

# IJST

## INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

---

Vol. (6), No. (2) JUNE 2011

---

ISSN: 1816-2509

[www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

# IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology  
المجلة الدولية للعلوم والتقولوجيا

---

**Volume 6. No. 2 / June 2011 / ISSN: 1816-2509**

---

***A Refereed Scientific Journal Since 2006***

مجلة علمية محكمة منذ عام 2006

***Issued By:***

***The International Centre for Advancement of Sciences and Technology***

IJST contact Information:

P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan

Tel. +96265602285

E-mails: [info@ijst-jo.com](mailto:info@ijst-jo.com) / [info.icast@yahoo.com](mailto:info.icast@yahoo.com)

URL: [www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

---

## EDITORIAL BOARD - 2011

---

**Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.**

**(Editor-in- Chief)**

Professor of Microbiology / Faculty of Pharmacy / Al- Isra University / P.O. Box 2793. Amman 11953, Jordan  
[shammari@ijst-jo.com](mailto:shammari@ijst-jo.com)

**Abbas, Jamal A.**

Professor of Plant Ecophysiology / College of Agriculture / Kufa University / Iraq  
[phdjamal@yahoo.com](mailto:phdjamal@yahoo.com)

**Abdul- Ghani, Zaki G.**

Professor of Microbiology / Faculty of Pharmaceutical sciences / Amman Private University / Jordan  
[zaki\\_abdulghani@yahoo.com](mailto:zaki_abdulghani@yahoo.com)

**Abdul- Hameed, Hayder M.**

PhD in environmental Engineering / Environmental Engineering Dept./ Faculty of Engineering/ Baghdad University/ Iraq.  
[hayder3almunshi@yahoo.com](mailto:hayder3almunshi@yahoo.com)

**Al- Abbasi Abdul Ridha M.**

Professor of Infectious Diseases and Clinical Immunology / EMRO- WHO the NAMRU3 Labs. / Cairo- Egypt  
[alabbasiam@yahoo.com](mailto:alabbasiam@yahoo.com)

**Al – Banna , Anton, S. A**

Professor in Microbiology and Virology/ Faculty of Veterinary medicine/ Baghdad University / Iraq  
[albanaantoon@yahoo.com](mailto:albanaantoon@yahoo.com)

**Al- Dabbagh, Riadh H.**

Professor of Engineering Hydrology/ UAE  
[riadhdabbagh@yahoo.com](mailto:riadhdabbagh@yahoo.com)

**Al- Douri, Atheer A. R**

PhD in Microbiology/Faculty of Veterinary Medicine/ Baghdad University/ Iraq  
[aaldouri96@yahoo.com](mailto:aaldouri96@yahoo.com)

**Al- Jashami, Najim A.**

Professor of Nuclear Material Sciences / Dept. of Physics / College of Sciences / Kufa University / Iraq  
[na\\_phys@yahoo.com](mailto:na_phys@yahoo.com)

**Al- Mashaykhi, Akram Othman**

PhD in IT / Amman Arab University for Graduate Studies / Jordan  
[akram.othman@gmail.com](mailto:akram.othman@gmail.com)

**Al- Murrani, Waleed K.**

Professor of Genetics and Biostatistics / University of Plymouth/ UK  
[profmurrani@yahoo.com](mailto:profmurrani@yahoo.com)

**Al- Saqur, Ihsan M.**

Professor of Parasitology/ Faculty of Sciences / Baghdad University/ Iraq  
[drihsanalsagur@yahoo.com](mailto:drihsanalsagur@yahoo.com)

**Al- Shamaony, Loai**

Professor of Biochemistry / Faculty of Pharmacy / Misr University for Sciences and Technology / Egypt  
[loaialshamaony@yahoo.com](mailto:loaialshamaony@yahoo.com)

**Alwachi, Sabah N.**

Professor of Physiology / Biology Dept./ College of Sciences/ Baghdad University/ Iraq  
[sabahalwachi@yahoo.com](mailto:sabahalwachi@yahoo.com)

**Daws, Kasim M.**

Professor of Mechanical Engineering / Faculty of Engineering / Baghdad University / Iraq  
[kasim\\_daws@yahoo.com](mailto:kasim_daws@yahoo.com)

**Khamas, Wael**

Professor of Anatomy and Histology / College of Vateriaary Medicine / Western University of Health Sciences / Ponomo -California/ USA  
[wael\\_khamas@yahoo.com](mailto:wael_khamas@yahoo.com)

**Mohammed, Ramadhan H.**

PhD in Geology / College of Sciences / Duhook University / Iraq  
[ramadhan56\\_2000@yahoo.com](mailto:ramadhan56_2000@yahoo.com)

**Editorial Board Secretary**

**TSTC & ICAST TEAM**

[Info.icast@yahoo.com](mailto:Info.icast@yahoo.com)

---

## FORWARD

---

Year 2011 is the success year of our Journal- The International Journal for Sciences and Technology- IJST. Great values had been added to our Journal, and today, It is my pleasure to welcome you back and present you this issue, Volume 6, No. 2 (2011), the second issue of this year, with diversity of researches and elite experts of the Editorial Board and Advisory Group. The members of Editorial Board, the ICAST and TSTC teamwork and I hope you will find this collection of research articles useful and informative.

This issue, IJST had been gifted by new Outstanding Expert, **Prof. Loai Al-Shamaony** as a new member in the Editorial Board who presented great efforts for evaluating many researches in this issue. On behalf of IJST team, I would like to present him our deep appreciation and thanking for his patience, following up, and evaluating the researches.

We are so honored to have all the new editorial board members being joined us in 2011, to strengthen our efforts, raising the prestigious level of the journal, and share in pushing all steps toward shining scientific future in Arab World.

The journal is one of the scientific contributions offered by ***the International Centre for Advancement of Sciences and Technology*** to the science and technology community (Arab region with specific focus on Iraq and International).

Finally, on behalf of *the International centre*, I would like to express my gratitude and appreciation to the efforts of the Editorial Board, Advisory group with their valuable efforts in evaluating papers, Researchers and the Editorial Board Secretary for managing the scientific, design, technical and administrative aspects of the Journal and for preparing this volume for final printing and publishing.

***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**

*Faculty of Pharmacy, Al- Isra University. Jordan*

**Dr. Abdullah Sh. Mahmoud**

*Faculty of Agriculture, Dept. of Food Sciences, Al- Kufa University. Iraq*

**Asssis.Prof. Dawood S. Al- Azzawi**

*College of Medicine, Dept. of Pediatrics Diyala University. Iraq*

**Prof. Dhia K. Ibrahim**

*College of Agriculture, Baghdad University. Iraq*

**Prof. Fouad K. Mohammed**

*College of Vaterinary Medicine, University of Mosul. Iraq*

**Assis. Prof. hadi K. Ismael**

*College of Administration and Economy, Dept. of Business Administration, Duhook University. Iraq.*

**Prof. Hameed M. Al- Obaidi**

*Faculty of Agriculture, Dept. of Food Sciences, Al- Kufa University, Iraq*

**Dr. Hayder M. Abdul- Hameed**

*Faculty of engineering, Dept. of Environmental Engineering, Baghdad University. Iraq*

**Dr. Ismail H. Aziz**

*Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Baghdad University. Iraq*

**Prof. Jamal A. Abbas**

*Faculty of Agriculture, Al- Kura university. Iraq*

**Prof. Loai Al- Shamaony**

*Faculty of Pharmacy, Misr University for Sciences and Technology. Egypt*

**Prof. Najim A. Askouri**

*College of Sciences, Dept. of Physics, Al- Kura University. Iraq*

**Prof. Zaki G. Abdul- Ghani**

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Amman Private University, Jordan*

---

## 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:**

#### **AGRICUTURAL SCIENCES**

##### **Extraction and Purification of Lectin from Grape Seeds**

*Montaha A. Al- Saffar*

#### **BIOCHEMISTRY**

##### **A comparison of neonatal bilirubin determined by blood gas analyzer and auto analyzer**

*Karim A. Obaid*

##### **Protective effects of two medicinal plants against CCl<sub>4</sub> induction of lipid peroxidation**

*Sundus H. Ahmed & Joao Batista*

##### **The relationship between hypothyroidism and prolonged jaundice in newborn babies**

*Thana I. Mustafa*

#### **CYTOGENETICS**

##### **The cytogenetic effect of *Capparis spinosa* on animal and human (*in vivo* and *in vitro* study)**

*Ebtehal H. Al- Naimy & Khulood W. Al- Samaraei*

#### **ELECTRICAL & ELECTRONIC ENGINEERING**

##### **Prolog-Based Sum of Product Logic Function Manipulation**

*Wafa F. Tobia*

##### **Training Artificial Neural Network using Back-Propagation & Particle Swarm Optimization for Image Skin Diseases**

*Hanan AR. Akar*

## **ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

### **Assessment of Wastewater Treatment Plants Performance and Reuse Opportunities**

*Firas Fraige & Laila Al- Khatib*

## **MICROBIOLOGY**

### **Incidence of *Listeria* in table-eggs in Baghdad Markets**

*Ali Hassan Ahmed AL-Shamary & Moutaz A. W. Abdul –Mounam*

## **MOLECULAR BIOLOGY**

### **Molecular Diagnosis of TWIST mutation in nasal septum's deviations by using PCR**

*Nawfal K. Yas & Shayma J. Ahmed*

## ARABIC SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)

### الأحياء الدقيقة – المجهرية

تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الانبولينيز Inulinase enzyme المنتج من

خميرة *Kluyveromyces marxianus*

غازي منعم عزيز، وزيد علي حسين و سحر ابراهيم حسين

العلاقة التعايشية بين بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحرارة النامية في درجات حرارة مختلفة

و تأثيرها على بعض الصفات للمنتوج النهائي

حسين / أحمد مهدي

### البيولوجيا الجزيئية

الحافات العلمية للهندسة الوراثية: مدخل الى علوم الحياة التركيبية

حسين فاضل الربيعي وعبد الجاسم محيسن الجبوري

### الصحة العامة

تقييم تأثيرات العنصر الثقيل الرصاص على صحة العاملين في مصنع البطاريات

سندس حميد أحمد، سراب كاظم ، جنان علي عبيد، عصام شاكر، فرقد عبد الله ، رواء جميل ،

فلاح عبد الحسن و محمد موسى

### العلوم الزراعية

تأثير حقن بيض التفقيس بتركيز مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني وبعض الصفات النوعية

والفسلجية للافراخ الفاقسة

فرح خالد الجاف

التحري عن بقايا مبيدات الكلور العضوية في اللحوم

عصام شاكر حمزة، عبود حيون مصلح ، عيسى عبد صالح ، فرقد عبد الله رشيد ، علي محمد جواد ،

سلوان سفيان ابراهيم ، عبد محمد ياس رياض رحيم نعمة ، عفراء عبدالوهاب علي و حسين ذياب احمد

## ***ENGLISH SECTION***

## Extraction and Purification of Lectin from Grape Seeds

Montaha A. Al- Saffar

Institute of Medical Technique – Al- Mansour, Baghdad - Iraq

Email: dr.montahabio@yahoo.com

### ABSTRACT

The aim of this study is to isolate lectin from seeds of *Vitis vinifera* by extraction using different solvents (phosphate buffer 0.1M (pH 7), phosphate buffer with NaCl 0.5M, acetate buffer (pH 5), tap water and distilled water. The highest specific activity (0.134 unit/ml) was observed in tap water. Further purification was done by precipitation with ammonium sulfate at 25-50% saturation. The dialyzed ammonium sulfate precipitate was subjected to affinity chromatography using sepharose- 6B column and fractions were tested by lectin activity. The lectin designated as lectin specific to galactose (gallelectins) with (187.5 unit/mg) specific activity and 3.043 purification fold. Lectin agglutinated human erythrocytes of AB blood group (23.9 unit/mL) activity as well as erythrocytes of bird, chicken, cattle, but does not agglutinate sheep, rats, and rabbit erythrocytes.

**Key words:** *Vitis vinifera*, plant lectin, lectin extraction

### الملخص باللغة العربية

هدف الدراسة عزل اللكتين من بذور العنب *Vitis vinifera* بواسطة محاليل مختلفة (محلول الفوسفات الداريء بتركيز 0.1 مولر ذي رقم هيدروجين 7، محلول الفوسفات الداريء مع كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولر ، داريء الخلات ذي رقم هيدروجين 5، ماء الحنفية ، والماء المقطر . اعطى ماء الحنفية اعلى فعالية نوعية ( 0.134 وحدة/ملغ) تبعها تنقية اللكتين المستخلص من بذور العنب *Vitis vinifera* بالترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع 25-50% ثم تقنية كروماتوغرافي عالية الألفة باستخدام عمود التلازن Sepharose - 6B وقدرة فعالية التلازن الدموي للكتين ، وكان اللكتين متخصص لسكر الكالكتوز (كالكتو لكتين) وقد اعطى فعالية نوعية ( 187.5 وحدة/ملغم) وبلغت عدد مرات التنقيه 3.043 مرة. وقد اظهر اللكتين المستخلص فعالية ( 23.9 وحدة/مللتر) تلازن كريات الدم في الانسان من نوع AB وكذلك تلازن كريات دم الطيور ، الدجاج والماشية ، ولم يظهر تلازن اتجاه دم ، الخراف والفئران ودم الأرنب .

## INTRODUCTION

*Vitis vinifera* L (common grapevine) is one of the world's largest fruit crops with a global production of around 69 million tons in 2006 (1). Since, about 80% of the total amount is utilized for the production of wine and juice, 10 million tons of grape pomace arise within a few weeks of harvest time, these wastes pose potential disposal and pollution problems along with loss of valuable biomass and nutrients (2,3). Bioconversion of food processing residues has increased attention regarding to fact that these residual matters represent possible and utilizable resources for conversion into useful products. In this context, the utilization of wastes of fruit processed as sources of heterogeneous groups of portion of non-immune origin with their non-catalytic binding sites capable of recognizing and reversibly binding to specific saccharide functional ingredients is a promising field (4).

Grape seeds are considered rich sources of polyphenolic compound (proanthocyanidin) antioxidant represent a group of condensed flavon-3-ol-such procyanidin that can be found in many plants like red wine of *Vitis vinifera* (the common grape)(5)

Lectin constitute a heterogeneous group of protein of non-immune origin with their non-catalytic binding sites capable of recognizing and reversibly binding to specific saccharide moieties(4).

Lectin was firstly found in plant and were latter isolated from animals as well (6). Seeds are the richest sources of lectins that show antioxidant or antibacterial activity, these agglutinins are also abundant in vegetative organs such as root, leaf, rhizome, and stem (7, 8).

The large concentration of lectin in plant seeds decreases with growth and suggests a role in plant germination and perhaps in the seeds survival itself (9).

There are several hypothesis regarding the physiological functions of lectins in plants, such as involvement in defense mechanisms, self recognition, symbiosis, transport, immobilization and storage of carbohydrate (5).

The present research reports the extraction and purification of lectin from seeds of *Vitis vinifera* belonging to the family vitaceae we have also detected hemagglutination activity.

## MATERIALS & METHODS

### Extraction of *Vitis vinifera* seeds:

Seeds of *Vitis vinifera* were collected from locally market, grape seeds were grinded, each of 20 grams were soaked in different solvents included potassium-phosphate buffer 0.1 M (pH 7), potassium phosphate buffer with NaCl 0.5M, Acetate buffer (pH 5), tap water, distilled water.

Each of these solvents had been homogenized separately with seed flour by ratio (1:5). The flour extracts from seeds were stirred for 15 min and centrifuged at 10,000 xg for 20min. The supernatants kept in 4°C.

### **Hemagglutination Activity**

#### Preparation of erythrocyte suspension:

The blood used was of human blood as well as animal blood (rat, rabbit, chicken, cattle, sheep and bird) and were mixed with phosphate buffer solution (PBS) (pH 9.8). These suspensions were centrifuged at 800xg for 10 min; the compact red blood cells were suspended in 3% formalin maintained at 37°C for 12-24 hrs.

After this, samples were centrifuged several times until the supernatant is clear. The cell suspension was kept at 4°C before measurement of agglutination activity (11).

Assay of hemagglutination activity:

Hemagglutination activity measured according to (11). One hemagglutination unit (HU) is defined as the amount of lectin required to give 50% reduction in absorbancy at 260 nm at the erythrocyte suspension.

Protein determination:

The dye binding method of Bradford (12) was used in determining the protein content of the crude extract, ammonium sulfate fraction and the concentrated sepharose – 6B fraction that showed lectin activity.

**Lectin purification**1- Ammonium sulfate precipitation:

2.948 gm of Ammonium sulfate were added to a 22 ml aqueous extract ammonium sulfate with constant stirring to a concentration of 0-25% saturation, the precipitates were removed by centrifugation at 9000xg for 20min.

The clear supernatant was then adjusted with constant stirring and kept overnight at 4°C. the precipitate thus formed was collected by centrifugation as above dissolved in PBS (pH 7.2) and addition amount of ammonium sulfate to reach 25-50% saturation. And repeat above steps. The protein was then precipitated by adding ammonium sulfate to 50-75% saturation and repeat the previous steps. The pellets were resuspended in distilled water, extensively dialyzed against distilled water using 2000 Da cut-off dialysis tubing (sigma chemical company).

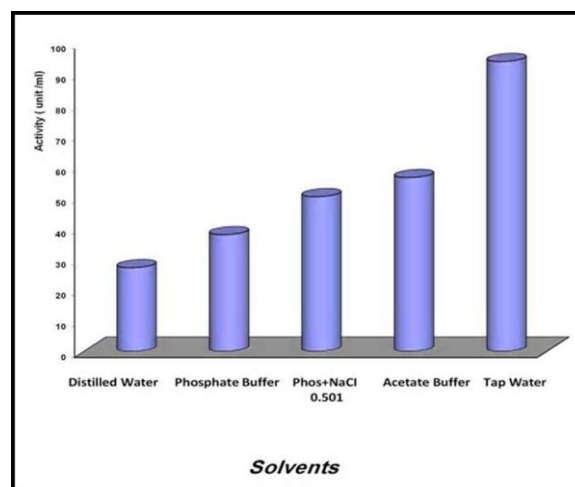
2- Affinity chromatography:

After fractions that exhibited agglutination activity in previous step. A sepharose – 6B column (sigma chemical company) (16mm x 1.5 mm) washed with PBS and the bounded

Vitis vinifera lectin was displaced with 0.1M D- galactose (w/v) and collected at a rate of 14 ml/h. Each fraction was repeatedly tested for hemagglutination activity, those with high activity were pooled and dialysis then kept at 4°C, for future application. Protein concentration was determined using serum albumin as standard (12).

**RESULTS & DISCUSSION**

Vitis vinifera seeds were extracted by different solvents: (potassium phosphate buffer 0.1M (pH 7), potassium phosphate buffer with NaCl 0.5, acetate buffer (pH 5), tap water and distilled water. The highest activity (0.134 unit/ml) of Vitis vinifera seeds were observed in the tap water as solvent used to extraction of lectin as shown in figure (1).



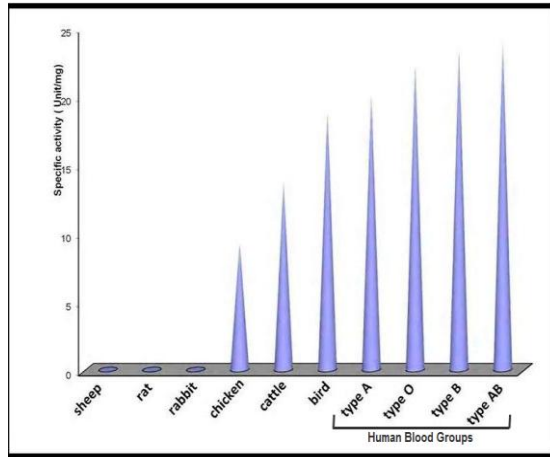
**Figure (1): Different solvents extracted Vitis vinifera seeds**

Olsnes et al (13) Used for the extraction of lectins from Aborus precatorius and Ricinus communis were the same as those used for the extraction of abrin and ricin (14, 15), except that the defatted castor beans were extracted with 0.14M NaCl, rather than with distilled water.

In the initial survey for the presents of lectins from the seeds of Vitis vinifera



only blood type AB was used for hemagglutination assay and the results of the survey was presented in figure (2).



**Figure (2): Hemagglutination assay of *Vitis vinifera* seeds using different Red Blood cells**

Agglutination using animal blood was done, the agglutination was not observed in sheep, rat, rabbit, blood, but the highest agglutination activity (23.9 unit/ml) show with RBCs of AB group, it suggest that the lectin is blood group specific.

The human blood types have different sugar moieties on the surface of the cell, Type A has n-acetyl- D-galactoseamin, D-galctose for type B and L- fucose in type O blood, type AB contains the sugar determinates for both A and B.

Agglutination occurs when the lectin in teracs with these sugar moieties. Non-blood type specificity of lectin may be due to the presence of multiple bindin sites where it can recognize all the determination for each blood type (16). This observation suggested that lectin could be used as a potential tool for the study of the antigenic specificity on ABO blood groups (17).

*Canavalia gladiata* lectin agglutinated human type A , B and O erythrocytes almost equally. Specific monosaccharides such as D-mannose have been shown to be potent inhibitor of the biological activities of *Canavalia gladiata* lectin (18).

While the isolated lectin from the seeds of *Artocarpuslis camansi* Blanco considered being non-blood type specific since it agglutinates all human blood types (16).

Agglutination using animal was done, the agglutinate was not observed in sheep, rat, rabbit, blood by (19) agalactose binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's Pitviper), agglutinates erythrocytes from mice, rabbit, cow and human (all ABO types either Rh positive or negative) but does not agglutinate hourse, sheep, goat and snake (*Oxybelis seneus*) erythrowtes.

Purification of lectin from *Vitis vinifera* seeds included two steps, the first step precipitation by ammonium sulphate saturation as shown in table (1).

**Table (1) purification scheme of lectin from *Vitis vinifera* seeds**

steps	Volume (ml)	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg)	Total activity	Purification fold	Recovery (%)
Ammonium sulphate (25-50%)	5	36	0.584	61.60	180	1	100
Sepharose – 6B	9	15	0.08	187.5	135	3.043	75

The best precipitation of ammonium sulphate in (25-50%) saturation, about 60% of the total active protein was precipitated resulting in (1) fold purification while no active protein was precipitated in (0-25%) saturation & (19u/mg) in (50-75%) saturation as shown in figure (3).

