toward the field point P and dv : is the

volume element that content the source J . In comical bodies the magnetic field generally derives from currents induced by rotation in such a body. Let (r, θ, ϕ) be the spherical coordinates system centered in the dipole and having its axis parallel to the magnetic moment (a) where,

$$a = \mu_0 m / 4\pi \quad \text{-----} (2)$$

and the latitude λ is:

$$\lambda = \frac{1}{2} \pi - \theta \quad \text{-----} (3)$$

Then, the magnetic field components are:

$$B_r = B_p \sin \lambda \quad \text{.....} (4)$$

$$B_\lambda = -1/2 B_p \cos \lambda$$

The magnetic field at point (p) is given by:

$$B_p = 2a / r^3 \quad \text{-----} (5)$$

According to Alven notation [9], $B_Y \equiv B_r$ and $B_X \equiv B_\lambda$. So B_r and B_λ don't refer to radial and angular components. $B_\phi = B_Z = 0$ constant, as shown in figs 2 and 3.

Or the magnetic field is given by the relation [6]:

$$B = \frac{a}{r^3} [1 + 3 \sin^2 \lambda]^2 \quad \text{-----} (6)$$

This equation (6), represents the first approximation of the magnetic dipole field. The dipole moment of this field is:

$a \equiv BR^3$, where, R : is the pulsar radius [1].

The magnetic line of force has the form:

$$r = r_e \cos^2 \lambda \quad \text{-----} (7)$$

2:-Acceleration of Charges along the Dipole

84

surface given. Baker and Kulkarni showed that the magnetosphere would then co-rotate with a local charge density, [5] :

$$\rho_e = -\Omega B (2\pi c)^{-1} \quad \text{-----} (8)$$

where

ρ_e : charges density,

c : Light velocity (3×10^8 m/s) and Ω : is the angular velocity .

The electric field in the neutron star and in its magnetosphere vanish in the co-rotating reference frame. The magnetic field far from the neutron star surface is dominated by the star's own dipole field. Those field lines which originate sufficiently close to the stellar polar caps will cross the light cylinder of radius [8,11] :

$$R_L = c/\Omega \quad \text{-----} (9)$$

For assuming that, $\Omega=1$ s, thus we get , $R_L=3 \times 10^8$ m .

As particles approach R_L in the equatorial plane becomes highly relativistic. Gold et.al. [2,4] have proposed that the high-frequency radiation observed from pulsars, may originate from the emission of relativistic particles near the light cylinder,

at which exist co-rotation can no longer be maintained. These open field lines will define two "polar caps" on the stellar surface from which charged particles leaving the star can move along field lines and escape from the co-rotating magnetosphere by passing through the light cylinder, [5] .

In the original model of Goldreich and Julian an outward negative (positive) charge flow is presumed to exist, [1,12]. In the pure dipole field approximation for a pulsar, the radius of the polar cap region out of which a net flow of positive charges is needed to maintain the magnetosphere is, [12] :

$$r_{p+} = (2/3)^{(3/4)} R (\Omega R/c)^{1/2} = (10^4) P^{(-1/2)} \text{ cm} \quad \text{-----} (10)$$

where R is the stellar radius and P is the rotation period

The outer radius to the foot of the last open field line:

$$r_{p-} = R (\Omega R/c)^{1/2} = 1.4 \times 10^4 P^{-1/2} \text{ cm} \quad \text{-----} (11)$$

Where, $R = 10^6 \text{ cm}$.

The net flux through the polar cap region:

$$\Phi = \pi(r_p)^2(B_r) \quad \text{-----} \quad (12)$$

Where, B_r is the surface component of the dipole field at the polar cap.

This equation gives the total flux penetrating the light cylinder, is unchanged by the removal of the dipole because $R_L \gg R$, [5,8].

$$N_{\max} = (\Phi\Omega/2\pi e) = \pi r_p^2 (\Omega B/2\pi e c) \quad \text{-----} \quad (13)$$

This current flows beneath the stellar surface between the negative and positive emission regions of the polar caps is calculated and shown in Fig (4). This figure shows that the charged particles flux are changed at different distances ($r_e = 2 \times 10^4$, 2×10^6 and $2 \times 10^8 \text{ m}$) within light cylinder limits. This indicates that the co-rotational angular momentum of charges at the stellar surface tends to give up the field as the charges get accelerated out ward. This leaves the motion of charges essentially poloidal as soon as it becomes relativistic.

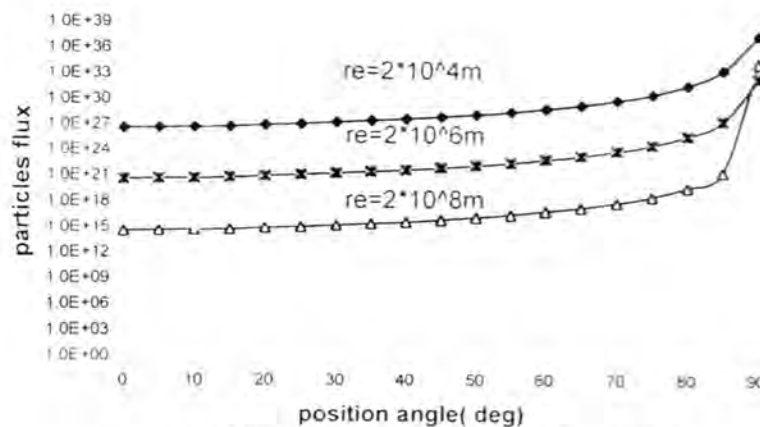


Fig (4) The relation between flux particles and position angle at different distances from center of star

3:- Luminosity and Torque

The analysis of a co-rotational atmosphere about a collapsed magnetic star with a surface dipole magnetic field indicates that the lines of force beyond the radius

$R_L = R(\Omega R/c)^{2/5}$ can not be closed. If the radiation reaction limits the energy of the charge within approximately 1 stellar radius, then the curvature radiation loss dominate the kinetic energy loss. The luminosity is obtained as [4]:

$$L = (1/64)B^2\Omega R^3 (\Omega R/C) \sin \theta_p \text{ -----(14)}$$

Where θ_p is the angle at the edge of the polar gap.

By setting: $\theta_p = (R/C)^{1/5}$ which has been calculated by Hinata and Jackson,[4], where the braking index $n=2.2$. This means that an aligned magnetic rotator with a surface dipole magnetic field has a braking index 2.2; this value should be a good value for slower pulsar.

The theoretical values for the moment of inertia for pulsar ($I=10^{44} \text{ gcm}^2$), and the radius ($R=10^4 \text{ m}$) and magnetic field ($B=10^{12} \text{ G}$) where taken from Irvin [11], enable us to estimate the strength of the surface magnetic field at different values of: r_e , ($r_e=2 \times 10^4 \text{ m}$, $2 \times 10^6 \text{ m}$ and $2 \times 10^8 \text{ m}$). The luminosity in Eq.(14) is calculated using the magnetic field in Eq.(6) and plotted as shown in figures (5), (6) and (7).

The luminosity obtained by Eq. (14) is different from that obtained by Roberts and Sturrock model [10], which is given the formula:

$$L^* = (1/2)B^2 \Omega R^3 (\Omega R/c)(R/R_L)^2 \text{ ----- (15)}$$

By applying the same adopted theoretical values in this model to Roberts and Sturrock model the new luminosity is obtained and plotted as shown in figures (8, 9 and 10). These results appeared different than ours because the angular momentum flux across the stellar surface consists of the kinetic and field angular momentum fluxes of our model. The field angular momentum loss alone can generate the torque which is enough to slow down the rotation of star.

The rotational energy of the star becomes available to the outside of the star when the potential difference across the polar gap sustained by rotation drives the current across the stellar surface. In the absence of other mechanisms which could draw the rotational energy more effectively out of the star [10,12].

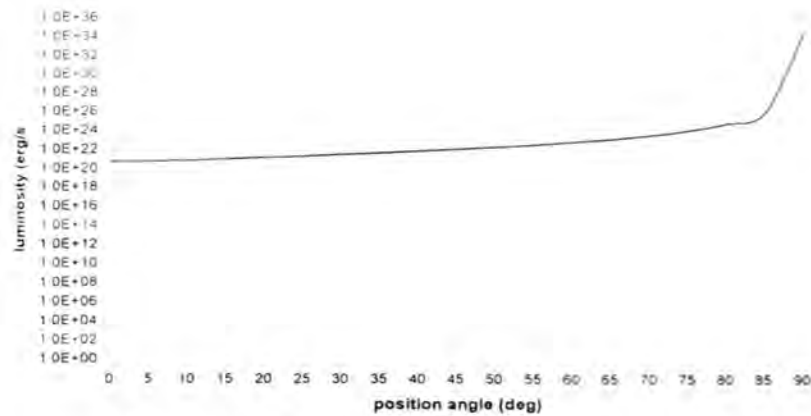


Fig (5) the relation between luminosity and position angle at distance ($r_e=2 \cdot 10^4$ m) from center star

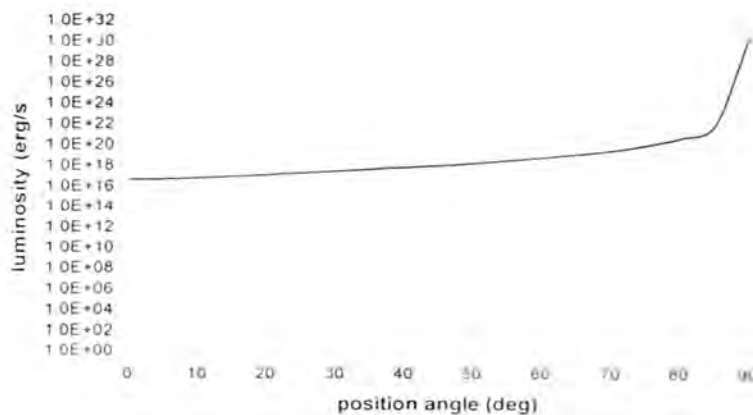


Fig (6) the relation between luminosity and position angle at distance ($r_e=2 \cdot 10^6$ m) from center star

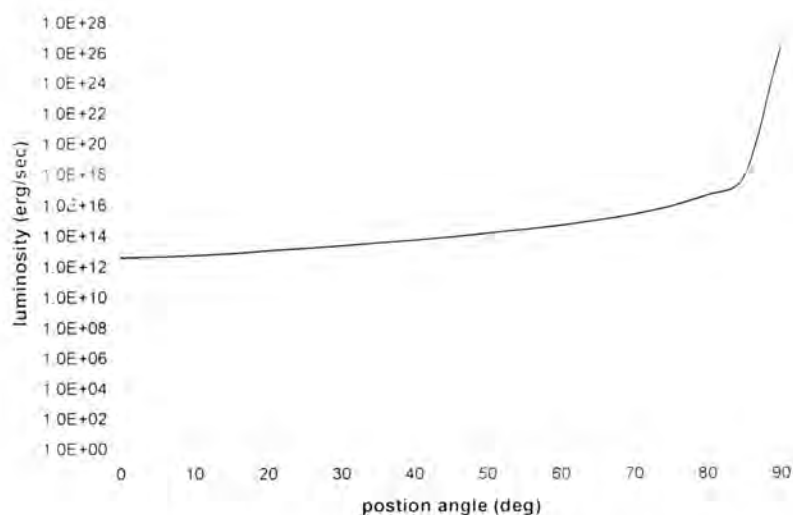


Fig.(7) the relation between luminosity and position angle at the limits of light cylinder ($r_e=2 \cdot 10^8$ m)

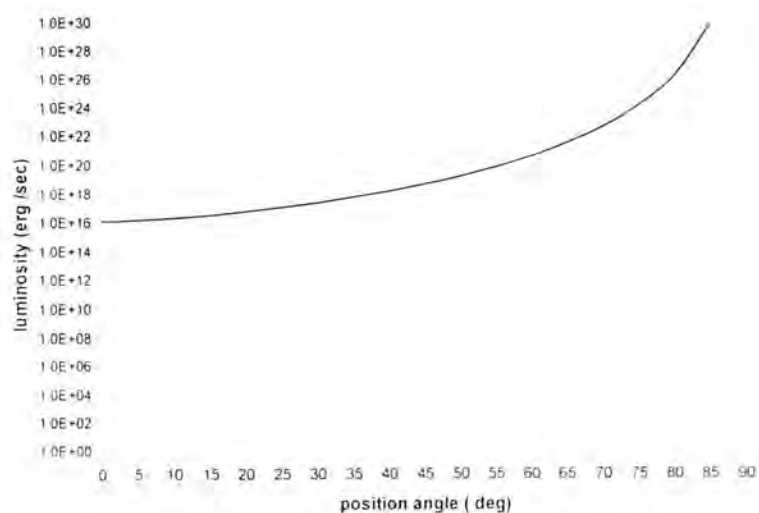


Fig.(8) the relation between luminosity and position angle at distance ($r_e=2 \cdot 10^4$ m) from center of star according to Sturrock model

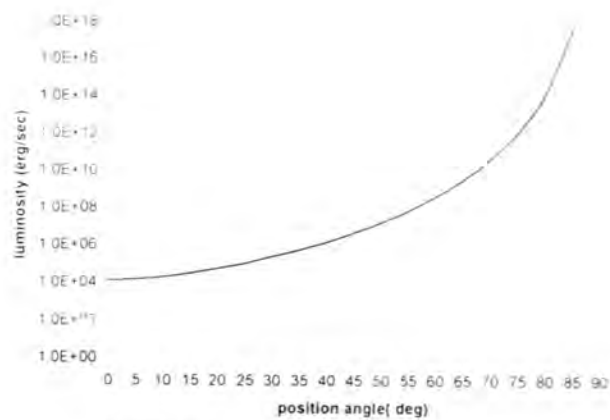


Fig (9) the relation between luminosity and position angle at distance ($r_e = 2 \cdot 10^6$ m) from center star

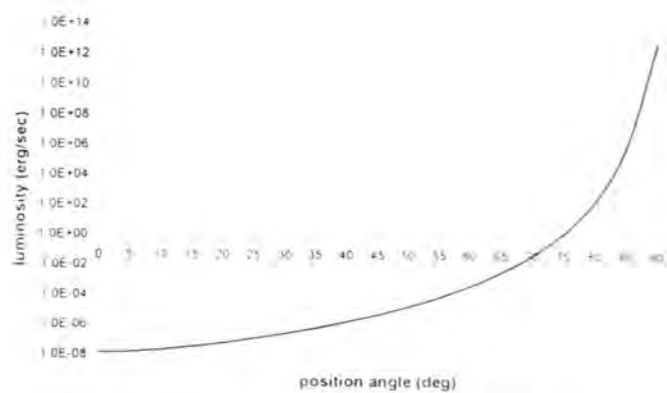


Fig (10) the relation between luminosity and position angle at light cylinder limits ($r_e = 2 \cdot 10^8$ m)

CONCLUSIONS

We shall list some of the most important results obtained:

- 1- The acceleration of charge take place on the magnetic field . The motion of charges becomes essentially poloidal as it gets relativistic.
- 2-The curvature radiation loss is dominate when the acceleration of charges is so rapid that the energy will be radiation limited within light cylinder ($R_L=2 \times 10^2$ m).
- 3- The luminosity which is obtained by using Eq. (13) different from the Eq.(14) of Roberts and Sturrock model. The differences seem to result from the fact that Roberts and Sturrock model have assumed that the toroidal and poloidal magnetic field are of the same order at the light cylinder limits.
- 4- According to the standard model we can see that the pulsar have great value of luminosity at angles near poles of star ($\lambda=90^\circ$),also we can see the luminosity at angles near the equatorial plane ($\lambda=0^\circ$) it is semi constant but it increases with great value at angles near the poles.
- 5- The kinetic energy density at the critical radius R_L is smaller than the magnetic energy density, even if all the energy is lost as kinetic energy.

REFERENCES

- 1-Goldreich,P.,Reiesengger,A, "Magnetar Fields",ApJ,Vol.395, P.250,(1992)
- 2-Gold,T., "Magnetic Field of Neutron Stars",Nature,Vol.218, P.73,(1968)
- 3-Hollerbach, R.,Gunther, R., "The Influence of Hall Drift on The Magnetic Field of Neutron Stars",Astron.Soc.,Vol.337, PP.216-224, (2002)
- 4-Sturrock, P.A., "The flow is unlikely to be static",Ap.J.,Vol.164, P.559,(1971)

- 5-Baker, D.C.,Kulkarni,S.R., "Millisecond Pulsar", Nature, Vol.300, P.615, 1982
- 6-Sandus, A.A., "Plasma Drift in The Magnetic field of Pulsar Star", M.Sc. thesis, College of Science, Dept. of Astronomy, University of Baghdad, (2001)
- 7-Gutierrez, G.M, Lopez, M., "The Nature of ultra luminous x-ray Sources", Astrophysics.J., Vol.622, PP.189-195, (2005)
- 8- Wielebiniski, R., "Pulsar Studies at High Radio Frequencies", Asp Conference Series, Vol.202, (2002)
- 9-Alven, H., Gunne, G., "Cosmical Electrodynamics", Clarendon Press, Oxford, (1969)
- 10-Roberts, D.H. and Sturrock, P.A. " The Braking index and period-pulse Distribution of pulsars" APJ, 172, 435, 1972.
- 11- Irvin, J.M., "Neutron Stars", Clarendon Press, Oxford, (1978)
- 12- Ruderman, M.S., Sutherland, P.G., "Theory of Pulsar gaps, Sparks and Coherent Microwave Radiation", Ap.J, Vol.169, PP.51-72, (1985)

Reynolds Stress and Heat Flux within and above a Neutrally Urban Boundary Layer

Monim H. Al-Jiboori

The Department of Atmospheric Sciences, College of Sciences, Al-Mustansiriyah University.

(Received 28/2/2005 – Accepted 6/6/2007)

الخلاصة

بيانات التذبذبات لمركبات الرياح الثلاث (u', v', w') ودرجات الحرارة T' المقاسة بواسطة أجهزة الاستجابة السريعة ومعدلات سرعة الرياح ودرجات الحرارة المقاسة بواسطة أجهزة الاستجابة البطيئة قد تم تحليلها لدراسة الخصائص المضطربة لتيار الهواء ضمن وفوق الطبقة الخشنة التحتية تحت الظروف المتعادلة والقريبة من المتعادلة. تم الحصول على هذه البيانات من برج الرصد الجوي ذو الارتفاع 325 متر المثبت في منطقة حضرية في بكين. باستعمال التدريجات المحلية، وجد إن إجهاد رينالدز والفيض الحراري يعتمدان على الاستقرار الجوية المحلية. كذلك تم الحصول على التركيب العمودي لإجهاد رينالدز و الفيض الحراري ومقارنتهم مع الهواء المار فوق التضاريس الملساء.

ABSTRACT

Fluctuation data of wind components (u', v', w') and of temperature T' measured by fast-response instruments, as well as wind and temperature data measured by slow-response instruments are analyzed to study the turbulent characteristics of air flow within and above roughness sublayer under neutral and near-neutral stratification. These measurements were obtained from a meteorological tower of 325 m height located in an urban area of Beijing. Using local similarity theory, Reynolds stress and heat flux parameters are found to be dependent on local atmospheric stability. The vertical structure of these parameters were obtained and compared with flow over smoother terrain.

INTRODUCTION

Kinematic vertical fluxes of turbulent momentum (or Reynolds shear stress, $\overline{u'w'}$) and heat, $\overline{w'T'}$, exist only in the turbulent flows. They indicate that the velocity and temperature fluctuations cause transport of momentum and heat. The turbulent characteristics and structures of these parameters within and above urban settlements are not as well known as the velocity and temperature standard deviations.

In the lower part of atmospheric boundary layer, the lower layer that extends from the ground up to below average height of buildings was called as "urban canopy layer" firstly by Oke [1], while above this layer was termed "roughness sublayer" (RSL) by Raupach [2] or transition layer by Garratt [3]. In both these layers, although the flow and

turbulence are influenced by individual roughness elements, they have a fully three-dimensional structure.

Using local similarity theory, the behaviour of Reynolds stress within and above the street under neutral conditions has studied by the Rotach [4] and Louka [5]. The aim of this contribution is to study the turbulence characteristics of urban boundary layer in terms of Reynolds stress and heat flux under neutral and near-neutral conditions. Also the vertical structure of these parameters is investigated.

The observational data used in this paper came from a high tower of 325 m height located in the urban center of Beijing city were taken from the State Key Laboratory of Atmospheric Boundary-Layer Physics and Atmospheric Chemistry (LAPC), Institute of Atmospheric Physics (IAP), Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China. These data obtained from April 10 to 20 2000 are two kinds. Firstly, actual instantaneous values were measured by three-dimensional sonic anemometer-thermometers fixed at levels 47, 120 and 280 m. Secondly, mean values of wind speed, wind direction and temperature were measured by three-cup anemometer, vane and platinum resistance thermometers sensors at levels: 8, 15, 32, 47, 63, 80, 102, 120, 140, 160, 180, 200, 240, 280 and 320 m. A detail description of the surface characteristics around tower site, fast- and slow-response instruments and acquisition and processing data are found in [6].

The surface roughness lengths, z_0 , and zero-plane displacement height, z_d , were estimated by the above reference using the logarithmic wind profile equation according to the wind direction with average values of 5.15 ± 0.52 m using fast-response data and 2.87 ± 0.75 m using slow-response data, and 5.4 ± 0.42 m, respectively. In the present study, more than 200 turbulence runs were used and distributed as 70 runs under neutral conditions ($-0.1 < z'/\Lambda < 0.1$), 80 runs under near-unstable ($1 > z'/\Lambda > 0.1$) and 50 runs near-stable conditions ($0.1 < z'/\Lambda < 1$), where $z' = z - z_d$ with z the height above ground, and Λ is the local Monin-Obukhov (M-O) length defined below.

Frame of Reference for the Analysis

High values of z_0 and z_d mentioned in the previous section, of course, one could be expected that urban central city of Beijing is highly heterogeneous. Historical continuously developments over built-up surface of the city have also reported at the reference [6] in terms of z_0 -

values. For this situation, therefore, the constant flux layer is not clear and the M-O similarity theory is not convenient for analyzing turbulence data. In addition, owing to high differences between the measurement levels and their high heights for fast-response instruments, the local similarity theory as a powerful tool can be conveniently applied to analyze atmospheric turbulence observations.

The idea of local scaling was first introduced by Nieuwstadt [7] to study turbulence characteristics in stable boundary layer and then Sorbjan [8] extended this idea to (local) free-convection boundary layer, which exists under unstable conditions. Many authors and workers have been successfully applied the local similarity theory to describe turbulent structures of statistical variables such as velocity and temperature standard deviations, gradients of wind and temperature, dissipation rates of turbulent kinetic energy and temperature variance, and spectra and cospectra under various stratification, i.e. stable, neutral and unstable (e.g., [9] and [10]).

Local scaling group below, as given at [7], will be further tested by the applicability of local similarity to verify on the behaviour of the turbulent structures of Reynolds stress, $\overline{u'w'}$, and heat flux, $\overline{w'T'}$, in the urban boundary layer:

$$\text{Velocity scaling: } |\overline{-u'w'}| = u_*'^2 \quad (1)$$

$$\text{Temperature scaling: } \overline{w'T'} = -u_*' T_*' \quad (2)$$

$$\text{Length scaling: } \Lambda = -\frac{u_*'^3 \bar{T}}{kg \overline{w'T'}} \quad (3)$$

where u' , w' and T' are the fluctuation values of horizontal and vertical velocity components and temperature, respectively. $\bar{T}$ is the average temperature, k von Kármán's constant (taken as 0.4 in this study) and g the gravitational acceleration.

