

IJST

INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

Vol. (10), No. (4)- DECEMBER 2015

SJIF:3.735 / ICV:4.32

ISSN: 2305-9346

www.ijst-jo.com

IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology

المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا

Volume 10. No. 4/ December 2015 / ISSN: 2305-9346

A Refereed Scientific Journal Since 2006

مجلة علمية محكمة منذ عام 2006

Issued By:

The International Centre for Advancement of Sciences and Technology

In a cooperation with TSTC - Jordan

IJST Contact Information:

P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan

Tel. +962796543469

E-mails: info@ijst-jo.com / ijst.jordan@yahoo.com

URL: www.ijst-jo.com

Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.

(Editor-in- Chief)

Professor of Microbiology / Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine / Faculty of Sciences / Al-Balqa' Applied University / Al- Salt / Jordan
shammari@ijst-jo.com

Abbas, Jamal A.

Professor of Plant Ecophysiology / Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq
phdjamal@yahoo.com

Abdul- Ghani, Zaki G.

Professor of Microbiology/ Faculty of Pharmaceutical Sciences / Amman Private University / Jordan
zaki_abdulghani@yahoo.com

Abdul- Hameed, Hayder M.

PhD in Environmental Engineering / Environmental Engineering Dept./ Faculty of Engineering/ University of Baghdad/ Iraq
hayderalmunshi@yahoo.com

Abdullah, Ahmed R.

PhD in Cancer Immunology and Genetics /Biotechnology Research Centre / Al- Nahrain University / Baghdad / Iraq
ahmedrushdi1970@yahoo.com

Al- Daraji, Hazim J.

Professor of Avian Reproduction and Physiology / Animal Resources Dept./ College of Agriculture / University of Baghdad / Iraq
prof.hazimaldaraji@yahoo.com

Al- Douri, Atheer A. R

PhD in Microbiology/Faculty of Veterinary Medicine/ University of Baghdad / Iraq
aaldouri96@yahoo.com

Al- Faris, Abdulbari A.

Professor of Surgery / Dept. of Surgery and Obstetrics / College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Iraq
Vetedu2000@yahoo.com

Al- Jashami, Najim A.

Professor of Nuclear Material Sciences / Dept. of Physics / College of Sciences / Kufa University / Iraq
na_phys@yahoo.com

Al- Mashaykhi, Akram Othman

PhD in IT / Amman Arab University for Graduate Studies / Jordan
akram.othman@gmail.com

Al- Mathkhoury, Harith J F.

Professor of Medical Microbiology / Dept. of Biology / College of Sciences / University of Baghdad/ Iraq
harith_fahad@yahoo.com

Al- Murrani, Waleed K.

Professor of Genetics and Biostatistics / University of Plymouth/ UK
profmurrani@yahoo.com

Al- Noor, Nadia H.

PhD. in Statistics, Mathematical Statistics / Dept. of Mathematics / College of Sciences / Al-Mustansiriya University / Baghdad / Iraq

Al- Noor, Taghreed H.

Professor of Chemistry / Dept. of Chemistry / College of Education – Ibn Al- Haitham / University of Baghdad / Iraq
drtaghreed2@gmail.com

Al- Saqur, Ihsan M.

Professor of Parasitology/ Faculty of Sciences / University of Baghdad / Iraq
drihsanalsagur@yahoo.com

Al- Shamaony, Loai

Professor of Biochemistry / Faculty of Pharmacy / Misr University for Sciences and Technology / Egypt
loaialshamaony@yahoo.com

Al- Shebani, Abdullah S.

PhD in Dairy Sciences and Technology / Food Sciences Dept./ Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq
Agrifood43@yahoo.com

Alwachi, Sabah N.

Professor of Physiology / Biology Dept./ College of Sciences/ University of Baghdad / Iraq
sabahalwachi@yahoo.com

Birasal, Narayan R.

PhD in Zoology / KLE Society's GH College Haveri / India
nrbirasal@gmail.com

Khamas, Wael

Professor of Anatomy and Histology / College of Veterinary Medicine / Western University of Health Sciences / Ponomia -California/ USA
wael_khamas@yahoo.com

Sharma, Sunanda

PhD in Veterinary Medicine / Dept. of Veterinary Obstetrics and Gynecology / College of Veterinary & Animal Science / Rajasthan University of Veterinary & Animal Sciences
dr.sunanda_sharma@rediffmail.com

Editorial Board Secretary

Pharmacist. Nansi Elian

Amman- Jordan
ijst.jordan@yahoo.com

FORWARD

Dear Colleagues,

I used to start my message by the achievements we try always to do and by the idea that was born to put between your hands our journal – IJST. Today, I write you about how our journal is moving to the new volume as we are now in 2016, eleven years without stop, despite the challenges we faced, and despite all constraints that our beloved Arab countries have while they are looking for more development achievements. What I want to say, is that the only weapon, as well as the tool to proceed to the gate of development is science and how we can use and adopt all the ways that make our cultures, our thoughts and our talents and research efforts to be converted into practices to improve life for us and for the coming generations and let the other parts of the world listen to us very appreciately.

Let me present my deepest thanking and great recognitions for all people and institutes who faithfully gave IJST their concerns, their cares, and their patiences to keep it as one of the leading journals in Arab and international worlds.

Thanks a lot for Prof. Jamal Abbas and Dr. Abdullah Al- Shebani from University of Kufa, Dr. Atheer Al- Douri , Prof. Hazim Al- Daraji from University of Baghdad, Prof. Waleed Al- Murrani for his endless support from Plymouth University, Prof. Abdulbari Abbas Al- Faris from University of Basrah, and finally to the one who stands always behind this great effort and performs her best with no disperence, non stopping, and with full of faith, loyalty and creative footprints at IJST, the Editorial Board Secretary of IJST. With you all, IJST is now here, and will continue as long as we breath, as we believe on our goal, and as we have the power from God to be with you.

IJST was a fruitful effort issued by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology – ICAST, which tries to take part in both globalization and revolution in information and communication technologies, because S&T development becoming not only the key elements of economic growth and industrial competitiveness, but also essential for improving the social development, the quality of life and global environment. ICAST took then a decision to establish a scientific alliance with TSTC (Tharwa for scientific Training & Consultations) and this alliance comes to support the efforts towards publishing IJST.

Today, we announce a new issue of our journal, that is the fourth issue from the tenth volume of IJST, December , 2015.

Finally, I hope that all significant figures of sciences whom joined the editorial board, the researchers, and the readers of our journal will keep IJST between their eyes and contribute in continuing its journey, with their remarks, valuable recommendations and their researching outcomes.

Thanks a lot for all who support IJST.

Editor-in-Chief

IJST

Abdul Jabbar Al- Shammari

The Referees for this Issue

** The referees and advisory group below are listed according to alphabetical order, with deep appreciation for all.*

Prof. Abdul- Jabbar N. Al- Shammari

Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shebani

Dept. of food sciences, Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq

Dr. Atheer A.R. Al- Douri

College of Veterinary Medicine, University of Baghdad. Iraq

Prof. Harith F. Al- Mathkhouri

College of Sciences, University of Baghdad. Iraq

Dr. Ibraheem N. Al- Tarawneh

Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Prof. Jamal A. Abbas

Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq

Dr. Loay Rahman

Dept. of Chemistry, Howard University, Washington DC. 20060 USA.

Prof. Mahmoud M. Othman Matar

College of Medicine, Al- Najah National University. Palestine

Dr. Maiada M. Al- Mousily

Stratford University , Falls Church, VA 22043 USA.

Dr. Moayyad Al- Khataybeh

Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan

Prof. Taha H. Al- Samarrai

College of Sciences, University of Samarra. Iraq

Prof. Waleed Al- Murrani

University of Plymouth , United Kingdom

TABLE OF CONTENTS

** Articles in this issue are listed below according to field specialties order, starting by English section and followed by Arabic section.*

(I) ENGLISH SECTION

BIOCHEMISTRY

- Isolation and purification of adenosine deaminase (Aminohydrolase EC 3.5.4.4) enzyme from serum of breast cancer patients** 7-10
Khalid F. Al Rawi, Mohammad Q. Al-Ani & Muna M. Aldosary

BIOLOGY

- Effect of light intensity on biofuel production from green alga *Chlorella vulgaris*** 11-17
Fikrat M. Hassan, Jasim M. Salman & Maysam A. Baiee

HISTOPATHOLOGY

- Histopathological and anatomical changes induced in the internal organs (heart, lung, liver and kidney) of laboratory mice after exposure to different concentrations of toilet detergent (Flash)** 18-25
Manal K. Ebraheem

MEDICINE

- ECG changes in chronic renal failure** 26-29
Ahmed M. Athab, Ali M. J. Al- Timimi, Ali S. H. Al- Duleimy & Nabeel K. M. Ali
- Significance of electroencephalographic alterations with mental and behavioral subnormalies in Diyala province, Iraq** 30-34
Kareem A. Obaid

MICROBIOLOGY

- Effect of internalin A extracted from *Enterococcus faecalis* isolated from faeces of chicken on normal and cancer cell lines** 35-40
Ansam K. Mohammed
- Study on some immune mediators in gastric biopsies and sera from dyspeptic patients infected with *H. pylori*** 41-46
Shehab A. Lafi, Wissam S. Khalil & Yaseen H. Majeed

VETERINARY MEDICINE

- Comparison of techniques used in isolation and identification of *salmonella spp.* and related genera from raw meat and abattoir environment of Basrah** 47-53
Ali A. Al-Iedani, Jalal Y. Mustafa & Nada S. Hadi
- Genotypic characterization of infectious bronchitis virus from clinically suspected broilers in Basrah, South of Iraq** 54-59
Hazim T. Thwiny, Firas T. Mansour & Harith A. Al-Taher

Continue>>>> English section

VETERINARY MEDICINE

- | | |
|--|--------------|
| Levels of ochratoxin A in chicken livers and meat at Sulaimani City markets | 60-64 |
| <i>Hazhaow O. M. Murad</i> | |
| Preliminary study of chlamydiosis and toxaplamosis in goats in Basrah, Iraq | 65-68 |
| <i>Israa A.W. M. Ali</i> | |

ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)**علوم الحياة**

- 76-70 أثر تركيز المستخلص القلواني لدرنات البطاطا ومدة التجريع في التغيرات النسجية للأمعاء الدقيقة في ذكور الفئران البيضاء *Albinus rats*
ثامر خضير مرزعة، عنان وحيد البديري، رحيم عبد زيد العابدي
- 80-77 تأثير استخدام طحين الرز ومستخلص الجرجير الكحولي كغذاء على نمو ديدان الأرض الجنس *Lumbricus sp.*
ناديا عماد الأمين، لقاء علي جازع، زهراء هادي
- 84-81 تأثير فعالية مستخلص قشور البصل الأحمر *Allium cepa* في حفظ مفروم لحم الدجاج المخزون
علياء سعد الحافظ
- 89-85 تأثير المستخلص الكحولي لدرنات نبات السعد *Cyperus rotundus* على كلية ذكور الفئران البيضاء
بسملة علي جاسم

العلوم الزراعية

- 104-90 تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في نمو وإزهار صنفين من القرنفل *Dianthus caryophyllus L*
مشتاق طالب حمادي الزرفي، فاضل حسين رضا الصحاف

هندسة العمارة

- 113-105 نمذجة المعلومات البنائية (BIM) وتكامل العملية التصميمية
أسامة عبد المنعم خريبط التميمي، محمد رضا شاكر مجيد، أنس حميد مجيد

ENGLISH SECTION

Isolation and purification of adenosine deaminase (Aminohydrolase EC 3.5.4.4) enzyme from serum of breast cancer patients

Khalid F. Al -Rawi, Mohammad Q. Al-Ani and Muna M. Aldosary

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

E- mail: aaldouri96@yahoo.com

ABSTRACT

The present study aimed to measure the levels of the serum adenosine deaminase (ADA) enzyme in a sample of females patients diagnosed by breast cancer (BC), as ADA enzyme is considered one of the biochemical tools that used to identify the breast cancer disease. serum adenosine deaminase (ADA) of fifty women with newly diagnostic breast cancer and before any treatments were collected for the study. The results showed that the activity of ADA enzyme was (319 IU/l), which reflected that there was an elevated level as compared with normal level for the enzyme (2-30 IU/l). The optimization of extraction methods was achieved to isolate and purify ADA enzyme from the serum, which included: precipitation by ammonium sulphate in saturated degree between (35-65), which showed an increase in specific activity for partial purification of ADA enzyme crude from 0.298 to 3.44 unit/gm. the second method was ion-exchange using DEAE-Cellulose and gel filtration chromatography using Sephadex 6B CL, by which these steps raised the specific activity from 3.44 U/mg for partial purification ADA and resulted from precipitation step to 7.9 U/mg after ion-exchange and 19.3U/mg after gel filtration. The purification fold was 20.3 and 35.7 from these two steps, Molecular weight for ADA was 41KD calculated from gel filtration.

Keywords: Adenosine Deaminase (ADA), Breast Cancer BC, Gel Filtration Chromatography (GFC).

الملخص باللغة العربية

سعت هذه الدراسة إلى قياس مستويات إنزيم الأدينوسين منزوع مجموعة الأمين (ADA - Adenosine deaminase) في عينة من المصابات بسرطان الثدي، باعتبار هذا الإنزيم من أهم المقاييس الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص الإصابة بمرض سرطان الثدي. تم جمع عينات الأمصال من خمسين مصابة بسرطان الثدي ممن لم يخضعوا بعد لأي برنامج علاجي، من مستشفى الرمادي العام، حيث تراوحت أعمارهن ما بين 26-61 سنة. أظهرت نتائج الدراسة ارتفاعاً في مستوى الإنزيم من (2-30 وحدة دولية / لتر) وهو المستوى الطبيعي إلى (319 وحدة دولية / لتر) في العينة، وقد تم عزل وتنقية الإنزيم باستخدام تقنيات متعددة للتنقية تضمنت الترسيب بكبريتات الأمونيوم، تفاعل الديلزة، والفصل بالتبادل الأيوني، بالإضافة إلى استخدام تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي، وقد بلغت قيمة الوزن الجزيئي للإنزيم بواسطة تقنية الترشيح الهلامي على عمود (Sephadex 6B CL) (41 كيلودالتون).

INTRODUCTION

Adenosine deaminase (EC.3.5.4.4) (ADA) is involved in purine catabolism by irreversibly convert of adenosine (Ado) and deoxyadenosine (dAdo) into inosine and deoxyinosine, respectively. ADA enzyme is important for purine metabolism (1). It is presented virtually in all mammalian cells, and it is thought that its primary function in human beings is related to the immune system (2). The enzyme is a glycoprotein compound consisting of a single polypeptide chain of 311 amino acids. The primary amino acid sequence of ADA is highly conserved across species. The crystal structure has also revealed that ADA is a metalloenzyme that complexes one mole of Zn^{+2} per mole of protein. Zinc plays a critical role in catalysis. ADA is an endogenous enzyme generated from ATP (3). It is essential for breakdown of nucleic acids in tissues (4). The ubiquity and abundance of ADA in human tissues make it an ideal enzyme for the activation of nucleoside prodrug (5).

Several studies showed high serum ADA activity in patients with many diseases and concluded that it could be a good marker for them (6,7). These diseases include cancer; which act as a group of diseases that involve abnormal increases in the number of cells, with the spread from one part to others of the body in which genetically cause cell damage (8).

Cancer is a multistep disease process and is one of the major causes of death worldwide. Most common types of cancer is breast cancer, which refers to the malignant tumor that is developed from cells in the breast (9). Adenosine is an important signaling molecule that exerts major anti-inflammatory actions in tumorous conditions (9).

The increase of ADA activity could lead to scavenging of important molecule i.e. adenosine. Increasing the activity of ADA has been reported in breast cancer patients in different stages as compared to controls (10). These findings might be important for diagnostic purposes in advanced breast cancer. Therefore, assessment of the levels of serum enzyme may be significant in early detection of carcinoma breast (11).

The aim of the present study is to isolate, purify and study the activity of ADA enzyme in a sample of female patients with breast cancer and evaluate its role as possible marker of breast cancer progression. The study also is an attempt to find the relationship between ADA enzyme and breast cancer.

SUBJECTS AND METHODS

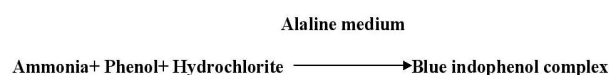
Collection and preparation of blood samples

A total of (50) samples of blood were collected from female patients with breast cancer. five ml of blood were collected in plain tubes from the patients, newly BA diagnosed and before any treatment. All women were monitored and diagnosed as breast cancer patients. Their ages

ranged between 26 -61 years old, and all were attended to Al- Ramadi General Hospital from different geographic locations. The blood samples were allowed to stand at room temperature until clotting, then serums were separated by centrifuge.

Determination of ADA activity in the sample

The protocol was adopted from Giusti *et al.* (12), in which enzyme activity is defined as the amount of ADA enzyme that forms one of micromole ammonia in one minute, according to the following chemical equations:



The activity of ADA enzyme was determined by using spectrophotometer analysis, where the colored complex was measured and absorbed at 630 nm.

Determination of total protein

Serum total protein was determined by the method of Bradford (13), where bovine serum albumin (BSA) was used as standard protein.

Isolation and purification of ADA

a. Ammonium sulfate precipitation: Protein was precipitated by solid ammonium sulfate (14). serum was brought to (35-65 %) saturation with ammonium sulfate. The supernatant was separated by cooling centrifugation at 10,000 rpm for (30) minutes. The supernatant was ignored and the precipitates were dissolved in small amount buffer for detecting the ideal saturation proportion of enzyme concentration. After stirring for 30 minutes and centrifuging as above, the enzyme activity and protein concentration was estimated.

b. Dialysis: The partial purified enzyme was dialyzed overnight at 4°C using solid sucrose sugar. The final volume measured and the protein concentration was assessed, and the ADA activity was determined (12).

c. Ion- exchange chromatography: The DEAE-cellulose column was used, where 3ml from the sample was applied to a column with dimensions 2.5×10 cm. Elution was carried out at flow rate (5 ml/3min). Using Tris-HCl buffer pH 7.6 as elutant, the fractions were collected and ADA activity and protein concentrations were determined.

d. Gel filtration chromatography: The Sepharose 6B CL gel was used in column with dimensions of 2.5×15 cm. 2 ml from the sample was applied to a columne and eluted using 0.2M Tris-HCl buffer pH 7.2 with flow rates of (5ml/3min) and 9 ml for each fraction. The absorbance of each fraction was measured at 280 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the present study showed that the activity of serum ADA in the tested sample of female patients of BA had increased to (319 IU/L) as compared with normal level of ADA enzyme (2-30 IU/L). Moreover, the specific activity of purified ADA enzyme had increased compared with the crude enzyme from (0.298 U/mg) to (3.44 U/mg). those results are in accordant with (15-17), who cocluded that purified ADA from breast cancer patients. Results also were in agreement for those concluded by (18), when ADA levels of patients with thalassemia had reached to (98.9U/L). these results indicated that the enzyme activity and specific activity had increased with progress of purification stages, which could lead to the benefit of measuring serum ADA activity in assessing BC. Elevation of serum ADA activity might be a physiologic attempt of the cancer cells to provide more substrate needed by cancer cells to accelerate the salvage pathway activity, also the purine metabolism and salvage pathway activity of purine nucleotides are accelerated in the serious human colorectal tissue (19). In addition, these findings may be a compensatory mechanism against toxic accumulation of ADA substrate, which means that adenosine and deoxyadenosine are produced from accelerated purine metabolism in the cancer cells (20).

The outcomes of protein precipitation by salting out technique using inorganic salts such as ammonium sulphate [NH₄(SO₄)₂] were the purification by ammonium sulfate. Results in table (1) showed that most of proteins in the tested sample were precipitated at partial purification in saturated degree between (35-65%), and thus caused elevated in specific activity for partial purification ADA from (0.298 unit/gm) in crude sample to (3.44unit/gm) after first step in purification, and the purification fold also had increased after precipitation from (0 to15.1).

Table(1): Partial purification of ADA from serum of BC patients

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity unit/mg of protein	Purification fold
Crude extract	731	319	0.298	0
35%-65% Ammonium sulphate	56.5	145	3.44	15.1
DEAE cellulose chromatography	33.7	123	7.9	20.3
Sepharose 6B CL	12.1	111	19.3	35.7

These results could be justified as ammonium sulphate has no adverse effects upon enzyme activity, and this result is in agreement with (21).The specific activity had slightly increased after dialysis. This might be due to the exclusion of the small molecules and increase of the purification of enzyme.

Results of ion- exchange chromatography showed that the ADA was purified until being homogenized. These results are in accordance with those obtained by (22, 23), which showed that there were losing in ADA activity after ion exchange chromatography.

The use of (DEAE-cellulose) column after the step of ammonium sulphate concentration was effective in purification step of enzymes (24), due to the hydrophilic nature of cellulose, and these exchangers had little tendency to denature proteins, which used as the first ion exchangers designed for biological substances such as protein, carbohydrates and nucleic acid (25).

Results from using gel filtration chromatography showed that total activity for purified ADA enzyme reached to (111 IU/L) and the specific activity of ADA enzyme was increased to (19.3u/mg) by (35.7) folds than the specific activity in last purification step (7.9u/mg) by (20.3) folds as shown in table (1). The apparent molecular weight was estimated for ADA using Matrix Sepharose 6B CL calibrated with known molecular weight proteins. The molecular weight was determined from the standard curve, which found that the apparent molecular weight of ADA was 41 KD calculated after gel filtration These results are similar to those obtained by (26), which used gel filtration as purification step for increasing enzyme purity.

REFERENCES

1. Gaspar HB.; Aiuti A.; Porta F.; Candotti F.; Hershfield MS. and Notarangelo LD. (2009). How I treat ADA deficiency. Blood. 114(17):3524-3532.
2. Wilson DK.; Rudolph FB. and Quijcho FA. (1991). A pre-transition state mimic of an enzyme: Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. Science. 252(5010):1278-1284.

3. Berrie C. (2004). Blood serum enzyme activity profiles as indicators of prognosis and chemotherapy response in breast cancer. Available at: <http://www.docguide.com>
4. Blackburn MR. and Kellems RE. (2005). Deficiency of adenosine deaminase: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv. Immunol.* 86:1-41.
5. Wu JZ.; Lin CC. and Hong Z. (2003). Ribavirin, viramidine and adenosine deaminase catalyzed drug activation: implication for nucleoside prodrug design. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 543-546.
6. Al-Assi WN. (2006). Adenosine deaminase enzyme activity in serum for native Rheumatoid Arthritis and hemolysis with normal serum in Salahaldeen. *Tikrit J. Pure Sci.* 11(1):79-82.
7. Al- Obaidi AH. (1999). Adenosine deaminase in cerebrospinal Fluid: an evaluation of its role as a diagnostic marker for meningitis in children. Master thesis. University of Tikrit, Iraq.
8. Varricchio CG. (2004). A cancer source book for nurses. Boston, Jones and Bartlett Publishers. P. 229.
9. Mealiffe ME.; Stokowski RP.; Rhees BK.; Prentice RL.; Pettinger M. and Hinds DA. (2010). Assessment of clinical validity of a breast cancer risk model combining genetic and clinical information. *J. Nat. Cancer Inst.* 102:1618-1627.
10. Eltzschig HK.; Weissmuller T.; Mager A. and Eckle T. (2006). Nucleotide metabolism and cell interactions. *Methods Mol. Biol.* 341:73-87.
11. Seth RK.; Kharb S. and Kharb DP. (2003). Serum biochemical markers in carcinoma breast. *Indian J. Med.* 57(8):350-354.
12. Giusti G.; Galanti B. and Mancini A. (1970). Serum guanase activity in viral hepatitis and some other hepatic and extrahepatic diseases. *Enzymol.* 38: 373-378.
13. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-264.
14. Robyt JF. and White BJ. (1987). Biochemical techniques, theory and practice. Wadsworth, Inc., Belmont, California, USA.
15. Gnerlich JL.; Deshpande AD.; Jeffe DB.; Suite A.; White N. and Mergenthaler JA. (2009). Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J. Am. Coll.* 3:341-347.
16. Mahmoud A.; Fatemeh K.; Siamak S. and Morteza A. (2010). Diagnostic Value of Adenosine Deaminase Activity in Benign and Malignant Breast Tumors. *Arch. Med. Res.* 41:14-18.
17. Al Attar HY. (2005). An enzymatic and harmonic study of the blood and tissues of benign and malignant breast tumors in the city of Mosul and some of the northern region. Ph.D. Thesis. College of Sciences, University of Mosul, Iraq.
18. McPherson K.; Steel CM. and Dixon JM. (2000). ABC of the breast disease, breast cancer epidemiology, risk factor, and genetics. *Brit. Med. J.* 321:624-626.
19. Erglu A.; Canbolat O.; Demirci S.; Kocaoglu H.; Eryavuzm Y. and Akgul H. (2000). Activities of adenosine deaminase and 5'-NT in cancerous and non-cancerous human colorectal tissues. *Med. Oncol.* 17 (4): 319-324.
20. Sharma S.; Desai PB. and Metgudmath RB. (2013). Evaluation of serum adenosine deaminase and retinol in patients with laryngeal cancer. *Indian J. Pharma. Bio. Res. (IJPBR).* 1(4):30-34.
21. Mukeshkumar DJ.; Priyadharshini DA.; Suresh K.; Saranya GM.; Rajendran K. and Kalaichelvan PT. (2012). Production, purification and characterization of α -amylase and alkaline protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a concomitant production medium. *Asian J. Plant Sci. Res.* 2:376-382.
22. Lisma S. and Ramesh S. (2000). Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol. Cell. Biochem.* 204:127-134.
23. Jaroszewicz L. and Kowalczyk K. (1995). Adenosine deaminase from human thyroid :purification and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 215:1096-1103.
24. Sideraki V.; Mohamedali KA.; Willson DK.; Chang Z.; Kellems RE.; Quirocho FA. and Rudolph FB. (1996). Probing the function role of two conserved said aspartat in mouse adenosine deaminase. *Biochem.* 35:7862-7872.
25. Grzywnowicz K. and Sobczyk K. (2006). Natural peptide inhibitors of proteases from white rot basidiomycete *trametes versicolor*. *Annal. Univ. Marine Curie-Sklodowska.* 49: 228-233.
26. Skoog DA. (2006). Principles of instrumental analysis. 6th ed. Thompson Brooks. Cole: Belmont, CA, Chapter 28.

Effect of light intensity on biofuel production from green alga *Chlorella vulgaris*

Fikrat M. Hassan (1), Jasim M. Salman (2) and Maysam A. Baiee (2)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences for Women / University of Baghdad (2) Dept. of Biology / College of Sciences / University of Babylon / Republic of Iraq

E-mail: jasimsalman@uobabylon.edu.iq

ABSTRACT

The intention of oil consumption as fuel resources had resulted in many critical and dangerous problems that considered as threatening situations for the earth environment, which necessarily summoned looking for alternative fuel resources to save earth temperature and reduce its associated impacts on climate changes.

In the present study, light intensity treatment at a group of measures (125, 268 and 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2$) were used to stimulate bioethanol production from microalga. The effects of these treatments on *Chlorella vulgaris* were investigated on its growth and its carbohydrate contents.

Results showed that the growth curve of the studied alga was different among the treatments. Different times of the beginning of the stationary phase were noticed as follows: day 13, 12 and 9 at 125, 268 and 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ of the treatments, respectively. The growth rate (K) increased from 0.08 to 0.15 for the treatments 125 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ and 268 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ respectively. The longest doubling time (G) was recorded in the treatment of 25 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ (3.4 days). The treatment 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ was recorded as the highest bioethanol yield, which was 19.63% dry weight (DW) and highest carbohydrate content, which was 18.52% DW.

Keywords: biofuel, bioethanol, light intensity, *Chlorella vulgaris*

الملخص باللغة العربية

أدى تعاضل استهلاك البترول ومشتقاته كمصادر للوقود إلى العديد من المشكلات والظواهر التي شكلت تهديدا كبيرا لبيئة كوكب الأرض، مما استدعى بالضرورة البحث عن مصادر للوقود البديل للحد من ارتفاع درجة حرارة الكوكب والتقليل من الآثار المصاحبة للتغيرات المناخية نتيجة ذلك.

في هذه الدراسة، تم استخدام شدة الإضاءة بمجموعة من المقاييس (125، 268، 300 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية) لتحفيز إنتاج الإيثانول الحيوي من طحلب مجهري. تمت دراسة تأثير هذه المعاملات على نمو ومحتوى الكربوهيدرات للطحلب *Chlorella vulgaris*. وقد بينت النتائج اختلافا في دخول الطحلب في مرحلة النمو الثابت بعد اليوم 13، 12، 9 في المعاملات 125، 268، 300 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية على التوالي. كما ازداد معدل النمو للطحلب (K) من 0.08 إلى 0.15 في معاملات 125 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية و 268 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية على التوالي. وتراوحت أطول فترة مضاعفة (G) بين يومين في معاملة 300 السيطرة إلى 3.4 يوما في معاملة 125 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية. كما سجلت أعلى نسبة من محصول الإيثانول (19.63% وزن جاف) وأعلى نسبة كربوهيدرات (18.52% وزن جاف) في معاملة 300 مايكرو إينشتاين/ متر مربع/ ثانية.

INTRODUCTION

Fuels are mostly derived from different types of organisms or biological materials such as biofuels (1). Many scholars around the world had – but still-looked for eliminating the effect of greenhouse due to unsafe use of fuel, and the raising in cost rates (2-4). Thus, research efforts were directed to stimulate the production of biofuels from microorganisms and plants to improve environmental sustainability (5). Biodiesel and bioethanol are known as biofuel resources (6). Biodiesel is produced by algae (7-8), while bioethanol can be produced from different crops (9-11).

Harun *et al.* (2010) revealed that the use of bioethanol has more advantages over other fuels in terms of toxicity, ability to biodegradation and no need for modifying the engine (12).

A number of bio feed stocks were tested to stimulate bio-fuels from different organisms. Algae was used for this purpose and considered as a promising resource (13,14).

There are advantages, features of using microalgae in terms of short life cycle, easy to cultivate in the laboratory and its ability of fixing dioxide carbon through photosynthesis (15). These microalgae can be selected as bioethanol producers due to their ability to produce carbohydrates in high quantity compared with lipid contents (16). *Chlorella vulgaris* is one of these microalgae in which it produces up to 37% DW of carbohydrate (starch). However, other microalgae can be used if they have higher starch contents (17).

In Iraq, the studies of biofuel were started recently (7,8, 18). These studies were conducted on biodiesel production from local isolated algae from Iraq. No studies were recorded on bioethanol in Iraq.

The present study aimed to isolate and purify *C. vulgaris* from local habitats in Iraq, and examine the ability of the algae to produce ethanol and catalyze ethanol production at different light intensities.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and purification of Alga *C. vulgaris*:

Alga *C. vulgaris* was isolated from artificial canal around University of Babylon campus near Al-Hilla City. The alga were cultured in modified Chu-10 (Table 1).

Two techniques were used to isolate and purify the algae, serial dilution and streaking on plate agar methods. The cultivation period was 14 days after inoculated 10 ml of isolated alga to 100 ml of culture media and then transported to a glass container (five liters).

Table (1): The components and concentrations of modified Chu-10 medium (19).

No. of stock solutions	Chemical formula of each salt	Concentration (g/l)
1	MgSO ₄ .7H ₂ O	10
2	K ₂ HPO ₄	4
3	NaNO ₃	8
	CaCl ₂	16
4	FeCl ₃	0.32
5	EDTA-Na	4
6	NaCl	30
7	Na ₂ CO ₃	8
8	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.02
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.028
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.224
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.004
	H ₃ BO ₃	0.288

The growth parameters were calculated as follows:

Growth curve and daily optical density (7). The following equations were used to calculate both growth rates (K) and doubling time (G):

$$K = \frac{(\log OD_t - \log OD_0)}{t} \times 3.322 \quad (20)$$

$$G = \frac{0.301}{K} \quad (20)$$

Where,

t: time (day)

OD_t: Optical density after (t) day

OD₀: Optical density at zero time

Experimental procedure:

The cultivation of the isolated alga was applied under 268 μE/m²/sec. This light intensity is considered as control. Other two treatments of light intensities were used (125, and 300 μE/m²/sec). Light intensity was measured by Lux meter (21).

Hydrolysis process:

In a stationary phase, 200 ml of *C. vulgaris* were put in Erlenmeyer and heated on a hot plate. The heating process lasted for two hours ±2 min with a heating temperature of 100°C ±2°C, and then cooled until the temperature reached 45°C ±2°C (22), and α-amylase enzyme was added with the concentration of 0.24 g/200 ml substrate and incubated for 80 min (23). Once hydrolyzed, hydrolysates were filtered using filter paper to be taken as supernatant. Supernatant was then centrifuged at 9000 rpm for 15 min. Centrifuged supernatant was sterilized, and used for the substrate of fermentation.

Fermentation process:

Saccharomyces cerevisiae was obtained from microbiology laboratory at University of Babylon. It was added to a concentration of 10% ($OD_{600nm} = 0.5$) and 2.5 ml volume into the 500 ml bottle fermenter containing 200 ml of substrate *Chlorella vulgaris*, incubated for 120 hrs at room temperature ($30^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$). If still experiencing increased levels of ethanol, the fermentation was continued. The fermentation process was stopped as ethanol levels had been reduced (22).

Ethanol analysis:

Samples were analyzed by HPLC system (24), model Knauer. HPLC consisted of acetonitril (100%) as a mobile phase, while the stationary phase was C18 column, dimension ($25cm \times 4.6mm \times 5\mu m$), injection flow was 1.2 ml/min, the absorption of UV 210. Ethanol standards used in the experiment were analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich. The samples were filtered by millipore filter $0.45 \mu m$, and the retention time was used to identify the compound. (Figure 1). The area under the peak was used for calculating the concentration of samples as the following formula:

$$\text{Concentration of sample (\%)} = \frac{\text{Area of ethanol peak}}{\text{Total area}} * 100$$

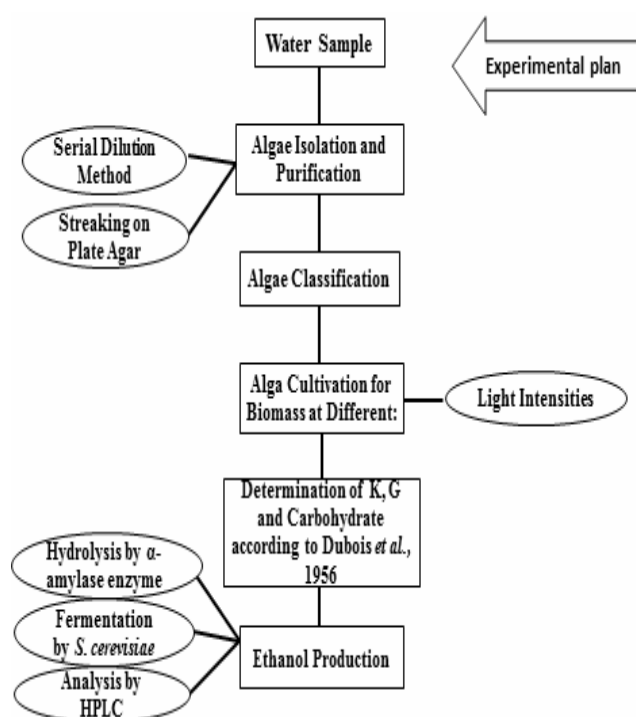


Figure (1): Experimental design of ethanol production from *C. vagaries* under different light intensities

The experimental data was analyzed via gene stat discovery (2012) to explain the effect of different used light intensities on carbohydrate and ethanol productions. Significant differences ($p < 0.05$) were calculated by using least significant difference (LSD).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolated alga and effect of light intensities on growth curve

C. vulgaris was obtained successfully, and it was identified according to (25) and (26) as follows:

Class: Chlorophyceae
 Order: Chlorococcales
 Family: Chlorococcaceae
 Genus: *Chlorella vulgaris* Beijerinck

Different growth rates were observed for isolated and treated algae (Figure 2). Monitoring the alga entry to the stationary phase was done at different days according to experimental light intensity. The cultivated alga entered their stationary phase in different days according to treatments as follows: in the 9 days for treatment $300 \mu E/m^2/sec$, 12 and 13 days for treatments 268 and $125 \mu E/m^2/sec$.

The K values were followed in 0.08 at $125 \mu E/m^2/sec$, 0.09 at $300 \mu E/m^2/sec$ and 0.15 at the $268 \mu E/m^2/sec$ (control). Significant differences were recorded in K values ($p < 0.05$) between all treatments (Figure 3).

The results recorded different doubling times (G) for *C. vulgaris* among treatments. The G for control was two days, while 3.4 days at $125 \mu E/m^2/sec$ and 3.1 days at $300 \mu E/m^2/sec$. Also, significant differences were recorded in G ($p < 0.05$) between control and all treatments (Figure 4).

Effects of light intensities on the carbohydrate content and amount of ethanol production

Carbohydrates could be used for bioethanol fermentation (27) and when the carbohydrate content increases the bioethanol production increases too, and that was observed in this study. The present study results showed an increase in carbohydrate contents of the *C. vulgaris* in response to increasing light intensities. The lowest contents were recorded in the treatment of $125 \mu E/m^2/sec$ and increased exponentially in other treatments as follows; 17.35% in the control treatment ($268 \mu E/m^2/sec$) and 18.52% in the treatment of $300 \mu E/m^2/sec$ (Figure 5). Statistically, there were significant differences among treatments. This increase in carbohydrate contents was a response to photosynthesis processes (28,29).

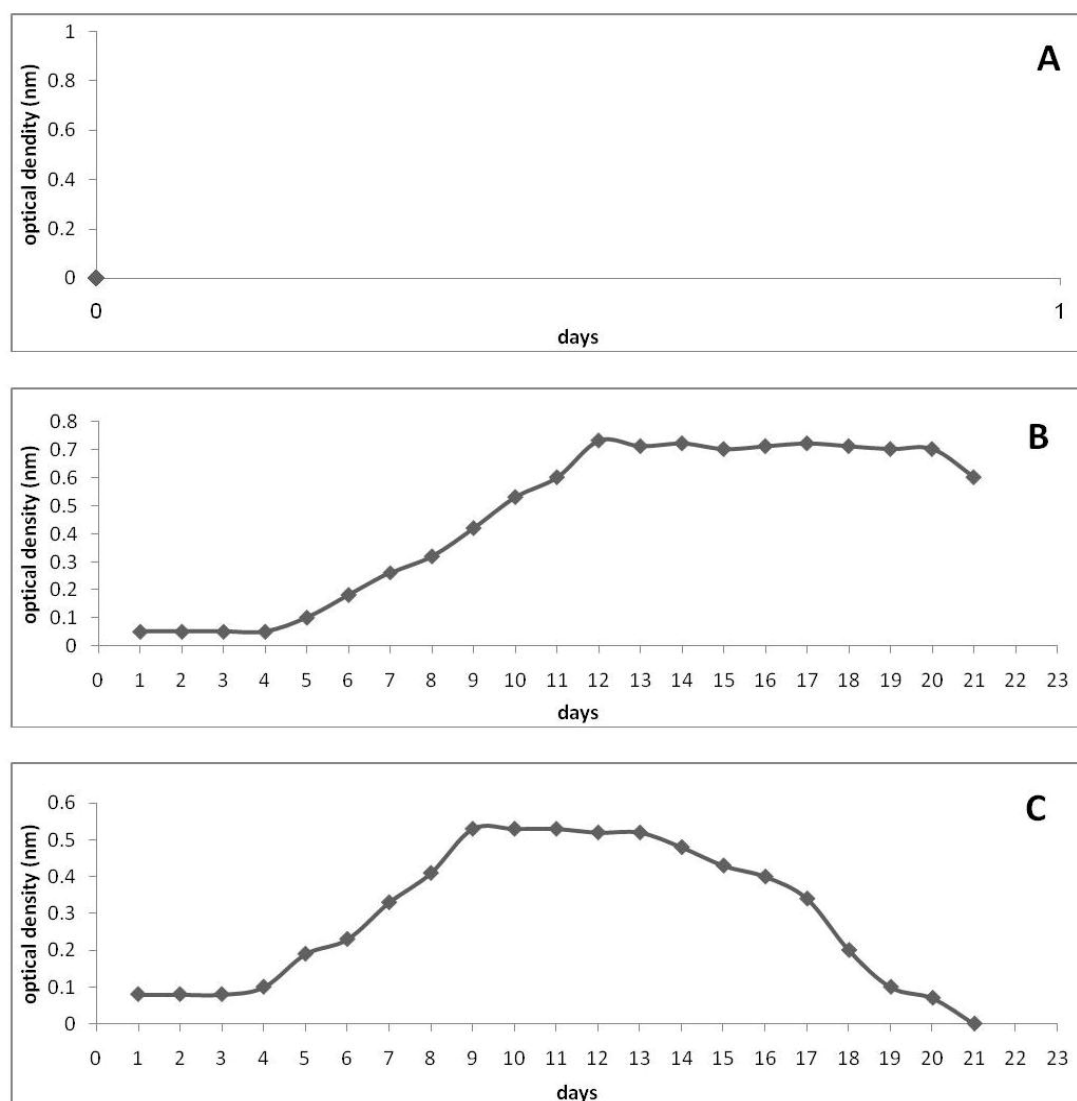


Figure (2): Growth curve of *C. vulgaris* at different levels of light intensities ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$) A= 125; B= 268(control); C= 300.Cultivation conditions: light intensity 268 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{Sec}$, temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16:8 light: dark period

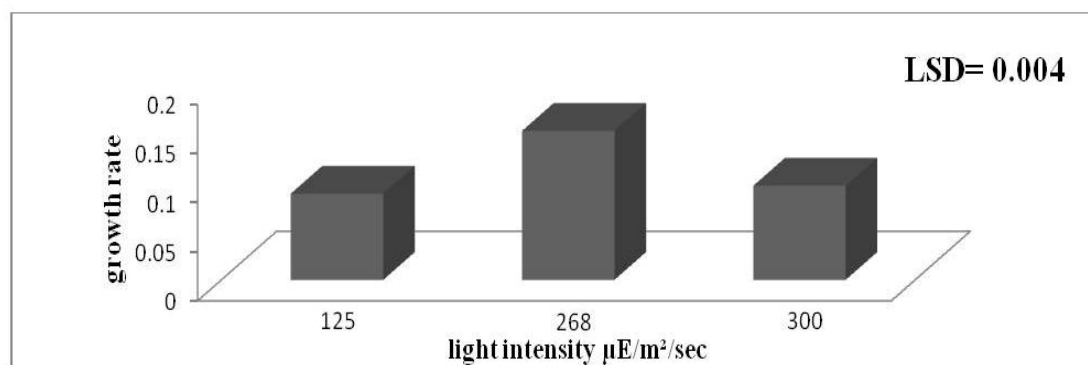


Figure (3): Growth rate of *C. vulgaris* at different light intensities ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). Cultivation condition: light intensity 268 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{Sec}$, temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16:8 light: dark period. LSD, least significant differences of means

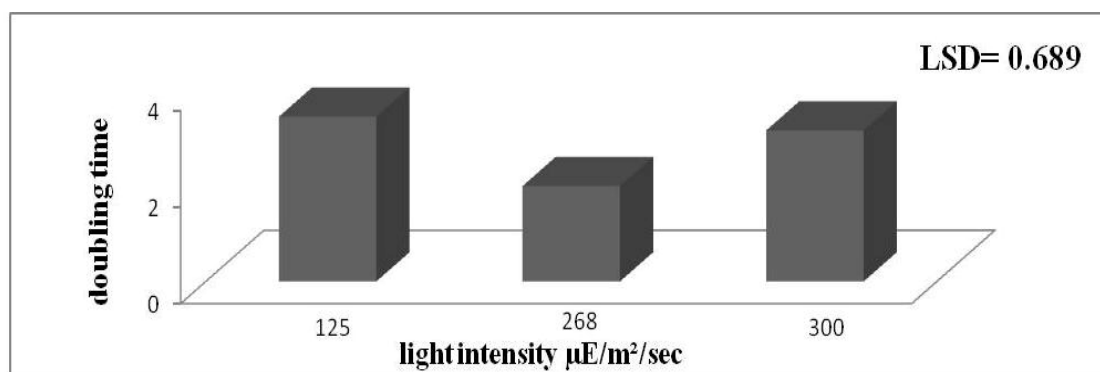


Figure (4): Doubling time of *C. vulgaris* at different light intensities ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). Cultivation condition: light intensity 268 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{Sec}$, temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16:8 light: dark period. LSD, least significant differences of means

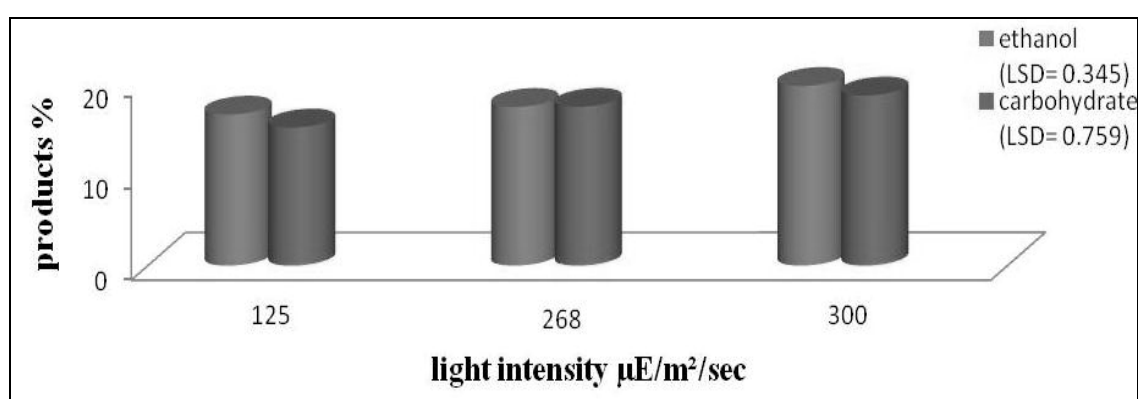


Figure (5): Ethanol and carbohydrate content of *C. vulgaris* at different light intensities ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). Cultivation condition: light intensity 268 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{Sec}$, temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16:8 light: dark period. LSD, least significant differences of means

When algae was exposed to suitable light intensity with respect for light period the chemical organic composition, including carbohydrate will increase (30). In light-dark cycle, light favors the accumulation of carbohydrate and in the absence of light, cells obtain their energy by metabolizing carbohydrate, and this energy is used to synthesis protein (31). The same results of increasing in carbohydrate in response to increase light intensity was noticed by (7). Higher carbohydrate content was reported 15.95% for *Spirulina platensis* when exposed to high intensity light in a fiber class chamber (32). It was noticed by (33) that an increase of light intensity had an effect on the hydrolysis process of photosynthesis.

Bioethanol production of *C. vulgaris* increased from 16.50% in treatment 125 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ to 19.63% in treatment 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$. While it was 17.34% in the control treatment. Bioethanol yield (%) showed significant differences between all treatments (Figure 5).

Other previous studies noticed the same results. A study conducted by (23) showed an increased production of ethanol from *S. cerevisiae* (4.42% ethanol (v/v)) with addition of α -amylase enzyme at 0.06 g for 120 hours. Another study also reported

that the ethanol produced from algae *Spirogyra* in anaerobic conditions was 11.36% (v/v), while in aerobic conditions was 2.16% (v/v) (34). Results of a study conducted by (35) reflected the success of producing 85 ml of ethanol from extracted carbohydrate by *S. cerevisiae* fermentation process from *Chaetomorpha* sp.

CONCLUSIONS

The alga *C. vulgaris* was considered as a source of ethanol production. The different light intensities influenced the carbohydrate content, and increased the bioethanol production of *C. vulgaris*. The high carbohydrate content and bioethanol yield were obtained when the light intensity is 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$.

Acknowledgments

The authors present their high appreciation and thanks for the support of the Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon.

REFERENCES

- Uriarte FA. (2010). Biofuels from plant oils. ASEAN Foundation, Jakarta, Indonesia.
- Tatli ZH. (2009). Computer based education: Online learning and teaching facilities. Energy Edu. Sci. Technol. Part B. 1: 171–181.
- Darici B. and Ocal FM. (2010). The structure of European financial system and financial integration. Energy Edu. Sci. Technol. Part B. 2: 133–145.
- Nguyen M.; Vu TH. and Hanh V. (2012). Bioethanol production from marine algae biomass: prospect and troubles. J. Viet. Env. 3(1): 25-29.
- Carere CR.; Sparling R.; Cicek N. and Levin DB. (2008). Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. Int. J. Mol. Sci. 9: 1342–1360.
- Demirbas MF. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. Appl. Energy. 88: 3473–3480.
- Hassan FM.; Aljobory IF. and Al-Jumaily EF. (2013). Stimulation of biodiesel production from two algae: *Chlorella vulgaris* Berjerinck and *Nitzschia palea* (Kütz) Smith, and study their some growth parameters under different light intensity. J. Env. Sci. Toxicol. and Food Technol. 6(2): 31-42.
- Hassan FM.; Hayder NH. and Hammadi SSF. (2015). Enhancement of Biodiesel Production from Local Isolates of Microalgae. Mesop. Env. J. 1(3): 66-81.
- Hammond GP.; Kallu S. and McManus MC. (2008). Development of biofuels for the UK automotive market. Appl. Energy. 85: 506–515.
- Tan RR.; Foo DC.; Aviso KB. and Ng DK. (2009). The use of graphical pinch analysis for visualizing water footprint constraints in biofuel production. Appl. Energy. 86: 605–609.
- Börjesson P. and Tufvesson LM. (2011). Agricultural crop-based biofuels – resource efficiency and environmental performance including direct land use changes. J. Cleaner Prod. 19: 108–120.
- Harun R.; Danquah MK. and Forde GM. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. J. Chem. Technol. Biotechnol. 85: 199–203.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from Microalgae. J. Biotechnol. Adv. 25: 294-305.
- Schenk PM.; Thomas-Hall SR.; Stephens E.; Markx UC.; Mussgnug JH.; Posten C.; Kruse O. and Hankamer B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Res. 1: 20-43.
- Wayman C. (1996). Handbook of bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Washington, USA.
- Eshaq FS.; Ali MN. and Mohd MK. (2011). Production of bioethanol from next generation feed-stock alga *Spirogyra* species. Int. J. Eng. Sci. Technol. 3: 1749–1755.
- Hirano A.; Ueda R. and Hirayama S. (1997). CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. Energy. 22: 137–142.
- Salman JM. and Mohammed-Ali MA. (2014). Bioethanol production from green alga *Chlorella Vulgaris* under different concentrations of nitrogen. Asian J. Nat. Appl. Sci.3(3): 27-36.
- Kassim TI.; Al-Saadi H. and Salman NA. (1999). Production of somphyto-and zooplankton and their use as live food for fish larva. Iraq. J. Agric. Prod. 4(5): 188-201.
- Fogg GE. (1975). Algae culture and phytoplankton ecology. 2nd ed. University of Wisconsin Press, Wisconsin, U.S.A. P. 175.
- Jiminez C.; Cossio BR. and Niell FX. (2003). Relationship between physiochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. J. Aquacul. 221 (4): 331-345.
- Zhang K. and Feng H. (2010). Fermentation potentials of *Zymomonasmobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. Afr. J. Biotechnol. 9:37-42.
- Sulfahri MS.; Sunarto E.; Irvansyah MY. and Mangkoedihardjo S. (2011a). Ethanol production from algae *spirogyra* with fermentation by *Zymomonasmobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Basic Appl. Sci. Res. 1:7.
- Chen HZ.; Liu ZH. and Dai SH. (2014). A novel solid state fermentation coupled with gas stripping enhancing the sweet sorghum stalk conversion performance for bioethanol. J. Biotechnol. Biofuels. 7: 53.
- Bellinger EG. and Sigee DC. (2010). Freshwater algae identification and use bioindicators. John Wiley and Sons Ltd. P. 271.
- Prescott GW. (1982). Algae of the Western Great Lakes areas. Willam, C., Brown, C.O. Pub. Dubuque. I. Iowa, 16th ed.
- John RP.; Anisha GS.; Nampothiri KM. and Pandey A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Bioresour. Technol. 102: 186–193.
- Yeh KL.; Chang JS. and Chen WM. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Eng. Life Sci.10: 201–208.
- Marsálková B.; Širmerová M.; Kurec M.; Brányik T.; Brányiková I. and Melzoch K. (2010). Microalgae *Chlorella* sp. as an alternative source of fermentable sugars. Chem. Eng. Trans. 21:1279–1284.
- Bouterfas R.; Belkoura M. and Dante A. (2002). Light and temperature effects on the growth rate of three fresh water algae isolated from a autotrophic lake. Hydrobiol. 489: 207-217.
- Cheirsilp B. and Torpee S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresour. Technol. 110: 510-516.
- Soni SK.; Agrawal K.; Srivastava SK.; Gupta S. and Pankaj CK. (2012). Growth performance and biochemical analysis of *Spirulinaplantensis* under different culture conditions. J. Algal. Biomass Utiln. 3(1): 55- 58.
- Adri N.; Zer H.; Shochats S. and Ohadi I. (2003). Photoinhibition: a historical perspective. Photosyn. Res. 76: 343-370.

34. Sulfahri MS.; Nurhidayati T. and Nurhatika S. (2011b). Aerobic and anaerobic processes of *Spirogyra* extract using different doses of *Zymomonasmobilis*. J. of Appl. Env. Biol. Sci. 1:101-108.
35. Gupta R.; Biswas K. and Mishra I. (2012). Ethanol production from marine algae using yeast fermentation. Biosci. Technol. 1(1): 17-22.

Histopathological and anatomical changes induced in the internal organs (heart, lung, liver and kidney) of laboratory mice after exposure to different concentrations of toilet detergent (Flash)

Manal K. Ebraheem

Dept. of Clinical Laboratory Sciences/ College of Pharmacy / University of Basra / Republic of Iraq

E-mail: manalkhaleel21@gmail.com

ABSTRACT

A commercial detergent Flash (toilet bowl disinfectant), is a widely used and easily available in most houses in Basra province. The present study aimed to investigate the general health risks of this detergent with emphasis on anatomical, histopathological, weight and general behavior effects by ingesting 30 mice (weighting about 22- 30 g) with detergent solutions. The mice were randomly divided in to five groups with 6 mice in each group. The control group was given ordinary water, while the experimental groups were given 25,50,75 and 100% of the detergent solutions, respectively as the only source of water for about 30 days.

The relative growth rate (RGR) in percentage of the control mice was 6.3, while the RGR of the experimental mice of 25,50,75 and 100% of the detergent solutions were -14.28, -30, -50 and -33.33, respectively. A significant difference ($p > 0.05$) existed between the mean weight of the control mice and the mean weights of the experimental mice with the 25,50 and 75% the detergent solutions. The anatomical alterations were observed in the internal organs (heart, lung, liver and kidney) structures of the experimental mice including marked black spots, hemorrhage and swollen, and the prominent features were shown in lung. The most important histopathological changes observed in the internal organs (heart, lung, liver and kidney) of the experimental mice included hemorrhage, congestion, infiltration of inflammatory cells and vacuolar degeneration in compared with the control mice. Results demonstrated that abnormal behaviors such as sluggishness, stress and increased mortality rates increased as the increase of the concentration of detergent solutions. The results indicated that the exposure to the toilet bowl detergent is highly health hazard even at small amount, and must be taken into consideration.

Keywords: flash, anatomical alterations, mortality rates, mice, relative growth rate (RGR).

الملخص باللغة العربية

يستخدم المنظف التجاري فلاش (مطهر أحواض المراحيض)، ويستخدم بنطاق واسع ومتوفر بسهولة في معظم المنازل في محافظة البصرة.

هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن المخاطر الصحية العامة لهذا المنظف مع التركيز على التغيرات التشريحية والمرضية، والوزن والسلوك العام لمجموعة من الفئران، حيث جرى تجريب 30 فأراً (تتراوح أوزانها ما بين 22-30 غم) بالمحلول المنظف، وتم تقسيم الفئران عشوائياً في خمس مجموعات في كل مجموعة 6 فئران، أعطيت مجموعة السيطرة الماء العادي، في حين أعطيت مجاميع التجربة 25، 50، 75 و 100 % من المحلول المنظف على التوالي كمصدر وحيد للماء لمدة 30 يوماً. وكانت النسبة المئوية لمعدل النمو النسبي في فئران السيطرة 6.3، في حين كانت النسبة المئوية لمعدل النمو النسبي في فئران التجربة بتركيز 25، 50، 75 و 100% من المحلول المنظف -14.28، -30، -50 و -33.33 على التوالي. كما أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ($p > 0.05$) بين متوسط وزن فئران السيطرة ومتوسط أوزان فئران التجربة مع 25، 50 و 75% من المحلول المنظف. ومن التغيرات التشريحية التي لوحظت في تراكيب الأعضاء الداخلية (القلب، الرئة، الكبد والكلية) لفئران التجربة ظهور بقع سوداء مميزة، ونزيف، وتورم، وكانت العلامات بارزة في الرئة. في حين كانت أهم التغيرات المرضية الملاحظة في الأعضاء الداخلية (القلب، الرئة، الكبد والكلية) لفئران التجربة حدوث نزيف، احتقان، ارتشاح للخلايا الالتهابية وانحطاط فجوي بالمقارنة مع فئران السيطرة. أظهرت النتائج سلوكاً غير الطبيعي مثل الخمول، الإجهاد وزيادة معدلات الوفيات في مجموعات التجربة مع زيادة تركيز المحلول المنظف. وبهذا تستنتج الدراسة أن التعرض لمنظفات المراحيض له مخاطر صحية كبيرة حتى لو كان التعرض لكميات صغيرة.

INTRODUCTION

Detergents are materials which aid in the removal of dirt or other undesirable matters from contaminated surfaces. Until the 1990s, soap was the only important detergent in the market, but today, soap is one of the numerous detergent products (1). However, modern technology has led to the creation of synthetic detergents that have gradually replaced soap in the laundry. Today, detergent market is highly competitive, where different brands are competing to get more consumers (2).

Detergents are widely used in both industrial and domestic premises to cloths, equipments, installation, heavy-duty machines and vehicles (3,4). The increasing domestic health hazards and environmental pollution arising from detergent exposure are reducing the popularity of its usefulness (5). There is no doubt that detergent exposure poses health risks to man and other animals, but the most important issue relies on what they actually act and cause and how dangerous they really are (6).

Toilet cleaning agents were also popular because they were available in almost every house. They involve in both intentional and unintentional exposure. Exposure to toilet cleaner could cause severe gastrointestinal injury and permanent morbidity (7). A study from Turkey reported that corrosive ingestions led to high fatality (8). Public education regarding the danger of toilet cleaner should be implemented (7).

Toxic effects of surfactants are usually presented after a direct contact with eyes and skin, mainly characterized by irritation, redness, itching, scaling in eyes, and erythema, contact dermatitis (skin), or harmful effects if swallowed e.g. damage of intestinal wall and internal organs (liver, kidneys etc.). Inhalation of aerosols causes respiratory tract irritation, and have carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects after chronic exposition, but there is usually a lack of experimental data (material safety data sheets). Surfactants act as deleterious agents mainly in microorganisms and water organisms, thus are chiefly used as disinfections or inhibitors of the fungal or algae growth (9).

The aim of this study was to examine the histopathological and anatomical alterations in the organs of mice (heart, lung, liver and kidney) that induced by exposure to different concentrations of the toilet detergent trading brand (Flash).

MATERIALS AND METHODS

Detergent (flash) properties

FLASH (Bowl Disinfectant) Made by Spartan Modern Industry Company, Jordan, was obtained from Basra local market. The chemical constituents of the detergent as stated by the manufacturers include surfactant, HCL (10-15%), N-alkyl dimethyl benzyl ammonium chlorides, tributyltin chloridem complex of ethylene oxide, and compensate of abietylamine (less than 5%).

Animal husbandry

Thirty mice of both sexes weighting about (22-30g) were obtained from animal house at the College of Education, University of Basra. The animals were left in the laboratory for one week to acclimatize before the experimental work and the mice were fed with a mixture of ground wheat, yellow corn and protein (3:2:1).

Experimental design

Mice were randomly divided into five groups with 6 mice in each group after taken their initial weights. Four concentrations (25,50,75 and 100%) of the toilet detergent were prepared. The control group was administrated by ordinary water. The experimental groups were administrated by 25,50,75 and 100% of detergent solution respectively, as the only sources of water. After one month of experiment, the final weights of the mice were taken and the calculation of relative growth rate (RGR) according to (10) were achieved by using the following formula:

$$RGR (\%) = \frac{W_F - W_I}{T} \times 100$$

Where:

W_F = final weight

W_I = initial weight

T = period of exposure

Anatomical and Histopathological examination

At the end of experimental period (4 weeks) or when any mouse was died, the anatomical pictures (macroscopic) of any changes in the organs of the mice were picked up. Then The internal organs (heart, lung, liver and kidney) were processed in a routine paraffin embedding procedure. Sections of 5 µm thick were taken which were later stained by hematoxylin and eosin method. Stained sections were examined by a light microscope.