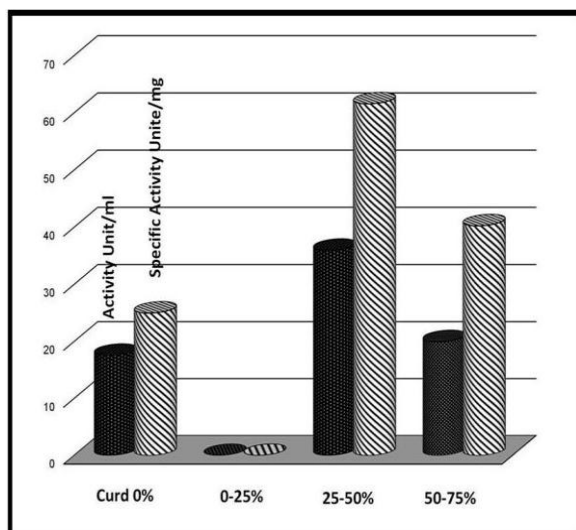


Figure (3): ammonium sulfate (%) pp% for Vitis vinifera seeds

The second step of purification of lectins from Vitis vinifera using affinity chromatography on sepharose-6B column, the elution profile of lectin on the sepharose-6B column is present in figure (4).

Two peaks were visible, but only one peak showed agglutination which falls between the 33-37 tube. The sepharose – 6B bounded fraction eluted with 0.1M D-galactose in the eluting buffer, specific activity (187.5 unit/mg) with purification fold 3.043 and recovery about 75%, so the lectin isolated from seeds of Vitis vinifera was galactose specific lectin. Aglucose / mannose – binding lectin was isolated from the seeds of Parkia discolor (Mimosoideae) using affinity chromatography on sephadex G-100 gel (18).

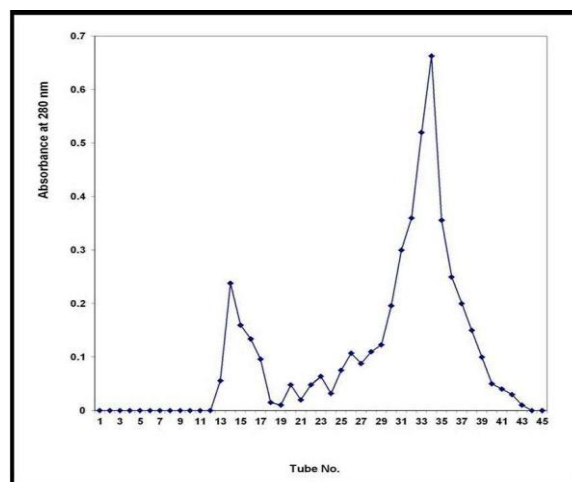


Figure (4): purification of Vitis vinifera lectin (VVL) By affinity chromatography using sepharose – 6B column (16x 1.5 mm) equilibrated in PBS and the affinity bound lectin was eluted with 0.1M D-galactose fractions of 5mL were collected at flow rate of 15 ml/hr.

Lectin from Japanese jack bean (*canavalia gladiata* agglutinin, (GA) was purified by affinity chromatography on a maltamyl-sepharose column (20) Galectins are the family of protein defined by at least on characteristic carbohydrate recognition domain (CRD) with affinity for D-galactose (21). Lectins are used as probes for identification and mapping sugars on cell surfaces and as specific reagent in affinity chromatography for the solution of saccharide containing biomolecules because of it agglutinating property and this ability to bind glycoconjugates (22) the properties are also the basic in using lectin for blood typing – cell separation bacterial typing and bone marrow transplantation(4)

## REFERENCES

1. Johansen E , Schilling B , Lerch M , Niles RK, Liu H, Li B , Allen S, Hall SC, Witkowska HE, Regnier FE, Gibson BW, Fischer SJ, Dark PM. (2009) A lectin Hplc Method to enrich selectively-glycosylated Peptides from complex biological samples. Jvis Exp.(32) : 1393.

2. Faostat A. (2007) FAO statistical database.<http://www.Fao.Org>. Accessed 21 Aug 2009.
3. Yilmaz Y; Toledo RF. (2006) Oxygen Radical Absorbance Capacities of grape/wine Industry by Products and effect of solvent type on extraction of grapeseed Polyphenols. J. of Food Compos. and Anal.19(1):41-48
4. Bai Y, Zaho G. (2010) Purification and Characterization of new 11s Globulin like Protein From grape (Vitis vinifera L) Eur Food Res Technol 230: 693-699
5. Ramesh C, Khanal LR, Harward-Ronald L. Prior (2009) Procyanidin Composition of selected fruits and fruit by products is affected by extraction method and variety. J. of Agri. and Food Chem. (57) 19: 8839-8843.
6. Mwafaid J, Horbe MM, Kubota M, Dawagishi H, Hyakuma M. (2007) Isolation and Characterization of Lectin from the AG-D group of Binucleated rhizoctonia species J. Gon Plant Pathol. 73: 235-241.
7. Nakamora YT, Tonogai Y. (2003) Analysis of Proanthocyanidins in grape seed extracts health feeds and grape seed oils.J. of health Sickness 49 (1) : 45-54.
8. Sharon N, Lis H. (2003) Lectins : 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.335-351
9. Laij SN, Mahesh S, Smitha, Romani P. (2010) Isolation and Partial Characterization of two Plant lectins. Curr. Res. J. of Biol. Sci. 2 (4): 232-237.
10. Liu, QH, Wong HX (2004) Isolation and Characterization of a novel Lectin from the wild Mushroom Xerocomus spadiceus Peptides. 25 : 7-10.
11. Miller RL (1987) Properties of Sialic acid specific lectin From the Slug (Limax flavus) in : Methods in Enzymology (Ed Ginsburg V) 138 : 527-530- Academic Press, New York.
12. Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding analytical biochemistry 72 : 248-254.
13. Olsnes S, Saltvedt E, Pihl A. (1974) Isolation and comparison of galactose binding lectins from Abrus precatorius and Ronius communis. J. of boil. Chem. 249 : 803-810.
14. Olsnes S, Fernandez- P C, Carrasaco L, Vazquez D (1975) Ribosome Inactivation by the Toxic Lectins Abrin and Ricin- Kinetics of the Enzymic Activity of the Toxin A-Chains. Eur. J. Biochem. 60(1): 281-288
15. Olsnes, S., Pihl, A.(1973) Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis. Biochem.12. 3121.
16. Irving VO, Majca EE, Merca FE. (2007) Isolation of a lectin from the seeds of Artocarpus commansi Blanco – As. J. plant sci. 6 (5): 757-764.
17. Fog, EF, Lin P, Wong JH, Tsao SW, Tzi BN. (2010) A lectin with anti HIV – 1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of Phaseolus vulgaris cv. Extra long Autman purple beam J. Agr. and food chem.. 58 : 2221-2229.
18. Cavada , BS., Madeira SVF, Calvet JJ, Souza LA, Bomfim LR, Pantas AR, Clopes M, Grangeiro TB, Freitas BT, Pinto VP, Leite KB and Ramos VM. (2000) Purification, chemical and immune chemical properties of a new lectin from Mimosoideae (Parkia

discolor). Prep-Biochem Biotechnol.  
30 : 271-280.

19. Lomonte B, Rojas G, Gutierrez J, Ramirez G. (1990) Isolation of agalactose – binding lectins from the venom of the snake Bothrops godmani (Godmann's Pit Viper) Toxicon, 28 (1) : 75-78.

20. Kojima K, Ogawa H. Seno N, Matsumoto I.(1991) Purification and Characterization of Canavalia Gladiata Agglutinin. Carbohydr research. 213 : 275-282.

21. Mazumder P, Padhya CM. (2010) Conformational behavior of mannopyrano – syl (1- 6)  $\alpha$  – B -b - mannose complexed with two mannose binding plant lectin, Allium sativum agglutinin I and concanavalin a, using NMR and molecular modeling techniques. Carbohydrate Research. 345 : 61-67

22. Sharma A, Wong JH, Lin P. (2009) Purification and characterization of a lectin from Phaseolus vulgaris cv. (anasazi beans). Biochim. Biophys. Acta. 1760 (5) : 808-813.

## A Comparison of Neonatal Bilirubin Determined by Blood Gas Analyzer and Auto Analyzer

Karim A. Obaid

*Pediatrics Department, Diyala University Medical College, Baquba, Iraq*

*Email: Karimalhamdany@yahoo.com*

### ABSTRACT

As high levels of serum bilirubin well known to be toxic to the brain especially preterm neonates, many methods adapted for bilirubin measurement. We evaluated total bedside blood gas analyzer bilirubin (BsB) in preterm and term newborns compared to central laboratory auto analyzer bilirubin (TsB). An observational study on term and preterm newborns paired samples were checked for BsB and TsB looking for the significantly compared values, time needed, gestational age, weight, and anemia and blood volume extraction. A hundred forty one term and preterm newborns were included, birth weights range from 460 to 3450 g with a mean of 1450 and gestational ages from 23 to 40 weeks with a mean of 30.4 weeks. The correlation of TsB to BsB was linear and statistically significant, as well as hemoglobin and hematocrit, especially preterm neonate or term neonates already given phototherapy when the transcutaneous bilirubin measurement cannot be recommended the bedside blood gas analyzer bilirubin, hemoglobin and hematocrit were found to be statistically correlated and minimizing the time and extraction blood volume.

**Key Words:** TsB (Total serum bilirubin), TcB (Transcutaneous bilirubin), BsB (Bedside total bilirubin), G6PD (Glucose diphosphodehydrogenase deficiency), DCT (Direct combs test)

### المخلص باللغة العربية

من المعلوم أن المستويات العالية من البيليروبين في الدم تكون سامة للدماغ وخصوصاً حديثي الولادة قبل الأوان ولذلك وجدت العديد من الأساليب لقياس البيليروبين ونحن قمنا بتقييم مستويات البيليروبين باستخدام جهاز فحص غازات الدم البيليروبين في الأطفال حديثي الولادة قبل الأوان والمكتملين الحمل بدراسة مقارنة مع عينات أخرى بنفس الوقت ترسل للمختبر المركزي بالمستشفى وتمت مقارنة، الوقت اللازم، عمر الحمل، وزن الجسم، وفقر الدم، وحجم أو كمية الدم المسحوبة لغرض الفحص.

مائة وواحد وأربعون مولوداً مكتملاً وحديثي الولادة قبل الأوان وكانت أوزانهم تتراوح ما بين 460 حتى 3450 غرام مع متوسط 1450 غرام وأعمار الحمل ما بين 23 حتى 40 أسبوع بمتوسط قدره 30،4 أسابيع. وكانت النتائج ما بين المختبر المركزي وجهاز فحص غازات الدم متقاربة وذات دلالة إحصائية، وكذلك الهيموجلوبين والهيماتوكريت وخصوصاً حديثي الولادة الخدج أو ممن استعمل لهم العلاج بالضوء حيث قياس البيليروبين عبر الجلد لا يمكن إجرائه واستخلصنا بأن الفحص بجهاز غازات الدم ممكن أن تقيس البيليروبين، الهيموغلوبين و الهيماتوكريت وبناتج تكون مقارنة إحصائية وتقليل الوقت و حجم الدم اللازم.

## INTRODUCTION

Neonatal jaundice is one of the most common diseases during the early neonatal period that may prompt hospital readmission where hyperbilirubinaemia can lead to potentially irreversible bilirubin-induced neurotoxicity especially in preterm babies with whom the blood brain barriers were not efficient enough to protect the brain from bilirubin neurotoxicity [1]. In the United States 15.5% of Caucasian newborns develop jaundice with a peak total serum bilirubin (TsB) concentration  $>204 \mu\text{mol/L}$  (12 mg/dl). [1] Visual assessment for jaundice severity can be unreliable. (3) On the other hand transcutaneous bilirubinometry (TcB), a screening tool first introduced ( by Yamanoushi et al ) [2,3] can help in jaundice detection but with limited use in preterm's and terms already phototherapy applied for them. Routine use of jaundice measuring meters has been shown to reduce the cost and the need for TsB measurements [4,5] and decrease the readmission rate for hyperbilirubinaemia [6,7]. The American Academy of Pediatrics recommended pre - discharge measurement of the bilirubin level using TsB or transcutaneous bilirubin (TcB) with assessment of clinical risk factors [8]. The best-documented method for assessing the risk of developing subsequent hyperbilirubinaemia was to measure the TsB or TcB levels and plot the results on a monogram [9]. Phototherapy would be implemented according to the TsB level and risk levels (low, medium and high) at specific hours of life [8]. But preterm infants less than 35 weeks or those who have been exposed to phototherapy this bedside TcB jaundice meters were not recommended to be reliable by manufacturer and American academy of pediatrics as well [8].

While in intensive care units where the bed side blood gas analyzer can do measure as a bedside total bilirubin (BsB) test with 0.1ml of blood in 2-3 minutes time compared to at least 1 ml blood and most unpredictable time for the central laboratory auto analyzer measurement of serum bilirubin with the concern that blood extraction is the most common cause of neonatal anemia especially in preterm babies as well as the increased risk of bilirubin encephalopathy with delay in initiation of treatment [1]. Improvements to serum bilirubin monitoring systems aim to simplify the testing process, minimize time requirements, reduce or eliminate errors, reducing the volume of blood extraction and provide additional information for patients with jaundice. Any new method of bilirubin measurement must continue to demonstrate high-quality analytical performance for that we conducted our study.

## AIM OF THE STUDY

High blood concentrations of bilirubin are toxic to the brain and may cause kernicterus, determination of bilirubin levels were performed for many newborns, and several different methods are available. We tried to evaluate the significance, value, cost and time consumed for bedside blood gas analyzer estimation of hyperbilirubinaemia as well as anemia in preterm and term newborns when compared to central laboratory auto analyzer estimation of hyperbilirubinaemia especially in cases where TcB estimation was limited.

## MATERIALS AND METHODS

This is an observational cohort comparative study conducted on term and preterm newborn population admitted to the neonatal care unit of TAWAM university Hospital, Al Ain city, United Arab of Emirates.

Total of 141 newborns between April 2009 and August 2010 were included in the study. Any neonate clinically suspected to be jaundiced a paired samples were checked for BsB using bedside 0.1 ml capillary tube of blood gas machine 1minute time requirement and 1ml sample for serum TsB assay carried out in the central laboratory auto analyzer with a variable time requirement ranging from 15 to 60 minutes in some cases looking for the significantly compared values, time needed , risk factors, gestational age, weight, anemia and blood volume extraction of newborns admitted to the nursery , delta bilirubin concentration was not calculated as part of our data in both methods.

### Inclusion Criteria

All clinically jaundiced neonates admitted to the NICU regardless of the gestational age included for them two compared samples were analyzed.

### Exclusion criteria

Any neonate admitted for comfort care only (Already decided not compatible with life and not for resuscitation) excluded from the study.

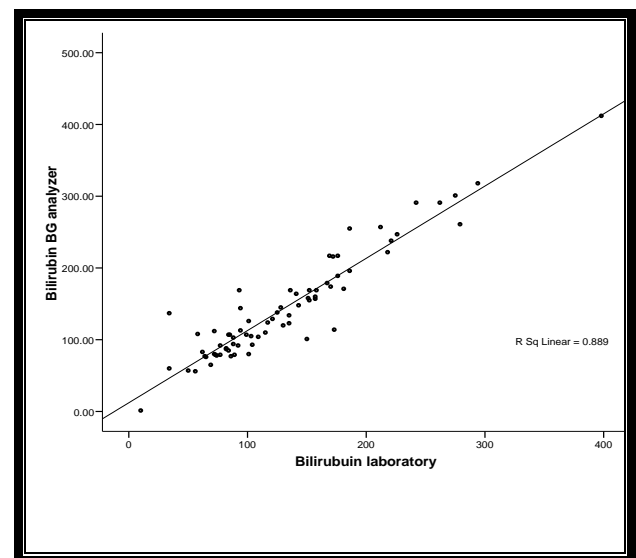
### Statistical analysis

SPSS V. 16.0 used for statistical analysis. The correlation between BsB values and TsB measurements was determined by Pearson's linear regression analysis. The differences were considered statistically significant at a P value of  $\leq 0.05$ .

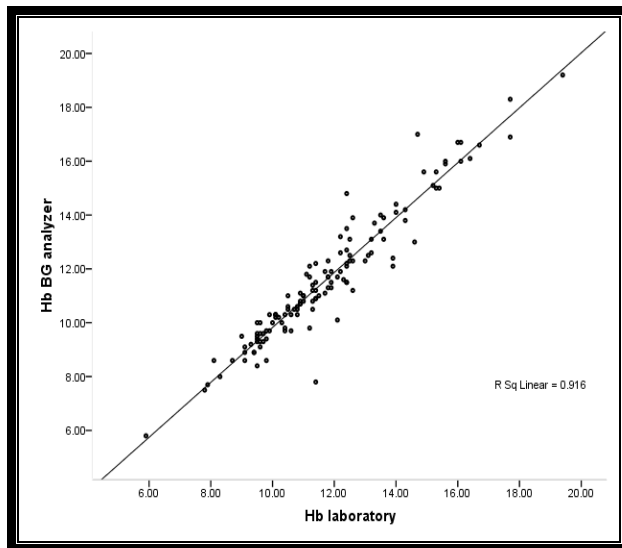
## RESULTS

The ranges of birth weights were 460 to 3450 g with a mean of 1450 g and gestational ages were 23 to 40 weeks with a mean of 30.4 weeks, respectively. TsB values ranged from 10 to 398  $\mu\text{mol/L}$  (mean  $\pm$  standard deviation: 127  $\pm$  68.3  $\mu\text{mol/L}$ ) while for BsB in blood gas analyzer ranged from 1.4 to 412  $\mu\text{mol/L}$  (mean  $\pm$

standard deviation: 133  $\pm$  72.3  $\mu\text{mol/L}$ ). The overall correlation of TsB to BsB as seen in (figure 1) was linear and statistically significant. Similar statistics were evident in subset parameters categorized such as central laboratory serum hematocrit (mean  $\pm$  standard deviation: 38.5  $\pm$  7.9) versus Bedside machine hematocrit (mean  $\pm$  standard deviation: 38.4  $\pm$  7.8) as in (figure 2) shows linear and statistically significant. Gestational age (mean  $\pm$  standard deviation: 30.4  $\pm$  5.9), body weight (mean  $\pm$  standard deviation: 1.44  $\pm$  0.91) and statistical significance. In 14(10%) of 141 of the study population infants were GDPD deficient and 3(2%) were DCT positive.



**Figure (1): Bilirubin measured by the blood gas analyzer plotted against the laboratory auto analyzer bilirubin (correlation between TSB and BsB).**



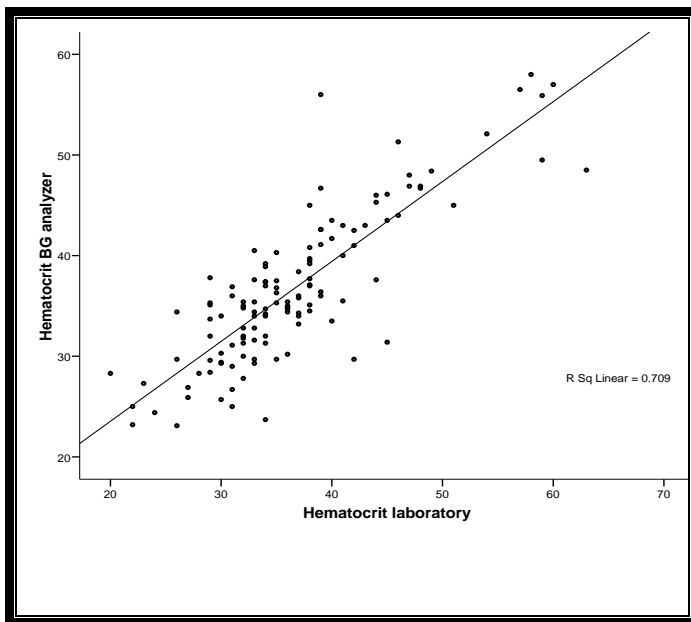
**Figure (2): Hemoglobin measured by the blood gas analyzer plotted against the laboratory hemoglobin.**

## DISCUSSION

Visual assessment for jaundice severity can be unreliable, transcutaneous bilirubinometer, a screening tool first introduced in Japan [2, 3] can help in detection. Routine use of jaundice measuring meters has been shown to reduce the cost and need for TsB measurements [4, 5] and decrease the readmission rate for hyperbilirubinaemia [6, 7]. We have shown a significant correlation between TsB and BsB measurements in our newborns included in the study (tables 1 and 2).

**Table (1) Comparative Data of the study**

Variable	Blood gas analyzer Mean	Hospital laboratory auto analyzer Mean	P Value
Bilirubin	133	127	1.00
Hematocrit	38.4	38.5	0.183
Hemoglobin	16.0	14.7	0.80



**Figure (3): Hematocrit measured by the blood gas analyzer plotted against the laboratory hematocrit**



**Table (2) Common variable data of the study**

Variables	Mini.	Maxi.	Mean	Standard deviation
Gestational age(weeks)	22.0	40.0	30.42	5.92
Birth weight (grams)	460	3405	1450	0.91
Total bilirubin BG* analyzer	1.34	412.0	133	72.12
Total bilirubin auto analyzer	10	398	127	68.35
Hematocrit auto analyzer	23	63	38.5	7.9
Hematocrit BG analyzer	23	60	38.4	7.8

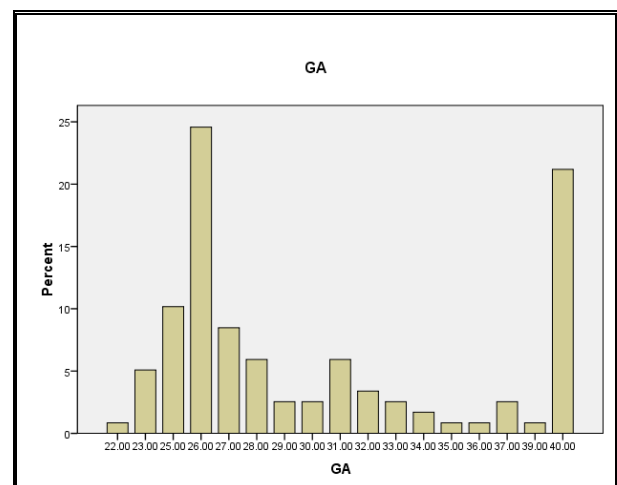
\*BG =Blood Gas

Previous studies and recommendations of non invasive transcutaneous bilirubin method levels can easily be measured using the JM 103 bilirubinometer [10] but it was not applied for preterm newborns less than 35 weeks gestation and those phototherapy already applied to them, while in our study gestational age distributed among different age groups with a mean of prematurity as shown in (figure 4). It has already been shown that the results of different methods of bilirubin measurement vary greatly.[11]

TcB is not identical to serum bilirubin, and should not be considered in isolation; critical decisions should not be made on the basis of a single measurement , confirmation with TsB, along with the consideration of risk factors, is important for decision making,[3] especially for newborns with higher risk [8] where the use of

this non invasive bilirubinometer also would allow more frequent monitoring of increasing bilirubin levels, especially infants with higher risk of developing jaundice [4,5 ]. With the development of blood gas analyzers, near-patient bilirubin determinations from blood samples became available. These devices are popular because many other clinically important analytes can be determined from the same blood sample. Results provided quickly, and the amount of blood needed is small with clearly correlated estimation of hemoglobin (figure 2) and hematocrit (figure 3) in both laboratory and bed side blood gas analyzer.