In order to investigate the vertical variation of $\overline{u'w'}$ and $\overline{w'T'}$, the depth of RSL, z_* , was estimated by Al-Jiboori [11] for the same data used here. As shown in the previous section, turbulence measurements of $\overline{u'w'}$ and $\overline{w'T'}$ at the three levels are not much enough to examine their results in RSL clearly. Thus, the values of $\overline{u'w'}$ and $\overline{w'T'}$ at 32-m level have estimated by the following formulae using mean data of wind and temperature measured by slow-response sensors [11].

$$(\overline{u'w'})_{z_i} = (\overline{u_{xy}})_{z_i} = \frac{k(\overline{U}_{z_{i+1}} - \overline{U}_{z_i})}{\left[\ln \frac{z_{i+1} - z_d}{z_i - z_d} - D \left(\frac{kz}{\overline{u_{xy}} \overline{\epsilon z}} \right)_{z_i} \right]} \quad (4)$$

$$(\overline{w'T'})_{z_i} = (\overline{T_{xy}})_{z_i} = \frac{k(\overline{T}_{z_{i+1}} - \overline{T}_{z_i})}{\left[\ln \frac{z_{i+1} - z_d}{z_i - z_d} - D \left(\frac{kz}{\overline{T_{xy}} \overline{\epsilon z}} \right)_{z_i} \right]} \quad (5)$$

where $D = \frac{\left(\frac{z}{\overline{U}} \frac{\partial \overline{U}}{\partial z} \right)_{z_i} - \left(\frac{z}{\overline{T}} \frac{\partial \overline{T}}{\partial z} \right)_{z_i}}{\left(\frac{z}{\overline{T}} \frac{\partial \overline{T}}{\partial z} \right)_{z_{i+1}}}$. $\overline{U}$ and $\overline{T}$ are the mean values of wind and temperature derived from slow-response data. The derivation of these equations is found in [12] for more details. In order to get $(\overline{u'w'})_{z_2}$ and $(\overline{w'T'})_{z_2}$, I assumed the initial values of $(\overline{u_{xy}}$ and $\overline{T_{xy}})_{z_{i+1} = z_2}$ and by iteration methods to minimize the percentage error. Although the results obtained are approximated, they have some practical advantages, for instance, high roughness lengths become not important.

RESULTS and DISCUSSION

1 Turbulent Fluxes and Stability The distribution of the kinematic Reynolds shear stress and heat flux derived from fluctuation data at the three measurement levels 47, 120 and 280 m according to local stability parameter, z'/Λ , is presented in Figures 1 and 2 in log-log plot, respectively. The results are marked by the symbols explained in the key of the panel of figures. Figures 1a and 1b, generally, show a systematic decreasing of Reynolds stress with increasing of unstable and stable magnitudes, respectively, but a slower decrease under neutral and near-neutral conditions, $|z'/\Lambda| \rightarrow 0$, so that shear production of turbulence was always significant. On the other hand, as shown in Figure 1, there are no significant differences between the values of

Reynolds stress at heights 120 and 280 m, and they are mostly larger than those values at lower level, 47 m. The reason for the increase of the Reynolds stress at 120- and 280-m levels is that the three-dimensional flow at lower level within the RSL is distorted by the individual roughness elements such as buildings and trees.

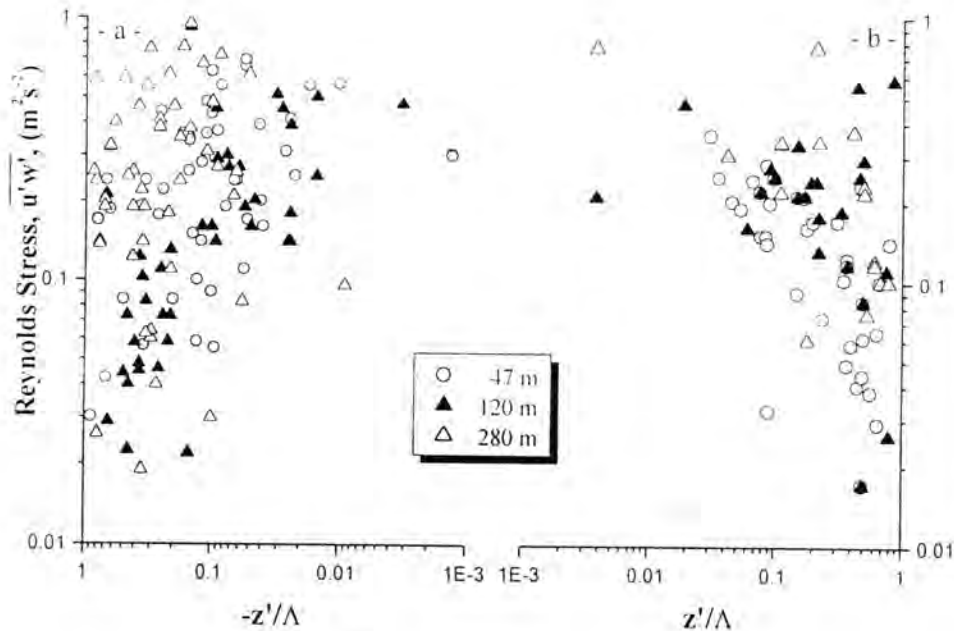


Figure 1: Dependence of the Reynolds shear stress, $\overline{u'w'}$, on the local stability parameter, z'/Λ .

The absolute values of heat flux, $\overline{w'T'}$, at the three measurement levels plotted against z'/Λ do not show differences between them under neutral and near-neutral conditions, but they increase slowly when $|z'/\Lambda| < 0.02$ and then strongly increase in near-neutral unstable and stable sides (see Figures 2a and 2b).

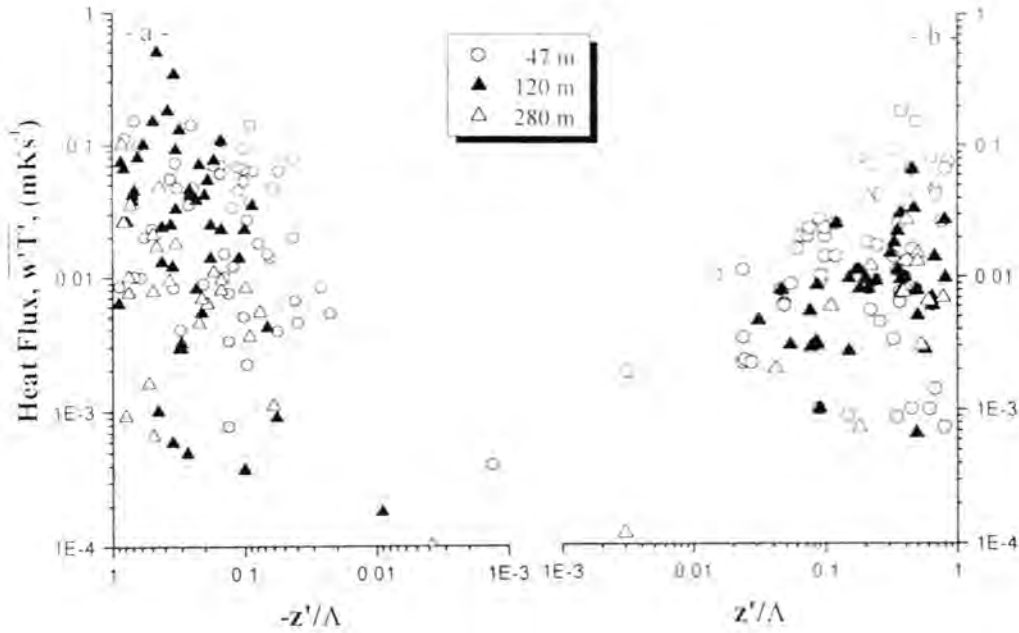


Figure 2: Dependence of the heat flux, $\overline{w'T'}$, on the local stability parameter, z'/Λ .

2 Vertical Structure of Fluxes

Using local scaling, the vertical profile of Reynolds stress within and above the street is well-known compared to that of heat flux. The conclusion made by Rotach [4] and Louka [5] is that the Reynolds stress was found to increase with height from very small values at the lower part of the RSL towards a virtually constant value. In this section, our propose is an attempt to examine vertical structure of both turbulent vertical fluxes of momentum and heat in real cities such as Beijing and also to know how the roughness elements within RSL influence on atmospheric turbulence in urban boundary layer.

The vertical profiles of local Reynolds stress and heat flux normalized with those estimated at level 32 m, $\overline{u'w'}/(\overline{u'w'})_{32}$ and $\overline{w'T'}/(\overline{w'T'})_{32}$, are plotted versus the non-dimensional height, z/z_0 , in Figures 3 and 4, respectively. The values of $\overline{u'w'}/(\overline{u'w'})_{32}$ and $\overline{w'T'}/(\overline{w'T'})_{32}$ were divided into eight directional sectors of 45°: N-NE, NE-E, E-ES, ES-S, S-SW, SW-W, W-WN and NW-N. In each sector, the values of non-dimensional

Reynolds stress and heat flux were averaged with making error bars of standard deviations for more than three point data.

In Figure 3 the values of $\overline{u'w'}/(\overline{u'w'})_{z_0}$ are roughly constant with height especially at the upper heights ($z/z_0 > 3$) which have a high magnitudes compared to those within and just above RSL. The behaviour of $\overline{u'w'}/(\overline{u'w'})_{z_0}$ over RSL is the same as that observed over flat terrain, which has a constant-flux layer. Lower values around RSL are directly affected by higher individual roughness elements. Thus, it can be expected that the boundary layer could be adjusted to the individual roughness elements of the buildings and trees. The increase and constancy in Reynolds stress above RSL reflect the adaptation to the new (non-urban) surface about the measurement level of 47 m. This result is also obtained by Al-Jiboori [6] and verified from the study of turbulence in terms of standard deviations of three-velocity components.

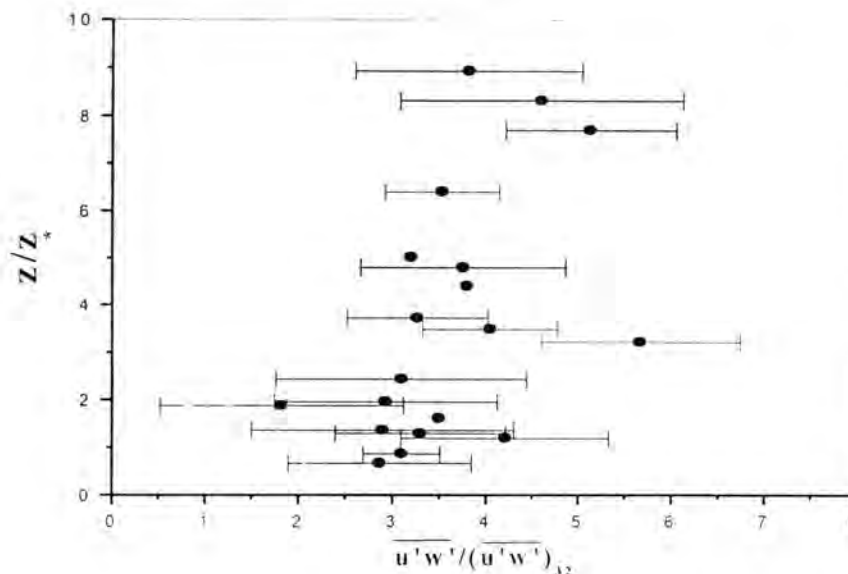


Figure 3: Vertical profile of non-dimensional Reynolds stress, $\overline{u'w'}/(\overline{u'w'})_{z_0}$, against non-dimensional height, z/z_0 . The errors bars represent the standard deviation for more than 3 data points.

Figure 4 shows the vertical distribution of absolute values of dimensionless heat flux, $\overline{w'T'}/(\overline{w'T'})_{z_0}$. Although the scatter of individual

data is somewhat large, the values of $\overline{w'T'}/(\overline{w'T'})_{32}$ have a decreasing tendency starting from lower to upper heights and do not appear affected by roughness elements.

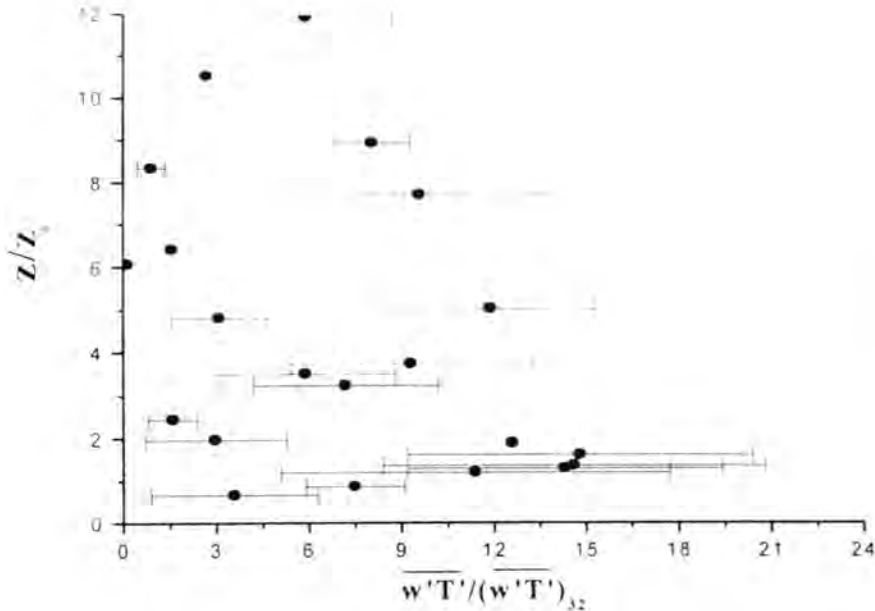


Figure 4: Same as Figure 3 but for non-dimensional heat flux, $\overline{w'T'}/(\overline{w'T'})_{32}$.

CONCLUSIONS

Using the measurements under neutral and near-neutral conditions from a 325-m tower, the turbulence structures have investigated in terms of Reynolds shear stress and heat flux in the framework of local similarity theory. Local values of Reynolds stress through the depth of measurement layer were found to be decreased with the increase of stability. At height 47 m, they are smaller than those at 120 and 280 m. There are no significant differences between local values of heat flux at these heights.

Within the urban roughness sublayer, the buildings and trees play an important role in determining atmospheric turbulence levels in the urban boundary layer. Meanwhile above roughness sublayer the turbulence characteristics have the same trend as those over uniform terrain. Therefore, at the leeward edge of the city a new post-urban boundary layer forms.

Acknowledgement

The author would like to thank Professor Hu Fei in LAPC, IAP, CAS, for providing the observational data.

REFERENCES

- [1] Oke, T. R., The distinction between canopy and boundary layer urban heat islands. *Atmosphere* 14, 268-277, (1976).
- [2] Raupach, M. R., Legg, B. J. & Edwards, I., A wind tunnel study of turbulent flow close to regularly arrayed rough surfaces. *Bound.-Layer Meteorol.* 18, 373-397 (1980).
- [3] Garratt, J. R., Flux profile relations above tall vegetation. *Q. J. R. Meteorol. Soc.* 104, 199-211 (1978).
- [4] Rotach, M. W., On the influence of the urban roughness sublayer on turbulence and dispersion. *Atmo. Env.* 33, 4001-4008 (1999).
- [5] Louka, P., Belcher, S. E. and Harrison, R. G., Coupling between air flow in street and the well-developed boundary layer aloft. *Atmo. Env.* 34, 2613-2621, (2000).
- [6] Al-Jiboori, M. H. and Hu F., Surface roughness around a 325-m meteorological tower and its effect on urban turbulence, *Adv. in Atmo. Sci.*, 22, (2005).
- [7] Nieuwstadt, F. T. M., The turbulent structure of the stable nocturnal boundary layer. *J. of Atmo. Sci.* 41, 2202-2216 (1984).
- [8] Sorbjan, Z., On the similarity in the atmospheric boundary layer. *Bound.-Layer Meteorol.* 34, 377-397, (1986).
- [9] Xu Y. M., Zhou C. F., Li Z. K. and Zhang W., Turbulent structure and local similarity in the tower- layer over the Nanjing area. *Bound.-Layer Meteorol.* 82, 1-21, (1997).
- [10] Al-Jiboori, M. H., Xu Y. M. and Qian Y. F., Local similarity relationships in the urban boundary layer. *Bound.-Layer Meteorol.* 102, 63-82, (2002).
- [11] Al-Jiboori, M. H. and Hu F., Vertical turbulent structures within and over an urban area, submitted to *Adv. of Atmo. Sci.* (2005).
- [12] Al-Jiboori, M.H., Xu Y. M. and Qian Y. F., Vertical structure of second-moment turbulent variables. *Acta Meteorologica Sinica* 15, 218-232, (2001).

مجلة علوم المستنصرية

مدير التحرير

الدكتورة اقبال خضر الجوفي

رئيس التحرير

الأستاذ الدكتور رضا ابراهيم البياتي

هيئة التحرير

عضو

أ.د. نجاه جواد العبيدي

عضو

أ.م.د. قيس جميل لطيف

عضو

أ.م.د. ايمان طارق العلوي

عضو

أ.م.د. ماجد محمد محمود

عضو

أ.م.د. انعام عبد الرحمن ملوكي

عضو

أ.م.د. زكي سعيد توفيق

بسم الله الرحمن الرحيم

تعليمات النشر لمجلة علوم المستنصرية

~~~~~

1. تقوم المجلة بنشر البحوث الرصينة التي لم يسبق نشرها في مكان آخر بعد إخضاعها للتقويم العلمي من قبل مختصين وبأي من اللغتين العربية او الانكليزية .
2. يقدم الباحث طلبا تحريريا لنشر البحث في المجلة على أن يكون مرفقا بأربع نسخ من البحث مطبوعة على الحاسوب ومسحوب بطابعة ليزيرية وعلى ورق ابيض قياس (A4) مع قرص مرن (Disk) محمل بأصل البحث ويكون عدد صفحات البحث 10 صفحات وبضمنها الاشكال والجداول على ان لا يكون الحرف اصغر من قياس 12 .
3. يطبع عنوان البحث واسماء الباحثين (كاملة) وعناوينهم باللغتين العربية والانكليزية على ورقة منفصلة شرط ان لا تكتب اسماء الباحثين وعناوينهم في أي مكان اخر من البحث ، وتعاد كتابة عنوان البحث فقط على الصفحة الاولى من البحث .
4. تكتب اسماء الباحثين كاملة بحروف كبيرة وفي حالة استخدام اللغة الانكليزية وكذلك الحروف الاولى فقط من الكلمات ( عدا حروف الجر والاضافة ) المكونة لعنوان البحث ، وتكتب عناوين الباحثين بحروف اعتيادية صغيرة .
5. تقدم خلاصتان وافيتان لكل بحث ، احدهما بالعربية والاخرى بالانكليزية وتطبع على ورقتين منفصلتين بما لا يزيد على (250) كلمة لكل خلاصة.
6. تقدم الرسوم التوضيحية منفصلة عن مسودة البحث ، وترسم على ورق شفاف (Tracing Paper) بالحبر الصيني الاسود ، وترفق ثلاث صور لكل رسم وتكتب المعلومات تحته على ورقة منفصلة.
7. 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 .
8. يفضل قدر الامكان تسلسل البحث ليتضمن العناوين الرئيسية 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 بالانكليزية .  
9. يتبع الاسلوب الاتي عند كتابة المصادر على الصفحة الخاصة بالمصادر : ترقيم المصادر حسب تسلسل ورودها في البحث ، يكتب الاسم الاخير ( اللقب ) للباحث او الباحثين ثم مختصر الاسمين الاولين فعنوان البحث ، مختصر اسم المجلة ، المجلد او الحجم ، العدد ، الصفحات ، ( السنة ) . وفي حالة كون المصدر كتابا يكتب بعد اسم المؤلف او المؤلفين عنوان الكتاب ، الطبعة ، الصفحات ، ( السنة ) الشركة الناشرة ، مكان الطبع .

10. بخصوص اجور النشر يتم دفع مبلغ ( 20000 ) عشرون الف دينار عند تقديم البحث للنشر وهي غير قابلة للرد ومن ثم يدفع الباحث ( 20000 ) عشرون الف دينار اخرى عند قبول البحث للنشر وبهذا يصبح المبلغ الكلي للنشر ( 40000 ) اربعون الف دينار .

~~~~~

المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
تأثير فطريات المايكورايزا على نمو وإنتاجية محصول القطن النامي تحت مستويات مختلفة من الفسفور هدى فاروق زكي	٨-١
تقييم كفاءة نوعين من فطريات الـ VAM في نمو وإنتاجية محصول الفاصوليا وتحت مستويات مختلفة من الفسفور هدى فاروق زكي	١٨-٩
تقييم بعض الادوية العشبية المحضرة كعلاج للحروق الجلدية ومقارنتها مع الادوية الكيميائية ابراهيم صالح - غيداء حسين - ورود كمال - اشراق عبد الامير	٢٩-١٩
دراسة تأثير بكتريا حامض اللاكتيك ورواشحها على نمو خميرة <i>Cryptococcus neoformans</i> عبد الواحد باقر - عبد العزيز مجيد الكبيسي - حمزية علي عجة	٤٣-٣٠
(تطوير طرق تحضير المناخل الجزيئية ٤A) نضال وديع الدرزي	٥٦-٤٤

تأثير فطريات المايكورايزا على نمو وانتاجية محصول القطن النامي تحت مستويات مختلفة من الفسفور

هدى فاروق زكى

الجامعة المستنصرية / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(استلم بتاريخ ٢٠٠٦/٥/٣ وقيل للنشر في ٢٠٠٧/٤/١٧)

ABSTRACT

The study included conduction of field experiment for cotton plants to test the effect of additional mycorrhizal fungi as (*Glomus mosseae*) only or as mixture of (*Glomus mosseae* + *Gigaspora* Spp.) under different levels of phosphorus. Three replications for each treatments as a mean. During flowering stage 50% of plants, 5 plants were taken randomized for each treatment and the following measurements were recorded: dry weight of shoots gm/plant, Concentration of N and P and percentage of root infection by mycorrhizal fungi. At harvesting stage Cotton weight (hair) gm, number of Balls/plant and weight of 100 seeds were determined. The results could be summarized as following:

The highest shoot dry weight (75.50)gm/plant was recorded in treatment inoculated with mixture of two species and fertilized by (20)KgP/ha which caused significant increase as compared with other treatments. And also this treatment non-significant difference with (F₁P₁) treatment in both phosphorus concentration and percentage of root infection. Highest yield weight (11.83, 11.57)gm/plant were in treatment (F₂P₁ and F₁P₁) which were non-significant differences between them, but they were differences in other treatment significantly. Also (F₂P₁) treatment recorded significant increase in both number of Balls plant and seed index. Our results showed using mycorrhizal fungi inoculation as a mixture (more than one species) lead to significant increase in most of the experiment measurements as compared with using inoculation include one species. In addition using (40)KgP/ha didn't lead to any significant increasing in experimental measurement were studied compared with using (20KP/ha).

الخلاصة

تضمن البحث اختبار تأثير اضافة فطريات المايكورايزا المتمثل بالـ (*Glomus mosseae*) بشكل مفرد فقط او بشكل خليط من (*Gigaspora* Spp. + *Glomus mosseae*) وتحت مستويات مختلفة من الفسفور على نبات القطن في تجربة حقلية وبمعدل ٣ مكررات لكل معاملة. عند مرحلة تزهير حوالي ٥٠% من النباتات تم اخذ ٥ نباتات عشوائيا من كل معاملة وتم اجراء القياسات الاتية لها:

قياس الوزن الجاف للمجموع الخضري، قياس تركيز N و P % فضلا عن حساب النسبة المئوية للجذور المصابة بفطريات المايكورايزا. وعند مرحلة الحصاد تم حساب حاصل القطن (الشعر)، عدد الجوزات/نبات ومعامل البذرة (غم). وكانت النتائج كالآتي: أعلى وزن جاف للمجموع الخضري (٧٥,٥٠ غم/نبات) تم تسجيله في المعاملة الملقحة بخليط من الجنس *Glomus* والمسمدة بمستوى ٢٠ كغم P/هـ. ويتفوق معنوي عن بقية المعاملات كما ان هذه المعاملة لم تختلف معنويا مع المعاملة (F_1P_1) في كل من تركيز P % والنسبة المئوية للجذور المصابة. اما أعلى الأوزان للحاصل (١١,٨٣ و ١١,٥٧) غم/نبات كان للنباتات المعاملتين (F_1P_1 , F_2P_1) اللتان لم تختلفا معنويا فيما بينهما الا انهما اختلفتا وبشكل معنوي عن بقية المعاملات الأخرى. كما تفوقت معاملة (F_2P_1) معنويا في كل من عدد الجوزات/نبات ومعامل البذرة.