Statistical analysis

Data analysis was created with Microsoft Office Excel 2007. Comparison of data among experimental and control groups were calculated using students t-test. P > 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Table (1) showed the adverse effects of Flash detergents on the weights of mice. The mean weight change of the control mice was 3.1 g, while the mean weights change of the experimental mice placed in 25,50,75 and 100% of detergent solutions were -3.3,-3.1,-3.6 and -5.8 g respectively. Also, the relative growth rate of the control mice in percentage was 6.3, while the relative growth rates of the experimental mice exposed to 25,50,75 and 100% of the detergent solutions were -14.28,-30,-50 and -33.33 respectively.

Table (1): Effects of Flash detergent solutions on the weights of the mice

Flash concentrations	Mean of initial weight (0 day)	Mean of final weight (30 days)	Mean weight change	Relative growth rate (RGR)	P values
Control	23 ± 2.8	26.1 ± 2.4	3.1	6.3 %	0.33371**
25 %	22.8 ± 0.9	19.5 ± 1.3	-3.3	-14.28 %	0.004*
50 %	22.5 ± 1.6	19.3 ± 1.7	-3.2	-30 %	0.003*
75 %	22 ± 2.0	18.3 ± 1.9	-3.7	-50 %	0.001*
100 %	25 ± 2.8	19.1 ± 1.9	-5.9	-33.33 %	0.14334**

Note: Data were expressed as Mean ± SD, when (*) $P > 0.05$ significant from control and when (**) $P > 0.05$ not significant from control.

The most important results of anatomical examination of experimental mice of the internal organs (heart, lung, liver and kidney) were marked black spots, hemorrhage and swollen in 25,50,75

and 100% of the detergent solutions in comparison with the control mice. The most prominent features were shown in lung. The results of anatomical examination of internal organs were shown in Figures (1, 2:1, 2:2, 2:3 and 2:4).

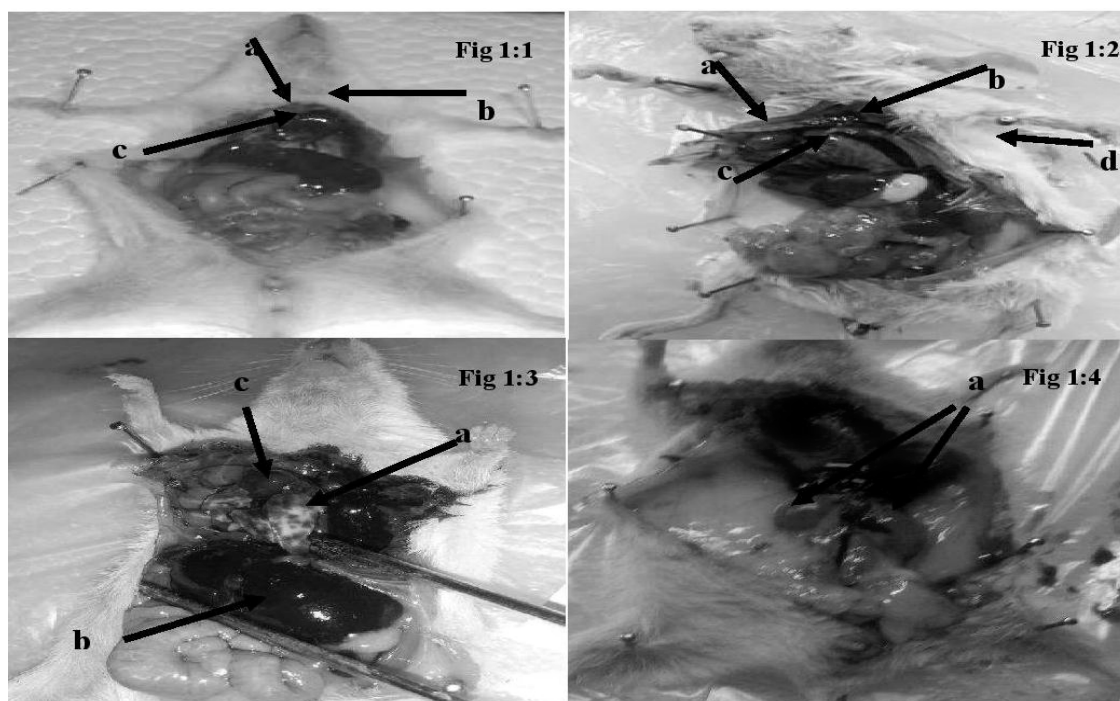


Figure (1): anatomical examination of internal organs. Figure (1:1): Control mice showed the normal anatomical structures of internal organs, a: heart b: lung c: liver. Figure (1:2): Experimental mice exposure to 100% detergent showed black spots, hemorrhage and swelling in a: heart, b: lung c: liver d: kidney. Figure (1:3): Experimental mice showed hemorrhage marked hemorrhage in a: lung, b: congested and swelling in liver and c: heart. Figure (1:4): Experimental mice showed hemorrhage and black spots in a: kidney



Figure (2:1) Experimental mice exposure to a:25%, b: 50% and c: 75% detergent show increase hemorrhage, congestion, black spots and swelling in heart with increase concentrations of detergent

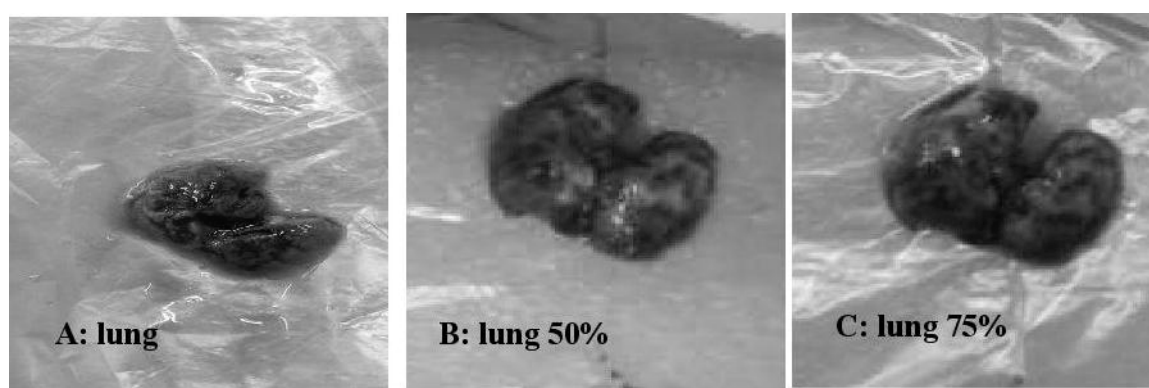


Figure (2:2): Experimental mice exposure to a:25% detergent b:50% detergent and c:75% detergent show increase hemorrhage, congestion, black spots and swelling in lung with increase concentrations of detergent

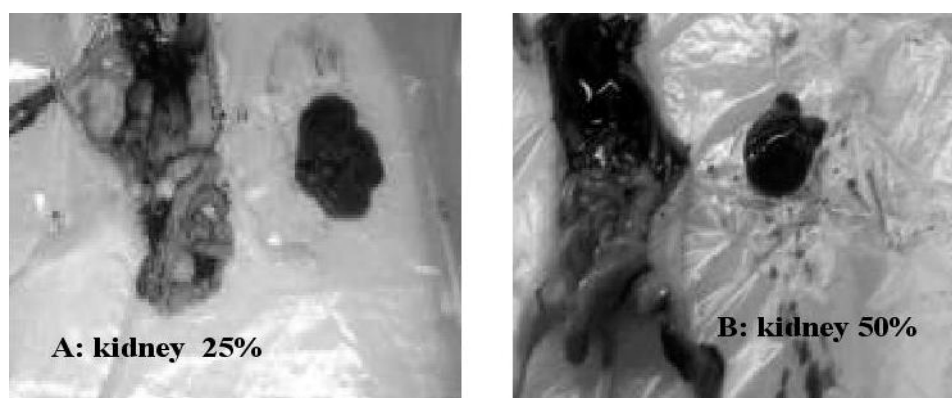


Figure (2:3): Experimental mice exposure to a:25% detergent b:50% detergent show increase hemorrhage, congestion, black spots and swelling in liver with increase concentrations of detergent

No pathological changes were observed in the internal organs of the control group (Figure 3). The results of histopathology examination of the internal organs of the experimental mice showed marked pathological changes. The heart showed degenerate and vacuolated myocardial muscle cells, hemorrhage and congestion changes in 25,50,75 and 100% of the detergent solutions, respectively (Figure 4). The lung of experimental mice suffered areas of emphysema ,congestion, hemorrhage and dilated of bronchiole in the 25 and 50% of detergent, prominent hemorrhage and congestion in

the75 and 100% of the solutions (Figure 5). The kidney showed cortical areas of dilated tubules , cortical aggregate of lymphocytes, hemorrhage and focal pyelonephritis in 25,50 and 75% of the detergent solutions and sever hemorrhagic and congestion changes in the 100% of the detergent (Figure 6). The liver showed congestion, few periportal foci/areas of mononuclear cells, sinusoid foci of activated/proliferated kupffer cells, hemorrhage ,congestion and dilated blood vessels in the 25,50,75 and 100% of the detergent solutions, respectively (Figure 7). Finally, the experimental mice showed marked reduce in body weight, sluggishness and high mortality rate compared to the control group.

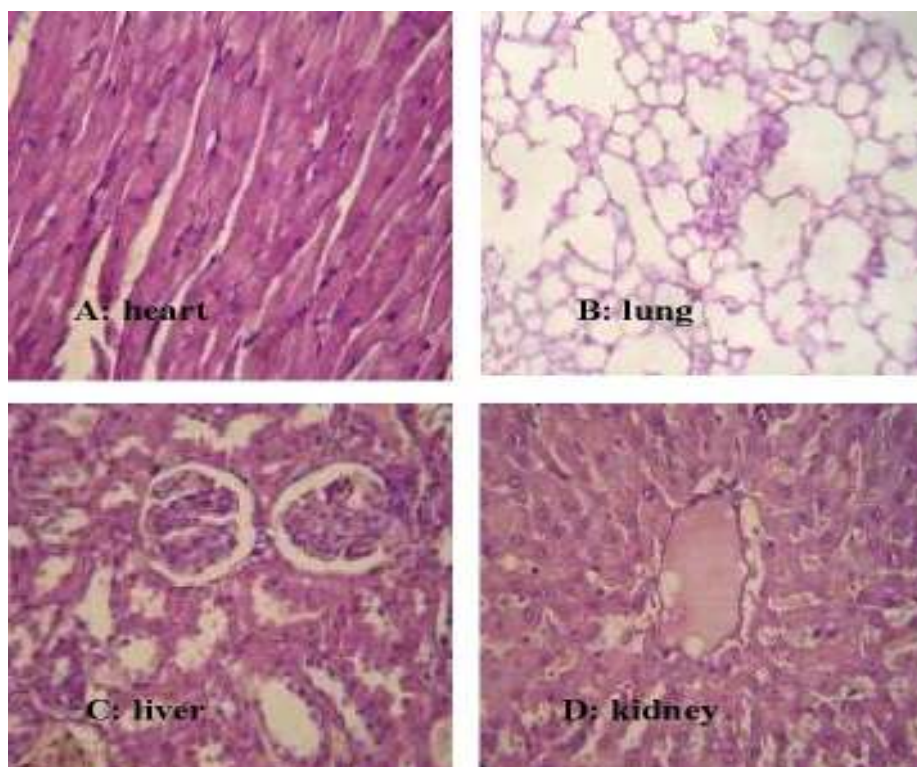


Figure (3): Control mice showed the normal structures of internal organs a: heart b: lung c: kidney d: liver

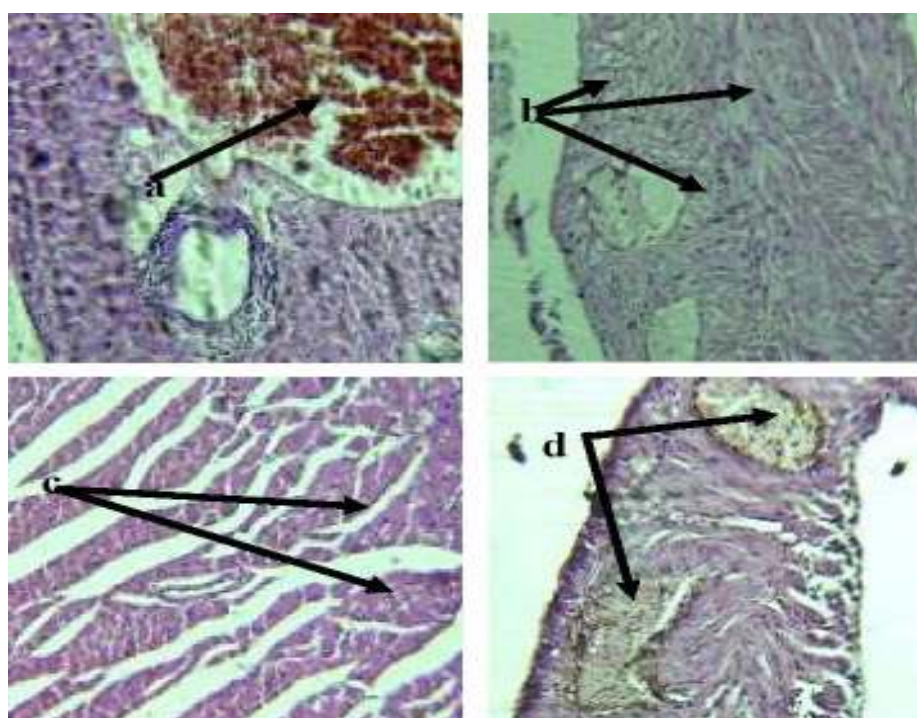


Figure (4): Heart of experimental mice show a: congestion b: vacuolated myocardial muscle cells c: edematous fluid d: hemorrhage and congestion

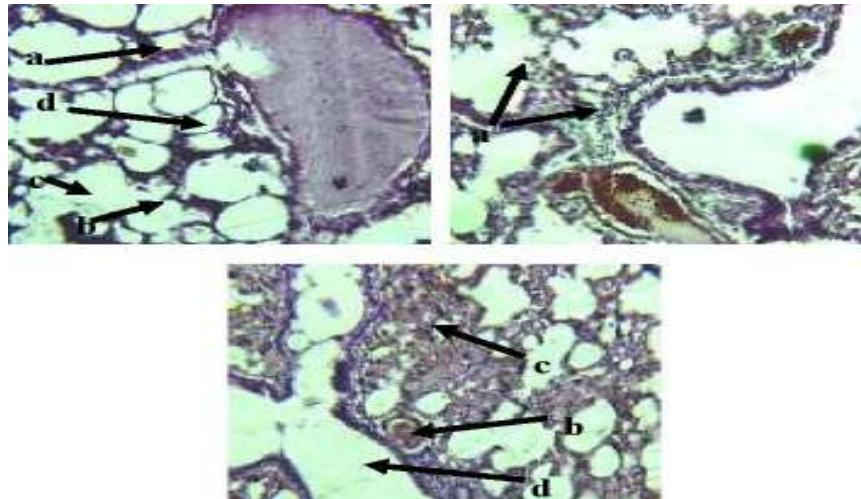


Figure (5): Lung of experimental mice show a: emphysema b: congestion c: hemorrhage d: dilated of bronchiole

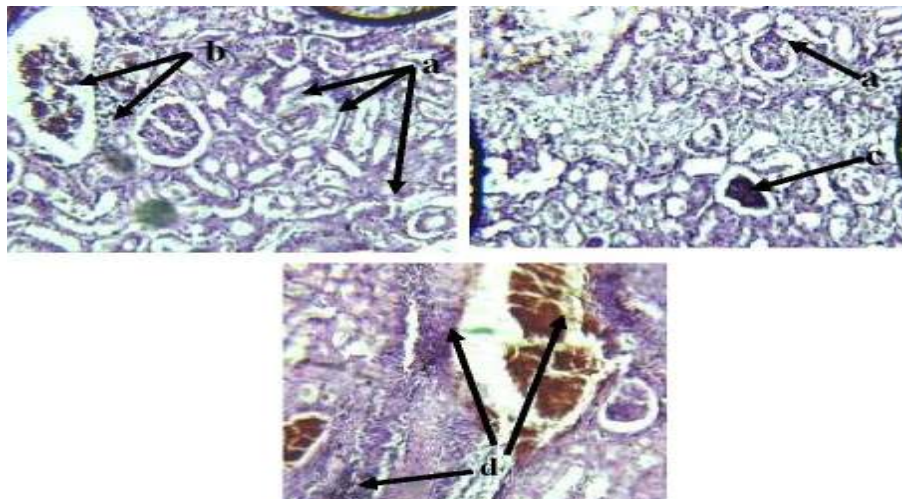


Figure (6): Kidney of experimental mice show a : cortical area of dilated tubules b: cortical area of lymphocyte c: congestion d: hemorrhage and focal pyelonephritis

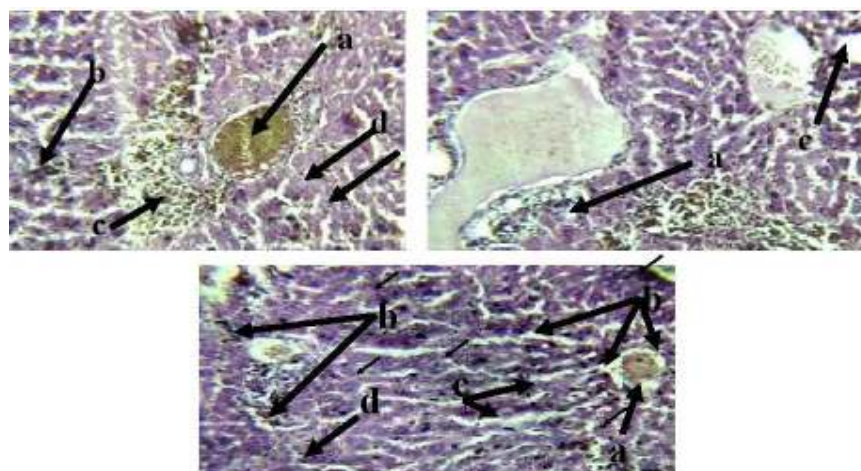


Figure (7): Liver of experimental mice show a: congestion b: proliferative kupffer cells c: dilated of sinusoid and blood vessels d: swelling of hepatic cells

DISCUSSION

The reduction in the growth rates of the experimental mice group supports the finding of (10) who reported that different concentrations (25,50,75 and 100%) V/V solution of detergents had adverse effects on the weights of mice and the relative growth rates of the mice (11), also observed that sub-lethal concentrations of detergent in an aquarium tank reduce the weight of catfish (*claris gariepinu*) exposed. The changes recorded in body weights and relative growth of experimental mice in this study may resulted from detoxification (12), poor physiological conditions of the exposed mice which led to loss of appetite, sluggishness and high metabolic demand (13). Toilet cleaner which contained hydrochloric acid caused more sever gastrointestinal injury after ingestion (7), this may cause nausea, sever digestive tract burns and weigh loss in experimental mice.

The present study indicated that toilet flash detergent solution induced marked anatomical (macroscopic) alterations in the internal organs (heart, lung, kidney and liver), of experimental mice such as black spots, hemorrhage and swollen. Similar results, have been reported by others (14,10). Congestion is a blood circulation disturbance due to the increase volume of the blood in the blood capillary. Macroscopically, the congestion of the fish liver showed dark red colorization, and microscopically, the blood capillary was widened and full of erythrocyte (14). Vacuolar degeneration is known as an acute swelling of the organ (15).

Microscopically, it was shown by the present of vacuoles in the cytoplasm and it is usually closed and/or around the nucleus. The vacuolar degeneration cannot be seen macroscopically, and it is usually shown by the swollen of the organ with pale colorization (14).

The mechanism of swelling starts as a decrease in O₂ levels which causes a drop in aerobic respiration. To maintain ATP levels, the cells must rely more on glycolysis. Glycolysis leads to lactic acid builds up, which causes the intracellular pH to drop. An acidic environment in the cell causes dysfunction of the Na⁺/K⁺ ATPases and consequent cell swelling due to an influx of Na⁺ and H₂O. Persistent ischemia can lead to Ca⁺⁺ influx mitochondrial and lysosomal damage, and membrane damage (16,17).

A study from Japan also recorded autopsy finding for the woman was ingested liquid detergent that the heart weighed 212.2 g, and contained large amounts of dark-red liquid blood. The left and right lungs weighed 242.9 and 182.6g respectively. Moreover, histological examination with Hematoxylin and Eosin stain revealed that the lungs were congested and edematous (18).

The major histopathological investigation of the internal organs (heart, lung liver, and kidney) of the experimental mice revealed that the detergent solutions are pathogenic to mice. The histopathological changes were as a result of cytotoxic agents in the detergent solutions which caused multi-organ injuries (10,19). This result supports the findings of (10, 20-22) who reported that the ingestion of detergent solutions can cause

multi-organ damage (10) leading to nervous system disorders, respiratory illness, birth defects, cancer and even death except the cancer probably due to short duration of the study (10, 23).

This study indicated that the main histopathological alterations such as congestion, cellular infiltrations and vacuolar degeneration varied with the differences in concentrations and period of exposure to the detergents, congestion and vacuolar degeneration increase with the high concentration while the cellular infiltrations more prominent in 25 and 50 % of detergent solutions and long period of exposure; this result in agreement with the submission of (22), who reported that, the major histological abnormalities observed were edema cellular infiltrations, congestion of central vein and cellular necrosis which showed a progressive architectures distortion at varied concentrations and period of exposures. (24), revealed that the longest time interval of lowest concentration was more damaged compared to the shortest time intervals of highest concentrations. In the present study, dilated of hepatic and cortical renal tubules of the experimental mice may be due to the toxic effects of the detergent solutions; this result support by (17), who reported, this is justifiable since the renal tubules are particularly sensitive to toxic influences, in part because they have high oxygen consumption and vulnerable enzyme systems, and in part because they have complicated transport mechanisms that may be used for transport of toxins and may be damaged by such toxin.

Also in the present investigation, the experimental mice showed abnormal behavior such as sluggishness, stress and high mortality rate with increase the concentration of detergent solutions in contrast the control mice. The observation was in agreement with (2), who showed the linear relationship between the probit mortality and the log concentration of detergent, also recorded several abnormal behavioral response in the exposed fish such as erratic swimming, loss of equilibrium, resting at the bottom, loss of skin coloration and sudden fish death. The sluggishness, low fecundity and high mortality rate observed in the exposed mice were direct consequences of impaired health and poor physiological conditions of the mice(9). Moreover it was reported that the pesticide and toilet cleaning agents caused severe morbidity and mortality (7). However, this result did not record a significant value on the weight of the experimental mice in the 100% of the detergent solution. Probably, due to sudden death of the experimental mice in about 2-3 days after exposure to this concentration.

In conclusion, this study demonstrated a direct correlation between detergent exposure and histopathological changes observed in the internal organs (heart, lung, liver and kidney), also the histopathological alterations and mortality rate depend on the concentration and period of exposure to the detergent. Finally, it is hoped that the results of this study will be useful for educating people on health risks that induced by detergents exposure and planning of health care. Also, more researches should be done on the genotoxic and cytotoxic effects of the toilet cleaning agents that available in most houses.

REFERENCES

1. Ronni W. (2004). Detergent chemistry foundations and application: encyclopedia.com. available at <http://www.encyclopedia.com>
2. Khurana R. (2002). Detergents: counting the cost of cleanliness. Toxic Link Fact Sheet, 16:1-4.
3. Lightowers P. (2004). Still dirty: A review of action against toxic products in Europe. A report of WWF-UK.
4. Chun WC. and You HZ. (2009). Nonionic surfactant Brij35 effects on toluene biodegradation in a composite bead bio-filter. Afr. J. Biotechnol. 8: 5406-5414.
5. Ezemonye LIN. and Enuneku A. (2005). Evaluation of acute toxicity of cadmium and lead to amphibian tadpole (Toad: *Bufo maculatus* and frog: *Ptychadena bibroni*) and frog. J. Aqua. Sci. 20:33-36.
6. Easy Essay (2007). Effects of laundry detergent on the environment. Available at: [Http://ez-essay.blogspot.com/2007/12/effects-of-laundry-detergent-on.html](http://ez-essay.blogspot.com/2007/12/effects-of-laundry-detergent-on.html)
7. Chitlada L. (2010). Acute poison exposure in the emergency department: a 2-year study in a university hospital. J. Med. Assoc. Thai. 93(7): S41-S49.
8. Akkose S.; Bulut M.; Armagan E.; Cebicci H. and Fedakar R. (2005). Acute poisoning in adults in the years 1996-2001 treated in the Uludag University Hospital, Marmara Region, Turkey. Clin. Toxicol. 43:105-109.
9. Madaan P. and Tyagi VK. (2008). Quaternary pyridinium salts: A review. J. Oleo. Sci. 9:197-215.
10. Yahaya T.; Okpuzor J. and Oladele EO. (2011). Investigation of toxicity of detergents. J. Env. Sci. Technol. 4(6): 638-645.
11. Esenowo IK. and Ugwumba OA. (2010). Growth response of catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to water soluble fraction of detergent and diesel oil. Env. Res. J. 4: 298-301.
12. Ojo OA. and Oso BA. (2009). Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. Afr. J. Biotechnol. 8: 1090-1109.
13. Ogunbileje JO. and Akinosun OM. (2011). Biochemical and hematological profile in Nigeria cement factory workers. Res. J. Env.Toxicol. 5: 133-140.
14. Sri R.; Desrina A. and Mulyana AR. (2008). Chronic effects of surfactant detergent linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the growth and survival rate of sea bass (*Lates Calcalifer* Bloch) larvae. J. Coast. Develop. 10: 2-12.
15. Kurniasih A. (1999). *Deskripsi Histopatologi dari beberapa Penyakit Ikan*. Pusat Karantina Pertanian, Departemen Pertanian. Jakarta.
16. Lieberthat W.; Menza SA. and Levine JS. (1998). Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. Am. J. Physiol. 274:F315-F327.
17. Al-Agha SZ. (2013). Histological, histochemical and ultrastructural studies on the kidney of rats after administration of monosodium glutamate. Master thesis. Biology Department, Faculty of Sciences, Al-Aqsa University, Gaza, Palestine.
18. Satoshi F.; Morita S.; Nishi K. and Hitosugi M. (2014). A case and review of death associated with ingestion of detergent. Forensic Med. Anatom. Res. 2: 89-94.
19. Ayandiran TA.; Fawole OO.; Adewoye SO. and Ogundiran MA. (2009). Bio- concentration of metals in the body muscle and gut of *clarias gariepinus* exposed to sub- lethal concentrations of soap and detergent effluent. J. Cell Anim. Biol. 3: 113-118.
20. Gholami M.; Fatemi SMR.; Falahi M.; Esmaili A. and Mashinchian A. (2010). Effects of heavy metals. J. Env.Toxicol. 4:231-236.
21. Ogundiran MA.; Fawole OO.; Adewoye SO. and Ayandiran TA. (2009). Pathologic lesion in the gills of *clarias gariepinus* exposed to sub-lethal concentrations of soap and detergent. J.Cell Anim. Biol. 3:78-82.
22. Ogundiran MA.; Fawole OO.; Adewoye SO. and Ayandiran TA. (2010). Toxicological impacts of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Claris gariepinus* B.). Agri. Biol.Am. 1:330-342.
23. Kassem N. (2010). Allergens and toxins in laundry detergents: synthetic ingredients that are harmful to people and the environment. Available at: <http://organizedwisdom.com/allergens-and-toxins-in-laundry-detergents-synthetic-ingredients-that-are-harmful-to-people-and-the-environment/1936071/nxi/med>
24. Akram S.; Naeemi S.; Jamili N. Shabanipour M.; Sotoodeh P. and Salehzadeh A. (2013). Histopathological change induced in the liver of the Caspian kutum fry after acute exposure to the anionic surfactant. Europ. J. Zool. Res. 2(5):100-105.

ECG changes in chronic renal failure

Ahmed M. Athab (1), Ali M. J. Al- Timimi (1), Ali S. H. Al- Duleimy (2) and Nabeel K. M. Ali (2)

(1) College of Medicine / University of Diyala (2) Baquba Teaching Hospital / Diyala / Republic of Iraq

E-mail: athab69@yahoo.com

ABSTRACT

Kidney diseases are considered as the third amongst life threatening diseases, after cerebrovascular and heart diseases. Cardiovascular disease is a common cause of death in patients with ESRD and advanced renal insufficiency. Anemia is common in chronic renal failure and can lead to left ventricular hypertrophy. Pericarditis also is common and may occur in two patterns. Pattern I is a hemorrhagic pericarditis that is treated with hemodialysis, while pattern II can occur in patients who are adequately dialyzed; it may be associated with hemorrhage and tamponade.

The present study is classified as a prospective study, which was carried out at Baquba Teaching Hospital, Renal Dialysis Unit, Medical Department. The study was conducted from 28th September 2013 to 15th March 2014. The sample was composed of 70 patients, 39 were male and 31 were female.

The aim of the study was to evaluate the ECG changes in patients with chronic renal failure in Baquba Teaching Hospital.

Results showed that there were abnormalities in ECG of patients with chronic renal failure. These abnormality signs included :sinus tachycardia (20%), sinus bradycardia (4%), P-pulmonale (5.7%), P-mitrale (1.42%), broad P-wave (11.4%), prolong P-R interval (8.57%), ST segment depression (2.85%), ST segment elevation (2.85%), T-wave inversion (37.1%), hyperacute T-wave (7.14%), LVH (4.28%), atrial fibrillation (5.7%), RBBB (5.7%), and LBBB (1.42%).

The study concluded that many ECG changes in CRF could occur, mainly hyper acute T wave and sinus tachycardia, and that those abnormalities could increase the incidence of morbidity and mortality from cardiac arrhythmia in patients with CRF.

Keywords: ECG- changes, CRF.

المخلص باللغة العربية

تعتبر أمراض الكلى من الأمراض الخطيرة التي تهدد الحياة، وهي تأتي بالمرتبة الثالثة بعد أمراض امراض الأوعية الدماغية وأمراض القلب المسببة للوفاة، من ناحية أخرى، تشكل أمراض القلب والأوعية الدموية التي تصيب مرضى الفشل الكلوي المزمن واحدة من أهم أسباب الوفاة بينهم، كما تشيع حالات فقر الدم والتهاب شغاف القلب المسبب لتضخم عضلة القلب بين مرضى الفشل الكلوي المزمن.

أجريت هذه الدراسة في مستشفى بعقوبة التعليمي في محافظة ديالى / العراق ، في وحدة الكلية الصناعية، حيث تم تنفيذ الدراسة على 70 مريض يعانون من مرض الفشل الكلوي المزمن (31 منهم ذكور و 39 منهم إناث) خلال الفترة ما بين 28 أيلول / سبتمبر 2013 إلى 15 آذار / مارس 2014، وذلك بهدف ملاحظة التغيرات الحاصلة عند إجراء فحص التخطيط الكهربائي القلبي لمرضى الفشل الكلوي المزمن.

أظهرت نتائج الفحص أن 20% من مرضى الفشل الكلوي المزمن يعانون من تسارع ضربات القلب و 4% يعانون من تباطؤ الضربات و 5.7% يعانون من زيادة الضغط الشرياني الرئوي، و 1.42% يعانون من تضخم الأذين الأيمن ، و 8.57% يعانون من زيادة عرض إشارة ب، كما لوحظت تغيرات ببقية التخطيط الكهربائي، حيث وجد أن ما نسبته 4.28% من المرضى لديهم تضخم في عضلة القلب، و 5.7% من المرضى لديهم رجفان أذيني، و 5.7% أيضا يعانون من انسداد بالحزمة الكهربائية اليمنى، فيما يعاني ما نسبته 1.42% من انسداد الحزمة الكهربائية القلبية اليسرى.

وبذلك فقد خلصت الدراسة إلى أن مرض الفشل الكلوي المزمن قد يحدث مضاعفات قلبية خطيرة يعكسها التخطيط الكهربائي القلبي الذي يعطي مؤشرات على ما قد تشكله مضاعفات الفشل الكلوي المزمن على القلب والأوعية الدموية والتي تعتبر بحد ذاتها من أهم وأخطر مسببات الوفاة لدى مرضى الفشل الكلوي المزمن.

INTRODUCTION

Kidney diseases rank 3rd amongst life threatening diseases, after cerebrovascular and heart diseases (1). The incremental risk of cardiovascular diseases in those with chronic kidney diseases (CKD) compared to the age- and sex-matched general population ranges from 10- to 200-folds, depending on the stage of CKD. Between 30 and 45% of patients reaching stage 5 CKD already have advanced cardiovascular complications (2).

Cardiovascular disease is a common cause of death in patients with ESRD (End-stage renal disease) and advanced renal insufficiency. Anemia can lead to left ventricular hypertrophy. Pericarditis may occur in two patterns. Pattern I is a hemorrhagic pericarditis that is treated with hemodialysis. Pattern II can occur in patients who are adequately dialyzed; it may be associated with hemorrhage and tamponade (3).

End-stage renal disease (ESRD) and cardiovascular disease have been inextricably linked since the earliest days of chronic dialysis. The first patient on long-term dialysis, died of myocardial infarction (MI) in 1970, at the age of 50 years, 11 years after starting hemodialysis (2).

The burden of cardiac diseases in all phases of renal failure is high, and their clinical impacts are grave. The most frequent clinical manifestations are IHD and CHF. IHD may be atherosclerotic or non-atherosclerotic in origin. CHF results from IHD, cardiomyopathy, or both. The manifestations of uremic cardiomyopathy include concentric and eccentric LVH and systolic dysfunction. Risk factors for cardiac disease in uremia include age, diabetes, hypertension, anemia, volume overload, hyperparathyroidism, dyslipidemia, and perhaps uremia itself (4).

Four reasons may explain why patients with renal dysfunction have poor cardiovascular outcomes in a variety of settings: (1) excess comorbidities associated with CKD and ESRD, in particular DM and heart failure; (2) therapeutic nihilism; (3) toxicity of therapies; and (4) special biological and pathophysiological factors in renal dysfunction that cause worsened outcomes (5).

Heart failure is common and is due to sodium and water retention, acid-base changes, hypocalcaemia and hyperparathyroidism, hypertension, anemia, coronary artery disease, and diastolic dysfunction secondary to increased myocardial fibrosis with oxalate and urate deposition and myocardial calcification. Uremia itself may also impair myocyte function. Smoking contributes not only to cardiovascular risk, but also to an accelerated rate of fall of glomerular filtration rate (GFR) (6).

Chronic renal failure is defined as progressive and irreversible loss of renal function. Loss of 75% of (GFR) typically does not result in pronounced symptoms, because the remaining glomeruli adapt with hyper filtration, and the surviving tubules adjust by maintaining adequate acid-base, fluid, and electrolyte balance (7).

The common causes of chronic renal failure can be summarized as follows:

1. Diabetic nephropathy.
2. Hypertensive nephrosclerosis.
3. Glomerulonephritis.
4. Renovascular disease (ischemic nephropathy).
5. Polycystic kidney disease.
6. Reflux nephropathy and other congenital renal diseases.
7. Interstitial nephritis, including analgesic nephropathy.
8. HIV-associated nephropathy.
9. Transplant allograft failure (chronic rejection) (8).

ESRD is identified on biochemical and clinical grounds as that point when despite conservative measures, the patient will die without the institution of renal replacement by dialysis or transplantation (9).

ECG abnormalities in chronic renal failure include in P and QRS waves (flat and broad P wave, disappearing P wave, widening of QRS wave, ST segment and T waves (tent-shaped T wave, shortening QTC interval, and depression or elevation of ST segment) (10).

Aim of the study

The study was conducted to evaluate the ECG changes in patients with chronic renal failure at Baquba Teaching Hospital, Diyala Province in Iraq.

PATIENTS AND METHODS

The study was carried out in Baquba teaching hospital at: renal dialysis unit, medical department, coronary care unit and emergency department, between 28th September 2013 to 15th March 2014 on a total sample of 70 patients suffering from chronic renal failure, (39 were male and 31 were female). For every patient with CRF, full history was recorded regarding the history of chronic diseases and medications. ECG was done for each patient, then analyzed for any changes occurred. Echocardiography was done for certain cases to detect left ventricular hypertrophy, systolic function and pericardial effusion with tamponade.

RESULTS

The results of ECG readings showed that 15 ECG were normal and 55 were abnormal (Table 1). The abnormalities in ECG of patients were recorded as follows:

1. sinus tachycardia(20%) and sinus bradycardia (4%) (Table 2).
2. P- pulmonale (5.7%), P-mitrale(1.42%), broad P-wave (11.4%) (Table 3).
3. prolong P-R interval (8.57%) (Table 4).
4. ST segment depression (2.85%), ST segment elevation (2.85%) (Table 5).
5. T-wave inversion (37.1%), hyperacute T-wave (7.14%) (Table 6).
6. LVH(4.28%), atrial fibrillation(5.7%), RBBB (5.7%), and LBBB (1.42%).

Table (1): ECG changes readings among the study sample

ECG	No. of readings	%
Normal	15	21.43
Abnormal	55	78.57
Total	70	100

Table (2): ECG changes in heart rate among the study patients

Heart rate	No. of readings	%
Normal	49	70
Sinus Tachycardia	14	20
Sinus bradycardia	3	4.3
Irregular	4	5.7
Total	70	100

Table (3): ECG changes in P-wave among the study patients

P-wave	No. of readings	%
Normal	57	81.43
P-pulmonale	4	5.71
P-mitrale	1	1.43
Broad p-wave	8	11.43
Total	70	100

Table (4): ECG changes in P-R interval among the study patients

P-R interval	No. of readings	%
Normal	63	90
Prolong P-R interval	6	8.57
Short P-R interval	1	1.43
Total	70	100

Table (5): ECG changes in ST segment among the study patients

ST segment	No. of readings	%
Normal	66	94
Elevation	2	3
Depression	2	3
Total	70	100

Table (6): ECG changes in T- wave among the study patients

T- wave	No. of readings	%
T-inversion	26	37.14
Hyperacute	5	7.14

DISCUSSION

Results of the study revealed that CRF was mostly found among older patients and patients who are suffering from diabetes mellitus, hypertension, glomerular nephritis, polycystic kidney disease, and benign prostate hyperplasia.

These results were found also by (11), where the chronic renal failure are more common among old patients and patient with diabetes mellitus, hypertension, glomerular nephritis, polycystic kidney disease, benign prostate hyperplasia.

Results obtained from the present study were in agreement of that obtained by (12), which reflected the prevalence of atrial fibrillation was (4.44%), RBBB(10%), and for ST segment change was (3.35%). These results also were in agreement with those revealed by (13), where the prevalences of atrial fibrillation was (4.44%), RBBB (5%), and for LBBB was (3.6%), as well as the results obtained from (14).

From another side, a study conducted by (15), revealed that ventricular arrhythmia was found in 35% of the patients, while non-controlled hypertension was observed in 21%, absence of systolic decency 29%, left ventricular hypertrophy 27%, and systolic dysfunction 10%, which represented high percentages of malignant arrhythmia that were not encountered in the present study.

Atrial fibrillation in patients with ESRD who undergone dialysis reported in prevalence of 13% in patients on hemodialysis and 7% in patients on peritoneal dialysis. Thus, the prevalence of atrial fibrillation in patients with ESRD seems to be 10 to 20 folds higher than in general population. Fluctuating levels of electrolytes during hemodialysis, sympathetic activation and modulation of the renin-angiotensin system represent additional predisposing factors for atrial fibrillation in chronic kidney disease (16).

The study of patients with implantable cardioverter defibrillators had revealed that patients with CKD were more likely to use their devices for ventricular arrhythmias, but in spite of this, they still have high associated mortality. Minimizing risk of sudden cardiac death can be achieved by good control of basic parameters such as fluid balance, electrolytes and blood pressure (17).

CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS

Based on the results obtained by this study, it is clear that well control of DM, hypertension and other risk factors of CRF can help in decreasing the incidence of CRF. Early management of CRF complications can help also in decreasing the rates of mortality and mortality of CRF.

REFERENCES

1. National Kidney Foundation (2006). K/DOQI clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease. USA. P. 47.
2. Zalunardo N. *et al.* (2009). Cardiovascular disease in chronic kidney disease. Harrison principle of internal medicine. 18th ed. Chapter 19. McGraw Hill.
3. William AM. (2007). Chronic renal failure. Myoclinic textbook of medicine, 1st ed. Chapter 17. P. 591.

4. Schrier RW. (2007). Cardiac disease in chronic renal disease, disease of kidney and urinary tract. Volume III. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 95.
5. McCullough PA. (2015). Interface between renal disease and cardiovascular illness. Braunwald's heart disease: a Textbook of cardiovascular medicine. 10th ed. Saunder, Elsevier Inc. Chapter 88. P. 1909-1930.
6. Luke RG. (2013). Chronic renal failure. Cecil Textbook of Medicine e-dition. Chapter 117. P. 708.
7. Andreoli T.; Benjamin I.; griggs R. and Wing E. (2010). Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine (Cecil Medicine). Chronic renal failure. Chapter 33. P. 369.
8. Kasper DI.; Braunwald E.; Fauci AS.; Hauser SL.; Longo DI. and Jameson JL. (2005). Harrison's manual of medicine. Chronic kidney disease and uremia. 16th ed. McGraw-Hill Inc. Chapter 141. P.707.
9. Baliga RR. (2006). Crash course. Genitourinary system. Internal medicine. 1st ed. Mosby Inc. Chapter 33. P. 303.
10. Madias JE. (2010). Comprehensive electrocardiogram. Chapter 20: Miscellaneous Electrocardiographic Topics. Springer Ltd. P. 870.
11. Bignotto LH.; Kallas ME.; Djouki RJT.; Sasaki MM. *et. al.* (2012). Electrocardiographic findings in chronic hemodialysis patients. J. Bras.Nefrol. 34(3): 291-292.
12. Mandic A.; Tomic M.; Petrov B. and Romic Z. (2012). Atrial fibrillation, atrioventricular blocks and bundle branch blocks in hemodialysis patients. Colleg. Antropol. 36(4):1395.
13. Eduardo VRC. and Perales CS. (2008). Prevalence and predisposing factors for bundle branch block in patients starting dialysis. Rev. Esp. Cardiol. 61(7):719-725.
14. Afolabi MO.; Abioye-Kuteyi EA.; Arogundade FA. and Bello IS. (2008). Prevalence of chronic kidney disease in a Nigerian family practice population. Family Prac. 51(2):132-137.
15. Bonato FOB.; Lemos MM.; Cassiolato JL. and Canziani MEF. (2013). Prevalence of ventricular arrhythmia and its associated factors in non-dialyzed chronic kidney disease patients. PLOS One. 8(6): e66036.
16. Reinecke H.; Klinik M. and Poliklinik C. (2009). Epidemiology of atrial fibrillation. JASN. 20(4):705-711.
17. Rafa SM. (2012). Arrhythmia in chronic kidney disease. Health and Medicine. Published by University of Alexandria. Egypt. P. 26.

Significance of electroencephalographic alterations with mental and behavioral subnormalities in Diyala province, Iraq

Kareem A. Obaid

Dept. of Pediatrics / College of Medicine / University of Diyala / Republic of Iraq

E-mail: karimalhamdany@yahoo.com

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is a genetic disorder manifested in significantly below average overall intellectual functioning and deficits in adaptive behavior. Mental retardation is a particular state of functioning in childhood characterized by decreased intelligence and adaptive skills.

The aim of this work was to analyze and determine the electroencephalographic alterations in patients with psychiatrics disorder and clinically subnormal to assess their significance.

This study consisted in a cohort analytical study, between November 2012 and March 2013 in Diyala province of Iraq, to detect electroencephalographic abnormalities in the population of children diagnosed to be mentally subnormal with psychiatrics disorders visited the Psychiatry and neurophysiology clinics in Baquba teaching hospital. An electroencephalogram (EEG) was later performed and a database was set up to record information about age, sex, perinatal asphyxia, family history of seizures, the location of the EEG phenomenon was stated.

A total of 57 patients were included, with an average of 8.2 years; there was a predominance of male patients, with 34 males (60%) versus 23 females (40%). 35 children with learning problems (58%) and 12 with a history of seizures (20%), 8 (13.3%) diagnosed with epilepsy. The normal EEG was in 24 (42%) and 33 considered abnormal (58%).

Children with severe mental health problems have an increased probability of having neurological problems which might have an impact on the ability to assess and treat the mental health problem. The most frequent location of the abnormalities observed in the EEG of a patient with psychiatric disorders is in the temporal lobe.

Keywords: Mental health problem, Diyala province, Neurological problem

المخلص باللغة العربية

يعرف التخلف أو التأخر الذهني بأنه اضطراب موروث يتمثل بانخفاض واضح للقابلية الذهنية واعتلال التصرف المكتسب. سعت هذه الدراسة إلى تحليل وتحديد الاضطرابات الدماغية العصبية الكهربائية لدى مجموعة من الأطفال المرضى الذين يعانون من الاضطرابات النفسية العقلية السريرية وتقييم مدى أهميتها لديهم، وهي دراسة تحليلية مستمرة للحالات للفترة ما بين شهري تشرين الثاني/نوفمبر 2012 وأذار / مارس 2013 في مدينة بعقوبة بمحافظة ديالى في العراق بمستشفى بعقوبة التعليمي في وحدة تخطيط الأعصاب، حيث تم التعامل مع بيانات الأطفال المحالين إلى المستشفى يعانون من الاضطرابات والقصور والتأخر النفسي والذهني وتحليلها، وتم إجراء التخطيط الدماغية الكهربائي لهم ، كما تم جمع البيانات عن العمر والجنس والأمراض المزمنة والأدوية المتناولة، والاختناق الولادي والاضطرابات النفسية والذهنية لدى الأسرة ، والاختلاجات العصبية، وقد تم تحديد نوع الخلل الكهرودماعي بالتخطيط، حيث سجلت 57 حالة وتم متابعتها، وبلغ متوسط العمر لدى العينة 8.2 سنة مع أغلبية للذكور في 34 حالة (60%) مقارنة بالإناث اللاتي بلغن 23 حالة (40%) ، وأظهرت النتائج أن 35 حالة (58%) يعانون صعوبات ومشاكل تعليمية، و 12 حالة تعاني من اختلاجات عصبية (20%) ، وثمان حالات تم تشخيصها كصرع ، وبين التخطيط الكهرودماعي أن 24 حالة تمتعت بتخطيط كهرودماعي طبيعي (42%)، و 33 حالة بينت تخطيطا كهرودماعيا غير طبيعي (58%). وبهذا استنتجت الدراسة أن الأطفال الذين يعانون من مشاكل ذهنية شديدة لديهم احتمالية عالية لوجود مشاكل عصبية تؤثر على العلاج والمتابعة والتقييم، كما بينت الدراسة أن أكثر المواقع الدماغية المفيدة في تحديد الاضطرابات العصبية هو الفص الدماغية الأمامي.

INTRODUCTION

Mental retardation (MR) in young children is often missed by clinicians. The condition is present in 2 to 3 % of the population, either as isolated findings or as a part of a syndrome or broader disorder (1). Diagnosis is highly dependent on comprehensive personal and family medical histories, a complete physical examination and a careful developmental assessment of the child, which guide appropriate evaluations for the child (2). Some definitions rely on Intelligence Quotient IQ scores alone to classify individuals with MR, some only use adaptive behaviors for classification, and others include both IQ scores and measures of adaptive skills (3).

Regarding the cause of mental retardation, approximately 3% of the population have an intelligence quotient (IQ) of less than 70, among whom a cause for the mental retardation can be established in less than half of all cases (4). A number of environmental, genetic or multiple factors can cause mental retardation. It is also believed that behavioral or social factors such as poverty, malnutrition, maternal drug and alcohol use, as well as severe stimulus deprivation can contribute to MR (5). Unfortunately, in approximately 30 to 50% of cases, the etiology is not identified even after thorough diagnostic evaluation (6). Genetic condition is caused as a number of single-gene disorders resulted in mental retardation, many of these are associated with atypical or dysmorphic physical characteristics (7). Prenatal causes include congenital infections such as cytomegalovirus, toxoplasmosis, herpes, syphilis, rubella and human immunodeficiency virus; prolonged maternal fever in the first trimester; exposure to anticonvulsants or alcohol; and untreated maternal phenylketonuria (PKU) (8). Complications of prematurity, especially in extremely low-birth-weight infants, or postnatal exposure to lead can also cause mental retardation (9). Prenatal causes involve late pregnancy (complications of pregnancy, diseases in mother such as heart and kidney disease and diabetes and placental dysfunction), during delivery (labour) (severe prematurity, very low birth weight, birth asphyxia, difficult and/or complicated delivery and birth trauma) and neonatal (first 4 weeks of life) (septicemia, severe jaundice, hypoglycemia) (10). Molecular medicine has made it possible to diagnose a number of conditions referred to as mitochondrial cell diseases (11).

Diseases like whooping cough, measles, or meningitis can cause mental disability if medical care is delayed or inadequate, exposure to poisons like lead or mercury may also affect mental ability (12,13). Malnutrition is a common cause of reduced intelligence in parts of the world affected by famine, such as Ethiopia (14).

The first and most important step in the diagnosis of mental retardation is to obtain a comprehensive patient and family histories. Previous gynecologic and obstetric history may reveal infertility or fetal

loss (15). Assessment of maternal health status during pregnancy with the involved child should include questions regarding use of tobacco, alcohol and drugs (prescribed and illicit); lifestyle or other risks for sexually transmitted diseases; weight gain or loss; signs of infection; serious illness or injury and surgery or hospitalization (16,17), type of delivery and any complications (10). The systems review of the child should be complete, with special attention to growth problems, history of seizures, lethargy and episodic vomiting, a developmental screen should be used at all well-child visits to obtain information about the timing of the child's developmental milestones, any concerns by parents or caregivers and comparison of the child's developmental rate and pattern with those of siblings (18). Delays in speech development are common and may become more obvious when contrasted with the speech development of a sibling, inquiry should be made regarding concerns about hearing and vision (19). Family history of fetal loss, mental retardation, severe learning problems, congenital abnormalities and unexplained childhood deaths, as well as other serious illnesses in first- and second-degree family members should be elicited. A complete physical examination can begin with a review of growth curves since birth, if these are available, the child should be examined closely for dysmorphic features or minor abnormalities, such as unusual eyebrow pattern, eyes that are widely or closely spaced, low-set ears or abnormal palmar crease patterns, minor abnormalities are defined as defects that have unusual morphologic features without serious medical implications or untoward cosmetic appearance. Most minor abnormalities involve the face, ears, hands or feet, and are readily recognized even on cursory examination (20).

The initial hope that it would either lead to specific knowledge of cerebral pathophysiology or support differential diagnosis in idiopathic major mental illnesses has long been abandoned, nevertheless, it continues to have value in the diagnosis of epilepsy, brain damage, delirium, and dementia and in differentiating brain disease from primary psychiatric disorders (21).

Among the psychiatric patients, children have shown more EEG abnormalities as compared to the adult cases (22,23). Psychotic mood disorders and "atypical" psychoses are reported to have a higher frequency of epileptiform variants, including the phantom spike and wave, positive spikes, and small sharp spikes, as compared with nonpsychotic mood disorders and schizophrenia (24).

Additionally, the insult may retard or arrest cerebral development (maturational retardation hypothesis), which may be expressed by the persistence of immature EEG characteristics. Walter suggested that many of the lesser dysrhythmias of childhood may simply reflect delayed cerebral maturation (25). Walter hypothesized that "certainly, deprivation or distortion of sensory input at a certain critical stage of ontogenetic development may engender dramatic electrographic changes (25).

PATIENTS AND METHODS

This study consisted in a cohort analytical study, and conducted between November 2012 and March 2013, to detect electroencephalographic abnormalities in the population of children diagnosed to be mentally subnormal with psychiatric disorders visited the Psychiatric and neurophysiology clinics in Baquba teaching hospital. An electroencephalogram (EEG) was later performed and a database was set up to record information about age, sex, , and prenatal history was taken regarding maternal .PE ,epilepsy , drug and antenatal fever. Information about delivery type , fetal distress , fit ,mile stone ,neurological deficit, school performance ,number of hospitalization and information about treatment ,financial state of family were recorded. Regarding examination, it was noticed if there is any dysmorphic features or short stature and if CT scan or MRI was done or not. Later EEG was set for all children using 10-20 International system of electrodes replacement . EEG made when patient open his eye and then closed it and in a state of hyperventilation when age and co- operation of patients were permitted . Also EEG was recorded during flash stimulation twice times (25).

RESULTS

A total of 57 patients were included in the study, 21 cases had family history of seizures disorder (36.8%) and 23 case have delayed mile stones (40.3%). Twenty four (24) cases had normal EEG (42%) compared to 34 cases who had different EEG abnormalities(58%). Thirty (30) cases required hospitalization (52.6%), while 27 did not (47.4%). Forty one (41) cases (72%) of them had fits, ten of them born with fetal distress (17.5%), 6 had maternal fever during pregnancy (10.5%) with an average of 8.2 years. There was a predominance of male patients, with 34 males (60%) versus 23 females (40%). Thirty five (35) children were suffering from learning problems (61%) and 12 with a history of having had seizures (21%). Eight (13.3%) were diagnosed with epilepsy. The normal EEG limits were in 12 (21%) and 48 were considered abnormal (80%). A direct relationship was found between the presence of seizures and EEG abnormalities. These results are shown in tables (1, 2).

Table (1): Demographic data of the study

Demographic data	Yes No. (%)	No No.(%)
Neurological deficit	6(10.5%)	51 (89.4%)
Delayed mile stones	23 (40%)	34(59.6%)
EEG Abnormalities	33 (58%)	24 (42%)
Treated	21(36.8%)	36 (63%)
Strict to treatment	18(31.5%)	39(68.4%)
Hospitalization	30(52.6%)	27 (47.3%)
Financial unsupported	43(75.5%)	14(24.5%)
Normal school performance	16 (28%)	41 (72%)
Fit	41 (72%)	16 (28%)

Table (2): Common maternal variable data

Maternal variables	Yes No. (%)	No No.(%)
Fetal distress	10(17.5%)	47(82.4%)
Maternal fever	6(10.5%)	51(89.4%)
Maternal Pre-eclampsia	9(15.7%)	48 (84.2%)
Maternal epilepsy	0 (0%)	57 (100%)
Maternal chronic drug use	7(12.2%)	50 (87.7%)
Family history of fit	21(36.8%)	36 (63%)

DISCUSSION

Regarding pathological conditions, in practically all studies a considerable proportion of the mentally retarded showed abnormal EEGs, especially paroxysmal activity (26). This proportion was higher for the very low IQ subjects (27), and in particular for the mentally retarded showing signs of clinical epilepsy (28). EEGs usually requested when there is a mental problems or subnormalities and many studies was suggest the association of these abnormalities with abnormal EEG findings and this complies with the results of this study which show that there is a significant EEG abnormalities present in 58% of our cases (29). Other studies explained that children with subnormalities have a significantly higher probability of having EEG abnormalities and seizure disorders, in this study those who complained from seizure represented (72%) of all cases ,while (36.8%) had family history of fit ,and we found a direct relationship between the presence of seizures and EEG abnormalities when the normal EEG limited in 12 (21%) of them and 48 considered abnormal (80%) (30,31). Furthermore, maternal infection, pregnancy hypertension, including hypertension with and without proteinuria (preeclampsia) and maternal exposure to drugs may place children at risk of mental problems (32). This correlate with present study in which the common maternal data (Table 2) showed that the maternal fever presented in (10.5%) ,fetal distress (17.5%), preeclampsia (15.7%) and maternal drugs exposure in (12.5%) of all cases. Environmental factors associated with poverty may also contribute to the association between poverty and mental subnormalities, and this agree with the

results of ours, we found that (75.5%) of children included in this study was financially unsupported (33), while neurological deficits were present in 2-11% of children mental problems according to many studies done previously. In present study, it was found that the neurological deficits presented in (10.5%) of our cases.

CONCLUSION

Mental retardation is a disorder manifested in significantly below average overall intellectual functioning and deficits in adaptive behavior. The systems review of the child should be complete, with special attention to growth problems, history of seizures, lethargy and episodic vomiting. Children with severe mental health problems have an increased probability of having neurological problems, which might have an impact on the ability to assess and treat the mental health problem. Children with severe mental health problems have increased probability of having neurological problems, which might have an impact on the ability to assess and treat the mental health problem. The most frequent location of the abnormalities observed in the EEG of a patient with psychiatric disorders is in the temporal lobe.

REFERENCES

1. Daily DK.; Ardinger HH. and Holmes GE. (2000). Identification and evaluation of mental retardation. *Am. Family Physic.* 61(4):1059-1067.
2. Rutter LQ. (2006). First diagnosis of severe mental and physical disability: a study of doctor-parent communication. *J. Child Psychol. Psychiat.* 35(7): 1273-1287.
3. Borthwick-Duffy SA. (1994). Epidemiology and prevalence of psychopathology in people with mental retardation. *J. Consul. Clin. Psych.* 62:17-27.
4. Flint J.; Wilkie AOM.; Buckle VJ.; Winter RM.; Holland AJ. and McDermid HE. (1995). The detection of sub telomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genet.* 9:132-140.
5. McLaren J. and Bryson SE. (1987). Review of recent epidemiological studies in mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am. J. Mental Retard.* 92:243-254.
6. Curry C.; Stevenson R. and Aughton D. (1997). Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am. J. Med. Genet.* 72: 468-477.
7. Sultana SAG.; Lam-Po-Tang TRL.; Wright F.; Linderman R. and Purvis-Smith S. (1995). Fragile X mental retardation in an Indonesian family. *Med. J. Indonesia.* 4:17-19.
8. Strømme P. and Hagberg G. (2007). Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Develop. Med. Child Neurol.* 42(2):76-86.
9. Piecuch RE.; Leonard CH.; Cooper BA. and Sehring SA. (1997). Outcome of extremely low birth weight infants (500 to 999 grams) over a 12-year period. *Pediatr.* 100:633-639.
10. Kolevzon A.; Gross R. and Reichenberg A. (2007). Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161(4):326-333.
11. Dimauro S. and Moraes CT. (1993). Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch. Neurol.* 50:1197-1208.
12. Aicardi J. (1998). The etiology of developmental delay. *Seminars in Pediatr. Neurol.* 5(1):15-20.
13. Daily DK.; Ardinger HH. and Holmes GE. (2000). Identification and evaluation of mental retardation. *Am. Family Physic.* 62(5):961-963.
14. Durkin MS.; Khan NZ.; Davidson LL.; Huq S.; Munir S.; Rasul E. and Zaman SS. (2000). Prenatal and postnatal risk factors for mental retardation among children in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 152(11):1024-1033.
15. Matson JL. and Sevin JA. (1994). Theories of dual diagnosis in mental retardation. *J. Consult. Clin. Psychol.* 62(1): 6-16.
16. Reiss S. (1994). Handbook of challenging behavior: mental health aspects of mental retardation. Worthington, OH: IDS Publishing Corporation.
17. Szymanski L. (1994). Mental retardation and mental health: Concepts, aetiology and incidence. In Bouras N (Ed.) *Mental Health in Mental Retardation*. Great Britain: Cambridge University Press.
18. Palmer FB. and Capute AJ. (1994). Mental retardation. *Pediatr. Rev.* 15:473-479.
19. Van Naarden K.; Decouflé P. and Caldwell K. (1999). Prevalence and characteristics of children with serious hearing impairment in Metropolitan Atlanta: 1991-1993. *Pediatr.* 103(3):570-575.
20. Holmes GE. and Hassanein RS. (1982). The KIDS chart. A simple, reliable infant development screening tool. *Am. J. Dis. Child.* 136:997-1001.
21. Fink M. (1993). EEG and behavior: association or disassociation in man? *Integ. Psychiat.* 9: 108-123.
22. Hill D. (1950). *Psychiatry. Electroencephalography*. London. p. 319.
23. Ribas JC.; Baptiste E.; Fonseca CA. *et. al.* (1974). Behavior disorders with predominance of aggressiveness, irritability, impulsiveness, and instability: clinical electroencephalographic study of 100 cases. *Arquivos de Neuro- Psiquiatria*; 32 : 187-194.
24. Inui K.; Motomura E.; Okushima R. *et. al.* (1998). Electroencephalographic findings in patients with DSM-IV mood disorder, schizophrenia, and other psychotic disorders. *Biol. Psychiat.* 43 : 69-75.
25. Walter WG. (1950). Normal rhythm-their development, distribution and significance. London. p. 203.

26. Posey HT. (1991). The electroencephalogram in mental deficiency. *Am. J. mental. Defic.* 55: 515-520.
27. Beckett PGS.; Bickford RG. and Keith HM. (1986). The electroencephalogram and various aspects of mental deficiency. *J. Dis. Child.* 92: 374-381.
28. Walter RD.; Yeager CL. and Rubin HK. (1996). An electroencephalographic survey with activation techniques of 'undifferentiated' mental deficiency. *Am. J. mental. Defic.* X(60): 785-791.
29. Baheti R.; Gupta BD. and Baheti R. (2003). A study of CT and EEG findings in patients with generalized or partial seizures in Western Rajasthan. *J. Indian Acad. Clin. Med.* 4 : (1)25-29.
30. Ribas JC.; Baptiste E.; Fonseca CA. *et. al.* (1974). Behavior disorders with predominance of aggressiveness, irritability, impulsiveness, and instability: clinical electroencephalographic study of 100 cases. *Arquivos de Neuro- Psiquiatria.* 32 : 187–194.
31. Steffenburg U.; Hagberg B. and Olow I. (1993). The changing panorama of cerebral palsy in Sweden: VI. prevalence and origin during the birth year period 1983-1986. *Acta. Paediatr.* 82:387-393.
32. McElrath TF.; Hecht JL.; Dammann O.; Boggess K.; Onderdonk A. *et. al.* (2008). Pregnancy disorders that lead to delivery before the 28th week of gestation: an epidemiologic approach to classification. *Am. J. Epidemiol.* 168: 980–989.
33. Boyle CA.; Boulet SB.; Schieve LA.; Cohen RA.; Blumberg SJ.; Yeargin-Allsopp M.; Visser S. and Kagan MD. (2009). Trends in the prevalence of developmental disabilities in U.S. children, 1997-2008. *Pediatr.* 127(6):1034-1042.

