

Guidelines for Authors

This periodical is a publication of the Academic Publishing and Translation Directorate of Al-Qassim University. Its purpose is to provide an opportunity for scholars to publish their original research.

Manuscripts will be published in on of the following platforms:

- 1) **Article:** It should be original and has a significant contribution to the field the field in which the research was conducted.
- 2) **Review Article:** A critical synthesis of the current literature in a particular field, or a synthesis of the literature in a particular field during an explicit period of time.
- 3) **Brief Article:** A short article (note) having the same characteristics as an article.
- 4) **Forum:** Letters to the Editor, comments and responses, preliminary results or findings, and miscellany.
- 5) **Book Reviews**

The Editorial Board will consider manuscripts from all fields of knowledge. A manuscript may be submitted in either Arabic or English, and, if accepted for publication, it may not be published elsewhere without the written permission of the Editor-in-Chief.

General Instructions

1. **Submission of manuscripts for publication:** Papers must be presented in final page format, along with a compact disk (CD) containing the contribution executed on a PC using MS Word or any updated version of it. Pages are to be numbered consecutively and are to include all illustrative material, such as tables and figures, in their appropriate places in the text. If the author does not follow these guidelines, the paper is likely to be rejected or delayed.

2. **Abstracts:** Manuscripts for articles, review articles, and brief articles require both Arabic and English abstracts, using not more than 200 words, in single column (12 cm wide), for each version.

3. **Keywords:** Each article must (may) have keywords before both abstracts (English and Arabic) and they should not exceed 10 words.

4. **Tables and other illustrations:** Tables, figures, charts, graphs and plates should be planned to fit the Journal's page size (12 cm x 19 cm incl. running heads). Line drawings are to be presented on high quality tracing paper using black India ink. Copies are not permitted for use as originals. Line quality is required to be uniform, distinct, and in proportion to the illustration. Photographs may be submitted on glossy print paper, in either black and white, or color, or made by using Adobe Photoshop. Tables and other illustrative material must include headings or titles, and captions for figures.

5. **Abbreviations:** The names of periodicals should be abbreviated in accordance with *The World List of Scientific Periodicals*. e.g., *et al.*, *J. of Food Sci.*

For weights and measurements, and where appropriate, abbreviations rather than words are to be used, e.g., cm, mm, m, km, cc, ml, g, mg, kg, min, %, etc., Fig.

Latin abbreviations such as: *op. cit.*, *loc. cit.*, *ibid.*, are to be in italic (if they are used).

6. **References:** In general, reference citations in the text are to be in the standard (Author, Date) style. Under the "References" heading at the end of the manuscript all references are to be presented alphabetically by the author's last name in the following fashion:

- a) Periodical citations in the text are to be in the standard (Author, Date) style. Periodical references are to be presented in the following form: author's surname followed by a given name and/or initials (bold), the title of the article between quotation marks (" "), title of the periodical (in italic), volume number, issue number between brackets (if available), year of publication between brackets and pages.

Example:

Hicks, Granville. "Literary Horizons: Gestations of a Brain Child." *Saturday Review*. Vol. 45, No. (6), (1982), 2-23.

- b) Book citations in the text are to be in the standard (Author, Date) style. Book references are to include the following: author's surname followed by a given name and/or initials (bold), title of the book (in italic), city of publication, publisher, year of publication between brackets and the number of pages (if available).

Example:

Daiches, David. *Critical Approaches to Literature*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., (1983), 350 p.

7. **Content Note or Footnote:** A content note or footnote is a note from the author to the reader providing clarifying information.

A content note is indicated in the text by using a half-space superscript number (e.g. ... books³ are ...). Content notes are to be sequentially numbered throughout the text. A reference may be cited in a content note by the use of the standard (Author, Date) style in the same way they are used in the text.

Content notes are to be presented below a solid half-line separating them from the text of the page in which the footnote is mentioned (in single column). Use the same half-space superscript number assigned in the content note(s) in the text to precede the content note itself.

8. **Proofs:** No changes, additions or deletions will be allowed in the pageproof stage.

9. **Opinions:** Manuscripts submitted to the Journal for publication contain the author's conclusions and opinions and, if published, do not constitute a conclusion or opinion of the Editorial Board.

10. **Offprints:** Twenty offprints are supplied free of charge to the author.

11. **Correspondence:** All correspondence may be addressed to:

Division Editor

The Journal of Agricultural and Veterinary Sciences

College of Agriculture & Veterinary Medicine

P.O. Box 6622, Buraydah 51452

E-mail: jvmagsc@yahoo.com

Kingdom of Saudi Arabia

12. **Frequency:** 2 per year

13. **Subscription and Exchange:**

E-mail: jvmagsc@yahoo.com



**In the Name of ALLAH,
Most Gracious, Most Merciful**



Volume (4) – NO.(2)

Journal of Agricultural and Veterinary Sciences

July 2011 – Rajab 1432H

Scientific Publications & translation

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

Prof. Hassan M. Mousa

Editorial Board:

Prof. Mohamed Abd El-Sattar El-Meleigi

Prof. Osama Mohammed Mahmoud

Prof. Ramadan Ahmed Habiba

Prof. Ansary E. Moftah

Prof. Soliman N. Al-Dobaib

Dr. Fahad A. Al-Sobyil

Advisory Board:

Prof. Abdulrahman I. Al-Humaid, Saudi Arabia

Prof. Hani M. Gohar, Egypt

Prof. Abdrab Al-Rasoul Omran, Saudi Arabia

Prof. Heungshik S. Lee, Korea

Prof. Hamzah M. AboTarboush, Saudi Arabia

Prof. Hassan A. Melouk, USA

Prof. Steven D. Lukefahr, USA

Prof. Ibrahim M. Al-Shahwan, Saudi Arabia

Prof. Mohamed M. Youssef, Egypt

Prof. Jean Boyazoglu, France

Prof. Abdulmageed M. Kamara, Egypt

Prof. Maher H. Khalil, Saudi Arabia

Prof. William E. Artz, USA

Prof. Ghanem M. Al-Ghamdi, Saudi Arabia

Contents	Page
English Section	
Animal Production	
Effect of Cooking Method on the Residues of Natural Sex Steroid Hormones in Local and Imported Meats and Meat Products in Al-Qassim Region Zeitoun, M.M. and Ahmed, S.M.	83
Veterinary Medicine	
Causes and management of dystocia in small ruminants in Saudi Arabia Ahmed Mustafa H Ali.....	95
Monitoring of Tetracycline Residues in Table Eggs Collected From Qassim Region, KSA Naser A. Al-Wabel.....	109
Accelerated Neutrophil Apoptosis in Cows Affected with Acute Mastitis M. Tharwat	125
Effect of Inhibin Immunization on FSH, LH and Testicular Histology of Rabbits and Mice Using Three Different Adjuvants K. Al-Kheraije.....	135
Microbiology	
Evaluation of antimicrobial activity of garlic (<i>Allium sativum</i>) against <i>E. coli</i> O157:H7 Mohammad S. Alorainy	149
Arabic Section	
Agricultural Economics	
The Economic Aspects for Development of the Agricultural Sector in Saudi Arabia Othman S. Nushwan, Mohamed H. Qunaibet, and Adel M. Ghanem	54
Agricultural Extension	
Some of Pesticides Application by the Farmers and Their Safety in Alqazalh, Hail Area in the Kingdom of Saudi Arabia. Mohammad S. Al-Shayaa.....	84

Animal Production

Effect of Cooking Method on the Residues of Natural Sex Steroid Hormones in Local and Imported Meats and Meat Products in Al-Qassim Region

Zeitoun*, M.M.⁽¹⁾ and Ahmed, S.M.⁽²⁾

⁽¹⁾*Department of Animal Production and Breeding and* ⁽²⁾*Department of Food Science and Human Nutrition , College of Agriculture and Veterinary Medicine , Al-Qassim University, 51452 Buraidah P.O. Box 6622, Saudi Arabia.*

(Received 6/ 3/2011, accepted for publication on 13/5/2011)

Abstract. Meat importation and fast food restaurant chains in Saudi Arabia have been increased in the recent decades to meet the increased demand and change of the lifestyle in the country. Public fear of the hormonal residues in imported meats and chicken has motivated the researchers to monitor the levels of the three natural sex steroid hormones in raw meats and to investigate the effect of cooking method on these residues. Thirty three fresh and processed red meat and chicken samples of local and imported origin were purchased from the local market. Six methods of cooking were applied to test their effects on the levels of estradiol 17- β (E2), progesterone (P4), and testosterone (T) residues in meat samples. Mean E2 residue was found to be higher ($p < 0.01$) in imported (132.2 ± 6.8 ng/kg) than in local (104.6 ± 5.9 ng/kg) meats. Contrariwise, T levels were not statistically different ($p > 0.05$) in imported (1.98 ± 0.08 μ g/kg) than in local (1.82 ± 0.09 μ g/kg) meats. Also, P4 residues were not different ($p > 0.10$) in imported (3.28 ± 0.27 μ g/kg) than in local (2.84 ± 0.08 μ g/kg) meats. Cooking method exhibited significant effect on the E2 and T but not on P4 residues in meat. Cooking by grill, microwave and oven surpassed frying, boiling and pressure in reducing the hormonal residues in various meats. Grill, microwave and oven reduced T residues by 29, 23 and 19% of that found in raw non cooked meats, respectively. Also, these three methods significantly ($p < 0.01$) reduced E2 residues by 27-47% of its counterparts in non cooked meats. However, grill was found to be the sole cooking method that reduced ($p < 0.01$) P4 residues in meats, the level of reduction approached 31% of that found in raw non cooked meats. There were no significant differences between the raw and processed meats in their contents of the three hormones. Although quite increases of the three tested hormones were found in the imported meats and chicken, these increases still comply with the safety allowable levels set by the American FDA and WHO guidelines. Moreover, microwaving, grilling or cooking in oven were the best cooking methods to minimize the hormone residues in meats.

Key words: Meat, estradiol 17- β , progesterone, testosterone, cooking method.

Correspondence Author: * Moustafa M. Zeitou
Professor of Reproductive Physiology, Email: mmzeitoun@yahoo.com

Introduction

Since 1989, European countries (EU) introduced a prohibition on the use of thyrostatic, estrogenic or gestagenic substances for growth promotion in meat production. The use of hormones such as estradiol-17 β , testosterone and progesterone to promote growth is now prohibited both for domestic production within the EU and in imports from other countries of meat from animals given these hormones (Heitzman, 1983). However, the status was different in the U S A as they allow the use of growth promoters, *i.e* hormones or antibiotics in meat production farms. Hormone implants containing estradiol benzoate/progesterone were first approved in 1956 by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for increasing growth, feed efficiency and carcass leanness of cattle. Later, other implants containing testosterone, zeranol, trenbelone acetate and combinations of these hormones were developed and approved for use in cattle by the FDA.

Among scientific, public and political communities there has been a controversy and arguments about banning or allowing the regular use of such compounds in meat production, as some scientific reports indicated possible carcinogenicity and genotoxicity (Andersson and Skakkebaek, 1999). Also, it has been found that the highest rates of hormone-related cancer, including cancer of breast, ovary, prostate, testes and colon were found in North America ,where hormone-treated meat is consumed (Sibbald,1999).

Not only natural steroids are used as growth promoters, but also synthetic compounds such as zeranol, trenbolone and melengesterol.

Increasing awareness of the scientific as well as public community about the risks of the residues of such compounds on human health has been raised in the recent decades. The recent life style of partially or fully dependence on fast foods and the increased consumption of such a food by the adolescents and prepubertal young generation promoted us to monitor the residues of the three natural sex steroid hormones in meats and their available processed products .

Therefore, it was the aim of the current study to investigate the effectiveness of various types of cooking on the minimization of such hormones in the human diets.

Materials and Methods

Meat samples and cooking methods:

Thirty three raw, processed and readymade beef, camel, lamb and chicken samples were purchased from the local supermarkets, including local series of internationally restaurants. The samples involved local as well as imported meats. Samples were taken to the physiology laboratory, sliced into equal 7 pieces to be disseminated into 7 cooking treatments (*i.e* raw, grill, oven, microwave, frying, stew and pressure cooking). Cooking methods were applied in the highly equipped educational kitchen in the Department of Food Sciences, College of Agriculture and Veterinary Medicine. Cooking was done similar to what is done at home kitchen, *i.e* spices and salt were added and time of cooking was adjusted by a stop watch.

Cooked samples were then transferred in sanitary food bags to the physiology laboratory for hormone analyses.

Steroid hormone extraction:

Steroid hormones were extracted according to the method described by Zeitoun and Fathelbab (1994) with some modification. One gram of minced and homogenized meat sample was taken into a clean centrifuge tube, five milliliters of an absolute ethanol (96% chromatographic grade, Sigma-Aldrich, USA) were added and samples were centrifuged (3000rpm/15 minutes) at room temperature. The centrifuged sample tubes were immersed in ice bucket for 30 minutes and the supernatants were aspirated into clean centrifuge tubes. A second centrifugation cycle as previously mentioned was applied and supernatants were aspirated into clean tubes. Extracted samples were subjected to a weak stream of nitrogen while on a warm block (37°C) until complete drying occurs. Dried residues were reconstituted in 1 ml phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.2). Samples were then ready for the hormonal determinations.

Enzymeimmuno assays (EIAs) of T, E₂ and P₄

EIA Commercial kits (Human, Germany) were used for the determinations of T, E₂ and P₄. The sensitivity of progesterone ranges between 0.03-0.07ng/ml. The intra- and interassay coefficient of variations for progesterone values were 3.7 and 5.1%, respectively (Israel *et.al*, 1972). Testosterone determinations sensitivity range was 0.05-0.09 ng/ml and intra- and interassay coefficient of variations were 2.9 and 4.7%, respectively (Moltz *et al*, 1984). The sensitivity of estradiol 17-β was 3.6pg/ml. The intra and interassay coefficient of variations were 3.2 and 5.6%, respectively (Goldstein *et.al*, 1982).

Statistical analyses:

Data were analyzed using GLM procedure (SAS, 2000). Significance among means was detected using Duncan's Multiple Range Test (DMRT, Steel and Torrie, 1980).

The fixed model used for analysis was as follows;

$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + e_{ijk}$; where:

Y_{ijkl} = an observation of sample l ,

μ = overall mean,

A_i = fixed effect of type of sample (imported or local),

B_j = fixed effect of type of cooking methods ($j = 1-7$).

C_k = fixed effect of type of material (raw or processed),

e_{ijk} = random error.

Results and Discussion

Local meats exhibited significant lower mean ($p < 0.01$) residues of estradiol 17-β (E₂) than this found in imported meats. However, progesterone (P₄) and testosterone (T) residues were not significantly ($p > 0.05$) different between the two sources of meat (Table 1).

Table (1). Sex steroid hormone (E₂, P₄ & T) residues in local and imported meats (LSM ± SEM)

Meat Source	E ₂	P ₄	T
	(ng/kg)		
Local	104.6± 5.9 ^a	2843.0±84.2	1817.8±91.6
Imported	132.2±6.8 ^b	3280.5± 272.5	1978.5±76.0

Means in the same column with different superscripts significantly differ (p<0.01).

According to the US-FDA guideline, they allowed incremental increases above the normal levels (i.e. in non treated meats) of E₂, P₄ and T in muscles up to 120, 3000 and 640 ng/kg, respectively (CVM-FDA, 1983, 1994a & 1994b). Moreover, acceptable daily intake (ADI) maxima of estradiol, progesterone, and testosterone were established by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) at 50, 30000 and 2000ng/kg body weight (BW), respectively. Even though, there still are found about 26 % increases in the amount of E₂ residues in imported than local meats, these increases remain fall within the safe levels. When an adult person weighing around 70 kg consumes per day for example two sandwiches (or other equal items) containing around two hundred grams of meat ,that means he consumes about 21 ng E₂ ,which still below 50% of the allowable value per kg BW set up by JECFA. This means that the amount of E₂ consumed is far below that allowed for a 70 kg person (≈1% of the allowed level). There were no significant differences (p> 0.05) of the three hormones in raw versus processed meats. The values of E₂, P₄ and T were 110.6±7.7, 3727.8±333.8 and 1860.2±114.8 ng/kg raw meats. However, the respective values in processed meats were 123.1±5.9, 2630.5±82.2 and 1920.2±64.6 ng/kg.

As shown in Table 2, there exist significant (p<0.01) reductions in T and E₂ residues of cooked meats as compared to their levels in raw (control-non cooked) meats. However, cooking method didn't influence P₄ levels in cooked and raw meats.

Table (2). Effect of cooking method on the E₂, P₄ and T residues in meats (LSMEAN±SEM)

Cooking method	E ₂	P ₄	T
	(ng/kg Meat)		
Control-non cooked	148.2 ± 14.2 ^a	3336.1± 374.3 ^{ab}	2137.6 ±170.1 ^a
Grill	77.9 ± 10.6 ^d	2304.1± 179.0 ^b	1510.0 ±129.2 ^b
Microwave	108.8 ± 10.8 ^{dc}	2732.0 ± 282.4 ^{ab}	1645.2 ±1445 ^b
Oven	94.8 ± 10.9 ^{dc}	3311.9 ± 5430 ^{ab}	1732.2 ±131.5 ^{ab}
Boiling	129.6 ± 10.9 ^{abc}	3039.4 ± 216.7 ^a	1958.5 ±150.9 ^{ab}
Frying	140.9 ± 11.8 ^{ab}	3071.2 ± 300.6 ^{ab}	2121.2 ±167.0 ^a
Pressure	124.6 ± 110.5 ^{abc}	3664.5 ± 589.2 ^a	2153.6 ±178.6 ^a

Means in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.01).

Grill gave the best results as far as the reduction in the levels of the three hormones (Table2). Followed by the grill, cooking in the oven and microwave also revealed good cooking methods for the reductions ($p<0.01$) in the three hormonal residues in all tested samples. Grill reduced E_2 by about 50% of its original levels in raw meats. Oven reduced E_2 levels by 36%, however microwave reduced E_2 by about 27% of its original levels in raw meats. Testosterone levels were reduced by 29, 23 and 19% for meats cooked by grill, microwave and oven, respectively. These values are in agreement with the values set up by the JECFA and parallel to the values obtained in Iranian meats (Oveisi *et.al*, 2007). Acceptable daily intake (ADI) maximum of Testosterone was established by JECFA at $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ body weight, based on reported no-or lowest observed effect levels in humans of $1.7 \text{ mg testosterone/kg}$ body weight (Joint FAO /WHO, 1999).

Average progesterone levels in imported meats were found to be 3280 ng/kg meat, which represent 9% more than the upper safe level (3000 ng/kg). Contrariwise, average progesterone level in local meats was 2843 ng/kg meat, representing 5% less than the upper safest level.

As illustrated in Figure (1), there were no statistically significant differences ($p>0.05$) in the levels of the three tested hormone residues between red meats and chicken, even though there appears to exist higher levels in chicken than in meats.

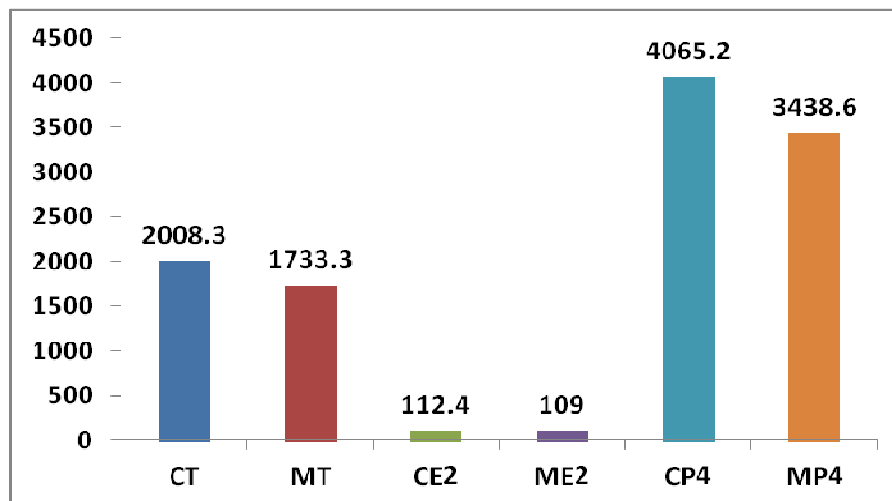


Figure (1). Overall Means (ng/Kg) of Testosterone (T), Estradiol (E2) and Progesterone (P4) in red meats (M) and chicken meats (C).

CT=Chicken Testosterone, MT=Meat Testosterone, CE2=Chicken Estradiol, ME2=Meat Estradiol, CP4=Chicken Progesterone, MP4=Meat Progesterone

Table (3) exhibits average levels of the three hormones in the processed meats. These involve canned beef, beef burger, luncheon and hot dogs. Hot dogs contained the lowest ($p<0.01$) level of testosterone (1244.3 ± 120.9 ng/ kg) as compared to the highest level in canned beef (2992.9 ± 170.8 ng/kg). Likewise, canned beef contained the highest level of estradiol (157.9 ± 12.5 ng/kg), however luncheon (103.0 ± 7.8 ng/kg) and hot dogs (109.6 ± 8.6 ng/kg) contained the lowest levels of E2. Highest level of progesterone was found in canned beef (3400 ± 170.8 ng/kg) and the lowest level existed in luncheon (2097.0 ± 130.5 ng/kg) .The only Possible explanation for the differences in the hormone levels between meat products is attributed mainly to the existing percent of a filler material (i.e soy bean, corn starch, spices,..etc) which might vary considerably between various meat products. As the percent of meat in a product decreases, the level of hormone residue consequently decreases.

Table (3). Effect of type of processed product on the E₂, P₄ and T residues in meats (LSM \pm SEM)

Processed Product	E2	P4	T
	(ng/kg Meat)		
Canned Beef	157.9 \pm 12.5 ^a	3400.0 \pm 419.6 ^{ab}	2992.9 \pm 335.3 ^a
Sausage	140.2 \pm 10.8 ^{ab}	2552.8 \pm 138.0 ^c	2030.4 \pm 110.8 ^b
Beef Burger	115.0 \pm 10.1 ^{ab}	2773.1 \pm 130.9 ^{bc}	1858.8 \pm 104.6 ^b
Beef Luncheon	103.0 \pm 9.1 ^b	2079.6 \pm 138.1 ^c	1743.9 \pm 106.4 ^{bc}
Hot Dogs	109.6 \pm 9.5 ^{ab}	3588.6 \pm 321.4 ^a	1244.3 \pm 110.2 ^c

Means in the same column with different superscripts significantly differ ($p<0.01$).

Evidently, levels of the three sex hormones in the imported meats are slightly higher than in domestic meats. Although precautionary concerns are paid to the hormone residues in meat and their products especially in the European countries, there are still no clear minimum safe levels of these hormones for human consumption. Moreover, to date, to the best of our knowledge there is little information on the daily production levels of these hormones and their effects on human health, particularly in prepubertal children both males and females (Doyle, 2000).

The approved US-FDA guidelines, so far depend on acceptable residue levels in tissue from hormone-treated animals on the presumably highly overestimated production rates in prepubertal children given in the JECFA report (Andersson and Skakkebaek, 1999).

Steroid hormones are very potent compounds that have profound biological effects on both animals and humans. Whether the level of the external consumed hormone is within the normal physiological level, still a subject of controversy. Recent *in vivo* studies in prepubertal adolescents indicate that even small differences in hormone levels and very low doses of steroid hormones may have significant adverse biological effects (Caruso-Nicoletti *et al*, 1985; Masamura *et al*, 1997). Likewise, *in vitro* research has shown significant molecular effects of estrogen in extremely low doses (Tayel, 2008).

In conclusion, special attention must be paid to the consumption of fat rich-fast foods, in which mainly imported meats are used. Moreover, special concern should be addressed to the lasting effects that may occur during specific sensitive time of life, mainly during the fetal, perinatal and pubertal periods. Therefore, according to the results obtained in the current study, it is preferable to use recipes for cooking meats, like grill, oven or microwave which get-rid of most fats for the best reduction of these fat-soluble hormones.

Acknowledgement: The authors acknowledge the University of Al-Qassim Deanship for Graduate Studies and Scientific Research for financing this study under the project No. SR-D-009-029.

References

- Andersson AM, Skakkebaek NE.** Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur. J. Endocrinol.* 1999; 140(6): 477-485.
- Caruso-Nicoletti M, Cassorla FG, Skerda MC, Ross J1., Loriaux DL, Cutler GB.** Short term, low dose estradiol accelerates ulnar growth in boys. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1985; (61): 896-898.
- Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration.** Summary of NADA 011-427: Synovex-H (estradiol benzoate and testosterone propionate). 1983. <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section1/011427s100583.html>
- Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration.** Summary of NADA 009-576: Synovex® (estradiol benzoate and progesterone). 1994a. <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section1/009576s81994.html> [Search at <http://www.fda.gov/cvm/efoi/foiglist.html> for all NADA numbers.].
- Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration.** Summary of NADA 140-992: Revalor®-H (trenbolone acetate and estradiol). 1994b. <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/140992.html>
- Doyle E.** Human safety of hormone implants used to promote growth in cattle. *Food Research Institute July 2000; FRI Briefings: 1-24.*
- Goldstein D, Zuckerman, Harpaz S et al.** Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil. Steril.* 1982, 37:348-354.
- Heitzman RJ.** The absorption, distribution and excretion of anabolic agents. *J. Anim. Sci.* 1983; 57(1):233-238.
- Israel R, Mishell DR, Stone Jr SC, Thorneycroft I H , Moyer DL.** Single luteal phase serum progesterone assay as an indicator of ovulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1972, 112 : 1043.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** Summary and Conclusions of the Fifty-second Meeting, Rome, 2–11 February 1999. <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/Jecfa/jecfa52.pdf>
- Masamura S, Santer SJ, Gimotty P, Gerge J & Santen RJ.** Mechanism for maintenance of high breast tumor estradiol concentrations in the absence of

ovarian function: role of very high affinity tissue uptake. *Breast Cancer Research and Treatment* 1997; (42):215-226.

Moltz L, Schwartz U, Sörensen R, Pickartz H , Hammerstein J. Ovarian and adrenal vein steroids in patients with nonneoplastic hyperandrogenism: selective catheterization findings, *Fertility and Sterility* 1984, 42: 69–75.

Oveisi M R, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Bagheri M. Preliminary screening for the levels of testosterone hormone in the market meat in Tehran. *Acta Medica Iranica* 2007; (45) 2: 126-130.

SAS, Statistical Analysis System User's Guide (Version 8), SAS Institute, Cary NC, USA.2000

Sibbald B. " European ban on bovine growth hormones should continue: expert" , *Canadian Medical Association Journal*, September 21, 1999: <http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/161/6/677>

Steel RGD, Torrie JH. Principals of Statistics. McGraw-Hill Book Company Inc., NY,USA, 1980.

Tayel D.I.A. Assessment of the dietary intake of hormones in consumed diets and its possible relation to obesity among adolescents.2008, *Ph.D Thesis, Alexandria University, Egypt* pp; 122.

Zeitoun M M , Fathelbab A Z. Seasonal ovarian function in Egyptian water buffalo as measured by a simple progesterone enzyme immunoassay in whole milk. *Alex. J. Agric. Res.* 1994; (39):55-67.

تأثير طرق الطهي على متبقيات الهرمونات الجنسية الأستيرويدية الطبيعية في اللحوم المستوردة و المحلية و منتجاتها بمنطقة القصيم

مصطفى محمد زيتون^(١) و سمير محمد أحمد^(٢)

^(١) قسم إنتاج الحيوان و تربيته و ^(٢) قسم علوم الأغذية

كلية الزراعة و الطب البيطري، جامعة القصيم ٥١٤٥٢ بريدة ص.ب ٦٦٢٢، المملكة العربية السعودية

ملخص البحث. استهدفت هذه الدراسة التعرف على مدى فاعلية تأثير طرق الطهي المختلفة على متبقيات هذه الهرمونات الستيرويدية الجنسية وذلك للوصول بتوصية للعامة باستخدام أفضل الطرق التي تقلل هذه المتبقيات للحد الأدنى المسموح به دولياً أو للتقليل من تناول تلك الأطعمة. في الدراسة الحالية تم شراء ثلاثة و ثلاثون عينة من اللحوم الحمراء و الدجاج المحلي و ستورد و كذلك شراء بعض الساندوتشات السريعة من المطاعم المحيطة للكشف عن هذه الهرمونات في لحومها. تم قياس متبقيات الهرمونات الستيرويدية الجنسية (التستستيرون و البروجستيرون و الاستراديول ١٧ بيتا) في العينات قبل إجراء الطهي (عينات خام) و بعد إجراء معاملات الطهي المختلفة (القلي بالزيت، السلق في الماء الحار، الميكروويف، الفرن الكهربائي، الضغط البخاري، الجريل).

أظهرت النتائج إرتفاعاً معنوياً في متوسط متبقي هرمون الاستراديول في اللحوم المستوردة (١٣٢,٢ نانوجرام/كجم لحم) عنها في اللحوم المحلية (١٠٤,٦ نانوجرام/كجم لحم). في المقابل لم يختلف معنوياً مستوى هرمون التستستيرون في اللحوم المستوردة (١,٩٨ ميكروجرام/كجم لحم) عنها في المحلي (١,٨٢ ميكروجرام/كجم لحم). أيضاً لم يختلف معنوياً تركيز هرمون البروجستيرون في اللحوم المستوردة (٣,٢٨ ميكروجرام/كجم لحم) عنها في اللحوم المحلية (٢,٨٤ ميكروجرام/كجم لحم).

وأظهرت طريقة الطبخ تأثيراً معنوياً بخفض متبقيات هرموني الاستراديول و التستستيرون و لكنها لم تؤثر على متبقيات البروجستيرون في كل العينات المقاسة. و تفوقت طرق الطهي باستخدام الجريل و الميكروويف و الفرن الكهربائي على الثلاث طرق الأخرى (القلي بالزيت و الضغط البخاري و السلق).

أدى الطهي بالجريل و الميكروويف و الفرن الكهربائي الى الإختزال المعنوي لمتبقيات هرمون التستستيرون بمقدار ٢٩ و ٢٣ و ١٩٪ على الترتيب. في حين أدت نفس طرق الطهي إلى إختزال متبقيات هرمون الاستراديول بمقدار ٢٧ - ٤٧٪ عن مثيلتها في العينات الخام قبل الطهي. كما وُجد أن الطهي بالجريل هي الطريقة الوحيدة التي إختزلت متبقيات هرمون البروجسترون بمقدار ٣١٪ عن مثيلتها في العينات الخام. و في المقابل لم تتواجد فروقاً معنوية بين اللحوم الخام وتلك المصّعة في محتواها من الثلاثة هرمونات. و تخلص الدراسة إلى أنه بالرغم من الارتفاع المعنوي لمستويات الهرمونات الثلاثة في اللحوم و الدجاج المستورد المتوافر بمنطقة القصيم عنها في اللحوم المحلية إلا أنها لازالت تقع تحت المستوى المسموح به و المقرر بواسطة هيئة الأغذية و الأدوية الأمريكية و منظمة الصحة العالمية. و هنا وُجد أن أفضل الطرق لطهي هذه اللحوم لتقليل متبقيات هذه الهرمونات هي الجريل و الميكروويف و الفرن الكهربائي الى الحدود المسموح بها عالمياً أو أقل من تلك الحدود. ولأزال هناك حاجة لدراسة بحثية مستفيضة لا بد من اجرائها على الصبية و الفتيات المستهلكين لهذه الأغذية بصورة مكثفة.

الكلمات المفتاحية: اللحوم، الاستراديول $\beta 17$ البروجسترون، التستستيرون، طرق الطهي.

Veterinary Medicine

Causes and Management of Dystocia in Small Ruminants In Saudi Arabia

Ahmed Mustafa H Ali

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Qassim University,
P.O. Box 6622, Buraydah, 51452Qassim, Saudi Arabia*

(Received 15/2/2011, accepted for publication on 1/5/2011)

Abstract. The objectives of this study were to clarify the most common causes of dystocia in sheep and goats in Saudi Arabia and to evaluate the efficiency of Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) in treating the ringwomb syndrome in ewes and does carrying dead fetuses. One hundred and sixty one Awassi and 19 Najdi ewes and 265 Aradi and 19 Damascus does suffering from dystocia were investigated in this study. Dystocia was diagnosed after careful vaginal examination and each case was attributed to a single primary cause. In cases with ringwomb, ultrasound examination was performed to investigate fetal viability. Cases with viable fetus(es) were promptly cesarean sectioned. While in cases with dead fetus(es), $PGF_2\alpha$ was administrated intramuscularly and the animals were observed for 72 hours for cervical dilatation. The results indicated that the important causes of dystocia in sheep were ringwomb (31.7%), narrow pelvis (21.7%), fetal mal-disposition (21.1%), and fetal oversize (15%). Other less important causes were uterine torsion (4.4%), monsters (4.4%) and simultaneous presentation of twins (1.7%). In goats, ringwomb (32.8%), fetal mal-disposition (22.6%), narrow pelvis (18%), and simultaneous presentation of twins (13.7%) were the major causes of dystocia. Other minor causes were uterine inertia (6.7%), fetal oversize (3.2%), uterine torsion (1.8%), and monsters (1.4%). After treatment of ringwomb cases with $PGF_2\alpha$, 21.9% of ewes and 68.6% of does had fully dilated cervix ($P < 0.01$). The mean intervals from treatment to complete cervical dilatation were 63.0 ± 11.6 hr and 41.5 ± 13.1 hr for ewes and does, respectively ($P < 0.001$). In conclusion, ringwomb syndrome constituted about one third of the causes of dystocia in the small ruminants in Saudi Arabia. It could be effectively treated by administration of $PGF_2\alpha$ in does.

Keywords: dystocia; ringwomb; small ruminant; causes; treatment.

Introduction

Dystocia, or difficult birth, is a contributory factor in peri-natal death of dams and newborns because of damage to the birth canal and use of excessive traction forces (Rook *et al.*, 1990; Ghosh *et al.*, 1992; Brounts *et al.*, 2004; Scott, 2005). The ability to distinguish lambing and kidding difficulties is important in treating dystocia. Generally, dystocia may be of fetal or maternal origin (Noakes *et al.*, 2009). Fetal dystocia occurred mainly due to oversize, mal-disposition, and monsters (Engum and Lyngset, 1970; Rahim and Arthur, 1982; Majeed and Taha, 1989a; Noakes *et al.*, 2009). Maternal dystocia were mainly due to a deficient dilatation of the cervical canal (ringwomb), narrow pelvis and uterine inertia (Franklin, 1986; Majeed and Taha, 1989b; Thomas, 1992; Noakes *et al.*, 2009).

Ringwomb, or incomplete cervical dilatation, is a problem in some sheep and goats flocks. It accounted for an incidence of 20 to 30% of all dystocia cases (Jackson, 1995; Noakes *et al.*, 2009). The cause is still unknown but may be due to a lack of release of hormones involved in softening collagen or a lack of response of the collagen in the cervix to hormonal stimulation (Wu *et al.*, 2004; Palliser *et al.*, 2006). There was no correlation of ringwomb with breed of sheep, age, and body condition score. However, there was a genetic predisposition; the occurrence of ringwomb appears to run with bloodlines and when these bloodlines are inbred, the frequency of ringwomb increases (Hindson and Turner, 1972, Majeed and Taha, 1989b; Thomas, 1992; Ghosh *et al.*, 1992; Sobiraj, 1994; Noakes *et al.*, 2009).