وعلى العموم فإن النتائج تظهر بأن استخدام لقاح فطريات المايكورايزا بشكل خليط (أكثر من نوع) قد أدى الى زيادة معنوية في أكثر من قياس من قياسات التجربة مقارنة باستخدام لقاح يتضمن نوع واحد. فضلا عن ذلك فإن زيادة كمية السماد الفوسفاتي المستخدم في التجربة (٤٠ كغم P/هـ) لم تؤدي الى زيادة معنوية في أي من قياسات التجربة المدروسة مقارنة باستخدام ٢٠ كغم P/هـ.

المقدمة

المايكورايزا شكل من اشكال العلاقات التعايشية تبادل المنفعة Mutualism بين جذور النباتات والفطريات. فالفطريات تساعد النبات في حصوله على المغذيات من التربة، في حين يقوم النبات بتزويد الفطر ببعض انواع التمثيل الضوئي (١) حيث تستعمر فطريات المايكورايزا الحويصلية - الشجرية Vesicular Arbuscular Mycorrhiza (VAM) خلايا الجذر للحصول على مصدر الكربون (٢). ويمكن ان يكون لهذه العلاقة تأثيرات مفيدة على نمو النبات وفي زيادة مقاومته للجهود الاحيائية وغير الاحيائية (٣). وقد ذكر (٤) ان اهمية فطريات المايكورايزا (VAM) في تحسين الانتاجية تكون مرتبطة بالبيئات شبه الجافة والفسفور المحدد (كمعظم ترب العراق). لذا استهدف البحث دراسة تأثير اضافة هذه الفطريات بشكل مفرد (*Glomus mosseae*) وبشكل خليط (*Gigaspora* Spp. + *Glomus mosseae*) وعلى المستوى الحقل في نمو وانتاجية محصول القطن *Gossypium hirsutum* لكونه من المحاصيل الاقتصادية المهمة في القطر وتحت مستويات مختلفة من الفسفور.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، حيث قسم الحقل الى ثلاث قطاعات (المكررات). كل قطاع احتوى على (٦) معاملات، (الواح) ابعاد كل منها (٢×١) م^٢ وكل لوح احتوى على مرزتين. اضيف السماد البوتاسي بمعدل (٨٠ كغم/ك/هـ) والفسفوري بمعدل (٤٠، ٢٠، ٠) كغم/ك/هـ على هيئة سوبرفوسفات الكالسيوم الثلاثية عند موعد زراعة البذور بوضعها في اخاديد تحت مستوى الزراعة على عمق (١٠ سم). اما النتروجين فقد تم اضافته بمعدل (٤٠ كغم/ك/هـ) وعلى دفعتين الاولى بعد عملية الخف مباشرة والثانية بعدها بشهر تقريباً. لقاح المايكورايزا *Glomus mosseae* فقط او بشكل خليط من *Gigaspora Spp. + Glomus mosseae* تمت اضافته بشكل خليط تربة مع جذور مصابة وحسب المعاملات بمعدل ٢٥٠ غم/خط. زرعت بذور القطن *Gossypium hirsutum* صنف لاشاتا في ٢٥/٣/٢٠٠٥ في جور بابعاد ٢٠ سم على خط التغير ووضع في كل جورة ٤-٥ بذرات، اجريت عملية الترقيع للجور الغائبة بعد ان ظهر فوق التربة ٧٠% من البادرات، خففت النباتات الى نباتين بالجورة بعد ان كان ارتفاع النبات ٢٥ سم تقريباً. وخلال فترة التجربة تم اخذ (٥) عينات من النباتات عشوائياً من كل لوح وذلك خلال مرحلتي التزهير لحوالي ٥٠% من النباتات والحصاد. اخذت العينات في مرحلة التزهير وقطعت الاجزاء الخضرية للنباتات مع سطح التربة ثم ازيلت التربة من حول الجذور باستخدام تيار ماء ضعيف واجريت القياسات التالية:

١. قياس الوزن الجاف للمجموع الخضري وفقاً لـ (٥).
٢. حساب النسبة المئوية للجذور المصابة بفطريات المايكورايزا: تم فحص ٢٠ قطعة من الجذور الشعرية من كل نبات بطول (١ سم) لكل قطعة تحت المجهر الضوئي بعد تصبغها بصبغة (Acid Fuchsin) تبعاً لـ (٦) ومن ثم حساب النسبة المئوية للاصابة حسب المعادلة الآتية:

عدد القطع المصابة

$$\text{النسبة المئوية للاصابة} = \frac{\text{عدد القطع الكلوية}}{100} \times 100$$

عدد القطع الكلوية

٣. قياس تركيز النتروجين والفسفور في المجموع الخضري: تم ذلك بعد طحن العينات النباتية الجافة وضمها حسب طريقة Stewart (٧) المبينة في (٨). بعدها تم تقدير كل من النتروجين باستخدام جهاز كدال وفق طريقة Bremner and Keeny (٩)

والفسفور باستخدام جهاز Spectrophotometer حسب طريقة Watnabe and Olsen (١٠).

وعند الوصول الى مرحلة الحصاد اخذت القياسات التالية:

١. حاصل القطن (الشعر): مجموع حاصل جنيتين من القطن (الشعر) محسوبا بالغرامات.
 ٢. عدد الجوزات للنبات الواحد: تم حسابها بجمع عدد الجوزات السليمة والمتفتحة لخمسة نباتات بصورة عشوائية وتقسيمها على عدد النباتات.
 ٣. معامل البذرة (غم): وزن مئة بذرة بالغرامات.
- وقد اجري التحليل الاحصائي على نتائج التجربة واعتمد اختبار دنكن لاختبار المعنوية بين المعاملات المختلفة تبعا للـ (١١).

النتائج والمناقشة

توضح النتائج المبينة في جدول (١) بان اعلى وزن جاف للمجموع الخضري (٧٥,٥٠) غم قد تم تسجيله في المعاملة الملقحة بخليط من الفطرين والمجهزة بمستوى ٢٠كغم/P هـ (F_2P_1) والتي تفوقت معنويا على بقية المعاملات، في حين وصلت ادنى المعدلات وبشكل معنوي في المعاملات غير المسمدة (F_2P_0 , F_1P_0) اذ كانت الاوزان (٥٣,٧٥ و ٤٦,٤٠) غم/نبات على التوالي. اذ تعد خصوبة التربة (قدرة التربة على امداد العناصر الغذائية بالكميات الملائمة لنمو النبات) من اهم العوامل المحددة لنمو النبات وان نقص أي من العناصر الغذائية كالفسفور مثلا في التربة ينعكس تأثيره على نمو الحاصل وانتاجه (١٢).

كما يلاحظ من نتائج الجدول ذاته ان الوزن الجاف للمجموع الخضري قد انخفض وبشكل معنوي عند التسميد بمستوى ٤٠ كغم P/هـ وربما يعود ذلك لكون النباتات المايكورايزية تختزل عند اضافة المغذيات الى النبات (١٣) اذ تعد مغذيات التربة ولاسيما الفسفور من اهم العوامل غير الحيوية التي تؤثر على فطريات المايكورايزا فعندما تكون التربة غنية بالمغذيات فان وجود المايكورايزا يمكن ان يثبط نمو النبات عن طريق خفضها لمستويات نواتج التمثيل الضوئي نتيجة لاستهلاكها وبذلك يتغير التكافل من (+, + mutualism) الى (+, -) Parasitism (١٤). كما توضح نتائج الجدول (١) ان النسبة المئوية لاصابة الجذور قد وصلت الى اعلى معدلاتها وبشكل معنوي (٩٠%) في المعاملتين (F_2P_1 , F_1P_1) والتي لم تختلف معنويا عن (F_2P_2 , F_1P_2). في حين وصلت ادنى المعدلات وبشكل معنوي (٥٥%) لمعاملة (F_2P_0) وهذا يشير الى قابلية القطن الكبيرة

للإصابة بفطريات المايكورايزا فضلا عن ان الفسفور ضروري لهذه العلاقة وهذا ربما يعود الى ان تركيز الفسفور الجاهز في اغلب الترب قليل وخاصة الكلسية منها (مثل الترب العراقية) مما يجعل علاقة المايكورايزا غير قادرة على التكون بشكل كبير (١٥). كما يتضح من النتائج المتحصل عليها ان المعاملة (F_2P_0) قد اعطت اقل المعدلات في النسبة المئوية للإصابة (٥٥%) مقارنة بـ (٧٠%) لمعاملة (F_1P_0) والذي من الممكن ان يعزى الى حالة التنافس الميكروبي (- و -) على المواد الغذائية الموجودة بكميات محدودة في منطقة الرايزوسفير (١٦). كذلك تشير نتائج الجدول (١) ان اعلى تركيز لعنصري (P و N) كان (٢,٧٨ و ٠,٥٦) على التوالي لمعاملة F_2P_1 و (٢,٦٦ و ٠,٥٥) للعنصرين اعلاه في المعاملة (F_1P_1) وعلى التوالي وبشكل عام تشير نتائج تراكيز عنصري (P و N) الى ان اعلى التراكيز لهذين العنصرين قد تم تسجيلهما في المعاملات المسمدة بمستوى ٢٠ كغم P/هـ ويتفوق معنوي مقارنة بكل من المعاملات المسمدة بـ ٤٠ كغم P/هـ او غير المسمدة. وربما يفسر هذا على اساس النسبة المئوية للإصابة (جدول ١) حيث ان الإصابة المايكورايزية تزيد من نمو الجزء الخضري فضلا عن زيادة انتقال هذه العناصر اليه (١٧) كما ان زيادة النسبة المئوية للإصابة بالفطريات يعزى لها الزيادة في اخذ المغذيات من قبل النبات وخاصة الفسفور (١٨).

اما بالنسبة لنتائج جدول (٢) فنلاحظ من خلال النتائج بان اعلى معدل لوزن الحاصل كان (١١,٨٣ غم) لمعاملة (F_2P_1) والتي تفوقت بشكل معنوي على بقية المعاملات ولكنها لم تختلف معنويًا عن وزن معاملة (F_1P_1) في حين وصلت ادنى المعدلات وبشكل معنوي (٨,٥٥ غم) لمعاملة (F_2P_0). وربما تعود الزيادة في وزن الحاصل عند اضافة ٢٠ كغم P/هـ لكون النباتات المايكورايزية تستجيب بشكل افضل للمستويات الواطنة من الفسفور (١٩).

كما ان الفسفور يساعد على تكوين مجموع جذري قوي له القدرة على التغلغل في اعماق التربة ومن ثم زيادة كمية الماء والعناصر الغذائية الممتصة (٢٠) فقد ادت اضافة السماد الفوسفاتي الى زيادة في حاصل الحبوب لمحصول الحنطة (٢١) ومحصول فول الصويا (٢٢).

كذلك سجلت المعاملات الملقحة بخليط من الجنسين والمسمدة بمستوى ٢٠ كغم P/هـ اعلى المعدلات لكل من عدد الجوزات/نبات ومعامل البذرة حيث وصلت الى (٧,٠٠ و ١٢,٧٤) على التوالي في حين كانت ادنى المعدلات (٤,١٦ و ١٠,٦٨) للقياسين اعلاه على التوالي في المعاملة (F_1P_0). وقد يعود السبب الى ان التراكيز الواطنة من الفسفور

الجاهز مع تلقيح النباتات بفطريات المايكورايزا له تأثير كبير في زيادة الانتاجية (٢٣) كما ان نمو العائل والفطر وتطورهما يتأثران معنويا بنوع النبات العائل ونوع الفطر والتربة (٢٤) والذي يفسر عموما الاختلافات الحاصلة ما بين F_1 و F_2 حيث ان التداخل ما بين الانواع المايكروبية قد يزيد او يثبط من تأثير النوع الواحد (٢٥) حيث ان الاجناس والانواع المختلفة من الفطريات تتباين في تأثيرها على نمو النبات (٢٦ . ٢٧).

جدول (١)

القياس المعاملة	الوزن الجاف للمجموع الخضري غم/نبات	تركيز %N	تركيز %P	النسبة المئوية للجذور المصابة %
F_1P_0	53.75d	2.50cd	0.45cd	70b
F_1P_1	65.00b	٢.66b	0.55a	90a
F_1P_2	55.00cd	2.47d	0.50b	80ab
F_2P_0	46.40e	2.51cd	0.42d	55c
F_2P_1	75.50a	2.78a	0.56a	90a
F_2P_2	58.00c	2.55c	0.49bc	80ab

جدول (٢)

القياس المعاملة	وزن الحاصل غم/نبات	عدد الجوزات /نبات	معامل البذرة (غم)
F_1P_0	10.03bc	4.16e	10.68c
F_1P_1	11.57a	4.78d	11.09c
F_1P_2	10.38b	5.41c	11.87b
F_2P_0	8.55d	6.01b	12.00b
F_2P_1	11.83a	7.00a	12.74a
F_2P_2	9.93c	6.87a	12.23b

F_1 : التلقيح بالفطر *Glomus mosseae* فقط.

F_2 : التلقيح بخليط من *Gigaspora Spp.* + *Glomus mosseae*.

P_0 : عدم اضافة السماد الفوسفاتي.

P_1 : اضافة ٢٠ كغم P/مـ.

P_2 : اضافة ٤٠ كغم P/مـ.

المصادر

1. John, T.V., Mycorrhizal inoculation: Advice for growth and restorationists, Hortus West, 7(2): 1-4 (1996).
2. Bago, B., Pfeffer, P.E. and Shachar-Hill, Y., Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas, Plant Physiol, 124: 949-957 (2000).
3. Mortan, T.B. and Benny, G.L., Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon, 37: 471-491 (1990).
4. Black, K.G., Osborne, B.A. and Mitchell, D.T., Photosynthetic water-use and phosphorus-use efficiencies of mycorrhizal cucumber plants, In: Aspects of Applied Biology, No.63. Plant microbial Interactions : positive interactions in relation to crop production and utilization. Edited by: Andrews, U., Andrews, U.E. and Humphry, D.R. UK. PP: 195-202 (2001).
5. ابو ضاحي، يوسف محمد، تغذية النبات التطبيقي، جامعة بغداد، بيت الحكمة (١٩٨٩).
6. Kormanik, P.P., Bryan, W.C. and Schultz, R.C., Producers and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay., Can. J. Microbial. 26: 536-538 (1980).
7. Stewart, E.A., Grimshaw, H.A., Parkinson, J.A. and Quarumby C., Chemicals Analysis of Ecological materials. Black Well. Sci., Publ. London and Melborn (1974).
8. Allen, S.E., Chemical Analysis of Ecological materials. Black Well Scientific publication Oxford, London (1974).
9. Bremner, J.U. and Kenny, D.R., Steam distillation methods for determination for ammonium, nitrate and nitrite, Anal.Chem.Acta. 32: 485-495 (1965).
10. Watanbe, F.S. and Olsen, S.R., Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO_3 extracts from soil, Soil Sci. Soc. Am. Froc. 29:677-778 (1965).
١١. الساهوكي، مدحت ووهيب، كريمة احمد. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق (١٩٩٠).
١٢. الصحاف، فاضل حسين، تغذية النبات العملي، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد، بيت الحكمة (١٩٨٩).
13. Lynd, J.Q. and Ansman, T.R., Lichen mycobionts of mycorrhizal symbiosis with nitrogen fixation of show partridge pea, J. Plant Nutr., 17 (2 and 3): 445-459 (1994).
14. Rangeley, A., Daft, U.J. and Bould, P., The inoculation of white clover with mycorrhizal fungi in unsterile hill soils, New Phytol. 92: 89-102 (1982).

15. Abbott, L.K. and Robson, A.D., Growth stimulation of subterranean Clover with vesicular-arbuscular mycorrhizae, Aust.J. Agric. Res. 28: 639-649 (1977).

١٦. الكسندر، مارتن، مقدمة في ميكروبيولوجيا التربة، الطبعة الثانية، مترجم، جون وايلي وأولاده، نيويورك (١٩٨٢).

17. Lesueur, D., Ingleby, K., Odee, D., Chmaberlian, J., Wilson, J., Tikimanga, T., Sarrailh, J.M. and Poitinger, A., Improvement, of forage production in *Calliandra Calothyrsus*: Methodology for identification of an effective inoculum containing *Rhizobium* Strains and arbuscular mycorrhizal isolates., J. Biotech. 91: 269-282 (2001).

18. Fitter, A.H., Water relations of red clover *Trifolium pretense* L, as affected by VA Mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought J.Exp. Bot. 39: 595-6-3 (1988).

19. Bethlen Falvay, G.J., Bayne, H.G. and Pocovyky, R.S., Parasitic and mutualistic association between mycorrhiza fungus and soybean: the effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. Physiol. Plant, 57:543-548. (1983).

20. Martar, A.E., Yields and response of cereal crops to phosphorous fertilization under change rain fall condition, Agren. J. 69: 879-882 (1977).

٢١. علي، علي حسين، ظاهرة عدم الاخصاب في حنطة الخبز وتأثير بعض العمليات الحقلية عليها في المنطقة الشمالية من العراق، رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل (١٩٨٣).

٢٢. الكرطاني، عبد الكريم عريبي سبع، تأثير فطر المايكورايزا *Glomus mosseae* والفسفور في نمو وحاصل فول الصويا، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد (١٩٩٥).

23. Costa, N. and Paulino, V., Response of *Desmodium gyroides* to phosphorus fertilization and mycorrhizal inoculation. Forest, Farm and Community. Tree Research Reports. 2: 43-45 (1997).

24. Bethlenfalay, G.J., Olrich, J.U. and Brown, M.S., Plant responses to mycorrhizal fungi: Host endophyte and soil effects, Soil Sci Soc.. Amer. J. 49: 1164-1168. (1985).

٢٥. الراشدي، راضي كاظم، احياء التربة المجهرية، كلية الزراعة، جامعة البصرة (١٩٨٧).

٢٦. العاني، محسن عزيز مصطفى، دور التقنية الحياتية في نمو وانتاجية محصولي الحنطة وفول الصويا باستخدام فطريات المايكورايزا VA mycorrhizal، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل (١٩٩٣).

٢٧. المفتي، هدى فاروق زكي، التأثير المتداخل لفطري المايكورايزا الحويصلية السجيرية

والرايزوبيا في نباتات الماش والابقلاء النامية تحت مستويات مختلفة من الفسفور، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية (٢٠٠٤).

تقييم كفاءة نوعين من فطريات الـ VAM في نمو وانتاجية محصول الفاصوليا وتحت مستويات مختلفة من الفسفور

هدى فاروق زكي

الجامعة المستنصرية / كلية العلوم - قسم علوم الحياة

(استند بتاريخ ٢٦ / ٥ / ٢٠٠٦ وقبل للنشر في ٦ / ٦ / ٢٠٠٧)

ABSTRACT

Efficiency of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora sp.* in growth and yield of *phaseolus vulgaris* grown under different levels of phosphorus was evaluated under field condition. The experiment comprised of (6) treatments prepared from the interaction of two levels of inoculation (inoculation with *Glomus mosseae* (F₁) and inoculation with *Gigaspora sp.* (F₂), and three levels of phosphorus: 0,20,40 Kg p/ha. The experimental unit size was (1x2)m. Irrigation and hand-weeding were done when needed. During this experiment some of plant measurements were recorded at two intervals: at flowering 50% of plants and harvesting stages. In the first interval, the following measurements were taken: shoots dry weight, concentration of N and P in addition to percentage of root infection with mycorrhizal fungi. At harvesting, number of pods/plant, number of seeds/pods and weight of 100 seeds were recorded. The results of the experiment could be summarized as following:

1. Inoculation with *Glomus mosseae* caused in a significant increase in all experimental measurements as compared with treatments inoculated with *Gigaspora sp.*, when no addition of the phosphorus occurred.
2. Highest values for the first stage measurements were recorded in treatment inoculated with (F₁) and fertilized with 20Kg P/ha, they were (3.81, 3.58, 0.53, 100) for (shoot dry weight gm/plant, N concentration, P concentration % and percentage of root infection) as respectively. As compared with (2.78, 3.00, 0.41, 80) as significant least values for above measurements as respectively in treatment inoculated with (F₂) and non-fertilized.
3. Application of phosphorus in level 40Kg P/ha significantly reducing the percentage of root infection with (F₁) fungus and (F₂) fungus as compared with both percentage of infection that recorded under 20Kg P/ha.

الخلاصة

تم تقييم كفاءة نوعين من فطريات المايكورايزا الحويصلية الشجرية *Glomus mosseae* والـ *Gigaspora* sp. في نمو وإنتاجية محصول الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* المزروعة تحت مستويات مختلفة من الفسفور وتحت ظروف الحقل.

احتوت التجربة على ٦ معاملات ناتجة عن التداخل بين نوعين من التلقيح (التلقيح بالفطر *Glomus mosseae* (F_1) والتلقيح بالفطر *Gigaspora* sp. (F_2) كلا على حدة مع ثلاث مستويات من الفسفور (٠، ٢٠، ٤٠) كغم P/هـ، حجم الوحدة التجريبية كان (٢×١) م. تم إجراء عملية الري والتعشيب يدوياً كلما دعت الحاجة. وخلال هذه التجربة تم تسجيل عدد من القياسات النباتية وذلك خلال فترتين الأولى عند تزهير حوالي ٥٠% من النباتات والثانية عند مرحلة الحصاد وخلال فترة القياس الأولى تم تسجيل كل من الوزن الجاف للأجزاء الخضرية وتقدير تركيز كل من N و P إضافة إلى النسبة المئوية لاصابة الجذور بفطريات المايكورايزا؛ أما في مرحلة الحصاد فقد تم تسجيل عدد القنرات/نبات وعدد البذور/قرنة ووزن ١٠٠ بذرة وقد كانت النتائج كالآتي:

١. تفوقت المعاملات الملقحة بالفطر *Glomus mosseae* وبمعنوية مقارنة بتلك الملقحة بالفطر *Gigaspora* sp. في جميع قياسات التجربة المدروسة عند عدم إضافة السماد الفوسفاتي.
٢. أعلى القيم لقياسات المرحلة الأولى تم تسجيلها في المعاملة الملقحة بالـ (F_1) والمسمدة بـ ٢٠ كغم P/هـ، إذ كانت (٣,٨١، ٣,٥٨، ٠,٥٣، ١٠٠) لكل من الوزن الجاف للمجموع الخضرى غم/نبات تركيز N %، تركيز P %، النسبة المئوية للجذور المصابة % على التوالي مقارنة بـ (٢,٧٨، ٣,٠٠، ٠,٤١، ٨٠) كأوطأ القيم وبشكل معنوي للقياسات اعلاه وعلى التوالي في المعاملة الملقحة بالـ (F_2) وغير المسمدة.
٣. أدت إضافة السماد الفوسفاتي بمستوى ٤٠ كغم P/هـ إلى انخفاض معنوي في النسبة المئوية للجذور المصابة بالفطر (F_1) والفطر (F_2) مقارنة بنسبتنا الاصابة التي تم تسجيلها عند التسميد بـ ٢٠ كغم P/هـ.