Effect of internalin A extracted from *Enterococcus faecalis* isolated from faeces of chicken on normal and cancer cell lines

Ansam K. Mohammed

Dept. of Microbiology / Collage of Veterinary Medicine/ University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ansamijj@yahoo.com

ABSTRACT

One hundred and fifty samples of feces from chicken were collected to isolate and identify *Enterococcus faecalis* from November 2012 to March 2013, using different cultural and biochemical tests. Twelve (12) isolates of *E. faecalis* were identified. Antibiotic sensitivity test was done. The results revealed that the isolates resisted 9 out of 16 types of antibiotics that were used in this study. Internalin A (InLA) was extracted and partially purified from *E. faecalis*. Crude and partial purified InLA were examined for the cytotoxic effect on cancer and normal cells. Obviously, the cytotoxicity of the both extracts (crude and partial) has slight effect on normal cell line, and Rat Embryo fibroblast (Ref). The study concluded that InLA can enhance reduction in tumor cells, but not in normal cells and showed cytotoxic effect of cancer cell lines Glioblastoma and AMN-3 with different concentrations and exposure time.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Internalin A (InLA), Rat Embryo Fibroblast (Ref)

الملخص باللغة العربية

تم جمع 150 عينة من براز دواجن بهدف عزل وتشخيص جرثومة *Enterococcus faecalis* للفترة من تشرين الثاني/نوفمبر 2012 ولغاية آذار/مارس 2013. استخدمت طرق زرع مختلفة إضافة الى تطبيق اختبارات زرع وطرق كيميائية للكشف عن الجرثومة، حيث تم الحصول على 12 عزلة من *Enterococcus faecalis*. بعد ذلك تم فحص الحساسية للمضادات الحيوية وأثبتت النتائج أن البكتريا المعزولة أظهرت مقاومة لتسعة أنواع من المضادات الحيوية من أصل (16) مضادا حيويًا تم استعمالها في الدراسة، كما تم استخلاص (InLA) من العزلات المقاومة وتنقيته جزئياً، ثم جرى فحص التأثير السمي الخلوي على الخلايا الطبيعية والخلايا السرطانية. وقد بينت النتائج أن مستخلص (InLA) الخام والمنقى جزئياً أثبتت فعاليته التثبيطية العالية على الخلايا السرطانية Glioblastoma و AMN-3 بمدة 24 ساعة، في حين كان تأثير المستخلص الخام والمنقى جزئياً بسيطاً في خط الخلايا الطبيعي Ref. وقد استنتجت الدراسة أن (InLA) له القدرة على تحفيز تثبيط نمو الخلايا السرطانية، ولا يملك ذات الأثر على الخلايا الطبيعية الاعتيادية، كما ظهر التأثير السمي الخلوي لخطوط الخلايا السرطانية AMN-3 بتركيز وأوقات تعرض مختلفة.

INTRODUCTION

Cancer is one of the most dangerous diseases known in the world, it is a disease affects all ages in human and animals even the embryos; it is also a severe complex and very heterogeneous disease (1). This is the main reason why searching for better cancer therapies is so difficult (2). Surgery may be sufficient to cure the patient by removing all cancerous cells. It becomes ineffective when the tumor metastasizes from the primary site (3). Radiotherapy side-effect that radiation is not specific to cancerous cells and may damage healthy cells as well. Chemotherapy has serious side effects and its toxicity not limited to cancer cells but it extended to normal cells as well, also tumor cells may develop resistance to it (4). So, the researchers went to alternative treatments such as plant extracts that will destroy the cancer cells without causing damage to normal cells (5).

Biological therapy is form of cancer therapy in which antitumor effects are produced primarily through the action of natural host defense mechanisms by the administration of immunologically active substances. This term includes the use of living microorganisms that directed toward tumor cells, as well as biological therapy using natural products such as verotoxin produce by *E. coli*, and cytosine which is produced by *Staphylococcus aureus*. Component structures of the bacterial cell wall have an important role in the inhibition of cancer cells (6).

Enterococcus faecalis are secondary infection acquired while in the hospitals and opportunistic pathogens, *E. faecalis* causes urinary tract infections, endocarditis, bacteremia, Central nervous system in the newborn, meningitis in neonates, infection within the abdomen, and inflammation of the iris of the eye (7). In bovine species cause mastitis, this related to poor hygiene, as well as in poultry infection occur primarily in the first week (8). *E. faecalis* have several virulence factors that are responsible for the disease events; resistance to antibiotics, production of Cytolysin, aggregation substance, Gelatinase, Extracellular superoxide, Enterococcal surface protein, Hyaluronidase and InLA (9).

The protein InLA mediates bacterial adhesion and invasion of epithelial cells in intestine through specific interaction with its host cell receptor E-cadherin (10).

The present study aimed to isolate and identify *E. Faecalis* from different samples, extraction of InLA from *E. Faecalis*, purification the extract of InLA by chromatography and study the effect of purified extract InLA on cancer cells and compared them with normal cells *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

One hundred fifty (150) Samples were collected from suspected (infected, non-infected) chicken feces during the period from November 2012 to March 2013. The samples were cultured on Brain Heart Infusion Agar supplemented with 5% sheep blood. Kenner Faecal Agar was used to differentiate between *Enterococcus* and *Streptococcus*. Moreover Streptococcal Faecal Agar was used to differentiate between *Enterococcus* species. Bile Esculin Azide Agar, Esculin blood Agar were used for the identification of *E. faecalis* (7). For primary identification, cultures reading were performed as well as Microscopical Examination using Gram stain. The second step of identification was performed using API strep system (11).

Antibiotic sensitivity test

This test was done by disc diffusion method according to Kirby - Bauer method by inoculating an agar plate with bacterial culture using sterile cotton swab and streaking evenly across the surface of a Mueller-Hinton agar plate. After that within 10 minutes of inoculation, the antibiotic disks were applied to the agar with a sterile forceps pressed firmly to ensure contact with the agar and then plate inverted and incubated at 37°C for 18 hrs. After incubation, the diameter of each inhibition zone was measured in millimeter (mm) using a metric ruler (12).

Extraction of InLA

Extraction and purification of InLA was accomplished using Sepharose CL-6B gel filtration chromatography (13).

Estimation of protein content

Protein content of partial purified InLA was done by using Lowry method (14).

Cytotoxic effect of extracted InLA on cancer cell lines and normal cell *in vitro*

1. Four concentrations (5000, 2500, 1250, and 625 µg / ml) were prepared under sterile conditions, from each of the crude and partially purified InLA. The preparations were used immediately after the completion of the preparation process.

2. The old media were removed from flasks containing culture cells, (monolayer), and washed by sterile PBS. Then 2 ml of worm solution of trypsin – Versan was added and incubated for 10-15 minutes until the separation of adherent cells from the surface of the flask and then 20 ml of RPMI-1640 media were added.

3. The contents of a container was transferred after gently shaking to a sterile beaker. 0.2 ml of cell suspension was put in 96 well microtiter plate (each well contain approximately 3×10^4 cells / well). Plates were covered tightly with a transparent adhesive and incubated at 37°C until obtaining a monolayer of cells in each well.

4. After incubation, the old media has been removed and added 0.2 ml of the extracts of crude InLA and partially purified by three period for each concentration, with positive and negative control; thereafter, plates were incubated at 37°C for 24, 48, 72 hrs with 5% CO₂.

5. After the end of the exposure time the contents of each well was stained with crystal violet, left for 15 minutes, then the dye was removed by washing with tap water for several times, to remove the excess dye.

6. The results were recorded for each plate using a Scanning multi well Spectrophotometer (Microplate reader) at a transmitting wavelength on 492 nm and then were estimated in percentage of inhibition of cells compared with control cells (Ref) (15).

antibiotics (100% to streptomycin, 92% to tobramycin, 83% to amikacin, 66% to erythromycin, 75% to ceftazidime, 84% to augmentin, 33% to cefotaxime, 60% to tetracycline and 91.5% to nalidixic acid) (table 3).

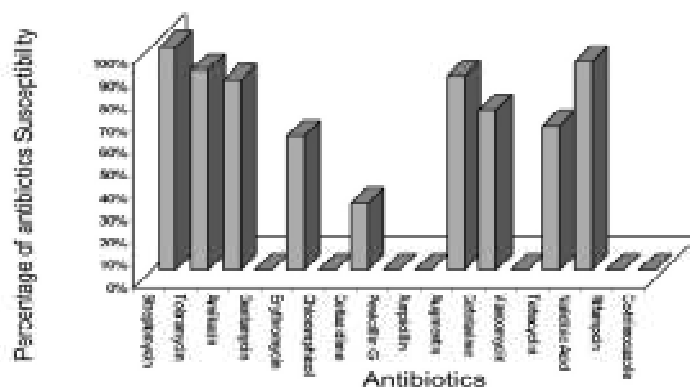


Figure (1): Antibiotics susceptibility test of *E. faecalis*

RESULTS

The results showed that 12 isolates of *E. faecalis* were obtained out of total 150 samples. The *E. faecalis* isolates were identified depending upon cultural characteristics. Microscopic examination and biochemical test are summarized in table (1), which showed its ability to grow at 10 and 45°C. Furthermore, it was able to grow with high concentration of salt up to 6.5% of sodium chloride and pH 9.6. API strep system was used to confirm the identification of the isolates.

Table (1): Results of Biochemical tests for *Enterococcus faecalis* isolates

Biochemical test	Result
Catalase	-
Motility	-
Growth at 45°C	+
Survives 60 °C for 30 min	+
Growth at pH 9.6	+
Growth in 6.5 % NaCl	+
Growth on 40% bile	+
Growth in 0.04% K ₂ TeO ₃	+
Carbohydrates fermentation	+
Arabinose	-
Lactose	+
Mannitol	+
Raffinose	-
Sorbitol	+
Aesculin hydrolysis	+

The Susceptibility test of all isolates of *E. faecalis* to 16 antibiotics demonstrated that all isolates were sensitive for gentamicin, chloramphenicol, penicillin G, ampicillin, vancomycin, rifampicin, and co-trimoxazole (figure 1, table 2), and resistant to 9

Table (2): The results of antibiotics sensitive test of *Enterococcus faecalis* isolation

Antibiotic type	Sensitivity (%)	Sensitivity of isolates from feces
Gentamycin	90	S
Chloramphenicol	70	S
Penicillin G	40	S
Ampicillin	10	S
Vancomycin	80	S
Rifampicin	100	S
Co-trimoxazole	10	S

Table (3): The results of (9) antibiotics resistance test of *Enterococcus faecalis* isolates

Antibiotic types	Resistance (%)	Resistance of isolates from feces
Streptomycin	100	R (all isolates)
Tobramycin	92	R (all isolates)
Amikacin	83	R (all isolates)
Erythromycin	66	R (all isolates)
Ceftazidime	75	R (all isolates)
Augmentin	84	R (all isolates)
Cefotaxime	33	R (3,4)
Tetracycline	60	R (4,5)
Nalidixic acid	91.5	R (all isolates)

Isolates which had higher resistance for many antibiotics by phenol-chloroform and ethanol gave large quantities of extracted InLA. The Gel Filtration Chromatography using Sepharose CL-6B was used for InLA partial purification.

The total concentration of partial purified protein was 694.58 micromole / ml. In addition, the result

of phosphorus was 0.022 μg / ml and phosphate concentration 91.37 μg / ml of the InLA.

With exception of the control group (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the highest values denoted for minimum response, in contrary the lowest value indicated maximum inhibition.

The results of cytotoxic assay of two-fold dilutions of A after 72 hrs of exposure were revealed that the concentrations over 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ have significant effect ($P<0.05$ - $P<0.0001$). Therefore, the concentrations used later in cell growth inhibition assay were chosen around these effective values.

As the time of exposure increased to 42 hrs., all concentrations of Purified extracted InLA were found to be significantly effective on AMN-3 cell line at level ($P<0.05$) (table 4). The greatest cytotoxic effect was observed after 72 hrs. exposure time.

All concentrations of Crude extracted of InLA exhibited high significant effect ($P<0.0001$) on AMN-3 and Hep-2 cell lines, which showed considerable significant effect ($P<0.05$) on both cell lines (table 5).

Table (4): Optical densities of Hep-2 and AMN-3 cell lines after treatment with partial extract of InA for 72 hrs. In cell growth assay.

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hep-2 (Mean \pm SE)	P-value	AMN-3 (Mean \pm SE)	P-value
0	0.325 \pm 0.00128	-	0.274 \pm 0.0012	-
625.0	0.282 \pm 0.01819*	0.001	0.261 \pm 0.0102	N.S
1250	0.269 \pm 0.01699*	0.001	0.251 \pm 0.00862	N.S
2500	0.280 \pm 0.01538*	0.001	0.258 \pm 0.00661	N.S
5000	0.270 \pm 0.01804*	0.0001	0.247 \pm 0.01257*	0.001

*The mean difference is significant in comparison with Conc.=0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the same cell line. N.S.: non- significant

Table (5): Optical densities of Hep-2 and AMN-3 cell lines after treatment with crude extract of InA for 72 hrs. in cell growth assay

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hep-2 (Mean \pm SE)	P-value	AMN-3 (Mean \pm SE)	P-value
0	0.334 \pm 0.0024	-	0.253 \pm 0.0055	-
625.0	0.186 \pm 0.0107*	0.0001	0.187 \pm 0.0502*	0.0001
1250	0.167 \pm 0.0020*	0.0001	0.147 \pm 0.0037*	0.0001
2500	0.133 \pm 0.0033*	0.0001	0.133 \pm 0.0004*	0.0001
5000	0.127 \pm 0.0011*	0.0001	0.117 \pm 0.0089*	0.0001

*The mean difference is significant in comparison with Conc.=0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the same cell line

To compare the values of optical densities, which resulted from exposure of both cell lines to Crude and purified, these values should be converted to cell viabilities as percentages in proportion with control group. This aimed to evaluate the effect of time on the cytotoxicity of these extracts and to compare the response of the used cell lines after exposure to crude, Purified extract as well as comparison between cytotoxic effects of two extracts was carried out.

The results showed time-dependant significant differences. The cytotoxic effect had increased at concentrations of 625, 1250, 2500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

of crude extracted on both cell lines after 24 hrs at high significant levels ($P<0.0001$). On other hand, the effect at the same concentrations of purified extracted revealed insignificant effect on both cell lines after 24 hrs and low significant effect ($P<0.05$) (table 6).

Table (6): Optical densities of Hep-2 and AMN-3 cell lines after treatment with Crude extract of InLA for 24 hrs. in cell growth assay

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hep-2 (Mean \pm SE)	P-value	AMN-3 (Mean \pm SE)	P-value
0	0.333 \pm 0.0023	-	0.253 \pm 0.0055	-
625.0	0.203 \pm 0.0140*	0.0001	0.129 \pm 0.0116*	0.0001
1250	0.167 \pm 0.0014*	0.0001	0.111 \pm 0.0373*	0.0001
2500	0.146 \pm 0.0043*	0.0001	0.090 \pm 0.0431*	0.0001
5000	0.122 \pm 0.0066*	0.0001	0.065 \pm 0.0070*	0.0001

*The mean difference is significant in comparison with Conc.=0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the same cell line

Both cell lines were significantly affected after 24 hrs. treatment with all concentrations of crude preparation rather than the high concentration of purified extract showed significant effect after 24 hrs. of exposure (figure 2). The effects of crude and purified InLA were tested on two cancer cell lines (Glioblastoma cell line, AMN-3) and normal cell line (Ref), using two-fold different concentrations ranging from 625 -5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for three exposure times (24,48, 72 hrs.). The results showed that purified InLA gave high growth inhibition progressed after 72 hours exposure time, while partially purified InLA extract gave high growth inhibition effect on Glioblastoma after 24 hrs. (figure 3).



Figure (2): The monolayer of Hep-2 cell line demonstrates loss of confluent feature, distinct patchy inhibition after exposure to 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of partial extract of InA. (100X, H&E stain).

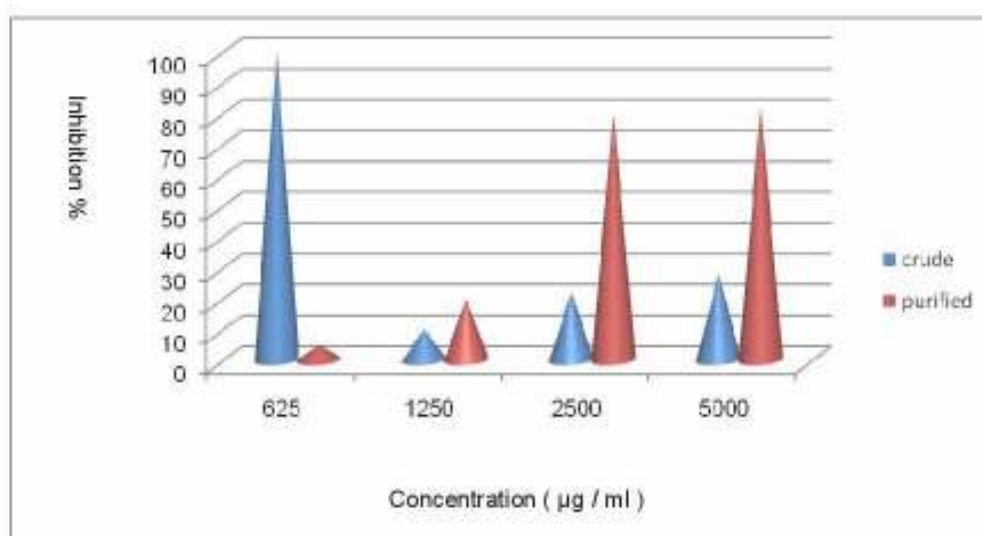


Figure (3): The inhibitory effects of different (Crude, Purified) InLA concentrations on Glioblastoma cell line after 24 hrs. of exposure

DISCUSSION

During the first three days of life, the intestine of chicks become colonized with bacteria (16). *E. faecalis* most commonly isolated from day -old chicks (17). It was recently shown that *E. faecalis* were the most significant bacterial pathogen associated with first week mortality (18).

E. faecalis isolates were tested for their sensitivity to different types of antibiotics and results showed that most of the isolates were highly resistance to the antibiotics used in this study, the results agreed with (19). The highly resistant isolate was used in the present study in extraction of InLA because of the highly virulence in pathogenicity (20). *E. faecalis* has opened a new window on cancer treatment by using InLA extracted by phenol-chloroform and ethanol, which gave the best results when compared with other techniques.

The amount of crude and purified InLA resulted from Sepharose CL-6B gel filtration chromatography was consistent to that resulted in the study of (21). Cancer treatment is encountered by various significant problems, InLA could unlock secrets that aid cancer treatment. The present study showed that InLA as a causative agent of benign infection in cancer cell lines. Cytotoxic effect of crude and partial purified of InLA in normal and several cancer cell lines were examined. In general the two types of extracts were more effective on AMGM than on AMN-3 cell line, this means that AMGM cell line was more sensitive than AMN-3 cell line. Whereas (Ref) normal cell line was non sensitive to all concentrations of the two types of extracts of InLA so it was used for a comparison with tumor cell lines. InLA extract can enhance reduction in tumor cells but not in normal cells,

similar results were reported by (22). Crude and partial purified InLA extracts both showed cytotoxic effect of cancer cell lines AMGM and AMN-3 with concentration and exposure time dependent. The results showed that growth inhibition was significantly progressed as the concentrations of extract increased as well as the time of exposure, while the effect of extract type was variable according to type of cell line and the time of exposure. The obvious result obtained in the growth inhibitory assay was the dose- and time- dependant cytotoxic effect of the two extracts on both study cell lines.

REFERENCES

1. Maass N.; Hojo T.; Ueding M.; Lutges J.; Kloppel G.; Jona W. and Nagasaki K. (2001). Expression of the tumor suppressor gene maspin in human pancreatic cancers. Clin. Cancer Res. 7: 812 – 817.
2. NCCL. (2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twelfth informational supplement. Vol. 22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne.
3. Moggs JH.; Murphy J.; Lim F. and Moore D. (2005). Anti proliferation estrogen in breast cancer cell that re-express ER is mediated by aberrant regulation of cell cycle genes. J. Mol. Endocrine. 34: 535 – 551.
4. Rowinsky EK. (1998). Novel natural products and other anticancer therapeutics. J. Cancer Con. 5:3.

5. Al-Shammari MAH. (2003). The study of the effect of newcastle virus in the treatment of cancer tumors implanted in mice. Master Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Baghdad.
6. Ntamere AS.; Taron DJ. and Neuhaus FC. (2011). Assembly of D-alanyllipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: mutants deficient in the D-alanyl ester content of this amphiphile. J. Bacterial. 169:1702-1711.
7. Maza LM.; Pezzlo MT. and Baron EJ. (1997). Color Atlas of Diagnostic Microbiology. Chapter. 11. Mosby- year Brook, Inc.
8. Pitot HC.; Hikita H.; Dragan Y.; Sargent L. and Haas M. (2000). Review article: The stages of gastrointestinal carcinogenesis- application of rodent models to human diseases. Aliment. Pharmacol. Therap. (Suppl). 14: 153.
9. Rudy M.; Nowakowska M.; Wiechula B.; Zeintara M. and Radosz KH. (2004). Antibiotic susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. isolated from urine. Przegl. Lek. 61: 473-476.
10. Cox DG. and Greenberg SR. (2001). Phagocytes signaling strategies: FC (gamma) receptor- mediated phagocytosis as a model system. Semen. Immunol. 13: 339 -345.
11. Schleifer KH. and Killper-Bälz R. (1987). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis*. Comb. nov and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 31-34.
12. Atlas RM.(2005). Handbook of media for environmental microbiology. 2nd ed. Taylor and Francis Group, LLC.USA.
13. Signoretto C.; Lleo M. ; Tafi MC. and Canepari P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but non culturable state. Env. Microbiol. 66: 1953 – 1959.
14. Lowry OH.; Reschrough NJ.; Earry AL. and Randull RJ. (1951). Protein measurement with folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-257.
15. Freshney RI. (2000). Introduction to basic principles. In: Maste JW. (eds.). Animal cell culture. Oxford University Press.
16. Apajalahti J.; Kettunen A. and Graham H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. World Poult. Sci. J. 60:223-232.
17. Devriese LA.; Hommez J.; Wijfels R. and Haesebrouck F. (1991). Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. J. Appl. Bacteriol. 71:46-50.
18. Olsen RH.; Christensen H. and Bisgaard M. (2015). Investigations on first week mortality in layers and its impact on subsequent production. Avian. Dis. 101:23-27.
19. Klein G. (2003). Taxonomy, ecology, and antibiotic resistance patterns of *Enterococci* and occurrence of vancomycin- resistant *Enterococci* in raw minced beef and pork in Germany. Env. Microbiol. 88: 1825-1830.
20. Walid A. and Warren CJ. (2006). *Enterococcal* infection. Med. Spec. Pediat. Infect.1-14.
21. Josephen SL.; Stinson MW.; Miller SJ. and Cohen RE. (1994). Purification of lipoteichoic acid by chromatography in water- organic solvent systems. Infect. Immun. 51: 378-384.
22. Al- Shaibani RD. (2006). Study the effect of leaf extracts Oleander Nerium oleander raw and pure in normal cells and cancer cell lines developing in vitro and in mice eggs. learned from the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in some cancer cell lines and natural for humans and animals. Master Thesis, Faculty of Science, University of Baghdad.

Study on some immune mediators in gastric biopsies and sera from dyspeptic patients infected with *H. pylori*

Shehab A. Lafi, Wissam S. Khalil and Yaseen H. Majeed

Dept. of Medical Microbiology/ College of Medicine / University of Al-Anbar / Republic of Iraq

E-mail: shehab_6555@ymail.com

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate some immune mediators in gastric biopsies and sera from patients with dyspepsia. Seventy six (76) adult patients from both genders were included in this study. Inclusion criteria included dyspeptic patients require upper gastrointestinal endoscopic examination. Patients were attending Gastrointestinal Endoscopy Unit at Baghdad Teaching Hospital during the period from December 2014 to May 2015. Multiple mucosal biopsy specimens were taken from each patient to be used for rapid urease test (RUT) for the detection of *H. pylori* in tissue sample. Sera from patients were examined for the presence of IgM, and IgG specific for *H. pylori* as well as IL-5. Homogenate from each biopsy was examined for IL-5 and C5 using ELISA test.

Results revealed significant higher male rate of infection (60.5%) than females (39.5%) and the highest rate of Positive urease were seen in younger patients (18-40) years. Forty two (42) (55.26%) patients were showing positive *H. pylori* IgM in their sera while Positive IgG for *H. pylori* was found in (51) (67.10%) patients. Higher positive IgM and IgG for *H. pylori* were seen in male patients with positive urease. Higher IL-5 mean value (26.32 ± 65.71) was found in sera of patients with positive *H. pylori* IgG than negative group (18.71 ± 29.50). High significant IL-5 mean values were found in homogenates from patients with positive *H. pylori* IgM and IgG than serum. Significant correlation was found between *H. pylori* IgM, IgG, and RUT. Negative correlation was found between IL-5 and C5 mean values in homogenates. The current study concluded that rapid urease test in biopsy specimen is diagnostic test for *H. pylori* infection in spite of it is invasive test for the patient. Both of serum IgM and IgG specific for *H. pylori* are non-invasive useful diagnostic tests. While tests for IL-5 and C5 are non-specific and does not reflects specific inflammatory degree for *H. pylori* in biopsy specimen.

Keywords: *H. pylori*, cytokines, immunoglobulins

الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن بعض العوامل المناعية في خزعات نسيجية معدية وأمصال مرضى يعانون من سوء الهضم. تضمنت هذه الدراسة ستاً وسبعين (76) مريضاً بالغاً من الجنسين الذين راجعوا شعبة منظار الجهاز الهضمي في مستشفى بغداد التعليمي خلال الفترة من الأول من كانون الأول / ديسمبر 2014 ولغاية نهاية شهر أيار / مايو 2015. كان من بين معايير تضمين المرضى في الدراسة مدى حاجة المريض لإجراء منظار على الجزء العلوي للمعدة والأمعاء.

تم أخذ عدة خزعات نسيجية للغشاء المخاطي لمعدة كل مريض لإجراء اختبار اليوريز السريع على مجموعة منها، في حين استخدمت مجموعة أخرى من الخزعات لتحضير عالق الخلايا، وتم اختبار أمصال المرضى للكشف عن وجود الأضداد المناعية IgG, IgM الخاصة بجرثومة الملويات البوابية، وكذلك الانترولوكين الخامس (IL-5)، وقد تم الكشف في عالق الخلايا لكل خزعة عن وجود الانترولوكين الخامس (IL-5) والمنتم الخامس (C5) باستخدام فحص الإليزا، وبلغت نسبة إصابة الذكور (60.5%) وهي أعلى من نسبة الإصابة لدى الإناث (39.5%)، كما بينت النتائج أن أعلى نسبة موجبة لاختبار اليوريز كانت ضمن الفئة العمرية (18-40) عاماً، أما المرضى الذين كانت أمصالهم موجبة للضد IgM، فقد بلغت نسبتهم (55.2%)، بينما كانت نسبة الضد IgG (67.10%)، وكانت أعلى نسبة موجبة للأضداد المذكورة في المرضى الموجبة خزعاتهم لاختبار اليوريز، وقد لوحظ أن أعلى قيمة للانترولوكين الخامس (IL-5) كانت في عالق الخلايا مقارنة بتلك القيم في أمصال المرضى الموجبة للأضداد IgG, IgM الخاصة بالملويات البوابية، كما لوحظ ترابط موجب بين الأضداد IgM, IgG الخاصة بالملويات البوابية والاختبار اليوريز، وأظهرت النتائج وجود علاقة ترابط سالبة بين قيم (IL-5) و (C5) في عالق الخلايا.

وتستنتج الدراسة أن اختبار اليوريز للخزعة النسيجية هو اختبار تشخيصي للإصابة بالملويات البوابية بالرغم من كونه اختباراً يؤذي المريض، وأن كل من اختبارات الأضداد IgG, IgM في أمصال المرضى هي اختبارات تشخيصية وغير مؤذية للمريض، في حين أن اختبارات (IL-5, C5) غير خاصة ولا تعكس درجة الإصابة بالملويات البوابية في الخزعة النسيجية.

INTRODUCTION

H. pylori infection is one of the most common infections among humans, involved mostly in stomach disease and peptic ulcer disease (1). *Helicobacter pylori* colonize the stomach, survive acidic pH of the lumen and burrow into the mucus to reach stomach's epithelial cell layer (2,3). The survival of *Helicobacter pylori* in the acidic stomach is dependent on urease, and it would eventually die without this enzyme (4). Bacterial urease activity is clinically important because it forms the basis for several invasive and noninvasive diagnostic tests (5). Approximately 50% of all *H. pylori* strains secrete VacA, a highly immunogenic 95-kDa protein plays an important role in the pathogenesis of both peptic ulceration and gastric cancer (6). The immune response to *Helicobacter pylori* is a versatile group. The innate and the adaptive immune responses lead to damaging leukocytes (PMN), T cells, macrophages, and plasma cells (7). Th1 and Th2 cells cross-regulate one another through their mediators (8,9). Other cell that infiltrates the gastric mucosa was Th17 which are CD4⁺ T cells associated with infections and inflammation (10).

This study aimed to study some immune mediators with a focus on Complement-5, IL-5, IgM and IgG specific for *H. pylori* in sera of patients with dyspepsia in contrast to rapid urease, Complement-5, and IL-5 in biopsies from their gastric mucosa.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Seventy six (76) dyspeptic adult patients within the age range (18-80) years from both genders were included in this study. Patients were attending Gastrointestinal Endoscopy Unit at Baghdad Teaching Hospital during the period from December 2014 to May 2015. All patients were examined by senior physician and the endoscopic diagnosis was done by the consultant. Inclusion criteria included dyspeptic patients require upper gastrointestinal endoscopic examination and a data sheets were reported according to a questionnaire for each patient including name, gender, age, smoking, alcohol intake and family history of chronic dyspepsia or peptic ulceration.

Specimens

1. Biopsies : Two tissue biopsies were obtained from antrum, a rapid urease test was performed on one of them at the time of endoscopy for the detection of *H. pylori* in tissue sample. Another biopsy specimen was placed in 1 ml of sterile normal saline and preserved at -20°C for homogenate preparation to be used for immunological tests.

2. Blood: Five ml of venous blood were taken in a dry sterile tube and serum was pooled and kept at -20 °C to be used for serological tests.

Laboratory investigations

1. Rapid urease test : This test was done for each biopsy specimen soon using special kit following instructions of the manufacturing company (Strong Biotech corporation, Taiwan). Results were reported within 2 hrs. of reaction with biopsy.

2. Homogenate preparation: Homogenate suspension was prepared from each biopsy specimen using special kit (Biovision, USA) following instructions of the manufacturing company.

3. Investigations for homogenate :

Each homogenate was tested for IL-5 and Complement -5 (C5) using ELISA kit test (Koma Biotech, USA) and (Mybiosource, USA) for each respectively.

4. Serological tests : Serum IgM and IgG specific for *H. pylori* tests were done for each serum specimen using special ELISA kit for each test (Diagnostic Automation, incu, USA). IL-5 was tested also for each specimen following instructions of the manufacturing company (Koma Biotech, USA).

Statistical analysis

Statistical descriptive analysis (Mean, SD, SE and percentage) was done to describe data, two independent samples T test, (F-test), and correlation analysis were applied (11).

RESULTS

Patients gender

Male ratio (60.5%) was more than that of females (39.5%), ($p < 0.05$).

IgM and IgG specific for *H. pylori*

Forty two (42) and fifty one (51) patients showed positive reactions for *H. pylori* IgM (55.26%) and IgG (67.10%) respectively. Majority of positive results for *H. pylori* IgM and IgG were seen in sera of patients within age (18-40) years old patients.

Rapid urease test

Biopsies from forty one (41) (54%) patients were positive rapid urease test for *H. pylori*. Positive urease results were seen more in younger patients (18-40) years ($p < 0.042$) (table 1). Males showed higher rate of positive urease test than females (56.10%) and (43.90%) respectively.

Table (2): RUT, IL-5 and C5 in different age groups of patients

Patients age	Tests				
	RUT		IL – 5 serum	IL – 5 homogenate	C – 5 homogenate
	Positive	Negative	Mean	Mean	Mean
18- 28	10	3	10.6	45	0.301
29-39	12	7	31.9	51	0.383
40-50	11	12	45.5	51.181	0.426
51-61	4	5	3.333	50.5	0.285
62≥72	4	6	14.6	34.6	0.395

Gender and IgM and IgG

Higher positive IgM and IgG for *H. pylori* were found in males, (54.75%) and (64.71%) for each respectively ($p < 0.05$).

Urease and *H. pylori* IgM and IgG

H. pylori positive IgM results were seen more in patients with positive urease (24, 57.1%) out of (42) patients. In the same time ,more positive *H. pylori* IgG were seen in sera of urease positive group (28, 54.9%) out of (51) urease positive patients.

IL-5 in sera and homogenate of patients

High significant differences ($P < 0.005$) were found between IL-5 mean values in homogenate of positive *H. pylori* IgM and IgG patients than serum (figures 1-A and B).

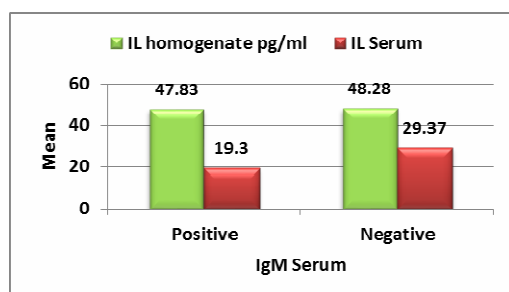


Figure (1-A): IL-5 versus IgM in homogenates and sera of patients

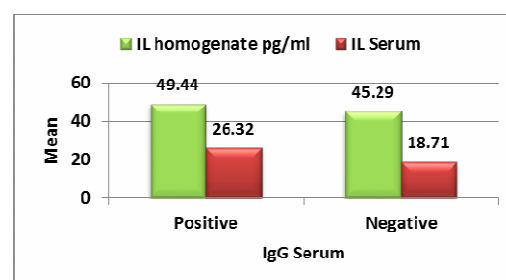


Figure (1-B): IL-5 versus IgG in Homogenates and sera of patients

IL-5 and urease

Non-significant difference ($P > 0.05$) was found in mean values of IL-5 in sera and homogenate of positive urease patients. Higher values of IL-5 were found in Homogenates than sera from patients with negative urease, ($P < 0.019$), (47.07) and (10.25) for each respectively (table-2).

Table (2): IL-5 by urease in sera and homogenates from patients

	Urease	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IL-5 homogenate pg/ml	Positive	22	44.9091	13.73875	2.92911
	Negative	26	48.3462	13.69655	2.68611
IL-5 serum	Positive	15	47.0667	84.03610	21.69803
	Negative	26	10.2538	22.26017	4.36558

Complement-5 (C5) in homogenates from patients

1. C5 and gender of patients: Non-significant difference was found between values of C5 in homogenates from males and female patients ($P>0.05$) (figure 2).

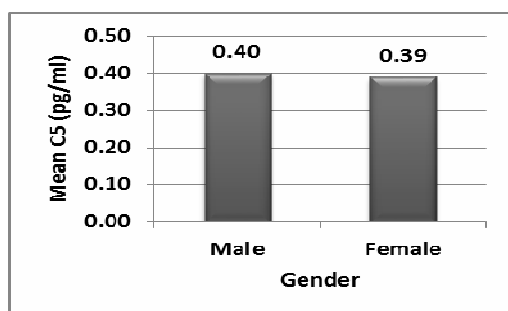


Figure (2): Compliment-5 (C5) in homogenates from both genders

2. IL-5 versus C5: Negative correlation was found between IL-5 & C5 mean values in homogenate (figure 3).

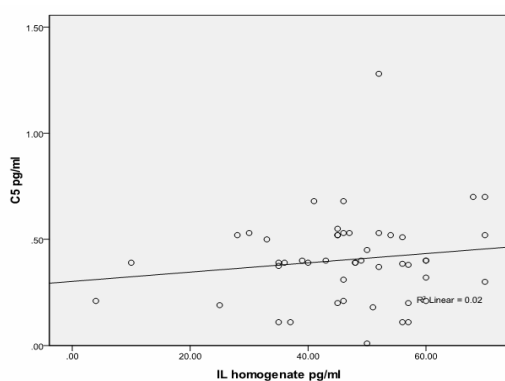


Figure (3): Correlation between C5 and IL-5 in homogenate

3. C5 and urease results: Higher mean C5 values were seen in homogenates of patients with negative urease than that of positive urease (0.50) and (0.28) for each respectively ($P<0.005$) (figure 4).

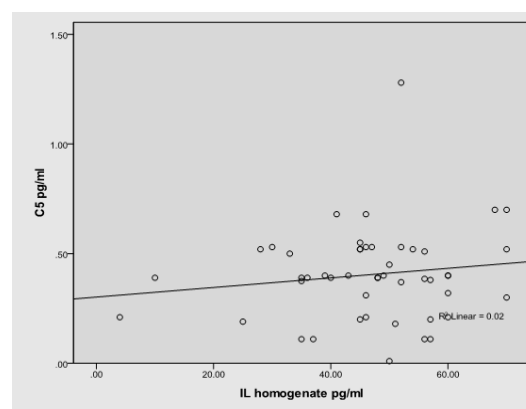


Figure (4): C5 in homogenate related to urease results

4. C5 and IgM: Non-significant difference ($P>0.005$) was found between C5 mean values in IgM positive and negative patients (0.38) and (0.40) for each respectively.

5. C5 versus IgG: In spite of the increased mean values of C5 in positive IgG patients (0.40) in contrast to that of negative IgG group (0.38), non-significant difference was found between them ($P>0.05$).

6. C5 and gender: Non-significant difference ($P>0.05$) was found between male and female C5 mean values, (0.40) and (0.39) for each respectively (figure 5).

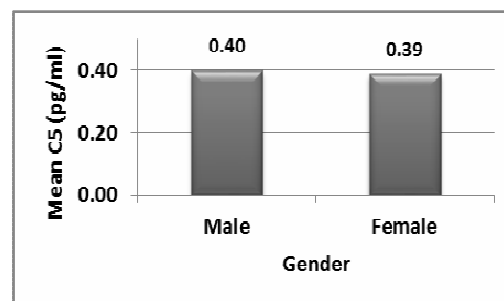


Figure (5): C5 in homogenate regarding patients gender

DISCUSSION

High male infection rate in this study was also confirmed by (12), while non-significant difference in infection between genders was reported by (13,14). Higher rate of *H. pylori* infection in males was attributed to low chance for female infection due to low rate female smoking and other gender related hormonal effects (15).

Highest rate of infection was found within age group (18-50) years, this result was confirmed by (13,14). This finding was might be due to higher exposure of (18-50) years old individuals to risk factors like smoking eating habits and other related factors (16).

Positive urease results were seen mostly within (18-40) years old patients, because of the density of *H. pylori* in gastric biopsy samples were higher in this age group. This result was in accordance with the findings of (17). The presnet study revealed higher rate of positive urease test in males, this result was in accordance with the findings of (13). This might be ought to the higher infection rates in male and other gender related infectivity factors mentioned above (15).

Higher positive IgM and IgG for *H. pylori* in males in this study was also observed by (18), while discrepant results were found by (19). This variability in the rates among different studies might be attributed to the different demographic distribution of bacteria, previous antibiotic consumption and different socioeconomic status (16,20).

Gender related factors may affect immune status of an individual due to immune modulation effect of sex hormones in both genders (21). The higher significant IL-5 mean values in homogenate of positive *H. pylori* IgM than serum was in accordance with the study of (22).

Higher IL-5 mean values found in sera of positive IgG patients were also found by (23). Higher IL-5 mean values in homogenate of positive *H. pylori* IgG can be attributed to the stronger local mucosal immune response against *H. pylori* (7,22). In addition to that *H. pylori* adheres to the cells of gastric mucosa and secretes different molecules that can change gastric epithelial cell function (24).

The non-significant difference between C5 values in both genders in homogenates and negative correlation between IL-5 and C5 mean values was observed also by (23). This might be due to the fact that IL-5 after 8 weeks production was found below the level of detection at all times (25). High C5 mean values in homogenates of patients with negative urease can be attributed to the late case presentation to the physician. This delay may lead to the increased coccoid forms of *H. pylori*, which were characterized by lower urease activities than the spiral form (26). Increased mean values of C5 in positive IgG patients was might be due to the shift of immune response to the secondary type through in which IgG predominant (27). As well as activated complement has been observed locally associated

with an increased mucosal IgG response in patients with inflammatory bowel disease (28). The current study concluded that males were more exposed to *H. pylori* infection within age range 18-40 years. Rapid urease test in biopsy specimen is diagnostic test for *H. pylori* infection in spite of it is invasive test for the patient. Both of serum IgM and IgG specific for *H. pylori* are non-invasive useful diagnostic tests. While tests for IL-5 and C5 are non-specific and does not reflects specific inflammatory degree for *H. pylori* in biopsy specimen.

REFERENCES

1. Graham DY.; Opekun AR.; Osato MS.; El-Zimaity HM. *et. al.* (2004). Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*. 53:1235-1243.
2. Ottemann KM. and Lowenthal AC. (2002). *Helicobacter pylori* use motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* 70 (4): 1984-1990.
3. Sgouros SN. and Bergele C. (2006). Clinical outcome of patients with *H.pylori* infection: the bug, the host, or the environment? *J. postgrad. Med.* 82:338-342.
4. Atherton JC. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1:63-96.
5. Amieva MR. and El-Omar EM. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol.* 134:306.
6. Wada A.; Yamasaki E. and Hirayama T. (2004). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration. *J. Biochem. (Tokyo)* 136:741-746.
7. Avilés-Jiménez F.; Reyes-Leon A.; NietoPatlán E.; Hansen LM. *et. al.* (2012). In vivo expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in patients with gastritis, ulcer, and gastric cancer. *Infect. Immun.* 80:594.
8. Tummala S.; Keates S. and Kelly CP. (2004). Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20:592-597.
9. Robinson K.; Kenefeck R.; Pidgeon E.; Shakib S.; Patel S. *et. al.* (2008). *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut*. 57:1375-1385.
10. Pinchuk IV.; Morris KT.; Robert A. *et. al.* (2013). Stromal cells induce Th17 during *Helicobacter pylori* infection and in the gastric tumor microenvironment. *PLOS One*. 8: e53798.
11. Wayne WD. (2010). Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. *Wiley Series in Probability and Statistics*. P. 960.
12. Baqire HI.; Abdullah AM.; Al-Bana AS. and Al-Aubaidi HM. (2002). Sere-prevalence of *Helicobacter pylori* infection in unselected adult population in Iraq. *IJGE*. 1(3): 23-29.

13. Al-Sulami AA.; Al-Edani TA. and Al-Abdula AA. (2013). Similarity of *Helicobacter pylori* isolated from drinking water and peptic ulcer patients. Am. Based. Res. J. 2(3): 1236-1239.
14. Husain AK.; Lafi SA. and Majeed YH. (2015). Study on some immune mediators in Sera from H. pylori infected patients. Anbar J. Sci. 8(3):15-19.
15. Ngo ST.; Steyn FJ. and McCombe PA. (2014). Gender differences in autoimmune disease. Front. Neuroendocrinol. 35: 34718.
16. Bazzoli F.(2002). Key points from the revised Maastricht Consensus Report the impact on general practice. Eur. J. Gastro. Hepatol. 13:3-7.
17. Dandin AS.; Pawale J. and Athanikar VS. (2012). *Helicobacter Pylori* Associated Gastritis. J. Clin. Diag. Res. 6: 211-214.
18. Hassan PA. (2010). Detection of immunoglobulin G and M antibodies to *Helicobacter Pylori* in serum by an enzyme immunoassay method. J. Edu. Sci. 24(3): 89-97.
19. Elhag WI. and Ali LEO. (2014). Frequency of *H. pylori* antibodies among patients with gastrointestinal symptoms attending Khartoum Teaching Hospital- Sudan. SOJ. Microbiol. Infect. Dis. 2(1):1-5.
20. Bardhan PK. (1997). Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin. Infect. Dis. 25: 973-978.
21. Grishina I.; Fenton A. and Walters SS. (2014). Gender differences, aging and hormonal status in mucosal injury and repair. Aging Dis. 5(2): 160–169.
22. Liu W.; Ming Y.; Yueqin L.; Ruihong W.; Cuiling L. *et. al.* (2010). Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. PANS. 107(24):11056-11061.
23. Taufiqur R.; Bhuiyan MM.; Towhidul I.; Taher U. *et. al.* (2014). Th1 and Th17 responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi infants, children and adults. PLOS One. 9(4):e 93943.
24. Chatterjee A.; Chatterjee S. and Bandyopadhyay SK. (2012). *H. pylori*-induced gastric ulcer: pathophysiology and herbal remedy. Int. J. Biol. Med. Res.3:1461-1465.
25. Chatterjee A.; Chatterjee S. and Bandyopadhyay SK. (2012). *H. pylori*-induced gastric ulcer: pathophysiology and herbal remedy. Int. J. Biol. Med. Res.3:1461-1465.
26. Andersen LP. and Rasmussen L. (2009). *Helicobacter pylori*- coccoid forms and biofilm formation. FEMS. Immun. Med. Microbiol. 56(2): 112-115.
27. Male D.; Brostoff J.; Roth DB. and Roitt I. (2006). Immunology. 7th ed. Mosby publishers, Canada. Pp.: 29-90.
28. Wagner E. and Frank MM. (2010). Therapeutic potential of complement modulation. Nat. Rev. Drug Disc.9 (1):43-56.

Comparison of techniques used in isolation and identification of *salmonella* spp. and related genera from raw meat and abattoir environment of Basrah

Ali A. Al-Iedani, Jalal Y. Mustafa and Nada S. Hadi

College of Veterinary Medicine / University of Basrah/ Republic of Iraq

E-mail: aliedany65@yahoo.com

ABSTRACT

The present study aimed to detect the presence of *Salmonella* spp. and related genera in raw meat and different parts of abattoir. It aimed also to compare the efficiency of techniques used in identification of *Salmonella* spp. and *Citrobacter freundii*. A total of (298) samples were collected from Basrah abattoir between 16th September 2014 and 21st March 2015. These samples composed of (80) samples from buffalo, (51) samples from cow, (93) samples from sheep, (51) swabs and (23) samples of sewage. Different techniques were used in this study to evaluate the presence of *Salmonella* spp. and phenotypically similar genera, which contaminate the raw meat. These techniques included traditional bacteriological assays, commercial identification kit (API 20 E), serotyping and molecular techniques (multiplex PCR).

Results of these techniques reflected the absence of *Salmonella* spp. from tested samples. However, 35 samples were positive to *Proteus mirabilis*, as identified by API 20 E system. There were differences between API 20 E and serotyping in results, (44) isolates were identified as *Citrobacter freundii* by using API 20 E, whereas, results of serotyping indicated the presence of (31) isolates as *Citrobacter braakii* and (13) *Enterobacter* spp.

The isolates were subjected to mPCR [*invA* gene (243 bp), *spvC* gene (570 bp) and *viaB* gene (516 bp)].

Results of mPCR confirmed only (13) of those isolates as *Citrobacter freundii*, while the other (31) isolates were not confirmed as *Salmonella* spp. or *Citrobacter freundii*. In addition, the results of this study showed that the mPCR is an accurate method for confirmation of *Salmonella* spp. and *Citrobacter freundii*.

Keywords: *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *invA*, *spvC* and *viaB* genes

المخلص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن وجود السالمونيلا والأجناس ذات الصلة في اللحوم النيئة وأجزاء مختلفة من مسلخ البصرة، كما هدفت إلى إجراء مقارنة بين كفاءة التقنيات المستخدمة في عزل وتشخيص السالمونيلا و *Citrobacter freundii*. تم جمع (298) عينة من مسلخ البصرة خلال الفترة من 16 أيلول / سبتمبر 2014 إلى 21 آذار / مارس 2015. تكونت العينات من (80) عينة من الجاموس، (51) عينة من الأبقار، (93) عينة من الأغنام، (51) مسحات و (23) عينة من مياه الصرف الصحي. تم استخدام تقنيات مختلفة في هذه الدراسة لتقييم وجود السالمونيلا والأجناس المماثلة لها ظاهرياً التي تلوث اللحوم النيئة، شملت هذه التقنيات الاختبارات البكتريولوجية التقليدية، واختبار (API 20 E) التجاري، التصنيف المصلي وتقنية البلمرة المتعددة.

أشارت نتائج استخدام هذه التقنيات إلى عدم وجود السالمونيلا في العينات التي تم فحصها، ومع ذلك، كانت 35 عينة إيجابية لجنس *Proteus mirabilis*، كما حددها نظام API 20 E. في حين كانت هناك اختلافات بين نتائج API 20 E والفحص المصلي، حيث تم تحديد (44) عينة باعتبارها *Citrobacter freundii* باستخدام API 20 E، وأشارت نتائج الاختبار المصلي إلى وجود (31) عينة *Citrobacter braakii* و (13) *Enterobacter* spp. خضعت هذه العزلات لتفاعل البلمرة المتعدد للكشف عن جين *invA*، جين *spvC* و جين *viaB*، وأكدت نتائج تفاعل البلمرة المتعدد أن (13) عينة فقط من هذه العزلات كانت *Citrobacter freundii*، بينما لم يتأكد وجود السالمونيلا أو *Citrobacter freundii* في (31) عينة، كما أظهرت نتائج هذه الدراسة أن تفاعل البلمرة المتعدد يعتبر وسيلة دقيقة لتأكيد عزل وتشخيص السالمونيلا و *Citrobacter freundii*.

INTRODUCTION

Meat and their products are considered as excellent sources of high quality animal protein, vitamins especially B complex, and certain minerals, especially iron (1). They are considered as an ideal culture medium for growth of many organisms because of the high moisture, high percentages of nitrogenous compounds of various degrees of complexity, plentiful supply of minerals, accessory growth factors and some fermentable carbohydrates (glycogen) of a favorable pH for most of the enteric microorganisms (2).

Contamination of raw meat is one of the main sources of foodborne illnesses (3,4). Unfortunately, The presence of microbial contaminants in meat products cannot be detected visually (5), which raise both the risks associated with foodborne pathogens and the incidence of human diseases (6). Microbial contamination of raw meat starts during slaughter, when the carcass become contaminated with microorganisms residing on external surfaces, the gastrointestinal tract and lymph nodes of the animal, and in the plant environment (7). The incidence of carcasses contamination depends on various factors including stress during transportation, time spent in lairages and hygienic level during slaughter (8). In fact, tissue from healthy animal are sterile however, it has been pointed that during slaughter, dressing and cutting, microorganisms came chiefly from the exterior of the animal and its intestinal tract but that more added from knives, cloths, air, carts and equipment in general. External contamination of meat is a constant possibility from the moment of bleeding until consumption (9).

The gram-negative bacteria account for approximately 69% of the cases of bacterial food borne diseases (10). *Salmonella* is one of the microorganisms most frequently associated with food-born outbreaks of illness (11). Furthermore, it remains a leading cause of food poisoning in the developed world, resulting in multiple cases of absenteeism, illness, hospitalization and death each year (12). *Salmonellae* can be frequently found in sewage, sea, and river water and can contaminate a variety of foods (13).

Citrobacter freundii is an environmental bacteria, which can be opportunistic and that also can be found in many animals (14,15). Moreover, *Citrobacter* species are occasional inhabitants of human, animal intestines, soil, water, sewage, and food (16). These organisms are isolated from variety of clinical specimens like urine, pus, blood, and cerebrospinal fluid (17).

Environmental pathogenic contaminant *Proteus mirabilis* are capable of growth in low nutrient conditions (18). Thus, this bacteria is able to grow in water distribution systems (19), manure, and soil, where it plays an important role in decomposing organic matter of animal origin (20). *Proteus* was recovered from hides and work surfaces within the abattoir, from carcasses, butchered meat as well as

from environmental samples in meat processing plants (21,22).

Multiplex PCR (mPCR) approaches have been largely applied to detect different species of several microbial niches, to differentiate closely related species and to recognize single species (23).

Aims of the study

1. Isolation and identification of *Salmonella spp.* and related genera from raw meat and environment of the abattoir by conventional microbiological, serological and molecular techniques.
2. Comparison of the efficiency of techniques used in identification of *Salmonella spp.* and *Citrobacter freundii*.

MATERIALS AND METHODS

Samples collection

A total of 298 samples were collected between 16th September 2014 to 21st March 2015. The samples were collected from slaughtered animals, workers and different places of Basra abattoir. Table (1) indicates the sources, types and number of samples.

Table (1): sources, types and number of the collected samples

Source of sample	Type of sample	No. of samples
Muscular tissue	Buffalo	50
Liver tissue		10
Bile		20
Muscular tissue	Cows	27
Liver tissue		14
Bile		10
Muscular tissue	Sheeps	57
Liver tissue		24
Bile		12
Sewage		23
Wall	Swabs	17
Ground		17
hands of workers		17
Total		298

Isolation of bacteria

Laboratory analyses of samples were achieved according to (24) by pre-enrichment in buffered peptone water and then enrichment in tetrathionate broth. After enrichment of samples with tetrathionate broth for 18 hrs., a loop-full of culture was streaked into plates of xylose lysine deoxycholate (XLD) agar at 37°C for 18 hrs. and checked for growth of colonies of *Salmonella spp.*, *Proteus spp.* and *Citrobacter spp.*

Conventional microbiological tests

The Presumptive isolates were cultured on MacConkey agar to differentiate between lactose and non-lactose fermenting. Suspected colonies were stained by Gram staining as described by (25). The presumptive isolates were submitted to conventional biochemical tests, urease test was done according to (26), triple sugar iron (TSI) agar slant reaction according to (27), citrate utilization test using Simmon's citrate agar according to (28) and oxidase test was accomplished like described by (29).

Confirmatory identification test for isolates

1. Analytical Profile Index (API 20E) test: The identities of all presumptive isolates were confirmed using analytical profile index API 20E test. The test was performed according to manufacturer's protocol (BioMerieux Inc., France). The results were read with reagents and the indices based on phenotypic profiles of isolates were used to determine the identity of isolates by referring to the analytical profile index.

2. Serological methods: Serological identification of isolates was done at the Department of

microbiology, Central Public Health Laboratory in Baghdad.

3. Molecular characterization of isolates:

3.1 Extraction of genomic DNA: Genomic DNA was extracted from all isolates using a DNA extraction kit (Genaid, Korea) according to manufacturer's protocol. The DNA extracted was stored at 4°C until PCR analysis.

3.2 Multiplex PCR (mPCR) assay: The mPCR primer pairs used in this study were to detect only *Salmonella* spp. and *Citrobacter freundii*. mPCR was performed by using three primer pairs according to (30); these primers were designed to identify 14 clinically important bacterial organisms, including *Citrobacter freundii*, *S. enteric* serovars Typhi and Paratyphi C, Dublin, and other non-typhoidal *Salmonella* that harbor a virulence plasmid (table 2).

PCR reactions were performed standard 25µl volumes containing 3µl of DNA template, 12.5 µl of Green master mix, 5µl of Nuclease free water and 0.75µl of each oligonucleotide primers. PCR amplification was performed with a DNA thermal cycler, using the following conditions: 95°C for 5 min., followed by 35 cycles of 95°C for 35 sec., 55°C for 30 sec., 72°C for 35 sec. and a final extension at 72°C for 10 min.

Table (2): Oligonucleotide primers for mPCR amplification

Primer	Sequence (5' → 3')	L (bp)	S	P (bp)
F	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	24	imA gene	243
R	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	24		
F	ACTCCTTGCACAACCAATGCGGA	24	spvC gene	570
R	TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA	25		
F	TGTCGAGCAGATGGATGAGCAT	22	viaB gene	516
R	ACGGCTGAAGGTTACGGACCGA	22		

RESULTS AND DISCUSSION

The collected samples were analyzed for the presence of *Salmonella* spp. and related genera. The growing colonies on XLD agar were small, discrete, round, smooth, convex and transparent with black centre. The suspected colonies were analyzed by using preliminary tests (lactose and non-lactose fermenting on MacConkey agar, Gram staining,

urease test, Simmons citrate agar test, triple sugar iron agar test and oxidase test) (table 3).

According to the confirmatory identification test (API 20E test), the proportion of isolates that satisfied these tests were revealed that, 14.7% (44/298) of isolates were identified as *Citrobacter freundii* (figure 1) and only 11.7% (35/298) of isolates were identified as *Proteus mirabilis* (figure 2), whereas no one of the isolates were identified as *Salmonella* spp. (table 4).

Table (3): Comparison of the isolates according to the conventional biochemical results

Biochemical tests	Results	No. of results of lactose fermenting	No. of results of lactose non-fermenting
TSI test	Positive	44	35
	negative	0	0
Urease test	Positive	0	35
	negative	44	0
Simmon'scitrate	Positive	34	32
	Negative	10	3
Oxidase test	Positive	0	0
	negative	44	35

Figure (1): *Citrobacter freundii*Figure (2): *Proteus mirabilis*Table (4): Distribution of *Citrobacter freundii* and *Proteus mirabilis* identified by using API 20 E

Source of sample	Type of sample	No. of sample	Total identified <i>C. freundii</i> by API 20E	Total identified <i>P.mirabilis</i> by API 20E
Muscular tissue	Buffalo	50	12	9
Liver tissue		10	2	1
Bile		20	2	1
Muscular tissue	Cow	27	15	4
Liver tissue		14	2	2
Bile		10	0	0
Muscular tissue	Sheep	57	0	8
Liver tissue		24	0	1
Bile		12	0	0
	Sewage	23	7	5
Wall	Swabs	17	1	1
Ground		17	3	2
hands of workers		17	0	1
Total		298	44	35

This isolation rate of *Citrobacter freundii* in agreement with (31), who isolated *C. freundii* from fresh meat in ratio 13.9%, however the isolation rate of *Proteus mirabilis* was similar to (32), who reported that the isolation rate of *Proteus mirabilis* was 12%. Concerning the isolation rate of *Salmonella spp.* from fresh meat, the results were in agreement with (31), who reported negative results of *Salmonella spp.* isolation. In this study, the identification rate of conventional biochemical tests was similar to that of API 20 E. (table 5).

A total of 44 isolates were identified as *Citrobacter freundii*, were subject to serotyping. However, a large proportion 70.4% of these isolates were identified as *Citrobacter braakii* and a small proportion of these isolates 29.5% were identified as *Enterobacter spp.*, while nil of *Salmonella spp.* This result in agreement with (33), who reported negative results for the *Salmonella spp.* from fresh beef by serological methods (table 6).

To avoid bias due to confusing in the results obtained by different methods, the PCR was used to eliminate that confusion and because *Salmonella* was genetically closer to *Citrobacter* (34) and species of *Citrobacter* share about 50 to 55% of their nucleotide sequences with *Salmonella* (35), because of these reasons the mPCR primer pairs used in this study were to detect only *Salmonella spp.* and *Citrobacter freundii*. All the 44 isolates were subjected to mPCR analysis for characters of *Salmonella spp.*, this was achieved through amplification of the (*invA*) gene fragments specific for *Salmonella* isolates and (*spvC*) gene for seven serovars of *Salmonella spp.* have been reported to harbor the virulence plasmid: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Abortusovis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum-Pullorum*, and *S. Sendai*. While primer pairs of (*viaB*) gene using to identified *Citrobacter freundii*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi C.* and *S. Dublin* (30).

The mPCR results of this study revealed that, despite the fact that none of the isolates possessed the (*invA* and *spvC*) gene, a small proportion 13(4.3%) were positive for the (*viaB*) gene fragments, and identified as *Citrobacter freundii*. This result in agreement with (30) who reported *viaB* gene is specific for *Citrobacter freundii* (figure 3).

Results of comparison of the different methods clarified that there was similarity in the results between API 20E and conventional techniques. While there are dissimilarity between traditional serotyping and multiplex PCR, the differences are statistically highly significant (table 7). This result was in agreement with (36) who reported that, the deficiencies of conventional serotyping have led to the development of alternative molecular strategies to replace or complement conventional serotyping. Also (37-41) employed PCR-based approaches such as mPCR to determine different O and H antigens as a means to replace serologic identification of these antigens. While the results of this study disagreement with (42), who reported that the

correlation between traditional serotyping and multiplex PCR was 100%.