Manual dilatation, medical and hormonal therapies, and surgical approach have been used to treat the ringwomb syndrome with variable outcomes. The administration of PGE₂, in form of intra-cervical gel, had no effect in causing softening of the cervix (Jones, 1982). Using relaxin on ewes affected with ringwomb did not appear to be of practical value (Hindson and Turners, 1972). Treatment with calcium borogluconate and/or estradiol benzoate has shown satisfactory results in goats (Majeed and Taha, 1989b; Ghosh *et al.*, 1992; WU *et al.*, 2004). However, the optimal response has been obtained by intramuscular injection of prostaglandin F₂α analog (Ghosh *et al.*, 1992).

Estimates showed that small ruminant herds have increased by 54% since 1994 in Saudi Arabia (FAO, 2010). Moreover, Saudi Arabia imports more live sheep and goats than any other nation in the world. In addition, there is scarce information about the forms of dystocia in local breeds of sheep and goats reared in Saudi Arabia. As dystocia is usually considered a major cause of newborns and dams deaths with consequence severe economic losses, thus, the aims of this study were to describe the common causes of dystocia in the local breeds of small ruminants in Saudi Arabia. Moreover, the aim was to investigate the efficiency of PGF₂α in treating the ringwomb syndrome in ewes and does carrying dead fetuses.

Materials and methods

The study was conducted on 180 ewes ($n=161$ Awassi breed, $n=19$ Najdi breed) and 284 goats ($n=265$ Aradi breed, $n=19$ Damascus breed) breeds suffering from dystocia. The investigated animals were referred to the Veterinary Teaching

Hospital, Qassim University for management during the period from September 2007 to September 2010. Animals' age ranged from 13 months to 8 years and parity was from 1 to 6. The majority of animals were housed under free condition in the desert area of Qassim region and fed mainly on alfalfa hay and concentrate (barely seeds).

Dystocia was considered when the mothers have more than one hr of active labour without producing a newborn (Bowen, 1978). Dystocia cases were diagnosed after careful vaginal examination. Each case was attributed to a single primary cause; any secondary or subsequent factors were ignored (Thomas, 1992). Ringwomb was defined as failure of the cervix to dilate at parturition (Ghosh *et al.*, 1992). Post-cervical uterine torsion was diagnosed during vaginal examination by felt twisting in the vaginal wall and encountering difficulty in reaching the cervix. However, pre-cervical uterine torsion was diagnosed only after labarotomy during cesarean section.

Trans-cutaneous ultrasound examination (Aloka 500 SSD machine attached with 5 MHz linear-array probe, Tokyo-Japan) was performed in cases with ringwomb to investigate the fetal viability. Cases with viable fetus(es) were promptly surgically operated (Cesarean section, Majeed *et al.*, 1992) to save the fetal live. When the fetus(es) was found dead, PGF₂α (15 mg dinoprost tromethamine, lutalyse®, Pfizer Inc, NY, USA) was administrated intramuscularly and the treated animals were observed for the following 72 hrs for cervical dilatation. These animals were infused with 2 liters 5% dextrose-saline/day during the observation period. When the cervix was not dilated within this time, caesarian section was immediately performed.

Data were expressed in percentages as well as in means±SD. Differences in percentages were evaluated by the χ^2 -test. Differences between sheep and goats in time needed for cervical dilatation after PGF₂α-treatment were analyzed by Tukey's *t*-test. SPSS program for Windows (version 18, 2008) was used for data analysis. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Forms of dystocia in sheep are shown in (Table 1). Ringwomb, narrow pelvis, fetal mal-disposition, and fetal oversize were the most important causes of dystocia. Other less important causes were uterine torsion, monsters and simultaneous presentation of twins. Monsters included Persomus elumbis (four cases), bulldog lambs (three cases), and deformity of vertebral column and extremities (Arthrogryposis, one case), (Fig. 1). Maternal dystocia occurred more frequently than fetal dystocia, both in Awassi and Najdi breeds as well as in primiparous (Tables 2 and 3) ($P < 0.05$). In multiparous, fetal dystocia was more frequent than maternal dystocia ($P < 0.05$).

Table (1). Frequencies of different forms of dystocia in sheep ($n=180$)

General causes	Specific causes	Number of animals	Frequency from the general causes	Frequency from the total causes
Maternal (n=104)	Ringwomb	57	57/104 (54.8%)	57/180 (31.7%)
	Narrow pelvis	39	39/104 (37.5%)	39/180 (21.7%)
	Uterine torsion	8	8/104 (7.7%)	8/180 (4.4%)
Fetal (n=76)	Oversize	27	27/76 (35.6%)	27/180 (15%)
	Head deviation	21	21/76 (27.6%)	21/180 (11.7%)
	Monsters	8	8/76 (10.5%)	8/180 (4.4%)
	Hock flexion	8	8/76 (10.5%)	8/180 (4.4%)
	Knee flexion	5	5/76 (6.6%)	5/180 (2.8%)
	Shoulder flexion	4	4/76 (5.3%)	4/180 (2.2%)
	Twins	3	3/76 (4%)	3/180 (1.7%)

Table (2). Effect of breed on the cause of dystocia in sheep ($n=180$)

	Awassi	Najdi	Total
Maternal	90 (55.9%) ^a	14 (73.7%) ^a	104
Fetal	71 (44.1%) ^b	5 (26.3%) ^b	76
Total	161	19	180

Values with different superscript letter in the same column differ significantly, $P < 0.05$.

Table (3). Effect of parity on the cause of dystocia in sheep ($n=180$)

	Primiparous	Multiparous	Total
Maternal	56/69 (81.1%) ^a	48 (43.2%) ^a	104
Fetal	13/69 (18.9%) ^b	63 (56.8%) ^a	76
total	69	111	180

Values with different superscript letter in the same column differ significantly, $P < 0.05$.

**Fig(1) Monsters in sheep:**

A) *Persomus elumbis* (Awassi breed).



(B) Bulldog lamb associated with anasarca (Najdi breed).



(C) Bulldog lamb associated with ascites (Najdi breed).



(D) Arthrogryposis (Najdi breed).

Forms of dystocia in goats are shown in (Table 4). Ringwomb, fetal mal-disposition, narrow pelvis, and simultaneous presentation of twins were the major causes of dystocia. Other minor causes were uterine inertia, fetal oversize, uterine torsion, and monsters. Monsters constituted schistosomus reflexus (one case) and dicephalus twin (Omphalopagus, one case), general ankylosis and muscle contractures (Arthrogryposis and Lordosis, one case), and failure of closure of abdominal wall (one case) (Fig. 2). Maternal dystocia occurred more commonly than fetal dystocia, both in Aradi and Damascus breeds and in primiparous (Tables 5

and 6), ($P < 0.05$). In multiparous, the difference between the frequencies of maternal and fetal dystocia was not significant.

Table (4). Frequencies of different cause of dystocia in goats ($n=284$)

General causes	Specific causes	Number of animals	Percentages from the general causes	Percentages from the total causes
Maternal (n=168)	Ringwomb	93	93/168 (55.4%)	93/284 (32.8%)
	Narrow pelvis	51	51/168 (30.4%)	51/284 (18%)
	Uterine inertia	19	19/168 (11.3%)	19/284 (6.7%)
	Uterine torsion	5	5/168 (3%)	5/284 (1.8%)
Fetal (n=116)	Twins	39	39/116 (33.6%)	39/284 (13.7%)
	Head deviation	37	37/116 (31.9%)	37/284 (13%)
	Oversize	9	10/116 (7.8%)	10/284 (3.2%)
	Hock flexion	11	11/116 (9.5%)	11/284 (3.9%)
	Knee flexion	7	7/116 (6%)	7/284 (2.5%)
	Shoulder flexion	5	5/116 (4.3%)	5/284 (1.8%)
	Dog-sitting	4	4/116 (3.5%)	4/284 (1.4%)
	Monsters	4	4/116 (3.5%)	4/284 (1.4%)

Table (5). Effect of breed on the cause of dystocia in goat ($n=284$)

	Aradi	Damascus	Total
Maternal	153 (57.8%) ^a	15 (79%) ^a	168
Fetal	112 (42.2%) ^b	4 (21%) ^b	116
Total	265	19	284

Values with different superscript letter in the same column differ significantly, $P < 0.05$.

Table (6). Effect of parity on the cause of dystocia in goat ($n=284$)

	Primiparous	Multiparous	Total
Maternal	44 (89.8%) ^a	124 (52.8%) ^a	168
Fetal	5 (10.2%) ^b	111 (47.2%) ^a	116
Total	49	235	284

Values with different superscript letter in the same column differ significantly, $P < 0.05$



Fig (2). Monsters in goats:

(A) schistosomus reflexus (Damascus breed).



(B) Dicephalus twin (Aradi breed)



(C) Arthrogryposis and Lordosis (Aradi breed).



(D) Failure of closure of abdominal wall and exposure of abdominal organs (Aradi breed).

In cases of ringwomb, cesarean section was performed promptly in 25/57 ewes and in 42/93 does to save the fetal live. The rests with dead fetus(es) were treated with $\text{PGF}_2\alpha$. After administration of $\text{PGF}_2\alpha$, 7/32 (21.9%) ewes and 35/51 (68.6%) does had fully dilated cervix within 63.0 ± 11.6 hr and 41.5 ± 13.1 hr of treatment, respectively. The differences between ewes and does in response to the $\text{PGF}_2\alpha$ -treatment and for the time needed for cervical dilatation were significant ($P < 0.01$). Cases, which failed to response to $\text{PGF}_2\alpha$ -treated, were immediately cesarean sectioned.

During cesarean section for cases with ringwomb, pre-cervical uterine torsion (twisting anterior to the cervix) was found in three ewes and two does. These cases could not be diagnosed as having uterine torsion until they were surgically operated. Three cases of them showed completely ischemic uteri that underwent obligatory uterine amputation.

Discussion

Ringwomb was the common form of dystocia in sheep and goat included in this study. Cases of ringwomb have been also reported in Clun Forest, Dorset Horn, Suffolk, Border Leicester, South Devon, Kerry Hill, and halfbred ewes (Hindson and Turner, 1962; Ghosh *et al.*, 1992; Sobiraj, 1994; Noakes *et al.*, 2009). Failure of the cervix to dilate may be attributed to failure of secretion of the hormones that control labor or of the tissue response to hormonal secretions (Breeveld-Dwarkasing *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Palliser *et al.*, 2006). In the absence of a high concentration of progesterone, prostaglandin F2 α and oxytocin allow calcium ions in the cell membrane to stimulate energy release from adenosine triphosphate, resulting in the contraction of the actin myosin filament (Liggins *et al.*, 1973; Stys *et al.*, 1978). Furthermore, there was an indication that the collagen fibers in the cervix may not have fully undergone their normal changes (Hindson and Turner, 1962; Winkler *et al.*, 1999).

Narrowing of the pelvis was the second important cause of dystocia. This is a warning for an improper management, especially with reference to the mating age and the selection for easy parturition. Additionally, some females may be themselves not fully grown and their pelvic may be quite small (Jackson, 1995). This type of dystocia may be further predisposed by the increasing use of heavy breeds of rams (Jackson, 1995; Noakes *et al.*, 2009).

During the present study, mal-presentation, -position, and -posture were frequently observed in sheep and goat. According to Jackson (1995), fetal mal-disposition is the most common cause of ovine and caprine dystocia. It has been assumed that mild or severe fetal ill and fetal death might predispose to fetal mal-disposition, as may maternal illness or abnormal hormone level (Jackson, 1995; Noakes *et al.*, 2009).

The results showed that fetal oversize was a common cause of dystocia in sheep, especially in multiparous. This problem is usually seen when litter size is small but the size of the individual lamb is large (Rahim and Arthur, 1982; Jackson, 1995; Noakes *et al.*, 2009). While, in goats, the relatively increased frequency of twins and triplets would lower the incidence of oversized fetuses.

Simultaneous presentation of twins in birth canal was a common cause of dystocia in goats in this study. The high incidence of twins and triplets may predispose for this condition in goats (Franklin, 1986; Jackson, 1995).

Uterine inertia was observed in some does during this study. Inertia has been occasionally seen in young inexperienced ewes. Hypocalcaemia may occasionally occur in severe cases of pregnancy toxemia (Jackson, 1995).

Uterine torsion was observed in both sheep and goats in this study. It is usually occurs in the early stage of labor and can be detected when a vaginal examination is carried out to determine why an expected birth has not progressed at the expected rate (Rahim and Arthur, 1982; Jackson, 1995; Ijaz and Talafha, 1999; Noakes *et al.*, 2009). In addition, it was difficult to diagnose pre-cervical torsion (twisting anterior to the cervix) until the animal was surgically operated. .

Fetal monsters were seen as a cause of dystocia in sheep and goats in this study. Based on studies in Australia, New Zealand and the United States, the incidence of congenital defects ranges from 0.2 to 2.0% of all lambs born (Dennis and Leipold, 1979). During a study period of 11 years, abnormalities were found in 19 of 995 (1.9%) newborn Awassi fat-tailed lambs (Elias and Bennett, 1992). Moreover, fetal anasarca has been reported in Awassi sheep newborns (Hailat *et al.*, 1997). The causes of congenital anomalies are usually unknown. The important incriminated factors are prenatal viral infection, intrauterine exposure to poisons ingested by the dam, vitamin deficiency like vitamin A and folic acid, hyperthermia, and gene mutation (Jones *et al.*, 1997).

PGF₂ α was successfully used for treatment of 68.6% of does with ringwomb in this study. Prostaglandins have been shown to be key cellular mediators in several critical processes involved in parturition in all mammalian species studied to date (Liggins *et al.*, 1973; Wu *et al.*, 2004; Palliser *et al.*, 2006). These Prostaglandins have been also implicated in the changes that occur in the connective tissue of the amnion and cervix at labor onset (Palliser *et al.*, 2006). In earlier studies, injection of 20 mg PGF₂ α at Day 144 or 145 gestation resulted in delivery of live kids about 30 to 40 hr later (Romano *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2009). Additionally, administration of 7.5 mg PGF₂ α analogue has been used to treated does with ringwomb (Majeed, 1994). In PGF₂ α -induced calvings, a well-defined sequence of events takes place with respect to changes in the maternal plasma concentrations of estrogen, progesterone, and prostaglandin metabolites, and myometrial activation and dilatation of the caudal cervix (Breeveld-Dwarkasing *et al.*, 2003).

The situation obviously differed in sheep, where only 21.9% of cases were respond to respond efficiently to the PGF₂ α -treatment. The difference between sheep and goats in the response to PGF₂ α -treatment might be related to the mechanism of maintenance of pregnancy. In goats, from day 119 to 126 day of pregnancy, progesterone was produced mainly by the ovaries (up to 10 mg/day, placenta 0 mg/day); whereas in sheep the placenta made the largest contribution (up to 14 mg/day, ovaries about 2 mg/day) (Linzell and Heap, 1968; Stupnicki, *et al.*, 1969; Flint *et al.*, 1983; Weems *et al.*, 2007).

In conclusion, ringwomb was the major cause of dystocia in Awassi and Najdi breeds of sheep and Aradi and Damascus breeds of goats in Saudi Arabia. Other important causes of dystocia were narrow pelvis, fetal oversize, fetal mal-disposition and simultaneous presentation of twins. While, the minor causes were uterine torsion, uterine inertia, and fetal monsters. Generally, maternal dystocia was more common than fetal dystocia. . PGF₂ α effectively treated the cases of ringwomb syndrome in does.

References

- Batista, M., Niño, T., Alamo, D., González, F., Santana, M., Rodríguez, N., Cabrera, F., Gracia, A.**, 2009. Use of Luprostiol and Cloprostenol for induction of parturition in pregnant goats. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 83-87.
- Bowen, J.S.**, 1978. Pregnancy toxemia, milk fever and kidding difficulties. *Dairy Goat J.*, 56, 20-25.
- Breeveld-Dwarkasing, V.N.A., Struijk, P.C., Lotgering, F.K., Eijskoot, F., Kindahl, van der Weijden, H.G.C., Taverne, M.A.M.**, 2003. Cervical dilatation related to uterine electromyographic activity and endocrinological changes during prostaglandin F₂ α -induced parturition in cows. *Biol Reprod* 68, 536-542.
- Brounts, S.H., Hawkins, J.F., Baird, A.N., Glickman, L.T.**, 2004. Outcome and subsequent fertility of sheep and goats undergoing cesarean section because of dystocia: 110 cases (1981-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 275-279.
- Dennis, S.M. and H.W. Leipold**, 1979. Ovine Congenital Defects. *The Veterinary Bulletin* 49, 233-237.
- Elias, E., Bennett R.** 1992. Congenital defects in Awassi fat-tailed lambs *Small Rumin. Res.* 8, 14 1-150.
- Engum, J., Lyngset, O.**, 1970. Gynaecology and obstetrics in the goat. *Iowa State Univ. Vet.* 120, 120-124.
- FAO.**, 2010. Intergovernmental Technical Working Group on Animal Genetic Resources, Sixth Session, Rome, 24-26, November
<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/genetics/angevent2010.html>
- Flint, A.P., Burton, R.D., Heap, R.B.**, 1983. Sources of progesterone during gestation in Barbary sheep (*Ammotragus lervia*). *J Endocrinol.* 98, 283-288.
- Franklin, J.S.**, 1986. Dystocia and Obstetrics in Goats. In: D.A. Morrow (Editor), *Current Therapy in Theriogenology*, 2nd ed., W.B. Saunders, Philadelphia.
- Ghosh, A., Yeasmina, F., Alam, M.G.S.**, 1992. Studies of ringwomb in Black Bengal goats. *Theriogenology* 37, 527-532.
- Hailat, N., Lafi, S.Q., al-Darraji, A., el-Maghraby, H.M., al-Ani, F., Fathalla, M.**, 1997. Foetal anasarca in Awassi sheep. *Aust. Vet. J.* 75, 257-259.
- Hindson, J.C., Turner, C.B.**, 1962. Observations on incomplete dilatation of the ovine cervix. *Vet. Rec.* 74: 363.
- Hindson, J.C., Turner, C.B.**, 1972. The relationship of serum calcium to prolapsed vagina and ringwomb. *Vet. Rec. E:100*.
- Ijaz, A., Talafha, A.Q.**, 1999. Torsion of the uterus in an Awassi ewe. *Aust. Vet. J.* 77, 652-653.
- Jackson, P.G.G.** 1995. *Handbook of veterinary obstetrics*. Saunders, London.
- Jones, G.W.**, 1982. The use of prostaglandin E₂ in the treatment of ringwomb in sheep. Ph.D. Dissertation. University of Liverpool, England.
- Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W.**, 1997. *Veterinary pathology*. T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King (eds), William and Wilkins, Baltimore, USA.

- Liggins, G.C., Fairclough, R.J., Grieves, S.A., Kendall, J.Z., Knox, S.J.** 1973. The mechanism of initiation of parturition in the ewe. *Rec. Prog. Horm. Res.* 29, 111–114.
- Linzell, J.L., Heap R.B.,** 1968. A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat: sources of production and an estimation of uptake by some target organs. *J. Endocrinol.*, 41, 433-NP.
- Majeed, A.F.,** 1994. Obstetrical problems and their management in Iraqi goats. *Small Rumin. Res.* 14, 73-78.
- Majeed, A.F., Taha, M.B.** 1989a. Dystocia in local goats in Iraq. *Small Rumin Res* 2, 375-381.
- Majeed, A.F., Taha, M.B.,** 1989b. Preliminary study on treatment of ringwomb in Iraqi goats. 18, 199-203.
- Majeed, A.F., Taha, M.B., Azawi, O.** 1992. Caprine caesarean section. *Small Rumin. Res.*, 9, 93-97.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W.,** 2009. *Arthurs' Veterinary reproduction and obstetrics*, 9th edition, DE Noakes, TJ Parkinson, GCW England (eds), Saunders, Edinburg, London.
- Palliser, H.K., Hirst, J.J., Gregory E. Rice, G.E., Guck T. Ooi, G.T., Dellios, N.L., Escalona, R.M., Ross Young, I.,** 2006. Labor-Associated Regulation of Prostaglandin E and F Synthesis and Action in the Ovine Amnion and Cervix. *J. Soci. Gyneco. Inves.* 2006 13, 19.
- Rahim, A.T., Arthur, G.H.,** 1982. Obstetrical conditions in goats. *Cornell Veterinarian* 72, 279-284.
- Romano, J.E., Rodas, E., Ferreira, A.,** 2001. Timing of prostaglandin F_{2α} for induction of parturition in dairy goats. *Small Rumi. Res.* 42,199-202.
- Rook, J.S., Scholman, G., Wing-Proctor, S., Shea, M.,** 1990. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 6, 531-562.
- Scott, P.R. Naqvi, S.M., Pandey, G.K., Gautam, K.K., Joshi, A., Geethalakshmi, V., Mittal, J.P.,** 2005. The management and welfare of some common ovine obstetrical problems in the United Kingdom. *Vet. J.* 170, 33-40. Review.
- Sobiraj, A.,** 1994. Birth difficulties in sheep and goats-evaluation of patient outcome from seven lambing periods in an obstetrical clinic. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 101, 471-476.
- Stupnicki, R., McCracken, J.A., Williams, K. I. H.,** 1969. Progesterone metabolism in the ewe. *J. Endocrinol.*, 45, 67-74.
- Stys, S.J. Clewell, W.H., Meschia, G.,** 1978. Changes in cervical compliance at parturition independent of uterine activity. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 130, 414-418.
- Thomas, J.O.,** 1992. Survey of the causes of dystocia in sheep. *Vet. Rec.* 127, 574-575.
- Weems, Y.S, Kim, L., Tsuda, V., Yin, C., Weems, C.W.,** 2007. What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? Prostaglandins Other Lipid Mediat. 84, 54-65.

- Winkler, M., Oberpichler, A., Tschesche, H., Ruck, P., Fischer, D.C., Rath, W.,** 1999. Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181, 153–158.
- Wu, W.X., Xiao Hong, M.A., Coksaygan, T., Chakrabarty, K., Collins, K.V., Rose, J., Nathanielsz, P.W.,** 2004. Prostaglandin Mediates Premature Delivery in Pregnant Sheep Induced by Estradiol at 121 Days of Gestational Age. *Endocrinol* 145, 1444–1452.

عسر الولادة في المجترات الصغيرة بالمملكة العربية السعودية وعلاج ضيق عنق الرحم

أحمد مصطفى حسين علي

قسم الطب البيطري _ كلية الزراعة والطب البيطري _ جامعة القصيم _ المملكة العربية السعودية

ملخص البحث. تم إجراء هذا البحث بهدف التعرف على أهم أسباب عسر الولادة في المجترات الصغيرة في سلالات الأغنام والماعز بالمملكة العربية السعودية ، ودراسة كفاءة البروستاجلاندين ف، الفا في علاج ضيق عنق الرحم في الأمهات التي تحمل حملان مينة.

تمت الدراسة على نعاج من سلالتين من الأغنام وهما العواسي (ن=١٦١) والنجدي (ن=١٩) وسلالتين من الماعز وهما العارضي (ن=٢٦٥) الدمشقي (ن=١٩) والتي كانت جميعها تعاني من عسر الولادة. تم تشخيص عسر الولادة بالمستشفى البيطري التعليمي التابع لجامعة القصيم بالفحص المهبلي ، وتم تصنيف الحالات حسب المسبب الرئيسي لعسر الولادة. تم الاستعانة بالموجات فوق الصوتية لتحديد حيوية الحمل في حالات ضيق عنق الرحم. وقد تم إجراء العملية القيصرية مباشرة في الحالات التي يكون فيها الحمل حياً ، أما في الحالات التي يكون فيها الحمل ميتاً فقد تم علاجها بحقن هرمون البروستاجلاندين ف، الفا في العضل (١٥ مجم دينوبروست ، لوتاليز® ، فيزر ، أمريكا) مع مراقبة الأم لمدة ٧٢ ساعة بهدف تقييم درجة توسع عنق الرحم.

أوضحت النتائج أن ضيق عنق الرحم (٣١,٧٪) وضيق الحوض (٢١,٧٪) وشذوذات المجئ والوضع والهيئة (٢١,١٪) وكبر حجم الحمل (١٥٪) كانت هي أهم مسببات عسر الولادة في الأغنام ، بينما كان التواء الرحم (٤,٤٪) وتشوهات الأجنة (٤,٤٪) والمجئ المتلازم للتوائم (١,٧٪) من المسببات الأقل أهمية. أما في الماعز فكان ضيق عنق الرحم (٣٢,٨٪) وشذوذات المجئ والوضع والهيئة (٢٢,٦٪) وضيق الحوض (١٨٪) والمجئ المتلازم للتوائم (١٣,٧٪) هي الأسباب الرئيسية لعسر الولادة ، فيما كانت عطلاة الرحم (٦,٧٪) وكبر الحمل (٣,٢٪) والتواء الرحم (١,٨٪) وتشوهات الأجنة (١,٤٪) من المسببات الأقل

أهمية. أظهرت الدراسة كذلك أن عسر الولادة الأمومي بصورة عامة كان أكثر شيوعاً من عسر الولادة الحميلي. لقد استجاب ٢١,٩٪ من الأغنام و ٦٨,٦٪ من الماعز (معنوية أقل من ٠,٠١) للعلاج بالبروستاجلاندين ف، الفا وذلك بإظهار توسع لعنق الرحم خلال $11,6 \pm 6,3$ ساعة في الأغنام و $13,1 \pm 4,1$ ساعة في الماعز من العلاج (معنوية أقل من ٠,٠٠١).

ويخلص البحث إلي أن ضيق عنق الرحم يمثل حوالى ثلث أسباب عسر الولادة في الأغنام والماعز بالملكة، وأنه يمكن علاج هذه الظاهرة بكفاءة في الماعز بواسطة الحقن بهرمون البروستاجلاندين ف، الفا، بينما لم تستجيب الأغنام لهذا العلاج بصورة مرضية.

الكلمات المفتاحية: عسر الولادة، ضيق عنق الرحم، المجترات الصغيرة، الاسباب، العلاج.

Monitoring of Tetracycline Residues in Table Eggs Collected From Qassim Region, KSA

Naser A. Al-Wabel

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture & Veterinary Medicine, Qassim University,
Buraidah 51452, P.O. Box 6622, Saudi Arabia*

(Received 15/4/2011, accepted for publication on 23/6/2011)

Abstract. The present study was designed to monitor tetracycline residues in table eggs collected from different regions located in Al-Qassim region from January 2006 to October 2006 using HPLC with UV detection and compare them with internationally acceptable maximum residue limits (MRLs) and assessing proper implementation of the proper withdrawal times. HPLC analysis showed that geographical and seasonal differences in OTC levels. The number of positive samples found in all regions during October 2006 were higher (n= 27) than that collected during January (n= 21), July (n= 19) and April (n= 17). Moreover, the percentages of total occurrence of the positive samples collected from Eion Al-Gawa (57.5) was higher than that in Al-Moznab (55), Buraidah (47.5), Al-Shamasia (27.5) and Oneiza (22.5) with 14, 12, 8, 5 and 5 samples exceeding MRLs, respectively. The results of present investigation indicate that there is widespread misuse of tetracycline by egg layer chicken farms in Al-Qassim region reflecting a general lack of compliance with the recommended practices regarding the use of antimicrobial agents.

These findings pointed to the following recommendations: the need for a monitoring program for tetracycline residues in table eggs in Al-Qassim region at the national level to protect consumers' health.

Keywords: Tetracycline Residues, table eggs, Qassim, withdrawal period

Corresponding author. Tel. +96663800050 ; Fax. +96663801360
E-mail address: naseralwabel@yahoo.com

Introduction

Antibiotics are substances produced by living organisms that are able to kill or inhibit the growth of microorganisms. Antimicrobial drugs have generally been classified into two categories, one includes the synthetic drugs, such as the sulfonamides and the quinolones, and the second, antibiotics, synthesized by microorganisms. In recent years, increasing numbers of semi-synthetic drugs have been developed which are chemical derivatives of antibiotics, thereby blurring the distinction between synthetic and natural antibiotics.

Antimicrobials are administered to animals either by injections (intravenously, intramuscularly, or subcutaneously), orally in feed or water, topically on the skin, intramammary or intrauterine infusions (Mitchell *et al.*, 1998) to control, prevent and treat infection, and to enhance animal growth and feed efficiency (Tollefson and Miller, 2000). Theoretically, all of these routes may lead to residues appearing in foods of animal origin such as milk, meat and eggs (Johnston, 1998). Large numbers of antimicrobial agents are used for the treatment and prevention of poultry infections (Smith, 1974). The most commonly used antimicrobials in food-producing animals are the β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, lincosamides, macrolides, pleuromutilins and sulfonamides. In addition, quinolones have been available for more than 25 years. Chemically, it is (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1, 4, 4a, 5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide. Other antibiotics in this family are tetracycline, chlortetracycline, demeclocycline, methacycline, doxycycline, rolitetracycline and minocycline.

Oxytetracycline (OTC) is widely used as veterinary drugs or as feed additives to promote growth (Katz *et al.*, 1973; Roudaut *et al.*, 1987; Yoshimura *et al.*, 1991; Omija *et al.*, 1994). OTC is a member of the family of the tetracyclines, a group of clinically important natural products and semi-synthetic derivatives characterized by a broad spectrum of activity against pathogenic microorganisms, including gram-positive and gram-negative bacteria and protozoa. These compounds are bacteriostatic antibiotics that act by inhibiting the formation of proteins within the bacterial cell. OTC is produced industrially through fermentation by *Streptomyces rimosus* (Hernández *et al.*, 2003; Mitscher, 1978). Antimicrobial residues in foods of animal origin may cause problems for several reasons. In addition to toxic effects, effects on intestinal microbiota and the immune system are important (Gorbach, 1993; Waltner-Toews and McEwen, 1994). Also, tetracyclines are excreted in milk; their concentrations in breast milk of lactating mothers are approximately 70% of maternal serum concentrations (Gideon and Martin, 1997). The same scenario happens in veterinaries and substantial levels of OTC have been detected in milk obtained from cattle on OTC therapy (Boatto *et al.*, 1999; Long *et al.*, 1990). Consumption of milk with such OTC levels by humans predisposes them to serious health effects. Examples of such health risks include: induction of allergic reactions to some individuals (Rudzki and Rebandel, 1997); development of bacterial resistance (Rudzki and Rebandel, 1997), risk of teratogenicity when OTC is administered in the first trimester of pregnancy (Stauffer, 1967); discoloration of

primary and permanent teeth (Stauffer, 1967. An allergic reaction may be triggered by antimicrobial residues in a previously sensitized individual. (Dewdney *et al.*, 1991; Sundlof *et al.*, 2000). Of 46 composite eggs tested from farms, 3 (6.5%) were contaminated with residues compared with 5 (16.1%) of 31 and 16 (15.0%) of 107 mall and supermarket eggs, respectively, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The antimicrobial residues detected were as follows: sulfonamides, 12 (6.5%) of 184; macrolides, 7 (3.8%) of 184; tetracycline, 5 (2.7%) of 184; and beta-lactam, 0 (0.0%) of 184 (Adesiyun, *et al.*, 2005). The most widely used antimicrobial drugs in farms and possible association between the management practices and the occurrence of antimicrobial residues in eggs from these farms in Nigeria. All the 25 farms surveyed use oxytetracycline. Eggs from nine of the surveyed farms tested positive for antimicrobial residue and three of the ten surveyed farms also tested positive for antimicrobial residue. No association was observed ($p > 0.05$; Fisher's exact test) between the occurrence of antibiotic residues in eggs and farm size, feed source and housing systems (Ezenduka, *et al.* 2011).

Protection of public health against possible harmful effects of veterinary drug residues is a relatively recent preoccupation. The initial intention for adequate consumer protection led to the desire to achieve complete elimination of all traces of drug residues in food commodities. Therefore, animal drugs were initially approved based on a "no residue" tolerance policy, but actually the "zero" tolerance represented the sensitivity of the analytical method used to monitor for drug residues. As analytical methods improved, the "no residue" tolerance was continually being lowered. Ultimately, a policy of negligible tolerance, based on toxicology data, was developed (Boisseau, 1993). As a result, there is concern that residues of these drugs may be retained in eggs from treated hens (Furusawa, 1999). Hence, it would be necessary to survey table eggs for presence of antibacterial agents which might reach the consumers causing undesirable adverse effects. The present study aims to determine the concentrations of tetracycline residues in table eggs in Al-Gassim region and compare them with internationally acceptable maximum residue limits (MRLs) and assess proper implementation of the proper withdrawal times. Also, the present study was also undertaken to develop and validate an analytical method for the determination of OTC in table eggs by using High performance Liquid chromatography (HPLC) with UV detection.

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) procedure is described for the identification and quantification of residues of tetracycline antibiotics (TCA) (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, and doxycycline), in eggs. Spiked and blank samples were prepared by homogenization with 1:1 (v/v) acetonitrile-mixed McIlvaine buffer and EDTA solution (pH 4.0) then centrifugal ultrafiltration. HPLC was performed on a reversed-phase column with acetonitrile-5% (v/v) aqueous acetic acid, 35:65 (v/v), as mobile phase and photo-diode array detection (Thaker, *et al.* 2010).

Materials and Methods

Chemicals and standard

Technical tetracycline as hydrochloride salt was provided by Sigma Compant (UK) with purity of 98%. Certified HPLC-grade of methanol and anhydrous disodium hydrogen phosphate, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), citric acid monohydrate and oxalic acid dehydrate were purchased from BDH Company, while the Baker spe-12G Column Processor designed vacuum manifold capable of processing up to 12 solid phase extraction columns and solid phase extraction column (BAKERBOND speTM, C18, 500 mg per column) was purchased from J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA. Ultra-pure deionized water of 15 MΩ.cm resistivity was obtained from a water purification system (PURELAB Option-R, ELGA, UK) and used throughout this study. All other chemicals were of analytical grades.

Sampling

Table eggs (10 samples) were collected from different provinces namely Oneizah, Al-Shmasia, Buraydah, Al-Moznab and Eion Al-Gawa located in Al-Qassim region, KSA during January, April, July and October 2006 and immediately transferred to laboratory. Egg contents were evacuated, thoroughly mixed in a clean Petri plate and kept at -20°C until needed.

Detection of tetracycline residues in eggs using high pressure liquid chromatography

Tetracycline residues in eggs were determined using HPLC according to the method of AOAC, 2002 with slight modification.

Preparation of standard solutions

The HPLC system was standardized on the same day as the samples were analyzed by injecting 20 µl of standard eight solutions of freshly prepared tetracycline in methanol with concentrations ranging from 0.0 to 0.1 µg/ml. Stock standard solution of tetracycline (1000 µg/ml) was prepared by transferring 108 mg of tetracycline into 100 ml volumetric flask by using methanol and diluted to the volume with methanol at room temperature and mixed well until dissolved. Stock standard solution was every three month and stored at -20°C. From stock standard solution, a concentration of 100 µg/ml was prepared by pipetting 10 ml of this stock into 100 ml volumetric flask, diluted to the volume with methanol at room temperature and mixed well until dissolved. From the concentration of 100 µg/ml, 2.5 ml was transferred to 10 ml volumetric flask, diluted to the volume with methanol at room temperature and mixed well until dissolved. Chromatographic working standard solution ranging from 0.0 to 0.1 µg/ml was prepared weekly by pipetting different volumes into separate 10 ml volumetric flasks. Six ml of daily prepared methanolic oxalic acid (1.26 g of oxalic acid dehydrate in one liter of methanol) was added to each flask and completed to the volume with ultra-pure deionized water of 15 MΩ.cm resistivity at room temperature and mixed well until dissolved.