المقدمة

من المعروف ان هناك علاقة وثيقة بين النباتات والاحياء المجهرية المختلفة والتي يمكن للاحياء المجهرية ان تؤثر في نمو النبات من خلال تأثيرها في التغذية

والامراض (١). وتعد المايكورايزا واحدة من اهم العلاقات بين النبات والاحياء المجهرية. فالمايكورايزا شكل من اشكال العلاقات التعايشية تبادل المنفعة (Mutualism) بين جذور النباتات والفطريات، الفطريات تساعد النبات في حصوله على الماء والمغذيات من التربة، في حين يقوم النبات بتزويد الفطر ببعض نواتج التمثيل الضوئي (٢). وذكر (٣) ان المايكورايزا تقسم بصورة عامة الى المايكورايزا الخارجية (Ectomycorrhizeae) والمايكورايزا الداخلية (Endomycorrhizeae). النوع الاول يحصل وبصورة رئيسية بين الاشجار والشجيرات وفطريات تابعة الى Actomycetes او Basidiomycetes. دون ان يخترق مايسيليوم الفطر الخلايا الحية للجذور. اما النوع الثاني فيتميز بقدرته على اختراق انسجة قشرة الجذر (٤)، من الناحية الاخرى فان المايكورايزا الداخلية تقسم الى مجموعتين الاولى تكونها فطريات ذات هايفات مقسمة والمجموعة الاخرى تكونها فطريات ذات هايفات غير مقسمة والتي تعرف بالمايكورايزا الحويصلية - الشجرية VAM (Vesicular Arbuscular Mycorrhizeae) لتمييزها بتكوين تراكيب متفرعة داخل خلايا الجذر تعرف بالشجيرة (Arbuscule) والتي تمثل مواقع تبادل المغذيات بين الفطر والنبات (٥) فضلاً عن تكوين تراكيب اخرى تعرف بالحوصيلات (Vesicles) والتي يعتقد بان لها علاقة بخزن المركبات الفسفورية (٦). ويشير Morton and Benny (٧) الى ان فطريات VAM التي تعود الى رتبة (Glomales) يمكن ان تقيم علاقتها التعايشية مع حوالي ٩٠% من النباتات الزهرية، وتضم هذه الرتبة ٦ اجناس ويمكن ان يكون لهذه العلاقة تاثيرات مفيدة على نمو النبات وفي زيادة مقاومته للجهود الاحيائية وغير الاحيائية. الا انه تم الاشارة الى وجود اختلافات ما بين وانواع فطريات الـ VAM المختلفة في القدرة على اصابة النبات العائل وتحسين انتاجيته (٨، ٩). لذا استهدف البحث تقييم كفاءة نوعين مختلفين من فطريات (VAM) وهما *Glomus mosseae* والـ *Gigaspora sp.* في اصابة وانتاجية محصول الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* تحت مستويات مختلفة من الفسفور.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة باستخدام القطاعات العشوائية الكاملة. بعد حراثة التربة وتنعيمها قسم الحقل الى ثلاث قطاعات (المكررات) كل منها احتوى (على ٦) معاملات (الواح) ابعاد كل منها (٢×١) م^٢ وكل لوح احتوى على مرزتين للزراعة ونفذت التجربة باستخدام القطاعات العشوائية الكاملة في كلية العلوم/الجامعة المستنصرية. اضيف السماد البوتاسي بمعدل (٨٠

تقييم كفاءة توعين من فطريات الـ VAM في نمو والتأجية محصول الفاصوليا وتحت مستويات مختلفة من الفسفور
هذى فاروق

كغم K/هـ) والفسفوري بمعدل (١٠، ٢٠، ٤٠) كغم P/هـ على هيئة سوپر فوسفات الكالسيوم الثلاثية (TSP) عند موعد زراعة البذور بوضعها في اخاديد تحت مستوى الزراعة على عمق ١٠ سم. اما النتروجين فقد تم اضافته بمعدل ٤٠ كغم N/هـ على دفعتين الاولى بعد عملية الخف مباشرة والثانية بعدها بشهر تقريبا. اما بالنسبة للقاح المايكورايزا المتمثل بالـ (*Glomus mosseae*, *Gigaspora* sp.) كل على حدة تمت اضافته بشكل خليط من تربة مع جذور نباتات الذرة البيضاء مصابة وحسب المعاملات بمعدل ٢٥٠ غم/خط وتم الحصول على اللقاح من مركز بحوث التربة/وزارة الزراعة. زرعت بذور الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* في ٢٥/٨/٢٠٠٥ في جور بابعاد ٢٠ سم على خط التعيير ووضع في كل جورة ٢-٤ بذرات. اجريت عملية الترقيع للجور الغائبة بعد ان ظهر فوق التربة ٥٠% من البادرات. تم تخفيف النباتات الى نباتين وخلال فترة التجربة تم اخذ (٥) عينات من النباتات عشوائيا من كل لوح وذلك خلال مرحلة التزهير لحوالي ٥٠% من النباتات حيث اخذت النباتات وقطعت الاجزاء الخضرية للنباتات مع سدح التربة ثم ازيلت التربة من حول الجذور باستخدام تيار ماء ضعيف واجريت القياسات التالية:

١. الوزن الجاف للمجموع الخضري (١٠).

٢. النسبة المئوية للجذور المصابة بفطريات المايكورايزا: تم فحص ٢٠ قطعة من الجذور الشعرية من كل نبات بطول (١ سم) لكل قطعة تحت المجهر الضوئي بعد تصبغها بصبغة (acid fuchsin) (١١) وتم حساب النسبة المئوية للإصابة حسب المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد القطع المصابة}}{100} \times 100$$

عدد القطع الكلية

٣. قياس تركيز النتروجين والفسفور في المجموع الخضري: تم طحن المجموع الخضري للعينات النباتية الجافة وهضمها حسب طريقة Stewart (١٢) المبينة في Allen (١٣) بعدها تم تقدير كل من النتروجين باستخدام جهاز الماكروكلدال وفق طريقة Bremner and Keeney (١٤) والفسفور باستخدام جهاز Spectrophotometer حسب طريقة Watanbe and Olsen (١٥).

كما اخذت بعض القياسات عند نضج ٥٠% من القرينات وشملت:

١. عدد القرينات لكل نبات: تم حساب عدد القرينات من كل معاملة وخمسة نباتات.
٢. عدد البذور لكل قرنة: تم حساب عدد البذور لكل قرنة ولجميع المعاملات وذلك بالنسبة للنباتات السابقة.

٣. وزن مئة بذرة: تم وزن مئة بذرة لجميع المعاملات وذلك بالنسبة للنباتات السابقة. وقد اجري التحليل الاحصائي على نتائج التجربة واعتمد اختبار دنكن لاختبار المعنوية بين المعاملات المختلفة (١٦).

النتائج والمناقشة

توضح النتائج المبينة في جدول (١) بأن اعلى وزن جاف للمجموع الخضري غم/نبات كان (٣,٨١) للمعاملة الملقحة بالفطر *Glomus mosseae* والمسمدة بمستوى ٢٠ كغم P/هـ (F_1P_1) والتي لم تختلف معنوياً مع (٣,٧٧) غم/نبات وزن المعاملة الملقحة بالفطر *Gigaspora* sp. والمسمدة بنفس المستوى من الفسفور. الا ان المعاملتين اختلفتا وبشكل معنوي عن بقية المعاملات الاخرى. كما يلاحظ من نتائج الجدول ذاته زيادة الوزن الجاف للمجموع الخضري وبشكل معنوي (٣,٠٠) غم/نبات لمعاملة F_1P_0 مقارنة بالوزن الجاف لمعاملة F_2P_0 . وربما يرجع تفسير ذلك على اساس الاختلاف في النسبة المئوية لاصابة الجذور والتي يبينها جدول (١)، حيث ان زيادة النسبة المئوية للاصابة بفطريات المايكورايزا (اذ وصلت اعلى نسبة مئوية للاصابة (١٠٠، ٩٥) % للمعاملتين F_1P_1 ، F_2P_1 على التوالي وبفرق معنوي عن بقية المعاملات) يعزى لها الزيادة في اخذ المغذيات من قبل النبات (١٧) وبالتالي زيادة في النمو الخضري (١٨) فضلاً عن قدرة فطريات المايكورايزا في التأثير ايجابياً على الفعاليات البايوكيميائية والفسيزيولوجية في النبات (١٩). كما توضح بيانات جدول (١) بأن زيادة مستوى الفسفور الى ٤٠ كغم P/هـ لم يؤدي الى زيادة معنوية في الوزن الجاف للمجموع الخضري مقارنة بالتسميد مستوى ٢٠ كغم P/هـ سواء كان ذلك لمعاملات (F_1 او F_2) على التوالي مقارنة بمخيلتها المسمدتين بـ ٢٠ كغم P/هـ. اذ ان العلاقة سلبية ما بين محتوى التربة من الفسفور وشدة الاصابة المايكورايزية (٢٠). وقد يعود ذلك هو ان تحت ظروف توفر الفسفور في التربة، تقل نفاذية الاغشية لخلايا الجذور بسبب زيادة الفوسفوليبيدات فيها وبالنتيجة تقل افرازات الجذور من السكريات والاحماض الامينية وهذا يؤدي الى انخفاض في نسبة الجذور المصابة (٢١). كما يبين Taylor and Harrier (٢٢) ان هناك استجابة جهازية ضمن نظام النبات تجاد الاصابة بفطريات المايكورايزا. يظهر الجدول (١) ان اعلى تركيز لعنصري N و P كان (٣,٥٨ و ٠,٥٣) لمعاملة F_1P_1 وعلى التوالي والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة F_2P_1 في حين وصلت ادنى المعدلات الى (٣,٠٠ و ٠,٤١) لمعاملة F_2P_0 لتركيزي N و P وعلى التوالي وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (٢٣) الذين اشاروا الى حصول اختلافات معنوية بين اجناس فطريات المايكورايزا *Scutellospora* sp. و *Gigaspora* sp.

Acaulspora sp. في تأثيرها على تركيز P في الجزء الخضري لنبات *Desmodium gyroides* عند اضافة او عدم اضافة الفسفور، كما ان نتائج جدول (١) تظهر وجود ارتباط موجب ما بين تركيز الفسفور في الجزء الخضري ونسبة الجذور المصابة حيث تماثل هذه النتائج مع ما توصل اليه اخرون (٢٤) الذي اشار الى وجود ارتباط معنوي موجب بين النسبة المئوية للجذور المصابة بالـ VAM ومحتوى الفسفور في نبات الفاصوليا. كذلك فان فطريات المايكورايزا تعمل على زيادة اخذ الفسفور من قبل النباتات النامية في الترب غير المسمدة او ذات التثبيت العالي للفسفور (٢٥). كما ان قياس فطريات المايكورايزا تظهر اختلافات في قابليتها لتحسين قابلية النبات على امتصاص العناصر الغذائية (٩).

اما عن نتائج جدول (٢) فيظهر ان فطر *Glomus mosseae* هو الاكثر كفاءة مقارنة بالفطر *Gigaspora* sp. عند جميع مستويات الفسفور المستخدمة فقد تم تسجيل اعلى القيم وبشكل معنوي (٢٨,٣٠، ٦,٨٢، ٤٢,٠٢) لكل من عدد القرنات/نبات، عدد البذور/قرنة ووزن مئة بذرة على التوالي لمعاملة (F_1P_1) مقارنة بادنى المعدلات وبشكل معنوي (٢٠,١٨، ٤,٦٣، ٢٧,٠٠) للقياسات اعلاه وعلى التوالي لمعاملة (F_2P_0)، والذي قد يعزى الى الظروف البيئية حيث تظهر فطريات المايكورايزا استجابة مختلفة تبعاً لدرجة الحرارة والدالة الحامضية فضلاً عن محتوى كل من N و P في التربة (٢٦).

كما يلاحظ من نتائج الجدول ذاته ان معاملة (F_2P_0) قد انخفضت وبشكل معنوي مقارنة بنتائج معاملة (F_1P_0) والذي ربما يفسر اما على اساس pH حيث اشار John (٢٧) ان نمو فطر *Glomus mosseae* يكون افضل في الترب القاعدية من الفطر *Gigaspora* Sp. او على اساس ان الاختلافات ما بين فطريات المايكورايزا في قابليتها على تحسين نمو النبات تعود الى التداخل ما بين الفطر والطرارز الجيني للنبات المضيف (٢٨)، كذلك توجد اختلافات في الفة فطريات المايكورايزا تجاه النبات العائل فضلاً عن تأثير صفات التربة (٢٩).

من خلال النتائج التي تم الاشارة اليها تظهر نتائج جدول (٢) ان زيادة مستوى الفسفور الى ٤٠ كغم P/هـ لم يشهد أي زيادة معنوية في أي قياس من قياسات التجربة مقارنة بمستوى ٢٠ كغم P/هـ كما هو الحال مع نتائج جدول (١)، والذي قد يعزى الى انخفاض نسبة الجذور المصابة بفطريات المايكورايزا في هذه المعاملات (P_2) وبمعنوية مقارنة بمعاملات (P_1)، حيث ذكر (٣٠) الى ان مستوى الفسفور يختزل بقوة نسبة الجذور المصابة بفطريات المايكورايزا. كما وان الحد الاقصى لاحتياج النبات من الفسفور غير ثابت بين البقوليات، ويعتمد ذلك على فعالية النبات البقولي على امتصاص واستخدام العنصر

فضلاً عن ان تجهيز الفسفور يعتمد على مصدر وكمية الفسفور المتاحة في التربة والسعة الحركية له في النظام الجذري النباتي (٣١).

جدول (١): تأثير المعاملات المختلفة في الوزن الجاف للمجموع الخضري، تركيز كل من N و P% والنسبة المئوية للجذور المصابة

القياس المعاملة	الوزن الجاف للمجموع الخضري غم/نبات	تركيز N %	تركيز %P	النسبة المئوية للجذور المصابة %
F ₁ P ₀	3.00b	3.50bc	0.43cd	90b
F ₁ P ₁	3.81a	3.58a	0.53a	100a
F ₁ P ₂	2.93b	3.49c	0.49ab	90b
F ₂ P ₀	2.78c	3.00d	0.41d	80c
F ₂ P ₁	3.77a	3.56ab	0.49ab	95a
F ₂ P ₂	3.00b	3.47c	0.47bc	85bc

جدول (٢): تأثير المعاملات المختلفة في عدد القران/نبات، عدد البذور/قرنة ووزن منة بذرة

القياس المعاملة	عدد القران/نبات	عدد البذور /قرنة	وزن منة بذرة (غم)
F ₁ P ₀	23.07b	5.41c	35.46c
F ₁ P ₁	28.30a	6.82a	42.02a
F ₁ P ₂	23.40b	5.00d	38.38b
F ₂ P ₀	20.18d	4.63e	27.00e
F ₂ P ₁	28.18a	5.90b	35.78c
F ₂ P ₂	22.30c	4.85de	30.12d

F₁: التلقيح بالفطر *Glomus mosseae*

F₂: التلقيح بالفطر *Gigaspora* sp.

P₀: عدم اضافة السماد الفوسفاتي

P₁: اضافة ٢٠ كغم P/هـ

P₂: اضافة ٤٠ كغم P/هـ

المصادر

1. Smith, K.P. and Goodman, R.M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. Ann. Rev. Phytopathol. 37: 473-491. (1999)
2. St. John, T.V. Mycorrhizal inoculation: advice for growers & restorationists. Hortus West. 7(2):1-4. (1996).

3. Barker, S.J.; Tagu, D. and Delp, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 116: 1201-1207. (1998).
4. Guinel, F.C. and Hirsch, A.M. The involvement of root hairs mycorrhizal associations. In: *Root Hairs: Cell and Molecular Biology*. Edited by Ridge, R.W. and Emonas, A.M.C. Springer-verlag Tokyo, Japan. PP: 285-310. (2000).
5. St. John, T.V. The importance of mycorrhizal fungi and other beneficial microorganisms in biodiversity projects. In: *Western Forest Nursery Associations Meeting at Fallen Leaf Lake*, September 14-18: 99-105. (1992).
6. Harrison, M.J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An under ground association. *Trends Plant Sci.* 2: 54-59. (1997).
7. Morton, T.B. and Benny, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders Glomineae and Gigasporineae, and two new families Acaulsporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon.* 37: 471-491, (1990).
٨. العاني، محجن عزيز مصطفى. دور التقنية الحياتية في نمو وإنتاجية محصولي الحنطة وفول الصويا باستخدام فطريات المايكورايزا VAMycorrhizal. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل. (١٩٩٣).
٩. المفتي، هدى فاروق زكي. التأثير المتداخل لفطري المايكورايزا الحويصلية الشجرية (*Gigaspora* sp. و *Gomus mosseae*) وبكتريا الريزوبيا في نباتات الماش (*Vigna radiata* L.) والبقلاء (*Vicia faba* L.) النامية تحت مستويات مختلفة من الفسفور. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. (٢٠٠٤).
١٠. ابو ضاحي، يوسف محمد. تغذية النبات التطبيقي. جامعة بغداد. بيت الحكمة. (١٩٨٩).
11. Kormanik, P.P.; Bryan, W.C. and Schultz, R.C. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Can. J. Microbial.* 26: 536-538. (1980).
12. Stewart, E.A.; Grimshaw, H.A.; Parkinson, J.A. and Quarmby, C. *Chemicals Analysis of Ecological Materials*. Blackwell. Sci Publ. London and Melborn. (1974).
13. Allen, S.E. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. Black Well Scientific Publication Oxford. London. (1974).
14. Bremner, J.U. and Kenny, D.R. Steam distillation methods for determination for ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chem. Acta.* 32:485-495. (1965).

15. Watanbe, F.S. and Olsen, S.R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO₃ extracts from soil. Soil. Sci. Soc. Am. Proc. 29:677-778.(1965)
١٦. الساهوكي، مدحت و وهيب، كريمة احمد. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق. (١٩٩٠).
17. Fitter, A.H. Water relations of red clove *Trifolium pratense* L. as affected by VAMycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. J. Exp. Bot. 39: 595-603 (1988).
18. Lesueur, D.; Ingleby, K.; Odee, D.; Chamberlain, J.; Wilson, J.; Tikimanga, T.; Sarrailh, J-M and Pottinger, A. Improvement of forage production in *Calliandra calothyrsus*: Methodology for identification of an effective inoculum containing *Rhizobium* strains and arbuscular mycorrhizal isolates. J. Biotch. 91: 269-282. (2001).
19. Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. Plant. Soil. 71: 197-209 (1983).
٢٠. الحمودي، علي عبد الله يونس. دراسات على المايكورايذا (جذر-فطريات) من النوع الحويصلي-الشجيري في شمال العراق. اطروحة ماجستير. كلية العلوم. جامعة صلاح الدين. (١٩٨٩).
21. Cooper, K.M. Physiology of VA-Mycorrhizal association in VAMycorrhiza. Eas. Gl. Powell and D.J. Bagyraj. PP: 155-186 Press Inc. Boca. Raon. Florida. (1984).
22. Taylor, J.M.G. and Harrier, L.A. Comparative study of down regulated genes in Arbuscular mycorrhizal (AM) fungal colonized plants. In: Aspects of Applied Biology No.63. Plant Microbial Interactions: Positive interactions in relation to crop production and utilization. Edited by Andrews, M.; Andrews, M.E. and Humphry, D.R. PP: 117-122. (2001).
23. Costa, N. and Paulino, V. Response of *Desmodium gyroides* to phosphorous fertilization and mycorrhizal inoculation. Forest. Farm. and Community Tree Research Reports. 2: 43-45. (1997).
24. Bedrous, V.S.; El-Wafai, A.N.; Besada, Y.B. and Faris, F.S. Studies on the interactions between VA-mycorrhiza, Strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Phoseoli* and bean cultures under field conditcins in Egypt: Zagazig. J.Agric. Res. 17(1): 1-12. (1990).
25. Mosse, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phyto Pathol. 11: 171-195. (1973).
26. Tinker, P.B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. Physiol. Veg. 16(4):743-751. (1978).

27. St. John, T.V. Mycorrhizal inoculation in habitat restoration. Land and water. September /October: 17-19. (1998).
28. Mercy, M.A.; Shivashankar, G. and Baggaraj, D.J. Mycorrhizal colonization in cow pea is host dependent and heritable. Plant and Soil. 121: 292-294. (1990).
29. Bethlenfalvay, G.J.; Olrich, J.M. and Brown, M.S. Plant responses to mycorrhizal fungi: host endophyte and soil effects. Soil Sci Soc. Amer.J. 49:1164-1168. (1985).
30. Wyss, P.; Bollert, T. and Wiemken, A. Effects of high phosphorus supply on the interaction of soybean roots with *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia Solani*; degree of infection and accumulation of the phytoalexin glyceollin. Symbiosis.(9): 383-387. (1990).
31. Koide, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. New Phytol. 117: 365-386. (1991).

تقييم بعض الادوية العشبية المحضرة كعلاج للحروق الجلدية ومقارنتها مع الادوية الكيميائية

* ابراهيم صالح الجبوري ** غيداء حسين الربيعي ** ورود كمال عاكف *** اشراق عبد الامير
* وزارة الصحة / دائرة الامور الفنية / طب الاعشاب
** قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
*** وزارة الصحة / المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية
(استلم بتاريخ ١٩ / ٦ / ٢٠٠٦ وقبل للنشر في ٦ / ٦ / ٢٠٠٧)

ABSTRACT

The clinical experiment was carried out to evaluate the effect of three kinds of herbal forms (Cream, oil, and powder) on prevention of burn wound sepsis, promotion of healing and compare their effects with chemical drug (flamison) and no treatment case as tow control.

Electrical thermal burn wounds were induced in Rabbits by using soldering iron in order to initiate of fullthickness burn. Herbal forms and chemical drug treated these wounds.

The effect of all treatments was evaluated after 21 days and repeated after 28 days. The obtained results showed the significant effect of herbal forms in healing of burnt tissue and preventing wound sepsis by production of granulation tissue with less pronounce acute inflammatory reaction and by the formation of small and numerous blood vessels with rapid increase in collagen deposition .The best results and short time of burnt tissue healing were obtained with herbal cream treatment.

الخلاصة

تم اختبار التأثير العلاجي الموضعي لثلاثة اشكال من الادوية العشبية (كريم اعشاب، زيت اعشاب، مسحوق اعشاب) في منع نتانة الحروق الناتجة عن الحرق الكهربائي وتحفيز الشفاء النسيجي لها. ومقارنة تأثيرها مع كريم الفلامسون (١% سيلفر سلفاديزين) مع وضع مقارنة اخرى بدون علاج. أحدثت جروح بالحرق الكهربائي في الأرانب باستخدام الكاوية الكهربائية. وقد تم تقييم التأثير العلاجي بعد ٢١ يوم من استخدام العلاجات وأعيد التقييم بعد ٢٨ يوماً أيضاً.

أظهرت النتائج بأن هناك تأثيرات معنوية للأشكال الثلاثة (كريم الأعشاب، زيت الأعشاب، مسحوق الأعشاب) على التوالي، تطور عملية الشفاء مقارنة بالعلاج الكيميائي وبدون العلاج.

كما بينت النتائج قصر الفترة اللازمة للشفاء ومنع ثناتة الجروح واختفاء ملامح الالتهاب الحاد وسرعة تكون النسيج المحبب المتزامن مع زيادة طرح مادة الكولاجين.

المقدمة

ان اسوأ ما يتعرض له الجلد هو الحروق والتي قد تؤدي الى تدمير الانسجة الداخلية وعنه تعقيدات مابعد الحروق كالتليف الجلدي وضمور الاعصاب وفقدان بصيالات الشعر كما ان التهاب الجروح مابعد الحروق تؤدي الى حوالي ٥٠-٧٠% من فقدان الحياة والموت للانسان (١).

تعتبر الالتهابات مابعد الحروق المشكلة الحرجة بالرغم من استخدام العديد من العلاجات الحديثة مع مضاد حيوي موضعي وتحتوي العديد من الاعشاب والنباتات الطبية على مواد فعالة تعمل على تثبيط نمو بكتريا الملوثة للحروق (Class *Pseudomonas aeroginosa* Bergey (٢) وقد ذكر Della (٣) ان المواد الفعالة لبعض النباتات الطبية تساعد على زيادة انتاج النسيج المحبب وطرح مادة الكولاجين.