Table (5): Comparison of *Citrobacterfreundii* and *Proteus mirabilis* identified by using conventional biochemical tests and API 20 E

No. of examined samples	Identified bacteria	Positive isolates identified by conventional		Isolates identified by API 20E System	
		No.	%	No.	%
298	<i>Citrobacter freundii</i>	44	14.7	44	14.7
298	<i>Proteus mirabilis</i>	35	11.7	35	11.7

Note: Percentages resulted from dividing the number of cell by total number of raw

Table (6): Serotyping results of isolates with their percentages

Serotype	No.	Percentage
<i>Citrobacter braakii</i>	31	70.4%
<i>Enterobacter spp.</i>	13	29.5%

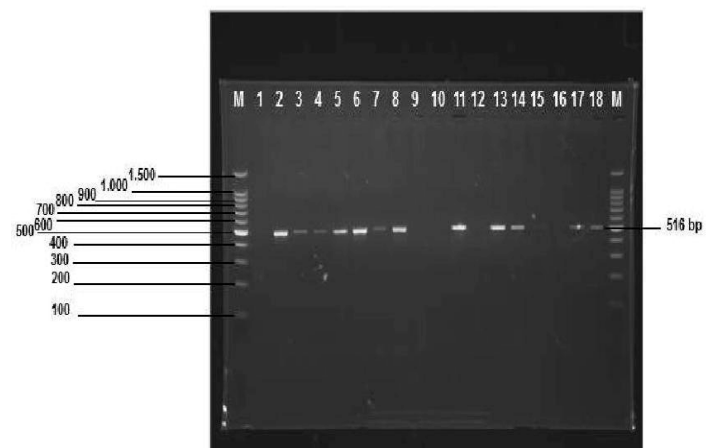


Figure (3): mPCR amplification mixture was run on 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lanes: M, Marker, 2-8, 11,13,14,17 and 18 positive for *viaB* gene as *C. freundii*

Table (7): Overall results of *Citrobacter freundii* obtained by different methods of isolation and identification

Type of test	Total no. of isolates	Positive tested samples	Percentage (%)
Positive cultural result on XLD	298	79	26.5
Conventional biochemical test	79	44	55.6
API 20 E	44	44	100
Serological	44	0	0
PCR	44	13	29.5

Chi-Sq = 129.654; Df = 4; P-Value = 0.000

Also the results of this study disagreed with many previous studies (43-46), who used the techniques of conventional and serology as only diagnostic

tools. While this study was in agreement with (47,48), who reported that, the serology method has a number of deficiencies, including the inability to serotype between 5 and 8% of isolates and incorrect typing due to the loss of surface antigens. In addition, cell surface antigens are sometimes horizontally transferred; a phenomenon that can cause classification of genetically unrelated strains within the same serovar, also this method does not reveal the genetic relationships of strains within the same or different serotypes (49). However, (50) and (51) demonstrated that serotyping approach can present a risk of false positives for *Salmonella*.

The present study concluded that, the isolated strains were identified as *Citrobacter freundii* and *Proteus mirabilis*, however, nil *Salmonella* species were identified in the raw meat and abattoir environment. In addition, this study concluded that, the mPCR is an accurate method for confirmation of *Salmonella* spp. and *Citrobacter freundii*.

REFERENCES

1. Gracey JF. (1986). Meat Hygiene. 8th ed. The English long book Sic. and Baillier, Tindall, London. P.517.
2. Fratmico PM.; Bhunia AK. and Smith JL. (2005). Foodborne pathogens in microbiology and molecular biology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK. P. 273.
3. Bhandare SG.; Sherikary AT.; Paturkar AM.; Waskar VS. and Zende RJ. (2007). A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Control. 18: 854-868.
4. Podpecan B.; Pengov A. and Vadjnal S. (2007). The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *staphylococcus aureus*. Slov. Vet. Res. 44: 25-30.
5. Movassagh MH.; Shakoori M. and Zolfaghari J. (2010). The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine carcass at Tabriz slaughterhouse, Iran. Global Vet. 5(2): 146-149.
6. Collins NA. and Biotumelo M. (2014). Use of *invA* gene specific PCR analysis for the detection of virulent *Salmonella* species in beef products in the North West Province, South Africa. J. Food Nutr. Res. 2(6):294-300.
7. Samelis J. (2006). Managing microbial spoilage in meat industry. In: Food spoilage microorganism. Blackburn CW.(ed.). CRC press, Boca Raton, FL. Pp.:252-255.
8. Marritto NG. and Gravani RB. (2006). Principles of food sanitation. 5th ed. Springer Science Business Media .Inc.
9. Lawrie RA. (1984). The preservation effect of smoke on meat. Meat Science Pergaman Press Inc. Maxwell House Fair view park -Elmford, New York. Pp.: 49-52.
10. Clarence SY.; Obinna CN. and Shalom NC. (2009). Assessment of bacteriological quality of ready to eat food (Meat pie) in Benin City Metropolis, Nigeria. Afr. J. Microb. Res. 3(6): 390-395.
11. Antunes P.; Reu C.; Sousa JC.; Peixe L. and Pestana N. (2003). Incidence of *Salmonella* poultry and their susceptibility to microbial agent. Int. J. Food Microbial. 82: 97-103.
12. Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). Division of Bacterial and Mycotic Disease. Disease information *Escherichia coli* O157: H7. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 54(2): 40.
13. Foti M.; Daidone A.; Aleo A.; Pizzimenti A.; Giacobello C. and Mammina C. (2009). *Salmonella* bongori 48: z35:-in Migratory Birds, Italy. Emerg. Infect. Dis. 15(3): 502-503.
14. Nada T.; Baba H.; Kawamura K.; Ohkura T.; Torii K. and Ohta M. (2005). A small outbreak of third generation cephem-resistance *Citrobacter freundii* infection in surgical ward. Japan Infect. Dis. 57: 181-182.
15. VetBact (2013). Available at: <http://www.vetbact.org/vetbact/index.php?artid=142&vsearchstring=citrobacter%20freundii>
16. Schwartz DA. (1997). *Citrobacter* infections. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE, eds. Pathology of infectious diseases. Stanford, Connecticut: Appleton and Lange. Pp.:513-516.
17. Murray PR.; Holmes B. and Aucken HM. (2005). *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, and other members of the Enterobacteriaceae. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10th ed. London: Hodder Arnold. Pp.:1474-1506.
18. Sahota P. and Pandove G. (2010). Biomonitoring of indicator and emerging pathogens in piped drinking water in Ludhiana. Rep. Opin. 2(1):14-21.
19. Szewzyk U.; Szewzyk R.; ManzSchleifer W. and Schleifer K. (2000). Microbiological safety of drinking water. Ann. Rev. Microbiol. 54: 118-127.
20. Rozalski A.; Sidoreczyk Z. and Kotelko K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:65-89.
21. Gill TA. (1992). Objective analysis of seafood quality. Food Rev. Int. 6:681-714.
22. Nychas GJ.; Skandamis P N.; Tassou CC. and Koutsoumanis KP. (2008). Meat spoilage during distribution. Meat Sci. 78: 77-89.
23. Settanni L. and Corsetti A. (2007). The use of multiplexPCR to detect and differentiate food- and beverage associated microorganisms: A review. J. Microbiol. Methods. 69: 1-22.
24. Andrews WH. and Hammack TS. (2003). *Salmonella*. Chapter 5. In: FDA Bacteriological analytical manual, 8th ed. Gaithersburg, MD.
25. Olutiola PO.; Famurewa O. and Sontag HG. (1991). An introduction to general microbiology. A practical approach. 1st ed. Heldelberg: Heideberger Verlags anstalt and Druckerei GmbH. pp. 42-44.
26. Abdullahi M. (2010). Incidence and antimicrobial susceptibility pattern of *Salmonella*

- species in children attending some hospitals in Kano Metropolis, Kano state –Nigeria. Bayero J. Pure Appl. Sci. 3(1): 202-206.
27. Al-Ferdous T.; Kabir SML.; Amin MM. and Hossain KMM. (2013). Identification and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* species isolated from washing and rinsed water of broilers in pluck shops. Int. J. Anim. Vet. Adv. 5(1):1-8.
28. Collins NA. and Biotumelo M. (2014). Use of *invA* gene specific PCR analysis for the detection of virulent *salmonella* species in beef products in the North West Province, South Africa. J. Food. Nutr. Res. 2(6): 294-300.
29. MacFaddin JF. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rded. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
30. Chia-Ling L.; Cheng-Hsun C.; Chishih C.; Yhu-Chering H.; Tzou-Yien L. and Jonathan TO. (2007). A multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* species, including *Salmonella Typhi*. J. Microbiol. Immunol. Infect. 40:222-226.
31. Ukut IO.; Okonko IO.; Ikpoh IS.; Nkang AO.; Udeze AO.; Babalola TA.; Mejehe OK. and Fajobi EA. (2010). Assessment of bacteriological quality of fresh meats sold in Calabar Metropolis, Nigeria. EJEAF. 9(1):89-100.
32. Bradeeba K. and Sivakumaar PK. (2013). Antibiotic susceptibility of selected pathogenic bacteria isolated from raw meat sample obtained from Chidambaram, Tamil Nadu. J. Chem. Pharmaceut. Res.5(1): 64-67.
33. Abdul Wahid AT. (2005). Bacteriological evaluation of beef carcasses at butchers shops in Basrah city. Master Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Basrah.
34. Yousra T.; Ines M.; Amel K.; Kaouther A.; Abdennaceur H. and Hadda O. (2013). Identification of three related genera, *Salmonella*, *Citrobacter* and *Proteus* using API 20E, 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer fingerprinting and 16S rDNA sequencing. Afr. J. Microbiol. Res.7(29): 3874-3884.
35. Crosa JH.; Brenner DJ.; Ewing WH. and Falkow S. (1973). Molecular relationships among the salmonellae. J. Bacteriol. 115(1): 307-315.
36. Brandon TL.; Jonathan GF.; Jinxin H.; Paula JF. and David SB. (2009). High-throughput molecular determination of *Salmonella enteric* serovars by use of multiplex PCR and capillary electrophoresis analysis. J. Clin. Microbiol. 47(5): 1290–1299.
37. Echeita MA.; Herrera S.; Garaizar J. and Usera MA. (2002). Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res. Microbiol. 153:107-113.
38. Alvarez J.; Sota M.; Vivanco AB.; Perales I.; Cisterna R.; Rementeria A. and Garaizar J. (2004). Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42: 1734-1738.
39. Herrera-Leon S.; McQuiston JR.; Usera MA.; Fields PI.; Garaizar J. and Echeita MA. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase 1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 42: 2581-2586.
40. Lim H.; Lee KH.; Hong CH.; Bahk GJ. and Choi WS. (2005). Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. Int. J. Food Microbiol. 105: 411-418.
41. Fitzgerald C.; Collins M.; Van Duyn S.; Mikoleit M.; Brown T. and Fields P. (2007). Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. J. Clin. Microbiol. 45: 3323-3334.
42. Mirzaie S.; Hassanzadeh M. and Ashrafi I. (2010). Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 34(2):181-186.
43. Abdul-Hadi A A. (2010). Prevalence of microflora in lamb meat and offal at Baghdad abattoir. Bas. J. Vet. Res. 9(1):28-34.
44. Aseel MH.; Maysoon SA. and Waffa AA. (2010). The isolation and identification of the important pathogenic bacteria from fresh meat. Vet. Med.J. 34(1): 55-62.
45. Roseliza R.; Maswati MA.; Hasnah Y. and Ramlan M. (2011). Identification of *Salmonella* serotypes isolated from meat samples in Malaysia. Malays. J. Vet. Res. 2(1): 59-64.
46. Wessam M. (2012). Isolation of *Salmonella* spp. from slaughtered sheep in Basra. Bas. J. Vet. Res.11(2): 159-166.
47. Kim S.; Frye JG.; Hu J.; Fedorka-Cray PJ.; Gautom R. and Boyle DS. (2006). Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enteric* subsp. *enterica*. J. Clin. Microbiol. 44:3608-3615.
48. Schrader K.; Fernandez-Castro A.; Cheung WK.; Crandall CM. and Abbott S. (2008). Evaluation of commercial antisera for *Salmonella* serotyping. J. Clin. Microbiol.46:685–688.
49. Selander RK.; Beltran P.; Smith NH.; Helmuth R.; Rubin FA.; Kopecko DJ.; Ferris K.; Tall BD.; Cravioto A. and Musser JM. (1990). Evolutionary geneticrelationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoidand other enteric fevers. Infect. Immun. 58:2262–2275.
50. Hoorfar J.; Baggesen DL. and Porting PH. (1999). A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. J. Microbiol. Meth. 35:77-84.
51. Nucera DM.; Maddox CW.; Hoiem-Dalen P. and Weigel RM. (2006). Comparison of API 20E and *invA* PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. J. Clin. Microbiol. 44:3388-3390.

Genotypic characterization of infectious bronchitis virus from clinically suspected broilers in Basrah, South of Iraq

Hazim T. Thwiny (1), Firas T. Mansour (1) and Harith A. Al-Taher (2)

(1) Dept. of Veterinary Microbiology and Parasitology (2) Dept. of Pathology and Poultry Diseases/
College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Republic of Iraq

E-mail: hazimthwiny@gmail.com

ABSTRACT

Infectious bronchitis virus (IBV) is a causative agent of an important respiratory disease (infectious bronchitis) that infects chickens. The disease is being controlled through immunization of birds using S1 subunit vaccine. However, such a vaccine has been no longer protected due to the occurrence of new variants. The aim of the present study was to detect and subtype the IBVs by reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Eight commercial broiler flocks were examined, located in the east (Shat Al Arab), west (Zubair) and north (Qurna) of Basrah city/ south of Iraq during the period from September 2014 to June 2015. The selected birds in all flocks were between 2 to 6 weeks of age and they all had respiratory signs. All birds in the farms were vaccinated against IBV during the first week of age. The birds were killed and samples were collected from the tissues of the kidneys and trachea to extract viral RNA. Specific universal primers XCE2- and XCE2+ for all IB virus serotypes were used in the first round of PCR to detect the virus. A type specific nested PCR was performed to identify the virus serotype using type specific oligonucleotide primers including the reverse primer MCE1+, DCE1+ and BCE1+ respectively specific for a hypervariable region in the S1 gens of serotypes Massachusetts, D274 and 4/91, and the forward primer XCE3- which is common for all three serotypes. The results showed that 7 out of 8 (87.5%) of the sampled flocks were positive to IBV by RT-PCR. The results of virus serotyping showed that the prevalence of Massachusetts serotype was about 71.4% (5 farms) and in two farms, unknown IBV serotypes were detected. These results suggest that vaccination against infectious bronchitis virus is no longer efficient because of the prevalence of different virus serotypes in Basrah city/ south of Iraq.

Keywords: primer XCE3, Infectious bronchitis virus (IBV), broilers

الملخص باللغة العربية

يعتبر فيروس التهاب القصبات المعدي (IBV) العامل المسبب لمرض التهاب القصبات المعدي الذي يصيب فروج اللحم. وعادة ما يتم السيطرة على المرض من خلال تحصين الطيور باستخدام لقاح وحيدات س1. مع ذلك فإن هذه اللقاحات لا تحمي الطيور من العنبر الجديدة. هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن فيروس التهاب القصبات المعدي وتحديد النوع بواسطة تقنية النسخ العكسي - لسلسلة تفاعلات البلمرة (RT-PCR). تم دراسة ثمانية حقول لفروج اللحم، تقع في الشرق (شط العرب)، الغرب (الزبير) والشمال (القرنة) من مدينة البصرة / جنوب العراق وذلك خلال الفترة من شهر أيلول / سبتمبر 2014 إلى شهر حزيران / يونيو 2015. كانت الطيور المنتقات في عمر 2-6 أسابيع، ومصابة بأعراض تنفسية. تم تلقيح جميع الطيور في الحقول ضد فيروس التهاب القصبات المعدي خلال الأسبوع الأول من العمر. بعد قتل الطيور تم جمع عينات من أنسجة الكلى والقصبة الهوائية لاستخلاص الحامض النووي الفيروسي. واستخدمت البادئات XCE2- و XCE2+ لجميع الأنماط المصلية لفيروس التهاب القصبات المعدي في الجولة الأولى من PCR للكشف عن الفيروس. ثم إجراء nested PCR لتحديد النمط المصلي للفيروس باستخدام بادئات خلفية محددة + MCE1، DCE1 + و BCE1 لتحديد الأنماط المصلية ماساتشوستس، D274 و 4/91، على التوالي، أما البادئ الأمامي XCE3- فهو لجميع الأنماط المصلية الثلاثة. وأظهرت النتائج أن 7 من أصل 8 (87.5%) من عينات الحقول كانت إيجابية لفيروس التهاب القصبات المعدي بواسطة RT-PCR. وأظهرت النتائج أن انتشار النوع المصلي ماساتشوستس Massachusetts بلغ نحو 71.4% (في 5 حقول)، وتم الكشف عن الأنماط المصلية مجهولة لفيروس التهاب القصبات المعدي في حقليين. وتشير هذه النتائج إلى أن التطعيم ضد فيروس التهاب القصبات المعدي لم يعد فعالاً بسبب انتشار فيروس بأنماط مصلية مختلفة في مدينة البصرة / جنوب العراق.

INTRODUCTION

Infectious bronchitis, which is commonly known as (IB) is a highly transmissible, febrile viral respiratory disease of chickens (1-3). The virus primarily infects the respiratory tract, kidneys and oviduct (4). The main clinical signs include tracheal rales, coughing and sneezing. In addition, other manifestations such as decline in egg production, enteritis, kidney damage, and occasionally pectoral myopathy may be observed (5). The disease is common worldwide and has significant economic consequences (6).

Infectious bronchitis virus which is referred as (IBV) is belonging to the genus *Coronavirus* of the family *Coronaviridae*. The virus is enveloped with a single stranded RNA of positive sense. The most conserved gene of the virus is responsible for coding the nucleocapsid protein, whilst the most variable gene is responsible for coding the spike 1 (S1) subunit of the spike protein (4). The S1 subunit is responsible for prompting neutralizing and serotype-specific antibodies. Mutations that may generate in this genome region may result in the emergence of new variants against which vaccines are no longer protective (7). Lots of genotypes and serotypes of the virus have been identified, and many more will surely be detected in the future. The occurrence and emergence of multiple serotype of the virus will complicate the control of the disease by vaccination (8). The emergence of new variants is associated with outbreaks in many countries (9-11). In Iraq, IB is considered an important viral disease of chickens. Although the vaccination is a good tool to protect from the disease, outbreaks occur frequently and the infection is not prevented by the existing vaccines, due to the serotype differences (12).

In our region, there is a high incidence of disease and is usually characterized by high morbidity and mortality. In addition, there is no report about the genotypes and the molecular detection of IBV in Iraq. Therefore, the aim of our study was to detect the IBVs by reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. PCR is fast and sensitive detection technique in comparison with the other traditional detection methods (13). Samples were collected from poultry farms to detect the viruses by two rounds of PCR run (single amplification by RT-PCR to detect IB viruses in general and nested-PCR to identify the virus serotype).

MATERIALS AND METHODS

Chicken flocks: history and samples

Eight commercial broiler (Cornish Cross) flocks, located in the east (Shat Al Arab), west (Zubair) and north (Qurna) of Basrah city/ south of Iraq were collected during the period from September 2014 to June 2015 and examined. Shat Al Arab and Al Qurna regions were included three farms each,

while in Al Zubair region, two farms were included. The age of birds in all flocks was 2–6 weeks. Each flock affected with respiratory disease as suspected IBV cases. Broiler flocks were showing moderate to severe signs of respiratory disease, a decrease in feed intake, and deaths (20% to 30%). Post-mortem examination revealed lesions of inflamed trachea, cheesy exudates and swelling of the kidneys. All birds in the farms were vaccinated against IBV during the first week after hatching, according to the supervisor of each farm. All flocks were contacted through specialist veterinarians and all owners were very pleased to participate in this study.

Five to ten diseased birds per farm were killed, and tissues of the trachea and kidneys were collected as organ-specific pools of birds after necropsy. All samples were placed in a sterile tube containing phosphate buffer saline (PBS) and they were moved to the microbiology lab at the college of Veterinary Medicine/ University of Basrah in cold conditions for analysis. The samples were homogenized in sterile PBS to prepare pooled samples; 20% (w/v) homogenates. They were then centrifuged at 5,000 x g for 20 min; and the supernatants were then collected to extract viral RNA.

Viral RNA extraction

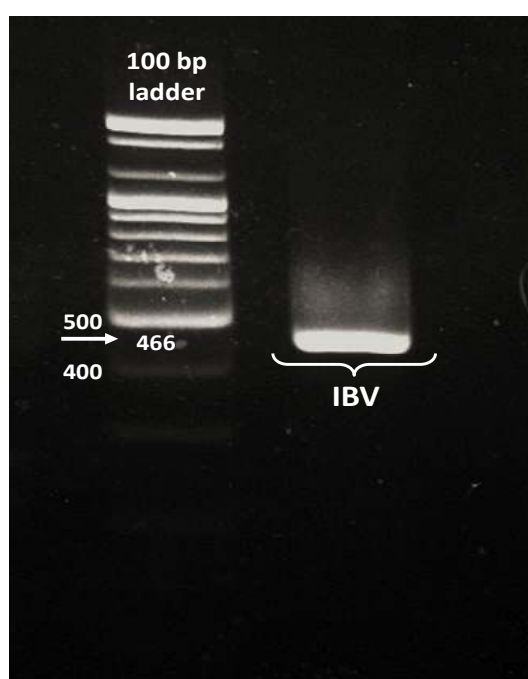
Two hundred micro liters of supernatants were used to extract viral RNA using a QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) following the manufacturer's manual. Viral RNA was stored at -70°C until analysis by RT-PCR.

Single gene amplification by RT-PCR

The PCR reaction was performed using universal primers XCE2- and XCE2+, which are specific to all IBV. Table (1) shows the primer sequences which were used in the reaction. The RT-PCR produces a 466-bp fragment (figure 1) specific to all IBV positive samples and does not differentiate between different strains. One-step RT-PCR was performed to amplify the target RNA (AccuPower RocketScript RT-PCR PreMix kit, Bioneer, South Korea), according to the manufacturer's protocol. The RT-PCR was carried out in a DNA thermocycler. Reverse transcriptase was carried out for 1 RT cycle at 42°C for 60 min, followed by initial denaturation at 94°C for 5 min, then 35 PCR cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension cycle at 72°C for 7 min (14).

Table (1): Oligonucleotide (primer) sequences used in the RT-PCR and nested PCR determine IBV and IBV serotypes (14)

Primer	Sequence (5'-3')	Amplification fragment (bp)
XCE2+	5'-CACTGGTAATTTTCAGATGG-3'	466
XCE2-	5'-CCTCTATAAACACCCTTGCA-3'	
XCE3-	5'-CAGATTGCTTACAACCACC-3'	
DCE1+	5'-TTCCAATTATATCAAACCAGC-3'	217
MCE1+	5'-AATACTACTTTTACGTTACAC-3'	295
BCE1+	5'-AGTAGTTTTGTGTATAAACCA-3'	154

**Figure (1): Results of RT-PCR in commercial broiler flocks affected by respiratory disease. The PCR products were separated using a 1.5% agarose gel pre-stained with ethidium bromide. Single band which represents the presence of IBV appeared clearly on the gel. A 100 bp ladder was also loaded on the gel to determine the size of the band.**

Agarose gel electrophoresis

The PCR products were electrophoresed using 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide and visualized by UV transilluminator. A DNA ladder of 100 bp was also loaded on the gel to estimate the size of the PCR product.

RESULTS

Detection of IBV

Single RT-PCR based on using universal primers specific to all IBV with 466 bp was carried out on tracheal and kidney samples of eight commercial broiler flocks affected with respiratory disease (figure 1). The results showed that 7 out of 8 (87.5%) of the sampled flocks were positive to IBV by RT-PCR. Four out of 7 positive, flocks gave positive results with trachea or kidney samples while three flocks, gave positive results with kidney samples only. Infectious bronchitis virus was identified in samples from all geographic regions (Table 2).

Table (2): Positive results of RT-PCR according to geographical distribution and animal organ

Flocks	Sample	RT PCR Result
Zubair 1	Trachea	Negative
	Kidney	Negative
Zubair 2	Trachea	Positive
	Kidney	Positive
Shat al Arab 1	Trachea	Negative
	Kidney	Positive
Shat al Arab 2	Trachea	Positive
	Kidney	Positive
Shat al Arab 3	Trachea	Positive
	Kidney	Positive
Qurna 1	Trachea	Positive
	Kidney	Positive
Qurna 2	Trachea	Positive
	Kidney	Positive
Qurna 3	Trachea	Negative
	Kidney	Positive

Nested amplification by PCR

A type specific PCR was performed to identify the virus serotype. For this purpose, a type specific nested PCR was employed. Oligonucleotide primers including the reverse primers MCE1+, DCE1+ and BCE1+ respectively specific for a hypervariable region in the S1 gens of serotypes Massachusetts, D274 and 4/91, and the forward primer XCE3- which is common for the three serotypes were used (14-16).

Results showed that the disease was identified from all geographic areas in Basra city. In general, the prevalence of the virus was slightly higher in kidney samples in comparison with trachea.

IBV typing

Specific nested PCR was performed on RT-PCR positive flocks. Massachusetts serotype was the specific serotype of infectious bronchitis virus in broiler flocks of Basrah. The 295 bp fragment, including a portion of the S1 gene of the Massachusetts serotype was amplified by PCR (figure 2). The prevalence of Massachusetts serotypes of IBV was about 71.4% (5 farms) and in two farms, unknown IBV serotypes (table 3).

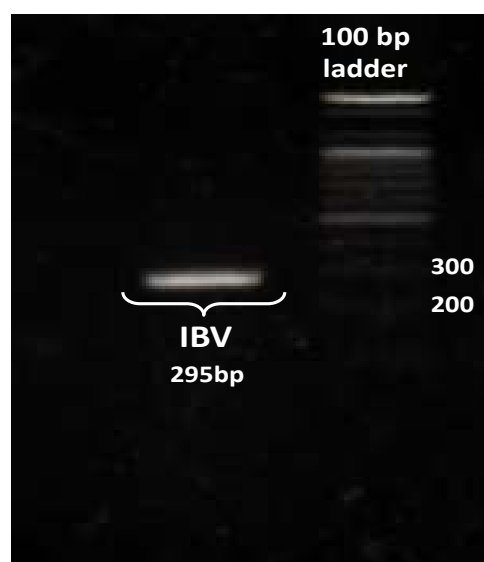


Figure (2): Nested PCR results in commercial broiler flocks affected by respiratory disease. The PCR products were separated using a 1.5% agarose gel pre-stained with ethidium bromide. Single band which represents the presence of Massachusetts serotype appeared clearly on the gel. A 100 bp ladder was also loaded on the gel to determine the size of the band.

Table (3): Stereotypes of IBV in Basrah city

Flocks	Serotypes
Zubair 2	Unknown IBV serotypes
Shat al Arab 1	Massachusetts
Shat al Arab 2	Massachusetts
Shat al Arab 3	Massachusetts
Qurna 1	Massachusetts
Qurna 2	Massachusetts
Qurna 3	Unknown IBV serotypes

The results showed that the dominant serotype of IBV in Basrah city was the Massachusetts. Unknown serotypes were in some chicken flocks.

DISCUSSION

In Basrah, poultry producers seek assistance for disease diagnosis through a limited network of poultry diagnostic laboratories. In general, the diagnosis of IBV infection is usually based on clinical signs and gross lesions and, likewise, other respiratory agents are excluded as the cause of the respiratory disease, based on clinical signs and gross lesions only. The clinical signs of the of respiratory diseases are generally similar, therefore, sensitive and specific detection and identification techniques are required. The most common methods to diagnose IB are based on virus isolation in embryonated hen's eggs, followed by immunological detection of the isolated viruses. This procedure is time consuming and quite expensive as it requires specific polyclonal or monoclonal antibodies for virus detection. The single RT-PCR based on S1 gene developed by Keeler (17) greatly improved the speed of the serotyping and diagnosis of IBV. In this study, we optimized PCR techniques to detect IBV which had been shown to be very efficient for the detection of IBV and for the identification of IBV types that also detected by others (18,19).

In the present study, 7 out of 8 (87.5%) broiler flocks were positive to IBV by RT-PCR confirming that infectious bronchitis is one of the main viral respiratory diseases of broilers in different geographic regions of Basrah, south of Iraq. Our study undoubtedly demonstrates that there is a relatively high prevalence of IB disease in commercial broiler flocks in Basrah. Poorbaghi *et al.* (20) found that IBV was detected in 72% of broilers suffering from respiratory signs. The failure of PCR to detect the IBV in samples taken from diseased broilers would be attributed to the chicken infected with another agent causes respiratory signs. Kidney samples are better than tracheal sample in term of the detection of IBV. The current virus strain has more affinity to replicate in kidney tissues, or the kidney tissues are softer than tracheal tissues, therefor the virus can be released more easily during sample homogenates.

This study was conducted to monitor the existence of serotypes of IBV which have been reported, in part, from the countries around Iraq. In commercial broilers in Basrah, five broiler flocks out of seven positive flocks to IBV were infected with Massachusetts serotype and the other two flocks were unknown IBV serotypes. The reason of the presence of unknown IBV serotype may be due to some variations and genetic changes that have occurred recently. Molecular analysis of IBV has shown that genetic variants of this virus can emerge, mainly as a result of a few alterations (insertions or deletions) or mutations in nucleotide sequences of the S1 gene which eventually might change the

amino acid sequence. The genetic variability in the S1 subunit of the envelope spike glycoprotein gene represents an adaptive mechanism of the virus to immune selective pressures associated with intensive IBV vaccination and other management practices (21,22).

Interestingly, a study had reported the identification and genotyping of IBV isolate in Kurdistan region of Iraq in symptomatic vaccinated broiler and found poor efficacy of vaccines used in this region, since vaccinated broilers were symptomatic and found positive by PCR. IBV was determined by RT-PCR in vaccinated broiler as results of studies conducted by (23, 24), and they suggested that flocks were naturally exposed to new variant strains of IBV, which is why the vaccines were not protected. This could be applied to the results of RT-PCR in vaccinated broilers in this study, where 7 flocks examined by RT-PCR were found positive to IBV although they were vaccinated. So virus isolated could be mutant of vaccine strain, or broiler flocks may be infected simultaneously with several type of IBV (18).

Future work suggests the isolation of IBV using the embryonated chicken eggs. In addition, virus serotyping through gene sequencing is so important to determine the current serotype in our region. This will have a fundamental role to adopt a suitable vaccination program, using the common field serotypes as vaccines, to protect against IBV caused disease.

REFERENCES

1. Cavanagh D.; Elus MM. and Cook JK. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26 (1):63-74.
2. Boltz DA.; Nakai M. and Bahra JM. (2004). Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 48 (4):909-915.
3. Williams AK.; Wang L.; Sneed LW. and Collisson EW. (1992). Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* 25(3):213-222.
4. Cavanagh D. and Naqi SA. (2003). Infectious bronchitis. In *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa: Iowa State Press. pp. 101-119.
5. Dhinakar RG. and Jones RC. (1996). Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 26 677-706.
6. Collison SA.; Jackwood MW. and Hilt DA. (2001). Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis.* 45: 492-499.
7. Moore KM.; Bennett JD.; Seal BS. and Jackwood MW. (1998). Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Gen.* 17: 63-83.
8. Saif YM.; Fadly AM.; Glisson JR.; McDougald LR.; Nolan LK. and Swayne DE. (2008). *Diseases of poultry*. 12th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp.:117-130.
9. Gough RE.; Randall CJ.; Dagless M.; Alexander DJ.; Cox WJ. and Pearson D. (1992). A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet. Rec.* 130: 493-494.
10. Gelb JJr.; Keeler CL.; Nix WA.; Rosenberger JK. and Cloud SS. (1997). Antigenic and S1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 41: 661-669.
11. Liu S. and Kong X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and nonvaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* 33: 321-327.
12. Wang CH.; Hsieh MC. and Chang PC. (1996). Isolation, pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. *Avian Dis.* 40: 620-625.
13. Zwaagstra KA.; vander Zeijst BA. and Kusters JG. (1992). Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J Clin. Microbiol.* 30:79-84.
14. Adzhar A.; Gough RE.; Haydon D.; Shaw K.; Britton P. and Cavanagh D. (1997). Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathol.* 26:625-640.
15. Nouri A.; Assasi K. and Seyfi-Abad SMR. (2003). Field study of infectious bronchitis virus in broiler using type-specific RT-PCR. *Arch. Razi Inst.* 55:1-10.
16. Roussan DA.; Totanji WS. and Khawaldeh GY. (2008). Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poult. Sci.* 87:661-664.
17. Keeler CLJr.; Reed KL.; Nix WA. and Gelb JJr. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42 (2):275-284.
18. Cavanagh D.; Mawditt K.; Britton P. and Naylor CJ. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593-605.
19. Handberg KJ.; Nielsen OL.; Pedersen MW. and Jorgensen PH. (1999). Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathol.* 28:327-335.
20. Poorbaghi SL.; Mohammadi A. and Asasi K. (2012). Molecular detection of avian infectious bronchitis virus serotypes from clinically suspected broiler chicken flocks in fars province of Iran. *Pakist. Vet. J.* 32(1): 93-96.

21. Gelb JJr.; Keeler CLJr.; Nix WA.; Rosenberger JK. and Cloud SS. (1997). Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 41:661–669.
22. Gelb JJr.; Wolff JB. and Moran CA. (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.* 35:82–87.
23. Roussan DA.; Haddad R. and Khawaldeh G. (2008). Molecular survey of avian respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. *Poult. Sci.* 87: 444-448.
24. Dergham AR.; Ghassan YK. and Ibrahim AS. (2009). Infectious bronchitis virus in jordanian chickens: Seroprevalence and detection. *Canad. Vet. J.* 50: 77-80.

Levels of ochratoxin A in chicken livers and meat at Sulaimani City markets

Hazhaow O. M. Murad

Dept. of Microbiology / College of Veterinary Medicine/ University of Sulaimani / Republic of Iraq

E –mail: Hazhaw.murad@univsul.edu.iq

ABSTRACT

The present study aimed to assess the levels of ochratoxin A in chicken carcasses and liver sold at Sulaimani markets. Sixty (60) samples of fresh chicken meat and livers were collected (30 samples of each). All the samples were inspected by using High Performance Liquid Chromatography- Ultra Violet (HPLC-UV). Out of 30 meat samples, 26 (86.66%) and 17 out of 30 liver samples (56.6%) had have measurable amount of the toxin, however, they were still under the international limits and had no hazards on consumer health. Yet, Iraq needs its own standards to be adopted at comparing the results.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography- Ultra Violet (HPLC-UV), chicken carcasses, ochratoxin A

الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم مستويات تواجد سموم أوكراتوكسين الفطرية في لحم وكبد الدجاج المباع في أسواق مدينة السليمانية في شمال العراق. تم جمع 60 عينة (30 ذبيحة و30 كبد) لهذا الغرض. وقد جرى فحصها باستخدام تقنية HPLC-UV. وبالرغم من أن النتائج بينت أنه من بين 30 عينة لحم، 26 منها وبنسبة (86.66 %) و 17 عينة كبد من أصل 30 وبنسبة (56.6%) كانت تحتوي على كميات محددة من السموم الفطرية، إلا أنها كانت أقل من الحدود الدولية المسموحة ولا تشكل خطراً على صحة المستهلك. ولكن ما زال العراق يحتاج إلى وضع حدود قياسية خاصة به لتبنيها واعتمادها عند المقارنة.

INTRODUCTION

The family of ochratoxins (OTA) consists of three members, A, B, and C that differ slightly from each other in their chemical structures. These differences, however, have marked effects on their respective toxic potentials (1). Ochratoxins of which ochratoxin A is the most prevalent, are secondary fungal metabolites of some toxigenic species of *Aspergillus* or *Penicillium* (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*). Ochratoxin A consists of a chlorinated dihydroisocoumarin moiety linked through a 7-carboxyl group by an amide bond to one molecule of L- β -phenylalanine (2). Ochratoxin A is the most abundant and hence the most commonly detected member but is also the most toxic of the three (1). It is a potent toxin affecting mainly the kidney. As in other mycotoxins, Ochratoxin A can contaminate a wide variety of foods as a result of fungal infection in crops, in the field during growth, at harvest, in storage and in shipment under environmental conditions especially when they are not properly dried. Ochratoxin A (OTA) may be present in a foodstuff even when the visible mould is not seen (3). Besides cereals and cereal products, OTA is also found in a range of other food commodities, including coffee, cocoa, wine, beer, pulses, spices, dried fruits, grape juice, pig kidney and other meat and meat products of non-ruminant animals exposed to feedstuffs contaminated with this mycotoxin. Ruminant animals such as cows and sheep are generally resistant to the effects of OTA due to hydrolysis to the non-toxic metabolites by protozoa in the stomachs before absorption into the blood. The International Agency for Research on Cancer had OTA in group 2B carcinogens (4). The contaminated animal feed is the major cause of exposure of these mycotoxins to animals and therefore ultimately to humans (5). Long-term exposure to OTA has been implicated in Balkan Endemic Nephropathy (BEN) and associated with urinary tract tumors because of rather high OTA levels detected in food samples and in blood or urine from affected persons (4,6). Furthermore, it is well established that contamination of poultry feeds with mycotoxins may induce sanitary disturbances and mortality among the birds and secondary contamination of the human consumer via poultry meat and giblets (7,8). The wide representations of OTA in food and feed have nephrotoxic, neurotoxic, mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppressive effects in humans and animals (9).

The European Food Safety Authority (EFSA) has carried out risk assessments on certain mycotoxins in animal feed that are considered to pose a potential risk to human or animal health: aflatoxin B₁, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, fumonisins and T-2 and HT-2. In each case, EFSA has published an opinion that provides an assessment of the potential risk to animal or human health. Each opinion has been used as a basis for the

current legislative controls on these mycotoxins. In Iraq, many researchers reported the presence of OTA producer fungus with different concentration of the toxin in finished poultry feed in the farms at different Iraqi cities (10-12), even more many other researchers studied the devastating effect of this toxin on broiler like (13,14).

Yet little is known about fungal and mycotoxin contamination of poultry feed in Kurdistan region governorate. During the last two or three decades, the production of mixed poultry feeds were significantly increased in parallel with the evolution of poultry industry in the country. Considering the above facts and very limited studies on the occurrence and incidence of the OTA in chicken meat at Sulaimani region, the present study is designed to investigate the level of this mycotoxin in chicken meat and liver and then to compare them with the international levels in order to display if we are far way from the standard levels, and it will be helpful to create awareness of the health hazards associated with this toxins.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Thirty meat samples were collected (both breast and thigh muscles mixed well then used), also thirty liver samples have been collected from different markets at Sulaimani city during the period (April to July 2015). The samples were stored in ice box during transportation and stored in plastic bags at 4°C, until the analysis. The Ochratoxin A from all the samples were determined and evaluated by using High Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet (HPLC-UV) which is considered as a corrective method (15). Three replicates had been used for each sample in order to obtain more corrective results, and the mean of them used for calculating the results.

Chemical materials

Ochratoxin A, crystalline material was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The procedure of (16) was used, the stock concentrated solution was prepared in toluene-acetic acid (99:1 v/v) at a final concentration of 1 µg/ml and kept under safe conditions, at -20°C and wrapped in aluminium foil to prevent the gradual break down of OTA breaks down under ultraviolet (UV) light. The toxin working solution was prepared by diluting the stock solution with toluene-acetic acid (99:1 v/v) to 0.8, 1 µg/ml. The actual concentration of toxin was calculated by fluorescence spectrophotometer set at 333 nm excitation and 440 nm emissions. After suitable dilutions in water-methanol-acetic acid (50:49:1 v/v/v), the working solution was used to

prepare the external calibration curve. All the reagents were HPLC grade and chemically pure.

Extraction procedure for ochratoxin A

The samples were extracted according to the method as described by (17), with few modifications, 15 g from the sample was blended (15 min) in 50 ml of acetonitrile-water (45:05, v/ v), using high speed blending and then the extract was filtered through filter paper. About 5 ml of the filtrate was mixed with 50 ml of phosphate buffer saline (PBS) and filtered through a glass microfiber. Ten ml of the filtrate was passed through immune affinity columns. The elute was evaporated until dryness at 40°C and residues were re-dissolved in 1 ml of mobile phase (acetonitrile-water- acetic acid) (47/51/2, v/v/v) for HPLC analysis. The flow rate of mobile phase was 1 ml/min while the excitation and emission wavelengths of fluorescence detector were set at 333 and 460 nm, respectively.

Chromatographic conditions (HPLC)

An aliquot of 50 µl meat extract samples and 50 µl liver samples were injected on an Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18, 50x4.6mm (1.8 µm) column on a (Shimadzu, 2010) HPLC system. The column oven temperature was set to 40°C. A gradient of eluent A: water + mM ammonium acetate and eluent B: methanol+5 mM ammonium acetate was used at a flow rate of 1 ml/min. Details of the gradient are recorded in table (1).

Table (1): The gradients of HPLC system

Step	Time (min)	A (%)	B (%)
0	0.0	80	20
1	1.0	80	20
2	5.5	10	90
3	7.0	10	90
4	8.0	80	20

A: water + mM ammonium acetate

B: methanol+5 mM ammonium acetate

Statistical analysis

All data were analyzed by using the General Linear Models procedure using (XLSTAT software, 1997) to study the effect of treatments (groups) according to one way of completely randomized design (CRD). Significant differences ($p \leq 0.005$) among the means of the treatments (groups) were determined by Duncan multiple range test (18).

RESULTS AND DISCUSSION

Mycotoxins, in general, are stable compounds, and OTA, in particular, is a moderately heat stable molecule that can survive at most food processing operations and, therefore, it appears in final and derived products (19).

Table (2) showed the means of ochratoxin levels in all tested meat samples, the total mean value of the meat samples was 1.982 ± 0.110 µg/kg, while in liver samples was 1.865 ± 0.204 µg/kg (table, 2), with evidence for the higher content in meat samples was 4.106 ± 0.058 µg/kg as in sample 4, where the lowest was 0.149 ± 0.149 µg/kg as in sample 29, while the means of OTA levels in liver samples, recorded the highest content was 8.699 ± 0.359 µg/kg as in sample 22, where sample 1 was completely free from it.

There were significant differences ($p < 0.005$) among all samples of both meat and liver as it could be seen in the table (2), which refers to different levels of the toxin residues in tested samples. This could be due to that the studied samples of liver and meat were collected from different markets at different times, and not from the same chicken or same locations.

Table(2): The means of ochratoxin A content in all tested meat and liver samples

Sample No.	OCT in meat samples (µg/kg)	OCT in liver samples (µg/kg)
1	2.402 ± 0.239 def	0.007 ± 0.007 l
2	1.947 ± 0.048 gh	0.042 ± 0.036 l
3	3.095 ± 0.056 b c	1.884 ± 0.074 g h
4	4.106 ± 0.058 a	0.087 ± 0.087 l
5	1.316 ± 0.167 i j	0.000 ± 0.000 l
6	2.523 ± 0.114 de	0.962 ± 0.045 ij
7	2.584 ± 0.026 d	2.269 ± 0.146 efg
8	2.096 ± 0.098 f g	0.203 ± 0.115 kl
9	2.505 ± 0.042 d e	0.232 ± 0.179 kl
10	2.182 ± 0.041 e f g	2.012 ± 0.016 fgh
11	2.307 ± 0.094 d e f g	4.702 ± 0.172 b
12	4.063 ± 0.087 a	1.055 ± 0.025 i
13	1.375 ± 0.063 i j	0.013 ± 0.013 l
14	2.187 ± 0.143 e f g	4.046 ± 0.046 cd
15	0.171 ± 0.116 l	1.602 ± 0.025 h
16	3.013 ± 0.094 c	0.231 ± 0.103 kl
17	2.941 ± 0.031 c	0.558 ± 0.073 jk
18	1.684 ± 0.052 h i	2.705 ± 0.401 e
19	3.010 ± 0.106 c	4.308 ± 0.160 bc
20	0.651 ± 0.326 k	2.033 ± 0.029 fgh
21	3.426 ± 0.048 b	0.629 ± 0.079 jk
22	1.383 ± 0.058 i j	8.699 ± 0.359 a
23	1.434 ± 0.034 i j	3.715 ± 0.058 d
24	1.166 ± 0.073 j	1.998 ± 0.015 fgh
25	1.556 ± 0.030 i	4.062 ± 0.067 cd
26	1.392 ± 0.008 i j	2.446 ± 0.081 ef
27	1.081 ± 0.078 j	2.333 ± 0.166 efg
28	1.403 ± 0.202 i j	0.380 ± 0.190 kl
29	0.149 ± 0.149 l	2.488 ± 0.048 e
30	0.317 ± 0.159 l	0.251 ± 0.251 kl
Mean ± SE	1.982 ± 0.110	1.865 ± 0.204
Measurable amount (%)	86.66	56.6

In spite of that, the total mean values of the toxin residue in chicken carcasses (table 2) was 1.982 ± 0.110 which was higher than total mean value in livers as it was 1.865 ± 0.204 . The detected levels of the toxin in the current study are in line with the

results reported by (17) when they analyzed four types of mycotoxins including OTA in 115 chicken meat and 80 eggs samples, collected from central areas of Punjab, Pakistan. The study was carried out using reverse phase HPLC, equipped with fluorescence detector. The results revealed that 41% samples of chicken and 35% sample of eggs were found contaminated with OTA, and maximum level 4.70 mg/kg was found in the liver part of chicken meat. However, the meat (wings, legs and chest) of domestic chicken have not shown any level of OTA contamination, and this point is disagree with the current study.

Indeed the OTA presence in chicken meat is due to their presence in poultry feed (5,20). So the presence of detected concentration of the toxin in the tested meat and livers referred to the presence in the chicken feed as it had been proven in a study done by (11), who found at inspection of forty five finished poultry feed samples, collected from different broilers, broiler breeders and layers farms in Nineveh governorate, Mosul/ Iraq, he found that, the concentrations of OTA recovered in 91.1% of the samples with mean concentration of 159.4 µg/kg and concentration of the toxin in the tested finished poultry feeds were ranged from 0-500 µg/kg. Also the previous results of OTA contamination of poultry finished feeds had been proved by (10).

Whereas (12) recorded the range of contamination chicken feed with mycotoxins in the markets of Najaf and Al-Qadisiya governorate/Iraq, by using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), when from a total of 200 poultry feeds samples, 50 samples inspected for the OTA, 32% were contaminated with it.

In table (2) of the present study 30 meat samples tested, measurable amounts of OTA were found in 26 tissue samples, which accounts for 86.66% of all samples, and of liver samples, measurable amounts of OTA were found in 17 samples, which account for 56.6% of all samples. These results were vary with results recorded by (21) who made a study to check the current status of OTA contamination of the Serbian pork and chicken meat in naturally exposed animals by inspecting a total of 540 samples of pigs blood, kidney, liver and chicken gizzard that were randomly selected from slaughtered pigs (n=90) and chicken (n=90) and analyzed for the presence of (OTA) by (HPLC-FL), their results showed that the majority of chickens' tissues samples, were not found to contain measurable amounts of OTA. Moreover, the OTA levels found in analyzed tissues were low in general. Because of the potential health hazards of mycotoxins for humans, threshold levels of OTA had been established worldwide. (22) had set 5 µg/kg as a maximum residue limit for OTA in cereals, cereal products and raisins. The European Commission has not yet set the maximum allowed and the maximum recommended levels for mycotoxins in meat or other animal products. However, some countries have enforced OTA MRLs (Maximum residue levels), for example

Denmark (of 10 mg/kg in pig kidney), Estonia (of 10 mg/kg in pig liver), Romania (of 5 mg/kg in pig kidney, liver and meat) and Slovakia (of 5 mg/kg in meat and milk). Other countries have developed guidelines for recommended maximum OTA levels, for example Italy (pig meat and derived products, 1 mg/kg) (23).

Unfortunately Iraq has no standards for mycotoxins residues limitation, nor for tolerant levels, that's, the results of this study depended on international standards for comparison, and the analyzed tissue samples in both chicken meat and livers did not pass the limit established by JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) as (10 ng/g) (9).

CONCLUSION

The results found in this study suggested that, in general, OTA contamination in chicken meat and liver obtained from different parts of Sualimani city were low, although there were measurable amounts of the toxin in tested samples, but they were under the limit determined by JECFA, and because of the hazards of this toxin on human health, more researches and studies are needed in order to determine the maximum residue limit standard for Iraq and Kurdistan region.

REFERENCES

1. Li S.; Marquardt RR.; Frohlich AA.; Vitti TG. and Crow G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145:82.
2. Bakker M. and Pieters MN. (2002). Risk assessment of ochratoxin A in the Netherlands. RIVM Report 388802025/2002, RIVM, Bilthoven. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/388802025.pdf>
3. CFSEH (Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department). (2006). Ochratoxin A in Food. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. Risk Assessment Studies Report No. 23.
4. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC, Lyon. P. 489.
5. Bryden WL. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173:134-158.
6. Castegnaro M.; Canadas D.; Vrabcheva T.; Petkova-Bocharova T.; Chernozemsky IN. and Pfohl-Leskowicz A. (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:519-529.

7. Pennington LJ. (1986). Mycotoxin: thin layer chromatography and densitometric determination of aflatoxins in mixed feeds containing citrus pulp. *JAOAC*. 69:690-696.
8. Naom RAF.(2007). Estimation of aflatoxin residues for some ruminant and poultry (Local and imported) livers in Mosul. Master thesis. University of Mosul. P. 94.
9. JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2001). Ochratoxin A, Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food; WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Geneva, Switzerland: WHO. P. 281.
10. Shareef AM. (2006). Natural contamination of some broiler's feed. *Iraqi J.Vet. Sci.* 20(1): 9-17.
11. Shareef AM. (2010). Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. *Iraqi J.Vet. Sci.* 24 (1):17-25.
12. Al- Saeedi TA. (2014). The Study of The contamination range in poultry feeds with Mycotoxins in Najaf and Al-Qadisiya. *Kufa J. Vet. Med. Sci.* 5 (1):1-5.
13. Jameel FA. (2011). Pathological effects of Ochratoxin A in brain, heart and lung of chicks. *Al-Anbar J. Vet. Sci.* 4(2):1999-6527.
14. Al-Nazzal AIA.; Yahyaa AI and Abood IA.(2012). Pathogenic effects of Ochratoxin-A in broilers. *Tikrit J. Agri. Sci.* 12 (2):139-142.
15. Herzallah SM. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.* 114: 1141-1146.
16. Martella R.; Monaci L.; Milillo MA.; Palmisano F. and Tantillo MG. (2006). Ochratoxin a determination in paired kidneys and muscle samples from swine slaughtered in southern Italy. *Food Contr.* 17(114):7-11.
17. Iqbal SZ.; Asi MR.; Jinap S. and Rshid U. (2014). Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. *Food Contr.* 35(1):223-226.
18. Steel RGD.; Torrie JH. and Dickey DA. (1996). Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 3rd ed. McGraw Hill Book Company Inc, New York, USA. pp. 334-381.
19. Bullerman LB. and Bianchini A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119:140-144.
20. EFSA (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. Adopted on 22 September 2004. *EFSA J.* 101:1–36.
21. Milićević DR.; Jovanović M.; Matekalo-Sverak V.; Radičević T.; Petrović MM. and Vuković D. (2012). Residue of ochratoxin A in chicken tissues-risk assessment. *Arch. Oncol.* 19(1-2):23-27.
22. FAO (Food and Agriculture Organization).(2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition Paper, FAO, Rome. Paper 81.
23. Duarte S. C.; Pena A. and Lino CM. (2010). Ochratoxin a in Portugal: a review to assess human exposure. *Toxins.* 2(6):1225-1249.

Preliminary study of chlamydiosis and toxaplamosis in goats in Basrah, Iraq

Israa A.W. M. Ali

Dept. of Internal and Preventive Medicine / College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Republic of Iraq

E-mail: ijst.jordan@yahoo.com

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the level of antibodies of *chlamydia abortus* and *toxoplasma gondii* in goats.

The study included 92 female local breed goats, 1-5 years old in different physiological status (30 with history of abortion, 17 pregnant and 45 non pregnant) during April and May 2015 in Basrah governorate/south of Iraq.

Five ml of blood samples were collected from jugular vein puncture for serological analysis using indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (indirect ELISA) test.

The results revealed that the seroprevalance of goats which have antibodies of *Chlamydia abortus* were 11.95% and 60.8% of *Toxoplasma gondii*.

The percentages were differed according to the physiological status. In aborted animals it was 16.66%, whereas in pregnant and non pregnant goats were 11.76% and 8.88% respectively, with no significant variation ($P \geq 0.05$).

The prevalence of *toxoplasma gondii* antibodies were 70%, 76.47% and 48.88% in aborted animals, pregnant and non pregnant respectively with significant variation ($P \leq 0.05$). The results also showed that the animals of 1-3 years old, which have antibodies for *chlamydia* were 63.63% and 76.78% for *toxoplasma*, and the animals of 3-5 years old were 36.36% and 23.21% for *chlamydia* and *toxoplasma* respectively.

The study concluded that the percentage of goats which have moderate infection with *chlamydia* (titer of antibodies) was 13.33% in aborted animal, and 5.88% of pregnant animals had high antibody titer, while the percentage of goats which had high level of antibody titer of *toxoplasma* was 40% in aborted animals and 35.29% and 26.66% in pregnant and non pregnant respectively.

Keywords: *chlamydia*, *toxoplasma gondii*, ELISA

المخلص باللغة العربية

سعت هذه الدراسة للكشف عن وجود الأجسام المضادة لكل من *Toxoplasma gondii* و *Chlamydia abortus* في الماعز، وشملت عينة الدراسة 92 من إناث الماعز المحلي، والتي تراوحت أعمارها بين 1-5 سنوات وبحالات فسلجية مختلفة (30 منها تعرضت لإجهاض في السابق، 17 منها حاملا، و 45 منها غير حامل) وذلك خلال شهري نيسان/ إبريل وأيار / مايو 2015، في مركز محافظة البصرة / جنوب العراق. تم سحب 5 مليلتر كعينات دم من الوريد الوداجي لغرض التشخيص المصلي باستخدام اختبار الاليزا الغير مباشر.

بينت نتائج الدراسة أن النسبة الكلية للماعز التي أظهرت أجساما مضادة للكلاميديا بلغت 11.95%، بينما كانت للتوكسوبلازما جونادي 60.8%، واختلفت النسبة باختلاف الحالة الفسلجية لدى الماعز، فقد كانت نسبة الحيوانات المجهضة التي بينت وجود الأجسام المضادة للكلاميديا 16.66%، بينما كانت 11.76% و 8.88% في الماعز الحوامل وغير الحامل على التوالي مع عدم وجود فرق معنوي ($P \geq 0.05$).

أما نسب الماعز التي ظهر لديها أجساما مضادة للتوكسوبلازما جونادي فقد بلغت 70% و 76.47% و 48.88% في الماعز المجهضة والحوامل وغير الحامل على التوالي مع وجود فرق معنوي ($P \leq 0.05$). كما بينت الدراسة أن الماعز التي تراوحت أعمارها بين 1-3 سنوات تحمل الأجسام المضادة للكلاميديا بنسبة 63.63%، بينما للتوكسوبلازما 76.78%، أما تلك التي تراوحت أعمارها فوق الثلاث سنوات إلى خمس سنوات فقد كانت نسبة الأجسام المضادة 36.36% و 23.21% للكلاميديا والتوكسوبلازما على التوالي.

كذلك بينت الدراسة أن نسبة الماعز التي أظهرت إصابة متوسطة الشدة بالكلاميديا (مستوى الأجسام المضادة) 13.33% في الماعز المجهضة، بينما 5.88% من الحيوانات الحوامل كانت تحمل أعلى مستوى من الأجسام المضادة للكلاميديا، بينما بلغت نسبة الماعز التي أظهرت أعلى مستوى للأجسام المضادة للتوكسوبلازما في المجموعة المجهضة سابقا 40% وفي المجموعة من الحوامل ومجموعة غير الحوامل 35.29% و 26.66% على التوالي.

INTRODUCTION

Diseases of goats that cause abortion and reproductive failure are usually accompanied with economic losses. Abortion may spread throughout the herd, many of these which causing abortion in goats are zoonotic potential (1).

Chlamyophilosis is a bacterial infection caused by *Chlamydophila abortus*, which is zoonotic pathogen that infects farm animals and has been implicated as a major cause of abortions in goats and sheep (2,3). Chlamydiosis is clinically characterized by abortion during the last months of pregnancy, stillbirths or premature births of weak offspring. Since abortions occur without previous clinical specific signs, some goats may develop persistent cough, arthritis and keratoconjunctivitis. In addition, experimental infections, slight vaginal discharge were observed the day before abortion on some goats (4). Retained placentas and metritis are not usual (5). After the abortion, goats may recover rapidly (6).

Toxoplasmosis is caused by the *Toxoplasma gondii*. It is another common cause of infectious abortion in all animals and humans. Does can become infected by ingesting food or water contaminated by feces. In pregnant does, *Toxoplasma gondii* can invade and multiply in the placenta and pass to the fetus, causing fetal death, fetal mummification, stillbirth, or the birth of weak kids. In some cases, the pregnancy can progress normally and the doe can give birth to a normal kid. Abortions from *Toxoplasma gondii* occur mainly in the last trimester of pregnancy and may occur in does of all ages and in successive pregnancies (7,8).

The aim of the present study was to investigate the prevalence of antibodies against *Chlamydophila abortus* and *Toxoplasma gondii* occurrence in Goats in Basrah, south of Iraq.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Blood samples were obtained from (92) Female local goats breeds of 1-5 years old between April and May 2015, from the centre of Basrah city / south of Iraq.

Samples were obtained from goats with different physiological status (30 animals have history of abortion, 17 Pregnant and 45 non-pregnant). The animals were most fed on trash.

Detection of antibodies by ELISA

Approximately 5ml of blood were obtained from jugular vein puncture, then centrifuged at 1500 r.p.m. for 5 minutes to isolate serum. The serum was then stored at -20 °C until further processing. Detection of antibodies against *Chlamydophila* and *Toxoplasma* sera were done by using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Life

technologies TM Bio-Tek instruments, Inc. ELX-800) according to manufacturer instruction. The indirect multispecies ELISA detects anti-MOMP (major outer membrane protein of *Chlamydophila*) antibodies in ruminant and *Toxoplasma gondii* P30 antigen, also the test explained the severity of infection incase of *Chlamydophila*, where the infection was not considered a severe if antibody titer is 25-35, moderate 35-60 and severe when antibodies titer 60-100 while for *Toxoplasma*. 20-30 is considered low severity, 30-100 and 100-200 considered moderate and more of those readings considered severe infection.

For each sample, S/P (sample/ positive) ratio: $S/P = (OD \text{ sample} - OD_{mNC}) / (OD \text{ PC} - OD_{mNC})$ for *Toxoplasmosis* were calculated, while for *Chlamydophila*, the S/P (sample/ positive) ratio: $S/P = (OD \text{ sample} - OD_{mNC}) / (OD_{mPC} - OD_{mNC})$.

The analysis of data was performed using the chi-square test (9).

RESULTS AND DISCUSSION

The overall seroprevalence levels of the infected animals with *Chlamydophila abortus* were 11.95%, while in those infected with *Toxoplasma gondii*, the level was 60.8%.

Seropositive samples according to physiological status of animals indicated that the proportion of *Chlamydophila abortus* in aborted goats were 16.66%, and in pregnant and non pregnant goats of 11.76% and 8.88% respectively, with no significant variation ($P \geq 0.05$) (table 1).

Table (1): Seroprevalance of *Chlamydophila abortus* and *Toxoplasma gondii* using ELISA test

Animal groups	Causes	
	<i>Chlamydophila abortus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Abortion N=30	5 (16.66 %)	21(70%)
Pregnant N=17	2 (11.76 %)	13 (76.47 %)
Non-pregnant N=45	4(8.88 %)	22(48.88 %)
Total N= 92	11(11.95%)	56(60.8%)

The present study also indicated that aborted goats, pregnant and non-pregnant gave seropositive of *Toxoplasma gondii* of 70%, 76.47% and 48.88% respectively with significant variation ($P \leq 0.05$).

Table (2) shows the seroprevalence of *Chlamydia abortus* and *Toxoplasma gondii* according to the age of goats. Results revealed that the seropositive of *Chlamydia abortus* was 7(63.63%) in 1-3 years old, and in 3-5 years the rate was 4(36.36%) with significant variation ($P \leq 0.05$), while in *Toxoplasma gondii*, animals of 1-3 years were 43 (76.78%) and in 3-5 years 13 (23.21%) with no significant variation ($P \geq 0.05$).

Table (2): seroprevalance of *Chlamydomphila abortus* and *Toxoplasma gondii* according to age group

Causes	1-3 years	3-5 years
<i>Chlamydomphila abortus</i>	7 (63.63%)	4 (36.36%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	43 (76.78%)	13 (23.21%)

Depending on the obtained results, abortion due to chlamydiosis and toxoplasmosis may vary according to animal population, feeding method, using of maternity pens, reproductive and health status of the animal and type of sample tested. In addition the susceptibility increases with pregnancy, and the presence of stray dogs and cats with goats that may feed on aborted material attributed in transmission of infection.

The occurrence of toxoplasmosis is related with presence of cats, which consider a final hosts and contaminate animal feed with sporulated oocytes of toxoplasma shed within their feces, as well as the role of climatic variation in *Toxoplasma* spread as the prevalence of toxoplasmosis is higher in warm, moist environment which attributed to the longer viability of *T. gondii* oocysts. It is well Known that Basrah city is hot and high relative humidity in most months of the year, and there is no vaccination program against chlamydia or toxoplasma used for animals.