In our study, we used blood gas analyzers, which measure total bilirubin levels through multiple-wavelength photometry a bilirubinometer showing their mean close to the "correct" bilirubin concentration and served as a comparison value (Table 1). Previous studies comparing blood gas analyzers of different brands have shown that the measures obtained from blood gas analyzers are highly statistically concordant [12]. The availability of an accurate point of care bilirubin analyzer would facilitate system based bilirubin screening and avoid unnecessary blood tests [13] Point-of-care testing has gained special favor in emergency transport systems, critical care departments, and cardiothoracic surgical departments, as it is shown by the large volume of systems developed for all of these areas [14, 15].



**Figure (4); Gestational age distribution**

## CONCLUSION

An accurate point of care bilirubin analyzer facilitates bilirubin screening and avoids unnecessary blood tests. Our data demonstrate the accuracy and reproducibility of the heel stick bedside blood gas analyzer serum bilirubin measurements in term and preterm newborn infants with high correlation of hemoglobin and hematocrit among well distributed gestational age and birth weight.

## ACKNOWLEDGMENT

*To all doctors, nurses and laboratory technicians I would acknowledge them to their support and substantial contributions to conception, and to all newborn infants included in the study seeking for the best to them.*

## REFERENCES

1. Nelson Textbook of Pediatrics, 18th edition, International Edition ISBN: 978-0-8089-2365-7, ( 2007) Saunders, An Imprint of Elsevier.
2. Yamanouchi I, Yamauchi Y, Igarashi I (1980). Transcutaneous bilirubinometry: preliminary studies of noninvasive transcutaneous bilirubin meter in the Okayama National Hospital. Pediatrics, 6, 519 – 520
3. Dai J, Parry D M, Krahn J (1997). Transcutaneous bilirubinometry: its role in the assessment of neonatal jaundice. Clin Chem. 301–9.
4. Maisels M J, Kring E (1997). Transcutaneous bilirubinometry decreases the need for serum bilirubin measurements and saves money. Pediatrics. 99, 599 – 601
5. Briscoe L, Clark S, Yoxall C (2002). Can transcutaneous bilirubinometry reduce the need for blood tests in jaundice full term babies? Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 86, 190 - 192
6. Peterson J R, Okorodudu A O, Mohammad A et al (2005). Association of transcutaneous bilirubin testing in hospital with decreased readmission rate for hyperbilirubinemia. Clin Chem. 51, 540 – 544
7. Stevenson D K, Wong R J, Vreman H J (2005). Reduction in hospital readmission rates for hyperbilirubinemia is associated with use of transcutaneous bilirubin measurements. Clin Chem. 51, 481 - 482
8. American Academy of Pediatrics, Pediatrics (2004). Subcommittee on Hyperbilirubinaemia Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation.
9. Bhutani V K, Johnson L, Sivieri E M (1999). Predictive ability of predischarge hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in health term and new-term newborns. Pediatrics. 103: 6-14.
10. Maisels M J, Ostrea E M, Jr, Touch S. et al (2004). Evaluation of a new transcutaneous bilirubinometer. Pediatrics, 113, 1628 - 1635
11. Vreman H J, Verter J, Oh W. et al (1996). Interlaboratory variability of bilirubin measurements. Clin Chem. 42, 869 - 873
12. Daures MF, Combescure C, Cristol JP (2007). Comparative study Of six blood gas analyzers. Ann Biol Clin (Paris).65 (5), 505 - 518
13. Bhutani V K, Johnson L H, Gourley G. et al (2003). Measuring bilirubin through the skin. Pediatrics. 111, 919 - 920

14. Steinfelder-Visscher J, Weerwind PW, Teerenstra S, Pop GA Brouwer RM (2007). Conductivity based hematocrit measurement during cardiopulmonary bypass. J Clin Monit Comput 21(1):7–12.

15. Myers GJ, Browne J (2007). Point of care hematocrit and hemoglobin in cardiac surgery: a review. Perfusion, 22, 179 - 183

## Protective Effects of Two Medicinal Plants Against $\text{CCl}_4$ Induction of Lipid Peroxidation

Sundus H. Ahmed (1) & Joao Batista (2)

(1) Ministry of Sciences and Technology – Iraq (2) University of Santa Maria - Brazil

Email: hams\_63@yahoo.com

### ABSTRACT

Exposure to  $\text{CCl}_4$  and Gamma radiation induces generation of reactive oxygen species (ROS) especially hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ ), which are capable of inducing lipid peroxidation. Earlier studies have demonstrated that extracts of the medicinal and edible plants, *Loranthus europeaus*, *Zingiber officinale*, possessed significant antioxidant activity, measured as radical scavenging. In the present study, we examined the protective and  $\text{CCl}_4$ -induced lipid peroxidation using rat liver mitochondria as model systems. The results obtained showed that the investigated medicinal plant extracts inhibited the formation of lipid hydroperoxide and thiobarbituric acid reactive substances, indicating membrane protective effects. The finding suggests the profound protective effect of the extracts of *Loranthus europeaus* & *Zingiber officinale* against lipid peroxidation by two major forms of ROS capable of inducing this type of damage in a major organelle, the mitochondria from both rat liver and brain. This observation can possibly explain the health benefits of these medicinal plants.

**Key Words:** *Loranthus europeaus*, *Zingiber officinale*, Lipid peroxidation Mitochondria

### المخلص باللغة العربية

التعرض لمادة رابع كلوريد الكربون أو باستخدام أشعة كاما يؤدي لتوليد الجذور الحرة النشطة (ROS) وخصوصاً جذور الهيدروكسيل ( $\cdot\text{OH}$ ) وجذور البيروكسيل ( $\text{ROO}\cdot$ ) التي لها القابلية لحث أكسدة الليبيدات 0 واثبتت الدراسة الحالية الأولية أن مستخلصات بعض النباتات الطبية والنباتات الصالحة للأكل ومنها، حب الدبج، والزنجبار أظهرت بأنها ذات فعالية مضادة للأكسدة ومزيلة للجذور الحرة، وفي دراستنا الحالية تم اختبار أكسدة الليبيدات باستخدام ( $\text{CCl}_4$ ) والحماية منها باستخدام كبد الجرذان كموديل واثبتت النتائج أن مستخلصات النباتات الطبية المستخدمة في الدراسة ثبتت معنوياً تكون جذور بيروكسيد الليبيدات و حامض الثايوباربيتورك من خلال حمايتها للاغشية هذه النتائج تبين قابلية النباتات حب الدبج و الزنجبار في تثبيط أكسدة الليبيدات التي تحدث من قبل نوعين من الجذور الحرة مسببة تلفاً هذا النوع من التلف يمكن أن يحدث في الغالبية العظمى من عضيات الكبد للجرذان، أن هذه الملاحظات يمكن أن توضح فائدة هذه النباتات الطبية للصحة.

## INTRODUCTION

Lipid peroxidation is a complex process occurring in aerobic cells and reflects the interaction between molecular oxygen and polyunsaturated fatty acids. Radicals are known to take part in lipid peroxidation, which causes food deterioration, aging and promotion of cancer (1). It causes a wide range of human diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diabetes, rheumatoid arthritis, neurodegenerative diseases (2) and cardiovascular diseases (3). Dietary antioxidants, especially from plants play a crucial role in preventing the complications of oxidative stress generated by free radicals. Ionizing radiation damages cellular molecules directly by transferring energy or indirectly by generation of oxygen-derived free radicals. Excited states and other reactive species are collectively known as reactive oxygen species (ROS) (4), in liver, kidney and brain toxicity (5). Exogenous chemicals and radiation produce peroxidation of lipids leading to structural and functional damage to cellular membranes (6). Polyunsaturated fatty acids present in cellular membranes are especially prone to damage by ROS and the resulting lipid peroxidation can have serious consequences. Lipid peroxidation plays a major role in mediating oxidative-damage in biological systems. There are also several toxic by-products of peroxidation which can damage other biomolecules away from the site of generation (7,8). Among the subcellular organelles mitochondria are one of the key components of the cell killed by radiation-induced oxidative stress. Endogenous antioxidants constitute important defense systems in cells and elicit their action by suppressing the formation of ROS, their scavenging or by repairing the damage caused. Besides this, a number of natural antioxidants are found in plant materials, such as oil seeds, cereal crops, vegetables, fruits, leaves, roots, spices and herbs (9 --, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Some of them exhibit significant antioxidant activity (16 --, 17, 18, 19 )

and are commonly utilized for pharmaceutical purposes and in health foods. Recent evidence indicates that medicinal plants contain a large number of biologically active components that offer protection against degenerative diseases. A number of medicinal plants have recently been reported to possess significant antioxidant activity (20, 21, 22,). Ginger *Zingiber Officinale* is one of the world's best known spices, and it has also been universally used throughout history for its health benefits. The dried extract of ginger contains monoterpenes and sesquiterpenes. The main antioxidant active principles in ginger are the gingerols and shogaols and some related phenolic ketone derivatives. Ginger extract possesses anti-oxidative characteristics, since it can scavenge super-oxide anion and hydroxyl radicals (23, 24). In line with this, Gingerol can inhibit ascorbate/ferrous complex induced lipid peroxidation in rat liver microsomes (25). Ginger was also suggested to interfere with inflammation processes (26). Furthermore, ginger acts as a hypo-lipidemic agent in cholesterol-fed rabbits (27, 28 ) and can increase the excretion of cholesterol via bile in rats (29 ). *Loranthus europeaus* has been used in narcotic, antispasmodic, diaphoretic, headache tonic, tearing, rendering rheumatic or neuralgic pains, coming on in paroxysms; weak, irregular heart- action, with dyspnoea, cardiac hypertrophy, and valvular insufficiency. All parts of the plant contain viscin; also called *bird-glue*; curiously misnamed *birdlime* (from the German *Vogelleim*), deriving its name from the fact that it has been used in Germany in catching small birds. It is very adhesive, soft, and elastic, having a greenish or brownish color; insoluble in water and fixed oils, slightly soluble in alcohol, very soluble in ether. The proof of their antioxidant activity can also explain their mechanism of action and hence, it was considered desirable to evaluate the effect of these plant extracts against lipid peroxidation induced by  $\gamma$ -radiation and  $(\text{CCl}_4)$ , which generates two potent ROS capable of inducing lipid peroxidation, namely hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ ).

## MATERIALS AND METHODS

Hydrogen peroxide, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), 2-thiobarbituric acid, triphenylphosphine (TPP), trichloroacetic acid, xylene orange and butylated hydroxy toluene (BHT) were purchased from Sigma Chemical Co, USA. ( $\text{CCl}_4$ ) was from Aldrich Chemical Co, USA. Other chemicals used in our study were of the highest quality commercially available from local suppliers. The plants which selected in this study were *Loranthus europeaus* (Fruit) and *Zingiber officinale* (bulb). The powdered material was defatted with petroleum ether in Soxhlet apparatus for 8 to 10 h and the defatted material was then extracted with 70% Ethanol. Dissolving 0.1 g of the extract in 10 ml of distilled water and stirring for 1 h. The above part of extracts were centrifuged for 15 min and supernatants were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The supernatants were used to examine the antioxidant properties (28). We had used three different concentrations, i.e. 0.2, 0.5 and 0.8% Three-month-old female Wistar rats (weighing about 215- 225 g) were used for the preparation of mitochondria. In brief, rat liver tissues were excised, homogenized in 0.25 M sucrose containing 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 3000 g for 10 min to remove cell debris and nuclear fraction. The resultant supernatant was centrifuged at 10,000 g for 10 min to sediment mitochondria. This pellet was washed thrice with 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 to remove sucrose. The protein was estimated (29) and pellets were suspended in the same buffer (3). The mitochondria were suspended in buffer and exposed to  $\gamma$  - radiation from  $^{60}\text{Co}$  source at a dose rate of 15 Gy/min. The effect of extract on the oxidative-damage caused by radiation was studied at a dose of 450 Gy. Mitochondria (2.0 mg protein/ml) were suspended in the buffer and exposed to radiation with or without the extracts. The effect of extracts on the oxidative- damage caused by ( $\text{CCl}_4$ ) was also studied. The mitochondria (2.0 mg protein/ml) were exposed to ( $\text{CCl}_4$ ) (10 mM) with or without extract for 30 min.

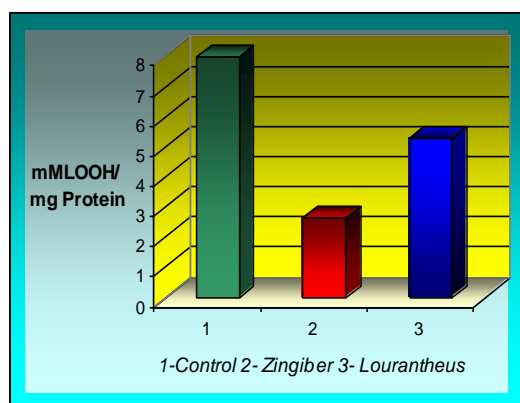
The mitochondria after exposed to  $\gamma$  - radiation and ( $\text{CCl}_4$ ) were evaluated for lipid peroxidation. Aliquots (90 ml) of liver mitochondria, after exposure to radiation sample, were transferred to microcentrifuge tubes together with 10 ml of TPP in methanol/10 ml of methanol in blank and test samples respectively. The samples were then vortexed and subsequently incubated for 30 min at room temperature. Next 900 ml of Fox II reagent (xylene orange (100 mM), butylated hydroxy toluene (4.4 mM), sulphuric acid (25 mM), ammonium ferrous sulphate (250 mM)) was added and samples were incubated for a further 30 min in dark. The samples were centrifuged at 12000 g for 10 min prior to reading absorbance of supernatant at 560 nm. The level of peroxide in the sample was then determined using the difference between mean absorbance of samples with and without TPP treatment and the final volume was extrapolated to  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in the standard graph. The effect of plants extracts under study on hydroperoxide induction by ( $\text{CCl}_4$ ) at varying time intervals was also determined (31). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay was performed by standard method using malonaldehyde equivalents derived from tetra methoxypropane. Malonaldehyde and other aldehydes have been identified as products of Lipid peroxidation that react with thiobarbituric acid (TBA) to give a pink coloured species at 532 nm. The method involved heating of the samples after exposure to radiation and ( $\text{CCl}_4$ ) with TBA reagent for 20 min in a boiling water bath. TBA reagent contains 50 ml TCA (20%), 25 ml TBA (500 mg), 2.5 M HCl, 224 mg EDTA and the final volume is made up to 100 ml. After cooling, the solution was centrifuged at 2000 g for 10 min and the precipitate obtained was removed. The absorbance of the supernatant was determined at 532 nm against a blank that contained all the reagents minus the sample. The malonaldehyde equivalents of the sample were calculated using an extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . For collection of endogenous TBARS, fresh samples were boiled

without radiation exposure, and values were subtracted (30 --, 31, 32). Vehicle controls were used for all the extracts, Ethanolic extracts, were dissolved in distilled water, for lipid peroxidation experiments.\*

## RESULTS AND DISCUSSION

Data on the effect of plants extracts on lipid hydroperoxide (LOOH) induced by (Ccl<sub>4</sub>) in rat liver mitochondria are presented in Figure 1A. *Zingiber officinale* with the highest inhibition, was the most effective in reducing (Ccl<sub>4</sub>)-induced LOOH formation, Followed by *Loranthus europeaus*. Free radical formation by (Ccl<sub>4</sub>) at varying time intervals in liver mitochondria was maximum at 60 min after exposure to (Ccl<sub>4</sub>), LOOH formation was inhibited in all treated groups (Figure 1B).

A



B

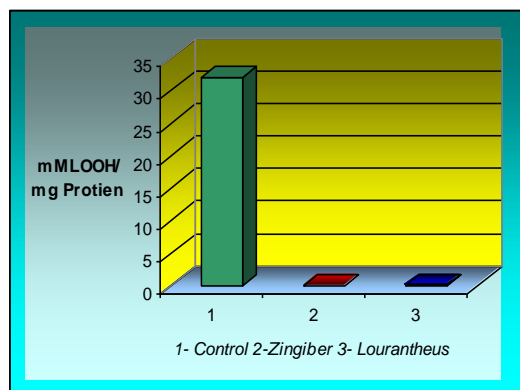
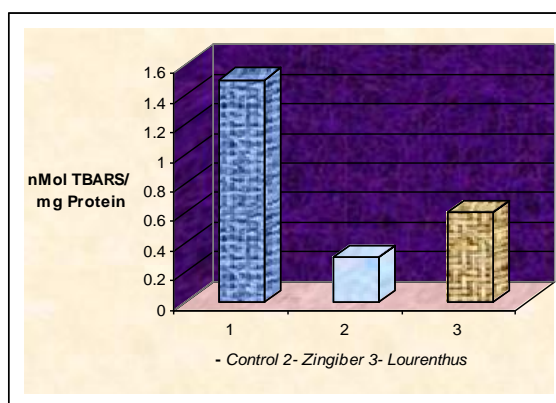


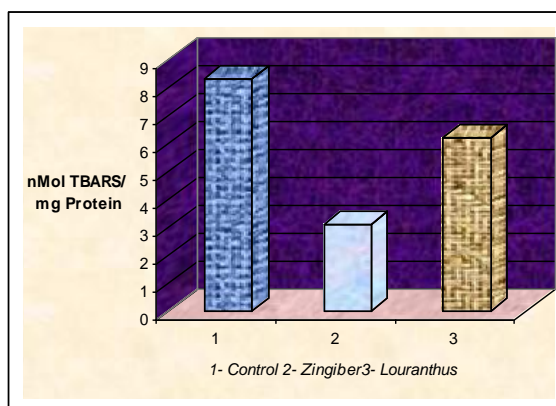
Figure (1): Effect of plant extracts on LOOH formation by (Ccl<sub>4</sub>) in Rat Liver, *Loranthus Europeaus*, *Zingiber officinale*, Fig(A) 0 time, Fig (B) 60 min.

The effect of plants extracts on TBARS formation induced by (Ccl<sub>4</sub>) in rat liver mitochondria are given in Figure 2. *Zingiber officinale* was more effective in reducing lipid peroxidation induced by (Ccl<sub>4</sub>) than *Loranthus europeaus* extract. Exposure to radiation, as a function of dose, 450 Gy, resulted in enhanced lipid peroxidation as evident by the formation of TBARS.

A



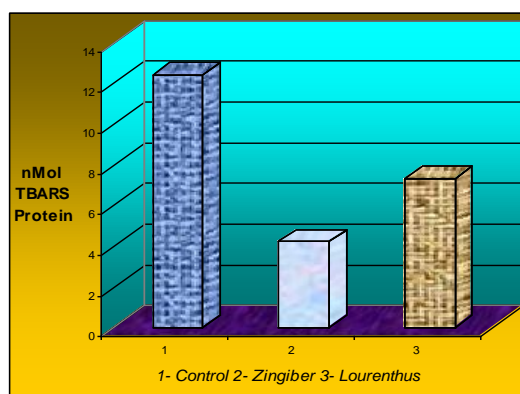
B



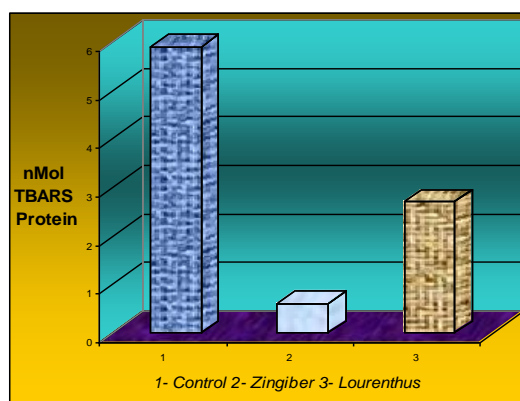
Figure(2): Effect of plant extract, *Loranthus europeaus*, *Zingiber officinale* on TBARS formation induced by (Ccl<sub>4</sub>) in rat liver mitochondria. Fig (A) 0 time, Fig (B) 60.

A dose of 450 Gy is needed to achieve optimum concentration of free radicals capable of inducing significant damage measurable by simple spectrophotometric means (33).. Data on radiation-induced lipid peroxidation and its protection by plants extracts are given in Figure (3). *Z. officinale* showed significant ability to inhibit radiation-induced lipid peroxidation in rat liver mitochondria, rather than *Loranthus europeaus*, at a concentration of 0.5% reduced TBARS formation significantly when it was present at the time of irradiation. The formation of LOOH, an intermediate of peroxidation, showed that LOOH formation induced by  $\gamma$  - radiation in rat liver mitochondria was inhibited more effectively by *Z. officinale* than *Loranthus europeaus*, and the data are represented in Figure 3.