وتعتبر نباتات الاقحوان *Alendula officinnalis L.*، الصبار *Aloe vera L.*، اغلفة ثمار الرمان *Punica granatum L.*، الزعرور *Thymus vulgaris L.* وعرق السوس *Glycyrrhiza glabra L.* لما تحتويها من مواد فعالة علاجية في التئام الجروح ومنع نمو البكتريا والفطريات المرضية فضلاً عن مواد تساعد على اعادة نمو الانسجة وتشجيع نمو بصيالات الشعر (4).

ونظراً لزيادة حالات الحروق في العراق وتعدد اسبابها ولندرة البحوث في مجال استعمال النباتات الطبية في هذا المجال، تعد هذه الدراسة من الدراسات المهمة في القطر لتقييم الاثر العلاجي لثلاثة اشكال من العلاجات العشبية المستخدمة لاول مرة في القطر للحروق الجلدية مقارنة بالعلاج الكيميائي المستخدم (فلامسون) المنتج من قبل شركة الادوية (Emson medicham الهندية).

المواد وطرائق العمل

١- تحضير العلاجات النباتية:-

تم إجراء التجربة في المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية التابع لوزارة الصحة فقد تم تهيئة العلاجات العشبية والتي اشتملت على كريم الاعشاب الذي يحتوي على زيت الاقحوان وزيت الزعتر ومسحوق السوس والصبار وقشور الرمان والتي لا تتجاوز 10% من قاعدة الكريم، بينما زيت الاعشاب المستخدم احتوى على كل من زيت الاقحوان وزيت الزعتر 3:1 ويتكون مسحوق الاعشاب المستخدم من مساحيق الصبار، قشور الرمان، ازهار الاقحوان، اوراق الزعتر، وعرق السوس ونسب 10,25,15,20,30% على التوالي.

تم استخلاص زيت ازهار الاقحوان وزيت اوراق الزعتر بطريقة التقطير المائي Water distillation method وحسب ماجاء في دستور الادوية البريطاني British pharmacopoeid (1968) وبالطريقة نفسها التي اوردها Asta (1968) و Marotti وآخرون (1996). اذ تم استخدام جهاز كليفنجر (Clevenger).

٢- معاملة الحيوانات:-

تم استخدام التصميم العشوائي المتكامل Completely Randomized Design (CRD) حيث وضعت الحيوانات (الارانب) في ثلاث مكررات يشمل كل مكرر على 5 معاملات. هي علاج كيميائي فلامسون والمتكون من 1% USP Sliver sulphadiazine (Cream base q.S) و كريم اعشاب و زيت اعشاب و مسحوق اعشاب ومعاملة بدون علاج (Placebo) وبواقع 15 حيوان. وتم ازالة الشعر لمساحة ٧ سم² بواسطة مزيل الشعر كازانوف حيث تم تخدير الحيوانات بواسطة اعطاءها جرعة تحت الجلد من مادة الكيتامين هايدروكلورايد (0.6 ml/kg B.W) مع الزايلازين (0.2 ml/kg B.D). فقد تم احداث الحرق الكهربائي بواسطة الكاوية الكهربائية (حرق جاف) لمدة دقيقة واحدة لكل حيوان لاحداث حروق متساوية وبلغت المساحة المحروقة لكل حيوان حوالي (1.5×2 cm) وقد كان الحرق كافي لاحداث تدمير للطبقة الجلدية السطحية وكانت المعالجة بالانواع المستخدمة مرة يومياً طيلة مدة التجربة.

٣- تقييم العلاج:-

قد تم تقييم التأثير العلاجي وتطور الشفاء بعد ثلاثة اسابيع (٢١ يوم) وبعد اربعة اسابيع (٢٨ يوم) من تاريخ بداية العلاج، وذلك بالمقارنة مع التأثير العلاجي (كيميائي) وكذلك مع حالة بدون علاج) وحالة الشفاء، ولغرض تسهيل التحليل الاحصائي ومعرفة الفروق المعنوية للتأثير العلاجي للأدوية المستخدمة ثم تحويل التأثير الى نسب مئوية اعتماداً على مساحة الشفاء والتأم الجروح وانبات الشعر، وتم التحليل باستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز SAS وتحديد الفروق تحت المستوى احتمالية 0.01 %

النتائج والمناقشة

بينت نتائج التحليل الاحصائي ان المعاملات الثلاثة من العلاجات المستخدمة قد اعطت فروقات معنوية وبصورة متدرج تنازلياً عند المقارنة بالمعاملة بدون علاج (جدول ١) وشكل (2,1).

إذا بلغ متوسط التأثير العلاجي لكريم الاعشاب حوالي 92.67% واعطى اعلى فرق معنوي مقارنة مع بدون علاج ويعود ذلك لفعالية المواد الفعالة التي يتكون منها زيت الاقحوان وكذلك زيت الزعتر حيث يحتوي زيت ازهار الاقحوان على مواد Flavonol Glycosides, β -amyrin, Aterpenoids, Sterols pentacyclic alcohols Isoquercitrin, lupeol, faradol, Brein, Avnidiol, clic, longispinogenin (7). وهذا التأثير يتوافق مع ما اكده الباحث Della (1994) من ان ازهار الاقحوان هي من احسن الاعشاب المستخدمة للعلاج الموضعي للالتهابات الجلدية. كما تتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه الباحث Akihisa (1996) من ان مواد Triterpene alcohols المكونة لزيت الاقحوان تعتبر من المواد المضادة للالتهابات والتي تساعد على التئام الجروح والقروح الجلدية. ان زيت الزعتر يعتبر من المواد المضادة للبكتريا والفطريات لاحتوائه على مواد فينولية مثل Thymol, Carvon, Carvacrol بالاضافة الى مادة التانين Tannin (9) احدى المصادر الى ان مادة التانين المتواجدة في مسحوق قشور الرمان واوراق الزعتر تعمل على تكوين غشاء لعزل المناطق المتقرحة (Medicinal coating membrane) مما يسبب زيادة سرعة نمو النسيج المحبب Granulation tissue الذي يساعد على التئام الجروح والتقرحات الجلدية (10). كما ان المكونات الفعالة لعرق السوس عملت على زيادة التأثير العلاجي الفعال لكريم الاعشاب حيث يحتوي عرق السوس على مواد Glycone of Glycyrrhizic acid, Glycyrrhizic acid من السوس وهي تسرع من التئام القروح المعدية (11). وقد اضافت المواد الفعالة لنبات الصبار وهي Dloe-emodin فعل ايجابي اخر للتأثير العلاجي لكريم الاعشاب حيث

يستخدم عصير الصبار في معالجة الجروح والقروح الجلدية وتشجيع إعادة نمو بصيالات الشعر (10) كما تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما اشار اليه الباحث Tanake (1986) ان مادة التانين فعالة في معالجة الالتهابات الناشئة من البكتريا الجلدية لقد تراوحت متوسط التأثير العلاجي لكل من زيت الاعشاب والمسحوق بعد أربعة أسابيع 89.00% 79.60 % على التوالي وكذلك اعطت فروق معنوية عالية مقارنة بالمعاملة بدون علاج وتشير نتائج هذه الدراسة الى سرعة إعادة الأنسجة وطرح مادة الكولاجين.

لقد كانت فترات الشفاء الكامل متقاربة مع بعضها وان اقرب فترة شفاء كامل مع اكتمال ظهور الشعر وبدون أي مضاعفات كانت عند استخدام كريم الأعشاب، وبلغت فترات الشفاء للعلاج الكيميائي، كريم الاعشاب، زيت الاعشاب، مسحوق الاعشاب 29,27,25,21 على التوالي.

لقد ادى ترك الحيوانات بدون علاج الى مضاعفات ما بعد الحروق حيث ظهر تلف في المنطقة مع عدم ظهور الشعر وبلغت مدة التئام الجروح حوالي 33 يوم. ومن الجدير بالذكر اظهرت النتائج ان سرعة إعادة نمو الشعر كانت في كريم الاعشاب اسرع من معاملة المقارنة العلاج الكيميائي (فلامسون).

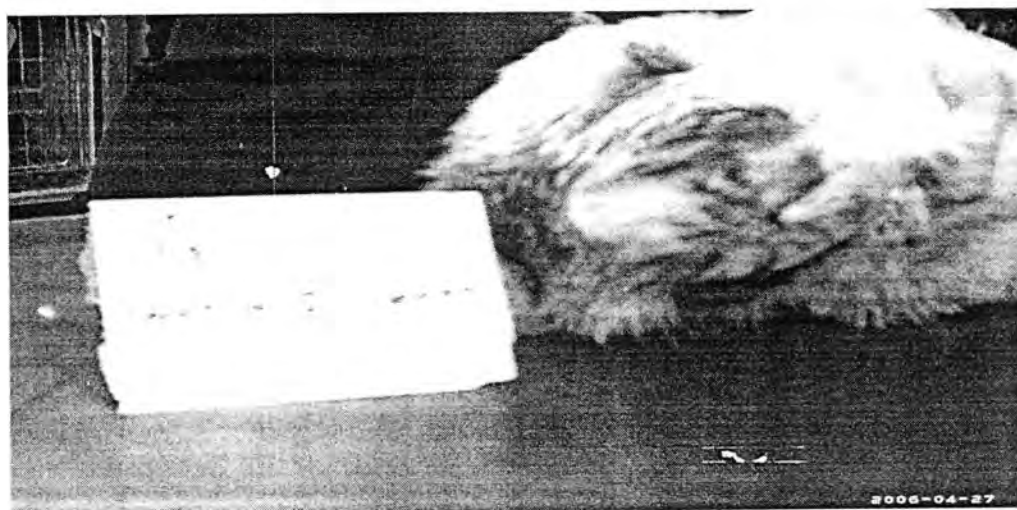
جدول (١) مقارنة تأثير العلاجات العشبية المستخدمة بفترات زمنية مختلفة في الحروق التجريبية للفئران

المعاملات	متوسط التأثير العلاجي %	
	بعد ٣ أسبوع على أنبات الشعر	بعد ٤ أسبوع
علاج كيميائي فلامسون	١٠٠	١٠٠
كريم اعشاب	٨٦,٣٣	٩٢,٦٧
زيت اعشاب	٧٧,٦٥	٨٩,٠٠
مسحوق اعشاب	٧٠,٠٠	٧٩,٦٥
بدون علاج	٢٩,٠٠	٣٣,٠٠
أ.ف.م ٠.٠١ اقل فرق معنوي	٣,٧٤٢	٢,٩٥٩

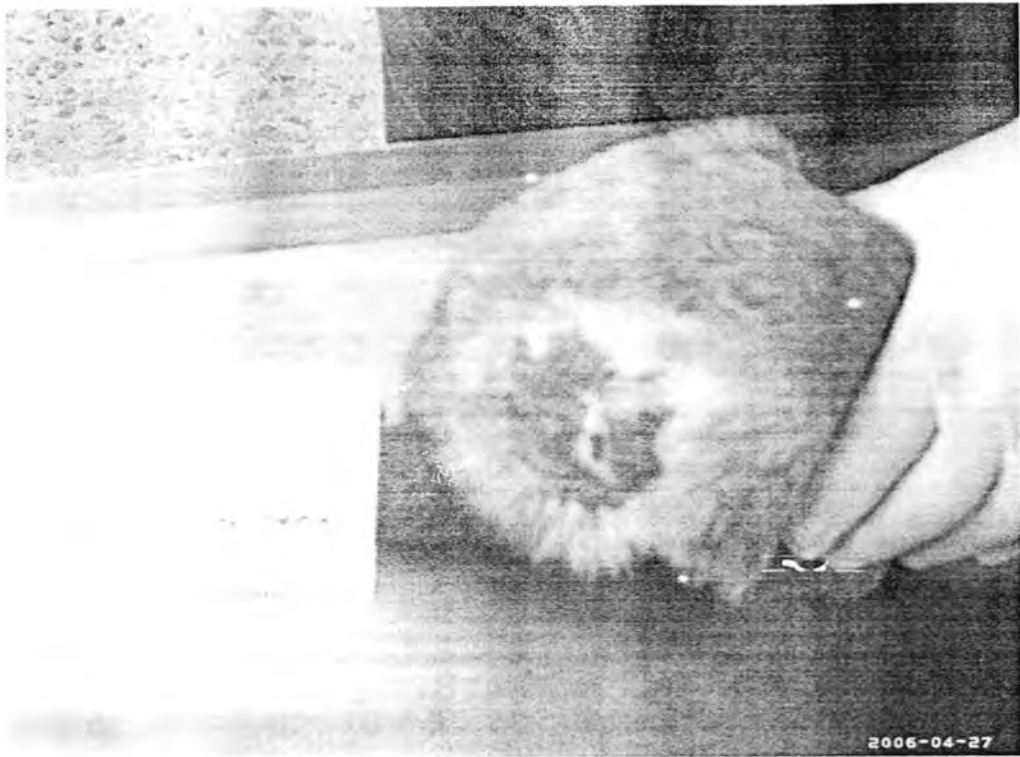
تقديم بعض الادوية العشبية المحضرة كعلاج للحروق الجلدية ومقارنتها مع الادوية الكيميائية
ابراهيم صالح - غيداء حسين - ورود كمال - اشراق عبد الامير



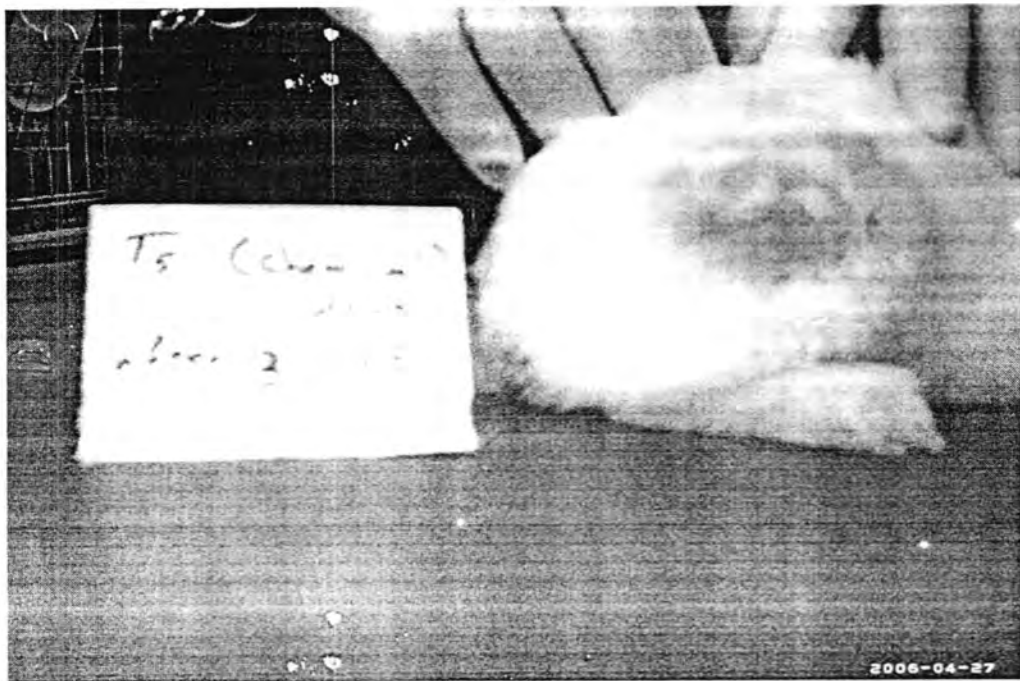
(أ)



(ب)

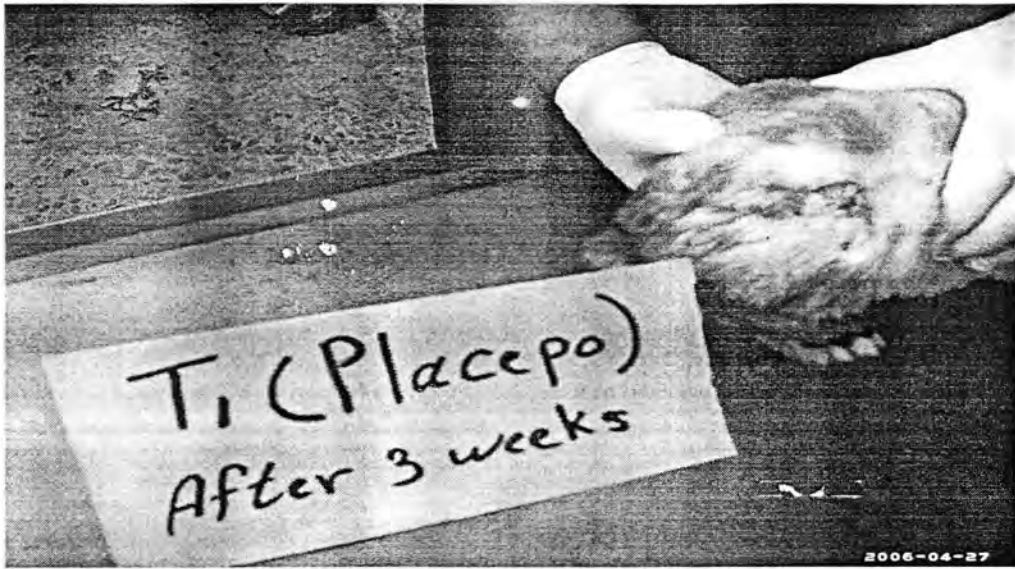


(ج)



(د)

تقييم بعض الأدوية العشبية المخصصة لعلاج الحروق الجلدية ومقارنتها مع الأدوية الكيميائية
ابراهيم صالح - غيداء حسين - ورود كمال - اشراق عبدالامير

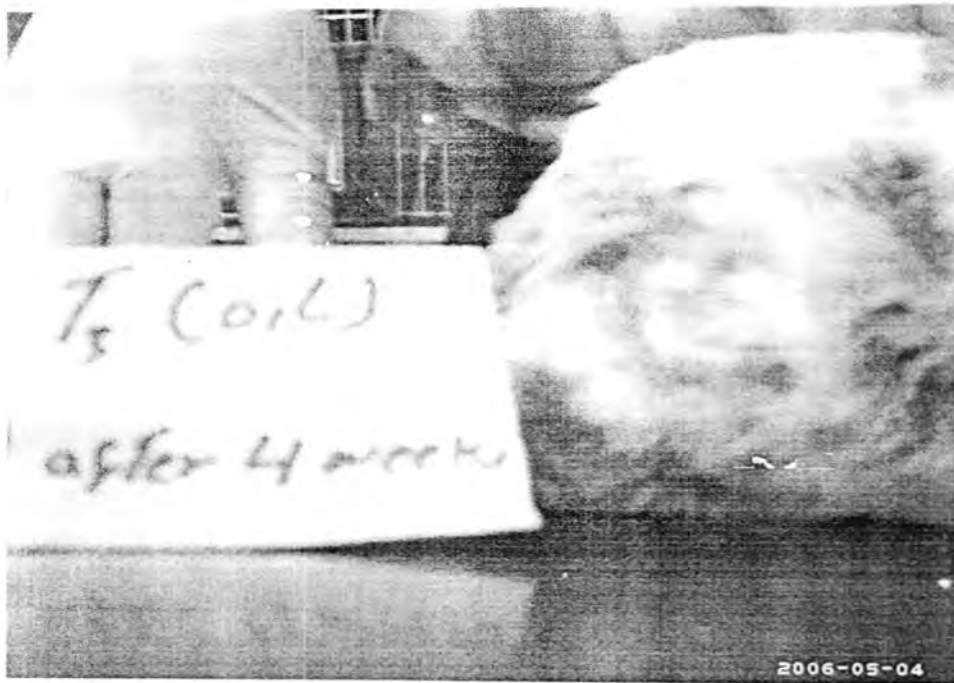


(و)

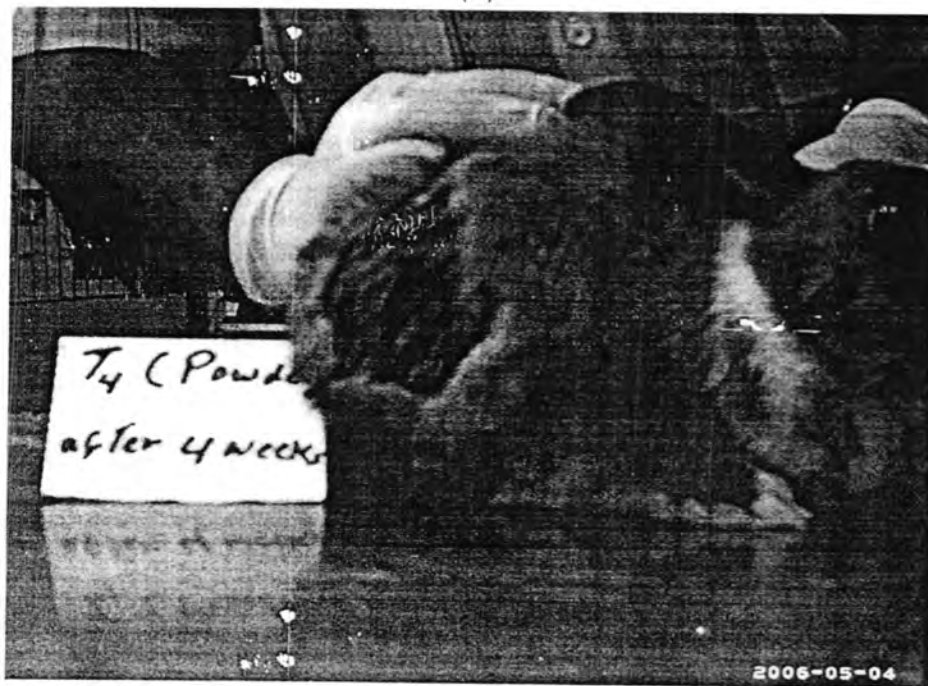
شكل (١) تقييم علاج الفئران المصابة بالحروق تجريبيا بثلاث معاملات مختلفة وبفترات زمنية مختلفة (أ) كريم (ب) زيت (ج) بودر (د) كيميائي (و) بدون علاج



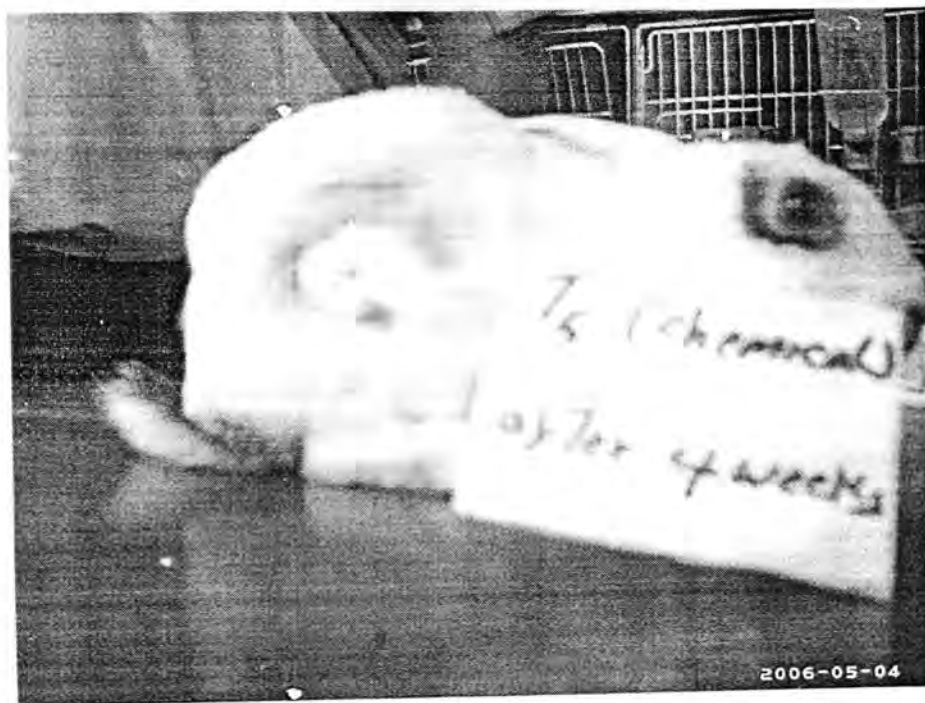
(١)



(ب)



(ج)



(د)

شكل (٢) تقييم المعاملات بعد اربعة اسابيع من العلاج : (أ) كريم ب) زيت ج) باودر د) كيميائي

المصادر

- 1- Asta.T. Official analytical methods of American spice trade association. Asta, Englewood cliffs, N.J.P. 8-11. (1968).
- 2- Al-mously, N.A. .Effect of antimicrobial agents on the adherence of pseudomonas aeruginosa to UECs and RBCs in vitro. M.Sc. thesis college of Medicine, university of Baghdad .(1994).
- 3- Akihisa, T. triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Photochemistry 43(6): 1225-1260. (1996)
- 4- Bisset NG. Herbal drugs and phyto pharmaceuticals (wichtl M, editor) Stuttgart; medpharm, (1994).
- 5- Della Loggia, a.et al., the role of triterpenoids in . flowers. Planta med.60(60), 516-520. (1994).