Although other goats which have history of abortion and do not appear antibodies against *Chlamydomphila* or *toxoplasma*, they may be aborted from other causes of abortion.

The overall results of this study were differed from other studies conducted on *chlamydiosis* and *toxoplasmosis*, which showed that only 1(1.1%) of 89 were positive for *Cp. abortus* using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (10), and 21 (23.6%) positive for *T. gondii* agglutinins. Also in Nigeria (11), it was shown that the prevalence rate of *T. gondii* in goats were 4.8% and *Cp. psittaci* 3.6%.

Other studies (12, 13) showed that the most common and important causes of abortions were *Chlamydomphila abortus* infection, which accounted for 23% of all goat abortions and 17% respectively. In a study conducted by (14), results showed that the mean values of seroprevalence examination on goat chlamydiosis were (19.33%) in India, and (15) revealed that the significance of *C. p. abortus* was considered to be significant in causing abortion in 15 out of 72 (21%) goat submissions that tested positive identified by real-time PCR.

In China, the prevalence of *Chlamydomphila abortus* infection in goats was determined by indirect hemagglutination antibodies (16), and were detected in 21 (2.88%) serum samples. In a similar study conducted in Morocco, it was explained the average abortion rate of (10.26%) in does, when serological analyses revealed the presence of all abortive infections, in goats, 21 (91%) to chlamydiosis and 17 (74%) to toxoplasmosis (17).

Furthermore, (18) showed that abortion from *T. gondii* occurred mainly in the last trimester of pregnancy and may occur in does of all ages and in successive pregnancies. The diseases are most common in sexually mature animals and older animals infected but not aborted, and the variation in the disease occurrence could attribute to environmental conditions such as climate, type of feeding, grazing and watering and animal density.

The severity of infection according to antibodies titer of *Chlamydomphila abortus* and *Toxoplasma gondii* were shown in table (3). The study revealed that the percentage of does with history of abortion from *Chlamydia abortus* in low titer was 6.66% and 13.33% does in moderate, while in pregnant does only one 5.88% doe in moderate and high antibodies titer of *Chlamydia abortus*, where in non-pregnant, two does were with low and one with highly antibodies titers (4.44%) and (2.22%) respectively.

In addition, the levels of antibody titers of does with *Toxoplasma gondii* were 10% and 20% does in moderate and high titer of antibodies, and in pregnant does were 11.76%, 29.41 and 35.29% does in low, moderate and high antibodies titer respectively, while in non-pregnant the percentage of does which have moderate, and high titer of antibodies 1.77%, 26.66% against *Toxoplasma gondii*.

Table (3): The interpretation of result of *Chlamydia abortus* and *Toxoplasma gondii* among teste goats

Physiological status	<i>Chlamydia abortus</i>			<i>Toxoplasma gondii</i>		
	25-35 +	35-60 ++	60-100 +++	20-30 +	30-100 ++	100-200 +++
Abortion	2(6.66%)	4(13.33%)	-	3(10%)	6(20%)	12(40%)
Pregnant	-	1(5.88%)	1(5.88%)	2(11.76%)	5(29.41)	6(35.29%)
Non-pregnant	2 (4.44%)	-	1(2.22%)	-	8(17.77%)	12(26.66%)

This study showed that Chlamydiosis in animals specially in goats is important and there is no chlamydial vaccine for goats, since abortion due to *Cp. abortus* remained infected for years, if not for life, and shed the organism, as well as *Cp. abortus* is zoonotic, occasionally causing serious disease in pregnant women so it must tack more attention for public health. Even the current study revealed that goats have antibodies titer against toxoplasmosis higher than the *Chlamydiosis* and the treatment is of limited value. However, it is recommended to perform blood testing on all herds, at least to be able to make decisions on the basis of factual data. Also, any cats which have access to the area should also be tested. The blood work will provide with blood antibody titer less than 20 reading indicates that the animal has probably not been exposed to the disease. Any titer level above 100 indicates a probable active disease state. Readings in the low range would be indicative of exposure with immunity possibly sufficient to prevent appearance of disease.

REFERENCES

1. Ruminant Production Medicine and Management (Sheep and Goats). 3rd ed. Animal Health Publications, Brigham City, UT 84302. available at: <http://www.infovets.com>.
2. Sharma SP.; Baipoledi EK.; Nyange JF. and Tlagae L. (2003). Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats with history of reproductive disorders and the prevalence of *Toxoplasma* and Chlamydial antibodies. Onderstepoort. J. Vet. Res. 70(1):65-68.
3. Masala G.; Porcu R.; Daga C.; Denti S.; Canu G.; Patta C. and Tola S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J. Vet. Diagn. Invest. 19(1):96-98.
4. Rodolakis A.; Boullet C. and Souriau A. (1984). *Chlamydia psittaci* experimental abortion in goats. Am. J. Vet. Res. 45:2086-2089.
5. McCauley EH. and Tieken EL. (1968). *Psittacosis-lymphogranulo mavenereum* agent isolated during abortion epizootic in goats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 152:1758-1765.
6. Appleyard WT.; Aitken ID. and Anderson I. (1983). Outbreak of chlamydial abortion of sheep and goats. Vet. Rec. 113:63.
7. Dubey JP. (2009). Toxoplasmosis of animals and humans. CRC. Press. Inc. Boca Raton, New York. Pp:101-313.
8. Engeland IV.; Waldeland H.; Kindahl H.; Ropstad E. and Andresen O. (1996). Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. Vet. Parasitol. 67(1-2):61-74.
9. Preacher KJ. (2001). Digital interactive Chi-square test program. University of Kansas.
10. Borde G.; Lowhar G. and Adesiyun AA. (2006). *Toxoplasma gondii* and *Chlamydomphila abortus* in caprine abortions in Tobago: a sero-epidemiological study. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. 53(4):188-193.
11. Amin JD. and Silsmore AJ. (1993). Aserological survey of some *abortifacient* disease of sheep and goat in the Maiduguri area of Nigeria. Bullet. Animal Health Prod. In Africa. 41(2): 123-132.
12. Robert B. and Moeller Jr. (2001). Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991–1998). J. Vet. Diagn. Invest. 13:265–270.
13. Szeredi L.; Jánosi S.; Tenk M.; Tekes L.; Bozsó M.; Deim Z. and Molnár T. (2006). Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). Acta. Vet. Hung. 54(4):503-515.
14. Gupta RCS.; Malik BBP. and Sharma SVM. (2015.) Seroprevalence studies on animal chlamydiosis amongst ruminants in five states of India. Vet. World. 8(1):72-75.
15. Hazlett MJ.; McDowall R.; DeLay J.; Stalker M.; McEwen B.; van Dreumel T.; Spinato M.; Binnington B.; Slavic D.; Carman S. and Cai HY. (2013). A prospectivestudy of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydomphila abortus* infection concurrently with other major pathogens. J. Vet. Diagn. Invest. 25(3): 359-368.
16. HuiZhao G.; Shang CC.; Yan-Qing Z.; Gao M.; Fan GY.; Tian TT.; Yao YL.; Chen DK. and Zhu XQ. (2012). Seroprevalence of chlamydial infection in dairy goats in Shaanxi Province, Northwestern China. Afri. J. Biotechnol. 11(7): 1796-1799.
17. Benkirane AA.; Essamkaoui S.; El-Idrissi A.; Lucchese L. Alda N. (2015). A sero-survey of major infectious causes of abortion in small ruminants in Morocco. Vet. Ital. 51(1):25-30.
18. Donn A.; Jones GE.; Ruiiu A.; Ladu M.; Machell J. and Stancanelli A. (1997). Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: comparison of the complement fixation test and an enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen. Vet. Microbiol. 59(1):27-36.

قسم الدراسات والبحوث العربية

ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION

أثر تركيز المستخلص القلواني لدرنات البطاطس ومدة التجريع في التغيرات النسجية للأمعاء الدقيقة في ذكور الفئران البيضاء Albinus rats

ثامر خضير مرزة (1)، عدنان وحيد البديري (2)، رحيم عبد زيد العابدي (1)

(1) قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الكوفة (2) كلية الطب / جامعة القادسية / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: phdjamal@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

سعت هذه الدراسة إلى تقييم التغيرات النسجية للمستخلص القلواني لدرنات البطاطا ومدة التجريع في أنسجة الأمعاء الدقيقة في ذكور الفئران البيضاء، وجرى تنفيذ التجربة في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية العلوم بجامعة الكوفة، وتضمنت دراسة فعالية أربعة تراكيز من المستخلص القلواني (0 و 50 و 100 و 200 ملغم/كغم من وزن جسم الحيوان) وأربع فترات تجريع هي (أسبوع، أسبوعان، ثلاثة أسابيع، وأربعة أسابيع) وتم دراسة تداخلاتها في التأثيرات السمية لأنسجة الأمعاء الدقيقة. أظهرت النتائج تباينا واضحا بزيادة التركيز وزيادة فترة التجريع، وكانت أشد هذه التغيرات في الحيوانات المجرعة بتركيز 200 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أربعة أسابيع، حيث أظهر الفحص المجهرى في المقاطع النسجية في الأمعاء الدقيقة وجود تحفيز في الخلايا الكاسية وفرط في تنسج للطبقة المبطننة للأمعاء الدقيقة، مع ارتشاح خلايا التهابية وقصر وتوسع الزغابات، مع تنكس وتنخر فيها.

الكلمات المفتاحية: الأمعاء الدقيقة، مستخلص قلواني، درنات البطاطا، التغيرات النسجية

The effects of potato tuber alkaloid extract at different cocenterations and dosage periods on histological changes in spleen of male albinus rats

Thamer K. Merza (1), Adnan W. Al- Bideri (2) and Raheem A. Al- Abbdy (1)

(1) Dept. of Biology / College of Sciences / University of Kufa (2) College of Medicine / University of Al- Qadisiyah / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the bioactivity effects of potato tuber alkaloid extract at different cocenterations and dosage periods on histological changes in spleen of male albinus rats. The experiment was conducted at the laboratory of Biology Department in college of Sciences of University of Kufa. Potato tuber extract concentrations were four (0 , 50, 100 ,200 mg/ kg) and four dosage periods (one, two ,three, and four weeks).

Microscopic examination for the histological sections of small intestine revealed the presence of induced goblet cells and hyperplasia in mucosa layer with infiltration of inflammatory cells with shortening, expanded, degeneration and necroses in villi.

المقدمة

سابقة في العراق حول تأثير المركبات القلوانية وتأثيراتها السمية في أنسجة الأمعاء الدقيقة للفئران البيضاء، وهذا ما سعت إليه الدراسة الحالية.

المواد وطرق العمل

جمع عينات درنات البطاطس وتحضيرها

تم جمع عينات درنات البطاطس صنف Bintiji من السوق المحلية لمحافظة النجف، وتم تنظيفها من الأتربة والأوساخ جيداً باستعمال ماء الحنفية. ثم تم تقطيع الدرنا إلى شرائح رقيقة وجففت في الظل إلى أن تم التخلص من الجزء الأكبر من الماء، ثم استعمل الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 م لغرض التخلص من باقي الماء، وتم طحن الأجزاء الجافة باستعمال مطحنة كهربائية، وحفظت المادة المطحونة في أوعية محكمة الغلق لحين الاستعمال.

تحضير مستخلص الكحول الإيثيلي

لتحضير هذا المستخلص، وضع 20 غم من المادة الجافة المطحونة في أوعية ورقية، ثم وضعت في جهاز الاستخلاص وأضيف إليها 200 مل من الإيثانول 95% بحسب طريقة (13)، وجرى الاستخلاص بدرجة حرارة 50 م ولمدة 24 ساعة. بعد ذلك تم تركيز المستخلص بجهاز المبخر الدوار بدرجة 50 م ورشح باستعمال ورق ترشيح نوع Watman، ثم وضع في أوعية زجاجية نظيفة وجفف في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 45 م، وجمعت المادة الجافة ووضعت في أوعية زجاجية نظيفة ومعقمة وأحكمت الغلق ثم تم لفها بأوراق معدنية (السلفون) بعيداً عن الضوء وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

الكشف عن المركبات القلوانية Alkaloid test

تم الكشف عن المركبات القلوانية باستعمال كاشف Dragandroff وكاشف ماير Mayer's test وواكتر Wagner reagent وكاشف ماركس Marqus Reagent (13).

حيوانات التجربة

استعملت في هذه الدراسة الفئران البيضاء (Albinus rats) التي تم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لكلية الطب في جامعة الكوفة. نُقلت الحيوانات إلى البيت الحيواني في كلية العلوم في جامعة الكوفة ووضعت في أقفاص بلاستيكية بأبعاد (38 × 20 × 18) سم وفرشت أرضية الأقفاص بالشارية مع مراعاة تبديلها بين حين وآخر. أعطيت الحيوانات الماء والغذاء المعد بطريقة مخصصة لها والمكون من طحين 50% وبيروتين حيواني 15% وفول الصويا 6% ونخالة الطحين 25% ودهن نباتي 2% وحليب مجفف 2% ومعادن وفيتامينات وفقاً لطريقة (14).

أعطيت الحيوانات الجرعة عن طريق الفم باستعمال أنبوب معدني مغطى بأنبوب مطاطي معد لهذا الغرض، أما التراكيز المستعملة فقد تم حسابها وفقاً لمعادلة التخفيف بحسب طريقة (15).

تم تجهيز 80 فأراً ذكراً، إذ تم تقسيم الحيوانات حسب التركيز المعطى إلى أربع مجموعات رئيسية وهي (سيطرة، 50، 100، 200) ملغم / كغم من وزن الجسم، وكل مجموعة ضمت 20 حيوان، كما تم تقسيم هذه المجموعات الرئيسية إلى أربع مجموعات فرعية حسب مدة التجريع، إذ كان التجريع لمدة أسبوع، أسبوعين، ثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع، وفي كل مجموعة 5 حيوانات. حضرت التراكيز 50، 100، 200 ملغم / كغم من وزن الجسم حسب طريقة التخفيف السابقة الذكر وكذلك مجموعة السيطرة.

عند نهاية كل أسبوع من التجريع، تم تخدير كل فأر بعد قتله، وتشريحه ثم استصلت الأمعاء الدقيقة وغسلت بالمحلول الملحي ونشفت باستعمال ورق الترشيح وسجل وزنها باستعمال ميزان حساس نوع Sartorius، ثم وضعت في قناني حفظ تحتوي

تعرف المواد الكيميائية المنتجة بواسطة النباتات بمركبات الأيض الثانوية Secondary metabolites، ويعتقد بأن هذه المركبات قد نشأت وتطورت كآليات دفاعية ضد الحيوانات العاشبة أو كنواتج عمليات أيض وإخراج (1). تشمل هذه المواد مركبات الكبريت والدهون والفينولات والقلوانيات الكلايكوسيدات وغيرها، ويعتبر العديد منها من مركبات الإدمان الشائعة مثل الكوكايين والكافيين والنيكوتين والمورفين وأنواع أخرى من المركبات السامة ذات الأصول النباتية (2). وتجدر الإشارة إلى أن هناك الكثير من المواد الكيميائية السامة التي تتواجد في الأغذية الرئيسة للإنسان، ومنها قلوانيات السولانين والجاكونين الموجودة في درنات البطاطس حيث تعتبر مثل هذه القلوانيات من مثبطات إنزيم كولين استيراز CHE، وهي من المواد السامة والماسخة Teratogens، وعلى الرغم من التاريخ الطويل للإنسان الذي يبين اعتماده على الأغذية التي تحتوي على القلوانيات، إلا أن الدراسات المسحية والتجريبية على الإنسان والحيوان لم تحدد المستويات الآمنة من القلوانيات في الأغذية المتناولة ومنها قلوانيات البطاطس.

يعد Willimott من أوائل الباحثين الذين أشاروا إلى وجود حالات تسمم ناتجة من جراء تناول البطاطس، حيث بينت نتائج دراسته وجود 60 حالة تسمم جراء تناول البطاطس وحالة وفاة واحدة في لندن (3)، كما أشار أيضاً إلى أن التسمم ناتج بفعل المركب القلواني السولانين. وبنفس النتائج جاءت دراسة (4) التي أكدت أن كمية المركبات القلوانية الموجودة بصورة طبيعية في درنات البطاطس هي 9 ملجم لكل 100 من البطاطس الجافة ولكن هذه الكمية تصل إلى 50 ملجم في الساق لكل 100 جرام.

وقد بينت نتائج دراسة (5) أن الفترة الزمنية اللازمة لظهور الأعراض تصل إلى حوالي 4 ساعات من تناول البطاطس المقلية، تتمثل هذه الأعراض بالتقيؤ والإسهال، وقد يصاحبها ألم في البطن، وربما حرارة ولكنها تكون قليلة، وانخفاض في إيعازات الجهاز العصبي المركزي في حالات التسمم الحادة. من ناحية أخرى، أشارت نتائج دراسة (6) إلى أن الاستخدام الأمثل لمستخلص البطاطس عند الأطفال حديثي الولادة يقيهم من مرض الإسقربوط.

ذكرت دراسة كل من (7،8) أن المركبات القلوانية في البطاطس والأجناس الأخرى القريبة منها تسبب أنواعاً مختلفة من حالات التسمم للحيوان والإنسان والتي تتراوح ما بين اضطرابات القناة الهضمية البسيطة إلى التأثيرات الجينية، وتعتمد درجة السمية على عدة عوامل منها ظروف النمو والإضاءة والخزن، والجزء النباتي المبتلع وتركيز المركبات القلوانية في النبات (9).

أما تأثير المركبات القلوانية على الخلايا السرطانية فقد أشارت إليه دراسة (10)، حيث بينت نتائج هذه الدراسة قدرة المركبات القلوانية في البطاطس على تثبيط عدد من خطوط الخلايا السرطانية، مثل سرطان الكبد وسرطان الغدد اللمفاوية وسرطان المعدة وسرطان العقد اللمفاوية في الرقبة.

من التأثيرات البيولوجية الأخرى للمركبات القلوانية في البطاطس التأثيرات السمية، ترجع بالدرجة الأولى إلى وجود السولانين والجاكونين بشكل طبيعي في البطاطس (9)، كما أشار (11) إلى أن المركبات القلوانية المتواجدة في درنات البطاطس لها دور كبير في تخريب التركيب الأساسي لحاجز الخلايا الظهارية epithelial barrier integrity في الأمعاء الدقيقة، والذي يسبب نوعاً من التهابات يسمى التهاب باول Inflammatory Bowel disease (IBD)، كما أن المركبين القلوانيين (السولانين والجاكونين) لهما القابلية على النفاذ داخل الأغشية التي تحتوي في تركيبها على الكولسترول، وإن هذا النوع من الأمراض لا يحصل بصورة متساوية في جميع اللبائن، فالحيوانات التي تحتوي داخل أمعائها على الجين المسؤول عن إنتاج الإنترلوكين Interlukin 10 تكون أكثر حساسية للمركبات القلوانية من غيرها (12).

وفي العراق، يعتمد السواد الأعظم من السكان على تناول البطاطس كغذاء رئيس للأصناف المستزرعة أو المستوردة التي تتعرض لعوامل زيادة نسبة المركبات القلوية فيها، مما يسبب حالات تسمم غير مشخصة لحد الآن، إذ لم يوجد أية دراسات

محلول الفورمالين 10% لغرض تهيئتها لعمل المقاطع النسجية والفحص المجهرى الضوئي (16).

تحضير المقاطع النسجية

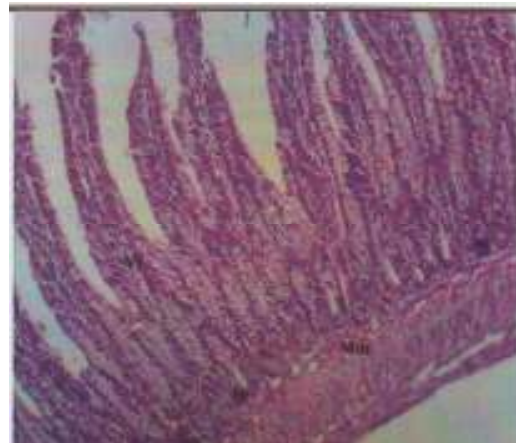
اتبعت طريقة (17) لغرض تحضير المقاطع النسجية للأمعاء الدقيقة.

التحليل الإحصائي

تم استعمال عاملين في هذه التجربة، العامل الأول كان تركيز المركب القلواني (0 ، 50 ، 100 ، 200 ملغم/كغم من وزن الجسم) والثاني مدة التجريب (أسبوع، أسبوعان، ثلاثة أسابيع، وأربعة أسابيع) بتصميم تام التعشيشية Complete randomized design ، واستعمل اختبار دنكن لبيان معنوية الفروق Duncan multiple Range test (18) وذلك بتطبيق البرنامج الإحصائي SPSS.

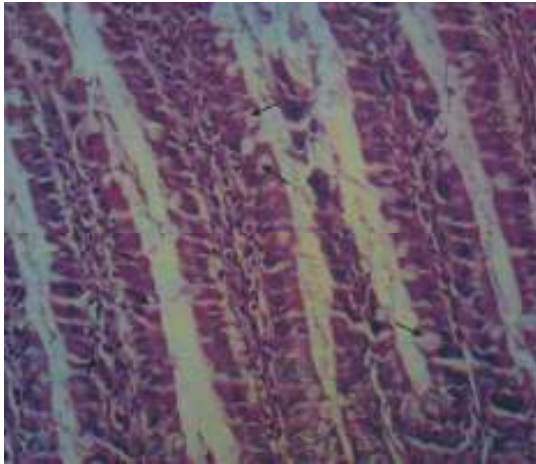
النتائج

أظهر الفحص النسيجي للمقاطع المأخوذة من الأمعاء الدقيقة في حيوانات السيطرة ولجميع المدة (أسبوع ، أسبوعين ، ثلاثة أسابيع ، أربعة أسابيع) أنها تتكون من أربع طبقات رئيسية من الداخل إلى الخارج هي الطبقة المخاطية Mucosa والطبقة تحت المخاطية Sub mucosa والطبقة العضلية الخارجية Muscularis (Me) والطبقة المصلية Serosa. احتوت الطبقة المخاطية على العديد من التراكيب كالزغابات Villi (Vi) والغدد المعوية أو خبايا ليبركن Crypts of Lieberkuhn ، فضلا عن وجود الطبقة العضلية المخاطية Muscularis mucosae ، وتوضح صورة رقم (1) التركيب الطبيعي للأمعاء في حيوانات هذه المجموعة، أما في المجموعات المعاملة بجرع مختلفة من المستخلص القلواني لدرنات البطاطس فقد أظهرت المقاطع النسجية المفحوصة تباينا واضحا في مستوى تأثير المستخلص القلواني سواء كان ذلك من جراء تأثير جرعة المادة (50 ، 100 ، 200) ملغم/كغم من وزن الجسم أو من تأثير مدة التجريب ضمن الجرعة الواحدة ابتداء من أسبوع واحد إلى أربعة أسابيع.

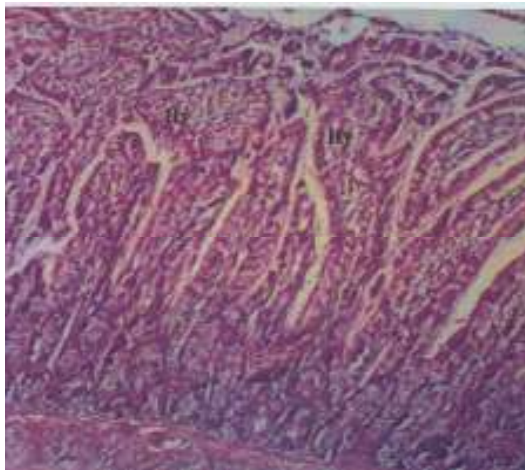


صورة رقم (1): مقطع من أمعاء الفئران من مجموعة السيطرة تظهر فيه الزغابات (vi) والغدد المعوية (Ig)، والطبقة العضلية المخاطية (Mm) بشكل طبيعي (40 x)

لوحظ في مجموعة الحيوانات المعاملة بالجرعة 50 ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوع واحد وجود تحفيز بسيط في الخلايا الكاسية، أما الزغابات فقد ظهرت بشكل طبيعي (صورة رقم 2)، وفي مجموعة الحيوانات المعاملة بالجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوعين تبين وجود فرط تنسج في الطبقة المخاطية للأمعاء (صورة رقم 3)، أما في المجموعة الثالثة والمجربة لمدة ثلاثة أسابيع، فقد أصبحت التغيرات المرضية أكثر شدة، إذ لوحظ وجود توسع في الزغابات مع ارتشاح خلايا التهابية وحيدة النواة في الصفيحة الأصلية وكذلك الزغابة (صورة رقم 4)، وفي المجموعة الأخيرة والمجربة لمدة أربعة أسابيع تبدو التغيرات المرضية أكثر وضوحا، فقد ظهر تنسج في الزغابات والخلايا الكاسية مع قصر وتوسع في الزغابات وارتشاح خلايا التهابية في الزغابات والمناطق البينية (صورة رقم 5).

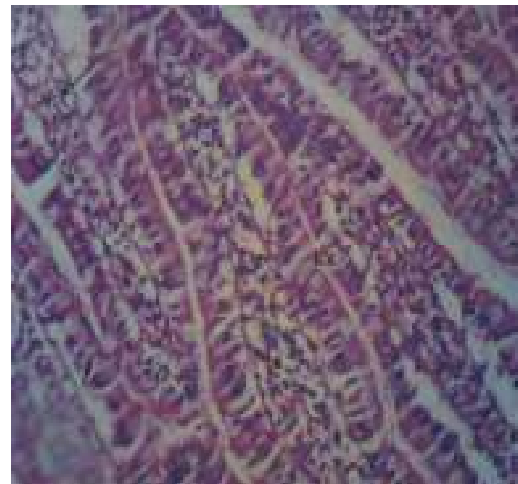
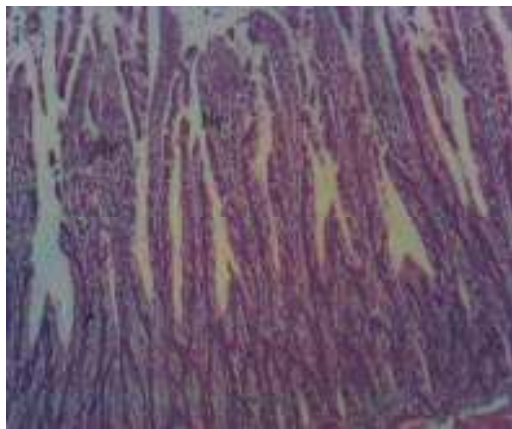


صورة رقم (2): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوع يظهر فيه تحفيز للخلايا الكاسية مع شكل طبيعي للزغابات (100x)



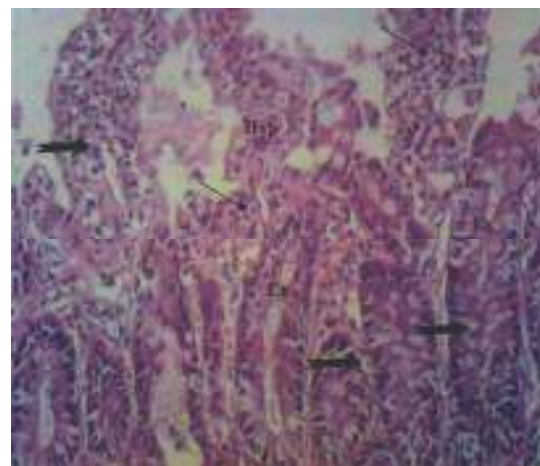
صورة رقم (3): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوعين يظهر فيه فرط تنسج Hy في الطبقة المخاطية للأمعاء (40x).

تبين من خلال المقاطع النسجية للحيوانات المجرعة بالجرعة 200 ملغم/كغم من وزن الجسم ، أن هذه الجرعة أكثر تأثيراً من بقية الجرعات الأخرى في أنسجة الأمعاء ولمختلف فترات التجريع، إذ لوحظ في المقاطع النسجية للأمعاء الدقيقة للحيوانات المجرعة لمدة أسبوع واحد توسع في الزغابات مع ارتشاح خلايا التهابية داخل الزغابة كما في صورة رقم (10)، وفي الحيوانات المجرعة لمدة أسبوعين لمستخلص القلوونات لوحظ وجود فرط تنسج في الزغابات والغدد المعوية كما يظهر في صورة رقم (11)، أما في الحيوانات المجرعة لمدة ثلاثة أسابيع فقد لوحظ أن هناك زيادة في فرط تنسج في الزغابات ومنطقة الغدد المعوية مع ارتشاح خلايا التهابية (صورة رقم 12) ، أما المجموعة الأخيرة من الحيوانات التي جرعت بجرعة 200 ملغم/كغم لمدة أربعة أسابيع فقد لوحظ وجود ضمور Atrophy (At) في الزغابات وارتشاح خلايا التهابية في النسيج المبطن للأمعاء مع وجود تنخر في الخلايا المبطن للزغابات (صورة رقم 13).

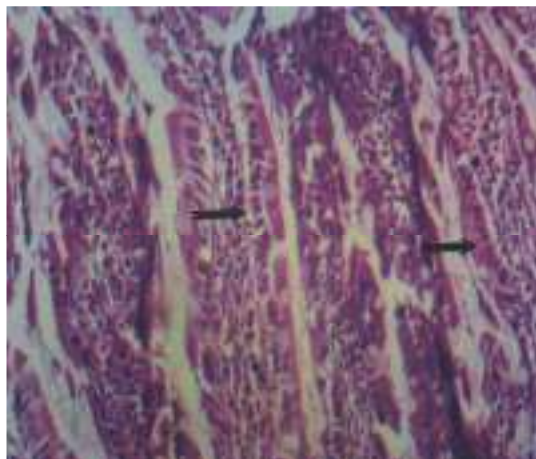


صورة رقم (4): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة ثلاثة أسابيع يظهر فيه توسع في الزغابات Ex مع ارتشاح خلايا التهابية داخل الزغابة (100x) →

صورة رقم (6): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 100 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوع يظهر فيه الزغابات أقرب إلى الشكل الطبيعي مع وجود فرط تنسج (Hyp) في النسيج الظهاري المبطن لقمة الزغابة (40x)

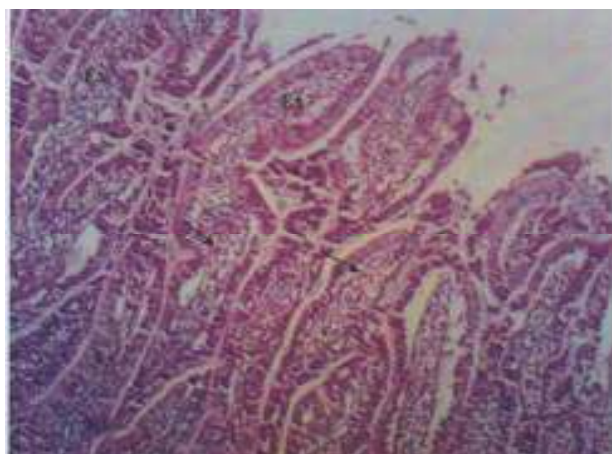


صورة رقم (5): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أربعة أسابيع يظهر فيه تنسج في الزغابات والخلايا الكاسية → مع قصر At وتوسع في الزغابات Ex وارتشاح خلايا التهابية (100 x) →

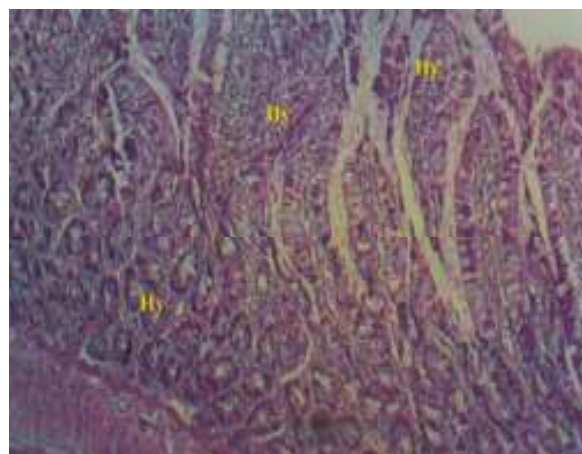


صورة رقم (7): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 100 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوع يظهر فيه تنسج في الزغابات المعوية مع ارتشاح للخلايا الالتهابية → أحادية النواة داخل الزغابات والمسافات بين الزغابات (100x)

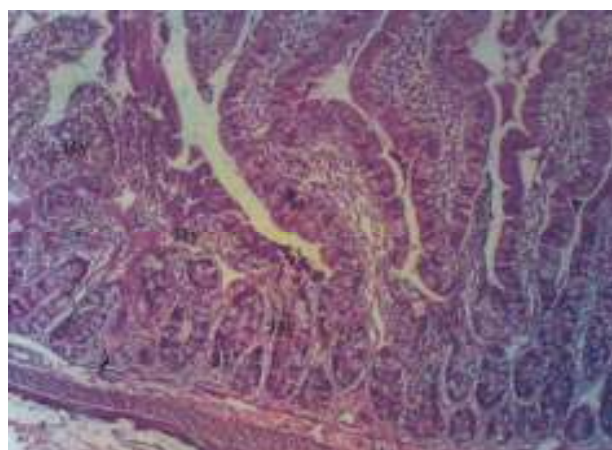
أظهرت المقاطع النسجية في الدراسة الحالية وجود تباين واضح في التغيرات النسجية المرضية للأمعاء الدقيقة المعرضة لجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدد مختلفة من أسبوع واحد ولأربعة أسابيع إذ لوحظ في مجموعة الحيوانات المجرعة لمدة أسبوع واحد وجود فرط تنسج (Hy) في النسيج الظهاري المبطن لقمة الزغابات ، أما شكل الزغابات فيبدو بشكل مقرب إلى الطبيعي (صورة رقم 6) ، أما في مجموعة الحيوانات المجرعة لمدة أسبوعين يظهر فيها تنكس في الزغابات المعوية مع ارتشاح خلايا التهابية في الزغابات وفي المساحات بين الزغابات كما يبدو في صورة رقم (7) ، أما في مجموعة الحيوانات المجرعة لمدة ثلاثة أسابيع فتبدو التغيرات أكثر تطوراً، إذ تبين من الصورة رقم (8) وجود فرط تنسج في الزغابات والغدد المعوية Intestinal glands ، أما في مجموعة الحيوانات المجرعة لمدة أربعة أسابيع، فقد كانت التغيرات النسجية أكثر شدة، إذ أصبح هناك توسع (Ex) وقصر Atrophy (At) شديد في الزغابات مع وجود التنسج وارتشاح خلايا التهابية في الزغابات والمسافات البينية بين الزغابات كما توضح ذلك صورة رقم (9).



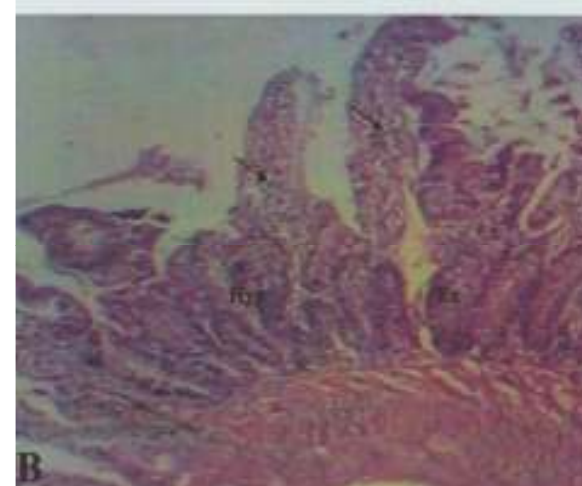
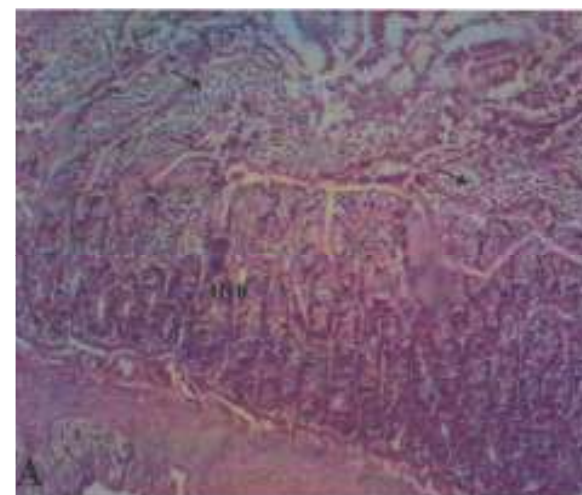
صورة رقم (10): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 200 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوع يظهر فيه توسع في الزغابات (Ex) مع ارتشاح خلايا التهابية (100x) →



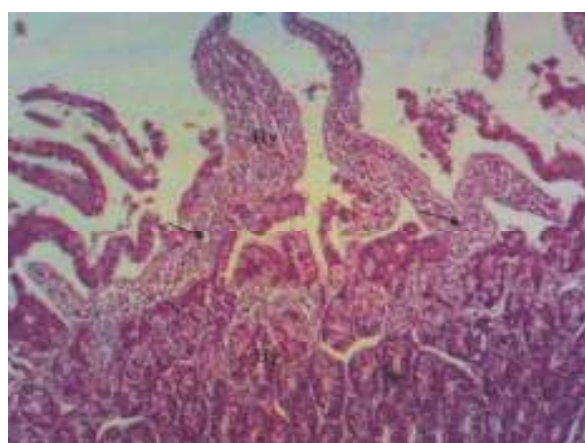
صورة رقم (8): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 100 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة ثلاثة أسابيع يظهر فيه تنسج (Hyp) في الزغابات والغدد المعوية (40x)



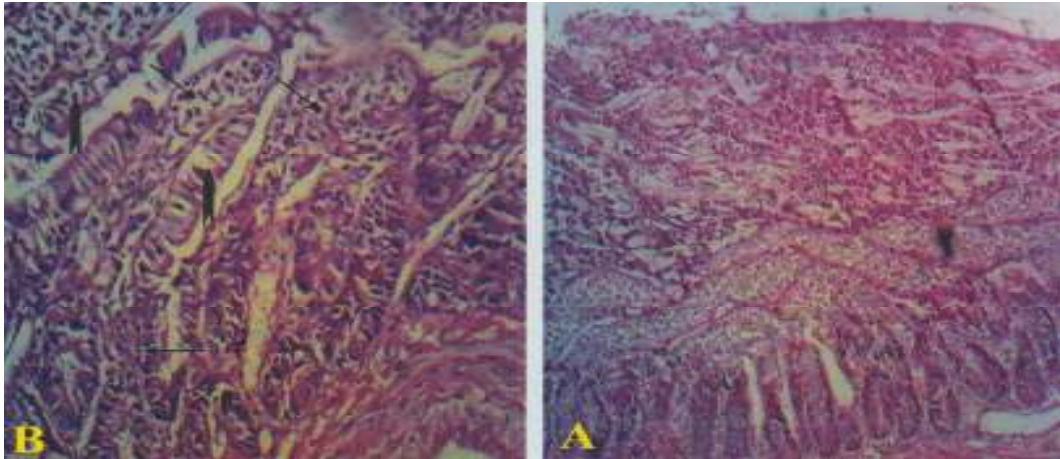
صورة رقم (11): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 200 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أسبوعين يظهر فيه فرط تنسج في الغدد المعوية والطبقة المخاطية (100x)



صورة رقم (9-A، 9-B): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 100 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أربعة أسابيع يظهر فيه وجود توسع في عرض الزغابات (Ex) وفرط تنسج (Hyp) مع ارتشاح خلايا التهابية (100x) →



صورة رقم (12): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 200 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة ثلاثة أسابيع يظهر فيه فرط تنسج في الغدد المعوية والطبقة المخاطية وارتشاح خلايا التهابية (100x) →



صورة رقم (A-13, B-13): مقطع من أمعاء الفئران المعاملة بجرعة 200 ملغم / كغم من وزن الجسم ولمدة أربعة أسابيع يظهر فيه ضمور في الزغابات (At) وتلف وتخر في الخلايا المعوية وارتشاح خلايا التهابية →
(A:40x ,B:100x)

المصادر

1. Pia HJ. (2008). Analysis and fate of toxic Glycoalkaloid from *Solanum tuberosum* in the terrestrial environment. Ph.D. Thesis. Faculty of life Sciences, University of Copenhagen.
2. محمد ، عبد الله إبراهيم . (2002) . علم السموم (أسس ومفاهيم) . قسم الحيوان - كلية العلوم - جامعة قار يونس، بنغازي . ليبيا.
3. Willimott SG. (1933). An investigation of Solanine poisoning. Anal. 58: 431-439.
4. Mutch N. (1937). Medicinal kaolin in food poisoning. A critical survey. Brit. Med. J. 595-601.
5. McMillan M. and Thompson JC. (1979). An outbreak of suspected Solanine poisoning in schoolboys: examination of criteria of Solanine poisoning. Quart. J. Med. XL(VIII): 227-243.
6. Henry PW. (1933). *Solanum tuberosum*. Canad. Med. Assoc. J. 236-240.
7. Gaffield W. and Keller RF. (1996). Induction of terata in hamsters by solanidine alkaloids derived from *Solanum tuberosum*. Chem. Res. Toxicol . 9(2):426-433.
8. Chaube S. and Swinyard CA.(1976). Teratological and toxicological studies of alkaloid and phenolics compound from *Solanum tuberosum*. J. Toxicol. Appl. Pharmacol. 36:227-237.
9. Phillips BJ.; Hughes JA.; Phillips JC.; Water DC.; Anderson D. and Tahourdin CSM. (1996). A study of the toxic hazard that might be associated with consumption of green potato tops. Food Chem. Toxicol. 34(5): 439-448.
10. Friedman M.; Lee KR.; Kim HJ.; Lee IS. and Kozukue N.(2005). Anticarcinogenic affects of glycoalkaloids from potatoes against humen cervical, liver, lymphome, and stomach cancer cells. J. Agric. Food Chem. 53 : 6162-6169.

المناقشة

يعود سبب التغيرات التي تحصل في جدار الأمعاء الدقيقة إلى قابلية قلوانيات البطاطس على الاتحاد مع مكونات الغشاء البلازمي للخلايا الظهارية المبطنه للأمعاء، إذ إن لها الألفة للاتحاد مع مركب الكولسترول حيث ترتبط قلوانيات البطاطس (السولانين والجاكونين) مع الأغشية التي تحتوي على مركب الكولسترول مما يؤدي إلى حدوث انبعاجات في الأغشية المخاطية لعدم انتظام التركيب النسجي بين المناطق المختلفة للطبقة المخاطية، محدثة تغيراً في نفاذية الأغشية البلازمية ومن ثم تمزقها، ويعتمد حجم تدمير الأغشية على المحتوى الكيميائي للغشاء من مركب الكولسترول (12)، ومن جانب آخر أشارت دراسة (11) إلى أن القلوانيات المتواجدة في درنات البطاطس لها القابلية على زيادة نضوحية الأغشية المزروعة خارج الجسم الحي من خلال تأثيرها على نضوحية أغشية الأمعاء الدقيقة عند الفئران التي لا تحتوي على الجين المسؤول عن صناعة IL-10 (Intelukien 10). إن التغيرات في أنسجة الأمعاء التي تم وصفها في الدراسة الحالية مشابهة للتغيرات الناتجة من الإصابة بمرض وبيلز Whipple's disease الناتج من استعمال الأدوية واسعة الطيف، أو نتيجة لوجود سموم البكتيريا مثل سموم السالمونيلا *Salmonella* spp. إذ يتصف هذا المرض بقصر وسمك الزغابات وتضخم الخلايا البلعمية Macrophage (19).

ويؤدي وجود التغيرات في أنسجة الأمعاء إلى ضعف امتصاص القلوانيات وبالتالي انخفاض تركيزها في الدم أو الأنسجة الأخرى، وهذا ما يعلل الفرق في جرعة LD₅₀ المعطاة عن طريق الغشاء البريتوني البالغة 3.6 ملغم/كغم من وزن الحيوان، مقارنة مع الجرعة المعطاة عن طريق الفم البالغة 575 ملغم/كغم من وزن الحيوان، كما يفسر السمية المتوسطة أو الضعيفة لهذه القلوانيات. إن النقطة الجديرة بالاهتمام هي أن التغيرات في أنسجة الأمعاء الدقيقة قد انعكست على بعض المعايير الفسلجية في هذه التجربة مثل انخفاض وزن الحيوان بسبب عدم قابلية الأمعاء على امتصاص المواد الغذائية (20)، وزيادة وزن الكبد والكلية والطحال (21)، وزيادة وزن الكبد وانزيماته (22).

11. Bijal P.; Ropert S.; Jason D.; Lawrence J. and Richard NF. (2002). Potato glycoalkaloids adversely affect intestinal permeability and aggravate. Inflammatory Bowel Disease. Crohn's and Colitis foundation of America Inc. pp.:340-346.
12. Keukens EA.; DeVrige T. and Vande BC. (1995). Molecular basic of glycoalkaloid induced membrane distribution. Biomem. Biochem. Biophys. Acta. 1240: 216-228.
13. Harborne JB. (1984). Physiochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. Chapman and Hall. London, New York. P.:288.
14. Al-Fartosi KK. (2004). Physiological studies of the effects of benzene in laboratory mice and humans. Ph.D. Thesis. College of Education, University of Basrah.
15. محمود ، رنا إبراهيم. (2008). تأثير المستخلص الكحولي لبذور الحلبة في الكبد والكلية ومستوى هرمون البرولاكتين والهرمون اللوتيني في ذكور الأرانب . رسالة ماجستير . كلية العلوم ، جامعة بغداد.
16. Raju K.; Anbugapathi G.; Gokulakri SV.; Rajkapoor B.; Jayaker B. and Manian S. (2003). Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* L. Against CCL4 induced hepatic damage in rats. Biol. Pharm. Bull. 26(11):1618-1619.
17. Bancroft JD. and Steven A. (1982). Theory and practice of histology techniques. Churchill Living Ston, New York. P. 1109.
18. الراوي، خاشع محمود، خلف الله ، عبد العزيز محمد. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر : جامعة الموصل.
19. David AL.; Robin R.; Alastair DB.; David JH. and Stewart F. (2008). Muir's Textbook of pathology. 14th ed. Hodder Arnold. London, Great Britain.
20. العبادي، رحيم عبد زيد. (2010). تأثير مستخلص المركبات القلوانية الخام لدرنات البطاطا *Solanum tuberosum* في أنسجة الأعضاء الحيوية وبعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية في ذكور الجرذان البيض Albinus Rats . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة.
21. مرزة، ثامر خضير، البديري، عدنان وحيد، العبادي، رحيم عبد زيد. (2015). تأثير تركيز المستخلص القلواني لدرنات البطاطس ومدة التجريع في أوزان بعض أعضاء الفئران البيض Ablinus rats . قيد النشر بعد قبوله في المجلة العلمية لجامعة كربلاء.
22. البديري، عدنان وحيد، العبادي، رحيم عبد زيد، مرزة، ثامر خضير. (2015). تأثير تركيز المستخلص القلواني لدرنات البطاطا ومدة التجريع في وزن الكبد وأنزيماته في الفئران البيض Albinus rats. قيد النشر بعد قبوله في مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة.

تأثير استخدام طحين الرز ومستخلص الجرجير الكحولي كغذاء على نمو ديدان الأرض الجنس

Lumbricus sp.

ناديا عماد الأمين، لقاء علي جازع، زهراء هادي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: nbio79@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

سعت الدراسة إلى تحديد تأثير كل من طحين الرز ومستخلص الجرجير الكحولي كغذاء لديدان الأرض الجنس *Lumbricus* sp. ، وقد أظهرت النتائج أن أعلى معدلات للطول قد سجلت باستخدام طحين الرز للديدان الصغيرة وقد بلغت (12.96) سم بعد 14 يوماً، و (17.02) سم للديدان البالغة بعد 21 يوماً، وسجل مستخلص الجرجير معدلات طول بلغت (8.05) و (14.29) سم للديدان الصغيرة والبالغة على التوالي بعد 21 يوماً، وسجلت أقل معدلات للطول باستخدام خليط من طحين الرز ومستخلص الجرجير في معاملة السيطرة، كما سجل طحين الرز أعلى معدلات للوزن بلغت (0.250) و (1.73) غم لكل من الديدان الصغيرة والبالغة على التوالي بعد 21 يوماً، ثم مستخلص الجرجير الذي سجل (0.343) غم بعد 21 يوماً للديدان الصغيرة، بينما تناقص وزن الديدان البالغة مقارنة بالوزن قبل التجربة، ولم يسجل الخليط زيادة بالوزن، وبلغ معدل الوزن في معاملات السيطرة (4.00) غم للديدان البالغة وبدأ بالتناقص بعد 21 يوماً.

الكلمات المفتاحية: ديدان الأرض، *Lumbricus*، *Eruca sativa*، طحين الأرزThe effects of using rice powder and *eruca sativa* alcoholic extract as food on growth of earthworms genus :*Lumbricus* sp.

Nadia I. Al- Ameen, Liqaa A. Jaze and Zahraa Hadee

Dept. of Biology / College of Sciences for Women / University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present study aimed to determine the effects of using rice powder and *Eruca sativa* alcoholic extract as food on growth of earthworms in genus *Lumbricus* sp. The results showed the highest length rates recorded by using rice powder for young worms (12.96) cm. after 14 days and (17.02) cm. for adults after 21days. The *E.sativa* extract recorded length rate of (8.05) and (14.29) cm. for young and adults respectively after 21days. The less length rate was recorded by using the mixture of (rice powder and *E.sativa*) extract at the control group. The rice powder recorded the highest weight rate (0.250) and (1.73) gm for young and adults respectively after 21 days. *E.sativa* extract recorded (0.343) gm after 21 days for young worms, while the weight rate decreased comparing with the weight before the experiment. The mixture did not record any increase in weight. The weight rate of control was (4.00) gm for adults and then began decreasing after 21 days.

المقدمة

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج ان أعلى معدلات للطول قد سجلت باستخدام طحين الرز وبلغت لدى الديدان الصغيرة (12.96) سم بعد 14 يوما و (17.02) سم لدى الديدان البالغة بعد 21 يوما ، ومن ثم الجرجير الذي سجل (8.05) سم و (14.29) سم لدى الديدان الصغيرة والبالغة على التوالي بعد مرور 21 يوما، ثم معاملة السيطرة وخليط الجرجير والرز الذي سجل أقل المعدلات (جدول رقم 1، 2).

جدول رقم (1): تأثير المعاملة والوقت في معدل الطول (سم) لدى صغار الديدان

المعاملة	المتوسط : الخطأ القياسي (سم)				قيمة LSD
	قبل التجربة	بعد 7 أيام	بعد 14 يوما	بعد 21 يوما	
لرز	0.08±5.99	0.34±7.55	4.76±12.96	0.36±8.36	*1.855
الجرجير	0.78±4.77	0.48±7.14	0.34±7.85	0.33±8.05	*1.097
خليط (رز + جرجير)	0.38±5.38	0.27±7.38	0.02±7.06	0.45±6.52	*1.247
السيطرة	0.33±6.32	0.23±7.56	0.19±8.02	0.20±8.35	*1.074
قيمة LSD	*1.531	NS 1.125	*2.215	*1.138	---

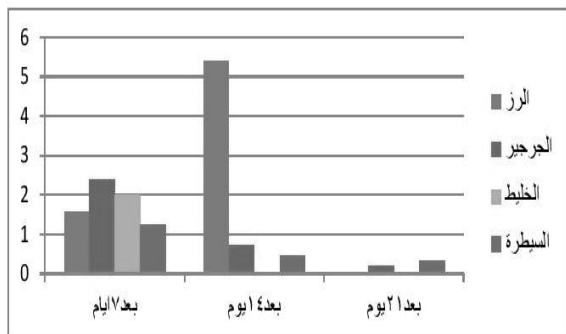
* (0.05), NS : غير معنوي

جدول رقم (2): تأثير المعاملة والوقت في معدل الطول (سم) لدى الديدان البالغة

المعاملة	المتوسط : الخطأ القياسي (سم)				قيمة LSD
	قبل التجربة	بعد 7 أيام	بعد 14 يوما	بعد 21 يوما	
لرز	0.33±11.66	0.39±15.77	0.55±16.38	0.59±17.02	*2.508
الجرجير	0.60±10.66	0.96±13.66	0.91±13.99	0.93±14.29	*1.942
خليط (رز + جرجير)	0.82±10.49	0.28±10.66	0.05±10.11	0.00±0.00	*2.664
السيطرة	0.34±10.38	0.36±12.72	0.59±12.13	0.26±13.08	NS 2.861
قيمة LSD	NS 1.834	*1.858	*1.993	*1.849	---

* (0.05), NS : غير معنوي

ومن خلال شكل رقم (1، 2) يلاحظ أن الزيادة بالطول كانت واضحة باستخدام طحين الرز لكل من الديدان الصغيرة والبالغة مقارنة بالمعاملات الأخرى.



شكل رقم (1): مقدار الزيادة بالطول (سم) للديدان الصغيرة للمعاملات

تعتبر ديدان الأرض من الأحياء الشائعة عالميا في الترب الزراعية، وتسهم في تحليل المواد العضوية وتثبيت النيتروجين في التربة من خلال عمليات الهضم والتنفس والإخراج (1)، ولها أثر إيجابي غير مباشر من خلال رفع معدلات النمو لبعض أحياء التربة وإعادة توزيع المغذيات المهمة للنبات (2)، وقد أوضحت دراسة (3) أن أفرادها غير محددة الموقع Anecic في التربة وتتراوح معدلات أطولها بين 8-15 سم ولونها بني محمر أو غامق في المنطقة الظهيرية، وفاتح مصفر في المنطقة البطنية، وتصل إلى عمق مترين في التربة . وقد دلت نتائج دراسة (4) أن ديدان الأرض تمتلك مستقبلات حسية خاصة باللمس والضوء وأخرى كيميائية للتذوق تنتشر بين القطعة أمام الفم prostomium ، ومن أكثر الأنواع شيوعا الجنس *Lumbricus* sp. أو ما يعرف باسم night crawler (5).

تتغذى ديدان الأرض على الأوراق المتعفنة الموجودة على سطح التربة، إذ تسحبها إلى داخل قنوات تحفرها عموديا أو أفقيا في التربة، وبهذا تصل المادة العضوية إلى طبقات التربة السفلى، كما تفضل الغذاء الذي يحتوي على البروتين والنشا، ويعتبر الرز *Oryza* sp. من الأغذية الغنية بالبروتينات والكربوهيدرات والفيتامينات والمعادن (6)، أما الجرجير *Eruca sativa* فهو من النباتات العشبية الشائعة سهلة النمو، يتراوح ارتفاعه من 20-50 سم، وله أوراق خضراء تحتوي على مواد مضادة للأكسدة مثل quercetin, flavonoids وفلافونويدات (kaempferol, isohamnetin) بالإضافة إلى فيتامين C و carotenoids (7).

هدفت الدراسة الى اختبار تأثير ثلاثة أنواع من الغذاء على نمو ديدان الأرض ذات الأهمية البيئية والاقتصادية، النوع الأول كان طحين الرز الجاف، والثاني سائل عبارة عن مستخلص الجرجير، والنوع الثالث خليط من النوعين الأول والثاني، إضافة إلى معاملة السيطرة.

المواد وطرق العمل

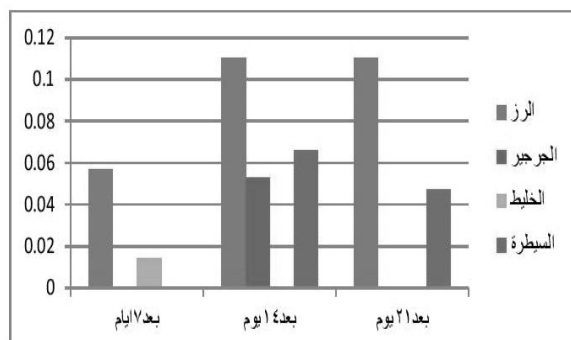
جمعت ديدان الأرض من تربة زراعية ومن أعماق تصل إلى 15 سم، ونقلت إلى المختبر حيث تم غسلها من بقايا الطين العالق، وجهازت أوعية بلاستيكية تحتوي على أوزان متساوية من التربة 200غم بعد أن تم تجفيفها في درجة حرارة الغرفة وتم تنظيفها باستخدام منخل 5 ملم لتنظيفها من الشوائب كالأحجار وبقايا الأوراق النباتية، عدا معاملة السيطرة التي أضيفت لها أوراق نباتية لتغذية الديدان من نفس مكان الجمع.

تم تجهيز ثلاثة مكررات لكل معاملة مع السيطرة وعلى مجموعتين من الديدان (صغار وبالغات) وكان التمييز من خلال وجود السرج clitellum، وضعت في كل مكرر ثلاثة ديدان أرض، أضيف الغذاء للمكررات مرة واحدة أسبوعيا بوزن 2غم طحين رز، و5 مل من مستخلص الجرجير ونفس الكميتين إلى معاملة الخليط.

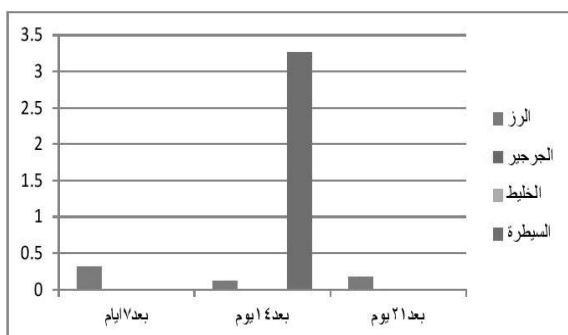
تحضير المستخلص

تم تنظيف أوراق نبات الجرجير *Eruca sativa* وتجفيفها بدرجة حرارة الغرفة ، وتم استخلاصها باستعمال الميثانول بنسبة (1:10) (وزن:حجم) بجهاز الساكسوليت soxhlate بدرجة حرارة 60-80 م لمدة 8 ساعات، ثم رشح المستخلص باستخدام ورق ترشيح wattman وترك الراشح ليحفظ بدرجة حرارة الغرفة بحسب طريقة (8).

استغرقت التجربة 21 يوما جرى خلالها قياس الأطوال والأوزان مرة واحدة أسبوعيا باستخدام مسطرة مدرجة وجهاز ميزان حساس، بعد غسل الديدان لإزالة الطين العالق بها، وتم المحافظة على رطوبة التربة بإضافة قليل من الماء عند الحاجة.

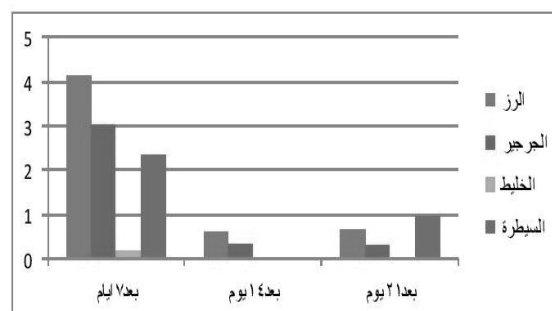


شكل رقم (3): مقدار الزيادة بالوزن (غم) عند الديدان الصغيرة للمعاملات



شكل رقم (4): مقدار الزيادة بالوزن (غم) عند الديدان البالغة للمعاملات

أشارت النتائج إلى أن طحين الرز هو الأفضل كغذاء لديدان الأرض مقارنة بباقي الأنواع المستخدمة ، وقد أكدت دراسة (6) أهمية الرز كغذاء لاحتوائه على البروتين والكربوهيدرات والألياف والفيتامينات، ويمكن الحصول عليه بسهولة واستخدامه بشكل مطحون لغرض تسهيل هضمه من قبل الديدان، ولا يؤثر ذلك على قيمته الغذائية. غير أن ديدان الأرض تفضل قطع السكر والرز المنقوع والنشا الذي وجدت آثاره في جحورها (9) . كما أنها تفضل الغذاء الغني بالكربوهيدرات وهو في مراحل التحلل وتلجأ إلى الحبوب والحنطة وبذور القطن إذا كان هناك نقص في مغذيات التربة المتواجدة فيها (10)، وهذا ما يفسر الزيادة الحاصلة في الطول والوزن عند استخدام طحين الرز، ويشير المصدر نفسه إلى ضرورة إضافة غذاء يحتوي على البروتين مثل الحبوب للديدان البالغة وذلك لأهميته في عملية التكاثر، وقد أكدت نتائج دراسة (2) على ديدان الأرض نوع *Drawida willsi* على ازدياد نموها عند استخدام طحين الرز، أما الجرجير فهو من النباتات الشائعة أيضا للإنسان وسهل النمو وله خواص مضادة للالتهابات، فهو مانع لبعض البكتيريا والفطريات (11)، وأوراقه غنية بهذه المواد المهمة، ولضمان وصولها للديدان تم استخلاصها ورش المستخلص على التربة الحاوية على الديدان للتغذي عليه. وقد أشارت دراسة (9) إلى قدرة ديدان الأرض على ابتلاع التربة واستخلاص المواد المفيدة منها أو القابلة للهضم كطريقة للتغذي، وفي هذه الدراسة قد يكون هناك تثبيط لنمو بكتيريا وفطريات التربة التي تتغذى عليها الديدان، بسبب إضافة المستخلص مما أدى إلى انخفاض معدلات النمو عند استخدامه كغذاء، أما عند استخدام الخليط من طحين الرز والمستخلص فلم يحقق نتائج جيدة، فالديدان لم تستفد من طحين الرز وذلك لوجود طعم لاذع نتيجة للمركبات الفلافونويدية من مستخلص الجرجير (12)، مما يفسر النتائج الأفضل لطحين الرز.