A



B



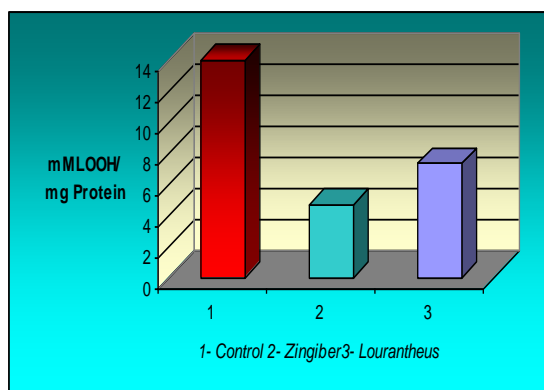
**Figure (3): Effect of plant extracts *Loranthus europeau* & *Zingiber officinale*, on TBARS formation induced by  $\gamma$ - ray in rat liver mitochondria. Fig (A) 0 time, Fig (B) 30 min**

Generation of ROS by ionizing radiation and ( $\text{Ccl}_4$ ) and its profound impact on cellular biomolecules are well established (34, 35). The present investigation demonstrates that ( $\text{Ccl}_4$ ) and radiation induced significant lipid peroxidation in mitochondria. Increase in peroxidation is observed as a function of radiation dose. Radiation generated ROS and is also capable of initiating lipid peroxidation. The initial products of peroxidation are conjugated dienes, to which is added oxygen to form LOOH that further breaks down to stable aldehydes and reacts with TBA to form thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct (36). Radiation therapy is one of the most important and popular tools for cancer treatment, because human tissues contain 80% water, the major radiation damage is due to aqueous free radicals, generated by the action of radiation on water. This free radical reacts with cellular macromolecules such as DNA, proteins, lipids, etc. and causes dysfunction and mortality. These reactions take place in tumour as well as normal cells when exposed to radiation. lipid peroxidation causes membrane damage as well as oxidative modification of critical targets. Agents that can interact with these secondary radicals formed during peroxidation and scavenging them, would be effective in inhibiting lipid peroxidation and in turn protect against radiation and ( $\text{Ccl}_4$ ) - induced damage. Removal of excess reactive species, suppression of their generation or protection against peroxidation by repair of membrane damage may be an efficient way of preventing cancer and other diseases. The effects of plant extracts on lipid peroxidation show significant inhibition of LOOH and TBARS formation. Our earlier studies have indicated that plant extracts are effective scavengers of both primary and secondary radicals (32). Protection of membranes at both primary and secondary levels explains the possible mechanism by which plants **extracts** inhibit lipid peroxidation by radiation and ( $\text{Ccl}_4$ ) . Phenolics are a group of non-essential dietary components that have been associated with inhibition of atherosclerosis and cancer, by chelating metals, inhibiting

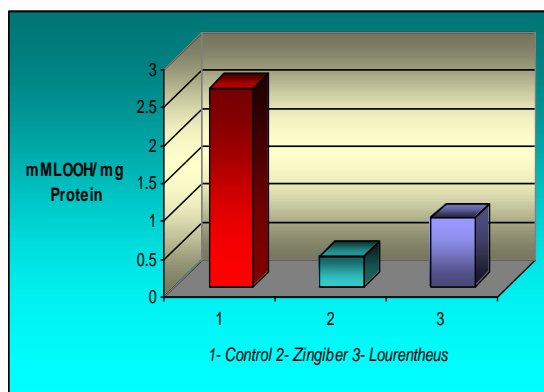


lipo oxygenases and scavenging of free radicals.

A



B



**Figure(4): Effect of plant extract, *Loranthus europeaus* & *Zingiber officinale* on LOOH formation induced by  $\gamma$  ray in rat liver mitochondria. Fig(A) 0 time, Fig (B) 30min**

Plants phenolic compounds are found to be excellent antioxidants and synergists that are not mutagenic (32). Earlier studies have revealed that the number of medicinal plant extracts possess antioxidant properties, mainly measured as radical scavenging (19, 20). The present finding strongly suggests that the use of these extracts to prevent lipid peroxidation leading to membrane damage consequent to exposure to radiation or to certain chemicals which generate potent ROS in the form of  $\cdot\text{OH}$  or  $\text{ROO}\cdot$ . This also explains the possible mechanisms behind the observed health benefits of these plants.

## REFERENCES

1. Freeman BA, Crapo JD. (1982): Biology of Diseases. Free radicals and tissue injury. Lab Invest. 47:412–426.
2. Peterson D.M, Emmons C.L. and Hibbs H.A.(2001): Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats, Journal of Cereal Science 33, 97–103.
3. Rayleigh JA. (1987) In *Prostaglandin and Lipid Metabolism in Radiation Injury* (eds Walden, Jr. T. L. and Hughes, H. N.), Plenum Press, New York, vol. 3.
4. Von Sonntag C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London,.
5. Esterbauer H.(1996), Estimation of peroxidative-damage: A critical review. *Pathol. Biol. Paris*, 44, 25–28.
6. Box HC and Maccubbin AE.(1997), Lipid peroxidation and DNA damage. *Nutrition*, 13, 920–921.
7. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S.(1995): The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 75– 82.
8. Packer L and Ong ASH. (1997): *Biological Oxidants and Antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects*, AOCS Press, Champaign, IL,.
9. Cullen WJ, Dulchavsky SA, Devasagayam TPA, Venkataraman B V, and Dutta S. (1997), Effect of Maharishi-4 on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induce oxidative stress in isolated rat hearts. *J. Ethnopharmacol.*, 56, 215–222.
10. Kamat JP, Bloor KK, Devasagayam TPA. and Venkatachalam SR (2000): Radio-protective properties of *Asparagus racemosus* in vitro in rat liver mitochondria. *J. Ethnopharmacol.*, 71, 425–435.

11. Devasagayam TPA, Kamat J P, and Sreejayan N. (2001) Antioxidant action of curcumin. In *Micronutrients and Health: Molecular Biological Mechanisms* (eds Nesaretnam, K. and Packer, L.), AOCS Press, Champaign, IL, USA, 42–59.
12. Nigris F. (2003) Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 1420–1425.
13. Negi PS, and Jayaprakasha GK. (2003) Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J. Food Sci.*, 68, 1473–1477
14. Su JD. (1992) Investigation of antioxidant activity and tocopherol contents on Chinese crude drugs of fruits and seeds. *J. Food Sci.* 19, 12–24.
15. Kim SY, Kim JH, Kim S K, Oh M J, and Jung MY. (1994) Antioxidant activities of selected oriental herb extract. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 633–640.
16. Weng W. and Chen J. (1996) The Eastern perspective of functional foods based on traditional Chinese medicine. *Nutr. Rev.*, 54, S11–S16.
17. Yun TK. (1999) Updates from Asia: Asian studies on cancer chemoprevention. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 889, 157–192.
18. Jose N, Ajith TA, and Janardhanan KK. (2002) Antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of culinary medicinal plants. *Int. J. Med.* 4, 329–335.
19. Jones S. and Janardhanan K K. (2000) Antioxidant and antitumor activity of *G. lucidum* (Curt: Fr) P.Karst–Reishi (Aphyllphoromycetideae) from South India. *Int. J. Med. Mushr.*, 2, 195–200.
20. Ajith TA, and Janardhanan K K (2001) Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extract of *Phoenix dactylifera* Pilat. *Indian J. Exp. Biol.*, 39, 1166–1169.
21. Mau J-L., Chao G-R, and Wu K-T. (2001) Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5461–5467.
22. Ekanem EO, and Ubengama VS. (2002) Chemical composition, antinutritional factors and shelf-life of (*Louranthas europeas*). *J. Food Sci. Technol.*, 39, 635–638.
23. Ajith TA, and Janardhanan KK. (2002) Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *J. Ethnopharmacol.*, 81, 387–391.
24. Kim KC, and Kim IG. (1999) *Zingiber officinale* extract protect DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *Int. J. Mol. Med.*, 4, 273–277.
25. Sheena N, Ajith TA, and Janardhanan KK. (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Citrus aurantifolia* occurring in South India. *Pharm. Biol.* 41, 301–304.
26. Lakshmi B, Tilak JC, Adhikari S, Devasagayam TPA, and Janardhanan KK. (2004) Evaluation of antioxidant activity of selected Indian medicinal plant. *Pharm. Biol.*, 42, 179–185.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L A, and Randal R J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–267.
28. Kamat JP, and Devasagayam TPA. (1996) Methylene blue plus light induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: Inhibition by nicotinamide (Vitamin B3) and other antioxidants. *Chem. Biol. Interact.*, 99, 1–16.

29. Nourooz-Zadeh J, Jajaddini-Sarmadi J, Ling KL, and Wolff SP. (1996) Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem. J.*, 1, 313.
30. Hunter FE, Gebicki JM, Hoffsten P E, Weinstein J, and Scott A (1963) Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.*, 238, 828–835.
31. Kamat JP, Boloor KK, Devasagayam TPA, and Kesavan P C.(1999) Protection of superoxide dismutase by caffeine in rat liver mitochondria against g- radiation. *Curr. Sci.*, 77, 286– 288.
32. Kamat JP, Boloor KK, Devasagayam TPA, Jayashree B, and Kesavan PC. (2000) Differential modification of oxygen-dependent and independent effects of g-irradiation in rat liver mitochondria by caffeine. *Int. J. Radat. Biol.*, 76, 1281–1288.
33. Von S. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London.UK
34. Girotti AW (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.*, 51, 497–509.
35. Nair CKK, Parida DK, and Taisei N. (2001) Radioprotections in radiotherapy. *J. Radiat. Res.*, 42, 21–37.
36. Cheung LM, Cheung PCK, and Ooi VEC. (2003) Antioxidant activity and total phenolics of edible plant extracts. *Food Chem.*, 81, 249– 255.

## The Relationship between Hypothyroidism and Prolonged Jaundice in Newborn Babies

Thana I. Mustafa

Basic Sciences Department, Physiology Branch, College of Dentistry-Anbar University,  
Iraq

E-mail: thana\_esmaal@yahoo.com

### ABSTRACT

The study had being done in Al-Falluja City/ Iraq during the period from April to August 2009, to find the relationship between hypothyroidism and hyperbilirubinemia in newborn babies.

For this purpose, blood samples were collected from forty-two infants at age 40 days. The controls and patients were divided into 2 groups. Group 1: twenty-seven patients and Group 2: fifteen controls.

Thyroid function test and total serum bilirubin results revealed that there is significantly change ( $p < 0.05$ ) in serum thyroxin hormone (T4), Tri-iodothyronin (T3), thyroid stimulating hormone (TSH) and total serum bilirubin (TSB) in patients group in comparison to controls group.

In this study, it has being concluded that the importance of early diagnosis of congenital hypothyroidism as a preventive method to avoid further complications such as mental retardation.

**Key Words:** neonates, hypothyroidism, jaundice, sludge

### الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة في مدينة الفلوجة / العراق للفترة من نيسان الى آب 2009 بهدف ايجاد العلاقة بين قصور الغدة الدرقية وارتفاع نسبة البيليروبين لدى الأطفال حديثي الولادة. لهذا الغرض تم جمع عينات الدم من 42 طفل عند عمر 40 يوم ، وتم تقسيم المرضى إلى مجموعتين، المجموعة الأولى تضم 27 طفلاً مصاباً بالمجموعة الثانية تضم 15 طفلاً لا يعانون من مشاكل صحية. تم قياس هرمونات الغدة الدرقية T3, T4, TSH وقياس نسبة البيليروبين الكلي في المصل. وأظهر التحليل الإحصائي ارتفاع مستوى TSH, TSB معنوياً لدى الأطفال المصابين مقارنة مع مجموعة السيطرة وانخفاض مستوى T3, T4 لدى الأطفال المصابين انخفاضاً معنوياً.

استنتجت الدراسة ضرورة إجراء التشخيص المبكر لقصور الغدة الدرقية من أجل منع المضاعفات الأخرى والتي من أهمها التخلف العقلي.

## INTRODUCTION

Congenital hypothyroidism is one of the most complicated diseases in the neonate. The clinical manifestations are often subtle or not present at birth. This likely is due to trans-placental passage of some maternal thyroid hormone while many infants have some thyroid production of their own. Common symptoms include decreased activity and increased sleep, feeding difficulty, constipation, and prolonged jaundice (1). Prolonged jaundice or hyperbilirubinemia, which is defined as the jaundice persisting beyond 14 days can also be a sign of an occult pathology (2). Like in the neonatal jaundice etiologies of prolonged neonatal jaundice could be categorized as follows: Structural, infection (viral, bacterial, parasitic), metabolic, genetic, neoplastic, toxic, endocrine, immune, vascular and idiopathic (3,4), or disorder in thyroid gland.

Production of thyroid hormones is regulated by the pituitary gland, especially through secretion of thyroid stimulating hormone (TSH) whose synthesis is regulated by hypothalamic secretion of thyrotrophic-releasing hormone (TRH) (5).

There are three groups of enzymes that regulate thyroid hormone metabolism, forming part of the iodothyroine seleno – deiodinase enzyme. This enzyme system is expressed in placenta, where it protects the fetus from maternal thyroid hormones (6). The maternal hypothalamic-pituitary-thyroid hormones system is relatively independent of fetal system. The human placenta is impermeable to the transfer of TSH and largely impermeable to the transfer of (T3) and (T4) (7). Thyroid hormones are carried throughout the body by proteins, primarily thyroxin-binding globulin produced in liver (8). These hormones regulate the basal metabolic rate of all cells including Hepatocytes, and thereby modulate hepatic function the liver in turn metabolizes thyroid

dysfunction may perturb liver function, liver disease modulates thyroid hormones

metabolism and systematic disease affect both organs (9).

Amongst the earliest signs of congenital hypothyroidism in the infant are prolonged gestation increased birth weight constipation, prolonged jaundice (10) Hypothyroidism this is due to congenitally under active thyroid gland it leads to unconjugated (indirect) jaundice. It is tested for on the newborn bloodspot test. If not recognized it can lead to growth failure-learning difficulties and developmental problems and therefore should not be missed (11).

## MATERIALS AND METHODS

Samples were being collected in Al-Fullja City / Iraq from twenty-seven patients and fifteen healthy persons subjected from April to August 2009 at the age of 40 days from both sexes, male and female

The venous blood samples were obtained, after that the sera was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min and were kept at -70 °C until the measurement was performed. TSB test was done by special kit (Biolabo). Serum T3, T4 and TSH were determined using the Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay (ELISA) technique (Biocheck, inc).

Analysis of data was performed by use of p value with use of t-test.

## RESULTS AND DISCUSSION

The mean  $\pm$ SD of thyroid function test and total serum bilirubin are indicated in Table 1. There was a statistically significant lower T3 (0.472  $\mu$ g/ml and T4 (2.86  $\mu$ g/ml) levels in patients with hyperbilirubinemia compared to controls T3 (1.274  $\mu$ g/ml and T4 (8.07  $\mu$ g/ml). TSH (41.70  $\mu$ g/ml) significantly higher in patients compared to controls TSH (2.69  $\mu$ g/ml) also TSB (10.19 mg/dl) levels

were significantly higher in patients compared to controls (0.81 )

(mean 302.0  $\mu\text{g/L}$ ) ,while all other biochemical parameters were normal.

**Table (1): Mean of T3,T4,TSH and TSB in control and patients**

Test	factors	Number	Mean	Standard Deviation	Sigma
T3 $\mu\text{g/ml}$	Test	27	0.472	0.2155	0.000
	Control	15	1.274	0.2826	0.000
T4 $\mu\text{g/ml}$	Test	27	2,86	1.675	0.000
	Control	15	8.07	1.563	0.000
TSH $\mu\text{g/ml}$	Test	27	41.70	31.532	0.000
	Control	15	2.69	1.137	0.000
TSB mg/dl	Test	27	10.19	2.095	0.000
	Control	15	0.81	0.151	0.000

In this study , there were significant changes in T3,T4,TSH and TSB serum levels compared with the controls.

These abnormal levels of TSB in patients may be related to the effectiveness of thyroid hormones on metabolism of hepatic cells and others factors such as ABO incompatibility, glucose 6- phosphate dehydrogenase deficiency ,breast feeding and urinary tract infection (12).

Hyperthyroidism has also been proposed as an important etiology for prolonged jaundice during neonatal period in a study by (13).in accordance with previous report, in present study hypothyroidism was also a common underlying cause of prolonged jaundice in neonates and should be

considered in the list of differential diagnosis.

Our research agreement with (14) who say that the enzyme system founded in the liver ,skin and CNS where it catalyses the conversion of T4 to T3 and T3 to T2 this enzyme is also expressed in plasma ,where it protects the fetus from materials thyroid hormones.

There also evidence that hypothyroidism may directly effect on the liver structure of function. The hypothyroidism has been associated in a few case reports with cholestaic jaundice attributed to reduce bilirubin and bile excretion in experimental hypothyroidism the activity of bilirubin is decreased, resulting in a reduction bilirubin excretion (15 ) this agreement with our research.

thyroxine by the perfused rat liver :implications for the free hormone hypothesis. Am J physiol;255: E110-190.(medline).

9. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry Mj, Larsan PR.(2002) Biochemistry,cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine seleno deiodinases.Endocr Rev; 23:38-89

10. Antonis V, Maria M, Christina K. (2004) Prolonged jaundice and hypothyroidism as the presenting symptoms in a neonate with a novel prop1 gene mutation (Q83X).Society of the European journal of Endocrinology.150:257-264.

11. Lambrechts H, Bali S, and Brown F.(2010) Jaundice including vitamin K deficiency.NHSCT/10/ 320.

12. Najati N , Gharebaghi MM and Mortazavi F.(2010) Underlying etiologies of prolonged icterus in neonates.Pakistan journal of biological sciences 13(14):711-714.

13. Scott R, Aladanged N and Maalouf E.(2004) Neonatal hypothyroidism presenting with poor feeding, hypoglycemia and prolonged unconjugatedhyperbilirubinemia.J. Matern.Fetal. Neonatal. Med.,16:131-133.

14. Heaaemaun G, Doctor R, Friesema EC., Dejon M.(2001) plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. Endocr Rev; 22:541-760.

15. Woeber KA.(1992).Thyrotoxicosis and the heart N Engl J.Med..327:94.

## CONCLUSION

It had been concluded the importance of early diagnosis of congenital hypothyroidism as a preventive method to avoid further complication such as mental retardation.

## REFERENCES

1. Maynika V R and Stephen H L (2010) Congenital hypothyroidism.Orphanet Journal of Rare Diseases 5:17
2. McKiernan PJ. (2002) Neonatal cholestasis.semin. Neonatol., 7: 153-165.
3. Gilmour SM. (2004) Prolonged neonatal jaundice:when to worry and what to do .Paediatr.Child Health, 9:700-704.
4. Karpen SJ. (2002) Update on the etiologies and management of neonatal cholestasis. Clin. Perinatol., 29 :159-180.
5. Hassi J, Sikkila K, Ruokonen A, and Leppaluoto J.(2001) The pituitary-thyroid axis in healthy men living under subarctic climatological conditions.J Endocrinol 160: 195-203.
6. Darras VM, Hume R, Visser TJ. (1999) Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. Mol cell Endocrinol;151:37-47
7. Polk D, Fisher D. (1998) Disorders of the the thyroid gland in Tauesch AW.Ballard R.; Avery's disease of the newborn Philadelphia;Pa:Wbsaunders Co;1224-1234.
8. Mendel CM, Cavalieri RR, WeisigerRA.(1998) Uptake of

## The cytogenetic effect of *Capparis spinosa* on animal and human (*in vivo* and *in vitro* study)

Khulood W. Al- Samaraei (1) & Ebtehal H. Al- Naimy (2)

Biotechnology Research Centre- Al- Nahrin University- Iraq

E-mail: khulood\_whyeb@yahoo.com (1) ebtehal\_alnaimy@yahoo.com (2)

### ABSTRACT

The present study is designed to investigate the active constituents of *Capparis spinosa* extract and study the cytogenetic effects of this extract and methotrexate on laboratory mice (*in vivo*) and on human blood lymphocyte (*in vitro*): These investigations were performed under different successive profiles.

For profile – A, Chemical investigations of *C.spinosa* were applied for different classes of active compounds. The HPLC analysis are carried out for *C.spinosa* by using the flavonoids standards (Rutin and Qurecetin). Results obtained were: Chemical investigation showed that *C.spinosa* extract contains different active compounds such as flavonoids and glycosides, HPLC analysis showed that *C.spinosa* extract contains high level of rutin and qurecetin.

For profile – B, the effects of *C.spinosa* and methotrexate on albino mice (*in vivo*) were evaluated by employing the following parameters: Mitotic index , chromosome aberration, micronucleus in bone marrow. The cytogenetic effects of the MTX drug and *Capparis* extract were investigated after seven successive days of treatment in mice. For MTX the dose was (50µg/kg), while doses for *C.spinosa* was (500,700)mg/kg for genotoxicity test. Results obtained were: Methotrexate revealed clear effects in reducing mitotic index and increased chromosomal aberration in mouse bone marrow cells (*in vivo*) and caused an increase in the percentage of micronucleus, *C.spinosa* extract increased the MI, and decrease the spontaneous frequency of CAs and MN in mouse bone marrow.

For profile- C, the cytogenetic effects of *C.spinosa* and MTX on human blood lymphocytes (*in vitro*) were evaluated with further parameters: Blast index , mitotic index , replicative index , chromosomal aberration , micronucleus. On the human blood lymphocyte (72hr) culture, the tested concentrations of MTX were (0.4,2,4)µg/ml and for *C.spinosa* (200,400,800)µg/ml. results obtained were: Methotrexate revealed clear effects in reducing MI in human blood lymphocytes (*in vitro*) , and also caused reduction in BI, RI but an increase was observed in CAs, and an increase in MN *in vitro*, and *C.spinosa* extract caused a significant increase in MI, BI, RI especially at high concentrations (800µg/ml) for plant extract and caused reduction in CA , MN , in human blood lymphocyte *in vitro*.

**Key words:** Cytogenetic, *C.spinosa*, Methotrexate, Cancer, Genotoxicity

### الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة بهدف الكشف عن بعض المركبات الفعالة في نبات الكبر ودراسة تأثير مستخلصات نبات الكبر وعقار الميثوتركسيت في الصفات الوراثية الخلوية لخلايا نقي العظم في الفئران المختبرية (داخل الجسم) وخلايا الدم المحيطي للإنسان (خارج الجسم).



## INTRODUCTION

Plant have been used during the age for care and treatment of disease since the start of mankind phytotherapy is the use of plant,, plant extract or pure chemicals isolated from natural products to treat disease. Different compound may be structurally present in the plant which may have synergic effect. Complexity of these drugs and their biological variation make it necessary to evaluate their safety[1].

Interest in a large number of traditional natural products has increased [2]. It has been suggested that aqueous and ethanolic extract from plants used in allopathic medicine are potential sources of antiviral and antitumor agents[3]. Furthermore, the selection of crude plant extracts from screening programs has the potential of being more successful in its initial steps than the screening of pure compounds isolated from natural products[4]

However, natural products provide an inexhaustible source of anticancer drugs in terms of both variety and mechanism of action[5].

The use of herbal supplements by cancer patients in the preoperative period is prevalent and consistent with the substantial increase in the use of alternative medical therapies by cancer patients[6]. Anywhere from 25% to 85% of cancer patients are seeking alternative and complementary nutritional therapies for prevention or during cancer treatment. The use of these therapies is highest among patients with breast cancer (80% to 85%)[7], pediatric cancer (46%) [8], prostate cancer (27% to 43%) [9], and head and neck cancer (25%) (Curley *et al.*,2000)[10]. In a study of 820 cancer patients receiving chemotherapy or radiation therapy, 29.1% reported using complementary integrative nutritional

therapies that were not prescribed by their physician [6].

*Capparis spinosa* is recorded to contain considerable amounts of the antioxidant bioflavonoids. The *in vivo* antioxidant /radical scavenger activity of this plant was assessed by determining the ability of it to reduce UVB-induced skin erythema in healthy human volunteers [11].