Areas under the peak (uV.sec) versus concentrations (μg) were plotted and fit by simple linear regression to obtain an equation for the standard curve. The amount of tetracycline in each sample was thus calculated based on the slope of the standard curve.

Sample preparation

Three 5 g of whole egg samples were used. Sample was transferred into polypropylene centrifuge tube, 20 ml of McIlvaine buffer-EDTA solution was added and then blended for 30 second with homogenizer. The homogenizer was rinsed twice with 2 ml of McIlvaine buffer-EDTA solution into centrifuge tube. Centrifuge tubes were capped, shaken for 10 min on flat-bed shaker at high speed and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The clear supernatant was collected into second centrifuge tube. Twenty ml of McIlvaine buffer-EDTA solution (1.625 liter of McIlvaine buffer (28.4 g of anhydrous disodium hydrogen phosphate/L of ultra-pure deionized water + 21.0 g of citric acid monohydrate and adjusted to pH 4.0) +60.5 g of EDTA) was added to the first centrifuge tube, capped, and resuspended tissue plug using vortex mixer. The suspension was shaken as above, centrifuged for 10 min at 5000 rpm, and then supernatant was added to the second tube. Tissue plug in the first tube was resuspended in 10 ml McIlvaine buffer-EDTA solution and supernatant was separated as mentioned above. Supernatant from the three extractions were centrifuged for 20 min at 5000 rpm. Supernatants were filtered into side arm flask under vacuum through Whatman No. 2 filter paper prewetted with McIlvaine buffer-EDTA solution in Büchner funnel.

Extraction of tetracycline residues by solid phase extraction (SPE)

Filtrates were subjected to SPE (BAKERBOND speTM, C18, 500 mg per column, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA) fitted on Baker spe-12G Column Processor designed vacuum manifold capable of processing up to 12 solid phase extraction columns. Each cartridge was conditioned with 20 ml of methanol followed by 20 ml of ultra-pure deionized water of 15 M Ω .cm resistivity and slowly aspirated. Test extract were loaded to SPE cartridge and vacuumed at rate of 5 ml/min. Subsequently, the elution took place with 6 ml of methanolic acid into 10 ml volumetric flasks, then vacuumed was increased to the maximum at the end of elution step to remove residual solvents from cartridge followed by diluting the elute to 10 ml with ultra-pure deionized water and after agitation by vortex were analyzed by HPLC. The final eluate was filtered through a 0.45 μm membrane filters Millipore and stirred in vortex before injecting into the chromatograph. An aliquot of 20 μl was injected.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis

Extracts were chromatographed on a Perkin Elmer HPLC system model 200 equipped with a degasser, quaternary LC pump model 2000Q/410, 20 μl loop, Spheri-5 RP-18 column (15 cm x 4.6 mm i.d., 5 μm , Perkin Elmer), oven column, a LC200 UV detector. The Turbochrom Workstation Software package was used for instrument control, data acquisition, and data analysis. The column temperature was kept at 25 °C. tetracycline was eluted using an isocratic gradient of 60:40 v/v MeOH: H₂O. Tetracycline was detected at wavelength (λ) of 355 nm with flow rate of 1.0 ml/min.

Statistical Analysis

The data were calculated as mean \pm S.D and analyzed using analysis of variance technique (ANOVA). Probability of 0.05 or less was considered significant. All statistical analysis was done with SAS program (1996) on a personal computer.

Results and Discussion

Calibration Linearity

The HPLC response was linear ($r^2 = 0.978$) for tetracycline in the range of 0.0 to 0.1 $\mu\text{g/ml}$ with correlation coefficient (r) equals to 0.989. The retention time for tetracycline was found to be 1.34 min under the described method (Table 1 and Figure 1).

Table (1). Optimum conditions, Calibration curve and Relative standard deviation corresponding to tetracycline analyzed

MeOH: H ₂ O ratio (V/V)	Flow rate (ml/min)	Wavelength (λ)	Correlation coefficient (r)	Response (r^2)
60: 40	1.0	355 nm	0.989	0.978

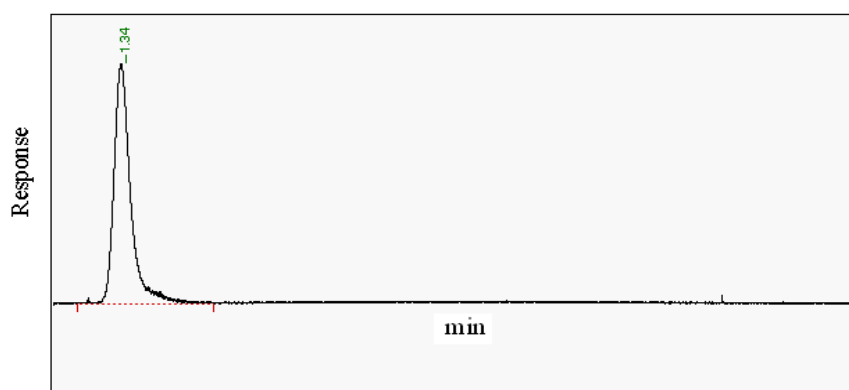


Figure (1). Tetracycline Chromatogram. Chromatographic conditions: mobile phase, MeOH: H₂O (60:40); flow rate, 1.0 ml/min; column, Spheri-5 RP-18 column (15 cm x 4.6 mm i.d., 5 μm , Perkin Elmer); UV detector, 355 nm wavelength.

Monitoring of OTC residues in egg.

Data in Table (2), illustrate the levels of tetracycline in egg samples collected from different areas of Al-Qassim region during January 2006. It was found that, samples collected from Buraydah had levels ranged from 0.02 to 0.3 $\mu\text{g/g}$ with mean of 0.145 $\mu\text{g/g}$. Seven of 10 were found to contain tetracycline with 3 samples violated the MRL. On the other hand, egg samples collected from Oneizah and Al-Shimasia were found to contain non-detected levels of oxytetracycline. Also samples collected from Al-Muznab contained levels of tetracycline with 5 samples violated the MRLs. In case of samples collected from Eion Al-Gawa, 8/10 of samples contained levels of tetracycline ranged from 0.16 to 0.35 $\mu\text{g/g}$ and contained tetracycline with 7 samples exceeded the MRL.

Table (2). Levels of oxytetracycline (ppm) in egg samples collected from different region of Al-Qassim during January 2006 using HPLC

Buraydah			Oneizah			Al-Moznab			Al-Shimasia			Eion Al-Gawa		
mean	-VE	%-VE	Mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE
0.21			ND			0.19			ND			0.31		
0.30			ND			0.32			ND			0.28		
0.09			ND			0.26			ND			0.29		
0.02			ND			0.05			ND			0.33		
0.1			ND			0.40			ND			0.21		
0.1			ND			0.23			ND			0.16		
0.2			ND			0.22			ND			0.33		
ND			ND			ND			ND			0.35		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND	3	30%	ND	10	100%	ND	3	30%	ND	1	100%	ND	2	20%
									0					
0.145						0.238						0.282		
±0.035 ^a						±0.412 ^b						±0.023 ^c		

Maximum residue limit (MRL) is 0.20 µg/g, Values have the same litter are not significantly different from each other at $p < 0.005$.

The levels of oxytetracycline in egg samples collected in April 2006 from different locations of Al-Qassim region are illustrated in Table (3). The results illustrate that 5/10 of the tested samples collected from Buraydah contained tetracycline with one sample violated the MRL. Also, the levels ranged from 0.07 to 0.28 µg/g with mean value of 0.162 µg/g. In case of samples collected from Oneizah only two samples contained tetracycline with one of them violated the MRL. The mean value was 0.16µg/g, while the levels ranged from 0.09 to 0.23. Also data illustrate that only two of the samples collected from Al-Muznab of which one sample violated the MRL. The levels ranged from 0.1 to 0.22 µg/g with mean value of 0.16µg/g. In case of samples collected from Al-Shimasia the levels ranged from 0.05 to 0.25 µg/g with mean value of 0.18 µg/g. Also 5/10 of the tested samples contained tetracycline with 2 samples exceeded the MRL. In case of samples collected from Eion Al-Gawa the levels ranged from 0.09 to 0.35 µg/g with mean value of 0.188 µg/g. Also one samples exceeded the MRL.

Table (3). Levels of tetracycline(ppm) in egg samples collected from different region of Al-Qassim during April 2006 using HPLC

Buraydah			Oneizah			Al-Moznab			Al-Shimasia			Eion Al-Gawa		
mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE
0.17			0.09			0.1			0.25			0.19		
0.07			0.23			0.22			0.25			0.11		
0.20			ND			ND			0.17			0.35		
0.28			ND			ND			0.05			0.20		
ND			ND			ND			ND			0.09		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND	6	60%	ND	8	80%	ND	8	80%	ND	6	60%	ND	5	50%
0.162 ±0.048 ^a			0.160 ±0.07 ^a			0.160 ±0.06 ^a			0.180 ±0.047 ^a			0.188 ±0.045 ^a		

Maximum residue limit (MRL) is 0.20 µg/g, Values have the same litter are not significantly different from each other at p<0.005.

Data in Table (4) show that 5 out of 10 of the samples collected from Buraydah contained detected amount of tetracycline with 3 samples violated the MRL, while the levels ranged from 0.07 to 0.28 µg/g with mean value of 0.166 µg/g. Three of the samples collected from Oneizah were found to contain tetracycline and the levels ranged from 0.13 to 0.21 µg/g with mean value of 0.183 µg/g and 2 samples exceeded the MRL. In case of samples collected from Oneizah seven samples contained tetracycline with four of them violated the MRL. The mean value was 0.238µg/g, while the levels ranged from 0.05 to 0.32 µg/g. In case of Al-Shimasia, 2 samples were positive for the presence of tetracycline. The levels of oxytetracycline ranged from 0.05 to 0.12 µg/g with non-violated samples. In case of samples collected from Eion Al-Gawa levels of oxytetracycline ranged from 0.13to 0.21 µg/g with mean value of 0.63 µg/g. The numbers of positive samples were three, one of each exceeded the MRL. The percent of negative in Buraydah, Oneizah, Al-Moznab, Al-Shmasia and Eion Al-Gawa are 50%, 70%, 30%, 80% and 30%.

Table (4). Levels of tetracycline(ppm) in egg samples collected from different region of Al-Qassim during July 2006 using HPLC

Buraydah			Oneizah			Al-Moznab			Al-Shimasia			Eion Al-Gawa		
mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE
0.28			0.21			0.19			0.05			0.21		
0.26			0.13			0.32			0.12			0.13		
0.10			0.21			0.26			ND			0.15		
0.07			ND			0.05			ND			ND		
0.12			ND			0.40			ND			ND		
ND			ND			0.23			ND			ND		
ND			ND			0.22			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND	5	50%	ND	7	70%	ND	7	70%	ND	8	80%	ND	7	70%
0.166			0.183			0.238			0.085			0.63		
±0.043			±0.026			±0.041			±0.035			±0.024		

Maximum residue limit (MRL) is 0.20 µg/g, Values have the same litter are not significantly different from each other at $p < 0.005$.

The results of samples collected during October 2006 from different areas of Al-Qassim region and analyzed for monitoring oxytetracycline are found in Table (5). Samples collected from buraydah contained levels of tetracycline ranged from 0.07 to 0.2 µg/g with mean value of 0.19 µg/g. six samples were free of tetracycline while only tow sample exceeded the MRL. In case of samples collected from Oneizah, the levels ranged from 0.11 to 0.31 µg/g with meam value of 0.215 µg/g. The numbers of detected samples were four, with two violated samples. Out of 10 samples collected from Al-Muznab, seven samples contained tetracycline in the range of 0.05 to 0.4 µg/g with mean value of 0.238 µg/g and five samples exceeded the MRL. In case of samples collected from Al-Shimasia, the levels ranged from 0.08 to 0.35 µg/g with meam value of 0.206 µg/g. The numbers of positive samples were five, with three violated samples. Also, the data show that 7/10 of the tested samples collected from Eion Al-Gawa contained tetracycline with meam value of 0.195 µg/g and ranged from 0.09 to 0.33 µg/g (Table 6). The number of samples that exceeded the MRL were four. The percent of negative in Buraydah, Oneizah, Al-Moznab, Al-Shmasia and Eion Al-Gawa are 60%-60%-30%-50% and 30% respectively .

Table (5). Levels of tetracycline(ppm) in egg samples collected from different region of Al-Qassim during October 2006 using HPLC

Buraydah			Oneizah			Al-Moznab			Al-Shimasia			Eion Al-Gawa		
mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE	mean	-VE	%-VE
0.20			0.15			0.19			0.35			0.24		
0.20			0.11			0.32			0.08			0.26		
0.17			0.29			0.26			0.26			0.15		
0.19			0.31			0.05			0.23			0.09		
ND			ND			0.40			0.11			0.33		
ND			ND			0.23			ND			0.20		
ND			ND			0.22			ND			0.1		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND			ND			ND			ND			ND		
ND	6	60%	ND	6	60%	ND	3	30%	ND	5	50%	ND	3	30%
0.19 ±0.007			0.215 ±0.049			0.238 ±0.044			0.206 ±0.049			0.195 ±0.033		

Maximum residue limit (MRL) is 0.20 µg/g, Values have the same litter are not significantly different from each other at $p < 0.005$

The most likely cause of violative drug residues is the failure to observe withdrawal times (Paige and Kent, 1987). Improper maintenance of treatment records or failure to identify treated animals adequately may lead to their omission (Sundlof, 1989). Fecal recycling, where the drug excreted in feces of treated animals contaminates the feed of untreated animals, can be the cause of residues of certain antimicrobial groups (Bevill, 1984). Violative drug residues can also occur as a result of improper use of a licensed product or through the illegal use of an unlicensed substance. Extra-label dosages and use of drugs which have not been approved for the species in question may lead to violative residues (Higgins *et al.*, 1999). The disease status of an animal and the way in which drugs are administered influence the potential for residues. Disease may affect the pharmacokinetics of the drugs, metabolism, or the presence of infection and/or inflammation may cause the drug to accumulate in affected tissues (Kaneene and Miller, 1997). Subcutaneous and intramuscular administrations increase the potential for residues at the injection sites (Kaneene and Miller, 1997). Contamination of animal feeding stuffs with a variety of compounds also occurs. The significance of this contamination depends on the pharmacodynamics of the compound and the species affected (McEvoy, 2002). Indeed, contamination of feeding stuffs seems to be an important source of unintended application of antimicrobials. Therefore, maximum residue limits (MRLs) must be established for all pharmacologically active substances for the concerned animal species and relevant tissues or products. These MRLs are the basis for the determination of limits of detection (LODs) of various analytical methods used in residue surveillance (EC, 2001). The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives and Contaminants (JECFA), at its 50th Meeting, 1998, established

an acceptable daily intake (ADI) of 0–0.03 mg/kg body weight for the tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline) alone or in combination (WHO, 1998).

Antibiotics are used by poultry industry and poultry veterinarians to enhance growth and feed efficiency and reduce diseases by enhancing the health and well-being of poultry and allow consumers to purchase at a reasonable cost, high quality meat and eggs. Although these uses benefits, unfortunately, consumers perceptions are that edible poultry tissues are contaminated with harmful concentrations of drug residues.

Because table eggs are consumed worldwide in various dishes and are considered very nutritious and a cheap source of protein, therefore, the presence of enteric pathogens table eggs and their contents can cause spoilage and enter the food chain through table eggs causing infection in consumers.

Tetracyclines are approved for treating hens with a maximum limit of 200 µg/kg for OTC, tetracycline and chlorotetracycline. Because of common use, residual CTC may occur in egg tables if the adequate withdrawal time has not been observed. Therefore, egg table may be a potential hazard for consumers. To protect consumers' health, legislation on veterinary drug should be settled. Unfortunately, some OCT is extensively used in Al-Qassim region to treat hen against bacteria infection. They are ultimately transported into human body by consumption and induce allergic reactions, teratogenicity, hypoplasia, and etc.

In the present investigation, HPLC analysis showed that geographical and seasonal differences in OTC levels. The number of positive samples found in all regions during October 2006 were higher ($n= 27$) than that collected during January ($n= 21$), July ($n= 19$) and April ($n= 17$). Moreover, the percentages of total occurrence of the positive samples collected from Eion Al-Gawa (57.5) was higher than that in Al-Moznab (55), Burayda (47.5), Al-Shamasia (27.5) and Oneiza (22.5). The corresponding total violated samples were 3.25, 4.25, 0.28, 2.75 and 1.25, respectively.

The results of present investigation indicate that there is widespread misuse of tetracycline by egg layer chicken farms in Al-Qassim region reflecting a general lack of compliance with the recommended practices regarding the use of antimicrobial agents. These malpractice may include overuse of the drugs, multiple use of drugs belong to the same pharmacological group and lack of implementation of recommended withdrawal times. This may be contributing to the high resistance rates to tetracyclines in both chicken and human microbial isolates observed in the region. Because of the danger of developing hypersensitivity or alteration of normal flora resulting from eating antibiotic-fed poultry, it would seem advisable to make sure that eggs should receive proper and adequate heat treatment. It has therefore been suggested that laid eggs should be removed from the nests as soon as. Also, there is a need to educate the population on good sanitary practices in handling eggs and consumption of only properly cooked eggs or egg products.

This study, therefore, stresses the need for strict regulations for the use of antimicrobial drugs in the poultry industry as well as the inspection of egg table for drug residues prior to marketing.

References

- Adesiyun A, Offiah N, Lashley V, Seepersadsingh N, Rodrigo S, Georges K.** 2005. Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad. *J Food Prot.* 2005 Jul; 68(7):1501-5.
- AOAC,** 2000: Metals and other elements at trace levels in foods. 16th Ed., published by the Association of Official Analytical Chemists P.O.Box 540, Benjamin Franklin station, Washington, DC 20044. PP 1-46. Assoc. 210(9): 1288-9.
- Bevill, R. F.** 1984. Factors influencing the occurrence of drug residues in animal tissues after the use of antimicrobial agents in animal feeds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 1124-1126.
- Boatto, G., Pau, A., Palomba, M., Arenare, L., & Cerri, R.** (1999). Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 321–326, 1999.
- Boisseau, J.** 1993. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. *Vet. Microbiol.* 35, 187-192.
- Dewdney, J. M., Maes, L., Raynaud, J. P., Blanc, F., Scheid, J. P., Jackson, T., Lens, S. and Verschuere, C.** 1991. Risk assessment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem. Toxic.* 29, 477-483.
- EC.** 2001. European Community. Notice to applicants and note for guidance. Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Volume 8.
- Ezenduka, Ekene; Oboegbulem, Steve; Nwanta, John; Onunkwo, Joseph.** 2011. Prevalence of antimicrobial residues in raw table eggs from farms and retail outlets in Enugu State, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, Volume 43, Number 3.
- Furusawa N.** 1999. Spiramycin, oxytetracycline and sulphamonomethoxine contents of eggs and egg-forming tissues of laying hens. *J. Vet. Med. A.* 46(10), 599-603.
- Gideon, K., & Martin, S. C.** (1997). Special aspects of perinatal & pediatric pharmacology. In B. G. Katzung (Ed.), *Basic & clinical pharmacology* (6th ed., pp. 920–928). Norwalk, CT, USA: Appleton & Lange.
- Gorbach, S. L.** 1993. Perturbation of intestinal microflora. *Vet. Human Toxicol.* 35, 15-23.
- Hernández, M., Borrul, F., & Callul, M.** (2003). Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 416–427.
- Higgins, H. C., McEvoy, J. D. G., Lynas, L. and Fagan, N. P.** 1999. Evaluation of a single plate microbiological growth inhibition assay as a screening test for the presence of antimicrobial agents in compound animal feedingstuffs at

- therapeutic and contaminating concentrations. *Food Addit. Contam.* 16, 543-554.
- Johnston, A.** 1998. Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *Br. Med. J.* 317, 665-667.
- Kaneene, J. B. and Miller, R.** 1997. Problems associated with drug residues in beef from feeds and therapy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16, 694-708.
- Katz, J.M. and Katz, S.E.** 1984. Rapid assay for tetracycline in premixes and mixed feeds. *J Assoc Off Anal Chem.* 67(3):576-579.
- Katz, S.E., Fassbender, C.A. and Dowling Jr., J.J.** 1973. Oxytetracycline residues in tissue, organs, and eggs of poultry fed supplemented rations. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 56(1), 77-81.
- Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, M. S., Short, C. R., & Barker, S. A.** (1990). Matrix solid-phase dispersion (mspd) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline and tetracycline and chlortetracycline in milk. *Journal – Association of Analytical Chemistry*, 73, 379–384.
- McEvoy, J. D. G., Crooks, S. R. H., Elliott, C. T., McCaughey, W. J. and Kennedy, D. G.** 1994. Origin of chlortetracycline in pig tissue. *Analyst* 119, 2603-2606.
- Mitchell, J.M., Griffiths, M.W., Mcewen, S.A., McNab, W.B. and Yee, A.J.** 1998: Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.* 61(6):742-756.
- Mitscher, L. A.** (1978). The chemistry of the tetracycline antibiotics. Medical research series (Vol. 9). New York: Marcel Dekker.
- Omija, B., Mitema, E.S. and Maitho, T.E.** 1994. Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens (1994) *Food Additives and Contaminants*, 11 (6), 641-647.
- Paige, J. C. and Kent, R.** 1987. Tissue residue briefs. *FDA Vet.* 11, 10- 11.
- Paige, J. C., Tollefson, L. and Miller, M.** 1997. Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet. Human Toxicol.* 39, 162-169.
- Roudaut, B., Moretain, J.P. and Boisseau, J.** 1987. Excretion of oxytetracycline in eggs after medication of laying hens. *Food Additives and Contaminants*, 4(3), 297-307.
- Roudaut, B., Moretain, J.P. and Boisseau, J.** 1987. Excretion of oxytetracycline in eggs after medication of laying hens. *Food Addit Contam.* 4(3):297-307.
- Rudzki, E., & Rebandel, P.** (1997). Sensitivity to oxytetracycline. *Contact Dermatitis*, 37, 136–139.
- SAS** 1996: SAS/STAT user's guide. 6.08 Edition under windows 1995, SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Smith, H.W.** 1974. Veterinary and food aspects of drug resistance. *J. Sci. Food Agric.* 25, 227-237.
- Stauffer, U. G.** (1967). Tooth changes caused by tetracycline in the fetus, infant and child. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 97, 291–293.
- Sundlof, S. F.** 1989. Drug and chemical residues in livestock. *Clin. Toxicol.* 5, 411-449.

- Sundlof, S. F., Fernandez, A. H. and Paige, J. C.** 2000. Antimicrobial drug residues in food-producing animals. In: Prescott, J. F., Baggot, J. D. and Walker, R. D. (eds.) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3rd ed. Ames, Iowa, USA, pp. 744-759.
- Thaker, M.; Peter Spanogiannopoulos and Gerard D.** 2010. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, Volume 67, Number 3, Pages 419-431.
- WrightTollefson, L. and Miller, M. A.** 2000. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. *J. AOAC. Int.* 83, 245-256.
- Waltner-Toews, D. and McEwen, S.** 1994. Residues of antibacterial and antiparasitic drugs in food of animal origin: a risk assessment. *Prev. Vet. Med.* 20, 219-234.
- WHO** (1998). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO food additives series no. 41 [internet]. <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je07.htm>> Accessed 08.01.07.
- WHO.** 1991. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: Monograph prepared by the thirty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 815. WHO, Geneva.
- Woodward, K. N.** 1998. The use of microbiological end-points in the safety evaluation and elaboration of maximum residue limits for veterinary drugs intended for use in food producing animals. *Vet. Pharmacol. Ther.* 21, 47-53.
- Yamada, Y., Sasaki, J., Matsuzaki, T. and Shiiki, K.** 1981. Influence of medium and diluent pH and diffusion time on antibiotic bioassay. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 6, 23-33.
- Yoshimura, H., Osawa, N., Rasa, F.S.C., Hermawati, D., Werdiningsih, S., Isriyanthi, N.M.R. and Sugimori, T.** 1991. Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens) *Food Additives and Contaminants*, 8 (1), 65-69.

رصد مخلفات التتراسيكلين في بيض المائدة التي جمعت من منطقة القصيم ، السعودية

ناصر أ. الوابل

قسم الطب البيطري ، كلية الزراعة والطب البيطري ، جامعة القصيم ،
بريدة ٥١٤٥٢ ، ص ب ٦٦٢٢ ، المملكة العربية السعودية

(وصول في ٢٠١١/٤/١٥ ، قبلت للنشر في ٢٠١١/٦/٢٣)

ملخص البحث . قد صممت هذه الدراسة لرصد بقايا التتراسيكلين في بيض المائدة التي تم جمعها من مختلف المناطق في منطقة القصيم خلال الفترة من يناير ٢٠٠٦ إلى أكتوبر ٢٠٠٦. لقد تم استخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء و الأشعة فوق البنفسجية للكشف علي المخلفات ومقارنتها مع الحدود القصوى المقبولة دوليا (الحدود القصوى) ، والتنفيذ السليم لتقييم أوقات الانسحاب السليم. وأظهر التحليل بواسطة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) إن مستوى تركيز مخلفات التتراسيكلين في البيض يختلف من منطقة جغرافية إلي أخرى وأيضا يتأثر بموسم الجمع . وأظهرت الدراسة أن العينات الإيجابية موجودة في جميع المناطق. وأعلى عدد عينات موجبة تم الحصول عليها كانت في شهر أكتوبر عام ٢٠٠٦ (ن = ٢٧) تليها تلك التي تم جمعها خلال شهر يناير (ن = ٢١) ، يوليو ، (ن = ١٩) وأبريل (ن = ١٧). وعلاوة على ذلك ، كانت النسبة المؤية الإجمالية للعينات الموجبة التي تم جمعها من عيون الجوز (57.5) أعلى من تلك التي جمعت في مدينة المذنب (55) وبريدة (٤٧.٥) ، الشماشية (27.5) وعنيزة (22.5) وكانت عدد العينات التي تزيد عن الحدود القصوى تساوي ١٤ ، ١٢ ، ٨ ، ٥ و ٥ ، على التوالي. نتائج التحقيق الحالية تشير إلى أن هناك إساءة استخدام على نطاق واسع للتتراسيكلين في مزارع الدجاج البياض في منطقة القصيم وهذا يعكس عدم الامتثال للموجهات العامة للممارسات لموصى بها بشأن استخدام العوامل المضادة للميكروبات. وأشارت هذه النتائج إلى التوصيات التالية : ضرورة وجود برنامج لرصد بقايا التتراسيكلين في بيض المائدة في منطقة القصيم على الصعيد الوطني لحماية صحة المستهلكين.

الكلمات المفتاحية : بقايا التتراسيكلين ، بيض المائدة ، القصيم ، فترة الانسحاب.

Accelerated Neutrophil Apoptosis in Cows Affected with Acute Mastitis

M. Tharwat

Department of Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Egypt. Present address: Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Qassim University, Buraydah, Qassim, Saudi Arabia. Email address: mohamedtharwat129@gmail.com

(Received 15/1/2011, accepted for publication on 1/6/2011)

Abstract. The objective of the present study was to investigate the apoptotic process in the polymorphonuclear neutrophils leukocytes (PMN) in cows with acute mastitis. Sixteen cows affected with *Staph. aureus* and *E. coli* acute mastitis were used for this purpose and results were compared with six healthy controls. Animals were referred because of anorexia, swelling and gangrene of the mammary gland, abnormal milk secretion and recumbency. Apoptosis of PMN was assessed using the Comet assay. Compared to control cows, PMN in diseased animals showed an accelerated rate of DNA damage. Undamaged DNA remained within the core; however broken DNA migrated from the core towards the anode, forming a tail of a comet. In undamaged cells, the DNA was tightly compressed and maintained the circular disposition of the normal nucleus. To the best of the author knowledge, this is the first study to document accelerated apoptosis of blood PMN in cows infected with acute *Staph. aureus* and *E. coli* mastitis using the Comet assay.

Keywords: apoptosis, cattle, comet assay, mastitis, neutrophils

Introduction

Acute bovine mastitis involves an initial phase, which includes an inflammatory reaction, and a resolution phase. Initiation of the inflammatory reaction is caused by the production and release of chemoattractants by macrophages and epithelial cells for the rapid recruitment of neutrophils in order to eliminate invading bacteria. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PMN) form the first line of immunological defence of the bovine mammary gland against Gram-positive and Gram-negative pathogens (Paape *et al.*, 2003). Neutrophils rapidly accumulate on the site of infection, and there is a concomitant potential to cause severe tissue destruction should they undergo necrotic lysis and release cytotoxic granule contents into mammary gland tissues (Capuco *et al.*, 1986). Therefore, it follows that timely and vigilant execution of a controlled programmed cell death in neutrophils is important in order to prevent damage to healthy tissues, and is necessary for resolution of infection (Kobayashi *et al.*, 2003). Previous elimination of bacterial pathogens, extravasated inflammatory cells (neutrophils) and their contents from tissue are necessary for resolution of acute infection. Therefore, mammary gland neutrophils undergo apoptosis and they are phagocytosed by macrophages (Sladek and Rysanek 2000 and 2001).

The life span of PMN migrating in tissues is only 1 to 2 days; thereafter, they undergo either apoptosis (Raff 1992), or necrosis as an alternative form of cell death (Hurley 1983). Apoptosis of PMN is a non-pathologic mode of cell death characterized by unique morphological and biochemical features. Apoptosis is marked by cellular shrinking, condensation and margination of the chromatin, roughing of the plasma membrane, and translocation of phosphatidylserine on the cell membrane (Van Cruchten and Van Den Broeck 2002). Apoptosis of PMN is accompanied by the loss of a number of fundamental functions: a reduced capability to respond to stimulation, a reduced intensity of phagocytosis (ranging to a total inability to phagocytise), and a lowered degree of degranulation and respiratory burst (Whyte *et al.*, 1993). Therefore, these fundamental functions are critical for the maintenance of host defenses and in reaction to an insult by infectious agents. Under these circumstances, the immune system of the mammary gland may be weakened in its fight against infection and a transition into chronicity may occur.

Single-cell gel electrophoresis (Comet assay) is a sensitive method for measuring DNA strand breaks (Endoh *et al.*, 2002). The clear advantage of comet assay over other techniques that measure DNA strand breaks is its ability to measure heterogeneity within complex populations. In the comet assay a damaged cell takes on the appearance of a comet, with head and tail regions. A variety of geometric and densitometric parameters are provided by the image analysis software, which allows an estimation of the amount of DNA in the head and tail regions and the extent of migration into the tail region. Because the tail length and density reflect the number of single-strand breaks in the DNA, the percentage of DNA in the tail provides a quantitative measure of the damaged DNA. A variety of modified comet assays using several parameters have been developed to evaluate the extent of DNA strand breaks. The alkaline version of comet assay (Tice *et al.*, 2000) primarily detects

single-strand breaks of DNA. The effect of mastitis on PMN apoptosis has only been studied in models of acute reversible bovine mammary gland injury caused by phosphate buffered saline and in experimentally induced mastitis. Therefore, the present study was aimed to evaluate apoptosis of PMN in cows during naturally occurring *Staph. aureus* and *E. coli* acute mastitis using the Comet assay.

Materials and Methods

Animals, history and physical examination

Sixteen Holstein cows (6 - 8 years old), weighed 500-680 kg were used in the present study. Animals were referred because of anorexia, swelling and gangrene of the mammary gland, abnormal milk secretion and recumbency. According to the owners, duration of illness ranged from 6 to 24 hr after parturition. Animals were treated with parenteral and intramammary antibacterial therapy, corticosteroids, and systemic fluid therapy. All animals underwent a thorough physical examination (Radostits *et al.*, 2000), which included general behavior and condition, auscultation of the heart, lungs, rumen and intestine, measurement of heart rate, respiratory rate and rectal temperature, swinging auscultation, percussion auscultation of both sides of the abdomen and rectal examination. After milk culture *Staph. aureus* was identified in 10 and *E. coli* in 6 cows. Sex healthy cows were enrolled in this study as controls.

Isolation and preparation of polymorphonuclear neutrophils leukocytes

Polymorphonuclear neutrophils leukocytes were isolated from heparinized blood by Ficoll-Conray solution (specific gravity 1.078), followed by hypotonic red blood cell lysis, as previously described (Nagahata *et al.*, 1994; Higuchi and Nagahata 2000, Mohamed and Oikawa 2010). Neutrophils were represented in Hanks' balanced salt solution (HBSS, containing Ca^{2+} and Mg^{2+} ; Nissui pharmaceutical company, Japan) to a concentration of 5×10^6 cells/ml. The resulting cell population comprised > 95% neutrophils, as determined by Wright-Giemsa staining, and > 99% of the cells were viable when assessed by trypan blue dye exclusion.

Evaluation of Apoptosis

Apoptosis of PBMC and PMN in the blood of BLV infected cows was evaluated based on the determination of single cell gel electrophoresis (Comet assay). Under alkaline conditions, the Comet assay of isolated PBMC and PMN was performed (Endoh *et al.*, 2002; Mohamed and Oikawa 2010). Briefly, the isolated PBMC and PMN were embedded in 1% low-melting point agarose (Life Technologies Co., Ltd., Japan) and deposited on top of a 1% agarose base layer (Nakarai Techs Co., Ltd., Osaka, Japan) on fully frosted slides (Matsunami Glass Indust. Ltd., Tokyo, Japan). Two slides per animal were made, one for PBMC and the other for PMN. After solidification of the top layer of agarose, the slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Na-sarcosinate, 10% dimethyl sulphoxide and 1% Triton X-100, PH 10.0) for one hour at 4°C in a dark room. After lysis, cell membrane and cytosol were lysed and isolated nuclei were remained in the agarose. The slides were incubated in an electrophoretic buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA) for 30 min. Electrophoresis was

carried out at 25 V and approximately 400 mA for 25 min at room temperature. The slides were neutralized in 0.4 M Tris-HCl solution (pH 7.5) for 20 min, stained with propidium iodide (PI), and then photographed under a fluorescent microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Images were captured with a Sony CCD camera and saved using Image Pro Plus software. Image analyzer software (Rio Grand Software) was used to quantify the different parameters of the images. Generally, 100 images were analyzed per slide. Migration length of nuclei and total length inclusive of nucleus and tail were determined, and then tail length was determined for each cell. DNA strand breaks measured by this assay are expressed as the "tail momentum" which is the product of the fraction of DNA that has exited the nucleus multiplied by the distance migrated.

Statistical analysis

Data were analyzed, using one-way analysis of variance (ANOVA). Values are expressed as mean \pm SD.

Results

In comet assay, undamaged DNA remains within the core, however the broken DNA migrates from the core toward the anode, forming a tail of a comet. In undamaged cells, the DNA was tightly compressed and maintained the circular disposition of the normal nucleus (Figure 1). The increase in DNA damage was mostly evidenced by an increase of comet moment. When cells processed for the comet assay were examined by fluorescence microscopy, fluorescent structures corresponding to the PI-stained nuclear DNA of the PMN cells (Figure 2). Figure 3 shows DNA damage in PMN measured by the Comet assay, compared to control neutrophils (0.52 ± 0.27 vs 0.32 ± 0.21).