شكل رقم (2): مقدار الزيادة بالطول (سم) للديدان البالغة للمعاملات

وعند ملاحظة الوزن، سجل طحين الرز أعلى معدلات للوزن بلغت (0.250) غم و(1.73) غم لكل من الصغار والبالغات على التوالي بعد 21 يوما، تلاه الجرجير الذي سجل (0.343) غم بعد 21 يوم للصغار، بينما تناقص الوزن لدى البالغات عند مقارنته بالوزن قبل التجربة (جدول رقم 3، 4)، أما خليط الرز والجرجير فقد سجل أيضا تناقصا بالوزن، بينما كانت معاملة السيطرة أفضل حيث سجلت معدل وزن بلغ (4.00) غم للبالغات تناقص بعد مرور 21 يوما .ويمكن ملاحظة مقدار الزيادة بالوزن لدى الصغار بعد 21 يوما وفي معاملة السيطرة بعد 14 يوما في كل من شكل رقم (3)، (4).

جدول رقم (3): تأثير المعاملة والوقت في معدل الوزن (غم) لدى الديدان الصغيرة

المعاملة	المتوسط ± الخطأ القياسي (سم)				قيمة LSD
	قبل التجربة	بعد 7 ايام	بعد 14 يوما	بعد 21 يوما	
الرز	0.02±0.263	0.04±0.320	0.05±0.410	0.07±0.520	*0.164
الجرجير	0.05±0.243	0.02±0.153	0.03±0.206	0.03±0.343	*0.109
خليط (رز + جرجير)	0.02±0.196	0.01±0.210	0.03±0.106	0.02±0.063	*0.044
السيطرة	0.02±0.253	0.02±0.230	0.02±0.296	0.03±0.343	NS*0.140
قيمة LSD	NS 0.110	*0.084	*0.109	*0.144	*****

* (0.05)، NS : غير معنوي

جدول رقم (4): تأثير المعاملة والوقت في معدل الوزن (غم) لدى الديدان البالغة

المعاملة	المتوسط ± الخطأ القياسي (سم)				قيمة LSD
	قبل التجربة	بعد 7 ايام	بعد 14 يوما	بعد 21 يوما	
الرز	0.15±1.12	0.11±1.44	0.14±1.56	0.59±1.73	*0.415
الجرجير	0.22±0.883	0.00±0.660	0.00±0.660	0.03±0.573	*0.307
خليط (رز + جرجير)	0.13±0.906	0.03±0.626	0.02±0.476	0.00±0.00	*0.371
السيطرة	0.06±0.730	0.05±0.716	1.50±4.00	0.02±1.02	*0.683
قيمة LSD	NS 0.503	*0.209	*2.456	*0.225	*****

* (0.05)، NS : غير معنوي

المصادر

1. Peres G.; Curmi C. and Hallaire PV.(1998). Earthworm activity and soil structure changes due to organic enrichments in vine yard systems. Biol. Fertil. Soil.27:417-424.
2. Padhan A. and Osahu SK. (2010). Effect of rice mill water on growth, reproduction and metabolism of *Drawida willsi* (oligochaeta) under laboratory conditions. I.J.Press 5(1):26-32.
3. Jimenez J.; Decaens TD.; Lavella P. and Thomas RJ. (2004). Native earthworm communities, soil processes and sustainability of Colombian savannas. Case study from South America –Carimagua Colombia.
4. Picnic JA.(2009). Biology of the invertebrate. 5th ed. McGraw Hill Higher Education, Boston.
5. Vrsic S. (2004). Soil erosion and earthworm population responses to soil management system in steep-slope vineyards. Faculty of Agriculture and Life Sciences. University Center of Viticulture and Enology. Meranova, Slovinia.
6. Abbas A.; Murtaza S. and Aslam F.(2011). Effect of processing on nutritional value of rice (*Oryza sativa*). World J. Med. Sci. 6(2):68-73.
7. Jin J.; Koroleva OA.; Gibson T.; Swanston J.; Magan J.; Zhang Y.; Rowland IR. and Wagstaff C. (2009). Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of roket (*Eruca sativa* and *Diplotaxistenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environment J. Agri. Food Chem.57(12):5227-5234.
8. Satyanarayana U. (2005). Biotechnology. Book and Allied (p)Ltd. Kalkata. India.
9. Charles D. (2015). The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Iraq virtual science library.
10. Rhonda S. (2003). Raising earthworms successfully. North Carolina Cooperative extension service. Pp. 996-999.
11. Naguib H.; Michael R.; Shafik E. and Rasmy GE. (2011). On the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca stiva* extract and its biological activity as anticancer agent *in vitro*. J. Med. Plant. Res. 5(7): 1184-1191.
12. Heimler D.; Isolani L.; Vignolini P.; Tombelli S. and Romani A. (2007). Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. J. Agri. Food Chem. 55:1724-1729.

تأثير فعالية مستخلص قشور البصل الأحمر *Allium cepa* في حفظ مفروم لحم الدجاج المخزون

علياء سعد الحافظ

قسم الاقتصاد المنزلي / كلية التربية للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: aliasaad80@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

هدفت الدراسة إلى معرفة تأثير استخدام المستخلص الكحولي الإيثانولي لقشور البصل الأحمر في إطالة مدة حفظ لحم الدجاج المفروم بالتبريد، حيث تم خلط لحم الدجاج المفروم بنسبة 0.5، 1، 1.5 % من المستخلص الكحولي، واعتبر 0 (عينة سيطرة)، وخزنت جميع المعاملات على انفراد لمدة صفر و 3 و 6 أيام في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م°، وأجريت عليها بعض الاختبارات البيولوجية. وقد أظهرت النتائج أن خلط لحم الدجاج المفروم بمستخلص قشور البصل الأحمر أدى إلى إطالة خزن اللحم لمدة 6 أيام على درجة حرارة 4 م°، وأفضل نتيجة جاءت عند إضافة المستخلص الكحولي الإيثانولي لقشور البصل الأحمر بنسبة 1.5 %، والتي تبلغ 0.03 غم، حيث خفض الحمل الميكروبي بنسبة أعلى من المستخلص المستخدم بنسبة 0.5، 1 %.

الكلمات المفتاحية: قشور البصل، لحم الدجاج المفروم، الفلافونويدات

Effect of the activity of red onion peel *allium cepa* extraction on preservation of minced chicken meat

Alyaa S. Al-Hafud

College of Education for Women/ University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The study aimed to determine the effect of using alcoholic ethanol extraction of red onion peel in prolonging the period of preservation of cooled minced chicken meat. The minced chicken meat was mixed with 0.5, 1, 1.5 % of alcoholic extract of the red onion, where (0 was the control sample). All samples were stored separately for 0, 3, 6 days in Refrigerator at temperature 4C. Biological tests were conducted. Results showed that mixing the minced meat with red onion peel extraction led to prolong the storage of meat for 6 days at 4C, and the best result was obtained when adding alcoholic ethanol extract of red onion peel by 1.5%, which amounted 0.03 g, that reducing microbial load more higher than 1.05 %.

المقدمة

الكشوفات النوعية

أجريت الكشوفات النوعية للتعرف على المكونات الكيميائية في المستخلص الكحولي للنبات ومنها:

1. كشف الفلافونويدات **Flavonoid's test**: أضيف 1 مل من الكاشف (هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي [KOH 5N]) إلى 1 مل من المستخلص، عند ظهور راسب أصفر تعتبر النتيجة موجبة، مما يدل على وجود الفلافونويدات (8).

تحضير العينات

أجريت الدراسة في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا في شهر أيار/ مايو 2015، وتم الحصول على لحم دجاج مفروم من أحد محال بيع اللحوم في منطقة السيدة، وتم تقسيم اللحم المفروم إلى أربع معاملات بواقع 250 غم لكل معاملة، وتم خلط معاملات لحم الدجاج المفروم في تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الإيثانولي بنسب مختلفة 0، 0.5، 1، 1.5 % (14)، ووضعت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م°، بعدها أجريت عليها الفحوصات البيولوجية.

الفحوصات البيولوجية Biological Tests

تم أخذ 10 غم من اللحم تحت ظروف معقمة وأضيف إلى 90 مل من محلول الملح الفسيولوجي Normal Saline المعقم، ومزجت المكونات بجهاز المازج Stomacher لمدة دقيقتين، ثم أخذ 1 مل من هذا المعلق الذي يمثل التخفيف الأول 10^{-1} ، وأضيف إلى 9 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline وأجريت سلسلة التخفيف العشرية التي تراوحت من 10^{-1} إلى 10^{-9} لغرض عد مستعمرات البكتيريا والأعفان والخمائر (9). وقد شملت:

1. **العد الكلي للبكتيريا Total Standard Plate Count (SPC)**: أجريت تجارب أولية لمعرفة التخفيف الذي يعطي أفضل النتائج باستخدام 1 مل من كل من التخفيفات 10^{-1} إلى 10^{-9} وزرعت على وسط الأكار المغذي Nutrient Agar بطريقة Pouring باستخدام مكررين لكل تخفيف، ثم حضنت في درجة حرارة 37 م° مدة 24-48 ساعة واختيرت الأطباق الحاوية على 30-300 وحدة تكوين مستعمرة (و.ت.م) وقد عبر عنها أينما وردت.

2. **عد بكتيريا القولون coliform bacteria**: استخدم وسط أكار الماكونكي MacConkey Agar لعد بكتيريا القولون حيث عقم الوسط بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 جو لمدة 15 دقيقة، وأجريت تجارب أولية كالتالي أجريت في العد الكلي للبكتيريا المذكورة سابقاً، واختير حجم المعلق 0.1 مل من كل تخفيف ووزعت على وسط أكار الماكونكي MacConkey Agar بطريقة النشر spreading وبواسطة الناشر الزجاجي، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 - 48 ساعة، حيث أعطى أفضل النتائج للعد البكتيري (10).

3. **عد البكتيريا العنقودية الذهبية Staphylococcus aureus**: استخدم وسط أكار المانتول Manitol Agar لعد البكتيريا العنقودية الذهبية حيث عقم الوسط بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 جو لمدة 15 دقيقة، وأجريت تجارب كالتالي أجريت في الفقرة السابقة.

4. **عد الخمائر والأعفان**: استخدم وسط أكار مستخلص الشعير (Malt Extract Agar)، وعقم الوسط بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 جو لمدة 15 دقيقة، ثم عدل الرقم الهيدروجيني pH إلى 5 باستخدام حامض التارتاريك 0.01 عياري، بعد ذلك أضيف المضاد الحيوي الذي حضر بإذابة 500 ملغم من كلورامفينيكول Chloramphenicol مع 100 مل محلول الفوسفات الدائري، ومزج الخليط جيداً قبل إضافته للوسط

استخدمت النباتات في مختلف أنحاء العالم وقيل آلاف السنين في معالجة الأمراض ذات المسبب الميكروبي، ولا زال الكثير من الناس في وقتنا الحاضر في المدن النامية يؤكدون على أهمية استخدام النواتج الطبيعية للنباتات الطبية كعلاج، إن ما بين 50-25 % من أنواع العلاجات المستخدمة حالياً هي من أصل نباتي، حيث تعتبر النباتات غنية بنتائج الأيض الثانوية ذات الخصائص المضادة للميكروبات والمتمثلة بالتانينات Tannins والترينويدات Terpenoids والقلويدات Alkaloids والفلافونويد Flavonoids. غير أن نسبة 1-10 % من النباتات فقط تستخدم كمصدر غذائي إنساني أو حيواني (1).

ركزت الدراسة الحالية على قشور نبات البصل الأحمر *Allium cepa*، وينتمي نبات البصل الأحمر إلى العائلة النباتية *Liliaceae*، وهو من النباتات التي تمتلك فعالية ضد جرثومية Antibacterial، وكذلك ضد التهابية Anti-inflammatory، ويملك عوامل مضادة للأكسدة Antioxidant (2، 3)، ويحتوي نبات البصل على المركب الفلافونويدي Quercetin الذي يمتاز بفعالية مضادة لعدد كبير من الأحياء المجهرية (3).

تتحدد النوعية الميكروبية للحوم من خلال معرفة أعداد ونوعية الأحياء المجهرية النامية فيها، ولا تخلو اللحوم من الأحياء المجهرية، ولكن قد تزداد أعدادها إذا توفرت لها بعض الظروف المناسبة لنموها كدرجة الحرارة والرطوبة والأكسجين، ويتوقف نمو الأحياء المجهرية حسب حرارة الخزن بالتجميد أو بالتبريد (4)، كما تزداد أعداد الأحياء المجهرية في اللحوم نتيجة حدوث التلوث أثناء عملية الذبح والتقطيع والتغليف والتصنيع، كما أن ظروف الخزن السيئة في غرف التبريد وعملية الإذابة، ومكائن الفرم في المعامل وأيدي العمال تعد من العوامل التي تعمل على زيادة أعداد الأحياء المجهرية في اللحوم (5، 6)، ونظراً للأهمية الطبية للنبات، أجريت الدراسة الحالية لاختبار مستخلص قشور البصل الأحمر على خفض الحمل الميكروبي وإطالة العمر التخزيني للحوم الدجاج المفروم.

المواد وطرق العمل

جمع العينات

تم جمع نبات البصل الأحمر من السوق المحلية، فقد أخذت أوراق الطبقتين الخارجيتين اليابسة من البصلة فقط، ثم أحضرت العينات إلى المختبر، وصنفت من قبل مختصين بتصنيف النبات في قسم علوم الحياة، من كلية العلوم في جامعة بغداد، ثم نظفت من الشوائب، وطحنت العينات باستخدام مطحنة كهربائية، وحفظت المساحيق النباتية بدرجة حرارة المختبر في قناني نظيفة وجافة وذات غطاء محكم وعلمت بأسماء النباتات.

تحضير مستخلص الكحول الإيثانولي

اتبعت طريقة (7) في استخلاص قشور البصل الأحمر، إذ تم وضع 40 غراماً من قشور النبات المطحون في وعاء ورقي Thumble ووضع في Soxhlet باستخدام 250 مل من مذيب الإيثانول 70% ولمدة 24 ساعة، بعد الاستخلاص ركز المحلول بواسطة جهاز المبخر الدور (Rotary Evaporator) وحفظ لاختبار فعاليته لاحقاً.

جدول رقم (1): تأثير فعالية المستخلص الكحولي لقشور البصل الأحمر بتركيز 0.5 % في الحمل الميكروبي للحم الدجاج المفروم والمخزون بدرجة حرارة الثلاجة 4 م. (مقاسة بوحدة تكوين مستعمرة و.ت.م)

الحمل الميكروبي	Cont. 0*	نوع المعاملة	مدة الحفظ بالأيام	
			6	3
العدد الكلي للبكتيريا الهوائية	45x10 ⁵	A	72x10 ⁷	59x10 ⁶
		B	15x10 ³	31x10 ³
بكتيريا القولون	5x10 ⁴	A	58x10 ⁶	23x10 ⁵
		B	11x10 ²	21x10 ²
البكتيريا العقدية الذهبية	1x10 ³	A	45x10 ⁵	78x10 ⁴
		B	18x10 ²	22x10 ²
الخمائر والأعفان	38x10 ⁴	A	68x10 ⁵	45x10 ⁴
		B	88x10 ²	21x10 ³

* A: النموذج بدون إضافة مستخلص / B: النموذج مع إضافة المستخلص.
* Cont.0 هي عينة السيطرة قبل الخزن

جدول رقم (2): تأثير فعالية المستخلص الكحولي لقشور البصل الأحمر بتركيز 1 % في الحمل الميكروبي للحم الدجاج المفروم والمخزون بدرجة حرارة الثلاجة 4 م. (مقاسة بوحدة تكوين مستعمرة و.ت.م)

الحمل الميكروبي	Cont. 0*	نوع المعاملة	مدة الحفظ بالأيام	
			6	3
العدد الكلي للبكتيريا الهوائية	45x10 ⁵	A	82x10 ⁷	65x10 ⁶
		B	43x10 ²	51x10 ²
بكتيريا القولون	28x10 ³	A	68x10 ⁵	41x10 ⁴
		B	3x10 ²	43x10
البكتيريا العقدية الذهبية	18x10 ³	A	48x10 ⁴	31x10 ⁴
		B	1x10 ²	21x10 ²
الخمائر والأعفان	11x10 ⁴	A	24x10 ⁵	35x10 ⁴
		B	23x10 ²	78x10 ²

* A: النموذج بدون إضافة مستخلص / B: النموذج مع إضافة المستخلص.
* Cont.0 هي عينة السيطرة قبل الخزن

جدول رقم (3): تأثير فعالية المستخلص الكحولي لقشور البصل الأحمر بتركيز 1.5 % في الحمل الميكروبي للحم الدجاج المفروم والمخزون بدرجة حرارة الثلاجة 4 م. (مقاسة بوحدة تكوين مستعمرة و.ت.م)

الحمل الميكروبي	Cont. 0*	نوع المعاملة	مدة الحفظ بالأيام	
			6	3
العدد الكلي للبكتيريا الهوائية	48x10 ⁵	A	59x10 ⁷	67x10 ⁶
		B	22x10	35x10 ²
بكتيريا القولون	1x10 ⁵	A	34x10 ⁶	17x10 ⁶
		B	17x10	22x10 ²
البكتيريا العقدية الذهبية	38x10 ³	A	77x10 ⁴	13x10 ⁴
		B	52x10	45x10 ²
الخمائر والأعفان	25x10 ³	A	86x10 ⁴	77x10 ⁴
		B	9x10 ²	31x10 ²

* A: النموذج بدون إضافة مستخلص / B: النموذج مع إضافة المستخلص.
* Cont.0 هي عينة السيطرة قبل الخزن

الزرعي، ثم أضيف 2 مل من الخليط إلى كل 100 مل من الوسط الزرعي الخاص لتنمية الخمائر والأعفان، ولتنشيط نمو البكتيريا، ثم أجريت تجارب أولية كالتالي أجريت سابقاً وكان حجم المعلق المستخدم 0.1 مل (11).

النتائج والمناقشة

توضح نتائج الجدول رقم (1) احتواء نماذج اللحم المفروم على أعداد كبيرة من الأحياء الدقيقة المجهرية المختلفة ، وقد أدت إضافة المستخلص الكحولي لقشور البصل الأحمر إلى انخفاض ملحوظ وكبير في أعدادها، وعلى الرغم من التأثير التنشيطي للمستخلص في نمو الأحياء المجهرية في هذه الدراسة، إلا أن لمدة الحفظ تأثيراً كبيراً في تكاثر الأحياء المجهرية، حيث ازدادت أعدادها بزيادة مدة الحفظ ، وكانت أعداد الحمل الميكروبي في المعاملات المتضمنة إضافة المستخلص الكحولي أدنى من أعدادها في نماذج اللحم المفروم بدون إضافة المستخلص كعقود مقارنة وطول مدة الحفظ، حيث بلغ العدد الكلي البكتيري عند إضافة المستخلص بنسبة 0.5% والتي تساوي 0.01 غم إلى مفروم لحم الدجاج 31x10³، 15x10³ لمدة حفظ 3، 6 أيام على التوالي في درجة حرارة الثلاجة 4 م بعد أن كان 45x10⁵ و.ت.م قبل إضافة المستخلص، وجاء هذا مطابق لما وجدته نتائج دراسة (12)، في حين بلغت بكتيريا القولون 21x10²، 11x10² بعد أن كانت 5x10⁴ و.ت.م. وكذلك بالنسبة للبكتيريا العقدية الذهبية 22x10²، 18x10² و.ت.م. بعد أن كانت 1x10³ قبل إضافة المستخلص، أما الخمائر والأعفان فقد بلغت 88x10²، 21x10³ بعد أن كانت 38x10⁴ قبل إضافة المستخلص ، وعند مقارنة التأثير التنشيطي للمستخلص الكحولي في نمو الأحياء المجهرية المختلفة، وقد لوحظ بقاء التأثير التنشيطي له بالرغم من الوصول إلى مدة الحفظ 6 أيام بالثلاجة ، فقد حافظ على الأعداد الميكروبية ضمن الحدود الميكروبية القياسية للحم الدجاج المفروم والصالح للاستهلاك البشري، كما حددته المواصفة القياسية العراقية للعدد الكلي البكتيري البالغ 10⁶ وليكنيتريا القولون 10²-10¹ ، وعدد البكتيريا العقدية الذهبية 10³-10⁴، وجاءت جميعها مطابقة للمواصفة العراقية القياسية (13)، والحال كذلك بالنسبة لكل من الجدول رقم (2،3) على التوالي، في حين لوحظ في الجدولين (2،3) انخفاض في الحمل الميكروبي عند إضافة المستخلص الكحولي بنسبة 1% الذي يساوي 0.02 غم و 1.5% والذي يساوي 0.03 غم على التوالي إلى اللحم المفروم بعد الخزن لمدة 6،3 أيام ، وقد جاءت أفضل نتيجة لخفض الحمل الميكروبي في لحم الدجاج المفروم وذلك عند إضافة المستخلص الكحولي الإيثانولي لقشور البصل الأحمر بنسبة 1.5% ، والتي تبلغ 0.03 غم حيث خفض الحمل الميكروبي بنسبة أعلى من المستخلص المستخدم بنسبة 1، 0.5 % ، حيث انخفض العدد الكلي البكتيري إلى 35x10²، 22x10² لمدة حفظ 6،3 أيام على التوالي، في حين بلغت بكتيريا القولون 17x10، 22x10² و.ت.م، أما البكتيريا العقدية الذهبية فبلغت 52x10، 45x10²، وبلغت أعداد الخمائر والأعفان 31x10²، 9x10² و.ت.م ، بعد أن كانت 25x10³، 48x10⁵، 38x10³، 1x10⁵، والعقود الذهبية والخمائر والأعفان على التوالي، وهذا مطابق لما وجدته نتائج دراسة (15)، بالنسبة لأعداد البكتيريا العقدية الذهبية . ويعود سبب انخفاض المحتوى الميكروبي للحم الدجاج المفروم إلى احتواء قشور البصل الأحمر على الفلافونيد، الذي يتميز بفعالية مضادة للميكروبات ضد عدد كبير من الأحياء المجهرية، وأن تأثير الفلافونويدات الضد مايكروبي ناتج عن قدرتها على تكوين معقد مع بروتينات الجدار الخلوي والبروتينات الذاتية الداخل خلوية لجسم الخلية الجرثومية ، فضلاً عن قدرتها على تحطيم الغشاء الخلوي للخلية الجرثومية (1).

11. القطبي، سحر حسن علي. (1999). الخمائر والأعفان في بعض منتجات الألبان. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
12. القيسي، مهدي ضمد، الزبيدي، لبيب أحمد، علي، نورية عبد الحسين. (2009). اختبار فعالية المستخلص الزيتي لقلف نبات الدارسين في حفظ اللحم المفروم. مجلة الزراعة العراقية. 14(4): 26-34.
13. الموصفات القياسية العراقية. (2000). مسودة المواصفة القياسية العراقية رقم (3725) الميكروبية في الأغذية - الجزء الرابع - الحدود الميكروبية للحوم ومنتجاتها. الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية. جمهورية العراق.
14. القزاز، محمد فاروق عبد الحميد. (2014). تأثير مستخلص قشور الرمان Pomegranate peel في بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للحم الدجاج المسن المفروم. مجلة ديالى للعلوم الزراعية. 6 (1): 1-10.
15. التميمي، سالم صالح، الموسوي، منى تركي، صاحب، مها. (2010). تقدير المحتوى الميكروبي لبعض أنواع البكتيريا في أفخاذ الدجاج المجمدة المستوردة في مدينة بغداد. المجلة العراقية لبحوث السوق. 2(4): 39-48.

الاستنتاجات

يستدل من نتائج هذه الدراسة أنه يمكن استخدام المستخلص الكحولي الإيثانولي لقشور البصل الأحمر في إطالة العمر التخزيني للحم الدجاج المفروم والمخزون بدرجة حرارة التلاجة 4 م° لمدة 6 أيام من بداية المعاملة، حيث كانت كفاءة المستخلص التثبيطية جيدة وفعالة ضد الحمل الميكروبي، وذلك عند استخدام المستخلص الكحولي بنسبة 1.5% والذي يبلغ 0.003 غم في خفض المحتوى البكتيري للحم الدجاج المفروم والتي أعطت أفضل النتائج.

التوصيات

1. إدخال مستخلص قشور البصل الأحمر في وصفات غذائية وإجراء تقييم حسي لها.
2. إجراء فحوصات كيميائية لمعرفة المواد الفعالة في البصل الأحمر.
3. استخدام مستخلص قشور البصل الأحمر كمضادات أكسدة في تدعيم أغذية الأطفال.

المصادر

1. Cowan M. (1999). Plant products as antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4):564-582.
2. Wilson E. and Adams B. (2007). Antioxidant, anti – inflammatory and antimicrobial properties of garlic and onions. Nutr. Food Sci. 37(3): 178-183.
3. Azu N.; Onyeagba R.; Nworie O. and Kalu J. (2007). Antibacterial Activity Of *Allium cepa* (onion) and *Zingiber officinale* (ginger) on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from high vaginal swab. Int. J. Tropic. Med. 3(2): 126-129.
4. Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official methods of analysis. Microbiological food testing. Chapter 17.; Meat and meat products. Chapter 39. USA.
5. Marth EH. (1998). Extended shelf life of refrigerated food microbiological quality and safety. Food Technol. 52(2):1-8.
6. فرج، محمد قاسم، اسحق، رعد جرجيس. (1990). فحص وصحة اللحوم. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - هيئة المعاهد الفنية، بغداد. العراق.
7. Plummer D. (1971). Introduction to practical biochemistry. McGraw Hill book Co. Ltd., England. pp.:186-190.
8. Al-Kazraji S. (1991). Biopharmacological study of *Artemisia herba Alba*. College of pharmacy, University of Baghdad.
9. Andrews W. (1992). Manual of food quality control: Food and Drug Administration, Washington, D.C. USA.
10. الحافظ، علياء سعد. (2009). دراسة مسحية عن محتوى العناصر النزرة والحمل الميكروبي في الحليب واللبن الرائب المحلي وتأثير الأواني فيها. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات، جامعة بغداد.

تأثير المستخلص الكحولي لدرنات نبات السعد *Cyperus rotundus* على كلية ذكور الفئران البيضاء

بسمه علي جاسم

كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: mhammed836@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

تم تصميم الدراسة الحالية لمعرفة تأثير المستخلص الكحولي لنبات السعد على كلية ذكور الفئران البيضاء، شملت عينة الدراسة 15 فأراً تم تقسيمها في خمسة مجموعات (المجموعة الأولى وهي مجموعة السيطرة، المجموعة الثانية حقنت بمقدار 300 ملغم /مل من المستخلص ، المجموعة الثالثة حقنت بمقدار 350 ملغم /مل من المستخلص، المجموعة الرابعة حقنت بمقدار 400 ملغم/مل من المستخلص والمجموعة الخامسة حقنت بمقدار 450 ملغم /مل من المستخلص)، واستمرت مدة التجربة يومين وأعطيت الجرعات بشكل حقن بالغشاء البريتوني. أظهرت نتائج الدراسة وجود تغيرات مرضية نسيجية في الكلية للمجموعات المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات السعد، وكانت متشابهة في أغلب المجموعات تمثلت بحصول احتقان دموي وارتشاح خلايا الدم البيضاء وانكماش الكبيبة. نستنتج من النتائج الحالية أن للمستخلص الكحولي لدرنات السعد تأثيراً سلبياً على نسيج الكلى في التراكيز المختلفة.

الكلمات المفتاحية: نبات السعد، الكلية، الفئران البيضاء، الغشاء البريتوني

The effect of ethanolic extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on kidney in albino male mice

Basma A. Jasim

College of Sciences for Women / University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

The present study was designated to determine the effect of ethanolic extract of *Cyperus rotundus* on kidney in albino male mice . a total sample of 15 male mice were used for the experiment, divided into five groups (1st group considered as the control group, 2nd group was injected by 300 mg/ml from extract , 3th group was injected by 350 mg/ml from extract , 4th group was injected by 400 mg/ml from extract, and the 5th group was injected by 450 mg/ml from extract) . The experiment lasted for two days and the doses were administrated by intraperitoneal injection . The results showed that ethanolic extract for *Cyperus rotundus* have negative effects on kidney tissues in 300, 350, 400,450 mg/ml concentrations when compared with control group . The results showed pathological changes in the kidney in the four treated groups. Those changes included bloody congestion, infiltration of white blood cells and shrinkage of the glomerulus. The study concluded that the alcoholic extract of tubers *Cyperus rotundus* have negative impact on the kidney tissues in different concentrations.

المقدمة

السكسوليت وأضيف له 200 مل من Petroleum ether لمدة 6 ساعات، وبعدها تم فصل الزيت وأخذ المستخلص ونشر على ورقة ليتبخر المذيب، وبعدها أضيف له 200 مل من الكلوروفورم وترك في السكسوليت مدة ثلاث ساعات، وأخذ المسحوق ونشر على ورقة نظيفة أيضا ليتبخر المذيب وبعدها أضيف له الإيثانول والماء المقطر بنسبة (3 : 7) مدة 24 ساعة في السكسوليت ورشح المستخلص باستعمال ورق ترشيح واتمان رقم (1) وجفف باستعمال المبخر الدوار.

تحضير التراكيز

تم تحضير التراكيز اعتمادا على تركيز الجرعة القاتلة لنصف حيوانات التجربة LD50 إذا كانت 90 غم/كغم، وكانت الجرعات 400، 350، 300، 250 ملغم/مل، وتم إعطاء الجرعة بحقنه بالغشاء البريتوني intraperitoneal injection (16).

حيوانات التجربة (الفئران البيضاء)

شملت عينة الدراسة 15 فأرا أبيض من الذكور السويسرية بعمر 8-10 أسابيع وبمعدل وزن 25-20 غم وتم وضع الحيوانات في أقفاص بلاستيكية، وأدخلت البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة في كلية العلوم للنبات بجامعة بغداد، وتم الاعتناء بنظافة الأقفاص، وتركت الحيوانات مدة أسبوع لتتأقلم مع ظروف المختبر من درجة حرارة 25 س، وفترة إضاءة وظلام (12 ساعة - 12 ساعة) وتركت الحيوانات لتناول الماء والعليقة طوال مدة التجربة.

مجموعات التجربة

تم تقسيم الحيوانات إلى ست مجموعات (بمعدل 3 حيوانات بكل مجموعة) واستمرت مدة التجربة يومين، أما تقسيم المجموعات فكان كالتالي:

المجموعة الأولى وهي مجموعة السيطرة وتركت لتناول الماء والعليقة.

المجموعة الثانية وهي مجموعة حقنت بـ 300 ملغم/مل من المستخلص.

المجموعة الثالثة وهي مجموعة حقنت بـ 350 ملغم/مل من المستخلص.

المجموعة الرابعة وهي مجموعة حقنت بـ 400 ملغم/مل من المستخلص.

المجموعة الخامسة وهي مجموعة حقنت بـ 450 ملغم/مل من المستخلص.

التضحية بالحيوانات

بعد انتهاء مدة التجربة تم قتل الحيوانات بطريقة فصل الرأس عن الجسم بالسحب وتم تشريح الحيوانات بعمل شق بالتجويف البطنى بشكل حرف T مقلوب واستؤصلت الكلى وتم تشريحها بورقة ترشيح وحفظت بمحلول الفورمالين 10% لحين تحضير المقاطع النسيجية.

التحضيرات النسيجية

نقلت العينات المحفوظة في مثبت الفورمالين إلى سلسلة تصاعديّة من الكحول الإيثيلي (70, 80, 90, 95, 100, 100%) بمعدل 3/4 ساعة لكل تركيز وبعدها وضعت العينات بالزايلين Xylene مدة ساعة كاملة لغرض ترويق العينة، ثم وضعت العينات بشمع البارافين المنصهر بدرجة 58-56 درجة سيليزية في عبوات زجاجية صغيرة بنسبة 1:1 زايلين وشمع بارافين منصهر، ثم وضعت العينات بشمع البارافين المنصهر وداخل الفرن Oven

ينتمي نبات السعد إلى العائلة السعدية Cyperaceae وهي من أكبر العائلات أحادية الفلقة، إذ تضم أكثر من 100 جنس و 5500 نوع (1)، ونبات السعد أسماء عديدة مرادفة، فمثلا باللغة الهندية يسمى (Motha) وباللغة الانجليزية يسمى (nutgrass) (2)، وهو نبات عشبي ينتشر في قرابة مائة بلد ومنها الهند، ولهذا النبات أهمية طبية وعلاجية، حيث يستخدم في علاج التهابات، الحساسية، الحمى، الحروق، كما يستعمل كمهدئ عام (3)، وتستخدم الجذور كمدر للبول، مذوب للحصى، طارد للريح، مطمئ، ويستعمل كدواء مضاد للدود، ويملك تأثيرا منبها، ومضاد للسعال (4)، وكذلك يستخدم مستخلص جذور نبات السعد في علاج احمرار العين وفي تحسين الذاكرة (5)، وفي علاج السمّة، مرض السكري، الملاريا، والسرطان (2) واسترخاء العضلات الملساء (6)، كما تتميز القلويدات الموجودة في النبات بقدرتها على تخفيض الكوليسترول في الدم (7)، وفي علاج اضطرابات الهرمونات لدى النساء، ويزيد من حليب الثدي (8). ويستخدم مستخلص نبات السعد في علاج الإصابة ببكتيريا *Staphylococcus Bacillus, E.coli* (9)، ويحتوي على مختلف المركبات الفعالة التي تعطي الأهمية الطبية للنبات ومنها القلويدات والفلافونويدات والتانينات والزيوت الأساسية وحامض الأسكوربيك وحامض اللينوليك وكليسيرول (2).

وبالرغم من الفوائد الطبية لنبات السعد، إلا أن بعض الدراسات أثبتت أن مستخلصه يؤثر على أبيض العديد من أعضاء الجسم مثل الكبد، حيث يؤثر على أبيض الدهون في الكبد فيمنع تراكمها، وبالتالي يلاحظ أن وزن الجسم لا يتأثر عند إعطاء المستخلص، وكذلك على الكلية والطحال والرئة (10)، أما عند إعطاء جرعة (50 mg/kg) من المستخلص الكحولي لنبات السعد فإنه يسبب نقصانا معنويا في مستوى إنزيمي الكبد (GOT, GPT)، كما يسبب نقصانا معنويا في مستوى low density lipoprotein (LDL)، وكذلك زيادة في مستوى high density lipoprotein (HDL) في ذكور الفئران البيضاء (11).

وفي الفئران البيضاء، تقع الكلى في الجزء الخلفي لمنطقة البطن من الناحية النسيجية وتقسّم إلى منطقتين هي القشرة cortex واللب medulla، وتغطي منطقة القشرة بالكبسولة capsule، ونسيج ضام دهني يحيط بالكلية، أما في الجزء الوسطي من الكلية، فيوجد تقعر يدعى التقير hillum يمر الشريان والوريد الكلويان والاعصاب والحالب من خلاله الذي يجمع البول من الكلى إلى المثانة، وينقسم لب الكلى إلى العديد من الوحدات أو الكتل النسيجية التي تسمى أهرامات الكلى renal pyramids، تبدأ قاعدة هذا المخروط في المنطقة التي تفصل بين اللب والقشرة وتنتهي بالحليمة papilla، وهو استمرار قمعي الشكل للطرف العلوي للحالب الذي يغطي بنسيج ظهاري عمودي بسيط (12)، (13).

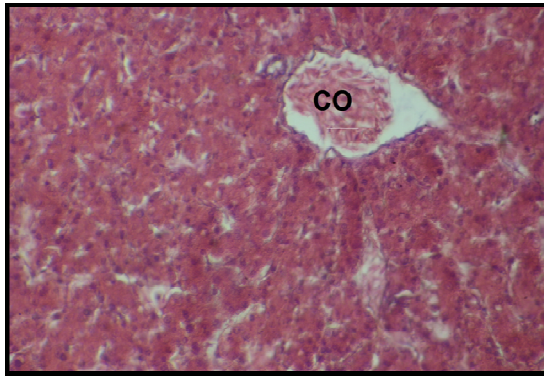
المواد وطرق العمل

جمع النبات

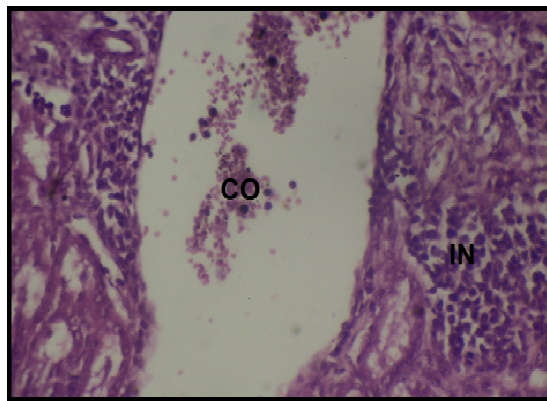
جمعت الجذور والعقد الجذرية لنبات السعد من الحدائق التابعة لجامعة بغداد في الجادرية ومن أكثر من موقع واحد، وتم تشخيص النبات حسب طريقة (14).

تحضير المستخلص

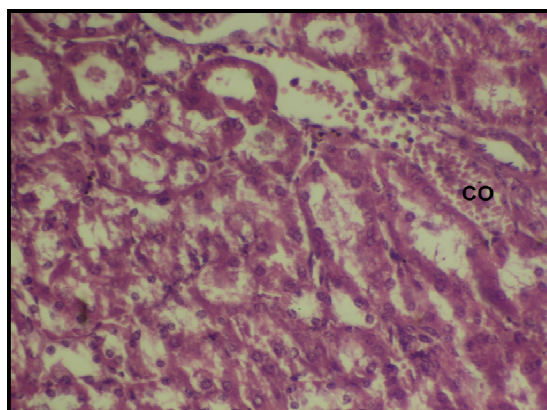
جمعت رايزومات النبات وقطعت لقطع صغيرة وجففت وطحننت باستعمال المطحنة الكهربائية، ثم نخلت للحصول على مسحوق لغرض تحضير المستخلص، تم تحضير المستخلص حسب طريقة (15)، بوزن 30 غم من المسحوق، ووضع في أنبوب في جهاز



شكل رقم (2) : مقطع مستعرض في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 300 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد يوضح حصول احتقان دموي CO (H&E) قوة التكبير x40



شكل رقم (3): مقطع مستعرض في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 350 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد يوضح حصول احتقان دموي CO وارتشاح IN (H&E) قوة التكبير x40.



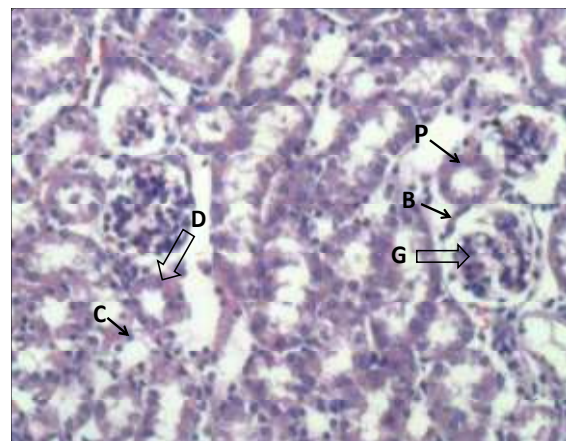
شكل رقم (4): مقطع مستعرض في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 400 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد يوضح احتقان دموي (CO) (H&E) قوة التكبير x40

مدة ساعة كاملة مرتين، ثم وضعت العينات بقالب صب الشمع وأدخلت الفرن مدة ساعة كاملة وبعدها تركت العينات بدرجة حرارة الغرفة مدة 24 ساعة.

وبعدها بدأت عملية التقطيع Sectioning بواسطة جهاز المشراح الدوار Rotary microtome وكانت العينات بسماك 6 ميكروميتر وبعدها تم وضع الشريط Ribbon الحاوي عينات على شريحة زجاجية نظيفة ثم وضع بضع قطرات من ماء مقطر حاوي على قطرات من لاصق ماير على الشريحة وكانت الشريحة موجودة على صفيحة ساخنة وتركت العينات مدة 24 ساعة ثم في اليوم التالي تم البدء في عملية التصبيغ بوضع الشرائح بعبوات خاصة بالتصبيغ المسماة Coplin jar ووضع العينات بزيلايين مدة 1/4 ساعة مرتين ثم مررت العينات بسلسلة تنازلية من كحول إيثيلي (100,90,80,70%) مدة دقيقتين لكل تركيز، ثم بصبغة الهيماتوكسلين مدة 5 دقائق، ثم بعدها بصبغة الأيوسين مدة 3 دقائق ثم بماء مقطر مدة دقيقتين ثم بسلسلة تصاعدية من الكحولات (70,80,90,100%) بتمريرة سريعة لكل تركيز، ثم بالزيلايين مرتين مدة 1/4 ساعة لكل مرة، وبعدها تمت عملية التحميل Mollinting بوضع قطرتين من كندا بلسم Canada balsm على الشرائح، ووضعت أغطية الشرائح على العينات وتركت الشرائح على الصفيحة الساخنة مدة 24 ساعة لتبدأ بعدها عملية الفحص والتصوير (17).

النتائج

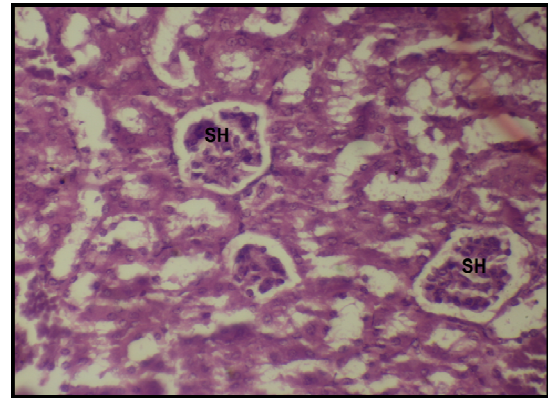
أوضحت نتائج الفحص المجهرى لنسيج الكلى بأنها مكونة من منطقتين وهي القشرة cortex للخارج المحتوية على وحدات الترشيح البولي (الكبيبات الكلوية Glomerulus)، والنيبيبات الكلوية القاصية والدانية Proximal and distal renal tubules، وتحاط الكلى بطبقة رقيقة من النسيج الضام يدعى بالمحفظة Capsule كما في الشكل رقم (1). أما الشكل رقم (2) فقد أوضح نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 300 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد حيث ظهر احتقان دموي congestion في النسيج المذكور، وفي الشكل رقم (3) الممثل لنسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 350 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد ظهر فيه أيضا احتقان دموي وارتشاح دموي infiltration، والشكل رقم (4) يمثل مقطعا في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 400 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد حيث ظهر احتقان دموي CO، وفي الشكل رقم (5) الممثل لمقطع مستعرض في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 450 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد ظهر انكماش الكبيبة.



شكل رقم (1) : مقطع مستعرض في نسيج الكلية لفئران مجموعة السيطرة يوضح الكبيبة G و محفظة بومان B والنيبيبات الكلوية الدانية P والقاصية D والجامعة (H&E) قوة التكبير 40x.

المصادر

1. Daswani PG.; Brijesh S.; Pundarikakshudu T. and Tannaz JB. (2011). Studies on the activity of *Cyperus rotundus* linn. Tubers against infections diarrhea. Indian J. Pharmacol. 43(3):340-344.
2. Singh N.; Pandey BR.; Bhalla M. and Gilca M. (2012). Phyto-pharmacotherapeutics of *Cyperus Rotundus* Linn.(Motha):Anoveiw. Indian J. Nat. Prod. Reso. 3(4):467-476.
3. Imam MZ. and Chandra DS.(2014). Evaluation of antinociceptive activity of hydromethanol extract of *Cyperus rotundus* in mice. BMC Complement. Alter. 14:83.
4. Sivapalan SR.(2013). Medicinal uses and pharmacological activities of *Cyperus Rotundus* Linn. a review. Int. J. Sci. Res. Pub. 3(5):101-108.
5. Samraj K. ; Thillaivanan S. and Kanagavalli K.(2014). An update on siddha herb korai (*Cyperus Rotundus*, L.): a review. IJP.1(4): 233-242.
6. Singh SP.; Raghavendra K . and Dash AP. (2009). Evaluation of hexane extract of tuber of root of *Cyperus rotundus* Linn (*Cyperaceae*) for repellency against mosquito vectors. J . Parasitol. Res. 5(1): 1 -5.
7. Philomena G . and Nimmi OS. (2011). Cent percent safe centum plants for antiobesity . Int . J. Innova . Tech . Creat. Eng. 1(3):1-19.
8. Jebasingh D1.; Jackson DD.; Venkataraman S. and Emerald BS. (2013). Physiochemical and toxicological studies of the medicinal plant *Cyperus rotundus* L (*Cyperaceae*) . Int. J. Appl. Res. Nat.Prod. 5 (4):1-8.
9. Sharma SK. and Ajay PS.(2011). Antimicrobial investigations on rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. Der. Pharmacia. Lett. 3(3):427-431.
10. Ahmad M.; Mahayrookh M.; Rehman AB. and Jahan N. (2013). Toxicological and biochemical evaluation of ethanolic crude extract of *Cyperus Rotundus*. Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5(4): 538-544.
11. Amalraj DA.; Parkavi C.; Murugaiah K. and Dhanaraj TS. (2012). Hypolipidemic activity of *Cyperous rotundus* on CCl4 induced dyslipidemia in Rats. Asian J. Pharm. 2:51-53.
12. Seeley R. ; Stephens T. and Tate P.(1996). Anatomy and physiology. 4th ed. Mosby-year book, USA. Pp:102,435-446.
13. Diflore MSH. (1981). Atlas of human histology. 5thed. Lee & Febiger. Philadelphia .USA. P: 186.
14. الحلي ، زيد عبد المنعم علي . (2004) . تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية . رسالة ماجستير . كلية العلوم ، جامعة بغداد.
15. Pal DK. and Dutta S. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of the roots and rhizomes of *Cyperus rotundus* L. Indian. J. Pharm. Sci. 68:256-258.
16. Thanabhorn S.; Jaijoy K.; Thamaree S.; Ingkaninan K. and Panthong A. (2005). Acute and subacute toxicities of the ethanol extract from the rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. Mahidol. Univ. J. Pharmaceut. Sci. 32(1-2): 15-22.



شكل رقم (5) : مقطع مستعرض في نسيج الكلية للفئران المعاملة بالتركيز 450 ملغم / كغم من مستخلص نبات السعد يوضح انكماش الكبيبة (H&E) قوة التكبير x40.

المناقشة

قد تتعرض الكلى للتلوث بسبب العديد من العوامل العلاجية، ومن خلال الدراسة الحالية لوحظ أن لمستخلص نبات السعد تأثيراً من الناحية النسيجية على الكلية تمثل بظهور احتقان دموي Congestion بسبب حصول التهاب حاد في نسيج الكلية مما أثر على انسياب الدم داخل الوعاء الدموي مسبباً استرخاء وتوسعاً في الأوعية الدموية وبالتالي تجمع الدم داخل الأوعية (18)، وكرد فعل لحصول التهاب تحدث ظاهرة الارتشاح الخلوي التي تؤدي إلى زيادة في نفاذية الأوعية الدموية بسبب تقلص الخلايا المبطنة للأوعية الدموية فتتم خلايا الدم البيضاء من داخل الوعاء الدموي إلى خارجه لتقوم بألية الدفاع والتعرض ضد الأجسام الغريبة، وقد يحدث الارتشاح نتيجة لفقدان الجسيمات الرابطة Desmosomes التي تقع بين الخلايا البطانية، مما يسمح لخلايا الدم Neutrophils , Monocytes بالانتقال من داخل الوعاء الدموي إلى خارجه (19، 20)، ولوحظ في دراسة سابقة أن معاملة ذكور وإناث الجرذان بالمستخلص الكحولي للسعد سبب زيادة معنوية بمستوى كريات الدم البيضاء والتي تزداد فقط في حالات الالتهاب والأضرار التي تحدث بخلايا وأنسجة الجسم (8). أما الانكماش الذي يحدث للكبيبة فهو ناتج عن تأثير المستخلص داخل نسيج الكلية الذي تسبب في تضخم خلايا الكبيبة مع توسع في الأوعية الدموية الشعرية بسبب التأثير على إنزيم COX-2 الذي يمنع تكوين Prostaglandin المسؤول عن توسع الوعاء الدموي وتقلصه، فعندما يحدث انكماش في تركيب الكبيبة فإن هذا يؤدي إلى تقليل ورود الدم إليها للتقليل من تأثير العوامل العلاجية (المستخلص) (21). وقد ذكرت الدراسات أن لمستخلص نبات السعد دوراً مضاداً للأكسدة ولعلاج قرحة المعدة لاحتوائه على المادة الفعالة الفلافونويد وحمض الأسكوربك والبوليفينول (22)، وبسبب وجود مركب الفينول فقد استخدم المستخلص الكحولي لنبات السعد في علاج تراكم الدهون في الأنسجة (11)، وقد لوحظ أن المستخلص الكحولي لنبات السعد يسبب نقصاناً معنوياً بمستوى البوتاسيوم في الكلية في ذكور وإناث الجرذان عند المعاملة بالمستخلص (8)، كما أن المعاملة بالمستخلص الكحولي للسعد يسبب انخفاضاً معنوياً بمستوى Triglyceride (TG)، Low density lipoprotein (LDL) و Cholesterol (C) في مصل الدم نتيجة لاحتوائه على القلويدات (23).

17. Bancroft JD. and Steven A. (1982). Theory and practices of histological technique. 2nd ed. Churchill Living Stone. London. P.:662.
18. Robbins SL. and Kumar V.(1987). Basic pathology. 4th ed. W.B.Saunders Company.Philadelphia,Landon. pp:29,31,50-53.
19. Sobata R.; Szwed M.; Kasza A.;Bugno M. and Kordula A. (2000). Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription(STATs) induced by cytokines of the IL -6 family. Biophys. Res. Comm. 267-333.
20. Sandritter W. and Thomas C.(1979). Color atlas and text book medical publishers. London. pp:7-11.
21. Loh AHL.; Hons MB. Chi B.; Path FRC. and Cohen AH. (2009). Drug-induced kidney disease – pathology and current concepts. Annal. Acad. Med. 38:240-250.
22. Mohammad A.; Nagarajaiah BH. and Kudagi BL.(2012). Experimental evaluation of antiulcer activity of *Cyperus Rotundus*. Asian. J. Biochem. Pharmaceut. 2:2.
23. Chandratre RS.; Chandarana S. and Mengi SA. (2011) . Lipid lowering activity of alcoholic extract of *Cyperus rotundus* . Int. J. Res. Pharm. Chem. 1(4):1042-1045.

تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في نمو وإزهار صنفين من القرنفل *Dianthus caryophyllus* L.**مشتاق طالب حمادي الزرفي، فاضل حسين رضا الصحاف**

قسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة / جامعة الكوفة / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: phdjamal@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

نفذت التجربة في الظلة الخشبية التابعة لقسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعة الكوفة خلال الموسمين الزراعيين 2013-2014 و 2014-2015 بهدف دراسة تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في نمو وإزهار صنفين من القرنفل. تم زراعة البذور بتاريخ 15/9/2013 و 2014 للموسم الأول والثاني على الترتيب في دايات وهي صنفين (الأحمر GIGANTE ROJO والأصفر GIGANTE AMARILLO) المنتجة من قبل شركة Semillas-Fito الإسبانية، وتم تغريد النباتات بعد ظهور زوجين من الأوراق الحقيقية في أصص بلاستيكية ذات قطر 20 سم وارتفاع 16، وشملت الدراسة ثلاثة عوامل هي صنفين من البذور الحمراء والصفرى والعامل الثاني نوع المستخلصات النباتية: مستخلص عرق السوس ومستخلص بذور الحلبة ومستخلص الكجرات، أما العامل الثالث فقد كان تركيز المستخلصات (0 و 2.5 و 5) و (0 و 2 و 4) و (0 و 7.5 و 15) غم.لتر⁻¹ على التوالي. نفذت التجربة كتجربة عاملية 3×3×2 بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R.C.B.D) وبثلاثة عوامل وثلاث مكررات وكل مكرر يحتوي على 18 معاملة وكل معاملة عبارة عن خمسة أصص، وقورنت المتوسطات حسب أقل فرق معنوي L.S.D. وعند مستوى احتمال 5%. وتم تحليل النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي (Genstat).

بينت نتائج التجربة عدم ظهور تأثير معنوي للصنف وللموسمين في محتوى الأوراق من الجبرلين والزياتين وحامض الأبسيسيك ونسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +الزياتين، بينما تفوق الصنف الأحمر على الصنف الأصفر وللموسمين في المساحة الورقية وقطر الزهرة والعمر المزهري ومحتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين، وعدد الصفوف وقطر أوعية الخشب، وتفوق الصنف الأصفر على الصنف الأحمر في عدد الأوراق ومحتوى الأزهار من صبغة الكاروتين وقصر المدة اللازمة للإزهار، من جهة أخرى، أظهرت النتائج أن رش نباتات الصنف الأصفر بمستخلص الكجرات وبتركيز 7.5 غم.لتر⁻¹ أدى إلى زيادة عدد الأوراق (168.00 و 132.33 ورقة/نبات⁻¹) وللموسمين على التوالي، وأدى رش نباتات الصنف الأحمر بمستخلص الكجرات وبتركيز 7.5 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة العمر المزهري للإزهار (7.00 و 11.45 يوم) وعدد صفوف الخشب (6.00 و 7.00) وللموسمين على التوالي، وأدى رش نباتات الصنف الأصفر بمستخلص عرق السوس وبتركيز 5 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة محتوى الأوراق من الجبرلين (4.15 و 4.93 مايكروغرام.كغم⁻¹) وللموسمين على التوالي، وأدى رش نباتات الصنف الأصفر بمستخلص عرق السوس وبتركيز 2.5 غم.لتر⁻¹ إلى تقليل عدد الأيام اللازمة للإزهار (184.3 و 235.0 يوم) وزيادة محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين (8.23 و 12.74 ملغم.100غم⁻¹) وللموسمين على التوالي، وأدى رش نباتات الصنف الأحمر بمستخلص عرق السوس وبتركيز 2.5 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة قطر الزهرة (5.13 و 7.26 سم) وللموسمين على التوالي، وأدى رش نباتات الصنف الأحمر بمستخلص عرق السوس وبتركيز 5 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة محتوى الأوراق من الزياتين (2.96 و 4.09 مايكروغرام.كغم⁻¹) وللموسمين على التوالي، كما أدى رش نباتات الصنف الأحمر بمستخلص الكجرات وبتركيز 15 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين (12.18 و 18.21 ملغم.100غم⁻¹) وللموسمين على التوالي. وأدى رش نباتات الصنف الأصفر بمستخلص بذور الحلبة وبتركيز 4 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك (3.38 و 2.60 مايكروغرام.كغم⁻¹) ونسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +الزياتين (1.23 و 0.68 مايكروغرام.كغم⁻¹) وللموسمين على التوالي.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية، نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L.**The effect of some plant extracts on the growth and flowering of two carnation (*Dianthus caryophyllus* L) cultivars****Mushtaq T. H. AL-Zurfi and Fadhil H. AL-Sahaf**

Dept. of Horticulture and Landscape Gardening / Faculty of Agriculture/ University of Kufa / Republic of Iraq

ABSTRACT

An experiment was conducted at the lath house of the department of horticulture and landscape design, faculty of agriculture, University of Kufa during the growing seasons of 2013-2014 and 2014-2015 to study the effect of some plant extracts on the growth and flowering of two carnation cultivars. Seeds were sown in 15/9/2013 and 2014 for the first and second season respectively and seedlings of the two cultivars (red GIGANTE ROJO and yellow GIGANTE AMARILLO) produced by Semillas-Fitot Spanish Company at two true leaves stage were transplanted in plastic pots with 20cm in diameter and 16 cm in height. The experiment comprised three factors, two cultivars of carnation, three types of plant extracts Licorice plant, seeds of Fenugreek plant and Roselle plant. Experiments were adopted as factor 2×3×3 in randomized complete block design (R.C.B.D) with three replicates. The means of treatments were compared using the Least Significant Difference (L.S.D.) test at 0.05 probability. Results showed that there was no significant effect for both seasons of cultivar on leaves content of GA₃, Zeatin, ABA, and the ratio of ABA to GA₃+ Zeatin, while the red cultivar, as compared to the yellow cultivar, had lower leaf area, flower diameter, vase life, flower contents of anthocyanins, number and diameter of xylem ray vessels. whereas the yellow cultivar, as compared to the red cultivar, had high number of leaves and reduction of the number of days to flowering in both seasons. On the other hand, Results showed that spraying of yellow cultivar with roselle calyx extracts at a concentration (7.5 g.l⁻¹) increased number of leaves (168.00, 132.33 leaf.plant⁻¹), for both seasons respectively. Spraying the red cultivar with roselle calyx extracts concentration (7.5 g.l⁻¹) increased vase life (7.00, 11.45 days) and number of xylem ray vessels (6.00, 7.00 vessels) for both seasons respectively. The spraying of the yellow cultivar with Licorice extracts at concentration (5 g.l⁻¹) increase the GA₃ (4.15, 4.93 µg.kg⁻¹) for both seasons respectively. The spraying of the yellow cultivar with Licorice extracts at a concentration (2.5 g.l⁻¹) led to decreased number of days to flowering (235.0, 184.3 days) and increased flowers content of carotene pigment (8.23, 12.74 mg.100 g⁻¹) for both seasons respectively. The spraying the red cultivar with Licorice at concentration (2.5g.l⁻¹) increased the flower diameter (5.13, 7.26 cm) for both seasons respectively. The spraying of the red cultivar with of Licorice extracts at concentration (5g.l⁻¹) increased Zeatin (2.96, 4.09 µg.kg⁻¹) for both seasons respectively. The spraying the red cultivar with roselle extracts at a concentration (15g.l⁻¹) increased the flowers content of anthocyanins pigment which was (12.18, 18.12 mg.100 g⁻¹) for both seasons respectively. Spraying the yellow cultivar with Fenugreek seed extracts at a concentration (4 g.l⁻¹) increased ABA (3.38, 2.60 µg.kg⁻¹) and the ratio of ABA to GA₃+ Zeatin (1.23, 0.68) for both seasons respectively.

المقدمة

ROJO والاصفر GIGANTE AMARILLIO) المنتجة من قبل شركة Semillas-Fito الأسبانية وتم توفير النباتات بعد ظهور زوجين من الأوراق الحقيقية (12) في أصص بلاستيكية ذات قطر 20 سم وأرتفاع 16 سم فيها تربة (رملية) حجم 2 لتر وحللت صفات التربة الكيميائية والفيزيائية في مختبر الدراسات العليا كلية الزراعة - جامعة الكوفة (جدول رقم 1)، وشملت التجربة ثلاثة عوامل هي صنفين من البذور الأحمر والأصفر والعامل الثاني نوع المستخلصات النباتية هي مستخلص عرق السوس بذور الحلبة الكجرات، أما العامل الثالث هو تراكيز المستخلصات (0.25، 0.5، 2.5، 4، 10، 15، 7.5، 15) غم.لتر⁻¹ على التوالي، كما تم رش المستخلصات النباتية لمرتين، الأولى بعد ظهور ستة أزواج من الأوراق على النباتات والثانية بعد شهر من الرش الأولى، تم قرط القمة النامية للساق الرئيس للنبات ولكل المعاملات وذلك بعد تكون سبعة أزواج من الأوراق على النبات، لغرض تكوين واختيار أربعة أفرع لتربى عليها النباتات (13)، وسمنت النباتات بالسماد المركب (N.P.K) وبمعدل 2.5 غم. لكل أصيص ولكل المعاملات (14)، وعند حدوث انخفاض في درجات الحرارة في فصل الشتاء، تم تغطية الظلة الخشبية بغطاء بولي أثيلين شفاف وأجريت كافة عمليات الخدمة من ري وتعشيب وتسليك للنباتات ولكل المعاملات وكلما دعت الحاجة لذلك.

جدول رقم (1): تحليل التربة المستخدمة في التجربة

الصفات	وحدة القياس	القيمة
درجة تفاعل التربة pH	—	7.62
درجة الايصالية الكهربائية	ديسي سيمنز م ⁻¹	2.57
N	غم. 100 كغم ⁻¹	0.55
P	ملغم.لتر ⁻¹	2.55
K+	سنتسي مول كغم ⁻¹	15.2
Mg++	سنتسي مول كغم ⁻¹	1.4
Ca++	ملغم.لتر ⁻¹	19.0
Fe++	ملغم.لتر ⁻¹	2.35
Zn++	ملغم.لتر ⁻¹	1.03
S	سنتسي مول كغم ⁻¹	6.5
Cl-	سنتسي مول كغم ⁻¹	2.4
Na+	ملغم.لتر ⁻¹	17.6
Ba	مايكرو غرام.لتر ⁻¹	108.8
المادة العضوية	%	0.95
طين Clay	%	2.0
غرين Silt	%	5.2
رمل Sand	%	92.8
نسجة التربة Texture	—	رملية

نفذت التجربة كتجربة عاملية بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized Complete Block Design (R.C.B.D) وبثلاث عوامل وثلاث مكررات وكل مكرر يحتوي على 16 معاملة وكل معاملة عبارة خمسة أصص، أي مجموع الأصص في التجربة 240 أصيصاً، وقورنت المتوسطات حسب أقل فرق معنوي L.S.D. وعند مستوى احتمال 5% (15، 16)، وتم قياس الصفات التالية:

عدد الأوراق الكلية (ورقة نبات⁻¹)، والمساحة الورقية (سم²)، عدد الأيام اللازمة للإزهار (يوم) وقطر الزهرة (سم)، والعمر المزهري للإزهار (يوم) ومحتوى الأوراق من منظمات النمو ومحتوى الأزهار من صبغتي الكاروتين والأنثوسيانين (ملغم. 100 غم⁻¹) وفق طريقة (17)، وعدد صفوف الخشب (صف) وقطر أوعية الخشب (μm).