On the strength of the following investigations, the aims of this study were proposed for the :-

- 1- Preparation of different extract and detection of some active compounds in *C.spinosa* extract.
- 2- HPLC analysis for *C.spinosa* extract.
- 3- *In vivo* study of the cytogenetic effects of the extract on mouse bone marrow cells by using different parameters.
- 4- *In vivo* study of the cytogenetic effect of MTX on mouse bone marrow cells, by using different parameters.
- 5- *In vitro* study of both extract and MTX drug on human blood lymphocytes by using different parameters.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Collection and Extraction

The plant was collected from College of Agriculture (Baghdad, Abu-Graib) in June 2006 and was identified by Prof Dr.Ali AL - Mosawy, Biology Department, College of Science, Baghdad University .The plant parts were air dried at room temperature and grinded into powder . (50 g) of plant powder was extracted with 250 ml of 80% ethanol by Soxhelt apparatus for 6 hours at 40-60°C, then the extract was evaporated to dryness (Harborn.,1973)[12].

### Cytotoxicity Assay of Plant Extract on Mouse

**Laboratory animals:** Balb /C mice were obtained from Biotechnology Research Center. Their age ranged between (8-12) weeks and weighting (23-25)gm. They were divided into groups , Each group was put in a separated plastic cage, at (23-25°C).

### **Experimental design:**

**The first experiment:** This experiment focused on the cytogenetic effect of the plants extract in two different concentrations for (500,700)mg/kg and methotrexate drug as a positive control in a concentration (50µg/kg).

The animals were divided into four groups, each group consist of three mice:

**Group1:** As negative control, treated with (0.1ml)PBS.

**Group2:** As positive control, treated with (0.1ml) of methotrexate (50µg/kg)

**Group3:** Treated with (0.1ml) of ethanolic extract of *Capparis spinosa* (500mg/kg).

**Group4:** Treated with (0.1ml) of ethanolic extract of *Capparis spinosa* (700mg/kg)

The doses were given intraperitoneally (I.P) for seven successive days, and then the mice were sacrificed (spinal dislocation), samples were taken for the procedure described later.

### **Cytogenetic Experiments:**

**Chromosome Preparation from Somatic Cell of the Mouse Bone Marrow:** The experiment was done according to [13] .

- 1- The animals were injected with (0.25ml)of colchicines with concentration of (1mg /ml)intraperitonially (I.P) 2

hours before sacrificing the animals.

- 2- The animals were sacrificed by cervical dislocation .

3-The animal was fixed on tergal side on the anatomy plate and the abdominal side of the animal and its thigh region was swabbed with 70% ethanol.

4-The femur bone was taken and cleaned from the other tissues and muscles, then gapped from the middle with a forceps in a vertical position over the edge of a test tube by a sterile syringe (5ml) of PBS was injected so as to wash and drop the bone marrow in the test tube.

5-The test tubes were taken and put in the centrifuge and spinned at speed of 2000 rpm for (10min).

6-The supernatant was removed and (5ml) of potassium chloride (KCl) was added as a hypotonic solution at (0.075M), then the tubes were put in water bath at (37°C) with shaking from time to time .

7-The tubes were centrifuged at 2000 rpm for (10min).

8-The supernatant was removed and the fixative solution was added (as drops) on the inside wall of the test tube with continuous shaking. The volume was fixed to (5ml) and the contents were shaken well .

9-The tubes were kept at (4°C) for (30min) to fix the cells .

10- The tubes were spinned at 2000 rpm for (10min). The process was repeated for 3 items and the cells were suspended in 2ml of the fixative solution.

11- By a Pasteur pipette, few drops from the tube were dropped vertically on the chilled slide from a height of 3feet at rate of (4-5)drops to give the chance for the chromosomes to spread well. Later ,the slide were kept to dry .

**12-**The slides were stained with Giemsa stain and left for (15min) and then washed with D.W.

**13-**Two slides for each animal were prepared for cytogenetic assay.

**Micronucleus Test in Mouse Bone Marrow cells:** The experiment was done according to [14].

**Cytogenetic analysis of human blood lymphocytes:**

**Chromosomal preparation of human blood lymphocytes:** The experiment was done according to [15].

**Micronucleus test in human blood lymphocytes culture :** The experiment was done according to [16].

Cytogenetic analysis test

**Mitotic index (MI) assay:**

The slides were examined under (40x) of light microscope and (1000) divided and non-divided cells were counted and the percentage rate was calculated to the divided cells only, according to the following equation:

$$MI = \frac{\text{Number of dividing cells}}{(\text{Number of dividing cells} + \text{number of non-dividing cells})} \times 100$$

**Blastogenic index (BI) assay:**

The slides were examined under (40 x) of light microscope and (1000) cells were counted to calculate the percentage rate of the blast cells according to the following equation :

$$BI = \frac{\text{No. of the blast cells}}{\text{Total no. of the cells (1000)}} \times 100$$

**Chromosomal aberration (CA) assay :**

The prepared slides were examined under the oil immersion lens for 100 divided cells per each animal or blood lymphocyte culture, and the cells should be at the metaphase stage of the mitotic division where the chromosomal aberrations were clear and the percentage of these aberrations could be estimated.

**Replicative index (RI) assay:**

The replicative index (RI) was determined by counting the number of cells at the first, second and the third metaphase in 100 successive dividing cells at metaphase, the RI was calculated according to the following equation:

$$RI = \frac{(1 \times M1\%) + (2 \times M2\%) + (3 \times M3\%)}{100}$$

**Micronucleus test (MN):**

The number of MN in (2000) cells of polychromatic erythrocytes (PCE) in mice and in human blood lymphocyte were scored under the oil immersion lens and the percentage of MN was calculated.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Detection of some active compounds of Capparis extract :**

Using different chemical reagents and solution for detection of various active compounds found in C. extract the results were presented in table (1). chemical detection indicated the presence of flavonoids, tannins, terpenes, steroids, and glycosides in the extract.

Table (1): Detection of some active compounds in ethanolic extract

Chemical compounds	Reagent Used	Indication	Result
			<i>C.spinosa</i>
Tannins	Lead acetate 1%	Greenish blue	+ve
Saponin	Shaking	Foaming	-ve
	Ferric Chloride 1%	White ppt.	-ve
Glycosides (befor hydrolysis)	Fehling Reagent	Red ppt.	+ve
Glycosides (after hydrolysis)	Fehling Reagent	Red ppt.	+ve
Terpense	Sulphuric Acid	Brown colour	+ve
Steroids	Sulphuric Acid	Blue colour	+ve
Flavonoids	Ammonia	Dark colour	+ve
Flavonoids	Potassium Hydroxide	yellow colour	+ve

Capparis contains considerable amounts of the antioxidant bioflavonoid rutin, Schraudolf [17] pointed that the strong flavor of the extract comes from mustard oil methyl isothiocyanate released from glucocapparin molecule. The positive detection in our study is in agreement with the study of [18].

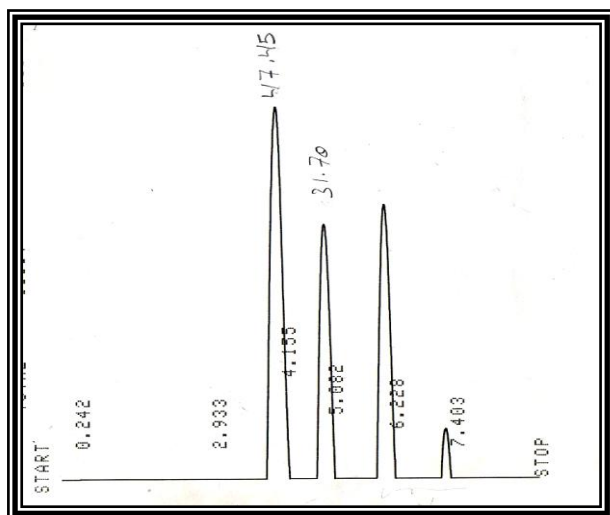
#### HPLC Analysis of *C. spinosa*:

For further identification and in addition to chemical detection of active compounds in *C.spinosa*, HPLC analysis was done for detecting some of the most important active

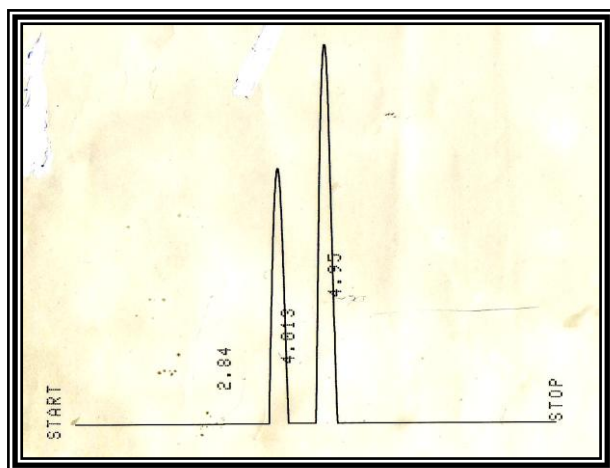
compounds (Rutin and Quercetin) in plant using rutin and quercetin standard as a reference. HPLC analysis was done using C18-column , 1250x , 4.6 mm I.D column , the mobile phase used was 0.1 % acetic acid in deionized water: acteto-nitrile (60:40), and the flow rate was 1ml/min .at 275 nm [19]. Depending on retention time it was clear that also two major peaks for (Rutin and quercetin ) were represented.

Figure (1 A, B,) shows that plant extract contains high concentration of these two flavonoids.

**A**



**B**



**Figure(1):HPLC analysis of Rutin and Quercetin standard(A),*C.spinosa*(B).**

### **Cytogenetic Effects of MTX Drug, *C.spinosa* Extracts on Mouse : Effects on Mitotic Index of Bone Marrow Cells :**

Under normal experimental conditions, Mitotic index is equal to 4.5% in bone marrow cells of Balb/C mice. This was considered as a negative control.

Table (2) shows that 50µg/kg a dose of MTX caused a significant reduction ( $P<0.05$ ) in MI (1.56%) after 7 days of treatment as compared with the negative control Treatment with ethanolic extract of *C. spinosa* caused an increase in MI. The increase in MI is concentration dependent , there was a significant increase ( $P<0.05$ ) in MI after seven days of treatment with extract at concentration 500mg/kg (6.90%)and also a significant increase ( $P<0.05$ ) in MI was shown at concentration 700mg/kg until reach (7.36%).

The results indicate that MTX resulted in a reduction of MI in mouse bone marrow cells . This may be related to the proteins required for mitosis which were not produced at the same quantities , or the code dose not reache the cell to induce it to proliferate , also the drug may cause the death of bone marrow cells [20]besides the reason may be the defect occurred in the mitotic spindle composition during cell division [21]].

This result was in agreement with that of [22], who found that MTX at concentration 25 and 50 µg/kg caused reduction in the MI of mouse bone marrow cells . [23] also refered that MTX caused reduction in MI of mouse bone marrow cells .

Table (2): Cytogenetic effects of MTX drug ,and C.spinosa in mouse bone marrow cells in vivo

Treatment groups		Mitotic index % $m \pm SE$	Micronuclei % $m \pm SE$	Chromosomal Aberration $m \pm SE$ %								
				Chromatid break	Chromatid gap	Deletion	Dicentric	Acentric	Ring	Chromoso me break	Chromoso me gap	Total
Negative control		A 4.50 $\pm$ 0.28	A 0.80 $\pm$ 0.05	A 0.04 $\pm$ 0.008	A 0.04 $\pm$ 0.008	A 0.22 $\pm$ 0.01	A 0.18 $\pm$ 0.01	A 0.19 $\pm$ 0.005	A 0.02 $\pm$ 0.006	A 0.07 $\pm$ 0.01	A 0.04 $\pm$ 0.009	A 0.8 $\pm$ 0.04
Positive control (MTX) (50 $\mu$ g/kg)		B 1.56 $\pm$ 0.23	B 2.33 $\pm$ 0.6	B 0.17 $\pm$ 0.04	B 0.17 $\pm$ 0.04	B 0.34 $\pm$ 0.03	B 0.53 $\pm$ 0.34	B 0.90 $\pm$ 0.30	B 0.06 $\pm$ 0.01	B 0.11 $\pm$ 0.008	B 0.10 $\pm$ 0.014	B 2.38 $\pm$ 0.60
Capparis spinosa	500 mg/kg	C 6.90 $\pm$ 0.005	A 0.33 $\pm$ 0.03	C 0.00 $\pm$ 0.002	A 0.00 $\pm$ 0.002	C 0.12 $\pm$ 0.005	A 0.03 $\pm$ 0.02	A 0.07 $\pm$ 0.02	A 0.00 $\pm$ 0.00	C 0.01 $\pm$ 0.008	C 0.00 $\pm$ 0.002	A 0.23 $\pm$ 0.05
	700 mg/kg	C 7.36 $\pm$ 0.08	A 0.20 $\pm$ 0.05	D 0.00 $\pm$ 0.002	A 0.003 $\pm$ 0.002	C 0.08 $\pm$ 0.005	A 0.02 $\pm$ 0.01	A 0.04 $\pm$ 0.009	A 0.00 $\pm$ 0.00	C 0.01 $\pm$ 0.005	C 0.00 $\pm$ 0.002	A 0.15 $\pm$ 0.02

There are other chemotherapeutic drugs that also cause mitotic index inhibition like cyclophosphamide (CP) [24] ,[25] mitomycin-C (MMC)[26] and TAM [27].

Decreased MI reflects inhibition of cell cycle progression and /or loss of proliferative capacity [28]. As it is known depression of the MI is usually a consequence of a reduced rate of cell proliferation (Mitotic delay) [29].

Obviously the increase in MI after treatment with the extract may be returned to that this plant extract contained mitogenic agents in its constituent because of that , MI might increase after treatment , the antioxidant activity in capparis is represented by the main constituent (rutin,Quercetin and vitamins) which were able to

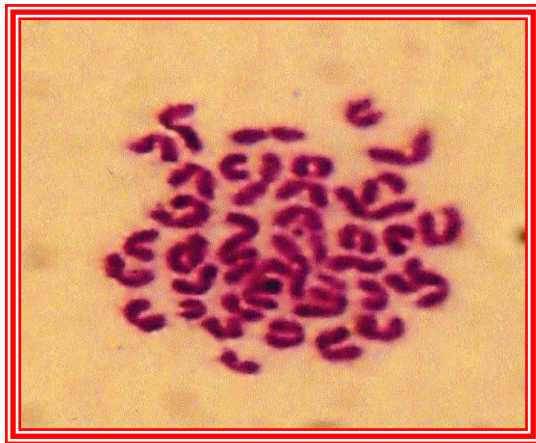
induce cell division without any other mitogen [30].

#### Effects on Chromosomal Aberrations (CAs):

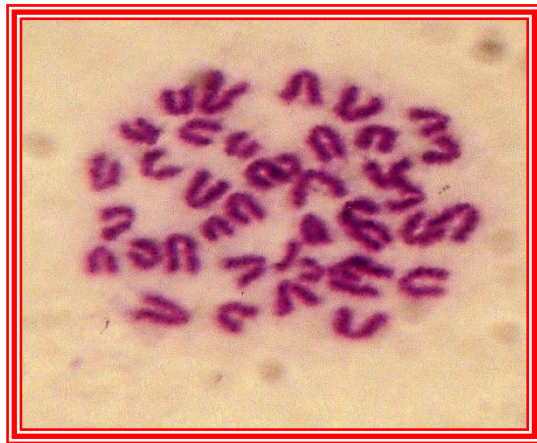
The spontaneous frequency of chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells was (0.87%) which represents a negative control (Table 2) .

The results of this experiment indicate that 50 $\mu$ g/kg of MTX can increase CAs frequencies (chromatid break , chromatid gap, deletion , dicentric chromosome , ring chromosome , chromosome break and chromosome gap) (Figure 2 ) which reached to (2.41%) after 7 days of MTX treatment . These results were significantly different ( $P < 0.05$ ) from the negative control.

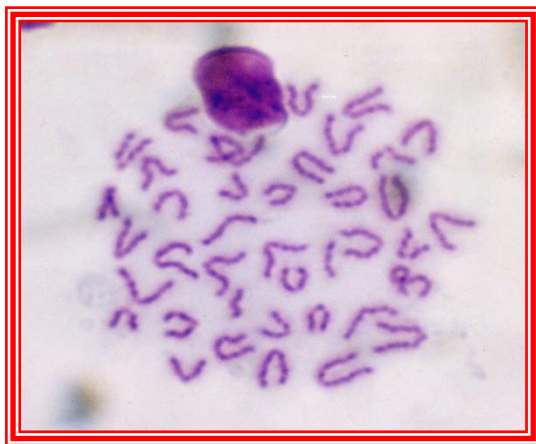




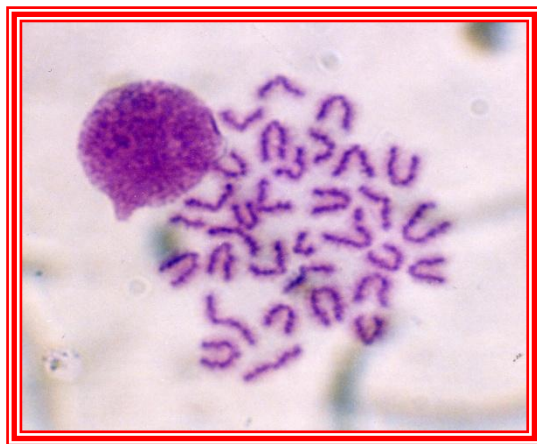
A



B



C



D



E



F

Figure(2) Cell in metaphase stage taken from mice treated with methtrexate showing normal chromosome(A) ,deletion(B), dicentric, gap(C),chromatid break(D) acentric chromosome (E), Ring chromosome(F) (100X).

*C.spinosa* has the ability to reduce the spontaneous CAs from (0.87%) in the negative control to (0.22%) after seven days of treatment with (500mg/kg) and (0.16%) with (700mg/kg) the extract .The results were non significantly different ( $P>0.05$ ) in comparison with the negative control (Table 2).

Methotrexate may act as cytotoxic agents on bone marrow cells by interferes and damages the chromosomal proteins [31]. It was pointed that the percentage of chromatid break was higher than the percentage of chromosome breaks this may be related to the differences in the repair systems for each change .There is also evidence that MTX influences the cellular topoisomerase II content and causes , therefore, an increase in DNA breaks [32],[33].

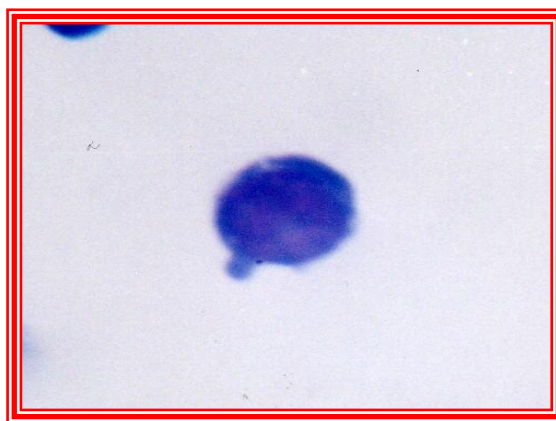
Capparis extract contains chemical compounds which may increase the activity of the detoxification enzymes , such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione -S- transferase (GST) that scavenging free radicals from the cell , or may act to decrease the activity of arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) enzyme which has the ability to activate mutagens inside the cells [34]. The ethanolic extract of different plants have more activity for decreasing the spontaneous frequency of CAs and MN which occur as a result of metabolic changes inside the body or as a result of presence of undetected environmental and genetic mutagen [35], because the ethanolic extracts contain the more active compounds which dissolved in alcohol but not in water like coumarin which have the

ability to remove the cytotoxic effect of more chemical compounds [36].

Another reason for CAs decreased proposed by the *in vivo* antioxidant / radical scavenger activity which was assessed by determining the ability of *C.spinosa* to reduced UV-B induced skin erythema in healthy human volunteers [11].

### The Effects on Micronucleus Induction (MN):

Micronucleus frequencies of polychromatic erythrocytes from negative control mice was (0.80%) (Table 2) .The percentage was increased to (2.33%)after treatment with 50 µg/kg methotrexate.This result is significantly different ( $P<0.05$ ) from the negative control (Figure 3) .



**Figure (3) Micronucleated bone marrow cell from mouse treated with methotrexate(100 X).**



Capparis extract caused reduction in MN frequency, and the reduction in MN was depending on the concentration of the extract (Table 2). The non-significant decrease in MN was observed after seven days of treatment with extract to reach to (0.33%) at the concentration (500mg/kg) and (0.20%) at the concentration (700mg/kg) when compared with negative and positive control.

The increases in MN by MTX suggests that micronuclei may originate from acentric chromosome fragments, either resulting from double-strand DNA damage before cell division, or after the breakage of anaphase bridges [37].

Micronucleus induction by MTX may be resulted from chromosomal damage or damage to the mitotic apparatus in the erythroblasts of the mouse bone marrow [38]. [39] found that MTX has been known as a clastogenic agent and a micronucleus inducer in mouse bone marrow cells and human. [40] pointed that 5-15% of the micronuclei induced by clastogens (hydroquinone and mitomycin C).

The reduction in frequency of MN after treatment with capparis extract may be due to the presence of more active herb constituents rutin and quercetin which have protective effects with

highest anticancer activity and can protect DNA from damage [41].

### **Cytogenetic Effects of MTX and *C.spinosa* on Human Blood Lymphocyte:**

The blast index of human blood cells from healthy individual was (34.1%).

Methotrexate treatment also causes a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in BI for all concentrations of methotrexate used in this experiment (0.4, 2, 4)  $\mu\text{g/ml}$  to reach to (25.24%, 16.24%, 11.92%) respectively in comparison with the negative control. Also, MTX causes a significant inhibition ( $P < 0.05$ ) in MI of human blood lymphocyte for all concentrations to reach to (0.86%, 0.35%, 0.19%) respectively in comparison with the negative control (2.92%) and a high significant inhibition of MI which was noticed with the (4  $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 3).

Other cytogenetic effects of MTX in human blood cells *in vitro* were the increases in the spontaneous frequencies of micronuclei (MN) and chromosomal aberrations (CAs). The increase in MN were significant ( $P < 0.05$ ) for all concentration of MTX (0.4, 2, 4)  $\mu\text{g/ml}$  to reach to (1.38%, 1.57%, 1.83%) respectively in comparison with the negative control (1.06%) (Table 3).