- 6- Hutter JA et.al., Anti inflammatory C-glucosyl chromone from Aloe vera . In: JNP59(5):541-543-(1996).
- 7- Inoue H, Saito K, koshihara y, murota S. inhibitory effect of glyzyrrhetic acid derivatives of lipoxygenase and prostaglandin synthetase. Chem. Pharm Bull 34:897. (1986)
- 8- Koch A, metabolisierung von Aloin. Correlation zwischen in vitro – und in –vivo-versuchen .In: DAZ 135 (13): 1150-1152
- 9- Le T-Trug. Experience in burns treatment in Vietnam.-HANOI Vietnam. (1993)
- 10- Monafe w.w., Ayvazian V.H., topical therpy. Sut-rg. Clin. North Ain.58:1157 .(1978)
- 11- marotti, m. piccaglia, R. and Giovanell H., Differences in essential oil composition of basil (ocimum basilicum L.) Italian cultivares related to morphological characteristics. J. Agric. Food chem.. 44, 3926-3929. (1996)
- 12- Tanake , T. Chem pharm Bull 34(2):656.(1986)
- 13- Vietnamese traditional Medicine TheGLOI publishers. HanoiVietnam. (1993)

دراسة تأثير بكتريا حامض اللاكتيك ورواشحها على نمو خميرة *Cryptococcus neoformans*

* - عبد الواحد باقر الشيباني . ** - عبد العزيز مجيد الكبيسي *** - حمزية علي عجة

* - كلية العلوم /جامعة النهرين

*** - كلية العلوم /الجامعة المستنصرية قسم علوم الحياة

(استلم بتاريخ ١٢ / ٣ / ٢٠٠٧ وقبل للنشر في ١ / ٦ / ٢٠٠٧)

ABSTRACT

This study performed to evaluate the antifungal activity of Lactic Acid Bacteria isolates (grown in solid and liquid Man-Rogosa-Sharps media) against *Cryptococcus neoformans* isolate (Crn1C).

To increase their activity, filterates of the LAB isolates, after grown in the liquid medium, were concentrated for one- fold, two- folds and three- folds. LAB isolates after grown in solid medium, showed different levels of antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. The 2- stage agar overlay method was most effective compared with the other methods (Agar cup and sealed plate).

Unconcentrated filterates of LAB isolates did not show any inhibitory effect but concentrated filtrates exhibited highest antifungal against *Cryptococcus neoformans*.

الخلاصة

أختبرت قدرة عزلات بكتريا حامض اللاكتيك المنماء في اوساط زرعية صلبة وسائل على اعطاء افضل فعالية تثبيطية ضد الخميرة *Cryptococcus neoformans* العزلة (Crn1C)، ثم ركزت رواشح العزلات البكتيرية (المنماء في الوسط السائل) لمرة واحدة ولمرتتين ولثلاث مرات بغية زيادة كفاءتها التثبيطية واختبار تأثيرها على الخميرة . - أظهرت عزلات بكتريا حامض اللاكتيك تفاوتاً في فعاليتها التثبيطية ضد خميرة *C. neoformans* عند تنميتها في الاوساط الزرعية الصلبة وكانت طريقة 2-Stage agar overlay اكثر كفاءة في التحري عن الفعالية التضادية لبكتريا حامض اللاكتيك مقارنة بطريقتي اقراص الاكار و Sealed plate assay. ولم يظهر الرواشح غير المركزة لعزلات البكتريا أي تأثير مثبط فيما اعطت الرواشح المركزة تأثير كبير على تثبيط نمو الخميرة.

INTRODUCTION

تمتلك بكتريا حامض اللاكتيك صفة التأثير التثبيطي ضد العديد من الأحياء المجهرية، ويعود استخدام هذه البكتريا في تحسين حفظ الأغذية إلى قابليتها على تثبيط نمو الأحياء المجهرية المرضية أو تلك المسببة لتلف الأغذية، وقد بين (8) Gilliland إلى أن الفعالية التثبيطية التي تمتلكها هذه البكتريا تعود إلى نظام أكثر تعقيدا ناتج عن اتحاد جملة عوامل مع بعضها تشمل بيروكسيد الهيدروجين ومضادات الحياة وفعاليات ايضية. و تعزى قابلية بكتريا حامض اللاكتيك على تثبيط بعض الفطريات إلى حساسية هذه الفطريات للنواتج الايضية التي تنتجها البكتريا ولاسيما حامضي الخليك واللاكتيك فقد اشار Hayashi et al. (9) إلى ان الحوامض العضوية ولا سيما حامض الخليك تبدي تأثيرا مثبطا لمدى واسع من الاعفان في البيئة الحامضية، ولاحظوا ان اضافة كميات من حامض الخليك والبروبيونيك إلى الحبوب عالية الرطوبة يؤدي إلى منع نمو الاعفان عليها. فيما ذكرت دراسات اخرى دور غاز CO2 وبيروكسيد الهيدروجين في خلق بيئة غير ملائمة لنمو الاعفان والخمائر (1). تؤثر الاحياء المجهرية ولا سيما البكتريا على نمو وتكاثر الخمائر الموجودة معها في البيئة نفسها، إذ لاحظ (Emmons et al. 1997) ان الاس الهيدروجيني الحامضي الناتج عن نمو *Lactobacillus acidophilus* في المهبل كان له تأثير مثبطا لنمو خميرة *Candida spp*، وعند غياب هذه البكتريا نتيجة لاستعمال مضادات الحياة فان اعداد الخميرة قد ازدادت، كما ان بكتريا *Lb. acidophilus* تعمل على تثبيط نمو الخمائر من خلال انتاجها لمواد ايضية ذات الفعالية المضادة للحياة المجهرية، إذ لاحظ Collins and Hardt (5) انخفاض في معدل نمو خميرة *C. albicans* عند معاملتها برواشح بكتريا *L. acidophilus*.

المواد وطرائق العمل

1- عزلات بكتريا حامض اللاكتيك

عزلت 55 عزلة تعود الى بكتريا حامض اللاكتيك من الاغذية والتي تضمنت الخضروات المتخمرة والحليب ومنتجاته و توزعت بين 13 عزلة (Lb1، Lb2، Lb6، Lb7، Lb9، Lb12، Lb17، Lb18، Lb24، Lb25، Lb26، Lb29، Lb36) تعود للنوع *L. plantarum*، و 7 عزلت (Lb8، Lb10، Lb11، Lb16، Lb23، Lb33، Lb44) للنوع *L. fermentum*، و 5 عزلات (Lb14، Lb15، Lb30، Lb31،

Lb34) للنوع *Lb.acidophilu* وعزلتان تحت النوع *L.delbrueckii subsp.* *bulgaricus*، وعزلتان (Lb35، Lb38) للنوع *Lb. casei* وعزلة (Lb40) للنوع *L.brevis*، أما عزلات جنس *Lactococcus* فقد توزعت بين 10 عزلات (Lc3، Lc4، Lc5، Lc13، Lc21، Lc22، Lc27، Lc28، Lc32، Lc45) فتعود للنوع *L.raffinolactis* و 6 عزلات (Lc41، Lc42، Lc46، Lc47، Lc54، Lc55) للنوع *L.lactis*، في حين تم الحصول على 6 عزلات (Lu19، Lu20، Lu37، Lu48، Lu49، Lu52) تحت النوع *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*، أما عزلات جنس *Pediococcus* والبالغة 3 عزلات (Pd50، Pd51، Pd53) كانت للنوع *P.acidilactici*.

2- تنمية بكتريا حامض اللاكتيك.

نميت بكتريا حامض اللاكتيك في وسط MRS السائل بعد تلقيحها بنسبة لقاح (١%) وبتركيز 1×10^9 خلية/مل وحضنت لاهوائياً بدرجة حرارة 37°C م لمدة (٢٤) ساعة (١٣).

3- تحضير رواشح المزارع السائلة للبكتريا.

نميت عزلات بكتريا حامض اللاكتيك في وسط MRS السائل نواس هيدروجيني 6 ونسبة لقاح ١% ثم حضنت الاتاييب تحت ظروف لاهوائية بحرارة 37°C م لمدة ٤٨ ساعة، نبد بعدها العالق مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق وبعد ان أهمل الراسب رشح الراشح خلال مرشحات Millipore بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر، بعدها تم تركيز الرواشح لمرة واحدة (١م) ولمرتتين (٢م) ولثلاث مرات (٣م) باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) بأخذ (٢٠) مل من الراشح البكتيري وتركيزه الى (١٠، ٥، ٢.٥) على التوالي (١٢، ١٣، ١٦).

٤- خميرة *Cryptococcus neoformans*

عزلت خميرة *C.neoformans* العزلة (Crn1C) من سائل المخ الشوكي، وتم تحضير عالق الخميرة بعد تنميتها في وسط Sabouraud Dextrose Broth بعدة مستعمرات من الخميرة وبعمر ٢٤ ساعة منمأة مسبقاً على وسط Sabouraud Dextrose Agar

وحُضِنَت بحرارة (٣٠)° لمدة ٢٤ ساعة ، تَبَذَ العالق الحاوي على الخميرة النامية بسرعة (٥٠٠٠) دورة/ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة. وبعد ان أهمل الراشح غَسَلَ الراسب بداري الفوسفات الملحي واعيد تَعْلِيْقَه بالداري نفسه، ثم ضبط تركيز الخلايا الى ٢*١٠^٦ خلية/مل بواسطة عداد خلايا الدم.

٥- تَقْدِير الفعالية التَضَادِيَّة

* تَقْدِير الفعالية التَضَادِيَّة على الوسط الصلب.

تم تَقْدِير الفعالية التَضَادِيَّة لبكتريا حامض اللاكتيك في الوسط الصلب بثلاث طرائق هي:

أولاً: طريقة اقراص الاكار Agar Cup Method.

زرعت عزلات بكتريا حامض اللاكتيك بطريقة التخطيط المتعامد على وسط MRS الصلب، (كل على أنفراد)، وحضنت الاطباق لاهوائياً بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة، بعدها أخذت اقراص بقطر ٥ ملم بواسطة ثاقب الفلين (Cork borer) المعقم ووضعت بصورة مقلوبة على سطح وسط Glucose Yeast Extract Peptone Agar والمنشور عليه مسبقاً ٠,١ مل من مزرعة عزلة الخميرة المنتخبة حضنت الاطباق بحرارة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة، وبعد انتهاء فترة الحضانة تم قياس اقطار مناطق تثبيط النمو حول القرص بالملمتر (14).

ثانياً: طريقة 2- Stage agar overlay

نقل (٠,١) مل من عالق مزارع بكتريا حامض اللاكتيك الى سطح وسط MRS الصلب، ثم بنشر العالق بواسطة الناشر (Spreader) الزجاجي المعقم، حضنت الاطباق لاهوائياً بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، بعد انتهاء فترة الحضانة وضعت ورقة ترشيح (Whottman No.2) معقمة بقطر ٧ سم على سطح النمو البكتيري. حُضِرَ وسط اكار GYEPA ويرد الى حرارة ٤٥°م ثم صب مقدار ١٥ مل منه فوق ورقة الترشيح في كل طبق من اطباق المعاملة والسيطرة، تركت الاطباق حتى تتصلب، بعدها لَقَح سطح وسط GYEPA بنشر ٠,١ مل من عالق الخميرة ، لتحضن بعدها بحرارة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة. تم تقدير الفعالية التثبيطية للبكتريا بمقارنتها مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط MRS الصلب ولكن دون لقاح بكتيري (14).

ثالثاً: طريقة Sealed plate.

اتبعت الطريقة المقترحة من قبل Fiddaman and Rossall (1993) لتقدير فعالية المواد الطيارة المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك وذلك بنشر ٠.١ مل من عالق البكتريا على سطح وسط MRS الصلب ثم حضنت الاطباق تحت ظروف لاهوائية بحرارة ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة. وبعد ان لُقح وسط GYEPA بنشر ٠.١ مل من عالق الخميرة رفعت أغطيت الاطباق جميعا ثم قلبت الاطباق الملقحة بالخميرة على الاطباق الملقحة ببكتريا حامض اللاكتيك وتم لصقها بوساطة شريط (Parafilm)، ثم حضنت الاطباق بحرارة ٣٠ °م لمدة ٤٨ ساعة، وتم تقدير الفعالية التثبيطية بمقارنتها بمعاملة السيطرة الحاوية على وسط MRS الصلب بدون لقاح بكتيري ووسط GYEPA الملقح بالخميرة.

* تقدير الفعالية التضادية لرواشح المزارع السائلة لبكتريا حامض اللاكتيك بطريقة الانتشار في الحفر.

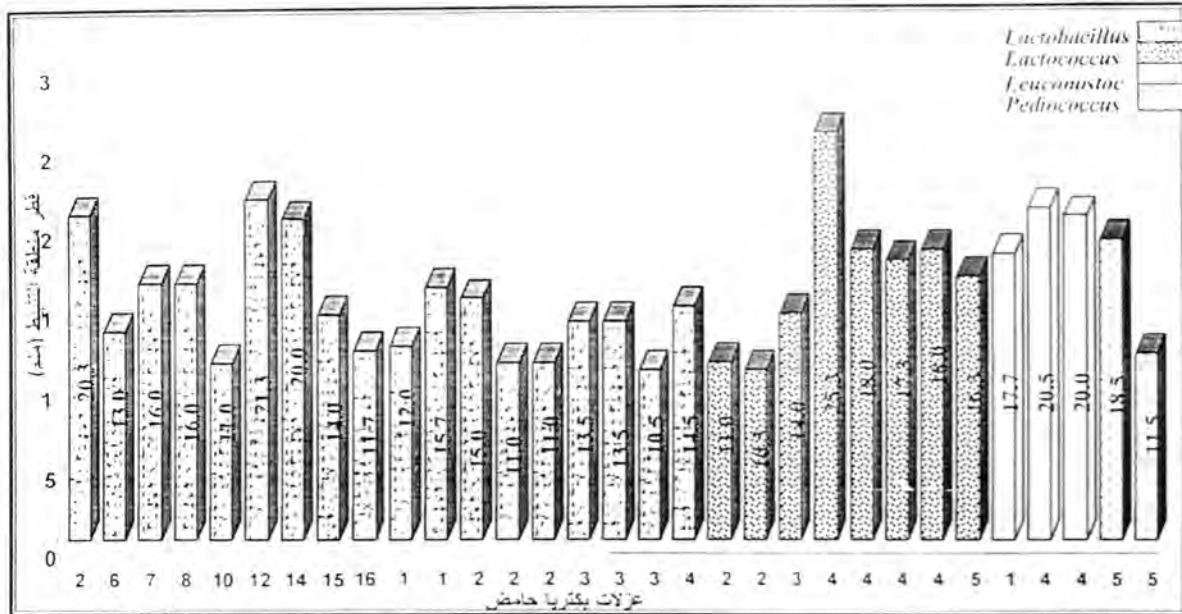
للتحري عن الفعالية التضادية لرواشح البكتيريا غير المركزة والمركزة، استعملت الطريقة الموصوفة من قبل (١٤) Rees (1997)، وذلك بنشر ٠.١ مل من عالق الخميرة على سطح وسط GYEPA، وبعد ترك الاطباق لتجف عملت ثقبوب بقطر ٥ ملم بوساطة ثاقب الفلين وملئ كل منها بـ ١٠٠ مايكروليتر من كل من رواشح عزلات البكتريا غير المركزة والمركزة لمرة واحدة ولمرتتين ولثلاث مرات بعدها تركت الاطباق بحرارة المختبر لمدة ساعة واحدة، ثم حضنت بحرارة ٣٠ °م لمدة ٤٨ ساعة، قدرت الفعالية التثبيطية للبكتريا بقياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر.

النتائج والمناقشة

١- الفعالية التضادية على وسط MRS الصلب

وبين الشكل (١) الفعالية التضادية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك قيد الدراسة ضد خميرة *C.neoformans* بطريقة اقراص الاكار، وأشارت النتائج الى تفاوت عزلات البكتريا في تأثيرها التثبيطي، فقد اظهرت ١٨ عزلة تابعة لعصيات اللاكتيك فعالية تثبيطية ضد الخميرة، كان منها ٩ عزلات تعود للنوع *L.plantarum* و ٤ عزلات لكل من النوعين

L. fermentum و *L. acidophilus* إضافة إلى عزلة واحدة تعود للنوع *L. casei* وتراوح مدى أقطار مناطق التثبيط لهذه العزلات ما بين (١٠,٥-٢١,٣) ملم.

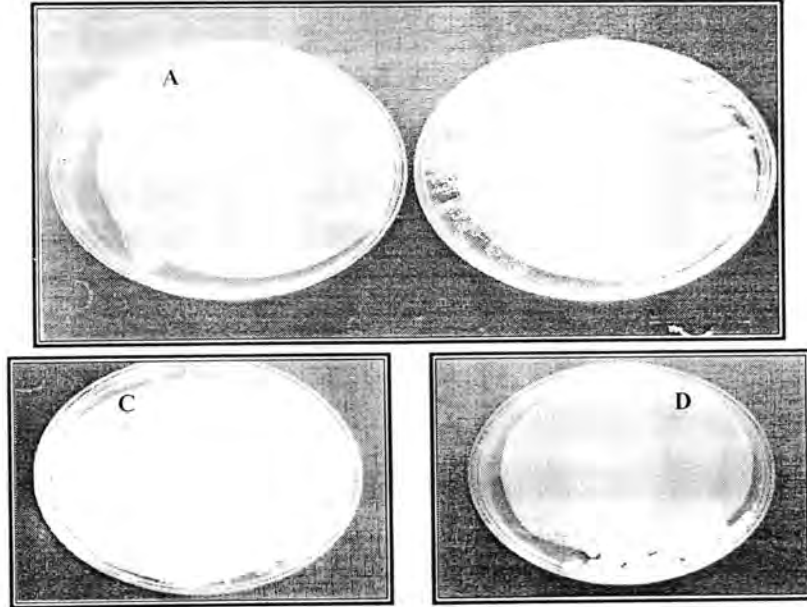


شكل (١) : الفعالية التصادمية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك ضد خميرة *C. neoformans* العزلة (Crn1C) على وسط MRS الصلب بطريقة اقراص اذار.

اما عزلات جنس *Lactococcus* فقد تمثلت بـ ٨ عزلات توزعت بين ٥ عزلات للنوع *L. lactis* و ٣ عزلات للنوع *L. raffinolactis* والتي اظهرت فعالية تثبيطية ضد الخميرة تراوحت اقطار مناطق التثبيط لها ما بين ١٠,٥-٢٥,٣ ملم. كما وظهرت النتائج فعالية (٣) عزلات تعود للنوع *L. mesenteroides* وعزلتان تعود للنوع *P. acidilactici* فعالية تثبيطية تراوحت فيها اقطار مناطق التثبيط ما بين ١٧,٧-٢٠,٥ ملم و ١١,٥ و ١٨,٥ ملم.

استعملت طريقة 2-Stage agar overlay للكشف عن قابلية عزلات بكتريا حامض اللاكتيك على انتاج مواد مثبطة للخميرة. وأشارت النتائج المبينة في الجدول (١) والشكل (٢) الى امتلاك جميع عزلات بكتريا حامض اللاكتيك (باستثناء العزلتين Le13 و Pd53) التأثير التثبيطي ضد عزلة الخميرة قيد الدراسة لكن هذه العزلات تباينت بفعاليتها التثبيطية، فقد اظهرت فعالية تثبيطية عالية (+++) وذلك عندما لم يلاحظ ظهور اي نمو لخميرة *C. neoformans* في اطباق الاختبار مقارنة باطباق معاملة السيطرة. وظهرت

بقية عزلات البكتريا فعالية تثبيطية متوسطة (++) او فعالية واطنة (+) مقارنة باطباق معاملة السيطرة.



شكل (٢): الفعالية التضادية لثلاث عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك ضد العزلة (Crn1C)

من خميرة *C. neoformans* بطريقة 2-Stage agar overlay

Lb16 :B (Lc.lactis) Lc42 :A فعالية تضادية عالية (+++)

(Lb.fermentum) فعالية تضادية متوسطة (++)

Lu52 :D سيطرة.

(Lu.mesenteroides) فعالية تضادية متوسطة (++)

جدول (١) الفعالية التصادمية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك ضد العزلة (Crn1C) لخميرة

C. neoformans بطريقتي Sealed plate assay و 2 - Stage agar overlay

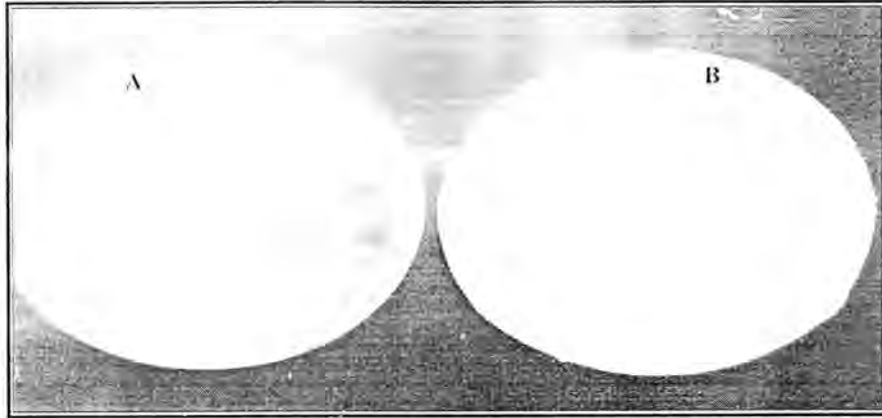
الفعالية التصادمية Sealed	الفعالية التصادمية 2 - Stage	رمز العزلة	الفعالية التصادمية		رمز العزلة
			Sealed	2 - Stage	
-	+	Lb43	-	+++	Lb1
+	++	Lb44	+++	+++	Lb2
-	++	Lc3	++	+++	Lb6
-	+	Lc4	++	+++	Lb7
+	+	Lc5	++	+++	Lb8
-	-	Lc13	-	+++	Lb9
+	+	Lc21	-	+++	Lb10
-	+	Lc22	-	+++	Lb11
-	++	Lc27	+++	+++	Lb12
-	+	Lc28	++	+++	Lb14
++	+++	Lc32	+	+++	Lb15
+++	+++	Lc41	+	++	Lb16
+++	+++	Lc42	++	+++	Lb17
-	+	Lc45	++	+++	Lb18
++	+++	Lc46	-	++	Lb23
++	+++	Lc47	+++	+++	Lb24
+	+++	Lc54	-	++	Lb25
+	+++	Lc55	-	++	Lb26
++	+++	Lu19	-	++	Lb29
-	+++	Lu20	++	+++	Lb30
++	+++	Lu37	-	+++	Lb31
+++	+++	Lu48	-	++	Lb33
++	+++	Lu49	-	++	Lb34
-	++	Lu52	-	++	Lb35
++	+++	Pd50	-	+	Lb36
+	++	Pd51	-	++	Lb38
-	-	Pd53	-	+	Lb39
			-	+	Lb40

- ← لا يوجد تثبيط. + ← فعالية تثبيطية واطنة. ++ ← فعالية تثبيطية متوسطة (٢ سم^٢ من الطبق خالي من النمو).