يعد القرنفل من الأزهار العشبية المعمرة ويزرع في الحدائق ويعطى أزهاراً ذات ألوان جذابة وهو أحد أهم الأزهار المعروفة عالمياً ويباع منها سنوياً أعداد كبيرة، كما يعتبر من أهم أزهار القطف التجارية في أغلب دول العالم (1). ينتمي جنس *Dianthus* إلى العائلة القرنفلية Caryophyllaceae ذات الفلقتين، حيث تحتوي على 80 جنساً و2000 نوعاً بعضها حولي والبعض الآخر معمر، وقد أمكن التعرف على 300 نوع ينتمي إلى الجنس *Dianthus* (2).

بينت الدراسات بأن هناك العديد من المستخلصات النباتية لها تأثير في تحفيز صفات النمو الخضري والزهرى للعديد من النباتات، ويعود ذلك إلى أن هذه المستخلصات تحتوي على عدد من المركبات الكيميائية الطبيعية والتي تختلف باختلاف الأجزاء النباتية ومراحل النمو والظروف البيئية التي تتعرض لها النباتات (3)، ونظراً لما تسببه المواد الكيميائية الصناعية من آثار جانبية قد تكون سلبية على الإنسان والبيئة والكائنات الحية الأخرى، فقد تم الاتجاه إلى إيجاد البدائل من المركبات الطبيعية والتي يمكن أن تؤدي تأثيراً مشابهاً لما تؤديه المركبات الكيميائية الصناعية (4)، ومن هذه المستخلصات مستخلص عرق السوس *glabra* L. *Glycyrrhiza*، الذي ينتمي إلى العائلة البقولية Leguminosae، ومن أهم المركبات التي يعتمد عليها في تقييم نوعية عرق السوس هو محتواه من Glycyrrhizin الذي يفوق بحلوه سكر القصب بحوالي 50 مرة، وتوجد هذه المادة على شكل أملاح الكالسيوم والبوليتاسيوم للحامض Glycyrrhizic acid، ومستخلص بذور الحلبة *Trigonell foenum-graecum* وهي أحد نباتات العائلة البقولية Leguminosae، نبات عشبي حولي شتوي قائم غزير التفريع يصل ارتفاعه إلى 80 سم، أوراقه مركبة ريشية معنقة ذات ثلاث وريقات، وتكمن أهمية الحلبة في بذورها التي تحتوي على العديد من المركبات الكيميائية الهامة غذائياً وطيباً (6، 7)، فهي تحتوي على البروتينات حيث تصل نسبتها إلى 36% من الوزن الجاف، وتتكون هذه البروتينات من مجموعة من الأحماض الأمينية أهمها اللايسين Lysine وليوسين Leucine، كما تحتوي على أحماض أمينية أخرى مثل الهستيدين Histidine والأرجينين Arginine والتربتوفان Tryptophan وحامض الإيسبارتيك Aspartic وحامض الجلوتاميك Glutamic acid (8، 9)، ومستخلص نبات الكجرات *Hibiscus sabdariffa* L. من نباتات العائلة الخبازية Malvaceae وهو من النباتات الطبية المهمة اقتصادياً وغذائياً، عشبي، وزراعته واستخدامه واسع في مناطق عديدة من العالم وخاصة المنطقة العربية (10)، وتحتوي الأجزاء المختلفة لنبات الكجرات على العديد من المواد الكيميائية المختلفة، فالأوراق الكاسية لنبات الكجرات تعد من الأجزاء المهمة والغنية بمحتواها من المواد الكيميائية الفعالة، حيث تحتوي على البروتينات والدهون والكربوهيدرات والألياف والثيامين Thiamine والريبوفلافين Riboflavin والنياسين Niacin وفيتامين C (Acorbic acid) وفيتامين E وعناصر معدنية عديدة مثل (الفسفور والبوتاسيوم والحديد والزنك والكالسيوم والمنغنيز) (11).

هدفت التجربة لدراسة تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في مؤشرات النمو والإزهار لصنفين من القرنفل لإنتاج أزهار قطف ذات مواصفات تسويقية مرغوبة وتحديد أفضل نوع وتركيز لبعض المستخلصات النباتية.

المواد وطرق العمل

نفذت التجربة في الظلة الخشبية - التابعة لقسم البستنة وهندسة الحدائق كلية الزراعة - جامعة الكوفة خلال الموسمين الزراعيين 2013-2014 و2014-2015 لبيان تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في نمو وإزهار صنفين من القرنفل. تمت زراعة البذور بتاريخ 2013/9/15 و2014 للموسم الأول والثاني على الترتيب في دايات وهي صنفين (الأحمر GIGANTE

النتائج والمناقشة

أولاً: تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في صفات النمو الخضري

1. عدد الأوراق (ورقة نبات¹): أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (2) تفوق نباتات الصنف الأصفر على الصنف الأحمر في عدد الأوراق، حيث بلغ 128.15 ورقة نبات¹ مقارنة بالصنف الأحمر الذي بلغ 99.67 ورقة نبات¹. وأعطى مستخلص الكجرات أعلى معدل في عدد الأوراق بلغ 123.50 ورقة نبات¹ مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 106.78 ورقة نبات¹ وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً. وأظهر الرش بين الصنف الأصفر مع مستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 غم/لتر¹ أعلى معدل في عدد الأوراق، حيث بلغ 168.00 ورقة نبات¹ مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص الحلبة الذي بلغ 71.67 ورقة نبات¹.

وفي الموسم الثاني، بينت نتائج جدول رقم (2) تفوق نباتات الصنف الأصفر في عدد الأوراق بلغ 94.07 ورقة نبات¹ مقارنة بالصنف الأحمر حيث بلغ 68.11 ورقة نبات¹. وأعطى مستخلص الكجرات أعلى معدل بلغ 96.94 ورقة نبات¹ مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 74.06 ورقة نبات¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً، وأعطى رش بين الصنف الأصفر مع مستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 غم/لتر¹ أعلى معدل في عدد الأوراق بلغ 132.33 ورقة نبات¹ مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص الحلبة بلغ 55.00 ورقة نبات¹.

2. المساحة الورقية (سم²): أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (3) تفوق نباتات الصنف الأحمر على الصنف الأصفر في أعطاء أعلى معدل في المساحة الورقية بلغ 466.5 سم² مقارنة بالصنف الأصفر بلغ 383.3 سم². وأعطى مستخلص الكجرات أعلى معدل في هذه الصفة بلغ 602.1 سم² مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 265.6 سم². وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأعطى التداخل رش الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات وبتريكز 15 غم/لتر¹ أكبر مساحة ورقية بلغت 947.2 سم² مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات بلغ 117.9 سم².

وفي الموسم الثاني بينت نتائج جدول رقم (3) تفوق نباتات الصنف الأحمر في أعطاء أعلى معدل في المساحة الورقية بلغت 430.4 سم² مقارنة بالصنف الأصفر بلغ 342.2 سم². وأعطى مستخلص الكجرات أعلى معدل بلغ 553.5 سم² مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 222.0 سم². وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأظهر التداخل بين الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 غم/لتر¹ أعلى معدل بلغ 877.2 سم² مقارنة بالصنف الأصفر وبدون رش مستخلص الكجرات بلغ 114.5 سم² اختلفت صفات النمو الخضري بين الصنفين معنوياً، إذ وجد أن الصنف الأصفر يتميز بأكبر عدد من الأوراق (جدول رقم 2)، لكن مساحته الورقية كانت أقل من الصنف الأحمر (جدول رقم 3) على الرغم من كثرة عدد الأوراق، أما الصنف الأحمر فقد تميز بأكبر المساحة الورقية، ويعود ذلك بسبب اتساع عرض وطول الورقة في الصنف الأحمر، مما يسد على دور التراكم الوراثية واستجاباتها للظروف البيئية، الأمر الذي أدى إلى اختلاف الأصناف في مدى تميز كل صنف عن الآخر في الصفات قيد الدراسة. يلاحظ من نتائج (جدول رقم 2) وجود زيادة معنوية في عدد الأوراق عند الرش بمستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5 غم/لتر¹، وقد يعود السبب إلى دور المستخلص في احتوائه على العناصر الغذائية (18) المهمة في تغذية النبات، ومنها عنصر الفسفور وما له من دور في جميع العمليات الحيوية مثل انقسام واستطالة الخلايا النباتية، ونقل الطاقة إلى كافة أجزاء النبات، وله دور في عملية التركيب الضوئي والتنفس وإنتاج الطاقة، وقد يعود السبب إلى دور المركبات الداخلة في تركيب المستخلص مثل حامض الكاليسيريزيك Glycyrrhizic acid، فعملية تصنيعه تبدأ

من خلال حامض الميفالونك Mevalonic acid والذي يعتبر البادئ ومهما في بناء الجبرلين وكذلك يؤدي إلى زيادة مستوى الجبرلين الداخلي، والذي يسهم في تحفيز النمو الخضري من البراعم الساكنة، وكذلك دوره في انقسام واستطالة الخلايا النباتية (19، 20)، وطول وعرض الورقة، الأمر الذي أدى إلى زيادة المساحة الورقية (21، 22).

وأظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في عدد الأوراق والمساحة الورقية عند الرش بمستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 و 15 غم/لتر¹، وقد يعود السبب إلى احتواء مستخلص الكجرات على العناصر الغذائية ومنها الفسفور واليوتاسيوم والحديد والتي لها دور مهم في تغذية النبات من خلال تشجيع انقسام واستطالة الخلايا النباتية وكذلك تنشيط أنزيمات تصنيع البروتين (11)، وكذلك احتواء المستخلص على حامض الأسكوربيك الذي له دور في العديد من العمليات الفسيولوجية، إذ يعمل على تشجيع عمل الأنزيمات المضادة للأكسدة (Antioxidants) (23)، إذ يؤدي إلى زيادة كفاءة عملية التركيب الضوئي وبدورها تؤدي إلى تصنيع المواد الغذائية وذلك لدخوله كمراقق أنزيمي في التفاعلات الأنزيمية لأيض الكربوهيدرات (24)، وكذلك دور المستخلص في كسر السيادة القمية من خلال التأثير المشجع على إزالة المواد المثبطة للأوكسينات الموجودة في القمة النامية، الأمر الذي يؤدي إلى تحفيز انقسام الخلايا النباتية والتي تزيد من حجم المجموع الخضري (25، 26). كما بينت النتائج أن رش مستخلص بذور الحلبة وبتريكز 4 غم/لتر¹ أعطى أقل معدل في صفات النمو الخضري مقارنة بمستخلص عرق السوس ومستخلص الكجرات، وقد يعود السبب إلى احتواء مستخلص بذور الحلبة على مركبات فينولية لها دور في تثبيط انقسام الخلايا وكذلك تثبيط عمل هرموني الجبرلين والأوكسين اللذين لهما دور في تحفيز الخلايا النباتية على الانقسام وبالتالي زيادة المجموع الخضري (27)، أو قد يعود السبب إلى أن مستخلص بذور الحلبة في التراكيز العالية يعتبر محفزاً لحامض الأبسيسيك والذي يعتبر من مثبطات النمو وبالتالي يؤدي إلى قلة النمو الخضري.

ثانياً: تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في صفات النمو الزهري

1. عدد الأيام اللازمة للإزهار: أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (4) أن نباتات الصنف الأصفر قد بكرت بالإزهار، إذ بلغ 214.1 يوماً مقارنة بالصنف الأحمر الذي استغرق 222.1 يوماً. وأدى مستخلص عرق السوس إلى تقليل عدد الأيام اللازمة للإزهار بلغ 214.3 يوماً مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 221.0 يوماً. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً، وأكدت النتائج أن الصنف الأصفر مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 غم/لتر¹ أدى إلى التبرير بالإزهار بلغ 203.0 يوماً مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 235.0 يوماً. وفي الموسم الثاني بينت النتائج في جدول رقم (4) أن نباتات الصنف الأصفر تفوقت معنوياً في تقليل عدد الأيام اللازمة للإزهار بلغ 198.4 يوماً مقارنة بالصنف الأحمر الذي بلغ 203.5 يوماً. وأعطى مستخلص الكجرات أقل عدد من الأيام اللازمة للإزهار بلغ 197.1 يوماً مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 206.1 يوماً. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً، وأكدت النتائج أن رش الصنف الأصفر بمستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5 غم/لتر¹ قد أعطى أقل عدد أيام للإزهار بلغ 184.3 و 185.3 يوماً على التوالي مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 216.3 يوماً.

جدول رقم (2): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في عدد الأوراق (ورقة نبات¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
61.50	63.33	59.67	82.33	92.33	72.33	0.0	عرق السوس
98.17	103.33	93.00	127.83	150.33	105.33	2.5	
102.17	114.33	90.00	124.17	134.67	113.67	5.0	
58.67	62.33	55.00	81.83	92.00	71.67	0.0	الحلبة
86.83	98.33	75.33	127.50	142.00	113.00	2.0	
76.67	86.33	67.00	111.00	128.00	94.00	4.0	
59.17	60.67	57.67	83.17	92.00	74.33	0.0	الكجرات
120.33	132.33	108.33	145.00	168.00	122.00	7.5	
111.33	125.67	97.00	142.33	154.00	130.67	15.0	
4.545	6.428		2.549	3.604		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	94.07	78.11	تأثير نوع المستخلص	128.15	99.67	تأثير الصنف	
	2.143			1.201		أ. ف. م. (0.05)	
87.28	93.67	80.89	111.44	125.78	97.11	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
74.06	82.33	65.78	106.78	120.67	92.89	الحلبة	
96.94	106.22	87.67	123.50	138.00	109.00	الكجرات	
2.624	3.711		1.471	2.081		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (3): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في المساحة الورقية (سم²) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
131.2	121.0	141.3	144.8	120.6	169.1	0.0	عرق السوس
504.2	416.1	592.4	537.8	467.3	608.4	2.5	
515.1	461.9	568.4	540.0	467.7	612.4	5.0	
136.3	119.6	152.9	150.3	124.0	176.6	0.0	الحلبة
271.6	260.3	282.9	362.6	364.9	360.2	2.0	
258.1	258.8	257.3	283.8	286.2	281.5	4.0	
130.1	114.5	145.7	125.6	117.9	133.4	0.0	الكجرات
770.0	662.8	877.2	821.5	730.2	912.7	7.5	
761.7	667.6	855.7	859.2	771.2	947.2	15.0	
40.03	56.61		20.69	29.26		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	342.2	430.4	تأثير نوع المستخلص	383.3	466.5	تأثير الصنف	
	18.87			9.75	أ. ف. م. (0.05)		
383.5	333.0	434.0	407.6	351.8	463.3	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
222.0	212.9	231.1	265.6	258.3	272.8	الحلبة	
553.5	481.7	626.2	602.1	539.8	664.5	الكجرات	
23.11	32.69		11.94	16.89		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (4): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في عدد الأيام اللازمة للإزهار (يوم) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم/لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
211.1	208.6	213.6	228.0	221.0	235.0	0.0	عرق السوس
188.5	184.3	192.6	207.0	203.0	211.0	2.5	
187.5	185.3	190.6	211.1	207.0	215.3	5.0	
211.3	207.3	215.3	227.8	224.6	231.0	0.0	الحلبة
203.0	202.0	204.0	215.3	213.0	217.6	2.0	
204.0	203.3	204.6	219.8	216.3	223.3	4.0	
211.6	207.0	216.3	226.5	221.0	232.0	0.0	الكجرات
187.8	187.6	188.0	209.0	206.0	212.0	7.5	
191.8	190.3	193.3	212.6	208.3	216.0	15.0	
2.24	3.17		2.57	3.64		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	198.4	203.5	تأثير نوع المستخلص	214.1	222.1	تأثير الصنف	
	1.05			1.21		أ. ف. م. (0.05)	
199.7	196.1	203.3	214.3	210.1	223.7	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
206.1	204.2	208.0	221.0	218.0	224.0	الحلبة	
197.1	195.0	199.2	219.0	214.3	218.6	الكجرات	
1.29	1.83		1.48	2.10		أ. ف. م. (0.05)	

3. العمر المزهرى للإزهار (يوم): بينت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (6) أن نباتات الصنف الأحمر أعطت أطول مدة في العمر المزهرى بلغ 4.25 يوما مقارنة بالصنف الأصفر بلغ 3.88 يوما. وأعطى مستخلص الكجرات أطول عمر مزهرى بلغ 5.00 يوما مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 3.16 يوما. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا وأعطى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15 غم/لتر⁻¹ أطول مدة في العمر المزهرى بلغ 7.00 و 7.33 يوما على التوالي مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 2.00 يوما.

وأظهرت نتائج الموسم الثاني في جدول رقم (6) أن نباتات الصنف الأحمر أعطت أطول عمر مزهرى بلغ 6.41 يوما مقارنة بالصنف الأصفر بلغ 5.26 يوما. وكان لمستخلص عرق السوس تأثير إيجابي في إطالة العمر المزهرى بلغ 7.11 يوما مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 3.89 يوما. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا وأعطى الصنف الأحمر مع مستخلص عرق السوس وبتركيز 5 غم/لتر⁻¹ أو مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 غم/لتر⁻¹ أطول عمر مزهرى بلغ 11.33 و 11.45 يوما على التوالي مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش أي نوع من المستخلصات الذي بلغ 2.33 يوما.

2. قطر الزهرة (سم): أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (5) أن نباتات الصنف الأحمر توقفت معنويا على الصنف الأصفر في قطر الزهرة إذ بلغ 4.75 سم مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 3.78 سم. وأعطى مستخلص عرق السوس ومستخلص الكجرات أكبر قطر للزهرة بلغ 4.17 و 4.60 سم على التوالي مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ فيه قطر الزهرة 3.86 سم. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا وأعطى الصنف الأحمر مع مستخلص عرق السوس بتركيز 2.5 و 5 غم/لتر⁻¹ وكذلك مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15 غم/لتر⁻¹ أكبر قطر للزهرة بلغ 5.13 و 6.46 و 6.20 و 6.68 سم على التوالي مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 2.26 سم.

يلاحظ من نتائج الموسم الثاني في جدول رقم (5) أن نباتات الصنف الأحمر أعطت أعلى معدل في قطر الزهرة بلغ 5.07 سم مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 4.11 سم. وأعطى مستخلص عرق السوس أكبر قطر للزهرة بلغ 5.11 سم مقارنة بمستخلص الحلبة بلغ 3.90 سم. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا وأعطى التداخل بين الصنف الأحمر مع مستخلص عرق السوس بتركيز 2.5 غم/لتر⁻¹ أكبر قطر للزهرة بلغ 7.26 سم مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص الحلبة الذي بلغ 2.66 سم.

جدول رقم (5): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في قطر الزهرة (سم) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
2.98	2.80	3.16	2.80	2.26	3.33	0.0	عرق السوس
6.26	5.26	7.26	4.66	4.20	5.13	2.5	
5.66	5.26	6.06	5.56	4.66	6.46	5.0	
2.96	2.66	3.26	3.01	2.73	3.30	0.0	الحلبة
4.86	4.60	5.13	4.78	4.23	5.33	2.0	
3.88	3.40	4.36	4.25	4.13	4.36	4.0	
3.03	2.80	3.26	2.95	2.46	3.43	0.0	الكجرات
5.60	5.06	6.13	5.36	4.53	6.20	7.5	
6.05	5.13	6.96	5.74	4.80	6.68	15.0	
0.444	0.628		0.205	0.290		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	4.11	5.07	تأثير نوع المستخلص	3.78	4.75	تأثير الصنف	
	0.209			0.096		أ. ف. م. (0.05)	
5.11	4.37	5.83	4.17	3.71	4.64	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
3.90	3.55	4.25	3.86	3.60	4.13	الحلبة	
4.76	4.40	5.12	4.60	3.93	5.27	الكجرات	
0.256	0.363		0.118	0.167		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (6): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في العمر المزهري (يوم) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
3.00	2.33	3.67	2.50	2.66	2.33	0.0	عرق السوس
8.67	7.67	9.67	4.83	4.33	5.33	2.5	
10.39	9.33	11.33	4.83	4.66	5.00	5.0	
2.50	2.33	2.67	2.66	2.66	2.66	0.0	الحلبة
4.67	4.67	4.67	3.50	3.66	3.33	2.0	
4.50	4.33	4.67	3.33	3.33	3.33	4.0	
2.50	2.33	2.67	2.16	2.33	2.00	0.0	الكجرات
9.89	8.33	11.45	6.33	5.66	7.00	7.5	
9.83	9.00	10.67	6.50	5.66	7.33	15.0	
0.922	1.304		0.787	1.113		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	5.26	6.41	تأثير نوع المستخلص	3.88	4.25	تأثير الصنف	
	0.435			0.371		أ. ف. م. (0.05)	
7.11	6.22	8.00	4.05	3.88	4.22	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
3.89	3.78	4.00	3.16	3.22	3.11	الحلبة	
6.50	5.78	7.22	5.00	4.55	5.44	الكجرات	
0.532	0.753		0.454	0.642		أ. ف. م. (0.05)	

مايكروغرام.كغم⁻¹ على التوالي مقارنة بالصف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 1.77 مايكروغرام.كغم⁻¹.

2. محتوى الأوراق من الزيوتين (مايكروغرام.كغم⁻¹): بينت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (8) عدم وجود فرق معنوي للصفين في محتوى الأوراق من الزيوتين. بينما تفوق مستخلص الكجرات في إعطاء أعلى معدل من الزيوتين بلغ 2.20 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 1.35 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأدى تداخل الصف الأحمر مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 5غم.لتر⁻¹ وكذلك الصف الأصفر مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5غم.لتر⁻¹ إلى زيادة معنوية في محتوى الأوراق من الزيوتين بلغ 2.96 و 2.98 مايكروغرام.كغم⁻¹ على التوالي مقارنة بالصف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 0.99 مايكروغرام.كغم⁻¹.

وفي الموسم الثاني بينت نتائج نفس الجدول أن الصف الأحمر تفوق معنوياً في إعطاء أكبر محتوى من الزيوتين بلغ 2.56 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بالصف الأصفر الذي بلغ 2.32 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأعطى مستخلص عرق السوس أو الكجرات أعلى معدل بلغ 2.95 و 2.97 مايكروغرام.كغم⁻¹ على التوالي مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 1.77 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأعطى التداخل بين الصف الأحمر مع مستخلص عرق السوس بتركيز 5غم.لتر⁻¹ وكذلك مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15غم.لتر⁻¹ أعلى معدل من الزيوتين بلغ 4.09 و 4.02 و 4.08 مايكروغرام.كغم⁻¹ على التوالي مقارنة بالصف الأصفر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 1.23 مايكروغرام.كغم⁻¹.

3. محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك (مايكروغرام.كغم⁻¹): يلاحظ من نتائج الموسم الأول في جدول رقم (9) عدم وجود فرق معنوي للصفين في محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك، بينما أعطى مستخلص الحلبة أعلى معدل بلغ 2.21 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بمستخلص عرق السوس الذي بلغ 0.95 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأعطى تداخل الصف الأصفر مع مستخلص الحلبة وبتريكز 4غم.لتر⁻¹ أعلى معدل في محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك، إذ بلغ 3.38 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بالصف الأحمر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 0.84 مايكروغرام.كغم⁻¹.

وفي الموسم الثاني بينت نتائج نفس الجدول عدم وجود تأثير معنوي للصفين في محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك. بينما أعطى مستخلص الحلبة أعلى معدل في هذه الصفة إذ بلغ 1.79 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بمستخلص عرق السوس الذي بلغ 0.93 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأعطى تداخل الصفين الأحمر والأصفر مع مستخلص الحلبة وبتريكز 4غم.لتر⁻¹ أعلى معدل في محتوى الأوراق من حامض الأبسيسيك بلغ 2.48 و 2.60 مايكروغرام.كغم⁻¹ على التوالي، وكذلك الصف الأصفر مع مستخلص الحلبة بتركيز 2غم.لتر⁻¹ بلغ 2.34 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بالصف الأحمر من دون رش مستخلص الحلبة الذي بلغ 0.78 مايكروغرام.كغم⁻¹.

4. نسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +زيوتين: أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (10) عدم وجود فرق معنوي للصفين في نسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +زيوتين. بينما أعطى مستخلص الحلبة أعلى نسبة بلغت 0.62 مقارنة بمستخلص عرق السوس والكجرات والتي بلغت 0.19 و 0.19 على التوالي. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً وأظهر الصف الأصفر مع مستخلص الحلبة وبتريكز 4غم.لتر⁻¹ ارتفاع نسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +زيوتين بلغت 1.23 مقارنة بالصف الأحمر مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5غم.لتر⁻¹ حيث بلغت 0.13.

يلاحظ أن الاختلافات في صفات النمو الزهري بين الصفين كانت معنوية، حيث تميز الصف الأصفر بفتح الأزهار مبكراً مما أدى إلى تقليل عدد الأيام اللازمة للإزهار، أما الصف الأحمر فقد تميز بفطر زهرة أكبر وتفق في عدد البتلات والعمر المزهري للأزهار، وقد يعود السبب إلى دور التراكيب الوراثية للصفين ومدى استجابتها للظروف البيئية من درجات الحرارة والإضاءة الكافية التي تؤثر في أداء العمليات الحيوية لبعض التراكيب الوراثية وبالتالي تؤدي إلى تحفيز النبات على الإزهار المبكر.

أظهرت نتائج الجدول أرقام (4-6) وجود زيادة معنوية في صفات النمو الزهري عند الرش بمستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5غم.لتر⁻¹، إذ قلل عدد الأيام اللازمة وزاد قطر الزهرة والعمر المزهري للأزهار، وقد يعود السبب في ذلك إلى احتواء المستخلص على العناصر الغذائية الضرورية التي تؤدي إلى التغذية الكافية والمتوازنة، وكذلك حامض الميفالونك Mevalonic acid الذي يعتبر البادئ الحيوي للجبرلين مما يؤدي إلى زيادة انقسام واستطالة الخلايا النباتية، إذ أدى إلى تحسين صفات النمو الخضري مما يسرع من تشجيع نمو وتطور البراعم الزهرية (28)، وقد يعود سبب زيادة العمر المزهري إلى زيادة في عدد صفوف وقطر أوعية الخشب للساق الزهري، مما أدى إلى زيادة امتصاص الماء والمواد الغذائية وتراكمها في الأزهار، وقد أدى تجمع السكريات والمواد الكربوهيدراتية وكثرة تجمع المواد الغذائية في بتلات الأزهار إلى إطالة عمر الأزهار المزهري (جدول رقم 6) (30، 31). أما عند رش مستخلص الكجرات على نبات القرنفل وبتريكز 7.5 و 15غم.لتر⁻¹ فادى إلى زيادة معنوية في صفات النمو الزهري، وقد يعود السبب إلى دور مستخلص الكجرات في تشجيع النمو الخضري بسبب احتوائه على العديد من العناصر الغذائية وحامض الأسكوربيك والتي تؤدي دوراً مهماً في تنظيم الانقسام الخلوي وزيادة اتساع الخلايا النباتية، مما يؤدي إلى زيادة حجم المجموع الخضري (11)، من خلال التأثير على العديد من العمليات الفسيولوجية مثل التركيب الضوئي والتنفس وإنتاج الطاقة، وكذلك تنظيم نشاط الهرمونات وتحفيزها في التأثير في الفعاليات الحيوية، مما يؤدي إلى تحفيز تحول البراعم الخضرية إلى براعم زهرية فيسرع في الأزهار (جدول رقم 4) (32، 33). كما يلاحظ من النتائج أن رش النبات بمستخلص بذور الحلبة وبتريكز 4غم.لتر⁻¹ أعطى أقل القيم في جميع صفات النمو الزهري مقارنة بمستخلص عرق السوس ومستخلص الكجرات، وقد يعود السبب إلى احتواء المستخلص على قلويد الكولين الذي يعمل كمثبط لعمل الجبرلين، مما يقلل من تأثيره في النبات، الأمر الذي يؤدي إلى تأخر تحول البراعم الخضرية إلى زهرية وقللة المعدلات للصفات الزهرية.

ثالثاً: تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في منظمات النمو

1. محتوى الأوراق من الجبرلين (مايكروغرام.كغم⁻¹): أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (7) عدم وجود فرق معنوي للصفين في محتوى الأوراق من الجبرلين، وأعطى مستخلص عرق السوس أعلى معدل في محتوى الأوراق من الجبرلين بلغ 3.47 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 2.28 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً. وبينت النتائج أن تداخل الصف الأصفر مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 5غم.لتر⁻¹ أدى إلى زيادة محتوى الأوراق من الجبرلين بلغ 4.15 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بالصف الأحمر من دون رش مستخلص الكجرات، إذ بلغ 1.77 مايكروغرام.كغم⁻¹.

وبينت نتائج الموسم الثاني في جدول رقم (7) أن الصفين لم يختلفا في محتوى الأوراق من الجبرلين. بينما أعطى مستخلص عرق السوس أعلى معدل في هذه الصفة بلغ 3.99 مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 2.22 مايكروغرام.كغم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيراً معنوياً، حيث بينت النتائج أن رش الصف الأحمر والأصفر بمستخلص عرق السوس وبتريكز 5غم.لتر⁻¹ أدى إلى زيادة معنوية في محتوى الأوراق من الجبرلين إذ بلغ 5.03 و 4.93

جدول رقم (7): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في محتوى الأوراق من الجبرلين (مايكروغرام.كغم⁻¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
2.09	2.23	1.95	2.02	2.12	1.93	0.0	عرق السوس
4.48	4.84	4.12	4.41	3.98	4.04	2.5	
4.98	4.93	5.03	3.99	4.15	3.84	5.0	
1.95	1.88	2.02	2.25	2.30	2.20	0.0	الحلبة
2.56	2.22	2.91	2.33	2.83	1.83	2.0	
2.47	2.23	2.71	2.26	1.58	2.94	4.0	
2.28	1.77	2.79	1.84	1.92	1.77	0.0	الكجرات
3.03	3.03	3.04	3.03	3.15	2.92	7.5	
3.35	3.10	3.60	3.51	3.37	3.65	15.0	
0.838	1.185		0.810	1.146		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	2.90	3.17	تأثير نوع المستخلص	2.80	2.90	تأثير الصنف	
	غ م			غ م		أ. ف. م. (0.05)	
3.99	4.02	3.95	3.47	3.35	3.60	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
2.22	2.04	2.41	2.28	2.23	2.32	الحلبة	
2.89	2.63	3.14	2.80	2.81	2.78	الكجرات	
0.483	0.684		0.468	0.661		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (8): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في محتوى الأوراق من الزيئاتين (مايكروغرام.كغم⁻¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
1.30	1.23	1.37	1.02	1.00	1.03	0.0	عرق السوس
3.82	3.91	3.74	2.28	2.37	2.20	2.5	
3.80	3.52	4.09	2.68	2.41	2.96	5.0	
1.26	1.26	1.27	1.03	1.01	1.05	0.0	الحلبة
1.59	1.70	1.49	1.49	1.35	1.62	2.0	
1.65	1.54	1.76	1.53	1.29	1.77	4.0	
1.27	1.25	1.30	1.00	0.99	1.02	0.0	الكجرات
3.88	3.74	4.02	2.92	2.98	2.87	7.5	
3.50	2.92	4.08	2.67	2.47	2.88	15.0	
0.445	0.629		0.470	0.665		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	2.32	2.56	تأثير نوع المستخلص	1.76	1.93	تأثير الصنف	
	0.209			غ م		أ. ف. م. (0.05)	
2.95	2.83	3.06	1.99	1.92	2.06	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
1.77	1.50	2.05	1.35	1.22	1.48	الحلبة	
2.97	2.64	3.11	2.20	2.14	2.26	الكجرات	
0.257	0.363		0.271	0.384		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (9): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في محتوى الأوراق من حامض الازيسيك (مايكروغرام.كغم⁻¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
0.90	0.83	0.98	0.84	0.85	0.84	0.0	عرق السوس
0.98	0.95	1.01	0.98	1.00	0.95	2.5	
0.92	0.96	0.89	1.03	1.06	1.01	5.0	
0.79	0.80	0.78	0.93	1.00	0.85	0.0	الحلبة
2.05	2.34	1.75	2.48	2.73	2.23	2.0	
2.54	2.60	2.48	3.24	3.38	3.09	4.0	
0.87	0.87	0.86	0.86	0.87	0.85	0.0	الكجرات
0.98	0.96	1.00	1.00	1.00	1.01	7.5	
1.11	1.11	1.12	1.08	1.06	1.09	15.0	
0.285	0.403		0.341	0.483		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	1.27	1.21	تأثير نوع المستخلص	1.44	1.32	تأثير الصنف	
	غ م			غ م		أ. ف. م. (0.05)	
0.93	0.91	0.96	0.95	0.97	0.93	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
1.79	1.91	1.67	2.21	2.37	2.06	الحلبة	
0.98	0.98	0.99	0.98	0.98	0.98	الكجرات	
0.164	0.232		0.197	0.278		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (10): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في نسبة حامض الازيسيك إلى الجبرلين +الزياتين لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
0.30	0.25	0.30	0.28	0.28	0.27	0.0	عرق السوس
0.11	0.10	0.11	0.14	0.15	0.13	2.5	
0.10	0.11	0.10	0.15	0.16	0.14	5.0	
0.26	0.27	0.26	0.27	0.27	0.27	0.0	الحلبة
0.50	0.61	0.39	0.66	0.69	0.63	2.0	
0.62	0.68	0.57	0.94	1.23	0.65	4.0	
0.24	0.25	0.24	0.25	0.25	0.25	0.0	الكجرات
0.13	0.14	0.13	0.16	0.15	0.17	7.5	
0.15	0.16	0.14	0.17	0.18	0.16	15.0	
0.026	0.037		0.162	0.229		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	0.28	0.25	تأثير نوع المستخلص	0.37	0.30	تأثير الصنف	
	غ م			غ م		أ. ف. م. (0.05)	
0.16	0.15	0.17	0.19	0.20	0.18	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
0.46	0.52	0.41	0.62	0.73	0.52	الحلبة	
0.17	0.18	0.17	0.19	0.19	0.19	الكجرات	
0.053	0.037		0.093	0.132		أ. ف. م. (0.05)	

بمستخلص الحلبة الذي بلغ 6.11 ملغم. 100غم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا. وأدى التداخل الثلاثي بين الصنف الأصفر مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 غم. لتر⁻¹ إلى زيادة معنوية في محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين بلغ 12.74 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 3.89 ملغم. 100غم⁻¹.

2. محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين (ملغم. 100غم⁻¹): تشير نتائج الموسم الأول في جدول رقم (12) إلى تفوق نباتات الصنف الأحمر في محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين، إذ بلغ 8.24 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 4.88 ملغم. 100غم⁻¹. وأدى مستخلص الكجرات إلى زيادة معنوية في محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين، إذ بلغ 8.02 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 4.84 ملغم. 100غم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15 غم. لتر⁻¹ إلى زيادة معنوية في محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين بلغ 12.35 و 12.18 ملغم. 100غم⁻¹ على التوالي مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 2.84 ملغم. 100غم⁻¹.

يلاحظ من نتائج الموسم الثاني في نفس الجدول تفوق نباتات الصنف الأحمر في إعطاء أكبر محتوى من صبغة الأنثوسيانين بلغ 12.79 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 8.37 ملغم. 100غم⁻¹، وأعطى مستخلص الكجرات أعلى معدل في هذه الصفة بلغ 12.28 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 8.26 ملغم. 100غم⁻¹. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأعطى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات وبتريكز 15 غم. لتر⁻¹ زيادة معنوية في محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين بلغ 18.21 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 5.50 ملغم. 100غم⁻¹.

أظهرت نتائج (جدول رقم 11) تفوق الصنف الأصفر في إعطاء أعلى محتوى من صبغة الكاروتين في الأزهار مقارنة بالصنف الأحمر، بينما تميز الصنف الأحمر في إعطاء أعلى محتوى من صبغة الأنثوسيانين في الأزهار (جدول رقم 12) مقارنة بالصنف الأصفر. وقد يعود السبب إلى طبيعة التراكيب الوراثية للصنف ومدى استجابته للظروف البيئية والتي أدت إلى الاختلاف في الصبغات فاختلاف لون الأزهار.

كما بينت النتائج في الجدولين (11، 12) أن رش النبات بمستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5 غم. لتر⁻¹ أدى إلى زيادة معنوية في صبغة الكاروتين وصبغة الأنثوسيانين، وقد يعود السبب إلى احتواء المستخلص على السكريات والمواد الكربوهيدراتية مما أدى إلى زيادة الكربوهيدرات في الأزهار (41). وربما يعود السبب إلى محتوى المستخلص من العناصر الغذائية والتي أدت إلى تحسين صفات النمو الخضري وخاصة عنصري النيتروجين والمغنيسيوم وما لهما من أهمية في زيادة محتوى الأوراق من صبغات الكلوروفيل، فقد تبين أن وجود صبغة الكلوروفيل مع صبغة الدلفندين تساعد على زيادة صبغة الأنثوسيانين كما في الصنف الأحمر (42)، كما أن رش مستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 و 15 غم. لتر⁻¹ قد أدى إلى زيادة محتوى الأزهار من صبغتي الكاروتين والأنثوسيانين، وقد يعود السبب إلى احتواء المستخلص على صبغات ومنها الكاروتين والأنثوسيانين (43، 44)، إذ أدى رش النبات بمستخلص الكجرات إلى امتصاص كمية كبيرة من الصبغات وتراكمها في الأزهار.

وقد أدى الرش بمستخلص بذور الحلبة وبتريكز 2 و 4 غم. لتر⁻¹ إلى إعطاء أقل محتوى من صبغتي الكاروتين والأنثوسيانين مقارنة بمستخلص عرق السوس والكجرات، وقد يعود السبب إلى دور المركبات الفينولية ومنها الكولين التي يحتويها مستخلص الحلبة في تثبيط تصنيع الصبغات في الأزهار.

وبينت نتائج الموسم الثاني في جدول رقم (10) أن الصنفين لم يختلفا معنويا في نسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +الزياتين. وأعطى مستخلص عرق السوس أقل معدل إذ بلغ 0.16 مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 0.46، وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا وأعطى تداخل الصنف الأصفر مع مستخلص الحلبة وبتريكز 4غم. لتر⁻¹ أعلى نسبة من حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين والزياتين بلغت 0.68 مقارنة بكلا الصنفين مع مستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5 غم. لتر⁻¹ حيث بلغت 0.10 و 0.10 على التوالي.

يلاحظ من نتائج الجداول أرقام (7-10) عدم وجود فرق معنوي بين الصنفين في محتوى الأوراق من منظمات النمو النباتية والتي هي الجبرلين والزياتين وحامض الأبسيسيك ونسبة حامض الأبسيسيك إلى الجبرلين +الزياتين. بينما وجدت زيادة معنوية في محتوى الأوراق من الجبرلين (جدول رقم 7) عند الرش بمستخلص عرق السوس وبتريكز 2.5 و 5 غم. لتر⁻¹، وقد يعود السبب إلى دور المستخلص واحتوائه على نسبة من أشباه الجبرلين (18)، أو قد يعود السبب إلى دور محتوياته من مواد تسلك سلوك الجبرلين وخاصة حامض الميفالونك Mevalonic acid (19) والذي يعتبر البادئ للجبرلين مما أدى إلى زيادة محتواه وتجمعه في الأوراق وكذلك زيادة محتوى الأوراق من الزياتين (جدول رقم 8). قد يعود السبب إلى دور المركبات المنظمة والمشجعة للنمو الموجودة في تركيبة المستخلص والتي تمتص من قبل النبات مما أدى إلى تحفيز وزيادة منظمات النمو النباتية وتثبيت عمل حامض الأبسيسيك وقلة محتواه في الأوراق (جدول رقم 9) (34، 35).

كما يلاحظ من الجدولين (7، 8) أن رش مستخلص الكجرات وبتريكز 7.5 و 15 غم. لتر⁻¹ أدى إلى زيادة محتوى الأوراق من منظمات النمو النباتية وقد يعود السبب إلى دور المركبات الداخلة في تكوين المستخلص وخاصة حامض الأسكوربيك والذي له تأثيرات محفزة ومشابهة لعمل الجبرلين (36، 37) وعامل مساعد في البناء الحيوي لعدد من منظمات النمو النباتية ومنها الجبرلين والزياتين (38، 39) مما أدى إلى تحفيز نشاط منظمات النمو وزيادة محتواه في الأوراق والتي ربما لها دور في تشجيع التكاثر في التزهير وتحسن الصفات الزهرية.

ويلاحظ من النتائج أن رش مستخلص الحلبة وبتريكز 4غم. لتر⁻¹ أدى إلى زيادة حامض الأبسيسيك في الأوراق (جدول رقم 9)، وقد يعود السبب إلى احتواء المستخلص على قلويد الكولين والذي يمكن أن يشق منه مركبات تعمل على عرقلة التخليق الحيوي للجبرلين والزياتين (40).

رابعا: تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في محتوى الأزهار من الصبغات النباتية

1. محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين (ملغم. 100غم⁻¹): بينت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (11) تفوق نباتات الصنف الأصفر في إعطاء أعلى معدل في محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين بلغ 6.41 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأحمر الذي بلغ 2.57 ملغم. 100غم⁻¹. وأعطى مستخلص عرق السوس والكجرات أكبر محتوى من صبغة الكاروتين في الأزهار، إذ بلغ 4.86 و 4.73 ملغم. 100غم⁻¹ على التوالي مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 3.86 ملغم. 100غم⁻¹، وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأصفر مع مستخلص عرق السوس بتركيز 2.5 غم. لتر⁻¹ ومستخلص الكجرات بتركيز 7.5 غم. لتر⁻¹ إلى أكبر معدل في محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين الذي بلغ 8.23 و 8.13 ملغم. 100غم⁻¹ على التوالي مقارنة بالصنف الأحمر من دون رش مستخلص الحلبة الذي بلغ 1.69 ملغم. 100غم⁻¹.

وفي الموسم الثاني أظهرت النتائج في جدول رقم (11) تفوق نباتات الصنف الأصفر في إعطاء أكبر محتوى من صبغة الكاروتين بلغ 9.13 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة بالصنف الأحمر بلغ 5.22 ملغم. 100غم⁻¹. وأعطى مستخلص عرق السوس أعلى معدل في هذه الصفة إذ بلغ 8.16 ملغم. 100غم⁻¹ مقارنة

جدول رقم (11): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في محتوى الأزهار من صبغة الكاروتين (ملغم. 100غم⁻¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
5.90	7.91	3.89	3.23	4.49	1.97	0.0	عرق السوس
9.43	12.74	6.11	5.81	8.23	3.38	2.5	
9.15	11.58	6.73	5.56	7.45	3.67	5.0	
5.26	6.62	3.91	3.47	5.25	1.69	0.0	الحلبة
6.61	8.30	4.93	4.21	5.86	2.55	2.0	
6.45	7.94	4.97	3.92	5.93	1.91	4.0	
5.36	6.50	4.23	3.54	5.24	1.85	0.0	الكجرات
8.59	10.98	6.20	5.53	8.13	2.93	7.5	
7.82	9.60	6.04	5.12	7.07	3.17	15.0	
0.696	0.985		0.759	1.073		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	9.13	5.22	تأثير نوع المستخلص	6.41	2.57	تأثير الصنف	
	0.328			0.357		أ. ف. م. (0.05)	
8.16	10.74	5.58	4.86	6.72	3.01	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
6.11	7.62	4.60	3.86	5.68	2.05	الحلبة	
7.26	9.02	5.49	4.73	6.81	2.65	الكجرات	
0.402	0.568		0.438	0.619		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (12): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في محتوى الأزهار من صبغة الأنثوسيانين (ملغم. 100غم⁻¹) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
7.05	5.50	8.61	4.42	2.86	5.97	0.0	عرق السوس
12.91	10.31	15.51	7.70	5.70	9.70	2.5	
13.66	11.17	16.16	8.39	5.47	11.31	5.0	
6.97	5.66	8.28	3.96	3.04	4.88	0.0	الحلبة
8.84	6.74	10.93	5.23	4.01	6.45	2.0	
8.97	6.45	11.50	5.34	4.70	5.97	4.0	
7.04	5.73	8.35	4.12	2.84	5.39	0.0	الكجرات
14.81	12.05	17.56	9.77	7.19	12.35	7.5	
14.99	11.77	18.21	10.17	8.15	12.18	15.0	
1.036	1.465		0.906	1.281		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	8.37	12.79	تأثير نوع المستخلص	4.88	8.24	تأثير الصنف	
	0.488			0.427		أ. ف. م. (0.05)	
11.21	8.99	13.43	6.84	4.68	8.99	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
8.26	6.28	10.24	4.84	3.92	5.77	الحلبة	
12.28	9.85	14.71	8.02	6.06	9.97	الكجرات	
0.598	0.846		0.523	0.739		أ. ف. م. (0.05)	

خامسا: تأثير رش بعض المستخلصات النباتية في الصفات التشريحية للساق الزهري

1. عدد صفوف الخشب: بينت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (13) تفوق نباتات الصنف الأحمر في عدد صفوف الخشب، إذ بلغ 4.88 صفا مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 3.77 صفا. وأعطى مستخلص عرق السوس والكجرات زيادة معنوية في عدد صفوف الخشب بلغ 4.50 صفا لكليهما مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 4.00 صفا. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات وبتركيز 7.5 و 15 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة عدد صفوف الخشب، إذ بلغ 6.00 و 6.33 صفا مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 2.33 صفا.

وفي الموسم الثاني أظهرت نتائج جدول رقم (13) تفوق نباتات الصنف الأحمر في زيادة عدد صفوف الخشب، إذ بلغ 5.44 صفا مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 4.14 صفا. وأكدت النتائج تفوق مستخلص عرق السوس والكجرات في زيادة عدد صفوف الخشب، إذ بلغ 5.27 و 5.16 صفا على التوالي مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 3.94 صفا. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص عرق السوس وبتركيز 5 غم.لتر⁻¹ وكذلك مع مستخلص الكجرات وبتركيز 7.5 و 15 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة في عدد صفوف الخشب، إذ بلغ 7.66 و 7.00 و 7.66 صفا على التوالي مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 3.00 صفا.

2. قطر أوعية الخشب مايكروميتر (μm): أظهرت نتائج الموسم الأول في جدول رقم (14) تفوق نباتات الصنف الأحمر على الصنف الأصفر في قطر أوعية الخشب، إذ بلغ 51.53 μm مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 42.56 μm. وبينت النتائج تفوق مستخلص الكجرات في إعطاء أكبر قطر للأوعية الخشبية بلغ 50.11 μm مقارنة بمستخلص عرق السوس والحلبة، إذ بلغ 45.66 و 45.53 μm على التوالي. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص الكجرات وبتركيز 15 غم.لتر⁻¹ إلى زيادة قطر أوعية

الخشب حيث بلغ 65.17 μm مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص عرق السوس الذي بلغ 32.27 μm. ويلاحظ من نتائج الموسم الثاني في جدول رقم (14) تفوق نباتات الصنف الأحمر في قطر أوعية الخشب، إذ بلغ 57.20 μm مقارنة بالصنف الأصفر الذي بلغ 45.20 μm، وأعطى مستخلص الكجرات أكبر قطر لأوعية الخشب بلغ 54.03 μm مقارنة بمستخلص الحلبة الذي بلغ 46.40 μm. وأظهرت التداخلات الثنائية بين العوامل تأثيرا معنويا، وأدى تداخل الصنف الأحمر مع مستخلص عرق السوس بتركيز 5 غم.لتر⁻¹ وكذلك مع مستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15 غم.لتر⁻¹ إلى أكبر قطر لأوعية الخشب بلغ 68.37 و 68.03 μm على التوالي مقارنة بالصنف الأصفر من دون رش مستخلص الكجرات الذي بلغ 34.33 μm.

يلاحظ من نتائج الجدولين (13، 14) وجود فرق معنوي في عدد صفوف الخشب وقطر أوعية الخشب بين الصنفين، وقد يعود السبب إلى دور التراكيب الوراثية واختلافها في طبيعة النمو. كما بينت النتائج أن رش مستخلص عرق السوس وبتركيز 2.5 و 5 غم.لتر⁻¹ ومستخلص الكجرات بتركيز 7.5 و 15 غم.لتر⁻¹ قد أدى إلى زيادة معنوية في عدد صفوف الخشب وقطر أوعية الخشب (جدولي رقم 13، 14) مقارنة الرش بمستخلص الحلبة وبتركيز 4 غم.لتر⁻¹ والذي أعطى أقل معدل للصنفين، وقد يعود السبب إلى احتواء هذه المستخلصات النباتية على المغذيات الضرورية لنمو وتطور النبات (18)، بالإضافة إلى احتوائها على عدد من المركبات العضوية كالأحماض العضوية وأشياء الهرمونات مثل الجبرلين والتي لها دور مهم في بناء البروتينات والتي تسهم في زيادة انقسام الخلايا النباتية وكذلك تأثيره على عمل عدد من الأنزيمات الخاصة بتحليل المركبات المعقدة إلى بسيطة يستفيد منها النبات في بناء المواد البروتينية والكربوهيدراتية والسييلوز الضرورية لنموه، وبالتالي يعطي مستويات كبيرة من النمو الخضري، مما يسهم في زيادة عدد صفوف هذه الخلايا وبالتالي زيادة عدد صفوف الخشب، وكذلك نتيجة للعمليات الحيوية التي تجري داخل النبات وبنشاط عالي بسبب توفر هذه الأحماض العضوية، مما أدى قيام النبات بأداء فعالياته الحيوية بسبب تمكن الخلايا من امتصاص أكبر قدر من هذه المغذيات والأحماض العضوية، مما أدى إلى زيادة في قطر أوعية الخشب (34).

جدول رقم (13): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في عدد صفوف الخشب لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الإصناف		نوع المستخلص × التركيز	الإصناف		تركيز المستخلص (غم لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصف الأصفر	الصف الأحمر		الصف الأصفر	الصف الأحمر		
3.66	3.00	4.33	3.50	3.33	3.66	0.0	عرق السوس
5.83	5.00	6.66	5.00	4.33	5.66	2.5	
6.33	5.00	7.66	5.00	4.66	5.33	5.0	
3.33	3.00	3.66	3.00	2.66	3.33	0.0	الحلبة
4.16	4.00	4.33	5.00	4.33	5.66	2.0	
4.33	4.33	4.33	4.00	3.33	4.66	4.0	
3.35	3.33	3.38	2.83	2.33	3.33	0.0	الكجرات
6.16	5.33	7.00	5.33	4.66	6.00	7.5	
6.00	4.33	7.66	5.33	4.33	6.33	15.0	
0.656	0.927		0.725	1.026		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	4.14	5.44	تأثير نوع المستخلص	3.77	4.88	تأثير الصنف	
	0.309			0.342		أ. ف. م. (0.05)	
5.27	4.33	6.22	4.50	4.11	4.88	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
3.94	3.77	4.11	4.00	3.44	4.55	الحلبة	
5.16	4.33	6.00	4.50	3.77	5.22	الكجرات	
0.378	0.535		0.418	0.592		أ. ف. م. (0.05)	

جدول رقم (14): تأثير الصنف ونوع وتركيز المستخلص النباتي في قطر أوعية الخشب مايكروميتر (μm) لنبات القرنفل ولموسمين

موسم 2015-2014			موسم 2014-2013				
نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		نوع المستخلص × التركيز	الأصناف		تركيز المستخلص (غم.لتر ⁻¹)	نوع المستخلص
	الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		الصنف الأصفر	الصنف الأحمر		
41.65	36.27	47.03	35.37	32.27	38.47	0.0	عرق السوس
58.07	49.63	66.50	50.80	46.60	55.00	2.5	
59.80	51.23	68.37	50.80	41.33	60.30	5.0	
41.42	37.87	44.97	35.58	33.07	38.10	0.0	الحلبة
49.60	45.17	54.03	47.21	44.40	50.03	2.0	
48.18	44.67	51.70	43.80	42.67	44.93	4.0	
40.27	34.33	46.20	37.05	35.50	38.60	0.0	الكجرات
62.06	56.10	68.03	56.27	53.40	59.13	7.5	
63.27	58.57	67.97	59.47	53.77	65.17	15.0	
4.100	5.799		2.395	3.387		أ. ف. م. (0.05)	
تأثير نوع المستخلص	45.20	57.20	تأثير نوع المستخلص	42.56	51.53	تأثير الصنف	
	1.933			1.129		أ. ف. م. (0.05)	
53.22	45.71	60.73	45.66	40.07	51.26	عرق السوس	الصنف × نوع المستخلص
46.40	42.57	50.23	45.53	40.04	51.02	الحلبة	
54.03	47.33	60.73	50.11	47.56	52.30	الكجرات	
2.367	3.348		1.383	1.955		أ. ف. م. (0.05)	

الاستنتاج

4. Grimstad SO. (1995). Low temperature plus effects growth and development of young cucumber and tomato plant. J. Hort. Sci. 70 (1):75-80.

5. Grimstad OQ. and Frimanslund E. (1993). Effect of different day and night temperature regimes on greenhouse cucumber young plant production, flower bud formation and early yield. Hort. Sci. 53:191-204.

6. قطب ، فوزي طه. (1992). النباتات الطبية في ليبيا. الجزء الأول. الدار العربية للموسوعات. الطبعة الثانية. ليبيا.

7. Bermejo H. and Leon J. (1994). Plant production and protection. Series. FAO, Rome Italy, No. 26. PP. 273-288.

8. Mansour EH. and El-Adawy TA. (1994). Nutritional potential and functional properties of heat-treated and germinated fenugreek seeds. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie . 27 (6):568-572.

9. Makai S. and Balatincz J. (1998). Study of seed produce and protein content of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). The materials of the lectures give and the scientific papers have been seen to the "Open day" titled "Man- Agriculture-Health". Gödöllő. 9:167-171.

تستنتج الدراسة أن الصنف الأحمر تفوق على الصنف الأصفر في الصفات الخاصة بإنتاج أزهار القطف ذات مواصفات تسويقية مرغوبة، كما أن رش النبات بمستخلص عرق السوس وبتراكيز 2.5 و 5 غم/لتر⁻¹ وكذلك مستخلص الكجرات وبتراكيز 7.5 و 15 غم/لتر⁻¹ يؤدي إلى تحسين جميع الصفات التي تم دراستها في هذه التجربة.

المصادر

1. Nukui H.; Kudo S.; Yamashita A. and Satoh S. (2004). Repressed ethylene production in the gynoecium of long-lasting flowers of the carnation 'White Candle': role of gynoecium in carnation flower senescence. J. Exp. Bot. 55:641-650.

2. Jürgens A.; Witt T. and Gottsberger G. (2003). Flower scent composition in *Dianthus* and *Saponaria* species Caryophyllaceae and its relevance for pollination biology and taxonomy. Biochem. Syst. Ecol. 31:345-357.

3. عمران ، وفاء هادي حسون. (2004). تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو وحاصل خيار *Cucumis sativum* L. في البيوت البلاستيكية المدفأة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.

- الشامية *Zea mays everta* مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية. 8(3):46-53.
27. Barnes J.; Anderson LA.; and Phillipson JD. (2002). Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals. 2nd ed. Pharmaceutical Press: London. England. p. 978-981.
28. السعد، كفاية غازي سعيد. (2010). تأثير مواعيد الزراعة وحامض الجبرليك ومستخلص عرق السوس في النمو والحاصل لنبات الكلايولس *Gladiolus hybrida* L. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة الموصل. العراق.
29. ناصر، زهراء صاحب. (2012). تأثير الرش بالمحلول المغذي PRO.SOL ومستخلص عرق السوس في نمو وإزهار نبات الجيرانيوم *Pelargonium zonale* L. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. العراق.
30. ساهي، بلقيس غريب. (2005). دراسة فسلجية في نمو وإنتاج نبات الجيربرا *Gerbera jamesonii* L. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
31. فاضل، حفصة باسم، قاسم، علي فاروق، زهوان، ثامر عبدالله. (2015). تأثير حامضي الجبرلين والسالبليك ومستخلص عرق السوس في حاصل ونوعية أزهار القرنفل *Dianthus caryophyllus* L ومواده الفعالة. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية. 15(1):31-46.
32. Smirnov N. (1996). Antioxidant systems and plant responses to the environment. (In: Smirnov, N. (ed.) Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation. Oxford: Bios Scientific Publishers, England. Pp.:217-243.
33. El-Tohamy WA.; El-Abagy HM. and El-Greadly NHM. (2008). Studies on the effect of putrescine, yeast and vitamin C on growth, yield and physiological responses of eggplant (*Solanum melongena* L.) under sandy soil conditions. Aust. J. Basic. Appl. Sci. 2(2): 296-300.
34. الصحاف، فاضل حسين، المرسومي، حمود غربي. (2001). تأثير نقع البذور ورش النباتات بالجبرلين ومستخلص جنور عرق السوس والمغذيات في نمو وتزهير البصل *Allium cepa* L. مجلة إباء للأبحاث الزراعية. 11(2): 20-34.
35. حمادي، مشتاق طالب، عباس، جمال أحمد. (2012). أثر الرش بعنصر الزنك ومستخلص جنور عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* في النمو الخضري والزهرى لأبصال الأيرس الأسباني *Iris xiphium* L. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية. 8(1):127-137.
36. Weaver LM.; Gan S.; Quirino B. and Amasino RM. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Mol. Biol. 37:455-469.
37. Davey MD.; Van Montagu M.; Sanmartin M.; Kanellis AK.; Smirnov N.; Benzie IJJ.; Strain JJ.; Favell D. and Fletcher J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. J. Sci. Food Agri. 80: 825-860.
38. Nakashima K.; Kiyosue T.; Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1997). A nuclear gene, *erdl*, encoding a chloroplast-targeted clp protease regulatory subunit homology is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 12: 851-861.
10. Osuntogun B. and Aboaba OO. (2004). Microbiological and physico-chemical evaluation of some non-alcoholic beverage. Pverage. Pak. J. Nutr. 3:188-192.
11. Mahadevan N.; Shivali A. and Kambo JP. (2009). *Hibiscus sabdariffa* L. Linn: an overview. Nat. Prod. Radiance. 8(1):77-83.
12. العبدلي، هيثم محيي محمد شريف. (2002). تأثير بعض المغذيات وحامض الجبرلين ومستخلص عرق السوس في نمو وإنتاج الأزهار وانفراج الكأس في القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
13. الصحن، جلال حميد علي. (2011). تأثير رش تراكيز حامض الجبرليك (GA_3) وإندول حامض الخليك (IAA) في صفات النمو الخضري والزهرى لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. العراق.
14. الدليمي، حيدر عريس عبد الرؤوف. (2005). تأثير بعض المغذيات وأوساط النمو وطريقة التربية في إنتاج أزهار القرنفل *Dianthus caryophyllus* L. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. العراق.
15. الساهوكي، مدحت، وهيب، كريمة محمد. (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
16. الراوي، خاشع محمود، خلف الله، عبد العزيز. (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل. العراق.
17. عباس، مؤيد فاضل، عباس، محسن جلاب. (1991). عناية وخزن الفاكهة والخضر العملي. كلية الزراعة. جامعة البصرة. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.
18. العجيلي، ثامر عبدالله. (2005). تأثير الجبرلين GA_3 وبعض المغذيات على إنتاج الكليسيرايدين *Glycyrrhizin* وبعض المكونات الأخرى في نبات عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* L. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
19. الدروش، عامر خلف. (1976). دراسة تأثير الموقع وموعد الجني على مكونات الرئيسية للمادة الخام والمستخلص الجاف لعرق السوس في العراق. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
20. المرسومي، حمود غربي خليفة. (1999). تأثير بعض العوامل في صفات النمو الخضري والتزهير وحاصل البذور في ثلاث أصناف من البصل (*Allium cepa* L). أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
21. النعيمي، سعد الله نجم عبد الله. (1987). الأسمدة وخصوبة التربة. مؤسسة المعاهد الفنية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد. العراق.
22. الصحاف، فاضل حسين. (1989). تغذية النبات التطبيقي. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
23. Bender DA. (2003). Nutritional biochemistry of the Vitamins. 2nd ed. Cambridge University. England. P. 709.
24. Younis ME.; Hasaneen MNA. and Kazamel AES. (2010). Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. Protop. 239(1-4): 39-48.
25. Smirnov N. and Wheeler GL. (2000). Ascorbic acid in plant: biosynthesis and function. Biochem. Mol. Biol. 35(4):291-314.
26. نصر الله، عادل يوسف، الكبيسي، يونس منصور، العبودي، هادي محمد كريم، الحلفي، الانتصار هادي حميدي. (2014). تأثير رش المستخلصات النباتية وفيتامين C في نمو وحاصل الذرة

39. Shalata A. and Neuman PM. (2001). Exogenous ascorbic acid (Vitamin C) increased resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. J. Exper. Bot. 52 (362): 2207-2211.
40. الشحات ، نصر ابو زيد. (2000). الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية . الطبعة الثانية. الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، مصر.
41. الربيعي ، نوال محمد علوان. (2003) . تأثير الرش بالمحلول المغذي (النهرين) ومستخلص عرق السوس في النمو والأزهار والعمر المزهري في الفريزيا *Freesia hybrida* L. رسالة ماجستير . كلية الزراعة. جامعة بغداد . العراق.
42. Gordon J.; Lightbourn RA.; Griesbach JA.; Novotny BA.; Clevidence DDR. and John RS. (2008). Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. J. Hered. 99(2):105–111.
43. Pino JA.; Marquez E. and Marbot R. (2006). Volatile constituents from tea of Roselle *Hibiscus sabdariffa* L. Rev. CENic Cien. Quim.37(3):127-129.
44. Oluwaniyi OO.; Dosumu OO.; Awolola GV. and Abdul-Raheem AF. (2009). Nutritional analysis and stability studies of some natural and synthetic food colorants. Amer. J. Food Technol. 4(5):218-225.