Table (3): Cytogenetic effects of methotrexate ,and *C.spinosa* on human blood lymphocytes in vitro

Groups		Mitotic index $m \pm SE$	Blast index $m \pm SE$	Micronucleus $m \pm SE$
Negative control		A 2.92 $\pm$ 0.20	A 34.1 $\pm$ 0.72	A 1.06 $\pm$ 0.05
Positive control (MTX)	0.4 $\mu$ g/ml	B 0.86 $\pm$ 0.07	B 25.24 $\pm$ 0.85	B 1.38 $\pm$ 0.02
	2.0 $\mu$ g/ml	B 0.35 $\pm$ 0.03	C 16.24 $\pm$ 0.34	C 1.57 $\pm$ 0.02
	4.0 $\mu$ g/ml	B 0.19 $\pm$ 0.03	C 11.92 $\pm$ 0.54	D 1.83 $\pm$ 0.03
<i>C.spinosa</i>	200 $\mu$ g/ml	C 4.37 $\pm$ 0.10	D 51.90 $\pm$ 1.95	F 0.33 $\pm$ 0.05
	400 $\mu$ g/ml	C 4.93 $\pm$ 0.19	D 55.1 $\pm$ 1.67	F 0.20 $\pm$ 0.04
	800 $\mu$ g/ml	D 6.12 $\pm$ 0.17	E 61.18 $\pm$ 1.94	F 0.14 $\pm$ 0.04

While increases in CAs were significant ( $P < 0.05$ ) only at the concentration (4  $\mu$ g/ml) to reach to (2.04%) in comparison with the negative control (1.57%) (Table 4)

Table (4): Chromosomal aberration of methotrexate , and *C.spinosa* human blood lymphocytes in vitro

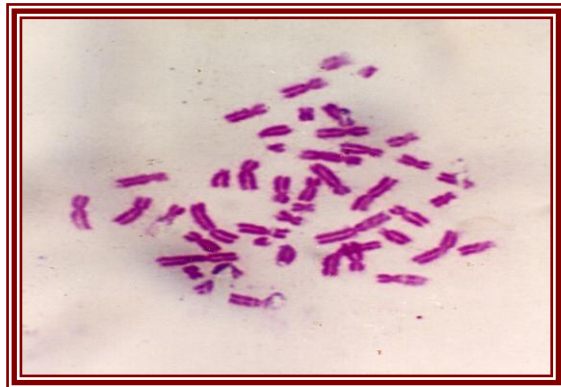
Treatment groups		Chromosomal Aberration % $m \pm SE$								
		Chromatid break	Chromatid gap	Deletion	Dicentric	Acentric	Ring	Chromosome break	Chromosome gap	Total
Negative control		A 0.18 $\pm$ 0.005	A 0.51 $\pm$ 0.01	A 0.41 $\pm$ 0.006	A 0.17 $\pm$ 0.01	A 0.12 $\pm$ 0.008	A 0.01 $\pm$ 0.001	A 0.08 $\pm$ 0.008	A 0.09 $\pm$ 0.006	A 1.57 $\pm$ 0.02
Positive control (MTX)	0.4 $\mu$ g/ml	B 0.07 $\pm$ 0.01	B 0.08 $\pm$ 0.01	B 0.18 $\pm$ 0.01	B 0.13 $\pm$ 0.02	A 0.08 $\pm$ 0.01	A 0.01 $\pm$ 0.009	AB 0.04 $\pm$ 0.01	B 0.07 $\pm$ 0.01	B 0.66 $\pm$ 0.02
	2 $\mu$ g/ml	C 0.13 $\pm$ 0.02	C 0.12 $\pm$ 0.01	B 0.21 $\pm$ 0.02	B 0.17 $\pm$ 0.02	B 0.19 $\pm$ 0.02	B 0.05 $\pm$ 0.009	B 0.08 $\pm$ 0.01	C 0.12 $\pm$ 0.01	A 1.07 $\pm$ 0.002
	4 $\mu$ g/ml	D 0.23 $\pm$ 0.02	D 0.21 $\pm$ 0.01	D 0.49 $\pm$ 0.02	C 0.27 $\pm$ 0.01	C 0.31 $\pm$ 0.03	C 0.12 $\pm$ 0.01	C 0.18 $\pm$ 0.02	D 0.20 $\pm$ 0.01	C 2.01 $\pm$ 0.03
<i>Capparis spinosa</i>	200 $\mu$ g/ml	C 0.07 $\pm$ 0.008	B 0.05 $\pm$ 0.008	B 0.21 $\pm$ 0.008	AD 0.06 $\pm$ 0.007	A 0.09 $\pm$ 0.006	AB 0.01 $\pm$ 0.005	AB 0.06 $\pm$ 0.009	B 0.03 $\pm$ 0.006	B 0.58 $\pm$ 0.03
	400 $\mu$ g/ml	B 0.03 $\pm$ 0.007	B 0.03 $\pm$ 0.008	B 0.17 $\pm$ 0.01	A 0.05 $\pm$ 0.007	A 0.06 $\pm$ 0.008	A 0.006 $\pm$ 0.003	A 0.02 $\pm$ 0.003	A 0.01 $\pm$ 0.008	D 0.37 $\pm$ 0.01
	800 $\mu$ g/ml	B 0.02 $\pm$ 0.006	B 0.03 $\pm$ 0.008	B 0.13 $\pm$ 0.01	A 0.02 $\pm$ 0.004	A 0.03 $\pm$ 0.006	A 0.0 $\pm$ 0.00	A 0.01 $\pm$ 0.004	A 0.004 $\pm$ 0.002	E 0.24 $\pm$ 0.01

Spontaneous frequencies of chromatid break, chromatid gap, deletion and dicentric chromosomes were increased depending on the concentration of MTX in human blood culture (Figure 4).



**Figure (4) Metaphase of normal human blood lymphocyte (100X)**

Another effect of MTX occurs on the replicative index in human blood culture. MTX also causes a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in RI at the concentration (4  $\mu\text{g/ml}$ ) to reach to (1.69%) while in other two concentrations (0.4, 2)  $\mu\text{g/ml}$  the decreasing in RI was non significant ( $P > 0.05$ ) in comparison with the negative control (Fig 5).



**Figure (5) Metaphase of human blood lymphocyte treated with MTX showing chromosome break (100 X).**

The percentage of cells in M3 was decreased after treatment with MTX concentrations (0.4, 2, 4)  $\mu\text{g/ml}$  to reach (30%, 27%, 22.8%) respectively in comparison with the negative control (31%). Cells in M2 was also decreased to reach (31%, 29%, 24%) respectively in comparison with the negative control (33%), while cells percentage in M1 was also increased to reach (39%, 44%, 53.2%) respectively in comparison with the negative control (36%) (Table 5). MTX also caused a significant increase ( $P < 0.05$ ) in SCEs and for all MTX concentrations to reach (8.06%, 12%, 16.2%) respectively in comparison with the negative control (6.16%).

The blast index appears to increase gradually in correlation with concentration of *C. spinosa* extract when compared with that of normal human blood lymphocyte culture (34.1%), using (200, 400)  $\mu\text{g/ml}$  of the plant extract blast index become (51.90, 55.1%) respectively. There is no significant differences ( $P > 0.05$ ) between these concentrations, but significant increase ( $P < 0.05$ ) was shown when compared with negative control, a significant increase ( $P < 0.05$ ) in blast index was also shown with the concentration

(800µg/ml) to reach (61.18%) in comparison with other two concentrations and with the negative control (Table 3)

**Table (5): Effects of methotrexate drug, and *C.spinosa* extracts on cell cycle progression on human blood lymphocytes from healthy individual *in vitro***

Groups	Replicative Index % m±SE	Cell Cycle Progression % m			Sister chromatid exchange % m±SE
		M1	M2	M3	
Negative control	A 1.95±0.02	36	33	31	A 4.41±0.07
Positive control 0.4 µg/ml MTX	A 1.91±0.03	39	31	30	B 5.32±0.02
Positive control 2 µg/ml MTX	AB 1.83±0.04	44	29	27	C 6.55±0.85
Positive control 4 µg/ml MTX	B 1.69±0.02	53.2	24	22.8	D 8.10±0.19
200 µg/ml <i>C.spinosa</i>	C 2±0.02	33	34	33	A 4.04±0.17
400 µg/ml <i>C.spinosa</i>	C 2.08±0.05	29	35	36	A 3.97±0.14
800 µg/ml <i>C.spinosa</i>	C 2.13±0.03	26	36.4	37.6	A 3.68±0.13

The mitotic index of human blood cells from healthy individual was (2.92%) , *C.spinosa* extract caused a significant increase ( $P<0.05$ ) in M1 in different concentrations in comparison with the negative control , so the increases in M1 was concentrations dependent. In the concentration (200µg/ml) of Capparis extract, the M1 reached to (4.37%), while at the (400µg/ml) M1 reached to (4.93%), so there are no significant differences using these two concentrations. A significant increase ( $P<0.05$ ) was observed at the concentration (800µg/ml) M1 reached to (6.12%) in comparison with other two concentrations and with negative control (Table 3).

Other cytogenetic parameters used in this study was chromosomal aberrations and micronucleus. For CAs , *C.spinosa* cause a significant decrease ( $P<0.05$ ) in totals of chromosome aberrations for three different concentrations (200, 400,800)µg/ml to reach to (0.61%,0.41%, 0.25%) respectively in comparison with the negative control (1.57%). A high significant reduction in spontaneous CAs was shown with the concentration (800µg/ml) in comparison with other concentrations. So the reduction was also concentration dependent , and this indicated that *C.spinosa* has no

cytotoxic activity on human blood lymphocytes *in vitro*.

Spontaneous frequencies of chromatid break, chromosome break, chromatid gap, chromosome gap, deletion, and dicentric were decreased depending on concentration of Capparis extract in human blood culture, while ring chromosomes were not observed in the concentration (800 µg/ml) in comparison with negative control (Table 4).

For the MN, *C. spinosa* extract shows that there was a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in micronucleus, the MN was decreased from (1.06%) in the negative control to (0.33%, 0.20%, 0.14%) for the concentrations (200, 400, 800) mg/ml respectively, a high significant decrease was clear at the concentration (800 µg/ml) (Table 3). The percentage of cell in M3 after treatment with *C. spinosa* reach to (33%) for the concentration (400, 800) µg/ml. A significant increase ( $p < 0.05$ ) was shown in the concentration (400, 800) µg/ml to reach to (36%, 37.6%) in comparison with negative control (Table 5). In M2, it was also shown that *C. spinosa* causes a significant increase in cells to reach to (34%, 35%, 36.4%) for three different concentration respectively (200, 400, 800) µg/ml in comparison with cells in M2 of negative control (33%). On the other hand, cells in M1 were decreased to reach to (33%, 29%, 26%) respectively in comparison with negative control (36%).

So, the RI was increased significantly ( $P < 0.05$ ) with the increase of the concentration of Capparis extract to reach to (2%, 2.08%, 2.13) for all concentrations of Capparis extract respectively in comparison with RI of negative control (1.95%).

*C. spinosa* causes non significant decrease in the percentage of SCEs with the all concentrations of plant extract to reach to (5.04%, 4.64%, 3.88%) µg/ml for the concentrations (200, 400, 800) µg/ml

respectively in comparison with the negative control (6.16%) (Table 5).

The reduction in BI and MI by MTX indicates that MTX has a cytotoxic activity on human blood lymphocyte *in vitro*. This reduction in BI and MI caused by MTX are considered as indicators of cytogenetic damage [42]. [43] demonstrates that repair of mutated G2 cells causes a lag in their reaching mitosis and, therefore, a drop in mitotic index. Another reason for decreasing the MI by MTX suggests that an indicator of changes in lymphocytes and their ability to respond to culture conditions and may be an early marker of cytotoxicity and genotoxicity in humans [44].

The increase of MN in peripheral blood indicates that MTX may be mutagenic agent [45]. [37] suggests that micronuclei may originate from a centric chromosome fragments, either resulting from double strand DNA damage before cell division, or after the breakage of anaphase bridges that thought to be caused by MTX.

Some investigations have indicated that nuclear irregularities may be also associated with chromosomal aberration [46]. The results indicate that the formation of different types of CAs and MN are closely related to the breakage fusion bridge type of mitotic disturbances, and abnormalities in nuclear shape may thus primarily be regarded as an indicator of genetic instability [47].

The increases on the frequency of SCEs and the reduction of RI caused by genotoxic agents are considered as indicators of cytogenetic damage [42] and, therefore, SCEs appear to have an application in the clinical prediction of tumor sensitivity to potential chemotherapeutics [48]. It is found that MTX leads to increase the SCE, reduction of new DNA synthesis, causes DNA fragmentations through inhibition of different enzyme mechanisms and induced cell growth inhibition and cell killing [49]; [50].

The increases in MI and BI indicate that plant extract contains active constituents that might stimulate cell mediated immunity by stimulating blastogenesis or blast transformation of lymphocyte and their cell division [51].

The reduction in the percentage of CAs and MN after treatment with Capparis extract gives an indication that Capparis extract has no genotoxic effects on human blood cells *in vitro* this may be due to presence of rutin and quercetin in the Capparis extract , it was found that quercetin reduced the DNA strand breakage which induced by mitomycin C in human lymphocytes quercetin and rutin displayed protective effects on DNA damage in concentration dependent manner [41].

Flavonoids have a variety of biological effects in numerous mammalian cell systems , *in vitro* as well *in vivo* . Much attention has been paid to their antioxidant properties and to their inhibitory role in various stages of tumor development [52] . Flavonoids can also act as desmutagen and Bio-antimutagen that can reduce or decrease the percentage of SCEs , and can DNA repair process, so, its act as Bio - anti mutagen [53]. Phenolic compounds including flavonoid are excellent antioxidant and prevent lipid peroxidation. Also flavonoids showed protection by reducing the induced damage in bone marrow cells caused by MTX through scavenging free radicals, the same effect was obtained through protection against genotoxic damage in cultured human lymphocyte. Quercetin, the major representative of the flavonol subclass , and one of Capparis active constituent, is a strong antioxidant and prevents oxidation of low density lipoproteins *in vitro*, [54], in addition to the ability of flavonoids quercetin and rutin to protect living cell against DNA strand breaks by way of their metal ion chelating mechanism [55].

The increases in percentage of M3 and the decrease in the percentage of M1 after treatment with plant extract point that plant extract stimulates cell to replicate and also lead to increase CCP especially M3 , and this may be due to that the plant extract contains active compounds acting as stimulator for cell cycle [56].

## REFERENCES

1. Said M.(1996) Medicinal Herbal.Karachi: aital Hikmah at Madinatal-Hikmah. 215-217
2. Taylor RS, Manandhar NP, Hudson JB , and TowersGH (1996). Antiviral activities of Nepalese medicinal plant. J.Ethonopharmacol.,52:157:163.
3. Chang TH, Kim JC, Kim MK, Choi SC, Kim SL, and Chung JM. (1995) Investigation of Korean plant extracts for potential phytotherapeutic agents against B-virus Hepatitis. Phytotherapy Research. 151-159
4. Kusumoto IT, Nakabayashi T, Kida H, and Miyashiro H (1995) Screening of various plant extracts used in a yurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type (HIV-1) protease.Phtotherapy Research,9:180-184.
5. Raghu C, Ashok G, Dhanaraj S.A, Suresh B, and Vijayan P.(2004) In vitro cytotoxic activity of Lanatana camara Linn.Indian J. pharmacology :36:94-95.
6. Kumar NB, Hopkins K, and Allen K.(2002) Use of complementary integrative nutritional therapies during cancer treatment implications in clinical practice. Cancer Con. 9:236-243.
7. Morris KT, Johnson N, and Homer L. (2000) A comparison of complementry therapy use between

breast cancer patients and patients with other primary tumor sites. *Am.J.Surg.*,179:407-411.

8. Sawayer MG, Gannoni AF, and Toogood IR.(1994) The use of alternative therapies by children with cancer .*Med.J.Aust.*,160:320-322.

9. Lippert MC, McClain R, and Boyd JC.(1999) Alternative medicine use in patients with localized prostate carcinoma treated with curative intent. *Cancer* .86:2642-2648.

10. Curley BJ, Gardner SF, and Hubbard MA.(2000) Content versus lable claims in ephedra-containing dietary supplements.*Am.J.Health.Sys.Pharma* .57:963-969.

11. Bonina F, Puglia C , Ventura D, Aquino R, Tortora S, Sacchi A, Saija A, Tomaino A, Pellegrino ML, and deCaprariis P.(2002) In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds .*Journal of Cosmet .Sci* ., 53:321-335.

12. Harborne JB.(1973). phytochemical methods. Science paper Backs , Chapman and Hall , New York .

13. Allen JW., Shuler CF., Mendes RW., and Latt SA. (1977) Asimplified technique for in vivo analysis of sister chromatic exchange using 5-bromodeoxy –uridine tablets . *Cytogenetics* ,18:231-237.

14. Schmid W.(1979) The cell micronucleus test for cytogenetic analysis . In : Hlaender , A. (ed) . Chemical mutagenes principles and methods for their detection . Vol .4, plenum press , New York and London.

15. Nowell PC.(1960) Phytohemagglutinin in initiation of

mitosis in culture of normal human leukocytes .*Cancer Res.*, 20:462

16. AL-Sudany AMA. (2005) Inhibitory effects of *Nigella sativa* oil and honey on the genotoxicity of tamoxifen in mice.M.Sc. Thesis,College of Science, AL-Nahrain University.

17. Schraudolf A. (1989) *Capparis spinosa* . *Phytochemistry*, 28:259.

18. Fairbairn JW, and Muhtadi FJ. (1972) Chemotaxonomy of anthraquinones in *Rumex*. *Phytochemistry*, 11:263-268.

19. Handa SS , Mundkinajedu D, and Mangal AK. (1998) Indian herbal pharmacopoeia (volume I) . Indian Drug Manufactures Association and Regional Research Laboratory , Mumbai. 50.

20. Turner RR.; Wakely GK., Hannon KS; and Bell NH (1998) Tamoxifen inhibits osteoclast mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone deficient rats. *Endocrinology*: 122:1164-1160 .

21. Shirashi Y.(1978) Chromosome aberration induced in germ cells of mice . *Mutat . Res* ., 57:313-324.

22. Theodore M.; Theodore L.; and Constantine T. (1998) Induction of cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and of antineoplastic effects in Ehrlich ascites tumor in vivo treated by methotrexate , hyperthermia and / or caffeine .*Mutat .Res.*, 422:229-236.

23. AL-Amiry EWH. (1999) Enzymatic, cytogenetic, and drug resistance studies on blood from patients with breast cancer. M.Sc. Thesis, College of Education for Women , University of Baghdad .



24. AL-Fayadh BS. (1997) Study of cytogenetic and enzymatic effects of water on mammalian cells .M.Sc. Thesis , College of Education for Woman , University of Bagdad.
25. Hassan MAK. (2002) The use of some plant extracts for inhibition of genotoxic effects for some anticancer drugs in mouse .Ph.D Thesis , College of Sciences, Babylon university .(In arabic)
26. Littlefield L.; Colyer S.; and Dufraim R.(1980) Comparison of SCE in human lymphocyte after exposure to MMC in vitro,in vivo Mutat. Res. , 67:191-195.
27. Sayhood YD. (2000) Inhibiting thenematologic and cytogenetic effects of tamoxifen by garlic extract.M.Sc.Thesis,Ibn Al-Hathem College,University of Baghdad.Iraq.
28. Marucia IM.; Donna M.; Marcelo OB.; Helene D.; Daniela M.; Jean L.; Rommel RB.;and Marc L. (2000) Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. An. Acad. Bras. Cienc., 72:4.
29. Galloway SM.; Aardema MJ.; Ishidate M.; Ivett J L.; Kirkland DJ.; Morita T.; Mosesso P.; and Sofuni T.(1994) Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. Mutat. Res. ,312:241-261.
30. Travis EL.(1995) Primer of medical radiobiology year book medical publisher , Travis , E.L.(ed). U.S.A.
31. WeissDJ.; and Gulpide E.(1988) Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens.J.Steroid Biochem.,31:671-676.
32. LoricA.; Toffoli G.; Boiocchi M.; Erba E.; Brogginini M.; Rappa G.; and D'Incalci M. (1988) Early DNA damage induced in cells exposed to N10-propargyl 5,8-dieazofolic acid (CB3717) or methotrexate. Biochem . pharmacol ., 37:1875-1876.
33. Holden SA.; Teicher BA.; Robinson MF.; Northey D.; and Rosowsky A. (1995) Antifolates can potentiate topoisomerase II inhibitors in vitro and in vivo . Cancer Chemother .Pharmacol ., 36:165-171.
34. Wang ZY; Chen SJ.; Zhon ZC.; Athar M.; Khan MA.; Bickers DR.; and Mukhtar H. (1989) Antimutagenic activity of green tea polyphenol . Mutat . Res . 223:273 -285.
35. Shubber EK. (1981) The genetic hazard of ten antiparasitic drugs compared to radiation . ph. D. Thesis , Harvard University. U.S.A.
36. Ohta T.; Watanabe K.; Moriya M.; Shirasu Y.; and Kada T. (1983) Anti – mutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenesis induced by 4-nitroquinolin 1-oxide or UV irradiation in E.coli. Mutat . Res ., 117:135-138 .
37. Schmid W. (1982) The micronucleus test : an in vivo bone marrow method .Hsu T.C. (ed) .Cytogenetic assays of environmental mutagens. Allanheld, Osmun Totowa, 221-229.
38. Armstrong MJ.; and Galloway SM. (1994) Micronuclei induced in peripheral blood of mu-plM-1 transgenic mice by chronic oral treatment with 2- Acetylaminofluorene or benzene but not with diethylnitrosamine or 1,2 – Dichloroethane. Mutat . Res ., 302:61-70.
39. Kasahara Y.; Nakai D.; Miura K.; Yagi K.; and Hirabayashi T. (1992) Mechanism of induction of micronuclei and chromosome a berrations in



mouse bone marrow by multiple treatments of methotrexate. *Mutat. Res.*, 280:117-128.

40. Miller BM.; and Adler ID. (1990) Application of antikinetochore antibody staining (REST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo. *Mutagenesis*, 5:411-415.

41. Sahelian RM.(2004) The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicol Lett.*, 151:143 -9.

42. Morris SM.; and Heflich RH.(1984) A comparison of the toxic and SCE-inducing effects of inhibitors of ADP-ribosyl transferase in chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 126-71.

43. Puck TT.; Johnson R.; Webb P.; Cui H; Valdez JG; and Crissman H. (2002) Mutagenesis and repair by low doses of  $\alpha$  radiation mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:12220-12223.

44. Gonsebatt ME.; Vega L.; Montero R.; Garcia-Vargas G.; DeL Razo LM.; Albores A.; Cebrian ME.; and Ostrosky-Wegman P. (1994) Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.*, 313:293-9.