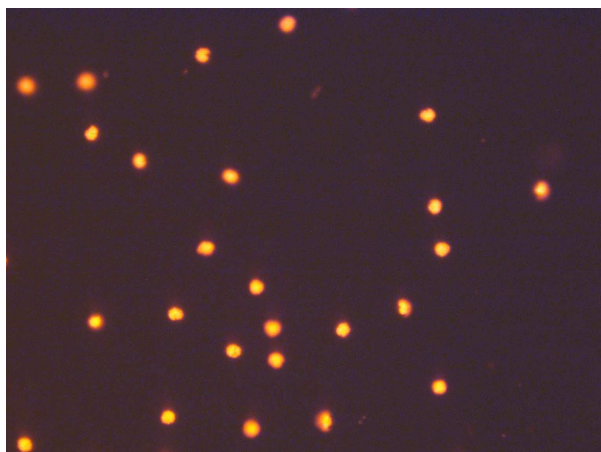


Figure (1). Undamaged DNA of neutrophils in a clinically healthy cows measured by the Comet assay where DNA remains within the core. The DNA is tightly compressed and maintained the circular disposition of the normal nucleus.

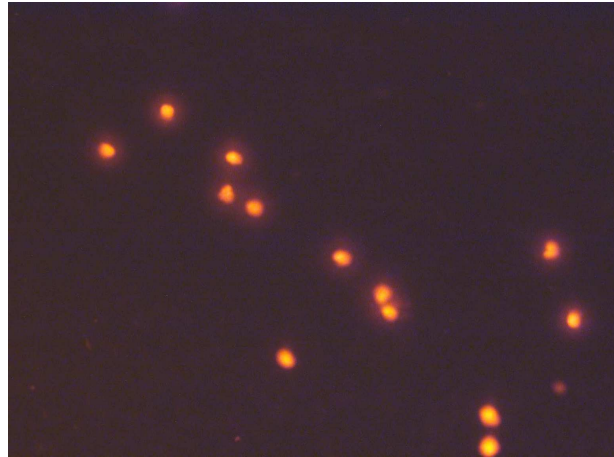


Figure (2). DNA damage in neutrophils in a cow with acute clinical mastitis measured by the Comet assay. Increase in DNA damage is mostly evidenced by an increase of comet moment. When processed cells were examined by fluorescence microscopy, fluorescent structures corresponding to the PI-stained nuclear DNA of the PMN cells.

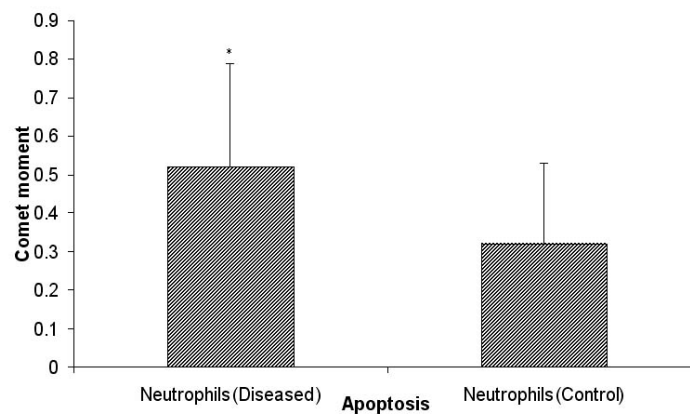


Figure (3). DNA damage in neutrophils of cows affected with acute clinical mastitis ($n=16$) measured by the Comet assay compared to healthy cows ($n=6$).

Discussion

Apoptosis is an active process involving gene transcription and protein synthesis, which trigger a sequence of events resulting in typical morphological and biochemical changes including nuclear chromatin condensation, cell shrinking, blebbing of the cytoplasmic membrane, break-up of DNA into 180- to 200-base fragments, and the final cell fragmentation into apoptotic bodies (Wyllie *et al.*,

1984). Apoptosis of PMN differs from necrosis. Necrosis of PMN is induced if the cells are affected by apoptosis-blocking signals. It results in a release of the histotoxic content of granules and subsequent damage to the surrounding tissue (Weiss 1989). Necrotic PMN are not quickly removed by macrophages. The role of apoptosis in the fate of PMN in vivo has been described in human (Savill 1992) and in laboratory animals (Yamamoto *et al.*, 1993). During PMN apoptosis, the organelles and the cytoplasmic membrane remain intact and the histotoxic content of granules is not released into the extracellular compartment. Moreover, apoptotic PMN are promptly removed by the macrophages before they can support the development of cellular damage (Savill *et al.*, 1989).

There is compelling evidence that PMN apoptosis plays a key role in resolution of the inflammatory response in both humans (Savill *et al.*, 1989) and cows (Sladek Z., Rysanek 2001). The end result of apoptosis is fragmentation of PMN into small membrane bound bodies that are quickly cleared by phagocytotic cells (Reed 2000; Sladek and Rysanek 2000). The main functions of PMN are to engulf pathogens and destroy them. At the same time, PMN can potentially harm the mammary gland. Neutrophils may promote tissue injury and disturb mammary function, via reactive oxygen metabolite generation and granular enzyme release (Paape *et al.*, 2002). There is increasing evidence that pathogens use various mechanisms to impinge upon cell death pathways. These virulence factors induce cell death by a variety of mechanisms, which include 1) pore-forming toxins, which interact with the host cell membrane and permit the leakage of cellular components; 2) toxins that express their enzymatic activity in the host cytosol; 3) effector proteins delivered directly into host cells by a highly specialized type-III secretory system; 4) superantigens that target immune cells, and 5) other modulators of host cell death (Weinrauch and Zychlinsky, 1999).

Escherichia coli and *Staph. aureus* are the most important pathogens causing mastitis in dairy cows (Bradley, 2002; Radostitis *et al.*, 2007), resulting in inflammation that ranges from chronic, subacute to peracute. Necrosis of the mammary epithelium occurs during severe, naturally occurring clinical *E. coli* mastitis, as well as during severe experimental *E. coli* mastitis (Burvenich *et al.*, 1994). During experimentally induced *Staph. aureus* and *E. coli* mastitis, migration of PMN through the secretory epithelium was correlated with extensive morphological damage (Harmon and Heald, 1982; Sladek *et al.*, 2005). Direct evidence that PMN damage in mammary tissue was shown by Capuco *et al.* (1986). Neutrophils isolated from mammary glands of nulliparous heifers given an injection of *E. coli* endotoxin were incubated with mammary tissues from noninfected quarters. Microscopic examination indicated that epithelial cell damage resulted from treatment with intact, lysed, or phagocytosing PMN. The greatest morphological damage resulted from treatment with phagocytosing PMN. Activated blood PMN were cytotoxic for mammary epithelial cells (Ledbetter *et al.*, 2001), possibly via the release of extracellular reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals (Boulanger *et al.*, 2002). Oxidative stress can damage all types of

biomolecules (e.g., DNA, proteins, lipids, and carbohydrates) and therefore induce tissue injury (Haddadi *et al.*, 2005).

Apoptosis of blood leukocytes has been used previously using the flow cytometric technique (Van Oostveldt *et al.*, 2001; Van Oostveldt *et al.*, 2002a; Van Oostveldt *et al.*, 2002b; Sladek *et al.*, 2005). In this study, apoptosis PMN isolated from cows with acute mastitis was investigated and assessed by the Comet assay. The results obtained show a statistically significant difference of DNA damage between PMN isolated from cows with acute mastitis and that isolated from healthy cows ($P < 0.05$). To the best of the author knowledge, this is the first study to document accelerated apoptosis of blood PMN in cattle infected with acute *Staph. aureus* and *E. coli* mastitis using the Comet assay.

References

- Boulanger, V., Zhao, X. and Lacasse, P.** Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. *J. Dairy Sci.* 85, (2002) 562–569.
- Bradley, A. J.** Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 163, (2002) 1–13.
- Burvenich C., Paape M. J., Hill A. W., Guidry A. J., Miller R. H., Heyneman R., Kremer W. D. and Brand A.** Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving, *Vet. Q.* 16, (1994) 45–50.
- Capuco A. V., Paape M. J. and Nickerson S. C.** *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 47, (1986) 663–669.
- Endoh, D., Okui, T., Ozawa, S., Yamato, O., Kon, Y., Arikawa, J. and Hayashi, M.** Protective effect of a lignan-containing flaxseed extract against CCl₄-induced hepatic injury. *J. Vet. Med. Sci.* 64, (2002) 761–765.
- Haddadi, K., Moussaoui, F., Hebiba, I., Laurent, F. and Le Roux, Y.** *E. coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, (2005) 485–496.
- Harmon, R. J. and Heald, C. W.** Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 43, (1982) 992–998.
- Higuchi, H. and Nagahata, H.** Effects of vitamin A and E on superoxide production and intracellular signaling of neutrophils in Holstein calves. *Can. J. Vet. Res.* 64, (2000), 69–75.
- Hurley, J. V.** Termination of acute inflammation: resolution, in: Hurley J.V. (Ed.), acute inflammation, Churchill Livingstone, London, 1983, pp. 109–117.
- Kobayashi S. D., Voyich J. M. and DeLeo, F. R.** Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microb. Infect.* 5, (2003) 1337–1344.
- Ledbetter, T. K., Paape, M. J. and Douglas, L. W.** Cytotoxic effects of peroxynitrite, polymorphonuclear neutrophils, free radical scavengers,

- inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 62, (2001) 286–293.
- Mohamed, T.** and Oikawa, S. Apoptosis of blood lymphocyte and neutrophil in dairy cows during the transition period. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences.* (2010), in press.
- Nagahata, H., Kehrli, M. E. Murata, H., Okada, H. and Kociba, G. J.** Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. *Am. J. Vet. Res.* 55, (1994), 40–48.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J. and Burvenich, C.** Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, (2002), 109–121.
- Paape M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X. and Lee, J. W.** The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34 (2003) 597–627.
- Radostits, O. M., Mayhew, I. G. and Houston, D. M.** *Veterinary Clinical Examination and Diagnosis.* (2000), W.B. Saunders, London.
- Raff, M. C.** Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, (1992) 397–400.
- Reed, J. C.** Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157, (2000) 1415–1430.
- Savill, J.** Macrophage recognition of senescent neutrophils. *Clin. Sci.* 83, (1992) 649–655.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., Haslett, C.** Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages, *J. Clin. Invest.* 83, (1989) 865–875.
- Sladek, Z. and Rysanek, D.** Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary glands during induced influx. *Vet. Res.* 31, (2000), 553–563.
- Sladek, Z. and Rysanek, D.** Neutrophil apoptosis during resolution of bovine mammary gland injury. *Res. Vet. Sci.* 70, (2001), 41–46.
- Sladek, Z., Rysanek, D., Ryznarova, H. and Faldyna, M.** Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Res.* 36, (2005), 629–643.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y. Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F.** Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mole. Mutagenesis* 35, (2000), 206–221.
- Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W.** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31, (2002) 214–223.
- Van Oostveldt, K., Vangroenweghe, F., Dosogne, H. and Burvenich, C.** Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.* 32, (2001), 617–622.
- Van Oostveldt, K., Paape, M. J. and Burvenich, C.** Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 85, (2002a), 139–147.

- Van Oostveldt, K., Tomita, G. M., Paape, M. J. Capuco, A. V. and Burvenich, C.** Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 63, (2002b), 448-453.
- Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A.** The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, (1999), 155–187.
- Weiss, S. J.** Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. Med. J.* 320, (1989) 365-376.
- Whyte, M. K., Meagher, L. C., MacDermot, J. and Haslett, C.** Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 150, (1993) 5124–5134.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A.L. and Dunlop, D.** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, (1984) 67-77.
- Yamamoto, C. H., Yoshida, S. I., Taniguchi, H., Qin, M. H., Maymoto, H., and Mizuguchi, Y.** Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect. Immun.* 61, (1993) 1972-1979.

تسارع الموت المُبرمج بخلايا الدم المتعادلة في الأبقار المصابة بالتهاب حاد بالضرع

محمد ثروت عبد العال

قسم طب الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة الزقازيق، مصر. العنوان الحالي: قسم الطب البيطري، كلية الزراعة
والطب البيطري، جامعة القصيم، المملكة العربية السعودية.

ملخص البحث. حدد الهدف من هذا البحث لدراسة الموت المُبرمج لخلايا الدم المتعادلة في الأبقار المصابة بالتهاب حاد بالضرع. لهذا الغرض تم فحص ١٦ حالة مصابة بالتهاب حاد بالضرع ومقارنتها بالنتائج المُتحصل عليها من ٦ حالات ضابطة. وردت الحالات للفحص بسبب فقد الشهية، وجود تضخم أو غرغرينا بالضرع، إفرازات غير طبيعيه بالضرع والرقاد. أظهر فحص خلايا الدم المتعادلة، باستخدام طريقة الخلايا المذنبه، وجود إختلافات معنوية للموت المبرمج مقارنة بالنتائج المُتحصل عليها من المجموعه الضابطة. يعتبر هذا البحث الأول من نوعه الذي أظهرت نتائجه، باستخدام طريقة الخلايا المذنبه، تسارع الموت المُبرمج بخلايا الدم المتعادلة في الأبقار المصابة بالتهاب حاد بالضرع.

الكلمات المفتاحية: الموت المبرمج، الأبقار، طريقة الخلايا المذنبه، التهاب الضرع، الخلايا المتعادلة

Effect of Inhibin Immunization on FSH, LH and Testicular Histology of Rabbits and Mice Using Three Different Adjuvants

K. Al-Kheraije

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Qassim University,
P. O. Box 6622 Buraydah, Saudi Arabia*

(Received 6/ 2/2011, accepted for publication on 15/6/2011)

Abstract. The effect of immunization against inhibin on follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testicular histology was studied on 66 male rabbits and 33 male mice. Immunization was achieved by injection of two inhibin antigens: ovine testicular lymph protein fraction-IV (OTLP4) and steroid-free ovine follicular fluid (OFF). The inhibin antigens were given using 3 different adjuvants: Freund's complete adjuvant (FCA), Freund's incomplete adjuvant (FIA) and TiterMax adjuvant, to boost the magnitude of the immune response in the experimental animals. The histological changes in the testes were examined after inhibin immunization. Results showed that immunization with inhibin resulted in increased FSH secretion in both rabbits and mice. LH was not increased in immunized rabbits. However, LH showed significant increase in mice immunized with OFF using FCA or TiterMax adjuvants. There were also significant increases in the titre of antibody against OTLP4 and OFF in serum of rabbits when Titer-Max and FCA were used. In mice, there was significant increase in the titre of antibodies against OTLP4 when FIA was conjugated as compared to TiterMax and FCA conjugation. Inhibin immunization resulted in activation of spermatogenesis. This is reflected histologically by the presence of large numbers of spermatozoa in both the seminiferous tubules and epididymis. TiterMax and FIA produced better antibody responses than FCA in inhibin-immunized rabbits and mice.

Keywords: Inhibin, mice, rabbits, adjuvants, gonadotrophins, testis.

Introduction

Decades of research have led to the discovery and characterization of a large family of proteins, the inhibin family. The development of specific immunoassays for biologically active, dimeric forms of inhibin provided new insights into our understanding of the physiological relevance of inhibin in male reproduction (Meachem *et al.*, 2001). FSH is one of the main hormones stimulating spermatogenesis. It was documented that pituitary gonadotrophs were regulated by both steroid testosterone and non steroid inhibin (Fafoiffe *et al.*, 2004). Inhibins A and B are gonadal factors that negatively regulate both FSH synthesis by the anterior pituitary and also testicular function in rats (Okuma *et al.*, 2006). In human males, inhibin B is the primary testicular factor regulating FSH with limited effects by gonadal steroids (Makanji *et al.* 2011). An inverse correlation exists between inhibin and FSH and LH levels (Ruiz Plazas *et al.* 2010). Rat Sertoli cells secrete inhibin bidirectionally, basally into testicular interstitial fluid and apically into seminiferous tubule fluid (Maddocks and Sharpe, 1990). Development of alternative methods for Superovulation in domestic animals utilize passive (Medan *et al.* 2003a) and active (Medan *et al.* 2003b) immunizations against inhibins were used.

Adjuvants are used to enhance the ability of a vaccine to elicit strong and sustainable immune response (Spickler and Roth, 2003). With the usage of such substances or molecules, less antigen and fewer injections are needed. Compared to injection of antigen alone, injection of antigen plus an adjuvant generally permits use of a much smaller quantity of the antigen and greatly enhances the antibody titer (Guy, 2007).

Trials for immunization against inhibin have been done to improve reproduction in laboratory and farm animals. The objectives of this study were to evaluate the effect of active immunization against inhibin by checking the titer response and comparing the endogenous levels of FSH and LH in treatment mice and rabbits. The study also evaluates the effect of immunization on the histological components of testes.

Material and Methods

Antigen preparations:

Ovine testicular lymph protein fraction -IV (OTLP4):

Collection of ovine testicular lymph was carried out according to the method of Cowre *et al.*, (1964). Steroid free ovine follicular fluid (OFF): Ovine ovaries containing follicles ranging from 0.3 - 0.8 mm in diameter were collected from Buraydah slaughter house. The follicular fluids were aspirated using sterile syringe and pooled together, cleared from tissue debris by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant was aspirated and considered as crude OFF. To remove steroids a previously described method (Welschen *et al.*, 1977) was followed. Follicular fluid samples were stirred with activated charcoal at a concentration of 50mg /1.0 ml sample. They were then incubated in refrigerator with continuous mixing using magnetic stirrer for two hours. After that the mixture were centrifuged

at 3500 r.p.m for 30 minutes. The supernatant was aspirated, labeled as steroid free and kept at -20°C until use.

Animals and study design:

Sixty six male albino mice, weighing between 25 to 30 gm and thirty three male rabbits each weighing between 2-2.5 Kg were used. The animals both mice and rabbits were randomly assigned to eleven test groups. The group consisted of six animals in case of mice and three animals each in case of rabbits. Two groups received the antigen dissolved in saline, and three groups received adjuvant and each of the remaining six groups received the antigen mixed with one of the three adjuvants.

Three different adjuvants were analyzed for effectiveness of production of immune response: CFA and IFA (Sigma-Aldrich) and TiterMax (CytRx Corp., Norcross, Ga). They were mixed per manufacturer's instructions to an initial concentration of 200 mg/ml. Immunization procedure was done according to the method of Tadeuz, (1974). Each rabbit was injected intradermally at several sites by 1.0 ml of the mixture. This procedure was repeated three times at 10 days interval followed by another three injections at 2 weeks interval. Seven days later, a final booster dose devoid of the adjuvant was injected. Rabbits were sacrificed seven days after the booster dose. blood collected, allowed to clot and sera separated carefully by centrifugation at 3000 r.p.m for 15 minutes and stored at -20°C till used for titration of their potency. The same method for mice was adopted except that each mouse was injected subcutaneously at several sites by 0.1 ml of the mixture.

Hormonal assay:

FSH and LH in the sesum samples were analyzed by immunoenzymetric assay using commercially available kits (EIAgen, Adaltis Italy). In this method, hormone calibrators, serum samples and/or controls (containing antigens) were first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies were added and the reactants were mixed; these antibodies have high affinity and specificity and were directed against distinct and different epitopes of hormone. The color reaction was measured at wavelength 450 nm using microplate ELISA reader.

Histological studies:

Small pieces of the testis and epididymis, 5 μm thick, were taken from fixed portion of the left testis, fixed in Bouin's solution, processed for paraffin embedding, and sections 6 μm thick cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Potency of prepared OTLP4 and OFF antriser:

ELISA methodology was used to detect the potency of antisera to OTLP4 and steroid free Off protein prepared in rabbits and mice and control sera according to the method of Voller *et al.*, (1979).

Measurements of the titer of antisera for each antigen and for each adjuvant were done by ELISA.

Statistics analysis:

The slope of regression "b" of the log dose response titer curves were obtained from respective standard preparation calculated according to the method of Spiegel (1981). Multiple regression analysis and Pearson chi-squared analysis were performed. Mean differences between groups were determined using two ways ANOVA to test the interaction followed by T- test.

Results

The immunization of rabbits and mice with inhibin using CFA resulted in a severe inflammatory reaction at the injection site. The examination of histological sections of the epididymis of rabbits and mice revealed a large sperm content occupying almost the entire lumen following active immunization with both inhibin products (Fig. 1). A moderate sperm number in the epididymis of rabbit after injection of OFF or OTLP4 alone was seen. The testis of immunized rabbit and mice showed normal organization of the seminiferous tubules containing all the stages of spermatogenesis (Fig. 2). After injection of OTLP4 alone, the testis showed some inhibition of normal organization.

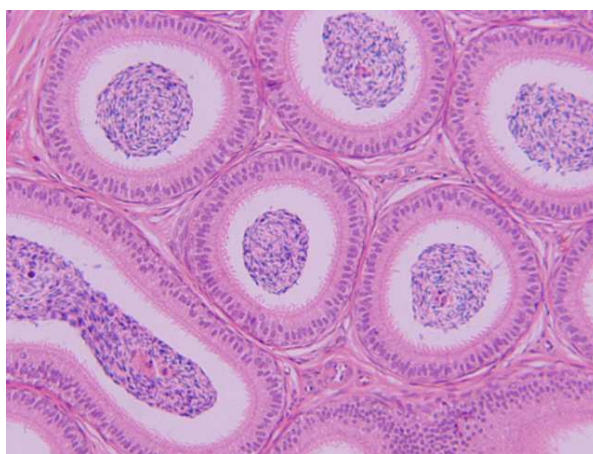


Fig. (1). Large sperm content in the epididymis of a rabbit after injection of OTLP4+ CFA. (H & E x 10).

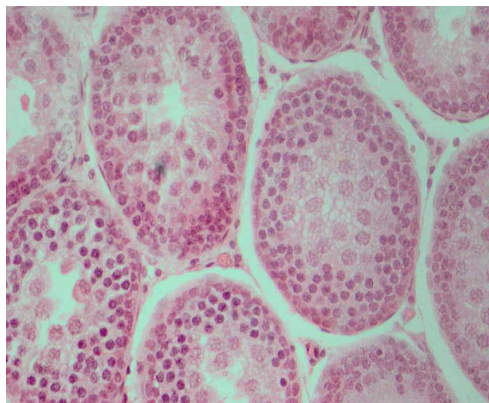


Fig.(2). A histological section in the testis of mice after injection of OTLP4+ IFA showing normal organization of the testis with active spermatogenesis. (H & E X10).

FSH and LH levels in serum of male rabbit and mice after active immunization with inhibins using different adjuvants are shown in Table (1 and 2). There is significant increase in FSH in the serum of rabbit immunized with OTLP4 and OFF conjugated with CFA than with IFA or saline. The conjugation of OTLP4 with TiterMax also increased the level of FSH compared to IFA or saline groups. Concerning LH, The obtained results showed no significant variation between the use of the different adjuvants or inhibin source.

Table (1). Serum Follicle stimulating hormone (FSH) and Luteinizing hormone (LH) levels of male rabbits after immunization with OLTP4 and OFF using different adjuvants

Animal	Antigen	Adjuvant	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)
Rabbit	OTLP4	+ CFA	4.68±0.71 ^{ac}	2.34±0.09
		+ IFA	2.45±0.33 ^{ab}	2.76±0.33
		+ TiterMax	5.09±1.01 ^{bd}	1.96±0.71
		+ Saline	2.17±0.22 ^{cd}	2.08±0.21
	OFF	+ CFA	5.23±1.17 ^{ab}	2.61±0.44
		+ IFA	2.55±0.34 ^a	2.43±0.61
		+ TiterMax	3.97±0.53	1.97±0.11
		+ Saline	2.87±0.30 ^b	2.07±0.09
	Saline	+ CFA	1.89±0.07	1.87±0.08
		+ IFA	1.13±0.30	1.75±0.28
		+ TiterMax	1.84 ±0.26	2.74±0.43

In the column, within the antigen and hormone, values having the same letter are significantly different at $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively.

Table (2). Serum Follicle stimulating hormone (FSH) and Luteinizing hormone (LH) levels of male mice after immunization with OTLP4 and OFF using different adjuvants

Animal	Antigen	Adjuvant	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)
Mice	OTLP4	+ CFA	5.34±1.06 [*]	2.54±0.23
		+ IFA	5.12±1.27 ^a	1.88±0.17
		+ TiterMax	4.92±0.94 ^b	2.62±0.22
		+ Saline	1.39±0.22 ^{*a b}	1.94±0.29
	OFF	+ CFA	5.64±1.26 ^a	4.64±0.53 ^{a *}
		+ IFA	5.72±1.47 ^b	2.05±0.31 ^{ab}
		+ TiterMax	5.64±1.20 ^c	5.13±1.11 ^{cb}
		+ Saline	1.70±0.45 ^{a b c}	2.22±0.71 ^{*c}
	Saline	+ CFA	2.22±0.62	1.01±0.09
		+ IFA	3.01±0.91	2.23±0.25
		+ TiterMax	2.12±0.57	2.41±0.42

In the column, within the antigen and hormone, values having the same letter are significantly different at P<0.05 and P<0.01 respectively.

Data presented in Table 2 show that all levels of FSH in the mice sera were significantly increased after active immunization with either OTLP4 or OFF conjugated with any of the three adjuvants used. For LH, a significantly higher increase in its release occurred after active immunization with OFF conjugated with either CFA or TiterMax as compared with IFA or saline.

The potency of prepared antisera in rabbits and mice were done and the optimum dilutions and the titer after antisera checkerboard titration were obtained (Table 3). There is significant increase in the antibody titer against OTLP4 and OFF in serum of rabbit using TiterMax and CFA than IFA. A significant increase in titer against OTLP4 was observed in serum of mice using IFA than TiterMax and CFA and no significant difference in the titer against OFF by any of the three adjuvants used.

Table (3). The antibody titer and the optimum dilutions of rabbit and mice antisera against OTLP4 and OFF using different adjuvants

Antigen	Adjuvant	Antibody titre X 1000 rabbit	Antibody titre X 1000 mice	Dilution of rabbit antisera	Dilution of mice antisera
OTLP4	+ CFA	11.54±1.12 ^{a*}	17.34±2.12 [*]	1:640	1:320
	+ IFA	5.18±0.98 [*]	32.19±3.43 ^{*#}	1:80	1:1360
	+ TiterMax	7.29±1.03 ^a	16.44±1.87 [#]	1:160	1:320
	+ Saline	-	-	1:1	1:5
OFF	+ CFA	14.21±1.87 [*]	19.32±2.12	1:320	1:640
	+ IFA	7.19±1.09 ^{*a}	16.16±1.11	1:80	1:320
	+ TiterMax	12.65±1.12 ^a	14.09±1.07	1:320	1:160
	+ Saline	-	-	1:5	1:5

In the column, within the antigen, values having the same letter and mark are significantly different at P<0.05 and P<0.01 respectively.

Discussion

Inhibin B is a hormone produced by Sertoli's cells that exercises a negative feedback on FSH secretion and an inverse correlation exists between inhibin and FSH and LH levels Ruiz Plazas *et al.* (2010).

Studies attempting to improve reproduction in laboratory and farm animals through the immunization against inhibin have yielded equivocal results. In some studies immunization against inhibin antigens increased sperm production, whereas in others it had little effect (Voge and Wheaton, 2007). Phillips (2005) concluded that it was not clear whether inhibin immunization would ever be routinely used to increase fertility of valuable males. The gonadal hormone inhibin regulates daily sperm production (DSP) indirectly through negative feedback control of FSH secretion and may also affect DSP via direct actions within the testis (Voge and Wheaton, 2007). McKeown *et al.* (1997) immunized 16 rams against bovine inhibin α -subunit without consistently increased sperm concentration or semen volume. Voglmayr *et al.* (1990) immunized 4 rams resulted in increased epididymal sperm reserves by 26%. Drummond *et al.* (2004) summarized 38 studies in which sheep and cattle had been immunized against α -inhibin antigens. Rams and bulls had been immunized in 6 of the studies. Findings were inconsistent. In some studies immunization against inhibin antigens increased sperm production, whereas in others it had little effect. The authors concluded that the eventual commercial success of inhibin-based fertility vaccines will depend on the design of new more potent immunogens that consistently enhance reproductive performance. In ram lambs Wheaton and Godfrey (2003) showed that active immunization against an inhibin alpha-peptide delayed rather than advanced puberty in ram lambs.

Histologically, the epididymis of rabbits and mice revealed a large sperm content of spermatozoa occupied almost the entire lumen following active immunization of both inhibin products than injection of Off or OTLP4 alone. Sections in the testis of rabbit and mice showed normal organization of the seminiferous tubules and all the stages of spermatogenesis following active immunization were present than the inhibition obtained by injection of OTLP4 alone. Voge *et al.*, (2009) reported that the percentage of testicular area occupied by seminiferous tubules differed by treatment and was greatest (82%) in alpha-inhibin-immunized lambs and lowest (74%) in control animals. Immunization of rabbits (Mehta *et al.*, 2003) and of rat (Vanage *et al.*, 2000) with C-terminal region of human seminal plasma inhibin and of rat with steroid-free bovine follicular fluid caused agglutination of spermatozoa resulting in a decrease in their fecundity. Bame *et al.*, (1999) concluded that inhibin suppressed spermatogenesis.

The data obtained showed a significant increased FSH in the serum of rabbit immunized with OTLP4 and OFF conjugated with CFA than with IFA or saline. The conjugation of OTLP4 with TiterMax also increased the level than with IFA or saline groups. All levels of FSH in the mice sera were significantly increased after active immunization with either OTLP4 or OFF conjugated with the any of the three adjuvants used than antigen with saline. In the present study, we found conclusively that immunization against inhibin clearly increased FSH secretions and it may be

due to immunoneutralization of endogenous inhibin that diminished negative feedback on the anterior pituitary gland resulting in increased FSH secretion. There was a discrepancy in the previous studies about the effect of active immunization against inhibin on FSH secretions. Some reports (Medan *et al.* 2003b Medan *et al.* 2006a and Gordon *et al.*, 2010) demonstrated that active immunization against inhibin increased FSH secretions, meanwhile others (Hennies *et al.* 2001) found an increase in ovulation rate without an increase in FSH levels in the cows.

In contrast to the observed increase in FSH concentrations following immunization against inhibin, concentrations of LH in rabbit did not show a significant difference between inhibin source or adjuvant use. These data agree with the previous work of McKeown *et al.* (1997). Medan *et al.* (2006b) and Schuenemann *et al.* (2007) reported that active immunization against inhibin α -subunit increased FSH secretions and enhanced sperm production in bucks, whereas LH and testosterone concentrations, semen volume and sperm motility parameters were unaffected.

In mice, a significant increase in the release after active immunization of OFF conjugated with either CFA or TiterMax than with IFA or saline without a significant effect of OTLP4 or different adjuvants alone. The present study reasonably concludes that TiterMax may be used as alternative to CFA as immune adjuvant. Powers *et al.*, (2007) mentioned that though Freund's complete adjuvant effectively increases immune response to vaccines in various species, its potentially severe inflammatory effects have led many animal researchers to seek alternative immunological adjuvants. In a study of New Zealand white rabbits, the authors compared the immune and adverse effects of Freund's complete adjuvant with the effects of two formulations of AdjuVac, an immunological adjuvant previously developed by their group. All three adjuvants improved humoral immune response but also caused inflammation. Inflammatory reactions caused by AdjuVac, however, tended to be less severe than those caused by Freund's complete adjuvant.

The present data showed a significant increase in the antibody titer against OTLP4 and OFF in serum of rabbit using TiterMax and CFA than IFA. A significant increase in titer against OTLP4 was observed in serum of mice using IFA than TiterMax and CFA and no significant difference in the titer against OFF by any of the three adjuvants used.

Estimates of anti- α -inhibin titers reported by other investigators were made and showed extensive variation among studies (Voge and Wheaton 2007). Differences in estimated titers among studies were not obviously ranked with antigen dose, route of administration, or the number, interval, or duration of booster immunizations. They reported that Greater titers may decrease LH concentrations. In studies with estimated midlevel titers, FSH was increased (Voglmayr *et al.*, 1990; Bame *et al.*, 1999) and positively associated with Ab titer (McKeown *et al.*, 1997). Effects on LH were inconsistent, being increased (Voglmayr *et al.*, 1990), increased in peak amplitude (McKeown *et al.*, 1997), or decreased (Bame *et al.*, 1999). In studies with higher titers, LH was decreased (Wheaton and Godfrey, 2003). Taken

together, these findings imply that TiterMax may be used as alternative to CFA in rabbit and IFA in mice as immune adjuvant.

References

- Bame, J.H., Dalton, J.C., Degelos, S.D., Good, T.E., Ireland, J.L., Jimenez-Krasse, I. F., Sweeney, T., Saacke, R.G. and Ireland, J.J.** Effect of long-term immunization against inhibin on sperm output in bulls. *Biol. Reprod.* 60, (1999), 1360-6.
- Cowre, A.T; Lascelles, A.K. and Wallace, J.C.:** Flow and protein content of testicular lymph in conscious rams. *J. physiol.* 171, (1964), 176-187.
- Drummond, A. E., Findlay, J. K. and Ireland, J. J. .** Animal models of inhibin action. *Semin. Reprod. Med.* 22 (2004), 243–252.
- Faffioffe, A.; Ethier, J.F.; Fontaine, J.; Jeanpierre et al.** Activin and inhibin receptor gene expression in the ewe pituitary throughout the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 182, (2004), 55-68.
- Gordon, A., Aguilar, R., Garrido-Gracia, J.C., Guil-Luna, S., Sánchez Cespedes, R., Millán, Y., Watanabe, G., Taya, K., et al** Immunoneutralization of inhibin in cycling rats increases follicle-stimulating hormone secretion, stimulates the ovary and attenuates progesterone receptor-dependent preovulatory luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology.* 91 (2010), 291-301.
- Guy, B.** The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007), 505–17.
- Hennies, M., Voglmayr, J.K., Dietrich, E., Stollmann, M., Moeller, R. & Holtz, W.** Hormonal response of female goats to active immunization against a recombinant human inhibin α -subunit, and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine follicle-stimulating hormone. *Reproduction in Domestic Animal* 36 (2001), 65–71.
- Maddocks, S. and Sharpe. R.M.** The effects of sexual maturation and altered steroid synthesis on the production and route of secretion of inhibin- α from the rat testis. *Endocrinology* 126 (1990), 1541–1550.
- Makanji, Y., Harrison, C.A. and Robertson, D.M.** Feedback regulation by inhibins α and β of the pituitary secretion of follicle-stimulating hormone. *Vitam Horm.* 85 (2011), 299-321.
- McKeown, R. M., Callaghan, D. O., Roche J. F. and Boland, M. P.** Effect of immunization of rams against bovine inhibin α 1-26 on semen characteristics, scrotal size, FSH, LH and testosterone concentrations. *J. Reprod. Fertil.* 109 (1997), 237–245.
- Meachem, S. J., Nieschlag, E and Simoni, M.** Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical Relevance. *European Journal of Endocrinology* 145 (2001), 561-571
- Medan, M. S., Takedom, T., Aoyagi, Y, Konishi, M., Yazawa, S., Watanabe, G. and Taya, K.** The Effect of Active Immunization against Inhibin on

- Gonadotropin Secretions and Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Cows. *Journal of Reproduction and Development* Vol. 52 (2006a), 107-113
- Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Nagura, Y., Sakaime, H., Fujita, M., Sharawy, S and Taya, K .** Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate. *Reproduction* 125(2006b), 751–757.
- Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Nagura, Y., Sakaime, H., Fujita, M., Sharawy, S. & Taya, K .** Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin. *J. Endocrinol.* 177 (2003a), 287–294.
- Medan, M.S. Watanabe, G. Nagura, Y. Fujita, M. Taya, K.** Effect of active immunization against inhibin on hormonal concentrations and semen characteristics in Shiba bucks. *Reproduction in Domestic Animals*, (2003b) 65, 691-702.
- Mehta, M.N., Mahale, S.D., Iyer, K.S., Vanage, G.R., Raghavan, V.P., Moodbidri, S.B.** Effect of active immunization with the C-terminal 67-94 (R-28) region of human seminal plasma inhibin on the fecundity of adult male rabbits. *Am J Reprod Immunol.* 49 (2003), 42-50.
- Okuma, Y., O'Connor, A. E., Hayashi, T., Loveland, K. L., de Kretser, D. M. and Hedger, M. P.** Regulated production of activin A and inhibin B throughout the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Journal of Endocrinology* 190 (2006), 331–340.
- Phillips, D. J.** Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest. Anim. Endocrinology.* 28 (2005), 1–16.
- Powers JG, Nash PB, Rhyan JC, Yoder CA, Miller LA.** Comparison of immune and adverse effects induced by AdjuVac and Freund's complete adjuvant in New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim (NY)* 36 (2007), 51-8.
- Ruiz Plazas, X., Burgués Gasi6n, J.P. and Ozon6s Moragues, M. and Piz6 Reus, P.** Utility of inhibin B in the management of male infertility. *Actas Urol Esp.* 34 (2010), 781-787.
- Schuenemann, G.M., Mendis-Handagama, S.M., Hopkins, F.M., Kania, S.A., Schrick, F.N.** Changes in the testis seminiferous tubules and interstitium in prepubertal bull calves immunised against inhibin at the time of gonadotropin administration. *Reprod Fertil Dev.* 19 (2007), 840-9.
- Spickler, A.R. and Roth, J.A.** Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med.* 17 (2003), 273-81.
- Spiegel, M.R.** Statistics. 1st ed., McGraw-Hill Natl. Book CO., Singapore (1981).
- Tadeuz, S.:** Attempts to determine immunological activity of pregnant mare serum gonadotrophin, *Bull. Vet. Inst. Pulaway* 18 (1974), 3-11.
- Vanage, G.R., Mehta, P.B., Moodbidri, S.B, Iyer, K.S.** Effect of immunization with synthetic peptide corresponding to region 1-17 of human seminal plasma inhibin on fertility of male rats. *Arch Androl.* 44 (2000), 11-21.