نمذجة المعلومات البنائية (BIM) وتكامل العملية التصميمية

أسامة عبد المنعم خريبط التميمي، محمد رضا شاكر مجيد، أنس حميد مجيد

قسم هندسة العمارة / كلية الهندسة / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: eng_usama_oat@yahoo.com

الملخص باللغة العربية

ترتبط العمارة بشكل كبير بالتطورات المتلاحقة على مختلف الجوانب (التقنية والمنظوماتية والعلمية وغيرها)، وهذا ما يحقق تغيراً في العملية التصميمية التي لم تعد كسابق عهدها التقليدي. حيث ظهر معامل جديد كان له القدرة على تغيير شكل ومفهوم ومضمون العمارة بما يمتلك القدرة على تبسيط التكوينات المعقدة، والاعتماد بشكل كبير على وسائل التصميم والإنتاج والتنفيذ الرقمي الجديدة عبر النمذجة والمحاكاة وتحويل العناصر والأجزاء المكونة للمبنى إلى معلومات سميت باسم (نمذجة المعلومات البنائية (BIM)). ومن هنا برزت المشكلة البحثية في عدم وضوح الرؤيا النظرية والتطبيقية حول تلك البرامج ودورها في العملية التصميمية وانعكاسها في تكامل تلك العملية، وخصوصاً مع تعقيد المشاريع وحاجتها إلى الكثير من التخصصات لإنجازها، الأمر الذي يتطلب الكثير من مهارات التواصل بين أفراد الفريق التصميمي، مما أنتج ضعفاً في قاعدة المعرفة التي توضح دور هذه البرامج واستعمالاتها وما يمكنها من تقليل مشاكل وصعوبات طالما عانى منها المعماري في توصيف الأشكال والحجوم، الأمر الذي ولد نقصاً في خبراء تقنيات (BIM) الذين تحتاجهم الصناعة البنائية، بالتالي هدف البحث إلى توضيح تأثيرات تكنولوجيا المعلومات على تكامل عملية التصميم وتوضيح دور (الكمبيوتر) في إجراء هذه العمليات بسهولة وسرعة ودقة عالية، حيث ترتبط معظم عمليات التواصل المطلوبة بين أطراف العملية التصميمية بعدة عمليات لترجمة الأفكار بين التمثيل ثنائي وثلاثي الأبعاد.

الكلمات المفتاحية: العملية التصميمية، نمذجة المعلومات البنائية، التكامل، البرامجيات، التمثيل ثلاثي البعد

Building information modeling (BIM) and the integration of the design process

Osamah A. Khraibet, Mohamed R. Sh. Majeed and Anas H. Majeed

Dept. of Architecture / College of Engineering / University of Baghdad / Republic of Iraq

ABSTRACT

Architecture significantly had been associated with the successive developments in various aspects (systematic, technical, scientific, etc.), and this is what achieves a change in the design process that is no longer the forerunner traditional restored. Where it appeared a new factor had the ability to change the shape, concept and content of architecture beside the ability to simplify complex formations. This depends strongly on design and production media with new digital implementation through modeling and simulation, and transforms elements and building components to information, which is called (Building Information Modeling (BIM)). So, Research problem is appeared as the absence of theoretical and practical vision about those programs and their role in design process and its impact on the integration of that process, especially with the complexity of the projects and the need for a lot of disciplines to accomplish which requires a lot of communication skills among design team persons, which produced a weakness in the knowledge base that clarify the role of these programs and their uses which can reduce the problems and difficulties as long as it is suffered by the architect in characterization of shapes and sizes. That decreases the numbers of experts in (BIM) techniques in construction industry. Thus, the goal of research is to clarify the information technology impacts on the integrity of design process and to clarify the role of the (computer) in the conduct of these operations easily and quickly with high accuracy. Where most of required communication operations are connected with several operations to translate the concepts to two and three-dimensional representation.

المقدمة

ظهرت أفكار BIM بداية في أواخر سبعينات القرن الماضي، وكانت تحمل اسم نموذج إنتاج المبنى BPM أو Building Production Modelling، ولقد بدأ عرضها من قبل تشارلز إيستمان Chales Eastman في مجموعة من الأبحاث والكتابات التي نشرت في تلك الفترة، ثم عمل المعماري برنستين Bernstein على تطوير هذه الأفكار ليكون هو أول من استخدم مصطلح BIM في بداية التسعينات.

وقام (جيرري لايسرين Laiserin) في عام 2003 بنشر هذا المصطلح على نطاق عالمي، ليبدأ عهد جديد في عالم التمثيل والتشكيل الرقمي للعناصر المعمارية. كما قامت مجموعة كبيرة من شركات البرمجيات مثل - Autodesk - Bentley J. Graphisoft بالعمل على إنتاج تطبيقات جديدة تعمل وفق هذا التوجه. وقد كان أول برنامج يعمل بنظام BIM من إنتاج شركة Graphisoft تحت اسم ArchiCAD (4).

وهذه النماذج كانت بداية ظهور جيل من البرامج المساعدة عبر التطوير التي ركزت عليه شركات إعداد البرامج كوسيلة للوصول إلى النموذج المثالي للعمل المعماري وإدارة منظومة البناء K كما كانت الطريق لاستخدام الحركة مع النموذج لمحاكاة الزمن وأحداثه عبر برمجيات المحاكاة للحركة Animation والتي تعتمد على أخذ العديد من اللقطات للنموذج والتي يطلق عليها Frames في اتجاه الحركة، إلى أن وصلت هذه النماذج إلى قمة المحاكاة وهي المحاكاة للواقع عبر تكنولوجيا الواقع الافتراضي، وهي أنظمة استخدمت فيها عناصر الإدخال للكمبيوتر Input devices بما تشمله من عناصر، واستحدثت عليها عناصر تساعد المستخدم على رؤية الواقع مع الانغماس في تجربة المحاكاة، ومن هذه الأجهزة (Data Helmet)، والتي تسمح للمستخدم بمشاهدة الواقع التخلي مع الحركة داخله ومشاهدة الأحداث والبيئة المحيطة مع الاستجابة لردود أفعاله عبر التفاعل (1).

بالتالي فإن نسبة الشركات في أمريكا وأوروبا التي استخدمت أسلوب نمذجة معلومات البناء في التصميم قفزت من 28% في عام 2007 إلى 49% في 2009 وإلى 71% في 2012 مع ملاحظة أن نسبة المقاولين المستخدمين لتقنية نمذجة معلومات البناء كانت الأعلى بنسبة 74% متفوقة بذلك على المعماريين والمهندسين في عام 2012 (2).

تعريف نمذجة المعلومات البنائية (BIM)

يمكن تعريف نمذجة المعلومات البنائية (BIM) بأنه أسلوب رقمي جديد للتصميم والتنفيذ والإدارة، وهو اختصار لمصطلح Building Information Modeling، أي نمذجة المباني معلوماتياً، حيث تطرح إمكانية تبادل المعلومات بين المساهمين في أي مشروع من خلال خزن كل المعلومات في قاعدة بيانات خاصة بالمشروع يمكن استعراضها في أي وقت وبسرعة كبيرة. وتفصيل أكثر، فإنه يتم التعامل مع عناصر المبنى على أنها كائنات رقمية موصفة تمثل مكونات المبنى الحقيقية التي تتيح لكافة العاملين في قطاع البناء والتشييد من عملاء وملاك ومهندسين ومقاولين الحصول على نموذج ثلاثي الأبعاد بتفاصيل دقيقة للمبنى (2).

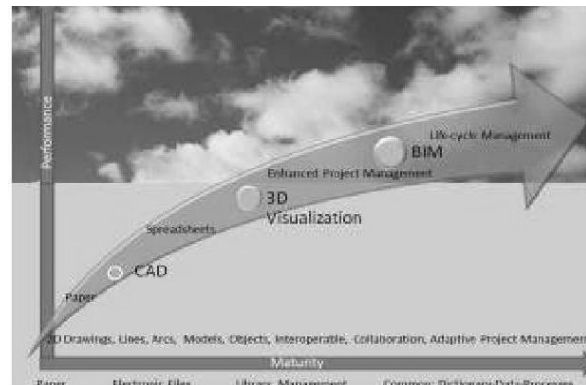
ونمذجة المعلومات البنائية ليست فقط نسخة ثلاثية الأبعاد من رسومات ثنائية الأبعاد، بل تمثل محاكاة رقمية للمبنى خلال وبعد مرحلة التنفيذ بجميع مكوناته المعمارية، الإنشائية، الكهربائية والميكانيكية. بالإضافة إلى احتوائها على جميع المعلومات التي لا يمكن محاكاتها وتمثيلها من خلال الرسومات، مثل المواد، الاستهلاك الكهربائي، والتكلفة.

يتميز هذا العصر بكونه يمثل عصراً للعمارة الرقمية، منطلقاً من العملية التصميمية ذاتها التي أصبح التصميم والمنظومة التي يعمل فيها المصمم تعتمد على أدوات وبرمجيات ووسائط تكنولوجيا المعلومات، فنجد أن العديد من المهتمين بالتعرف على تطور نظريات العمارة ذهبوا إلى دراسة هذه الظاهرة ومعرفة تأثيرها على العملية التصميمية، ومع التعرف على التكنولوجيات المؤثرة على العمارة في كل الحقب التاريخية التي ظهرت فيها عوامل التغيير في الأفكار، وجد أنه مثلما أثرت تكنولوجيا الماكينات والتصنيع المسبق على مناهج التصميم بالتوازي مع هذه الحقبة، كذلك فإن وسائط الكمبيوتر وبرمجيتها أثرت على المناهج العلمية والفعاليات التصميمية، المنتج المعماري، بل، والمصمم أيضاً، حيث أطلق على هذه المرحلة الجديدة بمرحلة التحول من التصميم عبر استخدام الأوراق إلى التصميم عبر المعلومات. والتي تكون ضمن برامج تصميمية متعددة تجتمع في تسمية مشتركة تعرف (نمذجة المعلومات البنائية Building Information Modeling).

التطور التاريخي لنمذجة المعلومات البنائية (BIM) وبرامج النمذجة ومحاكاة الواقع

إن فكرة استخدام النموذج المحاكى للواقع فكرة قديمة، ولكن تمثيلها رقمياً أعطى المصممين أداة نموذجية تساعد على التعرف على الشكل النهائي للمنتج وإعادة تقييمه بما يساعد على توفير المال والجهد، والخروج بالمنتج إلى الواقع عن قناعة، وذلك عبر التعبير عن عناصر (1).

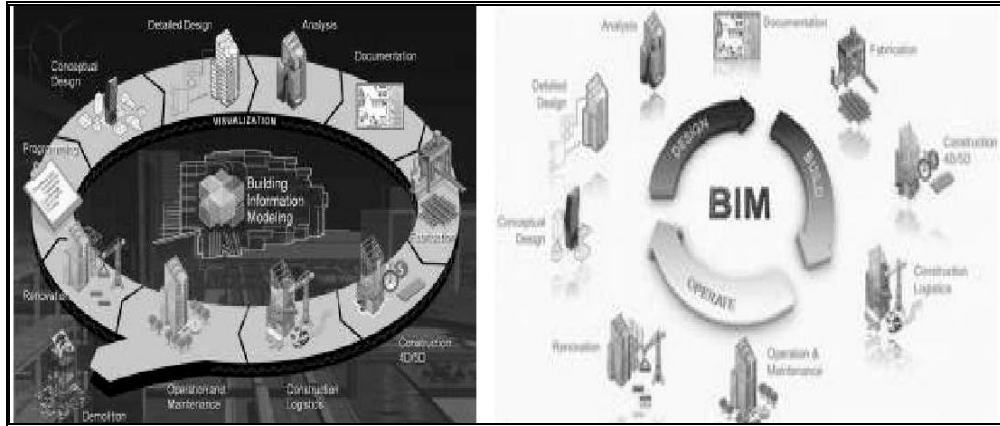
إن الأسلوب التقليدي المتبع لعرض وتنفيذ أي مشروع عادة ما يكون من خلال معلومات يعبر عنها بمجموعة من اللوحات الورقية والجدول المعدة يدوياً. وفي بداية العقد الثامن من القرن المنصرم، بدأ المعماريون باستخدام تقنية CAD التي تعتمد على الحواسيب الشخصية لإعداد الرسومات الهندسية. وحتى بظهور تقنية CAD فإن أسلوب التواصل بين أطراف عمليات التصميم والتنفيذ لم يتغير مطلقاً، على الرغم من تزايد تعقيد بيانات ومكونات المبنى، إذ استبدلت الوسيلة الورقية بأخرى رقمية فقط. وأصبحت ملفات مثل الرسومات الرقمية تتداول بشكل واسع بين المعماريين عوضاً عن اللوحات الورقية مستغلين تقنية الطبقات التي صاحبت تقنية CAD. ومع بداية التسعينيات ظهرت تقنية الكائنات الهندسية. ومضمون هذه التقنية هو إمكانية خزن بيانات لا رسومية (أسعار، كميات، الشركة المصنعة للمادة، الأبعاد... الخ) في الكائنات الرسومية (مثل الخط، الجدار، النافذة). الأمر الذي جعل عملية استخلاص الجداول وإيجاد قاعدة البيانات وإدارتها ممكنة طوال فترة عملية التصميم التي كانت نقطة الشروع لنمذجة المعلومات البنائية (Building Information Modeling) (2). شكل رقم (1).



شكل رقم (1): مخطط يوضح مراحل تطور برامج النمذجة البنائية في العملية التصميمية (3)

كما وتتيح البرامج التي تعمل وفقا لهذه التقنية سهولة نقل النماذج والتصاميم بين أكثر من برنامج ما يعرف بمصطلح Work Flow، وهو دليل مرجعي يعرف ويحدد أدوار ومسؤوليات أعضاء المشروع عند استخدام نمذجة معلومات البناء (BIM) في مراحل مختلفة من المشروع (5). شكل رقم (2).

وهذه التقنية تعتمد تصميم عناصر المبنى المختلفة لا كاشكال هندسية ثنائية أو ثلاثية الأبعاد فقط، مما يسمح بالتحول السريع بين التصميم والمحاكاة من جهة وبين النتائج الهندسية ومخططات التنفيذ من جهة أخرى. وبالتالي فإن هذه التقنية تجمع بين برامج CAD أي الرسم الحاسوبي، وبين برامج المحاكاة Simulation، وبرامج التحليل والتصميم Analysis and Design في إطار واحد. وهذا يمنح المهندس سهولة في العمل وسرعة في إتمامه.



شكل رقم (2): محاكاة رقمية للمبنى بجميع مكونات المبنى المعمارية عبر محاكاة العملية التصميمية والتنفيذية في الحقيقة في عالم من الواقع التخييلي (6)

عناصر المبنى في مرحلة مبكرة. ومن أبرز فوائد نمذجة المعلومات البنائية (BIM) ما يلي:

1. حل المشاكل أثناء التصميم.
 2. التعاون بين جميع عناصر التصميم بطريقة أفضل (ميكانيكي، كهربائي، معماري، إنشائي).
 3. الحصر الدقيق لجميع أجزاء المشروع.
 4. تخفيض تكلفة المشروع.
 5. تقليل الوقت أثناء التنفيذ حيث لا تعطل العمل من أجل حل تعارض لم يكتشف أثناء التصميم.
 6. الرسومات التصميمية design drawing، هي ذاتها الرسومات التنفيذية working drawing، وهي كذلك build drawing دون تعديلات كثيرة.
 7. يساعد في عملية الصيانة بعد انتهاء المشروع.
 8. التعديل سهل جدا ويتم مرة واحدة في أي مكان بالأنموذج فينعكس على كل جزء منه.
- كما أن من أهم فوائد نمذجة معلومات البناء هي إنقاص عامل المخاطرة في المشروع، فمعظم أشكال تسليم المشاريع المطورة خلال العقود الماضية نجحت في نقل مخاطرة أعمال الإنشاء من فريق لآخر بدلا من العمل على إنقاصها.
- وبما أن الغاية الأساسية لعملية المحاكاة هي إزالة المخاطرة لذلك هي في الوقت نفسه أداة رئيسية لتطبيق تقنيات المنشآت الاقتصادية (8). شكل رقم (3).

يعرف إيمان Eastman مصطلح نمذجة المعلومات البنائية على أنها عملية توليد وتنظيم لمكونات المبنى خلال دورة حياته أثناء العملية التصميمية، ويتم ذلك عن طريق عملية المحاكاة Simulation بحيث يتم بناء نموذج تخيلي ثلاثي الأبعاد محاكي تماما لكافة الظروف والعوامل المؤثرة عليه، وذلك بهدف زيادة الإنتاجية والكفاءة في سير العملية (7).

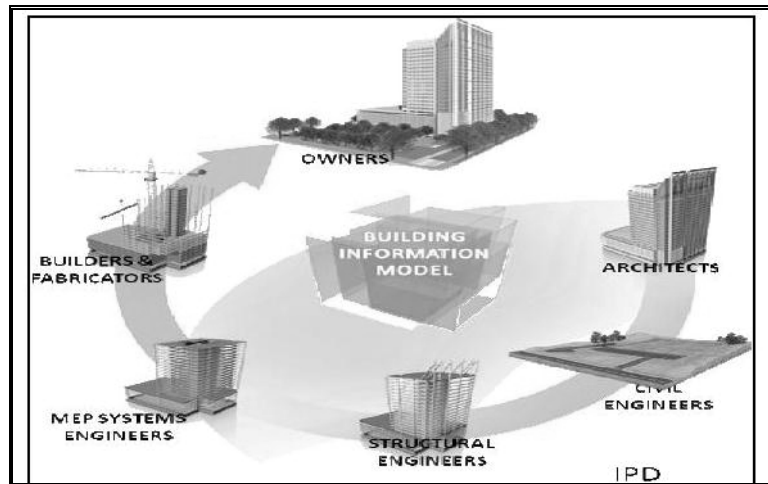
الفكرة العامة لنمذجة المعلومات البنائية BIM

تعتمد فكرة BIM على محاكاة العملية التصميمية والتنفيذية في الحقيقة عبر عالم من الواقع التخييلي (Virtual Reality) بما يتيح دراسة المشروع والمرور بداخله ومعرفة المشاكل والصعوبات التي قد تواجه القائمين على المشروع. كما أنها أداة ضبط للمشروع قبل تنفيذه في الواقع، فضلا عن كونها تساهم بالتعرف على المشاكل وفحصها عبر ملف يحتوي على التخصصات والتجهيزات المختلفة للمبنى ومدى توافقها أو اختلافها مع إعطاء المرونة للوصول إلى حلول (1).

كما تساعد هذه البرامج على عمل تواصل مستمر بين مراحل البناء والتصميم وإعداد مخططات دراسية، ومستغلا لغة البرمجة في دراسة المؤثرات المختلفة على المبنى، كما يمكن إعداد كل الأجهزة والتركيبات الخاصة بالتكييف والصحي والميكانيكي، ومعرفة الأماكن التي ستنبت بها ومدى إقتصادية هذه الحلول، بالإضافة إلى إعداد جداول الكميات والمواصفات لكل بنود المبنى. شكل رقم (2).

فوائد نمذجة المعلومات البنائية (BIM)

إن ما يدعو إلى تبني أي تقنية جديدة هو حتما تقديمها لحلول أكثر فعالية من سابقتها، وكذا الحال هنا. فهي فيما لو قورنت بسابقتها قدمت منافع كبيرة في خدمة القطاع الهندسي كتسريع وتيرة الأداء ورفع مستوى الجودة، وزيادة الإنتاجية وتخفيض التكلفة وتنسيق عناصر المشروع وحل المشكلات قبل وقوعها، وتصنيع وتشكيل



شكل رقم (3): إعطاء الشكل النهائي للمبنى عبر التعاون المتكامل بين جميع عناصر التصميم

2. نماذج التصميم: وهذه النماذج تعتمد على مستوى متوسط من التفاصيل وتكون بمثابة النقطة الحقيقية لبدء المشروع. فالعديد من التفاصيل سوف يتم تطويرها بالتعاون مع التخصصات الأخرى ويكون الغرض الأساسي من هذه النماذج هو تحليل التصميم وأخذ آراء التخصصات الأخرى في ملاءمة التصميم للغرض المصمم له وتلبية الاحتياجات والخدمات اللازمة. ويقوم المصمم بتنفيذ هذا النموذج ومن الممكن أن يتضمن بعض العناصر التي يتم إدخالها بواسطة التخصصات الأخرى مثل العناصر الإنشائية، والتجهيزات الكهروميكانيكية (8).

3. نماذج الإنشاء: ويتضمن هذا النموذج مستوى أعلى من التفاصيل، وذلك للوصول إلى الشكل النهائي للمبنى، وتقوم كل التخصصات باستخدام النموذج التصميمي ودراسته وتحليله، ثم القيام بالتصميم وإجراء التعديلات على النموذج الثلاثي الأبعاد. وفي هذه المرحلة تظهر المشاكل الخاصة بالتعارض أو التداخل بين التخصصات المختلفة، ليتم التعامل معها وحلها عبر هذا النموذج، وفي هذه المرحلة يقوم المعماري بعمل النماذج والتعديل عليها في النموذج الرئيسي وتكون هناك نماذج مماثلة للإنشائيين، الميكانيكيين. إلخ، ولكن المسؤول عن إجراء التطابق وإدخاله إلى النموذج الرئيسي هو المعماري (1).

4. النماذج الخاصة بمرحلة التفاصيل: وتغطي هذه النماذج تفاصيل جميع أجزاء المشروع، وتعتمد هذه النماذج على التحليل البصري فقط، ومثال ذلك دراسة تركيب عناصر الجدران الزجاجية Curtain walls وعلاقتها بالأسقف الداخلية للطوابق، حيث يمكن مشاهدة هذه العلاقة بسهولة عن طريق النموذج والدوران بزوايا الرؤية لتكون أداة مفيدة جداً في اتخاذ قرارات صائبة في التركيبات والتجهيزات وطرق التنفيذ (8).

5. نماذج رسومات التشغيل: تعتمد هذه النماذج على مستوى عالٍ من التفاصيل مع ضرورة وضوح معلومات التصنيع والتنفيذ، ولذلك نجد أن العديد من المصممين الآن يستخدمون هذه النماذج للوقوف على إمكانية التصنيع لتفادي وقوع المشاكل في مرحلة التنفيذ مع الاستفادة من إمكانيات هذه النماذج من دقة وسرعة في المحاكاة، ويمكن تطوير هذه النماذج من خلال البرمجة لكي تتصل مرحلة التصنيع بماكينات ومعدات الإنتاج والتنفيذ باستخدام ماكينات (CNC, NC)، ويقوم بتنفيذ هذه النماذج التخصصات العاملة عليها للوصول إلى أعلى مستوى من التفاصيل المطلوبة، مع أهمية دور المتابعة والمراجعة من جميع التخصصات على الشكل النهائي للتفاصيل، فعناصر التكيف، إطفاء الحريق تحتاج متابعة من الإنشائي لضمان عدم تعارضها مع النظام الإنشائي وهكذا... ويكون ذلك واضحاً باستخدام النموذج الثلاثي (8).

باستخدام ميزة زيادة قدرتنا على تخيل المنشأ ونقل المعلومات المتعلقة به وتقييمه والتنسيق بين الاختصاصات وتقدير حاجتنا للمواد أثناء عملية إدارة مشاريع البناء، يساعد نمذجة معلومات البناء في إنقاص التعارضات أثناء التنفيذ وفي الحد من الهدر وينقص أيضاً من المخاطرة، ومن المرجح أن يقلل من كلفة البناء. وكحال أي تقنية جديدة فإنها لا تخلو من العيوب، حيث يشير الاستبيان الذي أجرته مؤسسة بيلدينج سمارت على الشركات والمهندسين في الشرق الأوسط في عام 2010 عن نمذجة معلومات البناء، كشف أن العائق الرئيس في تطبيق أسلوب نمذجة معلومات البناء في التصميم يتمثل بنسبة 51% في «النقص في المستخدمين المهرة» و«عدم توفر التدريب» بنسبة 34% (2).

إدارة منظومة البناء باستخدام نمذجة المعلومات البنائية BIM

من أهم المميزات التي أتاحتها برامج BIM سهولة إدارة مشروعات البناء عن طريقها، وذلك من خلال الإجراءات الآتية (1):

1. تحديد الغرض من استخدام BIM وتنصيب المشروع وتحديد الأهداف حيث إن استخدامات BIM تختلف وفقاً للغرض منها وتختلف باختلاف التخصص المستخدم للنموذج المحاكى للعملية التصميمية.
2. اختيار فريق العمل وتوزيع الأدوار بداية من مدير المشروع والمنسق العام لإدارة نموذج BIM إلى جميع المتعاملين مع النموذج من جميع التخصصات.
3. اختيار الأدوات المساعدة من برمجيات Software، ووصلات links، وطرق الاتصال لربط فريق العمل بشبكة معلومات موحدة تسهل التواصل بين فريق العمل.

مراحل تقدم العمل في نمذجة المعلومات البنائية BIM

يتم تطور النموذج الثلاثي الأبعاد عبر سبعة مراحل يمكن تلخيصها بالنقاط التالية:

1. **نماذج وضع الأفكار المبدئية:** وهذا النموذج لا يحتاج إلى تفاصيل ويعتمد على التجريد والتبسيط وهي طبيعة التصميم الابتدائي، حيث يعتمد على وضع أفكار كثيرة واختيار الأفضل بينها والمناقشة بين فريق العمل ويقوم المعماري بتنفيذ هذا النموذج.

كما يمكن أيضا استخدام النموذج التخليبي الثلاثي الأبعاد المبني باستخدام BIM لتحليل كفاءة المبني لاستهلاك الطاقة، وذلك من خلال اختبار مجموعة من السيناريوهات للتأثير على المبني بمؤثرات خارجية مختلفة، لتحديد أفضل الحلول، وكلما زادت التفاصيل في النموذج الثلاثي الأبعاد، زادت معه دقة الحل المقترح.

وصول نموذج BIM لتكاملية العملية التصميمية

يجب الإشارة إلى أن تطبيقات CAD بجميع مميزات وإمكانياتها هي مجرد أداة للرسم، لا يمكنها القيام بنشاط أكبر من الرسم، فلا يمكنها العمل من خلال قواعد البيانات التي تتمكن من حساب التكاليف وإدارة مراحل التنفيذ، كما لا تقدم أنظمة CAD حلاً لعملية تطبيق نظم المحاكاة للأداء في التصميمات، مثل محاكاة الأداء الحراري أو الصوتي والإنشائي، بل لكل تلك الأنشطة برمجيات أخرى تطبقها، كما أن أنظمة CAD ذاتها لا تتعامل مع الرسومات من منظور معماري، بل أن أنظمة CAD هي أداة للرسم في جميع التخصصات الهندسية، فالخطوط والنقاط والمنحنيات بالنسبة لأنظمة CAD هي عناصر هندسية وليست معمارية (10)، أما نموذج BIM أو (BIM Model) فيعبر عن الوصف الرقمي للمبنى الحقيقي، بما يحتويه هذا المبنى من فراغات ووظائف ومواصفات لمواد الإنشاء المستخدمة وأنظمة ميكانيكية، وكذلك طريقة توريد تلك الخامات والأنظمة ومراحل الإنشاء المختلفة، ومتابعة التكلفة والزمن اللازم لتنفيذ المشروع، ولهذا النموذج الرقمي مجموعة من الخصائص (10). وهناك مراحل متعددة للوصول لذلك التكامل منها:

المرحلة الأولى: التصميم الابتدائي: تمثل مرحلة التصميم الابتدائي أول مراحل البعد الإنتاجي للعملية التصميمية، والتي يتم خلالها صياغة مجموعة من البدائل التصميمية التي تهدف إلى حل المشكلة، وتطبيقات BIM هي بالأساس تطبيقات للنمذجة ثلاثية الأبعاد 3D Modelers، فيمكن من خلالها عمل مجموعة من البدائل في صورة ثلاثية الأبعاد، وبالإضافة إلى هذا، يمكن لتلك التطبيقات استخراج مجموعة من المعلومات الخاصة بكل نموذج، سواء المساحات أو الأحجام أو النسب البنائية أو البرنامج الوظيفي المحقق في كل نموذج، والتي تساعد في عملية تقييم تلك البدائل واختيار الأنسب بينها.

ولم تتوقف إمكانيات النمذجة ثلاثية الأبعاد لتطبيقات BIM عند التشكيلات التقليدية والمألوفة، بل قام مطورو تلك التطبيقات بإدماج مجموعة من أدوات والوسائل التي تساهم في عملية التفكير الرقمي غير التقليدي باستخدام المعادلات الرياضية والنمذجة بالصيغ الحسابية Parametric Design، ويتم هذا عن طريق محرك المتغيرات الرياضية Parametric Engine، والذي دعمت به شركة Autodesk أحدث إصداراتها من برنامج Revit، يعتمد هذا المحرك على الخوارزميات الرياضية Algorithms Parametric التي تكتب بواسطة لغات البرمجة Language Scripting، وقد استخدمت تلك الطريقة في صياغة التشكيل المعماري لأبراج مرتفعات المحيط Ocean Heights في الإمارات العربية المتحدة (7). شكل رقم (5).

المرحلة الثانية: التصميم النهائي: في تلك المرحلة التي يتم فيها الاستقرار على الحل المقترح، والذي تم نمذجته بشكل ثلاثي الأبعاد، يلعب نموذج BIM دوراً مهماً في إجراء عملية المحاكاة للعوامل المؤثرة على التصميم بهدف اختبارها وتطويره وتحسين ملائمتها للظروف والعوامل البيئية والمناخية، وذلك من خلال مجموعة تطبيقات تستخدم عمل التحليلات اللازمة لقياس كفاءة أداء الأنظمة داخل المبني، وهذا عن طريق دمج المعلومات والبيانات اللازمة للتحليل من خلال نموذج BIM، وهناك العديد من تطبيقات التحليل التي تعمل بطريقة المحاكاة، والتي تعمل على تحليل مجالات مختلفة سواء صوتية أو ضوئية أو حرارية أو غيرها، ومن أهمها وأشهرها في عملية المحاكاة برنامج Daysim، حيث يقوم هذا البرنامج بحساب وتحليل كمية الإضاءة الطبيعية الواصلة للمبنى على مدار العام، كما يقوم بحساب كمية الإضاءة

6. نماذج تعديل الرسومات على ما تم بناؤه: تقوم هذه النماذج على ما تم بناؤه في الموقع ولكن بالاتصال مع نموذج BIM، ولكي تتم هذه النماذج بالشكل الصحيح، يجب أن يبدأ العمل بها مع بداية تنفيذ المشروع خطوة بخطوة، بحيث إذا انتهى الجدول الزمني تكون هذه النماذج في الشكل النهائي للمبنى، وتحتاج هذه النماذج إلى إدارة جيدة ومتابعة مستمرة بين أفراد ومجموعات العمل على التصميم التنفيذ (1).

7. نماذج التشغيل والصيانة: تعتمد هذه النماذج على مستويات متعددة من التفاصيل مع ربط دائم مع المبني بعد التنفيذ وتطوير مستمر لما يستجد على المبني من متغيرات لتلبية الصيانة الدورية والدائمة للمبنى، ولكي يتم ذلك يتم إعداد مخطط للمبنى يجمع به كل ما يخص المبني من عناصر وأجزاء وتفاصيل (1).

النموذج التكاملية الذكي

يشير مصطلح النموذج الذكي إلى حقيقة كون المعلومات مضمنة داخل النموذج الافتراضي ثلاثي الأبعاد، بعض هذه المعلومات فيزيائي ويتضمن أبعاد العناصر ومواقعها النسبية وكمياتها وبقية المتغيرات التي تصفها. يشير مصطلح المتحولات المعلوماتية إلى المعلومات التي تميز العناصر المتشابهة (8). ويضيف إنشاء النماذج المركبة بعداً آخر على مفهوم النموذج الذكي، لأنه غالباً ما يتم دمج النماذج المعمارية والإنشائية والكهربائية والميكانيكية والصحية في نموذج مركب لعرض المشروع كاملاً ومن أجل التنسيق بين مختلف الاختصاصات.

مصادر النموذج التكاملية: أفضل المصادر لنموذج البناء هو عناصر فريق التصميم لأن المعرفة التي يحصلون عليها من عملية النمذجة وفهم المشروع الذي يطورونه هي من أهم ميزات نظام نمذجة معلومات البناء.

الارتباطات النموذج التكاملية: الربط أحد المفاهيم المهمة للمنشآت الافتراضية وهو اتصال مع مصادر متعددة للمعلومات. هذه المعلومات يمكن أن تكون جزءاً من النموذج الثلاثي الأبعاد أو تكون محتويات في عناصر مفصلة عن ملف النموذج نفسه، كأن تخزن في جداول أو ملفات قواعد معطيات أو حتى ملفات نصية.

ربط النموذج بالمعلومات: تكون فيها المتحولات المعلوماتية جزءاً من الأغراض التي يحتويها نموذج المشروع (8).

مفهوم التكامل في تطبيقات نمذجة معلومات المباني

لا تتوقف إمكانيات BIM في العملية التصميمية عند اختيار ووضع المكونات الرئيسية في المبني، مثل مواد الإنشاء والأرضيات سواء الخرسانية أو المعدنية والجدران، كذلك وضع النظم الميكانيكية والكهربائية في المبني مثل نظام التكييف المركزي والتغذية والصرف، بل تتجاوز إمكانيات BIM هذا الحد إلى إجراء اختبار لجميع تلك المكونات وتشغيلها جنباً إلى جنب، للتأكد من عدم وجود أي تعارض أو تداخل فيما بينها (Clash Detection) وحل أي مشكلة قد تنتج من تلك الأنظمة والمواد قبل البدء في التنفيذ، بدلاً من الاضطرار إلى إعادة تنفيذ بعض الأعمال في الموقع في حال اكتشاف خطأ (9). شكل رقم (4).

زائره أهرامات الجيزة ، وهي أحد أعظم الآثار في العالم (11).
والجدول رقم (1) يوضح تفاصيل المشروع.

جدول رقم (1): تفاصيل مشروع متحف مصر الكبير بالجيزة

المكان	الجيزة، مصر
Client	وزارة الثقافة المصرية
بدء الإنشاء	2002
المساحة	2,100,000م ²
التكلفة	\$550M
المعماري	هنگينگ
المهندس الإنشائي	أروپ
مهندس الخدمات	يورو هاپولد

لقد تم اختيار التصميم المعماري الحديث للمتحف من خلال مسابقة دولية للهندسة المعمارية التي أشرفت عليها وزارة الثقافة المصرية في يناير 2002 برعاية "اليونسكو" في موقع الأهرامات نظرا لأهمية الموروث الثقافي الحضاري للمجموعات التي سيحتويها المتحف مثل مجموعة توت عنخ آمون المشهورة. وسيقدم المتحف مجموعة متنوعة من الخبرات والخدمات لزائريه؛ عن طريق مزج ثقافة القدماء المصريين والتكنولوجيا من خلال مجموعة الآثار الهائلة، وأيضا خدمة تعليمية للأطفال والكبار وخدمات بحثية ودخول سهل إلى مناظر الأهرامات الرائعة عن طريق الحدائق. شكل رقم (6).

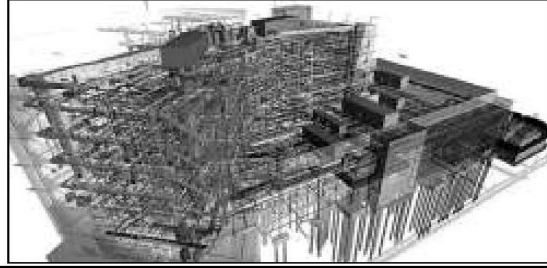
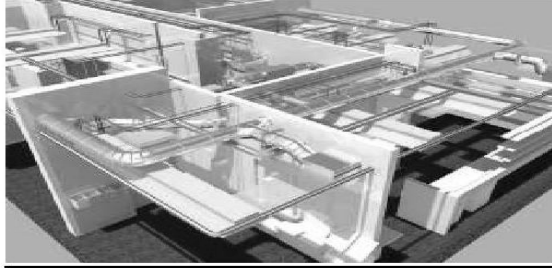
الصناعية المطلوبة لكل نشاط في المبنى، وكيفية التحكم فيها (10)، كما يقوم تطبيق (Apachesim) بتحليل الأداء الحراري للمبنى، وذلك من خلال قياس درجات الحرارة للأسطح الخارجية للمبنى.

المرحلة الثالثة: التصميم التفصيلي: تعتبر هذه المرحلة هي المرحلة الأهم والأخيرة في البعد الإنتاجي من العملية التصميمية، إذ إن تلك المرحلة تعد بمثابة المرحلة التحضيرية لعملية التنفيذ. ويتم خلالها إعداد الرسومات التنفيذية والتفصيلية الكاملة للتصميم، ويظهر الدور الأكبر والأهم لنموذج BIM في هذه المرحلة نظرا لكثرة الأنشطة بها. واتساع فريق العمل الهندسي من مختلف التخصصات، ويقدم نموذج BIM تلك المميزات إلى العملية التصميمية (9).

مثال على تطبيق نمذجة المعلومات البنائية (BIM)

مشروع متحف مصر الكبير بالجيزة

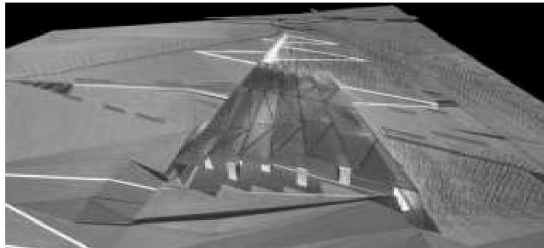
يقع المتحف المصري الكبير على بعد أميال قليلة غرب القاهرة وبالقرب من أهرامات الجيزة ، ويقوم فريق مكون من 25 مهندسا معماريا مع 350 عاملا بالعمل في متحف الآثار العملاق الجديد على مساحة 117 فدانا، ويقام المتحف الجديد على سهل صحراوي على حافة وادي النيل، حيث يرى



شكل رقم (4): بناء النموذج التخلي BIM ووضع كافة العناصر المعمارية فيه
http://construction.com/CE/CE_images/2009/Dec_Nystrom_2.jpg



شكل رقم (5): صياغة التشكيل المعماري لأبراج مرتفعات المحيط Ocean Heights في الإمارات باستخدام محرك المتغيرات الرياضية
http://prophubai.com/images/building/2006/05/b_o_7_88.jpg



شكل رقم (6): التصميم المقترح لمشروع متحف مصر الكبير بالجيزة
http://www.bonah.org/wp-content/uploads/m/434_gem-4.jpg

مصر، وحدائق التماثيل الخارجية المتصلة بصالات عرض المتحف، فضلا عن مجموعة من الحدائق العامة المتنوعة (11).

2. دور نمذجة المعلومات البنائية (BIM) في تصميم المشروع:
يعد مشروع متحف مصر الكبير بالجيزة والمطل على سفح الأهرامات من المشروعات التي اعتمدت في تصميمها على برامج BIM في كافة مراحلها، وذلك بدءا بالمسابقة التي أجريت وطرحت عالميا، حيث تم إعداد نموذج ثلاثي الأبعاد محاك لمساح الأرض، وعلاقتها بالموقع والأهرامات، مع توضيح تضاريس الموقع، والهضبة التي كانت تحيط بالموقع، وتوضيح زوايا الرؤيا، والشوارع المحيطة. شكل رقم (8).

ثم تم طرح هذا النموذج للمتسابقين لكي يستعينوا به في وضع الأفكار، كما تم وضعه على الموقع الإلكتروني للمسابقة مع مستندات المسابقة لمن يريد المشاركة دون القوم لأرض المشروع (1).

وتعد الفكرة التي فازت بالمسابقة من الأفكار المعقدة، وذلك نظرا لتعاملها مع ظروف الموقع، والتي هي عبارة عن هضبة متدرجة المناسيب، بالإضافة إلى استخدام المصمم سقف المشروع كي تمثل استمرارية للتدرج الطبيعي للهضبة، بالإضافة لرغبته بأن يسمح سقف المتحف بالرؤية من خلاله، فضلا عن تصميمه سقف يمثل شرائح مثلثة مركبة معا بطريقة تسمح بمرور الضوء دون الأشعة، وتمت دراسة الفكرة باستخدام برامج BIM في كل عناصر المشروع، بدءا باختيار الموقع، مروراً بتحديد زوايا الرؤيا، حيث جاء تصميم المتحف عبارة عن مخروط رؤية متجه نحو الأهرامات الثلاثة بواسطة نماذج التصميم (12). شكل رقم (9).

1. وصف المشروع: يبنى المتحف على مساحة كبيرة تصل إلى 480,000 مترا مربعا ليستوعب نحو 15 ألف زائر يوميا، ومن المقرر أن يضم المتحف الكبير مكتبة عملاقة ومراكز أبحاث ومعامل ترميم، كما يضم أيضا ساحة عامة للمحلات التجارية ومقاهي ومطاعم، كما يحوي أيضا متحف في الهواء الطلق وتم تصميم المتحف الجديد بطراز فريد يسمح باستخدام التكنولوجيا الحديثة لإنشاء أرشيف ومكتبة حديثة قادرة على حفظ المعلومات والأنشطة المرتبطة بالبحوث ليصبح المتحف المصري الكبير مركزا رئيسيا للتاريخ الفرعوني في جميع أنحاء العالم، وتنفذ البوابة المثلثة العملاقة في مدخل المتحف إلى باحته الرئيسية التي سيتصدها تمثال ضخم للفرعون رمسيس الثاني يصل وزنه إلى 83 طنا، والذي يوجد حاليا في قلب العاصمة بميدان رمسيس (12)، ويشير تصميم المشروع إلى طموح كبير في إخراج نموذج معماري متميز جديد بالقرب من أهرامات الجيزة، حيث تغطي واجهة المتحف الجديد واجهة الأهرام.

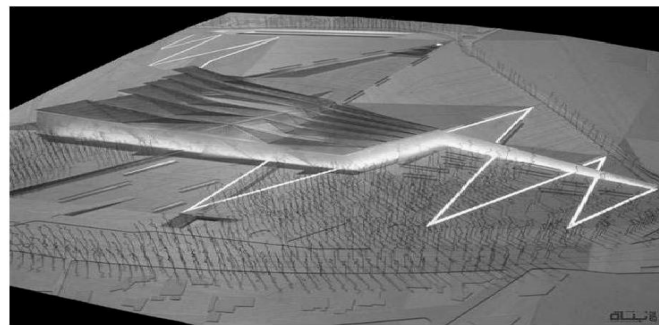
أما واجهة المتحف ستبلغ مساحتها 600 متر عرض بطول 45 مترا، وستكون من حجارة [الألباستر] الشفاف. ومركز الترميم ستبلغ مساحته 14 ألف متر. شكل رقم (7)، حيث تعلو واجهة المتحف بارتفاع 5 طوابق وذات جدران شفافة ومضاءة ليلا لترى من كافة أنحاء القاهرة، فيما روعي أن يصل ارتفاع الجدران مع أبعاد الهرم الأكبر، بحيث إذا أقمنا خطا مستقيما من نهاية جدران المتحف سيصل إلى أعلى قمة للهرم الأكبر بمنطقة الأهرامات. ويتم إنشاء منطقة ترفيهية على مساحة 25 فدانا، تتضمن أماكن الترفيه والخدمات والحدائق العامة المختلفة، والمرافق ومناطق الترفيه والتي ستخدم الجمهور على مدار 24 ساعة، وروعي في فلسفتها تطور الحضارة المصرية وتنوعها، وتشمل حدائق أرض



شكل رقم (7): الواجهة الرئيسية المقترحة لمشروع متحف مصر الكبير بالجيزة
<http://www.almorakib.com/wp-content/uploads/2015/04/a6d801a7-740a-4a3c-9c30-ed02f1c816d3.jpg>



شكل رقم (8): نموذج ثلاثي الأبعاد محاك لمساح الأرض
<http://www.cairolive.com/zahma/wp-content/uploads/2013>



شكل رقم (9): تصميم المتحف عبارة عن مخروط رؤية متجه نحو الأهرامات
http://www.bonah.org/wp-content/uploads/m/434_gem-3.jpg

استخلاص جوانب العلاقة بين BIM والتصميم المتكامل

1. يعد شكل وتأثير التعاون بين التخصصات المتعددة هو المفتاح وهو أيضاً القضية ذات التأثير الأهم لتحقيق التصميم المتكامل. ويمكن تصور الصعوبة في تنظيم التعاون، غير أن شكل التعاون متنوع، فقط الفريق المنظم تنظيماً جيداً مع كفاءة عالية يمكنه تحقيق الهدف النهائي للتصميم المتكامل.

2. يمثل المعماري صفة القائد في الفريق التصميمي بأكمله للوصول للتصميم المتكامل، الأمر الذي يعطي الجهد الأكبر لمنظومة المعلومات الكاملة للمهندس المعماري. حيث إن قدرة المهندس المعماري في التنظيم والإدارة والمعرفة في التخصصات الأخرى ذات الصلة تعطي القدرة الكافية لقيادة فريق التصميم المتكامل، بالتالي يمثل التصميم المتكامل علامة تجارية جديدة، والتي ستكون صعبة على المصممين الذين اعتادوا على طريقة التصميم التقليدية. خصوصاً مع تعقيد وتطور برامج BIM (10).

3. يستند التصميم المتكامل على تبادل وتعديل المعلومات بصورة عامة، ويمثل BIM الوسيلة الأفضل للتصميم المتكامل. فهو يدمج جميع البيانات والمعلومات لكافة التخصصات الهندسية في دورة حياة المبنى بأكملها للوصول إلى نموذج معلوماتي بنائي واحد. كما أنه يعمل على نقل الأفكار المختلفة، من تلك التخصصات ذات الصلة إلى معلومات وبيانات تحفظ في الكمبيوتر، والتي تتيح للمصممين المعرفة والمرونة والاختيار في نفس الوقت (13).

4. وعليه، في جميع مراحل عملية البناء يعد BIM أداة مفيدة جداً للمساعدة في اختيار أفضل فكرة تصميمية، كما إنها أفضل وسيلة يمكن من خلالها معرفة تفاصيل تشييد المباني وفترة صيانتها، من خلال تعاون الفريق التصميمي بأكمله، بالتالي يمكن لعملية التصميم أن تمضي قدماً بسلاسة وكفاءة، فهي تقلل من التكلفة التراكمية بشكل كبير وتوفر الطاقة في فترة دورة حياة المبنى الكاملة.

5. من خلال استخدام إمكانيات وكفاءة الكمبيوتر العالية، يتم تغيير أي بيانات وفقاً للحاجة في نفس اللحظة، مما يقلل من ساعات العمل مقارنة مع طريقة التصميم التقليدي. كما يمكن للمصمم أيضاً استخدام هذا النموذج الرقمي للتواصل مع العملاء، في فترات التصميم المختلفة (10).

6. BIM هي أداة ولكنها لا يمكن أن تحل محل التفكير الإبداعي التصميمي. على الرغم من أن الرسم الحاسوبي أصبح أكثر شعبية وشيوعاً، لكنه لا يمكن أن يحل محل رسوم اليد والرسومات الأولية، كما هو حال النموذج المادي الذي لديه تأثير كبير أكثر من رسم الكمبيوتر، خاصة في بداية فترة التصميم، حيث تكون الرسومات الأولية والنموذج المادي أكثر فائدة في خلق أفكار التصميم (13).

أهم البرمجيات المتخصصة في استخدام تقنيات نمذجة المعلومات البنائية (BIM)

هناك العديد من البرامج العالمية التي تعتمد هذه التقنية، يمكن ذكر بعض الأمثلة المشهورة منها:

1. **على صعيد الهندسة المعمارية** يبرز برنامج ArchiCAD المنتج من قبل شركة Graphisoft، و Autodesk Revit Architecture المنتج من قبل Autodesk. ويمتاز كلا البرنامجين بسهولة التصميم، حيث يكون الرسم وفقاً للعناصر (جدار، باب، عمود...) التي تحدد خصائصها بشكل منظم في قائمة الخصائص properties (الأبعاد، نوع المواد...). ومن الفوائد الأساسية هنا أنّ المهندس يكتفي برسم كل طابق (Plan) وبعد الانتهاء منها يعطي البرنامج بشكل تلقائي كل من الواجهات Facades والمقاطع Sections، والمنظور الثلاثي الأبعاد (Perspective) (5).

تم بناء نموذج المتحف بشكل كامل كنموذج محاك للمتحف الذي سيتم بناءه، والجدران، والأرضيات والسلالم والأسقف، كمنزاج التنفيذ والمواد المستخدمة، والعناصر الإنشائية، والتجهيزات الميكانيكية، ثم تمت دراسة عناصر الحركة للزوار، وأماكن التماثيل والمحتويات المتحفية، ووضعت خطط تحميل الآثار ومسارات حركة آليات النقل، بما يسمح بتلافي مشاكل التعارضات التي تحدث وقت التنفيذ، بالإضافة لذلك، تم إعداد نماذج خاصة بدراسة التركيبات الفنية المعقدة لكل عناصر المشروع، وبخاصة سقف المشروع والواجهة الرئيسية للمتحف في صورة نماذج ثلاثية الأبعاد لتوضيح كيفية تركيب العناصر الإنشائية، ومواقع الزجاج وكيفية تثبيته في العناصر الإنشائية شكل وتفصيل عناصر التثبيت، ثم إجراء الحسابات الإنشائية، والتأثيرات البيئية على كافة عناصر المشروع (1).

المخرجات المستخلصة من استخدام تطبيقات BIM في العملية التصميمية

تعمل العديد من المؤسسات والمكاتب المعمارية الكبرى على تحويل عملها من تطبيقات CAD إلى تطبيقات BIM المتطورة، وذلك لما تقدمه تلك التطبيقات لمجالات التصميم والرسم المعماري، وقد أشارت مؤسسة Autodesk المنتجة لبرنامج Revit إلى أبرز المخرجات منتطبيقات BIM كالآتي (9):

1. **الإنتاجية:** تعتقد معظم المؤسسات المعمارية أن عملية التحول من تطبيقات CAD إلى BIM في العمل ستعمل على تقليل الإنتاجية خلال فترة التحول، وقد وجدت Autodesk أن معدل الإنتاج يقل بنسبة من 25 إلى 50% أثناء فترة تدريب العاملين الأولى خلال مراحل التحول، ولكن سرعان ما يتم تعويض هذا النقص في الإنتاجية بمرور فترة التدريب، حيث يعود معدل الإنتاج إلى نفس معدلاته السابقة بعد 3 أو 4 أشهر من بداية التحول (7).

2. **سهولة:** تعد تطبيقات BIM متوافقة بشكل كبير مع المعماريين والمصممين، وأسهل في التعلم بكثير من تطبيقات CAD التقليدية، حيث بدأت مؤسسة Martinez+Cutri المعمارية في استخدام تطبيقات BIM منذ عام 2003، وذلك عن طريق تدريب ثلاثة من العاملين في المؤسسة في فترة زمنية لا تتجاوز الأسبوعين (7).

3. **تحسين سير العمل:** يسير العمل داخل أي مؤسسة عن طريق التنقل بين النشاطات المختلفة الخاصة بنوعية هذا العمل، وقد أكد حوالي 82% من العاملين باستخدام تطبيقات BIM في العملية التصميمية أن تغيراً إيجابياً حدث في معدل سير العمل.

تعمل مؤسسة Simpson Glotman باستخدام تطبيقات BIM منذ عام 2005، وقد استفادت من تطبيقات BIM في تحسين سير العمل، وذلك عن طريق تنظيم العلاقة بين أفراد الفريق التصميمي، وتحديد المسؤوليات لكل عضو منهم، حيث أصبح المصمم قادراً على دراسة تلك التفاصيل باستخدام النموذج ثلاثي الأبعاد (10).

4. **رفع قيمة التصميم:** يعد انخفاض معدل تكرار الأخطاء الحادثة في عملية الرسم ومطابقة الأعمال باستخدام تطبيقات CAD من أهم مميزات تطبيقات BIM، كذلك فهي تتيح للمصممين فهماً أعمق للتصميم عن طريق أدوات التحليل والنمذجة، وكذلك فهي تتيح وقتاً أطول لتحسين وتطوير الأفكار، مما يعني تصميماً أكثر قيمة، كذلك تتيح للمقاولين استلام رسومات على قدر عالٍ من الدقة والجودة، في وقت مناسب (10).

5. **تقليل المخاطر:** تقدم تطبيقات BIM ميزة التنسيق الأوتوماتيكي بين التخصصات المختلفة بشكل ذاتي، مما يقلل نسبة الأخطاء الناتجة عن التنسيق والمطابقة اليدوية المتبعة في تطبيقات CAD التقليدية، وهذا بفعل قاعدة البيانات الموحدة الموجودة داخل البرمجيات، حيث تشير مؤسسة Donald Powers المعمارية التي استخدمت تطبيقات BIM في أكثر من 20 مشروعاً، أن الإنتاجية الخاصة بها نتيجة لتقليل المخاطر زادت بنسبة 30%، كما أن كمية التساؤلات المطروحة من قبل المقاولين أثناء التنفيذ قلت بنسبة 50%، بسبب التنسيق الجيد بين التخصصات المختلفة (10).

مشاركتها بسهولة، ويمكن أيضاً ملاحظة تحسين التنسيق بأفضل التوافقات بين أعضاء فريق التصميم، والسماح لمهندسي العمارة والإنشاء والكهرباء والميكانيك إدارة المشروع بصورة أكثر فعالية.

- يستند التصميم المتكامل على تبادل وتعديل المعلومات بصورة عامة، ويعتبر BIM الوسيلة المثلى للتصميم المتكامل. فهو يدمج جميع البيانات والمعلومات لكافة التخصصات الهندسية في دورة حياة المبنى بأكملها للوصول إلى نموذج معلوماتي بنائي واحد.
- لا يمكن أن يحل BIM محل التفكير الإبداعي التصميمي وذلك لكونه مجرد أداة أو وسيلة، خاصة في بداية فترة التصميم، حيث تكون الرسومات الأولية والنموذج المادي أكثر فائدة في خلق أفكار التصميم.
- أبرز المخرجات المستخلصة من استخدام تطبيقات BIM (الإنتاجية، السهولة، تحسين سير العمل، رفع قيمة التصميم، وتقليل المخاطر).

المصادر

1. أحمد، محمد حسن خليل. (2011). تأثير تكنولوجيا المعلومات على تطور الفكر المعماري. رسالة ماجستير غير منشورة، جامعة الأزهر، كلية الهندسة.
2. النعيم، بندر. (2014). **نمذجة معلومات البناء**. صحيفة الشرق، العدد رقم (867) صفحة (13) بتاريخ 2014/4/19. <https://buildinginformationmanagement.files.wordpress.com/2012/10/aec-techology-evolution1.png>
3. جعفر، أشرف عبد المنعم. (2013). دور نموذج BIM في البعد الإنتاجي للعملية التصميمية. مجلة قسم الهندسة المعمارية. كلية الهندسة بشبرا، جامعة بنها، مصر.
4. يونس، علي. (2014). تقنيات BIM. مجلة أوريكا العلمية الإلكترونية. متاح على الموقع: <https://eurekamagazine.wordpress.com/2013/03/27/6.http://envisioncon.com/wp-content/uploads/2014/03/bim-diagram.jpg>
7. Holness G. (2008). Building information modelling gaining momentum. ASHRAE. J. 101-106.
8. Willem K. (2008). Building information modeling. New York, The McGraw-Hill Companies, Inc. pp. 48-59.
9. Ian H. and Bob B. (2005). Building Information Modelling Two Years Later – Huge Potential, Some Success and Several Limitations. Newforma Publication.
10. Charles T. (2012). BIM: Building Information Modeling. Design Advocacy Group. Philadelphia-USA.
11. الشامي، عصام. (2014). المتحف المصري الجديد. مجلة المعرفة الإلكترونية. متاح على الموقع: <http://www.marefa.org/index.php/>
12. لبيب، مروة. (2015). مروة لبيب، المتحف المصري الكبير.. جسر يربط بين الماضي والحاضر والمستقبل، مقال منشور في موقع بوابة اليوم السابع الإلكتروني: <http://www.photoyoum7.com/450368>
13. Zhang S. (2013). Building Information Modeling and Sustainable Architecture, International Conference on Advanced Information and Communication Technology, Department of Architecture and Urban Planning, Anhui University of Architecture, Hefei, China.

ومن أبرز برامج نمذجة المعلومات البنائية (BIM) المعمارية:

- Autodesk Revit Architecture •
- GraphisoftArchiCAD •
- NemetschekAllplan Architecture •
- Gehry Technologies – Digital Project Designer •
- NemetschekVectorworks Architect •
- Bentley Architecture •
- IntelliCAD (4MSA IDEA Architectural Design) •
- CADSoftEnvisioneer •
- Softtech Spirit •
- (RhinoBIM)BETA* •

2. **على صعيد الهندسة الإنشائية:** يبرز برنامج Autodesk Revit Structure الذي يتميز بسهولة التصميم الإنشائي (اعتماد النموذج الفيزيائي لا التحليلي) مع توفر تقنية الربط ببرنامج Autodesk Robot Structural Analysis Professional ، الأمر الذي يمكننا من تصميم المبنى إنشائياً بشكل مباشر. كما يسمح هذا البرنامج بتحديد الأسعار والكميات وإقامة الرسومات الإنشائية.

ومن أبرز برامج نمذجة المعلومات البنائية (BIM) الإنشائية:

- Autodesk Revit Structure •
- Bentley Structural Modeler •
- Bentley RAM, STAAD and ProSteel •
- Tekla Structures •
- CypeCAD •
- Graytec Advance Design •
- StructureSoft Metal Wood Framer •
- NemetschekScia •
- 4MSA Strad and Steel •
- Autodesk Robot Structural Analysis •

الاستنتاجات العامة

- تتيح نمذجة المعلومات البنائية للجميع الاطلاع على المبنى واحتياجاته وتصحيح المشكلات وتحسين جودة البناء قبل البدء في عملية التنفيذ.
- يجب أن تتناغم أهداف فريق التصميم وأن لا تتعارض مع أهداف المالك، وهنا نرى أن استخدام تقنية نمذجة معلومات البناء قد يساعد في تحقيق أهداف المشروع، مع التأكيد أن هذه التقنية ليست هدفاً بحد ذاتها بل هي مجرد أداة لتحقيق الهدف المنشود.
- من أهم مميزات نظام BIM أنه يجنب باتجاه جعل عملية التصميم أكثر شفافية، لأن بناء نموذج ثلاثي الأبعاد يظهر ما تم تحقيقه وما تم إغفاله في تصميم المشروع، وما نعتبره هنا فائدة كبرى لهذا النظام يصبح عائقاً أمام بعض عناصر الفريق الذين لم يعتادوا على العمل في بيئة شفافة.
- النجاح في استخدام تقنية BIM يتطلب مقارنة نفسية (psychological) جديدة ومختلفة عما اعتادت عليه قطاعات صناعة الإنشاءات، والتي لن يغير من سلوكها استخدام البرمجيات والتقنية الجديدة فقط بل إن التغيير المطلوب يحتاج سلوكيات أكثر عمقا من مجرد استخدام أدوات جديدة.
- تتطلب تقنية نمذجة معلومات البناء مزيداً من التعاون بين ممثلي المشروع من عملاء وملاك ومهندسين ومقاولين لتعميق تطور فكر روح الفريق وتجعل أفراد أكثر ارتباطاً لتبادل المساعدات فيما بينهم والتشارك في المسؤولية عن المنتج النهائي.
- إن استخدام نموذج المعلومات البنائية لا يمكن من إنتاج وثائق التشييد فحسب، ولكنه أيضاً بمثابة قاعدة لتقديم نتائج التحليل الهيكلي والتصميم بطريقة يمكن

N.B The views expressed in this issue are of the authors and do not necessarily reflect the views of the Editorial Board or the policies of the International Centre.

Copyright © 2015 by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or copied in any form or by any means without prior written permission from the Editor-in-Chief of the Journal.