+++ ← فعالية تثبيطية عالية (لا يوجد أي نمو) (14).

تعد طريقة Sealed plate assay المستعملة في دراسة قابلية عزلات بكتريا حامض اللاكتيك على انتاج مواد مثبطة متطايرة ذات تأثير على نمو عزلة الخميرة قيد الدراسة، من الطرائق التي تعطي نتائج ملموسة (14) يتبين من النتائج الموجودة في الجدول نفسه وفي الشكل ٣ ان ٣ عزلات تعود للنوع *L. plantarum* وعزلتين للنوع *L. lactis* وعزلة واحدة للنوع *L. mesenteroides* قد ابدت فعالية تثبيطية عالية، فيما

تفاوتت اغلب عزلات البكتريا في فعاليتها بين متوسطة الى ضعيفة الفعالية او عديمة الفعالية.



شكل (٣): الفعالية التضادية لبكتريا حامض اللاكتيك (العزلة Lc42) ضد عزلة (Crn1C)

لخميرة *C.neofornans* بطريقة Sealed Plate

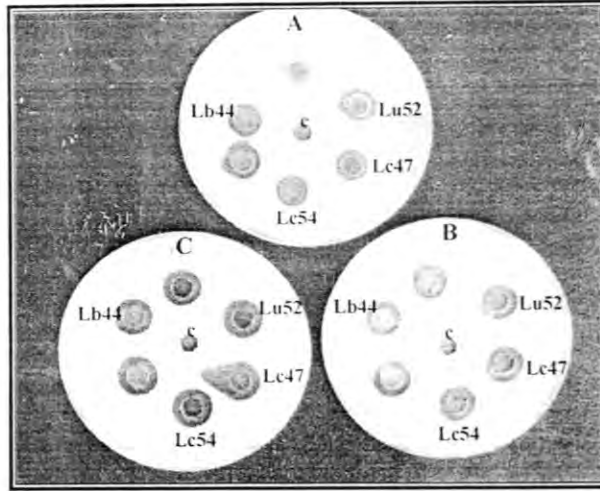
A : Lc42 (*Lc.lactis*) فعالية تضادية عالية (+++). B : سيطرة.

مما تقدم يتضح تباين العزلات في تأثيرها المثبط على خميرة *C.neofornans* والذي يمكن ان يعزى الى صفة انتاج المواد المثبطة التي هي خاصة بكل جنس ونوع (11)، ومع هذا فان اغلب انواع بكتريا حامض اللاكتيك لها صفة التأثير التثبيطي ضد العديد من الاحياء المجهرية، اذ تثبيط نمو هذه الاحياء من خلال قدرتها على انتاج الحوامض العضوية والتنافس على المغذيات فضلاً عن انتاجها لمركبات مثبطة اخرى كالبكتريوسينات (Bacteriocins) وغيرها (16).

تباينت اراء الباحثين حول طبيعة المواد المثبطة لنمو الخمائر والتي تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك، فقد اشار (3) Bonestroo et al. الى ان الحوامض العضوية التي تنتجها انواع مختلف من بكتريا حامض اللاكتيك خلال مسارات انتاج الطاقة، ولاسيما حامض اللاكتيك والخليك، تعمل على تثبيط نمو كل من الخمائر والاعفان بذلك يتضح من النتائج الواردة في الجدول (١) ان العامل المثبط لخميرة *C.neofornans* لا يعزى فقط الى انخفاض الاس الهيدروجيني بفعل الحوامض العضوية المنتجة من هذه البكتريا. وانما هناك عوامل اخرى تعمل بصورة تآزرية على تثبيط الخمائر، ومنها مركب Diacetyl الذي يتداخل مع استهلاك الحامض الاميني الارجنين (١٠).

٢ - الفعالية التضادية لرواشح المزارع السائلة لبكتريا حامض اللاكتيك.

اختبرت فعالية رواشح المزارع السائلة لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك المنمأة في وسط MRS السائل على تثبيط العزلة Crn1C لخميرة *C.neoformans* بطريقة الانتشار في الحفر. وتشير نتائج الجدول (٢) والشكل (٤) ان الرواشح المركزة لمرة واحدة ولمرتتين ولثلاث مرات ولجميع العزلات اظهرت فعالية تضادية وقد تفاوتت العزلات في فعاليتها وكان اعلاها ماظهرت رواشح العزلات Lb3 و Lc41 و Lu48.



شكل (٤): الفعالية التضادية للرواشح المركزة لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك ضد العزلة (Crn1C) من خميرة *C.neoformans* في المزرعة السائلة بطريقة الانتشار في الحفر A مركز لمرة واحدة، B مركز لمرتتين، C: مركز لثلاث مرات.

Lb31 : *Lb.acidophilus* , Lb29 : *Lb.plantarum* , Lb44 : *Lb.fermentum*

Lc47 : *Lc.lactis* , Lc54 : *Lc.lactis* , Lu52 : *Lu.mesenteroides* , c: سيطرة.

جدول (٢) التأثير التضادي للرواشح المركزة لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك ضد العزلة (Crn1C) لخميرة *C.neoformans* في المزارع السائلة بطريقة الانتشار بالحفر.

رمز العزلة	تركيز الراشح		
	لمرة واحدة	لمرتین	لثلاث مرات
Lb1	0.29 ± 9.17	1.53 ± 11.33	1.04 ± 15.83
Lb2	0.58 ± 14.33	0.58 ± 19.33	0.50 ± 34.00
Lb6	$0. \pm 9.00$	0.50 ± 10.50	0.87 ± 15.50
Lb7	0.50 ± 13.00	1.26 ± 16.17	1.53 ± 28.33
Lb8	0.57 ± 10.67	0.57 ± 13.67	$0. \pm 22.00$
Lb9	0.58 ± 8.67	0.87 ± 11.00	1.15 ± 15.33
Lb10	0.57 ± 9.67	0.57 ± 11.67	$0. \pm 16.00$
Lb11	0.50 ± 8.50	0.58 ± 10.33	0.50 ± 14.50
Lb12	$0. \pm 15.00$	$0. \pm 20.00$	$0. \pm 33.00$
Lb14	0.29 ± 13.17	1.16 ± 18.67	0.76 ± 30.17
Lb15	1.26 ± 11.17	1.15 ± 13.67	1.15 ± 18.67
Lb16	$0. \pm 11.00$	0.58 ± 14.33	$0. \pm 20.00$
Lb17	0.29 ± 11.17	0.76 ± 14.17	0.58 ± 22.67
Lb18	$0. \pm 12.00$	$0. \pm 15.00$	0.29 ± 24.83
Lb23	0.58 ± 10.33	0.58 ± 12.67	0.50 ± 18.50
Lb24	$0. \pm 11.00$	0.76 ± 14.83	$0. \pm 22.00$
Lb25	$0. \pm 9.00$	$0. \pm 11.00$	$0. \pm 13.00$
Lb26	1.15 ± 10.67	0.58 ± 12.67	0.58 ± 15.67
Lb29	0.58 ± 10.67	$0. \pm 14.00$	0.58 ± 18.33
Lb30	0.29 ± 12.17	0.57 ± 16.33	0.50 ± 25.50
Lb31	0.29 ± 10.17	0.50 ± 13.50	$0. \pm 19.00$
Lb33	0.57 ± 8.67	0.57 ± 10.67	0.58 ± 15.33
Lb34	0.57 ± 8.33	0.76 ± 11.83	0.28 ± 13.67
Lb35	0.58 ± 8.67	0.29 ± 11.33	0.29 ± 13.33
Lb36	$0. \pm 8.00$	0.29 ± 9.83	1.04 ± 11.67
Lb38	$0. \pm 9.00$	0.29 ± 10.83	0.50 ± 15.50
Lb39	0.57 ± 8.33	0.29 ± 10.17	0.29 ± 12.83
Lb40	0.58 ± 8.33	$0. \pm 10.00$	$0. \pm 11.00$
Lb43	$0. \pm 9.00$	0.29 ± 10.67	0.76 ± 14.17
Lb44	0.29 ± 10.33	0.58 ± 14.33	0.29 ± 19.17
Lc3	0.58 ± 8.67	$0. \pm 11.00$	0.29 ± 14.83
Lc4	$0. \pm 8.00$	$0. \pm 10.00$	0.29 ± 11.33
Lc5	$0. \pm 8.00$	0.28 ± 10.17	0.28 ± 11.17
Lc13	0.28 ± 8.17	$0. \pm 10.00$	0.57 ± 10.67
Lc21	0.58 ± 8.33	0.86 ± 11.50	0.29 ± 13.17
Lc22	$0. \pm 9.00$	$0. \pm 11.00$	$0. \pm 14.00$
Lc27	0.58 ± 9.33	0.29 ± 11.67	$0. \pm 15.00$
Lc28	0.29 ± 8.17	0.46 ± 10.27	$0. \pm 12.00$
Lc32	0.57 ± 11.67	$0. \pm 15.00$	0.29 ± 25.17
Lc41	0.58 ± 14.67	$0. \pm 20.00$	1.04 ± 35.83
Lc42	$0. \pm 13.00$	0.58 ± 17.67	0.58 ± 29.33

رمز العزلة	معدل قطر منطقة التثبيط (مم) $\pm$ الانحراف المعياري			تركيز الراشح
	لثلاث مرات	لمرتين	لمرة واحدة	
Lc45	***. + 11.00	**. + 10.00	*. + 8.00	
Lc46	***. $\pm$ 27.00	**. 58 ± 16.33	*. $\pm$ 12.00	
Lc47	***. $\pm$ 25.00	**. 58 ± 15.33	*. $\pm$ 12.00	
Lc54	***. 58 ± 20.67	**. $\pm$ 15.00	*. 58 ± 11.67	
Lc55	***. $\pm$ 16.00	**. 29 ± 11.83	*. $\pm$ 10.00	
Lu19	***. 15 ± 23.67	**. $\pm$ 15.00	*. 58 ± 12.33	
Lu20	***. 58 ± 15.33	**. $\pm$ 11.00	*. 58 ± 8.67	
Lu37	***. $\pm$ 26.00	**. 58 ± 15.33	*. 58 ± 12.33	
Lu48	***. $\pm$ 33.00	**. 58 ± 19.67	*. 50 ± 14.50	
Lu49	***. 29 ± 29.83	**. 50 ± 18.50	*. $\pm$ 13.00	
Lu52	***. $\pm$ 17.00	**. $\pm$ 14.00	*. 58 ± 11.33	
Pd50	***. 71 ± 26.50	**. 71 ± 17.50	*. $\pm$ 13.00	
Pd51	***. 50 ± 16.50	**. 58 ± 11.67	*. 57 ± 9.33	
Pd53	***. $\pm$ 11.00	**. $\pm$ 10.00	*. $\pm$ 8.00	

* وجود فروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) بين كل من الراشح المركز لمرة واحدة والراشح غير المركز.

** وجود فروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) بين كل من الراشح المركز لمرتين والراشح غير المركز والراشح المركز لمرة واحدة.

*** وجود فروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) بين كل من الراشح المركز لثلاث مرات والراشح غير المركز، الراشح المركز لمرة واحدة والراشح المركز لمرتين للعزلة البكتيرية الواحدة ضد الخميرة نفسها. ملاحظة: لم يظهر الراشح غير المركز اي تأثير ضد الخميرة لذا فقد حذف من الجدول.

بينت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام اختبار الفرق المعنوي الاصفر (Least significant difference/ LSD) وجود فروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) بين كل من الرواشح المركزة لمرة واحدة والرواشح غير المركزة لكافة عزلات بكتريا حامض اللاكتيك قيد الدراسة، كما لوحظ وجود فروق معنوية بالمستوى نفسه بين كل من الرواشح المركزة لمرة واحدة ولمرتين ولثلاث مرات ضمن العزلة البكتيرية الواحدة.

أظهرت النتائج ان الفعالية التثبيطية لرواشح بكتريا حامض اللاكتيك ازدادت بزيادة تركيزها، وان تركيز الرواشح لثلاث مرات كان الافضل في الحصول على اعلى فعالية لزيادة تراكيز المواد المثبطة فيه كالحوامض العضوية والبكتريوسينات وغيرها.

ومن الجدير بالذكر ان التحري عن قابلية هذه البكتريا على تثبيط الاحياء المجهرية الاخرى بعد تنميتها في الوسط السائل تعد من الطرائق ذات الكفاءة العالية والاكثر حساسية وانتاجية (2)، وأشار (4) Coallier – Ascach and Idziak ان المواد المثبطة التي تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك تفرز الى الوسط الزراعي اثناء نموها وتتركز فعاليتها في

رواشح المزارع السائلة للبكتريا. يتضح من ذلك ان رواشح المزارع السائلة لبكتريا حامض اللاكتيك تحتوي على مركبات ذات فعالية مضادة لنمو الخميرة. فوجود الحوامض العضوية كحامض اللاكتيك، الخليل والفورميك فضلا عن بيروكسيد الهيدروجين تساعد في خلق بيئة غير ملائمة لنمو الخميرة (14,15)، فيما اورد (14) Rees ان بكتريا *Pd.acidilactici* تمتلك فعالية مضادة لنمو الخمائر والاعفان اذ تنتج اثناء نموها بعض المركبات البيبتيدية ذات وزن جزيئي واطئ وتكون مقاومة للحرارة

REFERENCES

1. Adams, M.R. and Nicolaides, L. Review of the sensitivity of different food borne pathogens to fermentation. J. Food Control., 8 (5/6): 227- 239, (1997).
2. Al- Hiti, M.M.A. and Gilbert, P. A note on inoculum reproducibility: A comparison between solid and liquid culture. J. Appl. Bacteriol., 55: 1, (1983).
3. Bonestroo, M. H.; Dewit, J. C.; Kusters, B. J. M. and Rombouts, F. M. (1993): Inhibition of the growth of the yeasts in fermented salads. Int. J. Food Microbiol., 17: 311- 320, (1993).
4. Coallier-Ascah, J. and Idziak, E.S. Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. Appl. Environ. Microbiol., 49 (1): 163- 167, 173- 175, (1985).
5. Collins, E.B. and Hardt, P. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci., 63: 830- 832 , (1980)
6. Emmons, C.W.; Binford, C.H.; Utz, J.P. and Kwon- Chung, K.J. (1977): Medical Mycology. 3rd edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
7. Fiddaman, P.J. and Rossall, S. Production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol., 74: 119- 126, (1993).
8. Gilliland, S.E. Bacterial Starter Cultures of Foods. CRC. Press, Inc. Florida, (1985).
9. Hayashi, K.; Terada, M.; Mizunuma, T. and Yokotsuka, T. Retarding effect of acetic acid on growth of contaminated

- bacteria during shoyu – Koji making process. J. Food Sci., 44 (2): 359 – 362. (1979).
10. Mishra, C. and Lambert, J. Production of antimicrobial substances by probiotics. Asia Pacific. J. Clin. Nutr., 5: 20- 24, (1996).
11. Nigatu, A. and Gashe, B. A. Inhibition of spoilage and food borne pathogenic by lactic acid bacteria isolated from fermenting tef (*eragrostis tef*) dough. Ethiop. Med. J., 32: 223- 229, (1994).
12. Niku- paavola, M. L.; Laitila, A.; Mattila- Sandholm, T. and Haikara, A. (1999): New type of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol., 86: 29- 35.
13. Piard, J.C. ;Delorme, F.; Giraffa, G.; Commissaire, J. and Desmazeoud, M. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. J. Neth. Milk Dairy, 44: 143- 158 , (1990).
14. Rees, T. J. The development of anovel antifungal silage inoculant. Ph. D. Thesis, Cranfield University Biotechnology Center, U. K , (1997).
15. Suzuki, I.; Normura, M. and Morichi, T. Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action .Milchwissenschaft, 46(10): 635–639, (1991).
16. Yang, Z. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Department of Food Technology, University of Helsinki , (2000):

(تطوير طرق تحضير المناخل الجزيئية 4A)

نضال وديع الدرزي

قسم العلوم التطبيقية/ الجامعة التكنولوجية

(استلم بتاريخ 21 / 11 / 2006 وقبل للنشر في 17 / 4 / 2007)

ABSTRACT

Molecular sieve zeolite type 4A has been prepared with high purity from Iraqi kaolin of low crystallinity by agitation with sodium hydroxide solution at boiling point.

The aim of this work is to prepare a low cost zeolite 4A in which the influence of the type of reactants on the nature and purity of such economic zeolite has been studied. For this purpose, the distilled water used in the preparation and washing processes has been replaced by ordinary tap water. The sodium hydroxide used in the alkali treatment of the kaolinite has been obtained locally from Al-Hindiya factory in addition to the excessive alkali from the filtrate during the reaction process This will provide additional low cost in the preparation process.

Experimental results also revealed that the nature and purity of zeolites generated varies according to the type of kaolinite used as a starting material.

الخلاصة

تم تحضير مادة المناخل الجزيئية 4A بنقاوة عالية وكمادة مجففة للغازات من طين الكاولين العراقي ضعيف التبلور بمعاملته مع هيدروكسيد الصوديوم بدرجة الغليان وتحت الرج المستمر. ولغرض إنتاج المناخل الجزيئية بكلفة أقل، تم دراسة تأثير المواد الأولية المستخدمة على طبيعة ونقاوة الزيولايت الناتج. حيث تم استبدال الماء المقطر بماء الشرب الاعتيادي في عملية الغسيل. وقد تبين صلاحية استخدام ماء الشرب بدل الماء المقطر مما يوفر مبلغ حوالي مليوني دينار للطن الواحد. كذلك تم استخدام مادة الصودا الكاوية المنتجة محلياً والراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل مما يوفر مبالغ إضافية عند التحضير. كما بينت النتائج التجريبية تأثير لنوع الكاولين المستخدم على طبيعة ونقاوة الناتج من الزيولايت أظهرت النتائج بأن مواصفات المناخل الجزيئية

المحضرة تضاهي المواصفات المطلوبة لإنتاج مادة لتجفيف الغازات مقارنةً بالمناخل الجزيئية الصناعية المستوردة. كما بينت التجارب التي أجريت في شركة المصاييح الكهربائية صلاحية المناخل الجزيئية المحضرة كمادة لتجفيف الهواء.

المقدمة

إن استعمال المناخل الجزيئية الزيولائية لعملية الفصل والتنقية أصبحت معروفة في العمليات الكيميائية الصناعية. مادة المناخل الجزيئية نوع 4A والتي لها التركيب الكيميائي

$27 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{Na}_{12} [(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12}]$ شائعة الاستعمال، وذلك لأمكانية تغير حجم مساماتها بواسطة التبادل الأيوني. ومقارنة مع بعض أنواع المناخل الجزيئية فإن لها سعة أمتزاز وانتقائية عالية لأمتزاز جزيئات الماء والجزيئات المستقطبة وبمعدلات أسرع [1].

تصنع مادة المناخل الجزيئية نوع A على شكل الصوديوم وهذه يرمز لها بالمناخل الجزيئية 4A. وعندما تتبادل حوالي 75% من أيونات البوتاسيوم محل أيونات الصوديوم يسمى عندئذ بالمناخل الجزيئية 3A وبنفس الطريقة عندما تتبادل أيونات الكالسيوم بدل أيونات الصوديوم يسمى بالمناخل الجزيئية 5A [2].

إن وحدات البناء الأساسية للمناخل الجزيئية متكونة من SiO_2 و AlO_4 مرتبطة مع بعضها البعض، وهذا التركيب يكون مفتوح لاستقرار جزيئات الماء وكذلك الأيونات الموجبة. كما أن خواص الأمتزاز للمناخل الجزيئية A تعتمد على عدد ونوع الأيونات الموجبة في تركيب المناخل الجزيئية [3]. يستعمل الزيولايت A على الأغلب كعامل مجفف وخاصة بالنسبة للبخار وذلك لصغر مساماته.

لقد تم تحضير مادة المناخل الجزيئية نوع A من طين الكاولين العراقي [4]. وتم دراسة التركيب المعدني، التركيب الكيميائي، الخواص الفيزيائية والسعة الأمتزازية للماء. يتناول هذا العمل خدمة لمشروع المناخل الجزيئية وأنتاجها بكلفة أقل مع الحفاظ على النوعية وكما يلي :

١- استخدام ماء الشرب في عمليتي التحضير والغسيل.

٢- استخدام الصودا الكاوية المنتجة محليا.

- ٣- استخدام الراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل مرة أخرى.
- ٤- استخدام الكاولين الأحمر بدل الكاولين الأبيض في عملية التحضير.

المواد وطرائق العمل

المواد الأولية:

- ١- طين الكاولين العراقي الأبيض (منطقة كعارة)
- ٢- طين الكاولين العراقي الأحمر (دويخلة)
- ٣- هيدروكسيد الصوديوم الأجنبي التجاري
- ٤- هيدروكسيد الصوديوم المحلي (سدة الهندية)
- ٥- الزيولايت التجاري نوع A (BDH chemical)

طرق القياس:

- ١- جهاز الأشعة السينية الحيودية

لقد تم اجراء قياسات الأشعة السينية الحيودية بواسطة جهاز نوع Phillips PW 1380 باستخدام مولد أشعة سينية من معدن النحاس , وقد تم تحضير وقياس جميع النماذج تحت نفس الظروف , وقورنت النتائج مع نتائج مستحصلة من مواصفات قياسية أمريكية (ASTM).

٢-جهاز التحليل الحراري TG

تم تعيين قياسات السعة الأمتزازية للماء بواسطة جهاز التحليل الحراري الكمي نوع Stanton 760 في تيار من النيتروجين الجاف, فقد تم تسخين النموذج الجاف (١٠ ملغم) الى درجة الحرارة المطلوبة (٥٥٠ م) , أعقبها تبريد النموذج الى درجة حرارة الغرفة ثم شبع تيار النيتروجين بالماء ومرر على النموذج. وقد تم حساب مقدار السعة الأمتزازية من الزيادة في وزن النموذج .
تم تعيين قياسات المساحة السطحية بواسطة جهاز نوع Carlo Erba من نتائج امتزاز النيتروجين بدرجة حرارة النيتروجين السائل

٣- جهاز الأمتصاص الذري نوع Shimatzu

تم تعيين التركيب الكيميائي بواسطة طريقة التحليل الوزنية Wet chemical analysis لتحديد نسب المكونات الرئيسية بالإضافة الى التحليل بواسطة جهاز الأمتصاص الذري نوع Shimatzu لتحديد نسب المكونات الضئيلة.

٤- جهاز قياس الحامضية نوع HANNA

تم إجراء قياسات الأس الهيدروجيني لغرض تقييم مواصفات ماء الشرب المستخدم وللتأكد من خلو الزيولايت المحضر من الصودا الكاوية بعد الانتهاء من عملية الغسيل .