45. Liu W. (1992) .Improvement of micronucleus test method in peripheral blood lymphocytes and preliminary observation in clinical use. *Chinese Journal of Medical Testing*. 15:233-234.

46. Atkin NB.; and Backer NC. (1979) Nuclear protrusions in malignant tumours with large abnormal chromosomes: observations on -C banded preparation. *Experientia*, 35:899 -901.

47. David G.; Jonas B.; Mattias H.; Fredric M.; Paola DC; Mans A. ; and Nils M. (2001) Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *American Journal of Pathology*, 158:199-206.

48. Tofilon PJ.; Basic I.; and Milas L. (1985) Predication of in Vivo tumor response to chemotherapeutic agents by the in vitro sister chromatid exchange assay. *Cancer Res.*, 45:2025-2030.

49. Li JC.; and Kaminskas E. (1984) Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. *proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 81:5694-5698.

50. Sano H.; Kubota M.; Kasai Y.; Hashimoto H.; Shimizu T.; Adachi S.; and Mikawa H. (1991) Increased methotrexate -induced DNA strand breaks and cytotoxicity following mutational loss of thymidine kinase. *Int. J. Cancer*, 48:92.95.

51. Mowrey D. (1986) The scientific validation of herbal medicine keats publishing, U.S.A.

52. Hollman PC.; and Katan MP. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.*, 51:305-310.

53. Francis AR.; Shetty TK.; and Bhattacharya RK. (1989) Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub>: In vitro effect of plant flavonoids. *Mutat. Res.*, 222: 393-401.

54. Hollman PC.; and Katan MB. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, 37:937- 942.

55. Miski M.; Ulubele A.; and Mabry TJ. (1983) 6-Hydroxy flavones from *Thymbra spicata* .phytochemistry , 22 : 2093 -2094 .

56-Gebhart E. (1992) Anticlastogenicity in cultures mammalian cells. Mutat.Res ., 267:211-220.

## Prolog-Based Sum of Product Logic Function Manipulation

Wafaa F. Tobia

*Dept. of Electrical Engineering, College of Engineering, University of Technology,  
Baghdad -Iraq*

*Email; umfarah2005@yahoo.com*

### ABSTRACT

An interactive sum of product's logic function module is proposed here. That is, to define, configure and implement the module as an interface programming one for a combinational logic system design. The module allows the specification of sum of product logic functions to be described, translated, and verified as the function entered by the designer. The whole task is done using the non-procedural hardware description language "Turbo Prolog". The main features of the module, its configuration, and implementation are thoroughly presented in this work.

**Keywords:** logic programming, combinational logic function, combinational circuit synthesis, Prolog.

### الملخص باللغة العربية

البحث يقدم نموذج تفاعلي لمجاميع ضرب الدالة المنطقية، والعمل هنا لتحديد، تكوين ، وتنفيذ النموذج المقترح باعتباره واجهة برمجية لغرض تصميم الانظمة المنطقية التوافقية . النموذج يسمح بوصف، ترجمة ، والتحقق من مواصفات مجاميع ضرب الدالة المنطقية المدخلة من قبل المصمم. تم استخدام لغة البرمجة ( Turbo Prolog ) كاحدى لغات التعريف الوصفي الغير اجرائية في انجاز النموذج . العمل يعرض اهم ملامح النموذج، تشكيله، وتنفيذه بصورة شاملة.

## INTRODUCTION

This work attempts to reconnect two fields, a Logic Programming language and the combinational logic circuit design in a fresh look at Prolog as a Non-procedural Hardware Description Language. That is used to describe the logic function specifications. Boolean algebra forms a cornerstone of computer science and digital system design. Many problems in digital logic design and testing, artificial intelligence, and combinatorics can be expressed as a sequence of operations on Boolean functions.

Such applications would benefit from efficient approaches for representing and manipulating Boolean functions symbolically including the benefits of prolog's fast unification.

Using the benefits of Prolog's fast unification algorithm and built-in backtracking mechanism, an efficient (Sum Of Product- Module SOP-M) programming module is developed to represent and manipulate SOP logic functions as a first level in the logic design hierarchy.

Section 2 covers the uses of logic programming (specially Prolog) and section 3 the main part of the paper, presents SOP-M configuration, section 4 gives an overview of how logic function representation goes through SOP-M and section 5 shows the related kernel Prolog predicates of SOP programming module, section 6 concludes the work.

### Logic Programming

Prolog is a general purpose logic programming language associated with artificial intelligence and computational linguistics.

Prolog has its roots in first-order logic, a formal logic, and unlike many other programming languages, Prolog is declarative i.e. the program logic is expressed in terms of relations, represented as facts and rules. A

computation is initiated by running a query over these relations.[1,2,3]

Prolog was one of the first logic programming languages, and remains among the most popular such languages today, Prolog is an excellent rapid-prototyping language which can be applied in many areas, including digital hardware circuits design [4].

In particular, it supports many advanced programming features such as powerful searching for multiple solutions through backtracking mechanism, pattern matching (unification), database programming and modular programming [2]. Modern Prolog environments support creating graphical user interfaces, as well as administrative and networked applications. Among other Hardware Description Languages are; ABEL (Advanced Boolean Equation Language), VHDL (Verilog Hardware Description Language).

### SOP-M Configurations

The SOP-M representation proposed in this work is configured as shown in figure-1. It has the symbolic logic function reader, a logic translator [5] which translates logic function sum of product terms to canonical form, and logic converter to obtain the numeric value for symbolic SOP terms also a functional verifier already developed to detect designer entry errors if any.

In addition to these four parts, the module has the followings:

- A working Memory- a logic function specific data [3] is held in working memory. It contains the facts that are acquired from the designer by SOP-M during its operation, like number of variables, number of minterms, the minterms that represent the logic function with don't\_care conditions if any, and the immediate results obtained through module

running operation. Also SOP-M retrieves information from the working memory as the need for such information arises.

- A user Interface- SOP-M provides a "User Friendly" interactive environment to the designer through selection menu, different opening windows to communicate interactively with the programming module.

### SOP-M Overview

The SOP-M represents the highest level in the logic design hierarchy [6, 7], where the designers begins by describing the desired logic function as SOP symbolic minterms. Appendix-A contain the main technical terms description and usage in the logic function. Following the logic function representation process:-

#### I) Reading symbolic logic function.

SOP-M starts by, *reading* user defined logic function with don't\_cares in SOP symbolic form through function entry window, accepting functions up to (9) variables and it offers function entry notes to the user (designer) through function help notes window. The logic function reader can handle logic function in two forms:

-Standard form as the function:

$$F(A, B, C) = ab + Bc + aBc$$

$$\text{Don't\_care} = AbC$$

-Canonical form as the function:

Completely specified function

$$F(A, B, C) = abc + Abc + AbC$$

-Note : in our work we consider, Upper case letters as non -inverted variables.

Lower case letters as inverted variables.

#### II) Translating Symbolic logic function (Standard to Canonical)

*Translating* the incompletely specified logic functions into SOP canonical form. Here the functional translator plays an important role in translating the incompletely specified logic function into SOP canonical form.

**E.g for the standard logic function, which the user can enter:**

$$F(A,B,C) = ab + BC + aBc$$

$$ab = (abc + abC)$$

$$BC = (aBC + ABC)$$

$$aBc = aBc$$

**The obtained canonical logic function after translation:**

$$F(A,B,C) = abc + abC + aBC + ABC + aBc$$

$$\text{Don't\_care} = AbC$$

#### III) Converting symbolic minterms to numeric form terms

After translation *converting* the above obtained logic function from symbolic representation to numeric form as minterm values:

The input function of the three variables is:

$$F(A,B,C) = \sum (0,1,3,7,2),$$

$$\text{And the Don't\_care value} = \sum (5)$$

All logic function details that captured from user or gained through function manipulation will be asserted in working memory as design facts (that can be retrieved in the future new design level).

### III. Verifying & detecting function errors

To inform the user to enter logic function details twice again after detecting any of the following errors:

- Non-accepted symbols written in the logic function expression (".", ",", "-", "\_", """), the user can follow the notes in (help-window).
- Minterm entered twice.
- Intersection minterm between function and don't\_care.
- Different number of variables for function and don't\_care.

So the functional verifier can detect the logic function design errors if they occur, and inform the user about error occurrence and its type through (error! message window).

### **SOP-M Programming**

The present programming module uses Prolog's depth-first backtracking to capture the user defined logic function expression in symbolic form through "run\_fun" predicate which in turn calls "clear\_fun" predicate that retracts all the previous logic function details from memory:

```
run_fun:- !, clear_fun,
          shiftwindow(1),clearwindow,
          write("\n (Function)"), nl ,
          run_sym, fun_1,
sub_clear_fun,
          shiftwindow(1), write( "\n
(Dont_care)" ),nl ,
          run_sym, dont_1, chk_1, ! ,
          fail.
```

Suppose the SOP entry expression (symbolic form) as follows:

$F(A, B, C) = ab + BC + aBc$

Prolog accepts (  $ab + BC + aBc$  ) as a string , str\_to\_lst predicate will convert this string to list , a list in

Prolog is a powerful data structure for holding and manipulating groups of things here (SOP terms: string  $\rightarrow$  list) :

```
str_to_lst(String,[ ]):-
    fronttoken( String, First,_),
    not_acp(First), !,
    write("\n Please input Function
again without writing (\" ,First,\")"),
    clear_fun, run_fun.
```

```
str_to_lst(String,[ Token|Rest_list ]):-
    fronttoken(String,      Token,
Rest_string), !,
    str_to_lst(Rest_string,Rest_list)
    str_to_lst(_,[ ]).
```

The symbolic manipulation for the logic function minterms takes part with the kernel predicate "sub\_lst" which:

- evaluates for each term the number of literals,
- compares each term with a complete one ,
- and detects the missing literals in that term if any.
- then it starts to translate the incomplete term into a complete one by inserting (in sort) the missing literals to the term
- each incomplete term will be translated to  $2^N$  terms ( N= number of missing literals).

```
sub_lst([ ]).
```

```
sub_lst( [In| In_Tail]):-
    str_len( In,Len), number (Var),
    Len = Var,
    assert ( new_term ( In )),
    sub_lst( In_Tail ),!.
```

```
sub_lst ([ In | Tail ] ):-
    str_len ( In, Len ), number
(Var),
    Len >< Var,
    asserta ( term ( In )),
```

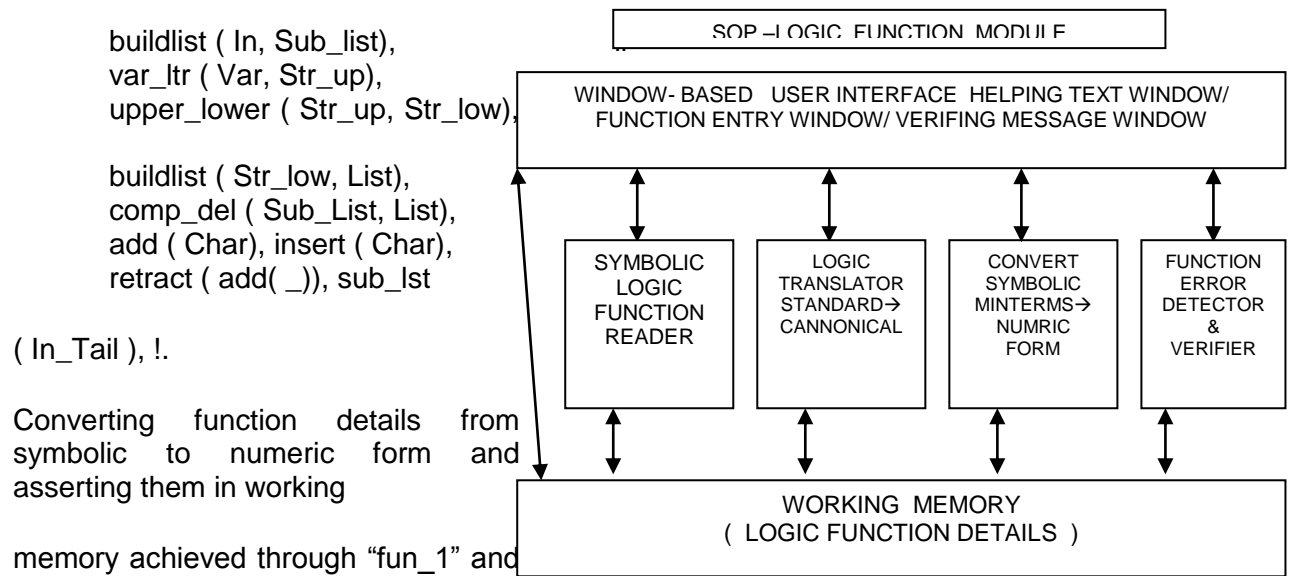


Figure (1): SOP Module Configuration

fun\_1:- shiftwindow (2), clearwindow,  
 symbol ( Sylstr),  
 unique ( Sylstr, Syl\_Str), assert  
 (fun\_syl ( Syl\_Str)),  
 number(Var), write(" No. of  
 VARIABLES = ", Var),nl,  
 write (Syl\_Str), nl, retracall  
 (number(\_)),  
 cnv\_str(Syl\_Str,Var),numeric(N  
 umlst),  
 list\_length(Numlst,S1),  
 assert(fun\_num(Numlst,Var,S1),  
 write(" FUNCTION = \288 "  
 ,Numlst),  
 write("\n No. OF MINTERMS =  
 ", S1),!.

The same process will be done  
 through "don't\_1" predicate if there is  
 any of don't\_care minterms

- "Chk\_1" predicate detects user entry errors if any(intersection minterm, different number of variables for the function and don't\_care ):

Chk\_1:- dnt\_num( \_\_, \_\_, S), S=0, !.

Chk\_1:-  
 fun\_num(Flist, V1, \_\_),  
 dnt\_num(Dlist, V2, \_\_), V1= V2,  
 end-chk(Flist,Dlist,Nlist),

st\_length(Nlist, L), L=0, end\_hlp, !.

Chk\_1:-  
 fun\_num(Flist, \_\_, \_\_),  
 dnt\_num(Dlist, \_\_, \_\_),  
 end\_chk(Flist,Dlist,Nlist),  
 trace(on),  
 list-length (Nlist, L), L>0, beep,  
 shiftwindow(4), clearwindow,  
 write( " \nIntersection  
 Minterm", "\n for function &  
 don't\_care"),  
 readchar (A), A=' T',  
 run\_1

Example W.1; see figure-2

(FUNCTION): AbC + ABc + ABC + aBC	Function Entry Window
(Don't_Care): abc + ABc	
Intersection Minterm for function & don't_care	Error! Message Window

Figure (2) Example W.1

Chk\_1:-

```

    fun_num(Flist,V1,_),
dnt_num(Dlist,V2,_),
    V1 >= V2, beep,
    shiftwindow (4), clearwindow,
    write("\nDifferent No. of
Variables", "\nfor function &
don't_care"),
    readchar (A), A=' T',
    run_1.

```

Example W.2; see figure-3

(FUNCTION): AbC + ABc + aBC + ABC	Function Entry Window
(Don't_Care): abc + adc	
Different No. of Variables for function & don't_care	Error! Message Window

Figure (3) Example W.2

Also "Une\_1st" predicate shows error message to the user if the minterm entered twice,

```

Une_1st (List, _, S1, S2, _):-
    list_length(List,S1),
    unique (List, Nlist),
    list_length( Nlist,S2),
    S1>S2, !,
    beep,shiftwindow
(4),clearwindow,
    write (" \nMinterm entered
twice"),
    readchar (A), A=' T',
    read(_,_,_).

```

Example W.3; see figure-4

(FUNCTION): AbC + ABc + ABC + aBC	Function Entry Window
(Don't_Care): abc + ABc	
Minterm entered twice	Error! Message Window

Figure (4) Example W.3

## CONCLUSION

With the combination of logic programming and combinational logic circuit design field, a very good Prolog programming module for SOP logic function representation and or description has been developed.

The SOP-M interface plays a vital role at the highest level in the logic design hierarchy, where the designer begin by describing the desired behavior as logic functions.

The logic designer interact via different windows viz. (i) choose the logic function entry in a symbolic form, with help notes if needed and, (ii) powerful error detector if any errors occur or done by the designer during the function entry, in addition,(iii) the manipulation of the logic function minterms & (don't cares if any) and finally(iv) asserting the translated logic function in the working memory as design facts to be managed in the next design level.

## REFERENCES

1. Clocksin WF.(1987) "Logic Programming and Digital Circuit Analysis", Journal of Logic Programming, 4(1): 59-82.
2. Clocksin WF and Mellish CS.(2003) "Programming in Polog", Spriger-Verlag,Berline, NewYork.
3. Max B. (2005) "Logic Programming with Prolog", Springer-Verlag, British Library:122-141
4. Paul T, Brenda L.(2007) "A Logic Programming Framework for Combinational Circuit Synthesis", 23rd International Conference on Logic Programming (ICLP), LNCS 4670, 180-194.
5. Sajjan G Sh.(1990) "Combinational Logic Synthesis From an HDL



Description", 17th Design Automation Conference: 550-555.

6. Wakerly J. (2000) "Digital Design", 3rd Edition, Prentice Hall, Englewood's Cliff, NJ:96-106

7. Parg K L(2007) "Principles of Modern Digital Design", John Wiley & Sons:420-428

## Training Artificial Neural Network using Back-Propagation & Particle Swarm Optimization for Image Skin Diseases

Hanan A R. Akkar & Samem A. Salman

Dept. of Electrical and electronic Engineering, University of Technology- Baghdad-Iraq

E-mail: hnn\_aaa@yahoo.com

### ABSTRACT

This work is devoted to compression Image Skin Diseases by using Discrete Wavelet Transform (DWT) and training Feed-Forward Neural Networks (FNN) by using Particle Swarm Optimization and compares it with Back -Propagation neural networks in terms of convergence rate and accuracy of results, to determine the efficiency of PSO that is applied in FNN compared to Back-Propagation neural network for Training ANN to Images Skin Diseases .The comparison between the two techniques will be mentioned. A MATLAB 6.5 program is used in simulation. using Particle Swarm Optimization (PSO) and Back-Propagation (BP) algorithms is proposed as follows:

1- The proposed structure of neural network that performs three compressions Images Skin training by Back-Propagation algorithms with log sigmoid activation function, and three neurons in output layer.

2- The proposed structure of Feed- Forward neural network using Particle Swarm Optimization that performs three compressions Image Skin with hardlim activation function, and three neurons in output layer.

The results obtained using PSO are compared to those obtained using Back-Propagation algorithm (BP). Learning iterations (602-4700 epoch), error convergence ( $10^{-7}$ ), convergence time (1sec.- 100 sec.), number of initial weights (1set - 75set), number of derivatives (0 - 38 derivatives) and accuracy (60% - 100%) used as performance measurements. The validity of each proposed neural network and operation has been verified by simulation using MATALAB 6.5. The obtained Mean Square Error (MSE) is  $10^{-7}$  to check the performance of algorithms. The results of the proposed neural networks performed indicate that particle swarm optimization can be a superior training algorithm for neural networks, which is consistent with other research in the area.

### الخلاصة باللغة العربية

هذا العمل مكرس لدراسة ضغط صور لأمراض الجلد بواسطة استخدام (DWT) ثم بعد تحويلها الى صورة ذات ابعاد (8×8) يتم تدريبها بواسطة الشبكة العصبية الاصطناعية باستخدام (BP) الانتشار العكسي وكذلك استخدام (PSO) أمثلية الحشد الجزيئي تم مقارنة النتائج التي وجدها باستخدام كلتا الطريقتين من حيث (الدقة - عدد hidden layer - الزمن - الأوزان - عدد التكرار للتدريب) .

تم اقتراح مجموعه من تصاميم الشبكات العصبية الاصطناعية التي تنفذ عدد من صور أمراض الجلد وهي كما يلي :-

1- التصميم المقترح للشبكة العصبية الاصطناعية التي تنفذ ثلاثة صور من أمراض الجلد بواسطة ( Back-Propagation الانتشار العكسي).

2- التصميم المقترح للشبكة العصبية الاصطناعية التي تنفذ ثلاثة صور من أمراض الجلد بواسطة ( Particle Swarm Optimization ) أمثلية الحشد الجزيئي .

وبمقارنة النتائج التي ظهرت باستخدام خوارزمية PSO المقترحة مع تلك النتائج التي ظهرت باستخدام خوارزمية الانتشار العكسي وهي (( التكرار ( 602-4700 دورة ) ، التقارب (  $10^{-7}$  ) ، الزمن ( اثنائية الى 100 ثنائية ) ، عدد الأوزان الإبتدائية ( 1 مجموعة الى 75 مجموعة ) ، عدد المشتقات ( 0 الى 38 مشتقة ) والدقة ( 60% الى 100% ) ) استخدمت كمقاييس للمقارنة . و بمحاكاة هذه التصاميم المقترحة وتقييمها باستخدام MATLAB 7.0 . وبمعدل مربع الخطأ  $10^{-7}$  وجدت أن نتائج الشبكات العصبية الاصطناعية المقترحة بواسطة أفضل خوارزمية لتدريب الشبكات العصبية الاصطناعية والتي تطابق البحث في هذا المجال من حيث السرعة ، الدقة و الكفاءة .

## INTRODUCTION

### A. Artificial Neural Network (ANN)

An Artificial Neuron AN is a model of biological neuron, where each AN receives signals from the environment or other ANs, gathers these signals applying some activation function to the signals sum, and when fired transmits signal to all connected neurons. Input signals are inhibited or excited through positive or negative numerical weights associated with each connection to AN, the firing of the AN and the strength of the exciting signal are controlled via a function referred to as activation function. The AN collects all incoming signals and computes a net input signal as a function of the respective weights. The net input serves to the activation function which calculated the output signal of the AN. An ANN is a layered network of artificial neurons. ANN may consist of input, hidden and output layers. ANs in one layer are connected fully or partially to the ANs in the next layer [1].

$$N_i(x_1, x_2, \dots, x_m) = a_i(\sum_j w_{ji} x_j) \quad (1)$$

Where  $x_j$  is the input signal,  $w_{ji}$  is the weight,  $a_j$  is the activation function and  $b_j$  bias weight.

There are several methods of training ANN back-propagation is by far the most common. In this research PSO are supposed as the best training algorithm to our application.