- Voge, J. L. and Wheaton, J. E.** Effects of immunization against two inhibin antigens on daily sperm production and hormone concentrations in ram lambs *J Anim Sci* 85 (2007), 3249-3255.
- Voge, J.L., Parker, J.B. and Wheaton, J.E.** Effects of immunization against alpha-inhibin using two adjuvants on daily sperm production and hormone concentrations in ram lambs. *Domest Anim Endocrinol.* 37 (2009), 206-213.
- Voglmayr, J. K., M. Mizumachi, D. W. Washington, Chen, C. L. and Bardin. C. W..** Immunization of rams against human recombinant inhibin α -subunit delays, augments, and extends season-related increase in blood gonadotropin levels. *Biol. Reprod.* 42 (1990), 81-86.
- Voller A.; Bidwell D.E. and Bartlett A.:** The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *The zool. soc, London*, (1979) 16-17.
- Welschen, R.; Hermans, W.P.; Dullaart, J. and De Jong, F.H.:** Effects of an inhibin-like factor present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotrophin levels in ovariectomized rats. *J. Reprod. Fert.* 50 (1977), 129-131.
- Wheaton, J.E. and Godfrey, R.W.** Plasma LH, FSH, testosterone, and age at puberty in ram lambs actively immunized against an inhibin alpha-subunit peptide. *Theriogenology.* 15 (2003), 933-941.

تأثير التحصين ضد الانهيين على استجابة الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني وأنسجة الخصية في الأرانب والجرذان وذلك باستعمال ثلاثة أنواع من محفزات المناعة

د. خالد الخريجي

قسم الطب البيطري، كلية الزراعة والطب البيطري، جامعة القصيم - بريدة ص.ب. ٦٦٢٢

- المملكة العربية السعودية.

ملخص البحث. تمت دراسة تأثير التحصين ضد انهيتن على الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني وكذلك على أنسجة الخصية في ذكور ٦٦ أرنب و ٣٣ جرذ. وتم التحصين بحقن نوعين من الانهيتن هما: البروتين اللمفي المستخلص من خصي الغنم ووسائل الجريبات الخالي من الاسترويدات. هذه الانتجيات حقن باستعمال ٣ أنواع من محفزات المناعة وهي ومحفز فرويد الكامل ومحفز فرويد غير الكامل ومحفز تتراماكس. هذه المحفزات تزيد من الاستجابة المناعية في حيوانات التجارب. كذلك تم فحص التغيرات النسيجية في الخصية بعد التحصين. وأوضحت النتائج أن التحصين بانهيتن أدى لإفراز الهرمون المحفز للجريبات في الأرانب والجرذان دون تأثير على الهرمون اللوتيني في الأرانب. ولكن أوضح الهرمون اللوتيني زيادة معنوية في الجرذان المحصنة باستعمال سائل الجريبات ومحفزات المناعة فرويد الكامل وتتراماكس. كذلك هنالك زيادة في كمية الأجسام المناعية ضد الأنتيجين البروتين اللمفي والوسائل الجريبي عند استعمال تتراماكس و محفز فرويد الكامل. وأدى التحصين بانهيتن إلى زيادة عملية تكون الحيوانات المنوية. وقد وضع ذلك برؤية الحيوانات المنوية في الانبيبات المنوية والبربخ. ولذا فإن التتراماكس و محفز فرويد غير المكتمل يعتبران أفضل من محفز فرويد المكتمل في حالة التحصين بانهيتن في الجرذان والأرانب.

الكلمات المفتاحية : انهيتن، جرذان، أرانب، محفز مناعة، محفزات التناسل، الخصي.

Microbiology

**Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*)
against *E. coli* O₁₅₇:H₇**

Mohammad S. Alorainy

College of Pharmacy, Qassim University, P. O. box 6800 Buraidah 51452, KSA

(Received for publication on 17/2/2011, accepted 22/6/2011)

Abstract. Garlic extract with different concentrations (0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 %) were tested for inhibitory activity against *E. coli* O₁₅₇:H₇ in MacConkey sorbitol agar (MSA). The reduction rates were 58, 100, 100 and 100%, respectively. Aqueous extract of garlic were tested for their inhibitory activity against *E. coli* O₁₅₇:H₇. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of garlic extract against *E. coli* O₁₅₇:H₇ was 1.56% (w/v), while the Minimal Lethal Concentration (MLC) was 3.12% (w/v). Garlic extract concentrations which had the best inhibitory effects against *E. coli* O₁₅₇:H₇ in the laboratory medium and in-vitro study, should be chosen and tested for the food model study. The obtained results showed that garlic extract 3% has the highest inhibitory effect against *E. coli* O₁₅₇:H₇ at the 3rd day of storage with reduction rate of 100%.

Keywords: Garlic, *E. coli*, inhibitory concentration, lethal concentration.

Introduction

Man has been using natural products of animals, plants and microbial sources for thousands of years either in the pure forms or crude extracts (Parekh and Chanda, 2007). Bioactive compounds from these diverse sources have been isolated and characterized worldwide. Systematic screening of plant materials represent an all important effort to find some new bioactive compounds with the needed therapeutic potential to fight against pathogenic microorganisms, particularly with respect to those that are hospital based. The elucidation of the chemical structures of some of these compounds had led to the synthesis and production of more potent and safer drugs. However, within the last few decades, microbial resistance has emerged for most of the available agents, thus necessitating the search for newer drugs (Bhattacharjee *et al.*, 2005). The increasing reliance on drugs from natural sources has led to the extraction and development of several drugs and chemotherapeutic agents from traditional herbs which are present in abundance in the tropics (Falodun *et al.*, 2006).

Garlic (*Allium sativum* Linn.) is one of those plants that was seriously investigated over the years. It has been used for centuries to fight infections (Onyeagba *et al.*, 2006). The early Egyptians used it to treat diarrhoea, the ancient Greeks used it to treat intestinal and extraintestinal diseases, while the ancient Japanese and Chinese used it to treat headache, flu, sore throat and fever. In Africa, particularly in Nigeria, it is used to treat abdominal discomfort, diarrhoea, otitis media and respiratory tract infections (Ankri and Mirelman, 1999; Jaber and Al-Mossawi, 2007). The phytochemical constituents of garlic have been established in previous studies (Farbman, *et al.*, 1993; Cavallito and Bailey, 1994; Ankri and Mirelman, 1999; Prados-Rosales *et al.*, 2003). The antimicrobial properties of garlic were first described by Pasteur in 1958, and since then, research had demonstrated its effectiveness against bacteria, protozoa, fungi and some viruses (Jaber and Al-Mossawi, 2007). Previous studies have also indicated that garlic has anti-neoplastic, cardiovascular, immuno-stimulatory and hypoglycemic properties (Sato and Miyata, 1999).

Garlic is a potent inhibitor of food pathogens. Foods contaminated with pathogens pose a potential danger to consumer health. Use of garlic would increase the shelf-life and decrease the possibilities of food poisoning and spoilage in processed foods. The Minimum inhibitory concentration (MIC) of garlic for *E. coli*, *Sal. typhi*, *Staph. aureus* and *L. monocytogenes* was 3.95, 7.0, 5.0 and 8.8%, respectively. The maximum inhibitory effect of garlic was observed against *E. coli* and the minimum against *L. monocytogenes*. In the case of *E. coli* and *Staph. aureus*, inhibition occurred rapidly. Up to the 5% level of garlic, there was an almost 80% inhibition and after that, very gradual inhibition was observed. (Kumar and Berwal, 1998).

It has consistently demonstrated the effectiveness of garlic against the nosocomial *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* that frequently display above average resistance to many antimicrobial agents. If well processed, garlic preparations can be used to treat nosocomial infections caused by susceptible

bacteria. The ability of garlic to inhibit the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria shows that it has a broad spectrum of activity and can be used for formulation of newer broad spectrum antibacterial substances (Abubakar, 2009).

The antimicrobial and synergistic effects of the plants, *Allium sativum* and *Gongronema latifolium* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were investigated. It is concluded that synergism associated with the combination of medicinal plants is doubtful. However, the synergistic or additive effect between garlic and conventional drugs to some strains of bacteria which are resistant to some conventional drugs, gives hope of fighting drug resistance (Eja, *et al.* 2011).

The aim of the present study is to Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O₁₅₇:H₇

Materials and Methods:

Preparation of garlic extract: Garlic extract was prepared according to the methods described by Zahira and Al-Delaimy(1982) and Kumar and Berwal, (1998). Briefly, the garlic bulbs were cleaned with tape water and detergent (0.2 % mercuric chloride) for 2 min to remove any adhering soil on their surfaces followed by five to six washings with dist. water. 100 g of garlic were taken after removal of their outer skin surfaces and cut into small pieces by sterile scalpel. The small pieces were blended with 100 ml sterile dist. water using sterile warring blender for 5 min at medium speed. The macerates were filtered using sterile funnel and Whatman filter paper. The filtered extract was used for studies within 8 h of extract preparation. Two-fold serial dilutions were prepared from the extract previously prepared, i.e. 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, and 0.39 % (w/v).

Bacterial strain: *E. coli* O₁₅₇:H₇ strain was isolated from beef burger sample and identified by PCR assay. A fresh culture was prepared by inoculating 10 ml of Tryptic Soy Broth (TSB) with a loopful of the stock culture and incubating the inoculated tube at 37°C for 18-20h.

In vitro methods:

Agar diffusion method (Parish and Davidson, 1993):

Petri dishes were prepared to contain a non-selective medium, Tryptic Soy Agar (TSA) at a depth of approximately 4mm. The medium was surface inoculated with a suspension containing approximately 1×10^7 cfu/ml of *E. coli* O₁₅₇:H₇, which were prepared in TSB culture after overnight incubation and adjusted to such previous initial inoculum. Known concentrations (100 µl) of each tested garlic extract were added by using sterile automatic micropipette to wells cut in the agar plate with a sterile glass tube (6 mm diameter). Negative control was prepared by placing sterile water in a well. Plates were incubated at 37°C for 24h. Following incubation; plates were examined for zones of inhibition that measured by using a vernier caliper. The evaluation of inhibitory properties was carried out in duplicate and the results were expressed as average values of inhibition halo. Minimum Inhibitory Concentration MIC for the tested extracts was predicted from the linear regression analysis of the relationship between the squared radii of the zone of inhibited growth versus logarithmic values of the concentrations.

Broth dilution method (Cosentino *et al.*, 1999 and Elgayyar *et al.*, 2001):

All tested extracts were performed in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) supplemented with Tween 80 detergent at a final concentration of 0.5% for emulsification of essential oils in aqueous media. Serial doubling dilutions of each extracts were performed as previously mentioned. Overnight broth culture of *E. coli* O₁₅₇:H₇ were prepared in TSB and adjusted so that the final concentration of each tube following incubation was approximately 6×10^5 CFU/ml. The concentration of initial inoculums was confirmed using viable counts on TSA plates. A control tube should be prepared. The tubes were incubated at 37°C for 24h and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) were determined. MIC was determined presumptively as the first tube that did not produce turbidity. MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial that prevents growth of a microorganism after a specified incubation period [i.e., the lowest concentration at which no growth occurs (absence of turbidity) in a nutrient medium following incubation]. To confirm MIC and establish MLC, 0.1 of broth was removed from each tube and surface plated onto TSA. After aerobic incubation at 37 °C overnight, the number surviving *E. coli* O₁₅₇:H₇ was determined. The MIC was the lowest concentration which resulted in a significant decrease in inoculums viability (> 90 %) while, the MLC was defined as the lowest concentration that killed > 99.9 % of *E. coli* O₁₅₇:H₇ within 72h (MLC culture was incubated at 37°C for 24, 48, and 72h). Survival was determined by plating an aliquot from each tube into TSA plates incubated for 48 h at 37°C and recorded as (+) for growth or (-) for no growth.

In vivo method (Food model):

Spices and spice extracts which had the best inhibitory effects against *E. coli* O₁₅₇:H₇ in the laboratory medium and *in vitro* study, should be chosen and tested for the food model study.

Evaluation of garlic extracts in minced beef (Ceylan *et al.*, 1998):

500 g of fresh meat was purchased from a local butcher. The samples were minced and divided into five equal portions each of 100 g in sterile beakers. The 1st and 2nd beakers were received 1 & 3% (w/w) garlic, while the 3rd and 4th beakers received 1.56 and 3.12% (v/v) aqueous garlic extract. Whereas, the five portion was considered as control sample which had no garlic. *E. coli* O₁₅₇:H₇ was added to these mixtures to obtain 3×10^5 CFU/g initial inoculum level. Both the bacterial inoculums and garlic extracts were distributed in the minced meat by stomacher for 2 min. All beakers were covered with aluminum foil and refrigerated at 3°C and examined at the 1st, 2nd, 3rd and 7th days to evaluate the viable cell counts of *E. coli* O₁₅₇:H₇.

Evaluation of *E. coli* O157:H7 in the inoculated samples:

25g of the inoculated ground beef sample were transferred into sterile 250-stomacher bag together with 225 ml of sterile 0.1-peptone water. The sample was thoroughly homogenized by using a stomacher for 2 min. Serial dilutions of the homogenate were prepared by using 0.1-peptone water as diluents. 0.1 ml portions of three consecutive dilutions were spread-plated on MacConkey sorbitol agar (MSA) medium. The plates were incubated at 37°C for 24h.

Results

The obtained results were recorded in Tables (1), (2) and (3).

Table (1). Reduction rates of *E. coli* O₁₅₇:H₇ on manitol salt agar containing different concentrations of garlic

Garlic concentration	0.5 %	*R. R. (%)	1 %	R. R. (%)	3 %	R. R. (%)	5 %	R. R. (%)
Control	50x10 ⁵	0.0	50x10 ⁵	0.0	50x10 ⁵	0.0	50x10 ⁵	0.0
<i>E. coli</i> counts	21x10 ⁵	58	**NG	100	NG	100	NG	100

*Reduction rate

** No growth

Table (2): Minimal inhibitory and lethal concentrations of garlic extract on *E. coli* O₁₅₇:H₇

Antimicrobial activity of garlic extract		<i>E. coli</i> O ₁₅₇ :H ₇	
		*MIC	**MLC
Manitol Salt Agar		1.56 % (w/v)	3.12 % (w/v)
Agar diffusion		2.51 % (w/v)	-

*Minimal Inhibitory Concentration

**Minimal Lethal Concentration

Table (3). Reduction rates of different concentration of garlic extract on *E. coli* O₁₅₇:H₇ inoculated into minced meat

		After day 1	After days 2	After days 3	After 7 days
Control	mean	3X10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁵
Garlic 1 %	R. R. (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
	mean	3X10 ³	7x10 ²	10.0	10.0
Garlic 3 %	R. R. (%)	99.0	99.5	99.9	99.9
	mean	1X10 ³	1X10 ²	0.0	0.0
Garlic 1.56 % (w/v)	R. R. (%)	99.6	99.9	100.0	100.0
	mean	2X10 ⁴	8X10 ²	10.00	10.00
Garlic 3.12 % (w/v)	R. R. (%)	99.3	99.6	99.9	99.9
	mean	8X10 ³	3X10 ²	10	0.0
	R. R. (%)	97.3	99.8	99.9	100

Discussion

Garlic (*Allium sativum*) in the family *Liliaceae* is a perennial bulb-forming plant. It is known world-wide, and for several centuries, it has been used for dietary and medicinal purposes. Antimicrobial activity of garlic and its extract has been recognized for many years in all parts of the world. Scientific studies made on garlic in 20th century revealed that it was effective against a wide variety of microbial pathogens (Ross *et al.*, 2001). Garlic contains 0.3–0.5% allicin, an antimicrobial component (Shelef 1983). According to Zaika *et al.* (1983), the Gram- positive

bacteria are generally more sensitive to allicin than Gram-negative bacteria. Further studies have confirmed also that garlic and its extract has antimicrobial properties (Reuter *et al.*, 1996; Kumar and Berwal, 1998; Ross *et al.*, 2001; Martin and Ernst, 2003; Eja *et al.*, 2007; Eja *et al.*, 2011).

Effect of garlic on *E. coli* O₁₅₇:H₇ on MSA showed high antagonistic effect (strong inhibition), inhibiting the growth of *E. coli* O₁₅₇:H₇ totally at 1 %, while the control sample had 50×10^5 cfu/ml (Table 1). These findings were in harmony with those reported by Ceylan *et al.*, (1998). As well as, Abdou *et al.* (1972) concluded that 5–10% fresh garlic was sufficient to inhibit the growth of *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Sal. typhosa* and *Staph. aureus* completely.

Current methods used to evaluate the efficacy of food antimicrobial may be divided into *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* methods provide only preliminary information to determine the potential usefulness of the test compound in the food, whereas, application methods, in which an antimicrobial was applied directly to a food product to determine its effect on an inoculated microorganism (Parish and Davidson, 1993).

The obtained results given in Table (2) indicated that calculated MIC for aqueous garlic extract was 2.51.

In vivo method (Food model), the antimicrobial effect of garlic extract on the growth of *E. coli* O₁₅₇:H₇ in minced meat was carried out. The garlic extract proved to have a good inhibitory effect against *E. coli* O₁₅₇:H₇ in previous preliminary *in vitro* study which include: 1 and 3 % of garlic, 1.56 (MIC) and 3.12 (MLC) % (w/v) of aqueous garlic extract. Higher MIC (3.95 %) of garlic for *E. coli* rather than the obtained findings was recorded by Kumar and Berwal, (1998).

From the results outlined in Tables (3) it could be observed that garlic (3%) had the highest inhibitory effect on the growth of *E. coli* O₁₅₇:H₇ in minced meat stored at 3°C for 7 days with reduction rate of 100 % at the 3rd day of storage. Greater reductions were observed after 7 days of refrigerated storage, rather than immediately after application. Other researchers have noted that lower temperature and prolonged storage may enhance the inhibitory activity of plant extracts (Beuchat *et al.*, 1994 and Hao *et al.*, 1998).

The overall observation of the results of the food system showed that there is a partial decrease in the antimicrobial activity of garlic in contrast to their antimicrobial inhibitory effect in culture medium. Many factors in foods could be responsible for the reduction of antimicrobial activity of garlic extract while applied on different types of food. This observation was recorded by many investigators such as Ismaiel and Pierson, (1990) and Stechini *et al.* (1993) who reported that antimicrobial activity of spices and oils diminished in food as a result of solubility of the antimicrobial agents into the food's lipid fraction.

References

- Abubakar , M. EL-mahmood (2009).** Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(4), pp. 179-185, April, 2009.
- Abdou, I.A., Abou Zeid, A.A., El-Sherbeeney, M.R. and Abou-el- Gheat, Z.H. (1972)** Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Veg- etabiles* 22, 29–35.
- Ankri S, Mirelman A (1999).** Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 2: 125-129
- Beuchat, L. R.; Brackett, R. W. and Doyle, M. P. (1994):** Lethality of carrot juice to *L. monocytogenes* as affected by pH, sodium chloride and temperature. *J. Food Prot.*, 57: 470-474.
- Bhattachajee I, Ghosh A, Chandra G (2005).** Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.) (Solanales : Solanaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 4 (4):371-374.
- Cavallito CJ, Bailey JH (1994).** Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* 1.Isolation, physical properties and antibacterial action *J. Am. Chem. Soc.* 66: 1950-1951.
- Ceylan, E.; Kang, D.H. and Fung, D.Y.C. (1998):** Reduction of *E. coli* O157:H7 in laboratory medium, ground beef and salami by selected spices. *Natural antimicrobials. Meat and poultry*, 44:54-56.
- Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. and Palmas, F. (1999):** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29: 130-135.
- Eja, M. E., Asikong, B. E., Abriba, C., Arikpo, G. E., Anwan, E. E. and Enyi-Idoh, K. H. (2007).** A Comparative Assessment of the Antimicrobial Effects of Garlic (*Allium sativum*) and Antibiotics on Diarrhoeagenic organisms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 38. 343-348.
- Eja, M. E., Arikpo, G. E., Enyi-Idoh K. H. and Ikpeme, E. M. 2011.** An evaluation of the antimicrobial synergy of Garlic (*Allium sativum*) and Utazi (*Gongronema latifolium*) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 7(1) 2011, pp. 49-53
- Elgayyar, M.; Draughon, F. A.; Golden, D. A. and Mount, J.R. (2001):** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.*, 64, 7: 1019-1024.
- Falodun A, Okenroba LO, Uzoamaka N (2006).** Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (*Euphorbiaceae*). *Afr. J. Biotechnol.* 5 (6): 529-531

- Farbman KS, Barnett ED, Boldiro GR, Klein JO (1993).** Antibacterial activity of garlic and onions: a historic perspective. *Paediat. Infect. Dis.* 12: 613-614.
- Hao, Y.Y.; Brackett, R.E. and Doyle, M. P. (1998):** Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiol.*, 15:367-378.
- Ismail, A. and Pierson, M. D. (1990):** Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.*, 55, 6:1676-1678.
- Jaber MA, Al-Mossawi A (2007).** Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic extract. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (6): 771-776.
- Kumar, M. and J.S. Berwal (1998).** Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *Journal of Applied Microbiology* 1998, 84, 213–215.
- Martin, K. W. and Ernst, E. (2003).** Herbal medicines for treatment of bacterial infections: A review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 241-246.
- Onyeagba RA, Ugbogu OC, Okeke CU, Iroakasi O (2006).** Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn). *Afr. J. Biotechnol.* 3 (10): 552-554
- Parekh J, Chanda S (2007).** In vitro antimicrobial activity of *Trapa natans* Linn. Fruit rind extracted in different solvents. *Afr. J. Biotechnol.* 6(6): 766-770.
- Parish, M.E. and Davidson, P.M. (1993):** Methods for evaluation. In: *Antimicrobials in foods*. 2nd Ed. edited by Davidson, P.M. and Branen, A.L. Marcel Dekker, Inc.
- Pruthi, J.S. (1980)** Spices and condiments—chemistry, microbiology, technology. *Advances in Food Research (Supplement)* 4, 16–31.
- Ross, Z.M.; Gara, E.A.O.; Hill, D.J.; Sleightholme, H.V. and Maslin, D.J. (2001):** Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1: 475-480.
- Sato T, Miyata G (1999)** .The nutraceutical benefit: part IV: garlic. *Nutrition* 16: 787-788
- Shelef, L.A. (1983)** Antimicrobial effect of spices. *Journal of Food Safety* 6, 29–44.
- Stecchini, M.L.; Sarais, I. and Giavedoni, P. (1993):** Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Prot.*, 56:406-409.
- Zahira, M. and Al-Delaimy (1982):** Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *J. Food Prot.*, 45, 11: 1007-1009.
- Zaika, L.A. and Kissinger, J.C. (1983)** Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of Food Science* 46, 1205–1210.

تقييم نشاط الثوم كمضاد للميكروبات ضد *E. coli* O₁₅₇:H₇

محمد س. العريني

كلية الصيدلة ، جامعة القصيم ، صندوق بريد ٦٨٠٠ بريدة ٥١٤٥٢ ، السعودية

ملخص البحث. تم اختبار تركيزات مختلفة (٥,٠,٣,٠,١,٠,٠,٥)٪ من مستخلص الثوم كمثبط لنشاط *E. coli* O₁₅₇:H₇ في آجار مأكوني والسريتول (MSA). وكانت نسب الحفص ٥٨ ، ١٠٠ ، ١٠٠ و ١٠٠ ٪ ، على التوالي. تم اختبار المستخلص المائي للثوم كمثبط لنشاط (*E. coli* O₁₅₇:H₇) ووجد أن التركيز الأدنى المثبط (MIC) من مستخلص الثوم هو ١,٥٦ ٪ (وزن/حجم) بينما التركيز الأدنى المميت (MLC) هو ٣,١٢ ٪ (وزن/حجم).

إن تركيزات مستخلص الثوم التي لديها أفضل الآثار المثبطة ضد *E. coli* O₁₅₇:H₇ في المختبر يجب أن يتم اختبارها واختبارها لدراسة نموذج الغذاء. النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة الحالية أظهرت أن مستخلص الثوم (٣٪) لديها أعلى تأثير مثبط ضد *E. coli* O₁₅₇:H₇ في اليوم الثالث من التخزين وكان معدل التخفيض يساوي ١٠٠ ٪.

الكلمات المفتاحية : الثوم ، الكولاي ، التركيز المثبط ، التركيز المميت.

قواعد النشر

مجلة دورية تنشرها إدارة النشر العلمي والترجمة بجامعة القصيم، وهي تهدف إلى إتاحة الفرصة للباحثين لنشر إنتاجهم العلمي وتقوم المجلة بنشر المواد الآتية:

- ١- بحث: يشمل على عمل المؤلف في مجال تخصصه، ويجب أن يحتوي على إضافة للمعرفة في مجاله.
 - ٢- مقالة استعراضية: تتضمن عرضاً نقدياً لبحوث سبق إجراؤها في مجال معين أو أجريت في خلال فترة زمنية محددة.
 - ٣- بحث مختصر.
 - ٤- نقد الكتب.
 - ٥- خطابات إلى المحرر، وملاحظات وردود، ونتائج أولية.
- تقوم هيئة المحررين بالنظر في نشر المواد المعرفية ذات الصلة بذلك الفرع، وتقدم البحوث الأصلية، التي لم يسبق نشرها، بالإنجليزية أو بالعربية، وفي حال قبول البحث للنشر، لا يجوز نشره في أي منفذ نشر آخر ورقياً أو إلكترونياً، دون إذن كتابي من رئيس هيئة التحرير.

تعليمات عامة

- ١- تقديم المواد: يقدم أصل البحث مخرجاً في صورته النهائية متضمناً الإشارة إلى أماكن الجداول والأشكال داخل المتن ومطبوعاً على هيئة صفحات مرقمة ترقمياً متسلسلاً، مع ضرورة إرفاق قرص ممغظ مطبوع عليه البحث على برنامج Ms Word باستخدام النظام المتوافق مع IBM، وسيعتذر عن قبول أي بحث لا يلتزم مؤلفه بهذه التعليمات.
- ٢- الملخصات: يرفق ملخصان بالعربية والإنجليزية للبحوث والمقالات الاستعراضية والبحوث المختصرة. على ألا يزيد عدد كلمات كل منهما على ٢٠٠ كلمة، وعلى عمود واحد يعرض كتابة ١٣ سم.
- ٣- لا بد من احتواء كل بحث على كلمات مفتاحية (Key Words) توضع أعلى الملخصين العربي والإنجليزي على ألا تزيد عن عشر كلمات.
- ٤- الجداول والمواد التوضيحية: يجب أن تكون الجداول والرسومات واللوحات مناسبة لمساحة الصف في صفحة المجلة (١٢ × ٩ سم بالحواشي)، ويتم إعداد الأشكال الخطية على برامج الحاسب الآلي أو بالحبر الصيني الأسود على ورق كلك، ولا تقبل إلا أصول الأشكال. كما يجب أن تكون الخطوط واضحة ومحددة ومنتظمة من حيث كثافة الحبر وتناسب سمكها مع حجم الرسم، ويراعى أن تكون الصور الفوتوغرافية (الضوئية) الملونة وغير الملونة مطبوعة على ورق لماع، أو محملة على برنامج (Adobe Photoshop). مع كتابة عنوان لكل جدول، وتعليق لكل شكل وصورة، والإشارة إلى مصدر المادة إن كانت مقتبسة.
- ٥- الاختصارات: يجب استخدام اختصارات عناوين الدوريات العلمية كما هو وارد في The World List of Scientific Periodicals وتستخدم الاختصارات المقننة دولياً مثل: سم، مم، م، كم، سم، ٢م، مجم، كجم... إلخ.
- ٦- المراجع: يشار إلى المراجع داخل المتن بنظام الاسم والتاريخ، وتوضع المراجع جميعها في قائمة المراجع بنهاية المادة مرتبة هجائياً ومتبعة بنظام ترتيب البيانات الببليوجرافية التالي:
(أ) يشار إلى الدوريات في المتن بنظام الاسم والتاريخ بين قوسين على مستوى السطر. أما في قائمة المراجع فيبدأ المرجع بذكر الاسم الأخير للمؤلف (اسم العائلة)، ثم الاسم الأول، ثم الأسماء الأخرى أو اختصاراتها بالخط الأسود. فعنوان البحث كاملاً بين قوسين " " فاسم الدوريات مختصراً بنط مائل، فرقم المجلد، ثم رقم العدد بين قوسين، ثم سنة النشر بين قوسين، ثم أرقام الصفحات.

مثال:

فقيه، أنيس بن حمزة. "نموذج تقطير خليط ذو نسبة تطاير عالية." *مجلة جامعة الملك سعود (العلوم الهندسية)*. المجلد ١٥، العدد (١)، (٢٠٠٣م)، ١٣-٢٧.

(ب) يشار إلى الكتب في المتن داخل قوسين بالاسم والتاريخ.

أما في قائمة المراجع، فيكتب الاسم الأخير للمؤلف (اسم العائلة)، ثم الاسم الأول، ثم الأسماء الأخرى أو اختصاراتها بالخط الأسود. فعنوان الكتاب بنط مائل ثم بيان الطبعة. فمدينة النشر: ثم الناشر، ثم سنة النشر، ثم عدد صفحات الكتاب، إن وجدت.

مثال:

المصري، وحيد عطية. مقدمة في هندسة العمليات الحيوية. الرياض: جامعة الملك سعود، ١٤٢٥هـ، ٥٠٠ص.

ويجب عدم استخدام الاختصارات المرجعية مثل: المرجع نفسه. المرجع السابق... إلخ.

٧- الحواشي: تستخدم لتزويد القارئ بمعلومات توضيحية، ويشار إليها في المتن بأرقام مرتفعة عن السطر. وترقيم التعليقات متسلسلة داخل المتن. وفي حال الضرورة؛ يمكن الإشارة إلى مرجع داخل الحاشية عن طريق استخدام كتابة الاسم والتاريخ بين قوسين وبنفس طريقة استخدامها في المتن، وتوضع الحواشي أسفل الصفحة التي تخصها والتي ذكرت بها و تفصل بخط عن العمودين (المتن) وتكون الحواشي على سطر أو عمود واحد وليس عمودين .

٨- المواد المنشورة في المجلة لا تعبر؛ بالضرورة، عن رأي جامعة القصيم.

٩- المستلآت: يعطى المؤلف (٢٠) عشرون نسخة مجانية من بحثه.

١٠- عناوين المراسلة

ترسل جميع مواد النشر والمكاتبات إلى :

رئيس التحرير

مجلة العلوم الزراعية والبيطرية / كلية الزراعة والطب البيطري

ص.ب ٦٦٢٢ بريدة ٥١٤٥٢ / E-mail: jvmagsc@yahoo.com

المملكة العربية السعودية

١١- تصدر المجلة مرتين في العام.





المجلد (٤) - العدد (٢)

مجلة العلوم الزراعية والبيطرية

رجب ١٤٣٢هـ - يوليو ٢٠١١م

النشر العلمي والترجمة

هيئة التحرير

أعضاء هيئة تحرير المجلة

- أ.د. حسن ميرغني موسى
رئيس التحرير
- أ.د. محمد عبد الستار المليجي
- أ.د. أسامة محمد محمود
- أ.د. رمضان أحمد حبيبة
- أ.د. أنصاري إدريس مفتاح
- أ.د. سليمان ناصر الدبيب
- د. فهد عبد الله السبيل

الهيئة الاستشارية لمجلة العلوم الزراعية والبيطرية

- أ.د. عبد الرحمن بن إبراهيم الحميد، المملكة العربية السعودية
- أ.د. هاني محمد جوهري، مصر
- أ.د. عبد رب الرسول عمران، المملكة العربية السعودية
- أ.د. هيوثقشيك اس لي، كوريا
- أ.د. حمزه محمد أبو طريوش، المملكة العربية السعودية
- أ.د. ستيفن دي لوكناهر، الولايات المتحدة الأمريكية
- أ.د. حسن أحمد ملوك، الولايات المتحدة الأمريكية
- أ.د. إبراهيم محمد الشهبان، المملكة العربية السعودية
- أ.د. محمد محمود يوسف، مصر
- أ.د. جين بويازوقلو، فرنسا
- أ.د. عبد المجيد محمد قمره، مصر
- أ.د. ماهر حسب النبي خليل، المملكة العربية السعودية
- أ.د. وليام إي آرترز، الولايات المتحدة الأمريكية
- أ.د. غانم محمد الغامدي، المملكة العربية السعودية

المحتويات

صفحة

أولاً: القسم العربي

اقتصاد زراعي

البعد الاقتصادي لتنمية القطاع الزراعي في المملكة العربية السعودية

عثمان بن سعد النشوان، محمد بن حمد القنييط، وعادل محمد خليفة غانم ٣٥

ارشاد زراعي

مدى التزام الزراع ببعض إجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات - محافظة الغزالة - منطقة

حائل - المملكة العربية السعودية

محمد شايع الشايع ٥٧

ثانياً : القسم الإنجليزي

الانتاج الحيواني

تأثير طرق الطهي على متبقيات الهرمونات الجنسية الأستيرودية الطبيعية في اللحوم المستوردة و المحلية

و منتجاتها بمنطقة القصيم

مصطفى محمد زيتون و سمير محمد أحمد ٩٢

الطب البيطري

عسر الولادة في المخرات الصغيرة بالمملكة العربية السعودية وعلاج ضيق عنق الرحم

أحمد مصطفى حسين علي ١٠٧

رصد مخلفات التتراسيكلين في بيض المائدة التي جمعت من منطقة القصيم ، السعودية

ناصر أ. الوابل ١٢٣

تسارع الموت المبرمج بخلايا الدم المتعادلة في الأبقار المصابة بالتهاب حاد بالضرع

١٣٤ محمد ثروت عبد العال

تأثير التحصين ضد الأنهبين على استجابة الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني وأنسجة الخصية
في الأرناب والجردان وذلك باستعمال ثلاثة أنواع من محفزات المناعة

١٤٦ خالد الخريجي

الميكروبيولوجيا

تقييم نشاط الثوم كمضاد للميكروبات ضد E. coli O157:H7

١٥٧ محمد س. العريني

اقتصاد زراعي

البعد الاقتصادي لتنمية القطاع الزراعي في المملكة العربية السعودية

د. عثمان بن سعد النشوان، أ.د. محمد بن حمد القنيبط، أ.د. عادل محمد خليفة غانم

قسم الاقتصاد الزراعي، كلية علوم الأغذية والزراعة، جامعة الملك سعود

(قدمت للنشر في ١٤٣٢/٣/٢٥هـ وقبلت للنشر في ١٤٣٢/٦/٢٧هـ)

ملخص البحث. استهدفت هذا البحث التعرف على البعد الاقتصادي لتنمية القطاع الزراعي ودراسة العوامل المحددة لنصيبه النسبي في الناتج المحلي الإجمالي خلال الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩م. واعتمدت هذه الدراسة في تحقيق أهدافها على التحليل الاقتصادي القياسي وبصفة خاصة معادلات التكامل المشترك وتقدير نموذج جوهانسن، بعد إجراء اختبار جذر الوحدة (ADF).