طريقة التحضير:

١- استخدام الماء المقطر في عمليتي التحضير والغسيل

تم طحن الكاولين المستخدم الى حجم حبيبي أقل من ٧٥ مايكرون وكلسنته بدرجة حرارة ٥٥٠م لمدة ستة ساعات بوجود الهواء ، وبعدها عومل مع محلول الصودا الكاوية المستوردة بتركيز (٢) عياري وبنسبة إضافة (١) وزن خام إلى (٥) حجم محلول ويسخن لمدة ثلاث ساعات في درجة ٩٨م وبأستخدام مكثف هوائي مع التحريك المستمر. تفصل المناخل الجزيئية 4A المتكونة بعد عملية التفاعل بواسطة الترشيح وتغسل بالماء المقطر (٢٥ لتر / كغم) . يجفف الناتج بدرجة ٨٠م ثم بدرجة ١١٠م لمدة (٢٤) ساعة

شكل رقم (١) يوضح مراحل سيرالعمليات الصناعية لتحضير المناخل الجزيئية

٢- استخدام ماء الشرب في عمليتي التحضير والغسيل

تم استبدال الماء المقطر بماء الشرب في عمليتي التحضير والغسيل لمادة المناخل الجزيئية المحضرة . وقد تم إجراء دراسة تحليلية لتقييم مواصفات مياه الشرب المستخدمة حيث أخذت عينات من مياه الشرب المجهزة عن طريق محطات التصفية التابعة لأسالة ماء بغداد. وأوضحت التحاليل على إن مياه الشرب المستخدمة مطابقة للمواصفات العراقية والمحددات الدولية [5] . وقد تبين من نتائج التحاليل للفلزات بواسطة جهاز الأمتصاص الذري كالصوديوم والبوتاسيوم والمنغنيز والنحاس والكاديوم بأن تراكيزها لا تتجاوز الحد المسموح به بالمواصفة العراقية كما إن تراكيز أيونات

الكبريتات والكلوريدات لم تتجاوز الحدود المسموح بها في المواصفة العراقية والمواصفة الأوربية (٢٥٠ ملغم/لتر) حيث كانت النسب تتراوح بين (٥٠-٧٠) ملغم/لتر وكذلك بالنسبة للأيونات الأخرى كالفلوريد والفوسفات حيث إن النتائج تدل على أن نسبهما متدنية بشكل لا يمكن تحسبها.

٢- استخدام الصودا الكاوية المنتجة محلياً

تم استبدال الصودا الكاوية الأجنبية بالصودا الكاوية المنتجة في سدة الهندية في عملية التحضير.

٣- استخدام الصودا الكاوية الفائضة من التفاعل

تم استخدام الراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل بعد معادلة عياريته في عملية التحضير.

٤- استخدام الكاولين الأحمر بدل الكاولين الأبيض

تم استخدام الكاولين الأحمر بدل الكاولين الأبيض في عملية التحضير.

النتائج والمناقشة

يبين شكل رقم (٢) الرسم التخطيطي للأشعة السينية لطين الكاولين الأبيض قبل وبعد كل سنته. يلاحظ من الشكل (2a) وجود معدن الكاولين بنقاوة جيدة وبدرجة تبلور عالية (المواصفة القياسية الأمريكية ٥-١٤٣) بالإضافة الى قليل من الكوارتز (المواصفة القياسية الأمريكية ٥-٤٩٠). يلاحظ إختفاء الحزم [001] و [002] في الموقع ٧,١٥ و ٣,٥٢ أنكستروم بعد عملية الكلسنة والتي تعود إلى البلورة الجيدة للكاولين مع ظهور الحزمة في ٣,٣٣ أنكستروم العائدة لمعدن الكوارتز بصورة أوضح بعد تسخين الكاولين بدرجة ٥٥٠م (شكل 2b). إن سبب ذلك يعود إلى إزاحة جزيئات الماء وتحطيم الشكل البلوري للكاولين الأصلي [4,6].

لقد أظهرت نتائج الأشعة السينية الحيودية للنموذج المحضر من معاملة الكاولين الأبيض المسخن بوجود الهواء، مع ٢ عياري من هيدروكسيد الصوديوم التجاري وغسل النموذج بالماء المقطر، عن تكوين مادة الزيولايت نوع A كما موضح في الشكل (3a). يلاحظ تطابق جميع الانعكاسات مع النتائج المستحصلة من المواصفة القياسية الأمريكية للزيولايت A (١١-٥٩٠) ومقارنة مع الزيولايت التجاري نوع A (شكل 3b). وكذلك أختفاء الحزم العائدة إلى الكاولين والكوارتز وذلك يعزى إلى إكمال تحول الكاولين إلى الزيولايت A [7].

ويبين جدول رقم (١) نتائج الأشعة السينية للحزم مع شدتها للمناخل الجزيئية المحضرة نوع A، مقارنة مع المناخل الجزيئية التجارية A ومع نتائج مستحصلة من مواصفات قياسية أمريكية..

إن كمية الماء المقطر المستخدم في عملية الغسيل تعتبر عالية (٢٥ لتر / كغم) ، ولغرض إنتاج مناخل جزيئية بكلفة أقل ، تم إستبدال الماء المقطر بماء الشرب في عملية الغسيل. وقد أظهرت نتائج الأشعة السينية الحيودية تكوين مادة المناخل الجزيئية نوع A المتبلورة بصورة جيدة وبنقاوة عالية مما يدل على صلاحية استخدام ماء الشرب بدل الماء المقطر في عملية الغسيل. أظهرت الأشعة السينية الحيودية تكوين مادة المناخل الجزيئية نوع A المتبلورة بصورة جيدة وبنقاوة عالية عند أستبدال الصودا الكاوية الأجنبية بالصودا الكاوية المحلية في عملية تحضير المناخل الجزيئية ،

كما أظهرت نتائج الأشعة السينية الحيودية على تكوين مادة المناخل الجزيئية نوع A المتبلورة بصورة جيدة عند أستخدام الراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل بعد معادلة عياريته. إن درجة تبلور المناخل الجزيئية A المحضرة تكون أقل عند أستخدام ماء الشرب في عملية تحضير محلول الصودا الكاوية اللازمة للتفاعل.

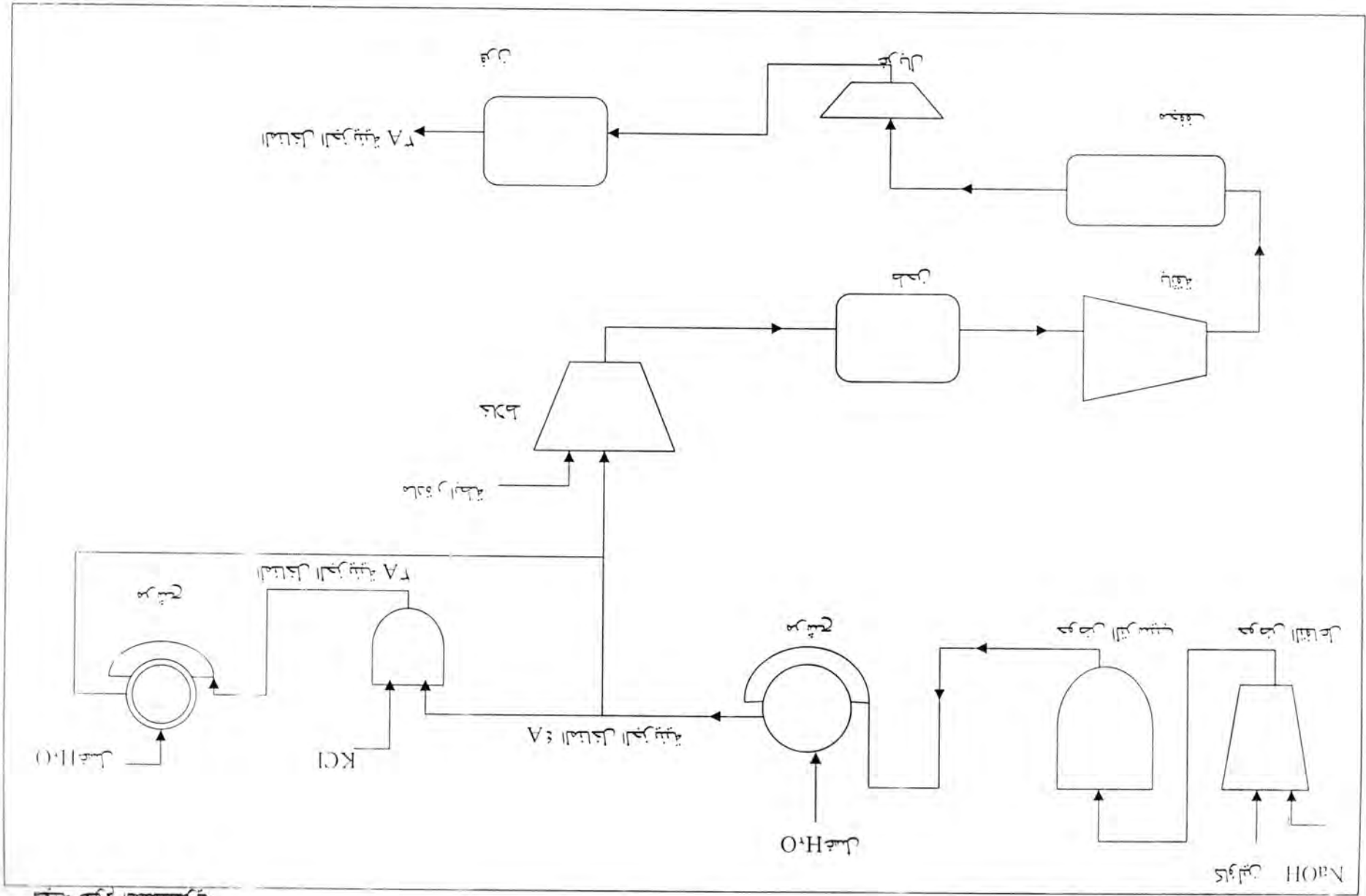
أظهرت نتائج الأشعة السينية وبعد فصل الشوائب من الزيولايت المتكون عدم صلاحية الكاولين الأحمر لأستخدامه كمادة أولية لأنتاج المناخل الجزيئية بنقاوة عالية (>95%) وذلك لأحتوائه على نسبة عالية من الشوائب.

التركيب الكيميائي

ويبين الجدول رقم (٢) التركيب الكيميائي للمناخل الجزيئية 4A المحضرة بأستخدام الماء المقطر في عملية التحضير والغسيل مقارنة مع النماذج المحضرة بأستخدام ماء الشرب في عملية الغسيل. وكما موضح في الجدول فإن النسبة المفقودة من أيونات الصوديوم خلال عملية الغسيل تعتبر قليلة (0.5%) في النموذج المحضر بأستخدام ماء الشرب في عملية الغسيل. هنالك تباين قليل في المحتوى المعدني للمناخل الجزيئية المحضرة والتجارية حيث تعتمد على المحتوى المعدني للمادة الأولية التي تم تحضير المناخل الجزيئية منها.

الخواص الفيزيائية

يبين جدول رقم (٣) الخواص الفيزيائية للمناخل الجزيئية 4A المحضرة بأستخدام الماء المقطر وماء الشرب في عملية الغسيل مقارنة مع النموذج التجاري. ويلاحظ التشابه في الخواص الفيزيائية للنماذج المحضرة مقارنة بالنموذج التجاري.



١٠ "A^o : شكل (١) : مخطط سير المعلومات العنصرية لتجفيف مادة الحشيشة الجاهزة للاستهلاك

جدول رقم (١) - نتائج الأشعة السينية للحزم وشدتها للمناخل الجزيئية نوع A المحضرة مقارنة مع المناخل الجزيئية التجارية نوع A ومع نتائج مستحصلة من مواصفات قياسية أمريكية

نموذج الزيولايت المحضر Prepared zeolite		نموذج الزيولايت التجاري Commercial zeolite A		ASTM		
d	I / I	d	I / I ₀	d	I / I ₀	hkl
12.1	100	12.1	90	12.1	100	100
8.57	50	8.58	95	8.57	70	110
7.03	45	7.025	30	7.025	50	111
5.47	30	5.47	30	5.422	25	210
4.29	10	4.29	5	4.275	12	220
4.068	30	4.053	50	4.062	50	300
3.66	60	3.66	100	3.66	60	311
3.39	20	3.38	20	3.39	35	320
3.24	500	3.24	60	3.24	65	321
2.95	60	2.95	100	2.95	60	410
2.867	10	2.87	10	2.862	14	411
2.727	10	2.72	10	2.727	10	420
2.667	5	2.661	5	2.661	4	421
2.599	25	2.59	40	2.593	14	332
2.488	3	2.480	3	2.48	2	422

جدول رقم (٢)

التحليل الكيميائي للكاولين (الأبيض والأحمر) والمناخل الجزيئية 4A المحضرة باستخدام الماء المقطر وماء الشرب في عملية الغسيل ومقارنتها مع المناخل الجزيئية التجارية 4A

المناخل الجزيئية التجارية 4A	المناخل الجزيئية المحضرة باستخدام ماء الشرب في عملية الغسيل	المناخل الجزيئية المحضرة باستخدام الماء المقطر في عملية الغسيل	الكاولين الأحمر	الكاولين الأبيض	
40.06	39.46	39.46	53.41	49.90	% SiO ₂
33.02	28.35	28.35	28.16	32.95	% Al ₂ O ₃
11.56	12.60	13.16	0.44	0.27	% Na ₂ O
0.02	0.29	0.26	0.195	0.26	% CaO
0.04	0.29	0.26	0.075	0.32	% MgO
0.24	0.84	0.84	3.62	1.46	% Fe ₂ O ₃
0.30	0.29	0.29	0.145	0.39	% K ₂ O
14.60	15.13	15.13	11.39	12.80	% L.O.I

جدول رقم (3)

الخواص الفيزيائية للمناخل الجزيئية A المحضرة ومقارنتها مع النموذج الأجنبي

المناخل الجزيئية المحضرة باستخدام ماء الشرب في عملية الغسيل	المناخل الجزيئية التجارية 4A	المناخل الجزيئية المحضرة باستخدام الماء المقطر في عملية الغسيل	
7.70	8.20	7.82	المساحة السطحية م ² / غم
0.72	0.71	0.73	الكثافة الظاهرية غم / سم ³
0.30	0.28	0.32	حجم المسامات سم ³ / غم
12.00	12.50	12.20	السعة الأمتزازية للماء %

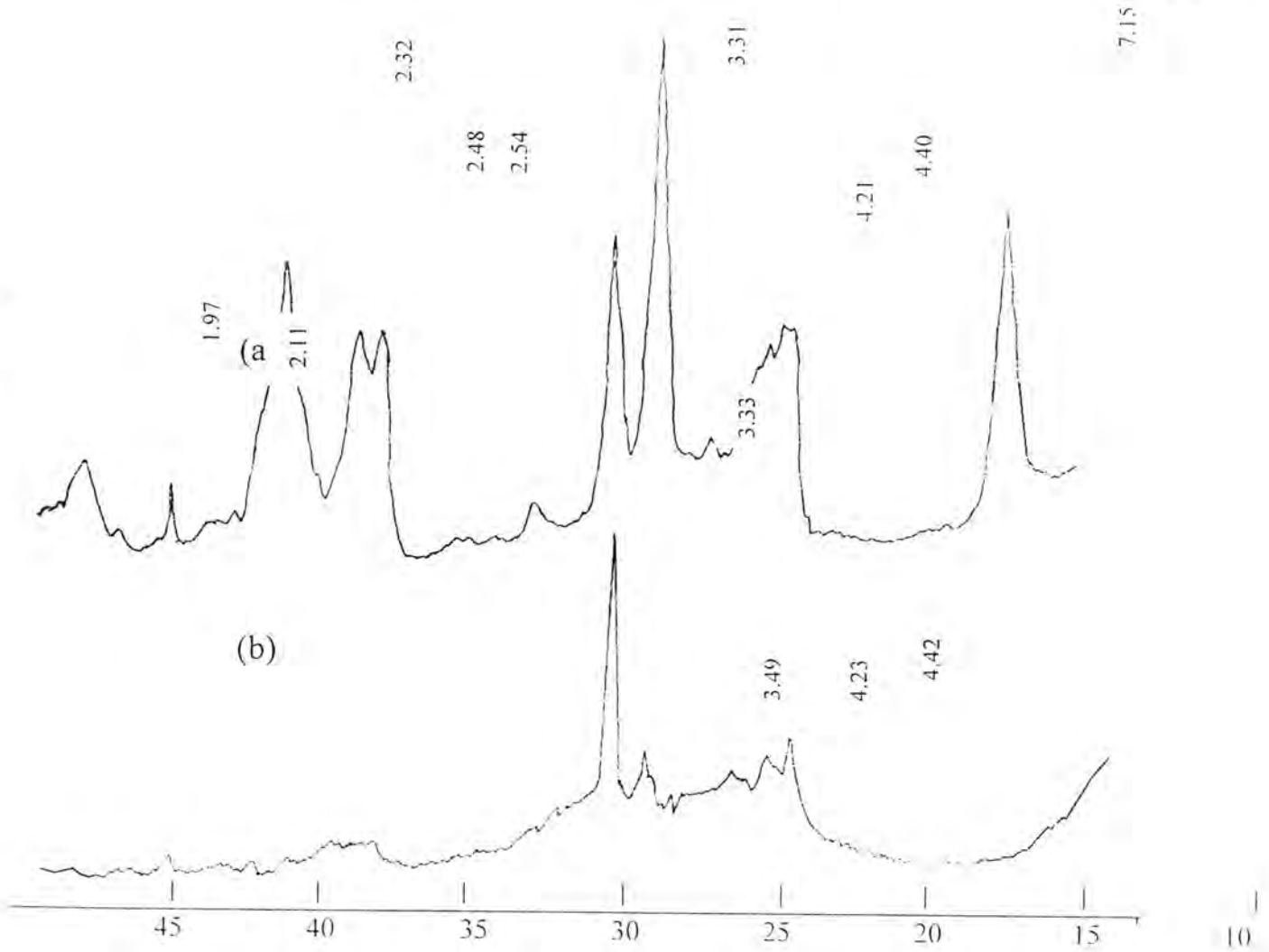
الاستنتاجات

من ملاحظة التركيب الكيميائي والتشخيص بتقنية حيود الأشعة السينية والخواص الفيزيائية لنماذج المناخل الجزيئية A المحضرة باستخدام ماء الشرب ، يمكن أن نستنتج ما يلي:-

- 1- من الممكن استخدام ماء الشرب بدل الماء المقطر لعملية الغسيل ، لأن الكمية المفقودة من الصوديوم خلال عملية الغسيل قليلة بالنسبة إلى الكمية التي تحتويها المادة.
- 2- استخدام ماء الشرب بدل الماء المقطر يوفر مبلغ قدره حوالي مليوني دينار للطن الواحد.
- 3- أظهرت النتائج صلاحية استخدام مادة الصودا الكاوية المنتجة محلياً

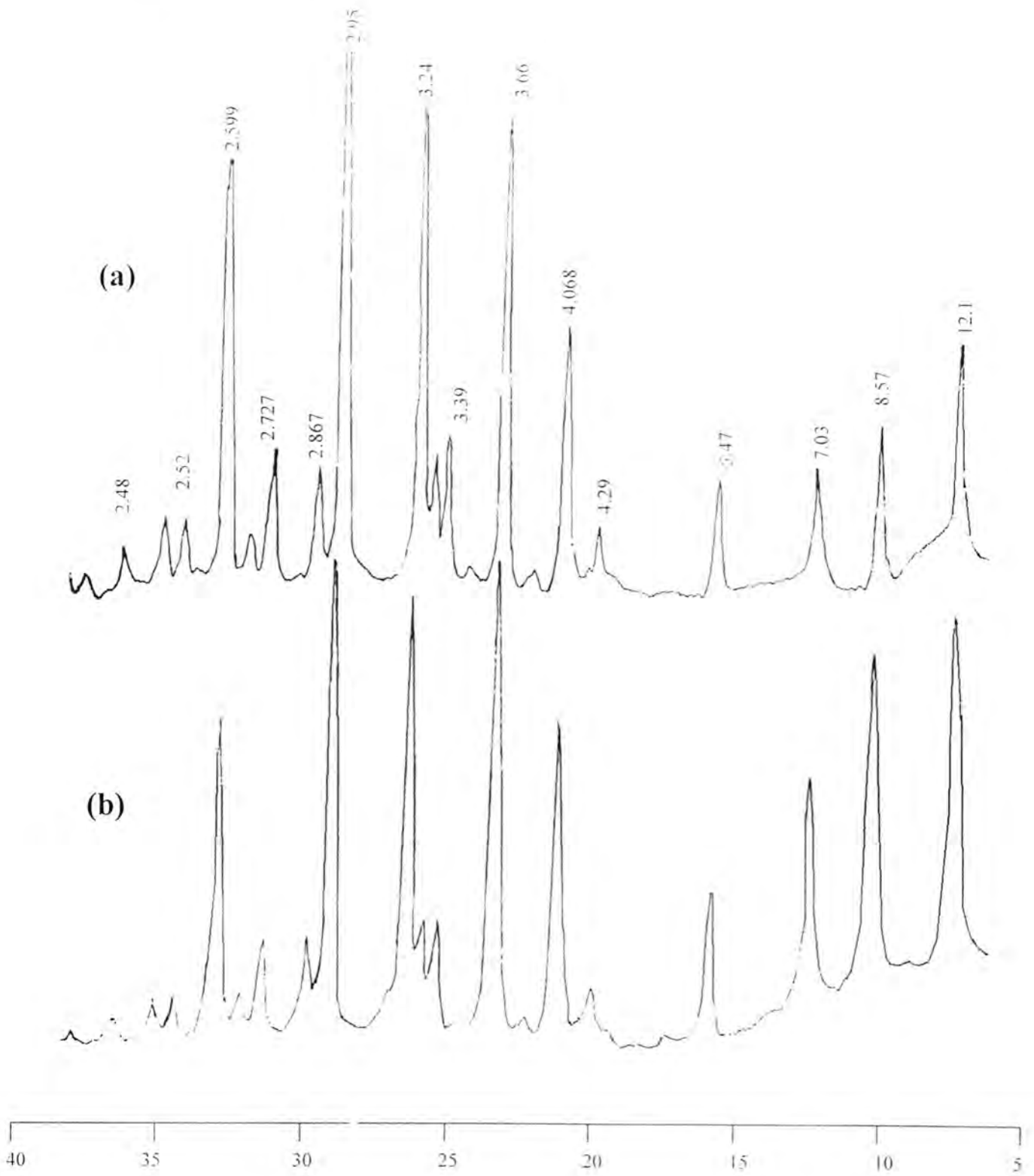
- ٤- أظهرت النتائج صلاحية استخدام الراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل بعد معادلة عياريته لإنتاج المناخل الجزيئية
- ٥- استخدام الراشح من الصودا الكاوية الفائض من التفاعل يوفر مبالغ إضافية.
- ٥- عدم صلاحية الكاولين الأحمر بدن الكاولين الأبيض في عملية تحضير الزيولايت لأحتوائه على نسبة عالية من الشوائب .

- 1



- 2

شكل رقم (٢): رسم تخطيطي للأشعة السينية الحيودية للكاولين الطبيعي (a) والكاولين المسخن بوجود الهواء بدرجة ٥٥٠ م لمدة (٦) ساعات (b)



شكل رقم (٣): الرسم التخطيطي للأشعة السينية الحيودية عند معاملة الكاولين المسخن بوجود الهواء مع (٢) عياري من هيدروكسيد الصوديوم (a) مقارنة مع المناخل الجزيئية التجارية (b)

المصادر

1- Kumakiri , T. Yamaguchi , S.I. Nakao ; “Application of a zeolite A membrane to reverse Osmosis Process” , J. Chemical Engineer of Japan, Vo 33, No.2, pp33-336, (2000)

2- X . Xu, W.Yang, J.Liu and L.Ling; “Synthesis of a high permeance NaA zeolite membrane” : Advanced material, Vol. 12, No.3, pp 195-202, (2002)

3- R.M.Barrer ; “Hydrothermal Chemistry of Zeolite” ; Academic Press, London, (1982)

4- F.Al-Mashta and N.Al-Derzi ; “Formation of Zeolite Type A from Iraqi Kaolinite”; J.Petroleum research, Vol.8, No.1, pp83-92, (1989).

5- المواصفة القياسية رقم ١٧٤ (التحديث الأول) لمياه الشرب/الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة

النوعية IQS /417/2001

6 - A.J.Leonard; “Structural Analysis of the Transition Phases in the kaolinite-Mullite Thermal Sequence”; Journal of the American Ceramic Society, Vol.88, pp. 2267-2276, (2005).

7- G.Brown; “The x-ray identification and crystal structure of clay minerals” Minerological society, (1972).