وأسفرت هذه الدراسة عن مجموعة من النتائج، أهمها:

- ١- تراجع الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي (نصيبه النسبي في الناتج المحلي الإجمالي) من ٥,٧٪ عام ٢٠٠٠م، إلى ٤,٨٪ عام ٢٠٠٩م، أي تناقص بمعدل بلغ ١,٧٥٪ سنوياً، وبالتالي بلغت محصلة درجة النمو في القطاع الزراعي - ٠,٨ خلال الفترة ٢٠٠٠ - ٢٠٠٩م.
- ٢- حقق القطاع الزراعي الاكتفاء الذاتي لكل من البطاطس والتمور وبيض المائدة والحليب الطازج، في حين تراجعت نسبة الاكتفاء الذاتي للقمح من ١٠٠٪ عام ٢٠٠٠م، إلى ٤٥٪ عام ٢٠٠٩م، نظراً لصدور قرار مجلس الوزراء رقم (٣٣٥).

- ٣- يعتبر النصيب النسبي للقطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات الإجمالية من أهم العوامل المحددة للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي، إذ تبين أن تغيراً مقداره ١٠٪ لكل من النصيب النسبي للقطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات الإجمالية، يؤدي إلى تغير في نفس الاتجاه للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي نسبته ٥,٢٪، ٠,٦٪ لكل منهما على التوالي. كما تبين أن تغيراً مقداره ١٠٪ لكل من المساحة المحصولية والعمالة الزراعية والمياه المستخدمة في الأغراض الزراعية، يؤدي إلى تغير في نفس الاتجاه لقيمة الناتج الزراعي نسبته ٢٨,٩٪، ١٥,٩٪، ٣,٥٪ على التوالي.

- ٤- توصي هذه الدراسة بضرورة تحسين كفاءة استخدام الموارد الاقتصادية الزراعية وخاصة الموارد المائية التي تتسم بالندرة النسبية ومن ثم زيادة قيمة الناتج الزراعي وأهميته النسبية في إجمالي الناتج المحلي.
- الكلمات المفتاحية:** القطاع الزراعي، درجة التنمية، الحجم الاقتصادي.

مقدمة

اهتمت الدولة بتنمية القطاع الزراعي وحرصت على تحقيق العديد من الأهداف الإستراتيجية أهمها ما يلي: (١) تشجيع القطاع الخاص في إحداث التنمية الزراعية، (٢) المساهمة في تحقيق الأمن الغذائي، (٣) الاستفادة من الميزة النسبية لمختلف المناطق الإنتاجية بالمملكة، (٤) نقل وتوطين التقنيات الحديثة، (٥) تحقيق التنمية الاجتماعية. ولقد حقق القطاع الزراعي العديد من الإنجازات أهمها ما يلي: (١) تطوير البنية الأساسية من خلال إنشاء مشاريع السدود لتنمية الموارد المائية ومشاريع الآبار الحكومية والأهلية ومشاريع محطات التحلية ومياه الصرف الصحي المعالجة، بالإضافة إلى مشاريع صوامع الغلال ومشاريع الطرق الزراعية التي تربط بين مناطق الإنتاج الزراعي ومراكز التسويق، (٢) توطيد التقنية الميكانيكية والكيميائية والحيوية، الأمر الذي انعكس في رفع معدلات نمو الإنتاج والإنتاجية في القطاع الزراعي، (٥) المساهمة في تنويع مصادر الدخل، (٦) زيادة معدلات الاكتفاء الذاتي من الغذاء وخاصة القمح والتمور والحليب والبيض وبعض الخضروات (وزارة الزراعة، ٢٠٠٧م).

وبالرغم من الإنجازات التي حققها القطاع الزراعي، فقد برز عدد من التحديات والمعوقات التي ينبغي معالجتها حتى لا تحول دون تحقيق التنمية الزراعية المستدامة وأهمها اختلال التوازن الإقليمي لتوزيع القروض الزراعية بين المناطق الإنتاجية، ندرة الموارد المائية وعدم زيادة المعروض منها، وتراجع المساحة المحصولية خلال السنوات الأخيرة؛ وكل هذه المتغيرات أدت إلى تراجع الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي، أي نصيبه النسبي في الناتج المحلي الإجمالي.

الأهداف البحثية

استهدف هذا البحث بصفة أساسية التعرف على البعد الاقتصادي لتنمية القطاع الزراعي وذلك من خلال دراسة الأهداف الفرعية التالية :

١ - قياس مؤشرات ودرجة التنمية في القطاع الزراعي خلال الفترة ٢٠٠٠-٢٠٠٩م.

٢ - دراسة العوامل المحددة للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي خلال نفس الفترة المشار إليها آنفاً.

٣ - تقدير دالة الإنتاج للقطاع الزراعي في المملكة العربية السعودية خلال الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩م.

الأسلوب البحثي

اعتمدت هذه الدراسة في تحقيق أهدافها على النماذج والأساليب التالية :

١ - مؤشرات تنمية القطاع الزراعي وأهمها نصيبه النسبي في الناتج المحلي الإجمالي ونصيبه النسبي في الاستثمارات والعمالة الزراعية ونسب الاكتفاء الذاتي لأهم السلع الزراعية.

٢ - استخدام مقدار التغير في الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي (نصيبه النسبي في الدخل المحلي الإجمالي) كمؤشر لقياس درجة النمو في القطاع الزراعي خلال فترة الدراسة. فإذا كانت محصلة التغير في الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي موجبة، فإن ذلك يشير إلى حدوث نمو اقتصادي زراعي على حساب القطاعات الاقتصادية الأخرى، أما إذا كانت المحصلة سالبة فإن ذلك يعني تراجع مساهمة القطاع الزراعي في الدخل المحلي الإجمالي، وبالتالي زيادة مساهمة القطاعات الاقتصادية الأخرى (الإمام، ٢٠٠٤م).

٣- معادلات التكامل المشترك لتقدير دالة الإنتاج للقطاع الزراعي خلال الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩ م، حيث أمكن التعبير عنها بالعلاقة التقنية التالية:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, x_4)$$

حيث إن:

y قيمة الناتج الزراعي بالأسعار الجارية مقدرة بالمليون ريال.

X1 المساحة المحصولية مقدرة بالألف هكتار.

X2 العمالة الزراعية مقدرة بالألف عامل.

X3 الاستثمارات الزراعية مقدرة بالمليون ريال.

X4 كمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية مقدرة بالمليار م^٣.

وتعتمد هذه الدراسة في تقدير دالة الإنتاج للقطاع الزراعي على تحليل بيانات السلاسل الزمنية والكشف عن استقرار المتغيرات، باستخدام اختبارات جذر الوحدة وأهمها اختبار ديكي - فوللر الموسع (Phillips and Person, 1988) (ADF). ولأهمية تحديد الفجوة الزمنية المستخدمة في اختبارات جذر الوحدة، فقد تمت الاستفادة من معيار Akiake Information Criterion في اختبار ديكي - فوللر الموسع - Dickey Fuller للتصحيح في حالة التباين المتغير والارتباط الذاتي. وفي حالة قبول فرضية العدم (عدم استقرار متغيرات النموذج) يتم تحديد درجة التكامل للمتغيرات التي يتضمنها النموذج. فإذا كانت السلسلة الزمنية مستقرة عند الفروق الأولى تكون السلسلة الزمنية متكاملة من الدرجة الأولى وبالتالي يصعب الوصول إلى علاقة طويلة الأجل بين متغيرات الدراسة (Dickey and Fuller, 1979).

ويستخدم تحليل التكامل المشترك co-integration لاختبار العلاقة السببية بين المتغيرات واتجاهها في المدى الزمني الطويل. ويقدم تحليل التكامل المشترك دعماً للنظرية

الاقتصادية من خلال رصد العلاقة بين المتغيرات الاقتصادية في إطار إحصائي، فمن منظور اقتصادي، فإن بعض المتغيرات تتحرك بانتظام بمرور الوقت، على الرغم من أنها تتسم بشكل منفرد بالتذبذب العشوائي، لذا فإن تحليل التكامل المشترك يعد إحدى الأدوات المهمة عند دراسة العلاقة بين المتغيرات الاقتصادية على المدى الطويل، بالإضافة إلى أنه يساعد على تحديد مستوى التوازن بين البيانات غير المستقرة، وتلك التي تتسم بالثبات. ويرتكز تعريف التكامل المشترك على أنه إذا كان بيانات المتغيرات Y, X متكاملة من الدرجة نفسها، فيمكن استخدام تحليل التكامل المشترك لاختبار وجود التوازن طويل الأجل بين بيانات السلاسل الزمنية غير المستقرة عند مستوياتها، فعلى سبيل المثال، يوجد تكامل مشترك بين بيانات السلاسل الزمنية المتكاملة من الدرجة الأولى إذا كانت سلسلة البواقي الناتجة من نموذج العلاقة الخطية بين المتغيرين متكاملة من الدرجة صفر، فهذا يعني وجود علاقة توازنية بين بيانات السلاسل الزمنية في الأجل الطويل على الرغم من وجود اختلال في الأجل القصير.

وقد تمكن Engle and Granger من إثبات أنه يمكن استخدام سلسلتين متكاملتين من الدرجة الأولى دون التضحية بالعلاقة طويلة الأجل وذلك من خلال تحليلات التكامل المشترك Co-integration. وتتم تحليلات التكامل المشترك بطريقتين هما: (١) اختبار استقرار بواقي معادلة التكامل المشترك ذو المرحلتين، فإذا كانت البواقي متكاملة من الدرجة صفر، أي ساكنة فإن السلسلة الزمنية تكون متكاملة تكاملاً مشتركاً، أي يوجد علاقة طويلة الأجل بينهما (Engle and Granger, 1987) وفي حالة النماذج المتعددة (أكثر من متغيرين) فيتم استخدام اختبار Johansen - Juselius الذي ينطوي على تقدير نموذج متجه الانحدار الذاتي Vector Autoregressive Model (VAR) باستخدام دالة الإمكانية العظمى Maximum Likelihood Function، ويفترض اختبار Johansen - Juselius $(J - J)$ وجود P من المتغيرات الاقتصادية في متجه الانحدار الذاتي من الدرجة K كما يلي (Johansen and Juselius, 1992):

$$X_t = \mu + \pi_1 X_{t-1} + \dots + \pi_k X_{t-k} + e_t$$

حيث إن :

μ تمثل الجزء الثابت

π تمثل مصفوفة من الدرجة P.

ويمكن تحديد عدد متجهات التكامل المشترك باستخدام الاختبارات التالية :

١- اختبار الأثر Trace (مجموع عناصر قطر المصفوفة) ويتم حسابه كما يلي :

$$\lambda_{\text{trace}} = -T \sum_{i=r+1}^P \ln(1 - \lambda_i)$$

٢- اختبار القيمة الذاتية العظمى Maximum Eigen Values Test ويتم حسابه

كما يلي :

$$\lambda_{\text{max}} = -T \ln(1 - \lambda_{r+1})$$

ومن خلال مقارنة نسبة الإمكانية بالقيم الحرجة عند المستوى الإحصائي ١٪،

٥٪ يمكن تحديد عدد متجهات التكامل المشترك، وبالتالي يفضل استخدام نموذج

تصحيح الخطأ (ECM) Error Correction Model. ويمكن صياغة هذا النموذج على

النحو التالي (Johansen, 1996) :

$$y_t = a \Delta X_t + \theta (y_{t-1} - B X_{t-1}) + \mu_t \Delta$$

حيث إن : Δy_t تساوى $(y_t - y_{t-1})$.

ويبين نموذج تصحيح الخطأ أن التغير في y_t لا يعتمد على التغير في X_t فقط،

بل يعتمد أيضاً على مدى البعد عن التوازن بين y_t و X_t . ويتميز نموذج تصحيح الخطأ

بأنه يعكس التغيرات الحركية في النموذج، كما يعكس العلاقة طويلة الأجل دون

فقدان خصائصها.

مصادر البيانات البحثية

- اعتمدت هذه الدراسة في تحقيق أهدافها على البيانات الثانوية المنشورة في كل من :
- ١- الكتاب الإحصائي الزراعي السنوي الذي تصدره إدارة الدراسات والتخطيط والإحصاء التابعة لوزارة الزراعة.
 - ٢- التقارير السنوية التي تصدرها مؤسسة النقد العربي السعودي.
 - ٣- التقارير السنوية التي يصدرها صندوق التنمية الزراعية.

النتائج البحثية

أولاً: قياس مؤشرات التنمية ودرجة النمو في القطاع الزراعي

- بدراسة تطور مؤشرات التنمية في القطاع الزراعي بالملكة العربية السعودية خلال الفترة ٢٠٠٠-٢٠٠٩ م، يتضح من البيانات الواردة بالجدول رقم (١) ما يلي :
- ١- بالرغم من زيادة قيمة الناتج الزراعي من ٣٥.٧٩ مليار ريال عام ٢٠٠٠ م، إلى ٣٩.٩٨ مليار ريال عام ٢٠٠٩ م، إلا أن مساهمته في الناتج المحلي الإجمالي تراجعت من ٥.٧٪ عام ٢٠٠٠ م، إلى ٤.٨٪ عام ٢٠٠٩ م، أي تراجعت بمعدل بلغ ١.٧٥٪ سنوياً خلال الفترة ٢٠٠٠-٢٠٠٩ م.
 - ٢- ازدادت إنتاجية العامل الزراعي من ٥٠.٩٨ ألف ريال/ عامل عام ٢٠٠٠ م، إلى ٧٨.٣٩ ألف ريال/ عامل عام ٢٠٠٩ م، أي ازدادت إنتاجية العامل الزراعي بمعدل نمو سنوي بلغ ٥.٩٧٪ خلال فترة الدراسة.
 - ٣- حقق القطاع الزراعي الاكتفاء الذاتي لكل من البطاطس والتمور وبيض المائدة والحليب الطازج، في حين تراجعت نسبة الاكتفاء الذاتي للقمح من ١٠٠٪ عام ٢٠٠٠ م، إلى ٤٥٪ عام ٢٠٠٩ م، نظراً لصدور قرار مجلس الوزراء رقم (٣٣٥) وتاريخ ١٤٢٨/١١/٩ هـ والقاضي بوقف المؤسسة العامة لصوامع الغلال ومطاحن الدقيق أن تتوقف عن شراء القمح المنتج محلياً في مدة أقصاها ثمان سنوات بمعدل سنوي ١٢.٥٪، وكذلك الاستمرار في منع تصدير القمح المنتج محلياً. (الأمانة العامة لمجلس الوزراء، ٢٠٠٧ م).

الجدول رقم (١): تطور مؤشرات التنمية في القطاع الزراعي خلال الفترة ٢٠٠٠ - ٢٠٠٩ م.

المؤشر	٢٠٠٠	٢٠٠٩	معدل التغير النسبي % الفترة السنوي
قيمة الناتج الزراعي بالمليار ريال	٣٥,٧٩	٣٩,٩٨	١١,٧٢ - ١,٣٠
معدل النمو السنوي (%)	٣,٩	٠,٦	٨٤,٦٢ - ٩,٤٠
نسبة المساهمة في الناتج المحلي:			
القطاعات غير البترولية	٨,٢	٦,٦	١٩,٥١ - ٢,١٧
إجمالي القطاعات الاقتصادية	٥,٧	٤,٨	١٥,٧٩ - ١,٧٥
متوسط نصيب الفرد من الناتج الزراعي بالآلاف ريال	١,٧٥	١,٥٨	٩,٧١ - ١,٠٨
متوسط إنتاجية العامل الزراعي بالآلاف ريال	٥٠,٩٨	٧٨,٣٩	٥٣,٨ - ٥,٩٧
معدل استخدام الميكنة الزراعية (جرار / ألف هكتار)	١٣,٢٤	٣٠,٩٦	١٣٣,٨٤ - ١٤,٨٧
نسبة الاكتفاء الذاتي (%) :			
القمح	١٠٠	٤٣,٥	٥٦,٥ - ٦,٢٨
الذرة الرفيعة	٩٤	٩٦,٦	٢,٨ - ٠,٣١
إجمالي الحبوب	٢٤	١٣,٢	٤٥,٠ - ٥,٠
البطاطس	١٠١	١٦١,٤	٥٩,٨ - ٦,٦٤
الطماطم	٦٢	٧١,٦	١٥,٥ - ١,٧٢
إجمالي الخضروات	٨٥	٩٨,٤	١٥,٨ - ١,٧٥
التمور	١٠٤	١٠٥,٤	١,٣ - ٠,١٥
المواالح	٢٩	٢٤,١	١٦,٩ - ١,٨٨
إجمالي الفاكهة	٦٢	٦٠,٥	٢,٤ - ٠,٢٧
بيض المائدة	١٠٤	١١٢,٥	٨,٢ - ٠,٩١
الحليب الطازج	١٠١	١٠٤,٩	٣,٩ - ٠,٤٣
اللحوم الحمراء	٤٣	٣٨	١١,٦٣ - ١,٢٩
لحوم الدواجن	٦٥	٤٧,٨	٢٦,٥ - ٢,٩٤
الأسماك	٥٢	٤٧,٨	٨,١ - ٠,٩
إجمالي اللحوم	٦٢	٤٥,٢	٢٧,١ - ٣,٠١

المصدر: جمعت وحسبت من:

- مؤسسة النقد العربي السعودي، الإدارة العامة للأبحاث الاقتصادية والإحصاء، التقرير السنوي السادس والأربعون. ١٤٣١هـ (٢٠١٠م).
- وزارة الزراعة، إدارة الدراسات والتخطيط والإحصاء، الكتاب الإحصائي الزراعي السنوي. أعداد متفرقة للفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩م.

٤- تم قياس درجة النمو في القطاع الزراعي من خلال حساب مقدار التغير في الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي، أي نصيبه النسبي في الناتج المحلي الإجمالي خلال الفترة ٢٠٠٠ - ٢٠٠٩ م. ويتضح من استعراض البيانات الواردة بالجدول رقم (٢)، أن الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي تراوح بين حد أدنى بلغ ٤,٧٪ وحد أعلى بلغ ٥,٧٪، بمتوسط سنوي يقدر بنحو ٥,٢٪ خلال فترة الدراسة. أما فيما يتعلق بدرجة النمو في القطاع الزراعي، فقد تبين أنه حدث تراجع لنمو القطاع الزراعي خلال معظم سنوات فترة الدراسة فيما عدا عامي ٢٠٠٠، ٢٠٠٩ م. وبصفة عامة بلغت محصلة درجة النمو في القطاع الزراعي - ٠,٨، وهذا يدل على تراجع الأهمية الاقتصادية للقطاع الزراعي في الناتج المحلي الإجمالي (GDP) خلال الفترة ٢٠٠٠ - ٢٠٠٩ م.

الجدول (٢). قياس درجة النمو في القطاع الزراعي السعودي خلال الفترة ٢٠٠٠-٢٠٠٩ م.

السنة	الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي (%)	الحجم الاقتصادي لبقية القطاعات (%)	درجة النمو في القطاع الزراعي
٢٠٠٠	٥,٧	٩٤,٣	٠,١
٢٠٠١	٥,٧	٩٤,٣	٠
٢٠٠٢	٥,٧	٩٤,٣	٠
٢٠٠٣	٥,٤	٩٤,٦	- ٠,٣
٢٠٠٤	٥,٢	٩٤,٨	- ٠,٢
٢٠٠٥	٥,١	٩٤,٩	- ٠,١
٢٠٠٦	٤,٩	٩٥,١	- ٠,٢
٢٠٠٧	٤,٨	٩٥,٢	- ٠,١
٢٠٠٨	٤,٧	٩٥,٣	- ٠,١
٢٠٠٩	٤,٨	٩٥,٢	٠,١
الإجمالي	-	-	- ٠,٨

المصدر: جمعت وحسبت من مؤسسة النقد العربي السعودي، الإدارة العامة للأبحاث الاقتصادية والإحصاء. التقرير السنوي السادس والأربعون. ١٤٣١هـ (٢٠١٠م).

ثانياً: العوامل الاقتصادية المحددة للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي

يتحدد الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي (نصيبه النسبي في الدخل المحلي الإجمالي) بمجموعة من العوامل أهمها: نصيبه النسبي من العمالة الكلية (x_1)، نصيبه النسبي من الاستثمارات الإجمالية (x_2)، متوسط نصيب الوحدة الأرضية من كمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية (x_3). وباستعراض البيانات المتعلقة باختبار جذر الوحدة (اختبار ديكي فولر الموسع ADF) الواردة بالجدول رقم (٣)، يتضح أن متغير متوسط نصيب الوحدة الأرضية من كمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية لا يحتوي على جذر الوحدة، أي مستقر في المستوى. أما بقية المتغيرات (النصيب النسبي للقطاع الزراعي في الدخل المحلي الإجمالي، وكذلك نصيبه النسبي من العمالة والاستثمارات الإجمالية) فهي تحتوي على جذر الوحدة، أي أنها غير مستقرة في المستوى، إذ أن قيم (t) المحسوبة تقل عن القيم الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪. وبأخذ الفروق الأولى للمتغيرات المستخدمة في التقدير، أتضح أن جميعها أصبحت مستقرة، أي أنها لا تحتوي على جذر الوحدة، حيث أن قيم (t) المحسوبة أصبحت أكبر من القيم الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪ أو ١٪. ومن ثم تكون المتغيرات متكاملة من الدرجة الأولى ومستقرة مما يبرر المضي قدماً في إجراء التكامل المشترك. وقد تم استبعاد متغير متوسط نصيب الوحدة الأرضية من كمية المياه، نظراً لأن اختبارات التكامل المشترك تتطلب أن تكون المتغيرات جميعها متكاملة من نفس الدرجة.

الجدول رقم (٣). اختبار جذر الوحدة (ديكي فوللر الموسع) للمتغيرات المحددة للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي.

الخصائص	مستوى المعنوية	Intercept	Trend and intercept	None
القيم الحرجة	١٪	- ٣.٧١	- ٤.٤١	- ٢.٦٦
المتغيرات	٥٪	- ٢.٩٨	- ٣.٦٢	- ١.٩٥
	١٠٪	- ٢.٦٣	- ٣.٢٥	- ١.٦١
المستوى	قيمة (t)	- ١.٩١	- ٣.٢٥	- ١.٢٩
نسبة الدخل الزراعي	قيمة معيار (AIC)	- ٢.٥٨	- ٢.٥٥	- ٢.٥٢
للدخل المحلي	الفروق الأولى	- ٤.٧٨	- ٤.٦٦	- ٤.٧١
الإجمالي	قيمة معيار (AIC)	- ٢.٤٤	- ٢.٣٧	- ٢.٤٩
المستوى	قيمة (t)	- ٠.٢٥	- ١.٩٨	- ٣.١٣
نسبة العمالة الزراعية	قيمة معيار (AIC)	- ٤.٨٠	- ٤.٨٩	- ٤.٨٨
للعامة الكلية	الفروق الأولى	- ٤.٦٠	- ٤.٥٣	- ٣.٦٥
	قيمة معيار (AIC)	- ٤.٧٧	- ٤.٦٩	- ٤.٦٤
نسبة الاستثمارات	المستوى	- ١.٤٣	- ٢.٥٤	- ٠.٤٩
الزراعية	قيمة معيار (AIC)	- ٠.٠٣	- ٠.١٢	- ٠.٠٣
للاستثمارات	الفروق الأولى	- ٣.٤٣	- ٣.٢٠	- ٣.٥٢
الإجمالية	قيمة معيار (AIC)	- ٠.٠٢	- ٠.٠٢	- ٠.١٢
المستوى	قيمة (t)	- ٦.٦٥	- ٦.٨٣	- ٠.٠٦
متوسط نصيب	قيمة معيار (AIC)	- ٤.٨٦	- ٤.٨٥	- ٣.٩٥
الوحدة الأرضية من	الفروق الأولى	- ٥.٨١	- ٥.٥٥	- ٦.٠١
كمية المياه	قيمة معيار (AIC)	- ٤.٤١	- ٤.٣٢	- ٤.٥٠

المصدر: جمعت وحسبت من التحليل الإحصائي للمتغيرات الاقتصادية الواردة بهذه الدراسة.

وبإجراء اختبار Johansen and Juselius للتكامل المشترك لتقدير دالة الحجم الاقتصادي القطاع الزراعي، يتضح من نتائج اختباري الأثر والقيمة الذاتية العظمى الواردة بالجدول رقم (٤) رفض فرضية العدم القائلة بعدم وجود التكامل المشترك بين المتغيرات عند مستوى معنوية ٥٪، حيث أن القيمة المحسوبة لاختبار الأثر وقدرها ٣٣,٩٦ أكبر من القيمة الحرجة البالغة ٢٩,٦٨. أما بالنسبة للقيمة التالية لها وقدرها ٨,٠١ تقل عن القيمة الحرجة البالغة ١٥,٤١ وبالتالي فإن اختبار الإمكانية العظمى يدل على عدم رفض فرضية العدم القائلة بوجود متجه وحيد على الأكثر للتكامل المشترك. كما أعطى اختبار القيمة الذاتية العظمى نفس نتائج اختبار الأثر.

الجدول رقم (٤). اختبار جوهانسن للتكامل المشترك لدالة الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي.

فرضية العدم لمتجه التكامل Vector	القيمة الذاتية Eigen value	اختبار الأثر Trace statistic	القيمة الذاتية العظمى Maximum Eigen value statistic	القيمة الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪ اختبار الأثر	اختبار القيمة الذاتية العظمى
$\diamond R = 0$	٠,٦٤	٣٣,٩٦	٢٥,٩٥	٢٩,٦٨	٢٠,٩٧
$R \leq 1$	٠,٢٧	٨,٠١	٧,٨٩	١٥,٤١	١٤,٠٧
$R \leq 2$	٠,٠٠٥	٠,١٢	٠,١٢	٣,٧٦	٣,٧٦

• تشير إلى رفض فرضية العدم عند مستوى معنوية ٥٪.

وبتقدير نموذج متجه الانحدار الذاتي للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي بطريقة

Maximum Likelihood خلال الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩ م، وأمکن التعبير عنه بالمعادلة التالية :

$$\text{Log yt} = -0.44 + 0.68 \text{ logyt-1} - 0.19 \text{ logyt-2} + 0.52 \text{ logx1t} + 0.06 \text{ logx2t}$$

$$(0.73) \quad (0.21) \quad (0.20) \quad (0.22) \quad (0.04)$$

$$R^2 = 0.70 \quad F = 11.26 \quad \text{log likelihood} = 37.20$$

ويتضح من الملامح الإحصائية للنموذج المقدر أن جميع المتغيرات المستقلة بدرجة معنوية وذات إشارة مطابقة لافتراضات النظرية الاقتصادية. وتبين أن زيادة قدرها ١٠٪ في كل من نصيب القطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات الإجمالية تؤدي إلى زيادة الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي (نصيبه النسبي في الدخل المحلي الإجمالي) بنسبة ٥,٢٪، ٠,٦٪ لكل منهما على التوالي. وتشير الأرقام بين الأقواس إلى قيم الأخطاء المعيارية وهي غير معنوية عند المستوى الاحتمالي ٥٪، كما بلغت قيمة log likelihood نحو ٣٧,٢. كما تبين أيضاً أن المتغيرات المستقلة التي يتضمنها النموذج تفسر نحو ٧٠٪ من التغيرات التي حدثت في نصيب القطاع الزراعي في الدخل المحلي الإجمالي، أما بقية التغيرات (٣٠٪) تعزى إلى عوامل أخرى لا يتضمنها النموذج.

رابعاً: تقدير دالة الإنتاج للقطاع الزراعي باستخدام معادلات التكامل المشترك

تحدد قيمة الناتج الزراعي بالأسعار الجارية مقدرة بالمليون ريال (y1) بمجموعة من العوامل الاقتصادية الزراعية أهمها:

- ١ - الأرض الزراعية ممثلة في المساحة المحصولية مقدرة بالألف هكتار (X1).
- ٢ - العمالة الزراعية مقدرة بالألف عامل (X2).
- ٣ - الاستثمارات الزراعية مقدرة بالمليون ريال ((X3).
- ٤ - كمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية مقدرة بالمليار م^٣ (X4).

اختبار استقرار وسكون المتغيرات (اختبار جذر الوحدة)

تم استخدام الاختبارات الكمية ومنها اختبار ديكي فوللر الموسع - Dickey (ADF) Fuller في الكشف عن استقرار وسكون المتغيرات أو السلاسل الزمنية. وقد تم الاستغناء عن اختبار ديكي فوللر البسيط نظراً لعدم أخذه أو تجاهله الارتباط الذاتي في الخطأ العشوائي وهذا يؤدي إلى عدم اتسام تقديرات المربعات الصغرى لمعادلة الانحدار بالكفاءة.

وباستعراض البيانات المتعلقة باختبار جذر الوحدة (اختبار ديكي فوللر الموسع ADF) الواردة بالجدول رقم (٥)، يتضح أن جميع المتغيرات المستخدمة في التقدير تحتوي على جذر الوحدة، أي أنها غير مستقرة في المستوى، إذ أن قيم (t) المحسوبة تقل عن القيم الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪. وبأخذ الفروق الأولى للمتغيرات المستخدمة في التقدير، أتضح أن جميعها أصبحت مستقرة، أي أنها لا تحتوي على جذر الوحدة، حيث إن قيم (t) المحسوبة أصبحت أكبر من القيم الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪ أو ١٪ ومن ثم تكون المتغيرات متكاملة من الدرجة الأولى ومستقرة مما يبرر المضي قدماً في إجراء التكامل المشترك.

الجدول رقم (٥). اختبار جذر الوحدة (ديكي فوللر الموسع ADF) لأهم المتغيرات الاقتصادية الزراعية.

الخصائص	مستوى المعنوية	Intercept	Trend and Intercept	None
القيم الحرجة	١٪	- ٣.٧١	- ٤.٣٥	- ٢.٦٦
	٥٪	- ٢.٧٨	- ٣.٥٩	- ١.٩٥
	١٠٪	- ٢.٦٣	- ٣.٢٣	- ١.٦١
المتغيرات	قيمة (t)	- ١.٦٥	- ٣.١٠	٣.١٣
	قيمة معيار (AIC)	- ٠.١٦	- ٠.٣٨	- ٠.٠٨
	قيمة (t)	- ٥.٧٠	- ٥.٦٥	- ٤.٣٤
الدخل الزراعي بالمليون ريال	قيمة معيار (AIC)	- ٠.١٧	- ٠.١٢	- ٠.٠٥
	قيمة (t)	- ٠.٢٥	- ١.٨٣	٣.٠٢
	قيمة معيار (AIC)	- ٥.١١	- ٥.١٧	- ٥.١٨
المساحة المحصولية بالألف هكتار	قيمة (t)	- ٤.٣٥	- ٤.٢٣	- ١.٨٨
	قيمة معيار (AIC)	- ٥.٠٦	- ٤.٩٨	- ٤.٩٦
	قيمة (t)	٠.٣٧	- ٢.٨٩	- ٤.٠٧
العمالة الزراعية بالألف عامل	قيمة معيار (AIC)	- ٥.٥٠	- ٥.٦٨	- ٥.٥٧
	قيمة (t)	- ٦.٢٤	- ٦.٣٦	- ٤.٧٤
	قيمة معيار (AIC)	- ٥.٦٧	- ٥.٦٥	- ٥.١١

تابع الجدول رقم (٥)

الخصائص	مستوى المعنوية	Intercept	Trend and Intercept	None
الاستثمارات الزراعية بالمليون ريال	المستوى	قيمة (t) قيمة معيار (AIC)	- ١.١٧ ٠.٣١	- ٢.٢٦ ٠.٣٢
كمية المياه المستخدمة بالمليار م ^٣	المستوى	قيمة (t) قيمة معيار (AIC)	- ٣.١٩ ٠.٢٩	- ٣.١٢ ٠.٣٥
المستوى	المستوى	قيمة (t) قيمة معيار (AIC)	- ٠.٧٢ ٣.٧٥	- ٢.٨٤ ٣.٩٥
المستوى	المستوى	قيمة (t) قيمة معيار (AIC)	- ٣.٢٧ ٣.٦٥	- ٤.٦٦ ٣.٦٢

المصدر: جمعت وحسبت من التحليل الإحصائي للمتغيرات الاقتصادية الواردة بهذه الدراسة.

اختبار جوهانسن للتكامل المشترك

يفضل استخدام أسلوب الإمكانات العظمى Likelihood and Ratio Maximam Eigen value المقترح من قبل (Johansen and Juselius) عندما يزيد عدد المتغيرات محل الدراسة عن متغيرين، لإمكانية وجود أكثر من متجه للتكامل المشترك. ولا تقتصر ميزة اختبار جوهانسن على حالة المتغيرات المتعددة، بل أن منهج جوهانسن يفضل على أسلوب انجل - جرانجر ذات الخطوتين، حتى في حالة النموذج البسيط (يتكون من متغيرين أحدهما تابع والآخر مستقل).

وبإجراء اختبار Johansen and Juselius للتكامل المشترك لتقدير دالة الإنتاج للقطاع الزراعي، يتضح من نتائج اختباري الأثر والقيمة الذاتية العظمى الواردة بالجدول رقم (٦) رفض فرضية العدم القائلة بعدم وجود التكامل المشترك بين المتغيرات عند مستوى معنوية ٥٪، حيث أن القيمة المحسوبة لاختبار الأثر وقدرها ٨٠,٦٩ أكبر من القيمة الحرجة البالغة ٦٨,٥٢. أما بالنسبة للقيمة التالية لها وقدرها ٣٨,٦٤ تقل عن القيمة الحرجة البالغة ٤٧,٢١ وبالتالي فإن اختبار الإمكانات العظمى

يدل على عدم رفض فرضية العدم القائلة بوجود متجه وحيد على الأكثر للتكامل المشترك. كما أعطى اختبار القيمة الذاتية العظمى نفس نتائج اختبار الأثر. الجدول رقم (٦): اختبار جوهانسن للتكامل المشترك لدالة الإنتاج للقطاع الزراعي.

فرضية العدم لمتجه التكامل Vector	القيمة الذاتية Eigen Value	اختبار الأثر Trace Statistic	القيمة الذاتية العظمى Maximum Eigen Value Statistic	القيمة الحرجة عند مستوى معنوية ٥٪ اختبار الأثر	اختبار القيمة الذاتية العظمى
$\diamond R = 0$	٠,٨١	٨٠,٦٩	٤٢,٠٥	٦٨,٥٢	٣٣,٤٦
$R \leq 1$	٠,٦٢	٣٨,٦٤	٢٤,٤٥	٤٧,٢١	٢٧,٠٧
$R \leq 2$	٠,٣٥	١٤,١٩	١٠,٩٣	٢٩,٦٨	٢٠,٩٧
$R \leq 3$	٠,٠٧	٣,٢٦	١,٩٥	١٥,٤١	١٤,٠٧
$R \leq 4$	٠,٠٥	١,٣١	١,٣١	٣,٧٦	٣,٧٦

* تشير إلى رفض فرضية العدم عند مستوى معنوية ٥٪.

وبتقدير نموذج متجه الانحدار الذاتي لدالة الإنتاج للقطاع الزراعي بطريقة Maximum Likelihood خلال الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩ م، وأمكن التعبير عنه بالمعادلة التالية:

$$\text{Log yt} = -34.75 + 0.68 \text{ logyt-1} - 0.06 \text{ logyt-2} + 2.89 \text{ logx1t} + 1.59 \text{ logx2t}$$

$$(6.15) (0.24) (0.25) (0.09) (0.38)$$

$$+0.35 \text{ logx4t}$$

$$(0.19)$$

$$R^2 = 0.97 \quad F = 114.80 \quad \log \text{ likelihood} = 6.30$$

ويتضح من الملامح الإحصائية للنموذج المقدر أن جميع المتغيرات المستقلة بدرجة معنوية وذات إشارة مطابقة لافتراضات النظرية الاقتصادية. وتبين أن زيادة المساحة المحصولية (X1) بنسبة ١٠٪ تؤدي إلى زيادة الدخل الزراعي بنسبة ٢٨,٩٪، أما زيادة العمالة الزراعية (X2) بنسبة ١٠٪ تؤدي إلى زيادة الدخل الزراعي بنسبة ١٥,٩٪، كما تبين أيضاً أن زيادة كمية المياه المستخدمة في القطاع الزراعي بنسبة ١٠٪

تؤدي إلى زيادة الدخل الزراعي بنسبة ٣,٥٪. وتشير الأرقام بين الأقواس إلى قيم الأخطاء المعيارية وهي غير معنوية عند المستوى الاحتمالي ٥٪، كما بلغت قيمة \log likelihood نحو ٦,٣. كما تفسر المتغيرات المستقلة التي يتضمنها النموذج نحو ٩٧٪ من التغيرات التي حدثت في الدخل للقطاع الزراعي، أما بقية التغيرات (٣٪) تعزى إلى عوامل أخرى لا يتضمنها النموذج.

المناقشة

مما لا شك فيه أن القطاع الزراعي يقوم بدور مهم في التنمية الاقتصادية والاجتماعية، إذ يقوم بتوفير السلع والمنتجات الغذائية والوفاء بنسبة مهمة من الاحتياجات الاستهلاكية المتزايدة للسكان البالغ عددهم ٢٥,٣٧ مليون نسمة عام ٢٠٠٩م. وفي ضوء الروابط الأمامية والخلفية للقطاعين الزراعي والصناعي، يقوم القطاع الزراعي بإمداد القطاع الصناعي بالمواد الخام اللازمة للتصنيع، كما يساهم القطاع الزراعي في توفير العملات الأجنبية من خلال التصدير لبعض السلع والمنتجات الزراعية، كما يعتبر القطاع الزراعي موظفاً كبيراً للعمالة غير الماهرة، إذ استوعب ٥٩٢,٣ ألف عامل عام ٢٠٠٩م، كما استحوذ على قدر من الائتمان المصرفي بلغ ٨,٧ مليار ريال يمثل ١,٢٪ من إجمالي الائتمان الممنوح للأنشطة الاقتصادية في المملكة العربية السعودية عام ٢٠٠٩م (مؤسسة النقد العربي السعودي، ٢٠١٠م).

ومن خلال التحليل والنماذج الاقتصادية المقدرة في هذه الدراسة، أتضح أن نصيب القطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات الإجمالية من أهم العوامل المحددة للحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي، أي نصيبه النسبي في إجمالي الناتج المحلي، إذ تبين أن زيادة قدرها ١٠٪ في كل من نصيب القطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات

الإجمالية تؤدي إلى زيادة الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي بنسبة ٥,٢٪، ٠,٦٪ لكل منهما على التوالي، كما أتضح أن المساحة المحصولية والعمالة الزراعية وكمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية من أهم العوامل المحددة لقيمة الناتج الزراعي، إذ تبين أن زيادة قدرها ١٠٪ في كل من المساحة المحصولية والعمالة الزراعية والمياه المستخدمة في الأغراض الزراعية، تؤدي إلى زيادة قيمة الناتج الزراعي بنسبة ٢٨,٩٪، ١٥,٩٪، ٣,٥٪ على التوالي.

ومما سبق يتضح أن زيادة الحجم الاقتصادي للقطاع الزراعي تتطلب زيادة نصيب القطاع الزراعي من العمالة والاستثمارات الإجمالية، كما أن زيادة قيمة الناتج الزراعي تتطلب زيادة كل من المساحة المحصولية والعمالة الزراعية وكمية المياه المستخدمة في الأغراض الزراعية. ومما لا شك فيه أن تحسن كفاءة استخدام الموارد الاقتصادية الزراعية (الموارد الأرضية والعمالة الزراعية والموارد المائية والموارد الرأسمالية) يؤدي إلى زيادة الإنتاجية والعائد للموارد الاقتصادية المستخدمة في القطاع الزراعي، ومن خلال النتائج التي أسفرت عنها هذه الدراسة، فإنها توصي بضرورة تحسين كفاءة استخدام الموارد الاقتصادية الزراعية وخاصة الموارد المائية التي تتسم بالندرة النسبية ومن ثم زيادة قيمة الناتج الزراعي وأهميته النسبية في إجمالي الناتج المحلي.

المراجع

مراجع باللغة العربية

الإمام، عماد. تحديات النمو في الاقتصاد العربي الحديث. المعهد العربي للتخطيط، الكويت، ٢٠٠٤م.

الأمانة العامة لمجلس الوزراء. قرار رقم ٣٣٥ وتاريخ ٩ / ١١ / ١٤٢٨هـ.

صندوق التنمية الزراعية. التقارير السنوية. أعداد متفرقة، الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩م.
مؤسسة النقد العربي السعودي، الإدارة العامة للأبحاث الاقتصادية والإحصاء. التقرير
السنوي السادس والأربعون. ١٤٣١هـ (٢٠١٠م).
والتر فاندل. السلاسل الزمنية من الوجهة التطبيقية ونماذج بوكس - جنكنز. ترجمة
عبد المرضي حامد عزام، مراجعة أحمد حسين هارون، دار المريخ للنشر، المملكة
العربية السعودية، الرياض، ١٩٩٢م.
وزارة الزراعة، إدارة الدراسات والتخطيط والإحصاء. الكتاب الإحصائي الزراعي
السنوي. أعداد متفرقة، الفترة ١٩٩٠ - ٢٠٠٩م.
وزارة الزراعة، إدارة العلاقات العامة والإعلام الزراعي. لمحة عن التنمية الزراعية في
المملكة العربية السعودية. ١٤٢٨هـ (٢٠٠٧م).

Dickey, D. and Fuller, W. Distribution of the estimators for auto-regressive time series with a unit root. Journal of the American Statistical Association, Vol. 74, 1979, 427-431.

Engle, R. and Granger, Co-integration and Error Correction: Estimation and Testing, Econometrica, Vol. 55, 1987, 251-276.

Johansen, S. and Juselius, K. Testing Structural hypothesis in a multivariate Co-integration analysis of the PPP and the UIP for UK, Journal of Econometrica, Vol. 53, 1992, 211-244.

Johansen, S. Likelihood – Based inference in Conintegrated Vector Auto-Regressive models, Oxford University Press, 1996.

Makridakis, S.; Wheelwrights, S.; and McGee, V.E. Forecasting Methods and Application. 2nd ed New York: Johns Wiley and Sons, 1993.

Phillips, P.C.B., and P. Person. Testing for unit Root in Time Series Regression, Biometrika, Vol. 75, 1988, 335-346.

The Economic Aspects for Development of the Agricultural Sector in Saudi Arabia

Dr. Othman S. Nushwan, Dr. Mohamed H. Qunaibet, and Dr. Adel M. Ghanem

College of Food and Agricultural Sciences, King Saud University

Abstract. The Study aimed to identify the economic Aspects for Development of the Agricultural sector and the determinants of the relative share of GDP during the period 1990-2009. This study is based on the achievement of objectives of the econometric analysis, especially co- integration equations and estimate model Johansen, after the unit root test (ADF).

The result of this study on a set of results, including:

1- the Economic size decreased of the agricultural sector from 5.7% to 4.8%, which decreased at a rate of 1.75% per year, and therefore amounted to of the degree of growth -0.8 in the agricultural sector during the period 2000 - 2009.

2- The Agricultural sector has achieved self-sufficiency of each of potatoes, dates, eggs and fresh milk, while the percentage of self-sufficiency for wheat from 100% in 2000, to 45% in 2009.

3 - The relative share of the agricultural sector of Employment and the total investment of the most important determinants of economic size of the Agricultural Sector, as it was found that a change of 10% for each of the relative share of the Agricultural Sector of Employment and gross investment, lead to a change in the same direction of the economic size of the agricultural sector 5.2 %, 0.6% respectively. As it turns out that a change of 10% for each of the cropped area and agricultural employment and water used for agricultural purposes, lead to a change in the same direction of the value of agricultural output rate of 28.9%, 15.9%, 3.5%, respectively.

4- This study recommends the need to improving the efficiency of economic resources, especially water resources are scarce relative and then increase the value of agricultural output and its importance relative to GDP.

Keywords: The Agricultural Sector, the degree of development, Economic size.

إرشاد زراعي

مدى التزام الزراع ببعض إجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات - محافظة الغزالة - منطقة حائل - المملكة العربية السعودية

محمد شايح الشايح

قسم الإرشاد الزراعي والمجتمع الريفي - كلية علوم الأغذية والزراعة ، جامعة الملك سعود

ص.ب. ٢٤٦٠ الرياض ١١٤٥١ ، المملكة العربية السعودية

البريد الإلكتروني malshayaa@ksu.edu.sa

(قدم للنشر ٢٠١١/٢/٢١م وقبل للنشر ٢٠١١/٥/١٠)

ملخص البحث. تستورد المملكة العربية السعودية كميات كبيرة من المبيدات حيث استوردت ٢.١٥ مليون لتر، ٥٩٠ طن بودرة من المبيدات الحشرية، وكذلك ٣٦٠ ألف لتر، و ٦١٣ طن بودرة مبيدات فطرية، و ١.٨ مليون لتر، و ١٤٥ طن بودرة من مبيدات الحشائش لجميع الأغراض لعام ١٤٢٩ / ١٤٣٠ هـ. وهذا يتطلب استخدام هذه الكم بطريقت صحيحة طبقاً لشروط وإجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات. من هنا تتضح أهمية دراسة إجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات ومدى التزام العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية بها بمحافظه الغزالة، بمنطقة حائل.

وتهدف الدراسة بصفة أساسية إلي التعرف على مدى إلمام المبحوثين ببعض إجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية بمنطقة حائل وذلك من خلال تحديد مدى إلمام المبحوثين بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد، تحديد مدى إلمام المبحوثين بطرق التخلص السليم من المبيدات المتبقية وعبواتها، التعرف على المخاطر الصحية التي يتعرض لها المبحوثين ومصادر المعلومات التي يعتمد عليها المبحوثين في تعاملهم مع المبيد.

وتكونت عينة الدراسة من ٢١٣ مزارع يمثلون حوالي ٢٥٪ من مزارعي محافظة الغزاة بمنطقة حائل. وقد أظهرت الدراسة أن ٦١,٥٪ من المبحوثين تقل أعمارهم عن ٤٠ سنة، وبلغ عدد السعوديين منهم ٨٧,٩٪، وأن التخلص من المبيدات يتم بطرق غير آمنة.

وتعد إجراءات السلامة المطبقة منخفضة، ماعدا عدم الرش عند تجمع الأفراد والحيوانات، واستخدام الرش الفراغي، وتخزين المبيد بعيداً عن السكن. ويحصل المبحوثين على معلوماتهم عن المبيدات من بطاقة المبيد ثم الأقارب والأصدقاء. ويرى المبحوثون ضرورة تكثيف التوعية في مجال المبيدات بالمنطقة من خلال الجولات الميدانية خلال فترات المساء لتعليم الزراع الطرق الآمنة والسليمة للتعامل مع المبيدات.

الكلمات المفتاحية:

المقدمة

نتيجة للزيادة السكانية على مستوى العالم، زاد الطلب على الغذاء، مما جعل الرقعة الزراعية تتوسع أفقياً ورأسياً لمواجهة هذا الطلب. التوسع في الإنتاج الرأسي يتم من خلال تكثيف عملية الإنتاج والتي تتطلب زيادة في استخدام المبيدات والأسمدة لرفع كمية الإنتاج. وفي هذا الجانب تمثل الآفات والحشرات والقوارض الزراعية مصدر تهديد للإنتاج الزراعي، بالإضافة إلى خطورتها في نقل العديد من الأمراض والآفات الزراعية وخاصة سوسة النخيل الحمراء في المملكة العربية السعودية. وتعد قلة المعرفة بنوع الإصابة أو الحشرة من أكثر المشاكل التي تواجه المرشد الزراعي في التعامل مع الزراع في هذا الجانب، مما يجعل المزارع يقوم برش كمية كبيرة من المبيدات لتلافي هذه المشاكل الإنتاجية. نقص المعرفة يجعل المزارع يقوم باستخدام أسرع الطرق للمكافحة وذلك بتعدد تطبيق المبيدات وبمجرعات تركيز عالية. ويتم رش المبيدات في معظم المزارع بشكل يومي على مدار العام، ويقوم بتلك المهمة عدد كبير من العمال.

تعتبر المبيدات من أشد المواد الكيميائية خطراً على الإنسان نظراً لسميتها العالية، مما يجعل دراسة التطبيق الآمن لها ذو أهمية عالية. فلا شك أن التعامل مع تلك المواد الخطرة يستدعي أخذ أقصى درجات الحيطة والحذر بالإضافة إلى الإلمام ببعض المعارف والمهارات الأساسية التي تساعد على القيام بالعمل بأمان وبدون أضرار على القائمين بتلك المهمة والتي قد تنتج من التعرض لهذه المواد السامة.

فبالرغم من أن المبيدات لها جانب إيجابي في مساعدة الإنسان في القضاء على الحشرات والآفات، إلا أن الاستخدام غير الرشيد قد يؤدي إلى العديد من المشاكل البيئية والصحية. ومن أهم هذه المشاكل حوادث التلوث الكيميائي نتيجة التعرض للمبيدات. والذي يأخذ صور مختلفة في الضرر نتيجة عدة عوامل منها ما يتعلق بالمبيد

مثل درجة سميته، سرعة تحطمه في البيئة، درجة تطايره، ودرجة تركيزه، ومنها ما يتعلق بطريقة التعرض للمبيد من خلال الجهاز التنفسي، الجهاز العصبي، الجلد، عدد مرات التعرض، ومدى حساسية الشخص لها (Johnson and Easter, 1999). فالهدف من استخدام المبيد هو إيصاله بالتركيز الكافي لقتل الآفة في المكان والزمان المناسبين وبأقل ضرر ممكن على القائمين بتلك العملية وعلى البيئة بشكل عام. ولذلك فإنه لكي تتحقق إجراءات السلامة والتطبيق الآمن للمبيدات لدى العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية، فإنه يستلزم توفر خلفية جيدة للقائمين بتطبيق المبيدات حتى يتمكنوا من الأخذ باحتياطات الأمن والسلامة.

المشكلة البحثية:

المبيدات عبارة عن سموم تؤثر على جميع أجهزة الإنسان، وثبت أنها تسبب أمراضاً خطيرة، كالسرطان، والفشل الكلوي، وتشوه الأجنة، والطفرات الوراثية وغيرها. ولا تقتصر سمية المبيدات على الإنسان فقط بل تؤثر في الكائنات الحية، وذلك عند وصولها بكميات مؤثرة إلى النظام الحيوي الحساس لفعالها، وبالتركيز المؤثر سواء كان ذلك النظام في الحشرة أو الإنسان وسواء كان التعرض لمرة واحدة أو أكثر. وأضاف (Murphy, 1992) أن التعرض للمبيدات بشكل متكرر ومستمر ولفترات طويلة حتى لو كان بجرعات صغيرة يؤدي لمخاطر كبيرة على صحة العاملين والمتناولين للأغذية التي تحتويها حتى لو كانت بجرعات منخفضة. ولذلك فإن الإفراط في استخدام المبيدات يتسبب في مشاكل صحية وبيئية خطيرة. وتعكس الصورة (الشكل رقم ١) مدى نقص المعرفة والمهارات لدى هذا المزارع في التعامل مع المبيد كمثال حي وواقعي لهذه المشكلة.



الشكل رقم (١) الشايح والسرار (٢٠١٠)

حسب تقارير وزارة الزراعة تستورد المملكة كميات كبيرة من المبيدات حيث إستوردت ٢.١٥ مليون لتر، ٥٩٠ طن بودة من المبيدات الحشرية، وكذلك ٣٦٠ ألف لتر، و ٦١٣ طن بودة مبيدات فطرية، و ١.٨ مليون لتر، و ١٤٥ طن بودة من مبيدات الحشائش لجميع الأغراض لعام ١٤٢٩ / ١٤٣٠ هـ (وزارة الزراعة، ١٤٣١ هـ). وتشير الإحصاءات أن ١٤٪ من اصابات العمل في المجال الزراعي ناجمة عن استخدام المبيدات منها ١٠٪ قاتلة (هيئة الري والصرف، ٢٠٠٦ م) ونظراً لكبر حجم الكميات المستوردة من المبيدات يصبح من الضرورة معرفة ما اذا كان يتم استخدام هذه الكميات بطريقة صحيحة طبقاً لشروط وإجراءات السلامة والتطبيق الآمن للمبيدات. وبذلك فإنه تتضح أهمية دراسة مدى الإلتزام بإجراءات السلامة والتطبيق الآمن للمبيدات من قبل العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية.

أهداف الدراسة

تهدف هذه الدراسة بصفة أساسية إلي التعرف على مدى إلمام المبحوثين ببعض إجراءات السلامة والتطبيق الأمن للمبيدات لدى العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية بمحافظة الغزاة بمنطقة حائل وذلك من خلال الأهداف الفرعية التالية :

- ١ - تحديد مدى إلمام المبحوثين بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد.
- ٢ - معرفة الطرق المتبعة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها.
- ٣ - التعرف على المخاطر الصحية التي يتعرض لها المبحوثين.
- ٤ - الطرق المثلى للرقى بالعمل الإرشادي الزراعي في مجال المبيدات
- ٥ - مصادر المعلومات التي يعتمد عليها المبحوثين في تعاملهم مع المبيد.

الدراسات السابقة

تتعدد استخدامات المبيدات والأفراد الذين يقومون بتطبيقها سواء في المنازل ، المزارع ، المباني الحكومية والشركات ، الشوارع والمستنقعات ، وقد قدرت منظمة الصحة العالمية (Van Emden and Service., 2004) عدد الحوادث التي يتعرض لها العاملين في تداول وتطبيق المبيدات بنصف مليون حادث تسمم ، وذلك في عام ١٩٧٣م توفي منهم نسبة ١٪ ، وفي عام ١٩٨٥م زاد العدد إلى ٣ ملايين توفي منهم ٢٢٠ حالة ، بينما انخفض هذا العدد إلى ٢٥٧ ألف حالة عام ١٩٩٩م. ولاشك أن إلمام العاملين في هذا المجال بكيفية التعامل مع هذه المواد الخطرة أمر ضروري للوقاية من مخاطرها ، وهذا ما أظهرته دراسة (Abrams et al., 1991) والتي أجريت على القائمين بتطبيق المبيدات حيث أكدت النتائج عدم الالتزام باحتياطات السلامة وقراءة بطاقة

المعلومات على عبوة المبيد ، وفي دراسة أخرى Rucker *et al.*, (1986) أرجعت ذلك إلى الإهمال وليس للجهل بأضرار المبيدات ، وهذا يتفق مع دراسة (الشايح والسرار، ٢٠٠٧م) من أن درجة تطبيق وسائل السلامة لاتعكس معارف زراع منطقة الخرج العالية بمخاطر المبيد حيث أن ممارساتهم لاتباعاات التعليمات متدنية جداً. يضاف إلى ذلك ما وجدته الدوسري (٢٠٠٢) أن ٥٧,٥ ٪ من العمالة الزراعية في محافظة الخرج بالمملكة العربية السعودية لا يستطيعون القراءة والكتابة وهي نفس منطقة دراسة الشايح والسرار (٢٠٠٧).

وقام Ergonen *et al.*, (2005) بدراسة شاملة عن استخدام المبيدات في البيوت المحمية (الصوب الزجاجية) في تركيا ، حيث قام بمقابلة ١٣١ عاملاً في البيوت المحمية في مقاطعة أزمير حيث اتضح أن ٨٦,٩ ٪ منهم يطبقون المبيدات بأنفسهم ، و ٥٩,٣ ٪ لا يتخذون أي احتياطات عند التطبيق. وظهرت عليهم أعراض مرضية مختلفة مثل الإعياء، الصداع، تغير المزاج، حساسية في العين وحكة مع تغير في البصر، سعال وكانت نسب ظهور هذه الأعراض ٥٦ ٪، ٥٨ ٪، ٥٠ ٪، ٤٧ ٪، ٤٣ ٪ من مجموع أفراد العينة المدروسة على التوالي.

وفي تايلاند وجد Stimamiglio *et al.*, (1998) أن ثلث القائمين بخلط وتطبيق المبيدات في الزراعة ليس لديهم أي خبرة في كيف تتم عمليتا الخلط والتطبيق، وكما أنهم يطبقون المبيدات بمعدلات أعلى من الموصى بها على عبوة المبيد. وأشار Gomes *et al.*, (1999) إلى أن عدد قليل جداً من العاملين في تطبيق المبيدات يرتدون الملابس الواقية في المناطق الاستوائية الحارة. وفي ولاية مينسوتا أوضح Mandel *et al.*, (1996) أن ٩٥ ٪ من القائمين بتطبيق المبيدات يؤمنون بأهمية ارتداء الملابس الواقية و ٨٨ ٪ يعتقدون بأن هناك ضرر من التعرض للمبيدات أثناء عملية التطبيق و ٥٦ ٪ يرتدون

قفازات أثناء التطبيق يخلعها ٢٢ ٪ منهم بعد مرور ٧٥ ٪ من الوقت اللازم لإتمام عملية التطبيق.

وفي منطقة الدوادمي بالمملكة العربية السعودية وجد العتيبي (١٤٢٦ هـ) أن هناك وعي بأهمية تطبيق وسائل السلامة أثناء التعامل مع المبيدات. بينما أوضحت دراسة قام بها الدوسري (٢٠٠٢م) أن ٥٧.٥ ٪ من العاملين في تطبيق المبيدات في مزارع الخرج لا يستطيعون القراءة ولا الكتابة ويعتمدون على خبرتهم في التعامل مع المبيدات. وفي منطقة الرياض أوضح (AL-Sarar – et.al., 2009) أن الغالبية العظمى من العاملين المبحوثين كانت معلوماتهم ضحلة عن التخلص من الفائض من المبيدات والعبوات الفارغة كما ظهرت على العديد من العاملين بعض أعراض السمية المرتبطة بالتعرض المهني للمبيدات.

وتسبب مخلفات المبيدات تلوث التربة والمياه وكذلك للبيئة مما يعني ضرورة الاهتمام بهذا الأمر قبل حدوث كارثة بيئية من خلال تعليم وتدريب وتثقيف العاملين بها (رشوان، ٢٠٠٦). الإرشاد الزراعي له دوراً مهماً في التغيير من خلال تعليم وتدريب الزراع على التكنولوجيا الحديثة (الريماوي وآخرون، ١٩٩٥). وكذلك له دور مهم في فهم مخاطر المبيدات ووضع إستراتيجية تعليمية وتدريبية للزراع للتعامل معها (Pearson, 1987). الإرشاد الزراعي من خلال دراساته يحدد الأولويات لمجتمع الدراسة ومن ثم يتم تصميم البرامج المناسبة لتغيير المعارف او السلوك (الطنوبي، ١٩٩٨). ونظراً لأهمية الإرشاد الزراعي فقد قدمت الوزارة العديد من الخدمات الإرشادية من حقول تدريبية واجتماعات بالزراع ومربي الماشية وكذلك زيارات ميدانية كان الهدف منها خدمة الزراع حسب احتياجاتهم (وزارة الزراعة، ١٤٣١هـ)

الطريقة البحثية

يتكون مجتمع البحث من جميع العمال العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية بمنطقة حائل والبلغ عددهم ٨٢٥ مزارعها وقد عمد الباحث إلى أخذ عينة عشوائية بسيطة Simple Random Sample بلغت ٢١٣ مزارع تمثل حوالي ٢٥٪ من شاملة البحث. واعتمدت هذه الدراسة على استخدام أسلوب المسح (Survey) من خلال استخدام استبانة بالمقابلة الشخصية كوسيلة لجمع البيانات. واستخدمت كل من النسب المئوية والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لإظهار التباين والاختلاف بين العمال الباحثين فيها يتعلق بالصفات الشخصية والاجتماعية والاقتصادية، ومدى التزامهم بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد، وطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواته، والأعراض الصحية، ومصادر المعلومات التي يعتمد عليها الباحثون في تعاملهم مع المبيد. كما تم استخدام معامل الارتباط البسيط ليرسون لمعرفة العلاقة الارتباطية بين بعض الصفات الاجتماعية والاقتصادية للعاملين كمتغيرات مستقلة بكل من: معرفتهم والتزامهم بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد، طرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها، وقد تم تحليل البيانات باستخدام برنامج التحليل الإحصائي للعلوم الاجتماعية SPSS-17.

نتائج البحث ومناقشتها

أولاً: الصفات الشخصية والاجتماعية والاقتصادية.

يتضح من الجدول رقم (١) أن معظم الباحثين العاملين في مجال مكافحة الآفات والحشرات الزراعية بمنطقة حائل (٦١,٥٪) تقل أعمارهم عن ٤٠ سنة في حين بلغ متوسط العمر ٣٦,٩ سنة وانحراف معياري ١١,٠١، وهذا من شأنه أن العمل بحماس والتحمل الميداني وبذل الجهد والمثابرة في الأداء والاستمرارية لمدة أطول. كما أتضح أن غالبية

العاملين (٨٧,٩٪) سعوديون من أصحاب المزارع مما ينعكس إيجاباً على عمل المكافحة ويزيد من فرص نجاح العاملين في أداء مهامهم ، وأن غالبيتهم (٧٨,١٪) متزوجون. كما تشير النتائج (الجدول رقم ١) إلى التباين الواضح في المستويات التعليمية إذ تبين أن ٣٩,٤٪ مستواهم التعليمي من متوسط وما فوق في حين بلغت نسبة الأمية ٢٤٪ وهذا يجعلهم غير مدركين للمعلومات التي تحتويها بطاقة المبيد حتى يمكن الاستفادة منها وهذا التباين يجب أخذه به في الاعتبار عند وضع البرامج التدريبية والإرشادية للعاملين ، وهذا يتفق مع ما وجدته الدوسري (٢٠٠٢) من ضعف المستوى التعليمي لمن يقوم بتطبيق المبيدات في منطقة الخرج.

وتعكس نتائج الدراسة صغر حجم الأسرة حيث تبين أن ٥٠,٤٪ من المبحوثين ذوو أسر صغيرة يقل حجمها عن ٥ أفراد ، و ٣٩,٤٪ ذوو أسر متوسطة يتراوح عدد أفرادها بين ٥ - ٩ أفراد في حين بلغ متوسط حجم الأسرة ٤ أفراد فقط. أما فيما يتعلق بالخبرة في مجال العمل بالمبيدات فتبين أن غالبية العاملين لديهم خبرة طويلة نسبياً في العمل في مجال المبيدات إذ أن ٣٤,٨٪ لديهم خبرة تمتد من ٥ - أقل من ١٠ سنوات ، و ٢٥٪ من العمال لديهم خبرة تزيد عن ١٠ سنوات في حين بلغ متوسط الخبرة ٧,٣ سنة وهذا مما يجعل العامل قادراً على إدراك دورة المتوقع وأدائه وإبداعه. أما المجالات التي يقوم بها العمال المبحوثين في تعاملهم مع المبيد فتبين أن مجالات تطبيق المبيد ، وخلطه ، وغسل الأجهزة بعد التطبيق احتلت المراتب الثلاثة الأولى بنسبة ٨٠,٥٪ ، ٦٢,٥٪ ، و ٦٠,٧٪ على التوالي ، بينما نقل المبيد ، والتخلص من عبوات المبيد الفارغة فقد احتلت المرتبتين الأخيرتين بنسبة ١٧,٢٪ ، ١٢,١٪ فقط على التوالي.

ومن الملاحظ ارتفاع عدد سنوات الخبرة في مجال الزراعة مما يعني أن هذه العينة تعطي حكم جيد عن الممارسات الزراعية المختلفة ، وبلغت نسبة من لهم خبرة في مجال الزراعة أكثر من ١٠ سنوات حوالي ٨٨٪.

الجدول رقم (١) الصفات الشخصية والاجتماعية والاقتصادية للعاملين المبحوثين (ن = ٢١٣)

الصفة	%	الصفة	%
العمر		مجالات عمل المبحوثين في تعاملهم مع المبيد	
أقل من ٣٠ سنة	٣٣,٤	تطبيق المبيد	٨٠,٥
٣٠ - أقل من ٤٠ سنة	٢٨,١	خلط المبيد	٦٢,٥
٤٠ - أقل من ٥٠ سنة	٢٣,٥	غسل الأجهزة بعد التطبيق	٦٠,٧
٥٠ سنة فأكثر	١٥,٠	مجالات أخرى تشمل إشراف وصيانة واستكشاف الحشرات ونقل العمل	٢٤,٤
الجنسية		تخزين المبيد	٢١,١
سعودية	٨٧,٩	نقل المبيد	١٧,٢
بنجلاديشي	٧,٤	التخلص من عبوات المبيد الفارغة	١٢,١
مصري	١,٤	الخبرة في مجال العمل بالمبيدات	
سوداني	١,٢	أقل من ٣ سنوات	٢٠,٣
أردني	٠,٢	٣- أقل من ٥ سنوات	١٩,٩
المستوى التعليمي		٥- أقل من ١٠ سنوات	٣٤,٨
أمي	٢٤,٠	١٠- أقل من ١٥ سنة	١٣,٣
تعليم عام	٧٣,٨	١٥ سنة فأكثر	١١,٧
جامعي	٢,٢		
الحالة الاجتماعية			
متزوج	٧٨,١		
أعزب	١٩,٥		
مطلق	٢,١	حجم الأسرة	
أرمل	٠,٢	أقل من ٥ أفراد	٥٠,٤
الخبرة في مجال العمل بالمبيدات		٥- أقل من ١٠ أفراد	٣٩,٤
أقل من ٣ سنوات	٢٠,٣	١٠ أفراد فأكثر	١٠,٢
٣- أقل من ٥ سنوات	١٩,٩	الخبرة في الزراعة	
٥- أقل من ١٠ سنوات	٣٤,٨	٥ سنوات	٢,٥
١٠- أقل من ١٥ سنة	١٣,٣	٥- ١٠ سنوات	١٠,٣
١٥ سنة فأكثر	١١,٧		٨٧,٢

ثانياً: إجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد.

يعد عدم تطبيق وسائل السلامة أثناء عملية تطبيق المبيد بأنواعها من أكثر المشاكل التي يواجهها الإرشاد الزراعي، ففي دراسات متعددة منه على سبيل المثال Rucker *et al.*, (1986) و (الشايع والسرار، ٢٠٠٧م) والدوسري (٢٠٠٢) تبين أن المستوى المعرفي مقبول في معرفة الطرق السليمة ولآمنة في التعامل فيما يعد التطبيق لايعكس مستوى المعرفة، حيث أن المعرفة لا تترجم أثناء التطبيق من خلال استخدام الوسائل الصحيحة والمناسبة. وفي هذه الدراسة يعكس الجدول رقم (٢) بأن سلوك الأفراد المبحوثين من حيث التطبيق لوسائل السلامة منخفض جداً، فرغم أن ٧٥٪ من المبحوثين يقوم بقراءة بطاقة المبيد الا أن الالتزام بشروط السلامة في جميع الحالات لم يصل إلى ٣٠٪، أي أن ٧٠٪ من المبحوثين لا يطبق وسائل السلامة، وقد يعزى ذلك إلى أن اتجاهات المبحوثين سلبية في هذا الشأن، حيث أن الاتجاهات هي المحرك لتغيير السلوك

الجدول رقم (٢) بعض إجراءات السلامة المبيدية التي يمارسها المبحوثين (ن = ٢١٣)

العبارة	نعم %	لا %
تقوم بقراءة بطاقة المبيد قبل استخدام المبيد	٧٥	٢٥
تثقيف نفسك عن الآفات والأمراض	٣١	٦٩
ترتدي جميع وسائل السلامة	٣٠	٧٠
تلتزم بتعليمات بطاقة المبيد	٣٠	٧٠
تعتني بمبدأ الصحة العامة	٢٨	٧٢
تسوق المنتج الزراعي دون مراعاة لفترة التحريم	٢٥	٧٥
تقوم بأكل منتجات المزرعة دون النظر لفترة التحريم	٢٤	٧٦
تزور قسم الإرشاد الزراعي بالفرع لطلب مساعدتهم	٢٠	٨٠
يزور المرشد الزراعي لتوجيهك بأهمية الوقاية والتعامل مع المبيدات	١٢	٨٨
تقوم بتحليل المنتجات الزراعية لاختبار متبقيات المبيدات	-	١٠٠

تبين من توزيع المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة لدرجة استخدامهم لإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد والتي تراوحت بين ٢٧ درجة في حدها الأدنى و ٩٥ درجة في حدها الأقصى ، بمتوسط ٦٦,٤٧ درجة وانحراف معياري ٢٠,٥٢. وكما هو موضح في جدول (٣) فإن غالبية العمال المبحوثين (٧٤,٦٪) يقعون في فئتي الاستخدام القليل والمتوسط مقابل ٢٥,٤٪ تقعون في فئة الاستخدام المرتفع.

فيما يعكس الجدول رقم (٤) أن المبحوثين أفادوا باستخدام هذه الإجراءات ولكن بدرجات متفاوتة. حيث تم عرض معظم الإجراءات وطلب من كل عامل مبحث أن يبين مدى استخدامه لكل إجراء بالاستجابة لأحد الفئات دائماً أو أحياناً أو نادراً أو لا يستخدم. وقد تم إيجاد عدد الاستجابات تحت كل فئة من الفئات السابقة والنسب المئوية للعاملين الذين حددوها. ويوضح (الجدول رقم ٥) درجة استخدام إجراءات السلامة مرتبة ترتيباً تنازلياً وفقاً لمتوسطها الحسابي. فعلي عكس ما أظهرته دراسة (Salameh et al., 2003) من انخفاض ومحدودية إلمام العاملين بإجراءات السلامة أثناء التطبيق والتعامل مع المبيدات وكذلك المعلومات عن مخاطر المبيدات ، ودراسة Ergonen et al., (2005) التي توضح أن العاملين لا يتخذون أي احتياطات عند التطبيق والتعامل مع المبيدات تبين أن درجة الاستخدام لإجراءات السلامة عند التعامل مع المبيد أقرب إلى المتوسط حيث بلغ المتوسط العام لدرجة استخدام المبحوثين لإجراءات السلامة المختلفة ٢,٤٦ درجة وانحراف معياري ٠,٧٦ على مقياس مدة الاستخدام الرباعي. كما تراوح المتوسط الحسابي لدرجات مدى الاستخدام لإجراءات السلامة المختلفة الواجب إتباعها ٢,٨٦ درجة في حده الأدنى ، و ٣ درجة في حده الأقصى.

الجدول رقم (٣). توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن مدى استخدامهم لإجراءات السلامة عند التعامل مع المبيد.

القيمة الرقمية (مدى التعرض)	%
أقل من ٤٥ درجة (قليل)	٢٩,٩
٤٥ - أقل من ٨١ درجة (متوسط)	٤٤,٧
٨١ درجة فأكثر (مرتفع)	٢٥,٤
المجموع	١٠٠,٠

المتوسط الحسابي ٦٦,٤٧ الانحراف المعياري ٢٠,٥٢

الجدول رقم (٤) إجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد مرتبة حسب المتوسط الحسابي من منظور المبحوثين (ن = ٢١٣)

الإجراء	مدى الاستخدام	دائماً %	أحياناً %	نادراً %	لا استخدمها %	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
في حالة وجود تجمع أشخاص أو حيوانات يتم التوقف عن الرش	٥٥,٦	١٢,٧	٧,٩	٢٣,٨	٣,٠٠	١,٢٧	
يتم الرش في أوقات محددة	٥٤,٠	١١,١	١٢,٧	٢٢,٢	٢,٩٧	١,٢٦	
يتم الرش الفراغي في مسارات ثابتة ومحددة	٥٥,٦	١١,١	٧,٩	٢٥,٤	٢,٩٧	١,٢٩	
تخزين المبيد بعيداً عن أماكن سكن العمال	٥٥,٦	٧,٩	١١,١	٢٥,٤	٢,٩٤	١,٣١	
يتم تثبيت قوة الضغط لجهاز الرش أثناء العمل	٥٤,٠	١١,١	٧,٩	٢٧,٠	٢,٩٢	١,٣١	
فصل الملابس المستخدمة عند الرش وغسلها منفردة	٥٤,٠	١١,١	٦,٣	٢٨,٦	٢,٩٠	١,٣٣	
شرب كمية من الحليب بعد الانتهاء من تطبيق المبيد	٤٩,٢	١٤,٣	١٤,٣	٢٢,٢	٢,٩٠	١,٢٤	
يتم التقيد بسرعة منخفضة وثابتة لسيارة الرش	٥٢,٤	١١,١	٧,٩	٢٨,٦	٢,٨٧	١,٣٣	
إتباع التعليمات المدونة على بطاقة المبيد	٤٤,٤	٢٥,٤	٣,٢	٢٧,٠	٢,٨٧	١,٢٥	
قراءة بطاقة المبيد قبل الاستخدام	٥٢,٤	١٤,٣	١,٦	٣١,٧	٢,٨٧	١,٣٥	
يتم تطبيق المبيد بعد قياس سرعة الرياح	٥٤,٠	٦,٣	١١,١	٢٨,٦	٢,٨٦	١,٣٤	

وتبين أن أهم إجراءات السلامة المتبعة من قبل العاملين المبحوثين عند التعامل مع المبيد والتي احتلت المراتب الأربع الأول هي : في حالة وجود تجمع أشخاص او حيوانات يتم التوقف عن الرش ، يتم الرش في أوقات محددة ، يتم الرش الفراغي في مسارات ثابتة ومحددة ، وتخزين المبيد بعيداً عن أماكن سكن العمال إذ بلغ المتوسط الحسابي ٣ ، ٢,٩٧ ، ٢,٩٧ ، ٢,٩٤ وبنسبة استخدام بلغت ٧٦,٢٪ ، ٧٧,٨٪ ، ٧٤,٦٪ ، و ٧٤,٦٪ على التوالي. تلاها إجراء يتم تثبيت قوة الضغط لجهاز الرش أثناء العمل ، وفصل الملابس المستخدمة عند الرش وغسلها منفردة ، وشرب كمية من الحليب بعد الانتهاء من تطبيق المبيد ، يتم التقيد بسرعة منخفضة وثابتة لسيارة الرش ، إتباع التعليمات المدونة على بطاقة المبيد ، قراءة بطاقة المبيد قبل الاستخدام ، يتم تطبيق المبيد بعد قياس سرعة الرياح بمتوسط حسابي ٢,٩٢ ، ٢,٩ ، ٢,٩ ، ٢,٨٧ ، ٢,٨٧ ، ٢,٨٧ وبنسبة استخدام بلغت ٧٣٪ ، ٧١,٤٪ ، ٧٧,٨٪ ، ٧١,٤٪ ، ٧٣٪ ، ٦٨,٣٪ ، ٧١,٤٪ على التوالي مما يعني أن درجة استخدام هذه الإجراءات تعتبر متوسطة. الأمر الذي يعكس بضرورة توعية وتثقيف العاملين بأهمية هذه الإجراءات الوقائية.

ثالثاً: طرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها.

تبين عند توزيع المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة استخدامهم لطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها والتي تراوحت بين صفر درجة في حدها الأدنى ، و ٢٤ درجة في حدها الأعلى بمتوسط ٢,٧٢ وانحراف معياري ٤,٢٧. وكما هو موضح بمجدول (٥) فإن الغالبية العظمى (٩١,٤٪) يقعون في فئة الاستخدام القليل مقابل ٨,٤٪ في فئة الاستخدام المتوسط ، و ٠,٢٪ فقط في فئة الاستخدام المرتفع الأمر الذي يعكس ضرورة تدريب العاملين على الطرق المختلفة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها.

الجدول رقم (٥). توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة استخدامهم لطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها.

القيمة الرقمية (مدى الاستخدام)	%
أقل من ١٠ درجات (قليل)	٩١,٤
١٠ - أقل من ٢٠ درجة (متوسط)	٨,٤
٢٠ درجة فأكثر (مرتفع)	٠,٢
المجموع	١٠٠,٠

المتوسط الحسابي ٢,٧٢ الانحراف المعياري ٤,٢٧

ويتضح من بيانات الجدول رقم (٦) أن درجة استخدام المبحوثين للطرق المختلفة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها أقرب إلى ندرة وعدم الاستخدام الآمن لذلك وهذا يتفق مع دراسة AL-Sarar - et. Al., (2009) التي أظهرت أن الغالبية العظمى من العاملين في منطقة الرياض معلوماتهم عن التخلص من الفائض من المبيدات والعبوات الفارغة ضعيفة، حيث بلغ المتوسط العام لدرجة استخدام العاملين للطرق المختلفة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها ٠,٢٧ وانحراف معياري ٠,٤٣ على مستوى مقياس مدى الاستخدام.

كما تراوح المتوسط الحسابي لدرجات الاستخدام لطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها بين ٠,٠٥ في حده الأدنى و ١,١٤ في حده الأقصى. واتضح من البيانات الواردة في نفس الجدول أن المتوسط الحسابي لمدى الاستخدام كان منخفضاً بشكل عام إذ أن أياً من الطرق المختلفة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها لم ترق لمرتبة الاستخدام المتوسط على مقياس مدى الاستخدام، إلا طريقة استخدام الكميات المشتراة بأكملها والتي احتلت المرتبة الثانية وبلغ متوسطها الحسابي ١,١٤ فقط وبنسبة استخدام متوسط ٥٧,١٪، تلاها رش المبيدات في صورته مخففة على الطبقة السطحية للتربة في أرض غير مستغلة لأي غرض، إعادة استخدام العبوات، الحرق في الهواء المفتوح واحتلت المراتب الثانية والثالثة والرابعة بمتوسط حسابي ٠,٣٨، ٠,٢٢، ٠,٢١ وبنسبة استخدام بلغت ٢٠,٦٪، ١٢,٧٪، ١٢,٧٪ فقط على التوالي، فيما جاء في المرتبة الأولى أكثر الطرق ملاحظة وشيوعاً وهي رمي المتبقيات بجوار سور المزرعة.

أما تخفيف تركيز المبيد بإضافة مواد أخرى مخففة، وشركات متخصصة في التخلص من النفايات السامة، الدفن تحت التربة ووضع عليها علامات، الاستعانة بوزارة الصحة أو البلديات للتخلص من النفايات، إعادة الكميات المتبقية لمصدر الشراء فإن درجة استخدامها كانت ضعيفة من وجهة نظر العاملين المبحوثين واحتلت المراتب الخمسة الأخيرة بمتوسط حسابي ٠,١١، ٠,١٠، ٠,١٠، ٠,٠٥، ٠,٠٥ وبنسبة استخدام بلغت ٦,٣٪، ٤,٨٪، ٦,٣٢٪، ٣,٢، و ٣,٢٪ فقط على التوالي.

الجدول رقم (٦). طرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها مرتبة حسب المتوسط الحسابي من منظور العاملين المبحوثين (ن = ٢١٣)

طريقة التخلص	مدى الاستخدام	دائماً %	أحياناً %	نادرًا %	لا تستخدم %	المتوسط الحسابي	الاختلاف المعياري
رميها بجوار المزرعة	٤,٢	٥٠,٨	٣,٢	٤١,٩	١,١٨	١,٠١	
استخدام الكميات المشتراه بأكملها	٣,٢	٥٠,٨	٣,٢	٤٢,٩	١,١٤	١,٠٣	
رش المبيدات في صوره مخففة على							
الطبقة السطحية للتربة في أرض غير	٣,٢	١١,١	٦,٣	٧٩,٤	٠,٣٨	٠,٨١	
مستغلة لأي غرض							
إعادة استخدام العبوات	٣,٢	٣,٢	٦,٣	٨٧,٣	٠,٢٢	٠,٦٦	
الحرق في الهواء المفتوح	-	٧,٩	٤,٨	٨٧,٣	٠,٢١	٠,٥٧	
تخفيف تركيز المبيد بإضافة مواد	-	٤,٨	١,٦	٩٣,٧	٠,١١	٠,٤٤	
أخرى مخففة							
شركات متخصصة في التخلص من	١,٦	١,٦	١,٦	٩٥,٢	٠,١٠	٠,٤٧	
النفايات السامة							
الدفن تحت التربة ووضع عليها	-	٣,٢	٣,٢	٩٣,٧	٠,١٠	٠,٣٩	
علامات							
الاستعانة بوزارة الصحة أو	-	١,٦	١,٦	٩٦,٨	٠,٠٥	٠,٢٨	
البلديات للتخلص من النفايات							
إعادة الكميات المتبقية لمصدر الشراء	-	١,٦	١,٦	٩٦,٨	٠,٠٥	٠,٢٨	

رابعاً: الأعراض الصحية التي يتعرض لها المبحوثين

تبين عند توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة تعرضهم لبعض الأعراض الصحية والتي تراوحت بين ١٦ درجة في حدها الأدنى، و ٥٠ درجة في حدها الأقصى بمتوسط حسابي ٢١,٥٣ وانحراف معياري ٦,٢٩. وكما هو موضح في جدول (٧) فإن غالبية العمال المبحوثين (٩١٪) يقعون في فئة التعرض القليل مقابل ٩٪ فقط تقع في فئة التعرض المتوسط والمرتفع.

الجدول رقم (٧). توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة تعرضهم لبعض الأعراض الصحية.

القيمة الرقمية (مدى التعرض)	%
أقل من ٣٢ درجة (قليل)	٩١,٠
٣٢ - أقل من ٤٨ درجة (متوسط)	٨,٨
٤٨ درجة فأكثر (مرتفع)	٠,٢
المجموع	١٠٠,٠

الانحراف المعياري ٦,٢٩

المتوسط الحسابي ٢١,٥٣

يتضح من الجدول رقم (٨) ندرة الأعراض الصحية التي يتعرض لأي منها العاملون المبحوثين في مجال تطبيق المبيدات، وذلك خلافاً لما بينه AL-Sarar – et .al., (2009) من أن الغالبية العظمى من العاملين بمنطقة الرياض قد ظهرت عليهم بعض أعراض السمية المرتبطة بالتعرض المهني للمبيدات، فتبين من الجدول أن درجة التعرض للأعراض أقرب إلى الندرة حيث بلغ المتوسط العام لدرجة ظهور الأعراض الصحية على العاملين المبحوثين في مجال تطبيقات المبيدات ١,٣٥ درجة وانحراف معياري ٠,٣٩ على مقياس مدى التعرض الرباعي. كما تراوح المتوسط الحسابي لدرجات مدى التعرض للأعراض الصحية المختلفة بين ١,٠٢ درجة في حده الأدنى و ١,٣٨ في حده الأعلى.

واتضح من البيانات الواردة بنفس الجدول أن المتوسط الحسابي لمدى التعرض كان منخفضاً بشكل عام، إذ أن أي من الأعراض المرضية لم يرق لمرتبة التعرض المتوسط على مقياس مدى التعرض، إذ أن تعرض العاملين لأي من الأعراض المرضية لم يرق لمرتبة التعرض المتوسط على مقياس مدى التعرض، إذ أن تعرض العاملين للمبوهين لأعراض الصداع والذي احتل المرتبة الأولى بمتوسط حسابي ١,٣٨ فقط وبنسبة تعرض ١٩٪. تلى أعراض الصداع أعراض الغثيان، والنسيان، وصعوبة التنفس، والإجهاد بمتوسط حسابي ١,٣٠، ١,٢٩، ١,٢٩، ١,٢٩ وبنسبة تعرض ١٥,٩٪، ١٩٪، ١٢,٧، ١٧,٥ على الترتيب. ثم ضبابية الرؤية، ونزيف الأنف، والحساسية، والتقيؤ بمتوسط حسابي ١,٢٧، ١,٢٥، ١,٢١، ١,١٩ وبنسبة تعرض ١٤,٣٪، ١٤,٣٪ و ١٤,٣٪، و ١١,١ على التوالي. أما أعراض السعال، والتعرق، والأرق، والدوخة، وتكسر الأظافر، وفقدان الوزن، فإن درجة التعرض لها كان قليلاً إذ احتلت المراتب الأربع الأخيرة بمتوسط حسابي ١,١٧، ١,١٦، ١,١٣، و ١,٠٨، و ١,٠٦، و ١,٠٢ وبنسبة تعرض بلغت ١١,١٪، ٩,٥٪، ٩,٥٪، و ٧,٩٪، و ٣,٢٪، و ١,٦٪ فقط على التوالي.

الطرق المثلى لرفع الوعي:

يرى المبهوهين أن التوعية من خلال الحملات الميدانية والزيارات الحقلية زيادة عدد المرشدين من الطرق المهمة في رفع مستوى المهارات عند تطبيق المبيدات، فيما جاء في المرتبة الأخيرة وضع أجهزة الكشف عن المبيدات في أسواق البيع للمنتجات الزراعية وجميع النسب عالية حيث كانت جميعها أعلى من ٧٧٪ ويوضح ذلك الجدول رقم (٨).

الجدول رقم (٨). مدى تعرض العاملين المبحوثين في مجال المبيدات لبعض الأعراض الصحية مرتبة

حسب المتوسط الحسابي المبحوثين (ن = ٢١٣)

الأعراض	مدى التعرض	دائماً %	أحياناً %	نادراً %	لم يتعرض %	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
الصداع	٣,٢	١٢,٧	٣,٢	٨١,٠	١,٣٨	٠,٨٣	
الغثيان	٣,٢	٧,٩	٤,٨	٨٤,١	١,٣٠	٠,٧٥	
النسيان	-	٩,٥	٩,٥	٨١,٠	١,٢٩	٠,٦٣	
صعوبة التنفس	٤,٨	٦,٣	١,٦	٨٧,٣	١,٢٩	٠,٧٩	
الإجهاد	١,٦	٧,٩	٧,٩	٨٢,٥	١,٢٩	٠,٦٨	
ضبابية الرؤية	٤,٨	٣,٢	٦,٣	٨٥,٧	١,٢٧	٠,٧٥	
نزيف الأنف	٣,٢	٤,٨	٦,٣	٨٥,٧	١,٢٥	٠,٦٩	
الحساسية	٣,٢	-	١١,١	٨٥,٧	١,٢١	٠,٦٠	
التقيؤ	١,٦	٤,٨	٤,٨	٨٨,٩	١,١٩	٠,٥٩	
السعال	-	٦,٣	٤,٨	٨٨,٩	١,١٧	٠,٥٢	
التعرق	١,٦	٣,٢	٤,٨	٩٠,٥	١,١٦	٠,٥٤	
الأرق	-	٣,٢	٦,٣	٩٠,٥	١,١٣	٠,٤٢	
دوخة	-	-	٧,٩	٩٢,١	١,٠٨	٠,٢٧	
تكسر الأظافر	١,٦	-	١,٦	٩٦,٨	١,٠٦	٠,٤٠	
فقدان الوزن	-	-	١,٦	٩٨,٤	١,٠٢	٠,١٣	

العبارة	%
تكثيف حملات التوعية في المنطقة	٩٨
تكثيف الزيارات الميدانية بالمزارع	٩٧
زيادة عدد المرشدين الزراعيين	٩٧
التواصل مع الزراع من خلال الجوال	٨٨
دراسة الآفات والأمراض النباتية وتحديدتها بالمنطقة	٨٢
وضع أماكن لتجميع نفايات المبيدات	٨١
وضع مختبر للكشف عن المبيدات ومنع المنتجات الزراعية التي يثبت المبيد فيها	٥٥

خامساً: مصادر المعلومات التي يعتمد عليها العمال المبحوثين في كيفية تعاملهم مع المبيد.

عند توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة اعتمادهم على مصادر المعلومات المتعددة والتي تراوحت بين ٤ درجات في حدها الأدنى و ٤٠ درجة في حدها الأعلى بمتوسط قدره ١٠,٣١ درجة وانحراف معياري قدره ٦,٢٧. وكما هو موضح في الجدول رقم (٩) فقد تبين أن الغالبية العظمى من العمال المبحوثين (٨٥٪) يقعون في فئتي درجة الاعتماد المنخفضة والمتوسطة بالمقارنة بنسبة ١٥٪ فقط من المبحوثين في فئة الاعتماد المرتفع لمصادر المعلومات.

الجدول رقم (٩). توزيع العمال المبحوثين وفقاً للقيمة الرقمية المعبرة عن درجة اعتمادهم على مصادر المعلومات المتعلقة بكيفية التعامل مع المبيد.

القيمة الرقمية (مدى الاعتماد)	%
أقل من ٤ درجات. (منخفض)	٥,٥
٤ - أقل من ١٧ درجة. (متوسط)	٧٩,٥
١٧ درجة فأكثر. (مرتفع)	١٥,٠
المجموع	١٠٠,٠

الانحراف المعياري ٦,٢٧

المتوسط الحسابي ١٠,٣١

وتوضح بيانات الجدول رقم (١٠) أن هناك مصدراً واحداً يعتمد عليه العاملون المبحوثون في الحصول على المعلومات المتعلقة بكيفية التعامل مع المبيد بدرجة كبيرة وهو الخبرات الشخصية المكتسبة في التعامل مع المبيد إذ بلغ المتوسط الحسابي ٢,٦٢ وانحراف معياري ١,٠٢، يليه كل من بطاقة المبيد، الأقارب والأصدقاء والجيران والعاملين في مجال المبيدات، والمرشد الصحي بمتوسط حسابي ٢,٤٠، ٢,٠٥، ١,٤٣ وانحراف معياري ١,١٢، ١,٣٠، ١,١٢ على التوالي ويعتبر الاعتماد عليها بدرجة

متوسطة على قياس مدى الاعتماد. ويعكس الجدول تعدد وتنوع مصادر المعلومات التي يعتمد عليها العمال المبحوثين إلا أن هذا التعدد والتنوع يفقد قيمته لانخفاض درجة الاعتماد على معظم المصادر إذ يلاحظ أن شركات المبيدات، وتجار بيع المبيدات احتلتا المرتبتين الخامسة والسادسة في درجة الاعتماد بمتوسط حسابي ٠,٨١ فقط أي أن درجة الاعتماد عليهما كمصدرين للمعلومات تعتبر ضعيفة. كما يلاحظ أن الجمعيات التعاونية، والمعارض الزراعية، ومركز الإرشاد، ومراكز البحوث، والنشرات الإرشادية احتلت المراتب الخمس الأخيرة بنسبة عدم استخدام بلغت أكثر من ٦٨٪ لكل مصدر منها وبمتوسط حسابي يقل عن ٠,٥٢ لكل منها رغم أهمية هذه المصادر.

الجدول رقم (١٠). المصادر التي يعتمد عليها العمال المبحوثين بجدة في الحصول على المعلومات المتعلقة بكيفية التعامل مع المبيد مرتبه حسب المتوسط الحسابي (ن = ٢١٣)

مصادر المعلومات	درجة الاعتماد	١	٢	٣	٤	٥	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
الخبرات الشخصية المكتسبة في التعامل مع المبيد.	٨٤,٢	١,٦	٣,٢	١١,١	٢,٦٢	١,٠٢		
بطاقة المبيد	٧٣,٠	٤,٨	٩,٥	١٢,٧	٢,٤٠	١,١٢		
الأقارب والأصدقاء والجيران والعاملين في مجال المبيدات.	٦٠,٣	٩,٥	٤,٨	٢٥,٤	٢,٠٥	١,٣٠		
المارش الزراعي	٢٠,٦	٣٠,٢	٢٠,٦	٢٨,٦	١,٤٣	١,١٢		
شركات المبيدات	٢٢,٢	٦,٣	١,٦	٦٩,٨	٠,٨١	١,٢٨		
تجار بيع المبيدات	٢٥,٤	١,٦	-	٧٣,٠	٠,٨١	١,٣٥		
الصحف والمجلات	١٥,٩	٧,٩	٤,٨	٧١,٤	٠,٦٨	١,١٦		
البرامج الإذاعية	٧,٩	١٤,٣	٧,٩	٦٩,٨	٠,٦٠	١,٠١		

تابع الجدول رقم (١٠)

الانحراف المعياري	التوسط الحسابي	لا تستخدم	نادرًا	أحيانًا	دائمًا	درجة الاعتماد	مصادر المعلومات
٠.٩١	٠.٥٧	٦٨.٣	٩.٥	١٩.٠	٣.٢		الأفلام الإرشادية
١.٠٣	٠.٥٦	٧٣.٠	٩.٥	٦.٣	١١.١		البرامج التلفزيونية
١.٠١	٠.٥٦	٧٣.٠	٧.٩	٩.٥	٩.٥		الحقول الإرشادية
٠.٨٤	٠.٥٢	٦٨.٣	١٢.٧	١٧.٥	١.٦		الجمعيات التعاونية
٠.٨٢	٠.٤٩	٧١.٤	٧.٩	٢٠.٦	-		المعارض الزراعية
٠.٨٤	٠.٤٨	٧١.٤	١٢.٧	١٢.٧	٣.٢		مركز الإرشاد
١.٠٩	٠.٤٦	٨٤.١	-	٣.٢	١٢.٧		مراكز البحوث
٠.٧٣	٠.٣٨	٧٦.٢	٩.٥	١٤.٣	-		النشرات الإرشادية

سادساً: العلاقة الارتباطية بين بعض الصفات الشخصية والاجتماعية والاقتصادية للعاملين بمتغيرات الدراسة الرئيسية.

يتضح من الجدول رقم (١١) وجود علاقة ارتباطية عكسية بين العمر كمتغير مستقل بكل من مدى الاستخدام لإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد، وطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها، وذلك عند مستوى معنوية ٠,٠١ حيث بلغ معامل الارتباط البسيط البيرسوني - ٠,٢٩١ ، - ٠,١١٦ على التوالي، أي أن المزارع كبير السن أقل استخداماً لإجراءات السلامة، ولطرق التخلص من المبيدات المتبقية. وعلى العكس تبين وجود علاقة موجبة بين العمر ومدى التعرض لبعض الأعراض الصحية وذلك على المستوى الاحتمالي ٠,٠١ حيث بلغ معامل الارتباط البسيط ٠,٢٠٢ حيث يكون كبار السن أكثر حساسية لسمية المبيدات والتأثر بها. وربما يكون ذلك بسبب تقدم العمر وعدم التقيد بإجراءات السلامة عند استخدام المبيدات.

كما تبين وجود علاقة ارتباطية طردية ومعنية عند مستوى ٠,٠١ بين المستوى التعليمي كمتغير مستقل بكل من إجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيدات، وطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها، ومدى التعرض لبعض الأمراض الصحية حيث بلغ معامل الارتباط البسيط البيروني ٠,٢٥٩، ٠,٢٦٧، ٠,١٤٦ على الترتيب، وعكس الجدول أيضاً وجود علاقة ارتباطية طردية ومعنية عند مستوى ٠,٠١ بين الراتب الشهري ومدى الاستخدام لإجراءات السلامة حيث بلغ معامل الارتباط البسيط ٠,١٤٥. كما اتضح وجود علاقة ارتباطية طردية بين مصادر المعلومات كمتغير مستقل بكل من الالتزام بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيدات، وطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها حيث بلغ معامل الارتباط البسيط البيروني ٠,٦٦٤، ٠,٦١٩، مما يعكس قوة العلاقة بين كثرة الإطلاع على مصادر المعلومات بالمتغيرين المستقلين: الالتزام بإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيدات، وإتباع الطرق السليمة للتخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها.

الجدول رقم (١١). العلاقة الارتباطية بين بعض الصفات الشخصية والاجتماعية والاقتصادية للعاملين المبحوثين ببعض متغيرات الدراسة الرئيسية باستخدام معامل الارتباط البسيط البيروني.

العوامل المستقلة	العمر (ر)	المستوى التعليمي (ر)	الراتب الشهري (ر)	درجة مصادر المعلومات (ر)
العوامل التابعة				
مدى الاستخدام لإجراءات السلامة الواجب إتباعها عند التعامل مع المبيد	- ٠,٢٩١ **	** ٠,٥٢٩	** ٠,١٤٥	** ٠,٦٦٤
مدى الاستخدام لطرق التخلص من المبيدات المتبقية وعبواتها	- ٠,١١٦ **	** ٠,٢٦٧	- ٠,٠١٣	** ٠,٦١٩
مدى التعرض لبعض الأمراض الصحية	** ٠,٢٠٢	** ٠,١٤٦	٠,٠٦	٠,٠٧٨

** معنوي عند مستوى ٠,٠١

التوصيات

رغم أهمية المبيدات في القضاء على الآفات الزراعية، إلا أن سوء الاستخدام الناتج من عدم المعرفة أو سوء السلوك أثناء عملية التطبيق له أثار سلبية على الإنسان والحيوان والبيئة. ففي السنوات الأخيرة ظهر تلوث المياه بالمبيدات وتلوث التربة وهذا يؤكد ما جاء في الدراسة من عدم اتباع الطرق الصحيحة للتخلص من المبيدات وكذلك عدم التزام المزارع بإجراءات السلامة أثناء عملية التطبيق.

ومن خلال النتائج المتحصل عليها توصي الدراسة بما يلي :

- ١- ضرورة تفعيل دور الإرشاد الزراعي من خلال التوعية بأخطار المبيدات، وضرورة مراقبة و تدريب المزارع على الاستخدام الأمثل للمبيدات.
- ٢- يجب وضع حاويات خاصة ببقايا المبيدات، وإرشاد المزارع بضرورة رمي مخلفات المبيدات فيها، لتجنب البيئة التلوث.
- ٣- ضرورة عمل حقول إرشادية بالمنطقة لتعريف وتدريب المزارع على التطبيق السليم والآمن للمبيدات.

المراجع

المراجع العربية:

- الريماوي، احمد شكري، حسن جمعة حماد، خلدون عبداللطيف الصبيحي. (١٩٩٦). مقدمة في الارشاد الزراعي. دار حنين للنشر والتوزيع، عمان، الأردن.
- الدوسري، صالح بن عبدالله (٢٠٠٢م). استخدام المبيدات وتداولها على المستوى المزارع في محافظة الخرج. مجلة الإسكندرية للعلوم الزراعية.

الشايح ، محمد شايح الشايح ، علي سعيد آل سرار (٢٠٠٧م). مستوى المام مزارعي محافظة الخرج بنواحي السلامة أثناء استخدام مبيدات الآفات الزراعية ، مجلة المنصورة ٣٢ (٧)

العتيبي ، صالح حمود (١٤٢٦هـ). وعي المزارعين بالآثار السلبية للمبيدات البيئية محافظة الدوادمي رسالة ماجستير، قسم الإرشاد الزراعي والمجتمع الريفي ، كلية علوم الأغذية والزراعة ، جامعة الملك سعود ، الرياض بالمملكة العربية السعودية. رشوان ، حسين عبدالحمد أحمد (٢٠٠٦). البيئة والمجتمع دراسة في علم اجتماع البيئة. المكتب الجامعي الحديث ، الإسكندرية ، جمهورية مصر العربية. هيئة الري والصرف بالإحساء (٢٠٠٦م) المبيدات واحتياطات السلامة عند الاستخدام ، وزارة الزراعة ، الإحساء وزارة الزراعة (١٤٣١) الكتاب الإحصائي الزراعي السنوي ، العدد الثالث والعشرون ، الرياض.

المراجع الأجنبية:

- Abrams, K., Hogan D. J. and Maibach, H. I** (1991) Pesticide-related Dermatoses in Agricultural Workers IN Health Hazards of farming; Occupational Medicine: State of the Art Reviews, Vol. 6, No. 3. pp. 463-492. Hanley& Belfus, Inc., Philadehia, PA.
- Al-Sarar, A. S., Y. Abo Bakr, G. S. Al-Erimah, H. I. Hussein** (2009), Pesticides Occupational Exposure in Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia: Knowledge, Attitudes and Practices, J. King Saud Univ., Vol. 21, Agric. Sci (2).
- Al-Sarar, A. S., Y. Abo Bakr, G. S. Al-Erimah, H. I. Hussein and A. E. Bayoumi** (2009). Hematological and Biochemical Alterations in Occupationally Pesticides-Exposed Workers of Riyadh Municipality, Kingdom of Saudi Arabia, Reserch Journal of Environmental Toxicology 3 (4): 179-185. 2009.
- Ergonen, A .T., S . Salacin., and M. H.Ozdemir** (2005) . Pesticide use among greenhouse workers in Turkey . Journal of Clinical Forensic Medicine, 12:205-208.
- Gomes, J., Lloyd, O. L. and Revitt, D. M.** (1999) The influence of Personal protection, environmental hygiene and exposure to pesticides on the

- health of immigrant farm workers in desert county. International Archives of Occupational and Environmental Health, 72: 40-45.
- Johnson, P. M., Easter, E. P.** (1999) Personal Protective Equipments Display for County Extension Service Programs. Journal of pesticide safety education. 1: 1-6.
- Mandel, J. H. , W. P. Carr, T. Hillmer, P. R. Leonard, J. U. Halberg, W. T. Sanderson, and J. S. Mandel** (1996). Factors associated with safe use of agricultural pesticide in Minnesota. Rural Health Kansas City, Mo: National Rural Health Association.
- Murphy, D. J.** (1992) Safety and Health for Production Agriculture. American Society of Agricultural Engineers; ASAE Textbook No.5. St. Joseph, MI.
- Rucker, M. H., McGee, K. M., and Chordas, T.** (1986) California Pesticide Applicators Attitudes and Practices Regarding the use and care of protective clothing IN performance of protective Clothing, ASTM STP 900, R. L. Barker and G. C. Coletta, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 103-113.
- Salameh, P.R., I .Baldi., P. Brochard , and B . Abi Saleh** (2003). Pesticides in Lebanon: a knowledge , attitude, and practice study. Environmental Research, 94:1-6.
- Stimamiglio, G., B. C. Schiffers, and W. A. Ellis** (1998). A survey on the safe and effective use of pesticide in cut flower production, the case of highlands of northern Thailand. Proceeding the 50th international symposium on crop production, Mededeligen- Faculties- Land bouwkundige- en- Toegepaste Biologissche – Wetenschappen, universities.
- Van Emden, H. F. and Service, M. W.** (2004) Pest and vector control p. 110 Cambridge university press.

Some of Pesticides Application by the Farmers and Their Safety in Alqazalh, Hail Area in the Kingdom of Saudi Arabia.

Mohammad S. Al-Shayaa

Department of Agricultural Extension and Rural Sociology, Food and Agriculture Sciences,

King Saud University

P.O. B. 2460 Riyadh 11451, Kingdom of Saudi Arabia

E-mail malshayaa@ksu.edu.sa

Abstract. Kingdom of Saudi Arabia imports large quantities of pesticides every year. The kingdom imported 2.15 million liters, 0.590 tons of powder form pesticides, as well as 360 thousand liters, and 613 tons of powder fungicides, and 1.8 million liters, and 145 tons of powder herbicide for all purposes in the year 1429/1430 (Ministry of Agriculture, 1431). It is important to know whether these quantities were used properly according to the conditions and safety procedures required for the safe application of pesticides. It is a very serious issue and needs investigation. Based on the importance of the subject, it is imperative to ensure the safety of agricultural workers of the hail region and examine the safety procedures and safe application of pesticides used in the field of insect pest control. Primarily, this study aims at determining the extent of the knowledge of the farmers on the safety procedures and safe application of pesticides in the Hail region. The main objectives of study include: to determine the extent of knowledge of the subjects safety procedures to be followed when dealing with the pesticide; to determine the extent of knowledge of the farmers on the methods of proper disposal of the remaining pesticides and their containers; to identify the health symptoms experienced by the farmers, sources of information relied upon by the respondents in their dealings with the pesticides .

The study sample consisted of 213 farms representing about 25% of the farmers of the Ghazala province, Hail region .It was found that about 61.5% of respondents were under the age of 40 years, and the number of Saudis account for 87.9%.It was also found that they do not use proper disposal methods for the remaining pesticides. Whereas safety procedures were found to be generally low except that farmers do not apply pesticides near the gathering of individuals and animals, and vacuum-spray are used, and pesticides storage is away from the houses of the farmers. The respondents get their information on the use of pesticides from the labels of the containers while their relatives and friends are the secondary information sources.

Key words: Farmers knowledge; Safety procedures; pesticides application; Information sources, Health symptoms