### B. Back-Propagation Algorithm (BP)

The Back-Propagation (BP) algorithm was proposed in 1986 by Rumelhart, Hinton and Williams for setting weights and hence for the training of Multi-Layer Perceptrons (MLP) [2]. The BP algorithm propagates backward the error between the desired signal and the network output through the network. After providing an input pattern, the output of the network is then compared with a given target pattern and the error of each output unit calculated. This error signal is propagated backward, and a closed-loop control system is thus established. The weights can be adjusted by a gradient-descent-based algorithm. In order to implement the BP algorithm, a continuous, nonlinear, monotonically increasing, differentiable activation function is required. The two most-used activation functions are the logistic

function equation (2) and the hyperbolic tangent function equation (3), and both are sigmoid functions [3].

$$F(\text{net}) = \frac{1}{1 + e^{-\text{net}}} \quad (2)$$

$$F(\text{net}) = \frac{e^{\text{net}} - e^{-\text{net}}}{e^{\text{net}} + e^{-\text{net}}} \quad (3)$$

$F(\text{net})$  Represent the actual output

The Back-Propagation (BP) algorithm to compute weights of neurons may tend to instability under certain operation conditions. To reduce the tendency to instability, Rumelhart

in (1986) suggested to add a momentum

term  $\alpha$ ,  $\alpha$  is the

momentum coefficient in the range of ( $0 < \alpha < 1$ , usually around 0.9). The employment of  $\alpha$  will tend to avoid fast fluctuations, but it may not always work, or could even harm convergence [2]. Another parameter suggested improving learning process, it is a learning rate  $\eta$ . Weight changes in

back propagation are proportional to the negative gradient of the error. This guideline determines the relative changes that must occur in different weights when a training pattern is presented. But, it does not fix the exact magnitudes of the desired weight changes. These magnitude changes are dependent on the learning rate. A large learning rate leads to rapid learning but the weights may oscillate, while lower learning lead to slower learning [4].

### C. Particle Swarm Optimization (PSO)

Particle swarm optimization is a population based evaluation optimization technique developed by J. Kennedy and R. Eberhart in 1995 motivated by the social behavior of bird flocking or fish schooling [5].

PSO is a kind of random search algorithm that simulates nature evolutionary process

and performs good characteristic in solving some difficult optimization problems. The basic concept of PSO comes from a large number of birds flying randomly and looking for food together. Each bird is an individual and called a particle. As the birds looking for food, the particles fly in a multidimensional search space looking for the optimal solution. Here all the particles are composed of a family rather than the isolated individual for each other; they can remember their own flying experience and share their companion's flying experience [6].

The basic PSO model consists of swarm of particles moving in a D-dimensional search space the direction and distance of each particle in the hyper dimensional space is resolute by its fitness and velocity. In general the fitness is primarily related with the optimization objective and velocity is updated according to a sophisticated rule [7].

In PSO, populations starts with random initialization of individuals in the search space and then repeat the social behavior of the particles in the swarm till achieves the best possible result by iterative searching. At each iterative step the velocity (position change) is updated and the particle is moved towards a new position. The best previously visited position at the  $n^{\text{th}}$  particle is denoted by the personal best position  $p_{\text{best}}$ , while the position of the best individuals of the whole swarms is denoted as the global best position  $g_{\text{best}}$ . In other words, the particle swarm optimization idea consists of at each time step, changing the velocity and location of each

$$V_{id} = W \cdot V_i + C_1 \cdot \text{rand1} \cdot (P_{id} - X_{id}) + C_2 \cdot \text{rand2} \cdot (P_{gd} - X_{id}), \quad (4)$$

$$X_{id} = X_{id} + V_{id} \quad (5)$$

Where  $W$  is the inertia weight which bring stability between global exploration and local exploration,  $C_1$  and  $C_2$  are two constants called learning factors [8],  $\text{rand1}$  and  $\text{rand2}$  are two independent random numbers uniformly spread in the range of  $[0, 1]$ , for (4) the first part represents the inertia of previous velocity; the second part is the cognition part which represents the private thinking by itself; the third part is the social part, which represents the assistance among the particles [9].  $P_{id}$  represent personal best position recorded by particle  $i$  and  $P_{gd}$  is the global position and  $d$  is the index of dimension in the

search space.

During the past few years PSO has been shown successful for many applications [10- 12] several papers discuss how to apply PSO in training NNs and their advantages [13- 15].

#### D. Wavelet Transforms (WT)

Wavelets are functions which allow data analysis of signals or images, according to scales or resolutions. The processing of signals by wavelet algorithms in fact works much the same way the human eye does; or the way a digital camera processes visual scales of resolutions, and intermediate details. But the same principle also captures cell phone signals, and even digitized color images used in medicine. Wavelets are of real use in these areas, for example in approximating data with sharp discontinuities such as choppy signals, or pictures with lots of edges.

While wavelets is perhaps a chapter in function theory, we show that the algorithms that result are key to the processing of numbers, or more precisely of digitized information, signals, time series, still-images, movies, color images, etc. Thus, applications of the wavelet idea include big parts of signal and image processing, data compression, fingerprint encoding, and many other fields of science and engineering [17].

In this work, we will briefly discuss image compression, the nature of wavelets, and some of the salient features of image compression technologies using wavelets. Since this is a very rapidly evolving field, only the basic elements are presented show in figures (1), (2) & (3)

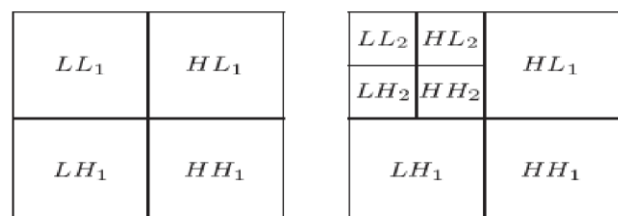


Figure (1) Two -Level DWT Decomposition

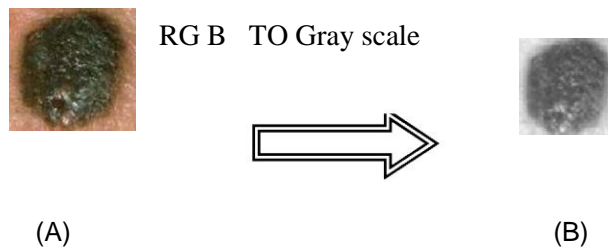


Figure (2). (A) Original S quamous Cell Carcinoma (SCC) ( RGB JPGE).  
(B) Compression Image Squamous Cell Carcinoma Grayscale- 8X8 pixels.

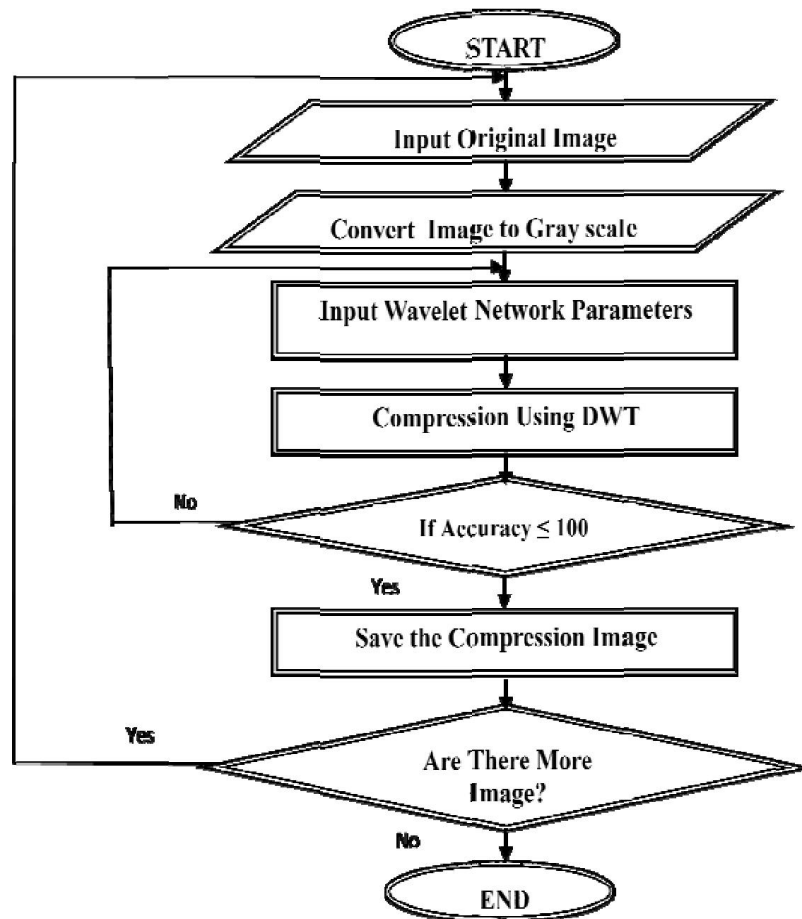


Figure (3) Flowchart of Compression Images using DWT

## 2. THEORY DESCRIPTION

There has been a significant increase in research and development in the area of applying Evolutionary Computation (EC) techniques for the purposes of evolving one or more aspects of artificial neural networks. These EC techniques have usually been used to evolve neural network weights, but sometimes have been used to evolve network structure or the network learning algorithm [18].

The first applications of PSO involved accelerating the evaluation of the transfer functions in neural networks. This phase is often called training when the network itself modifies according to data provided gradually to entries and to the expected results, it is called training because the evaluations are imposed by a third party, in fact, precisely, by PSO [19]. A new learning algorithm combined Artificial Neural Networks (ANN) was proposed to determine the optimal weights. The weights of the Artificial Neural Networks (ANN) are adjusted by Particle Swarm Optimization (PSO). Because PSO has the probabilistic mechanism and multi-starting points, hence the PSO can avoid getting into the local optimal solutions [20]. Numerous studies have further explored the power of PSO as a training algorithm for a number of different NN architectures. Studies have also shown for specific applications that NNs trained using PSO provide more accurate results [21]. In order to train Feed-Forward Neural Network (FNN) by using Particle Swarm Optimization (PSO) and compare the performance with Back-propagation algorithm (BP), the following steps have been followed show in figure(4):

- a) Determine training image.
- b) Define neural network architecture.
- c) Determine network parameters.
- d) Run FNNPSO program.
- e) Run FNNBP program.
- f) Comparison and analysis.

The first real implementation of the particle swarm algorithm was a model that

bridges psychological theory and engineering applications. The Feed-Forward artificial neural network is a statistical model of cognition that inputs vectors of independent variables and outputs estimates of vectors of dependent variables. The network is structured as a set of weights, usually arranged in layers, and the optimization problem is to find values for the weights that make the mapping with minimal error [18].

For the purpose of NN learning, the empirical error in equation (6) is referred to as the objective function to be optimized by the optimization method. Several optimization algorithms for training NNs have been developed. These algorithms are grouped into two classes [21]:

- *Local optimization*, where the algorithm may get stuck in a local optimum without finding a global optimum. Back-propagation algorithm is an example of local optimizers.
- *Global optimization*, where the algorithm searches for the global optimum by employing mechanisms to search larger

velocity update equation (4) to produce new parts of the search space. Global value for positions adjustment to the best Optimizers include evolutionary solution or targeted learning error. The algorithms and Particle Swarm new sets of positions (NN weight and optimization.

bias) are produced by adding the In order to use PSO to train an NN, a suitable calculated velocity value, equation (4), to representation and fitness function needs to the current position value using movement be found. Since the objective is to minimize equation (5). Then that new set of the error function, the fitness function is positions is used for producing new simply the given error function (e.g. the MSE learning error (particle fitness) in Feed-forward given in equation (6)). Each particle Forward neural network. represents a candidate solution to the optimization problem, and since the weights

### 3. THE PROPOSED DESIGN OF Training ANN using BP& PSO for Image Skin Diseases

The objective of this thesis was to develop a Back-Propagation (BP) neural network (ANN) and particle swarm optimization (PSO) neural network model that could training three images skin diseases. Although only the colour indices associated with image pixels were used as inputs, it was assumed that the ANN model could develop the ability to use other information, such as shapes, implicit in these data. The type of images skin diseases were RGB (128 × 128 pixel). Images were taken to compression that used Wavelet Transform (WT). The first part convert image from RGB (128 × 128 pixel) to Gray scale (128 × 128 pixel).

After convert image to Gray scale (128 × 128 pixel) get in to DWT that convert image Gray scale (128 × 128 pixel) to Gray scale (8 × 8 pixel) that was become input data to input layer networks of particle swarm optimization (PSO) neural network or Back-Propagation (BP) neural network. A neural network is composed of a series of interconnected nodes and the corresponding weights between them. It aims at simulating the complex mapping between the input and output. A 3-layer feed forward ANN basically consists of input units, hidden units and output units. Let  $w_{ih}$  denotes the weight between the input node and the hidden one. Likewise,  $w_{ho}$  denotes the weight between the hidden node and output one. ANN is characterized by the ability of self learning

of a trained NN are a solution, a single particle represents one complete network. Each component of a particle's position vector represents one NN weight or bias, using this representation [21].

A particle represents the weight vector of NN, including all biases. The dimension of the search space is therefore the total number of weights and biases. The fitness function is the Mean Squared Error (MSE) over the training set as in equation (6) [22]. Changing the position means updating the weight of the network in order to reduce the error. All the particles update their position by calculating the new velocity, which they use to move each particle to the new position. The new position is a set of new weights used to obtain the new error. For PSO, the new weights are adapted even though no improvement is observed. This process is repeated for all the particles. The particle with the lowest error is considered as the global best particle so far. The training process continues until satisfactory error is achieved by the best particle or computational limits are exceeded. When the training ends, the weights are used to calculate the classification error for the training patterns. The same set of weights is used then to test the network using the test patterns. There is no back-propagation concept in FNNPSO, where the Feed-Forward NN produced the learning error (particle fitness) based on set of weight and bias (PSO positions). The  $P_{best}$  value (each particle's lowest learning error so far) and  $G_{best}$  value (lowest learning error found in entire learning process so far) are applied to the

**Table (1):** comparison and analysis framework of the Study Training ANN Using PSO & BP.

Training FNN by using BP	Training FNN by using PSO
Determine training image	Determine training image
Define FNN architecture	Define FNN architecture
Determine FNN and BP parameters	Determine FNN and PSO parameters
Run BP and start training	Run PSO and start training
Weight adjustment using BP	Weight adjustment using PSO

and error toleration. With the appropriate activation functions and trained weights, ANN can approximate any smooth, nonlinear function or relationship between the input and output. The training process is carried out on a set of data including input and output parameters. Usually, the data are split into two parts namely training samples and testing samples.

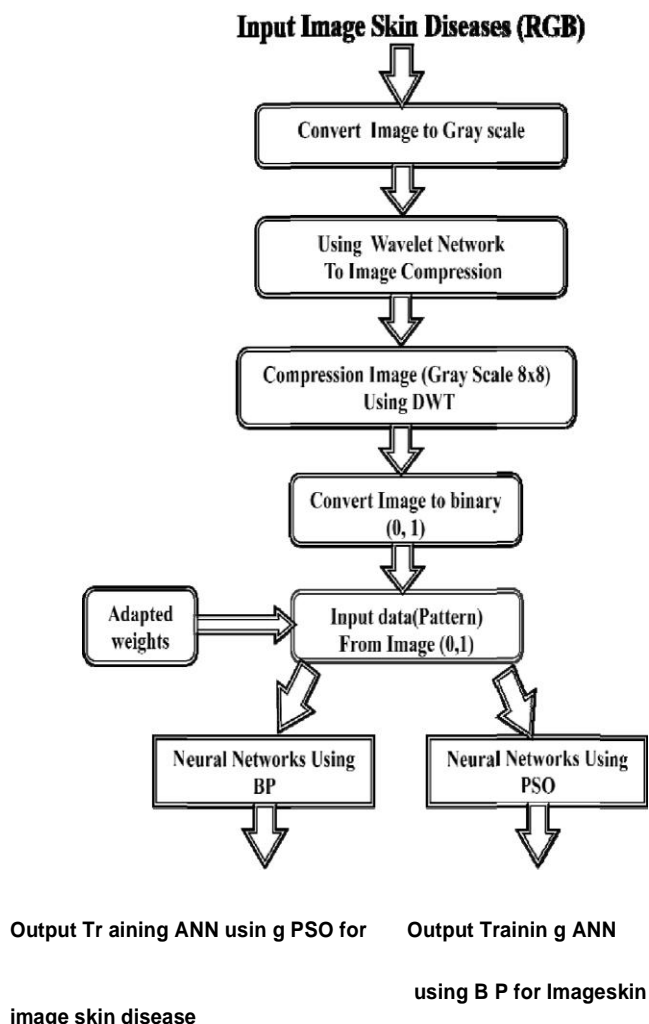
The learning procedure is based on the training samples and the testing samples are used to verify the performance of the trained network. During the training, the weights in the network are adjusted iteratively till a desired error depicted as equation (3.1) is obtained.

$$E = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (y_{ik} - y_{jk})^2 \quad (7)$$

Where,  $y_{ik}$  and  $y_{jk}$  represents the actual and the predicted function values respectively,  $m$  is the number of training samples, and  $n$  is the number of output nodes. The neural network is trained by minimizing the above error function in a search space based on weights. PSO generates possible solutions and measure their quality by using a forward propagation through the neural network to obtain the value of the error function. This error value is used as the particle's fitness function to direct it toward the more promising solution. The global best particle is corresponded to the desired trained network after adequate iterations.

For the purpose of NN implementation of training image. The MATLAB PSO tools are modified to be suitable with this application.

The Modified PSO will give the exact integer weight needed for the training of the network, where the modified PSO algorithm will search the optimum weights in an integer search space only, thus it takes less effort and time finding the optimum weights, minimizing the error to zero which means 100% percent accuracy obtained. These integer weights will be restricted between minimum integers values needed for the training process based on trial and error show in figures (5), (6)&(7) and table (1)



**Figure (5)** A block diagram training ANN using BP & PSO for Image Skin diseases



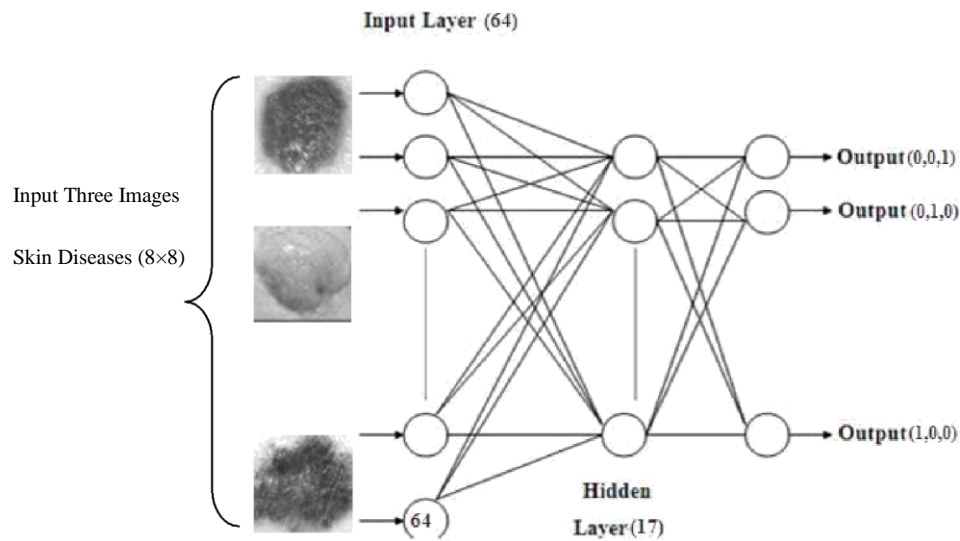


Figure (6) Training ANN Using BP Three Images Skin Disease

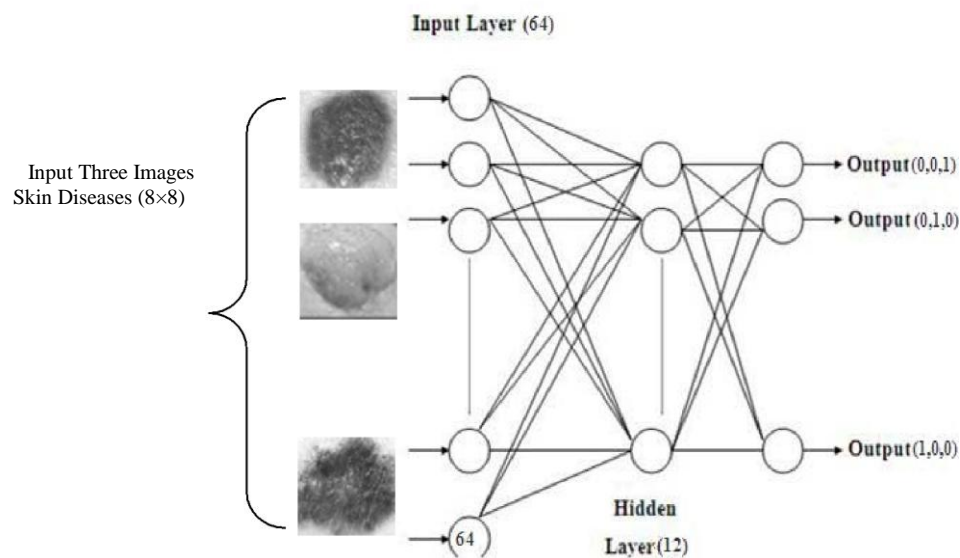


Figure (7) Training ANN Using PSO Three Images Skin Diseases

network are compared and analyzed based on the convergence rate and the accuracy of results. A MATLAB program is used to implement the simulation. This PSO tools implementing Common, Clerc 1 and Trelea types along with an alpha version of tracking changing environment.

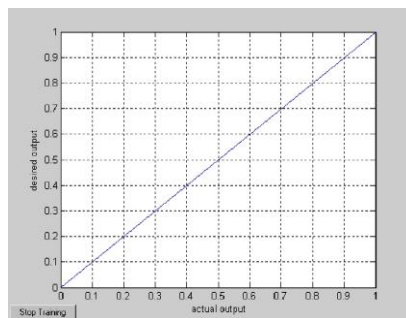
### The Experimental Results

In this work, used two programs have been developed which are Feed-Forward Neural Network Particle Swarm Optimization (FNNPSO) and Feed-Forward Neural Network Back-Propagation algorithm (FNNBP) for training (One, Two and Three) Images Skin Diseases.

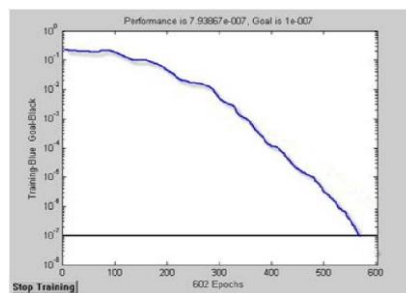
The results for each neural

takes 4.4380 seconds at iteration 602 for overall learning process. Both algorithms converged using the minimum error criteria. For the correct accuracy percentage, it shows that FNNPSO result is better than FNNBP with 100% compared with 97.5% show in figure (8) & (9).

**A**



**B**



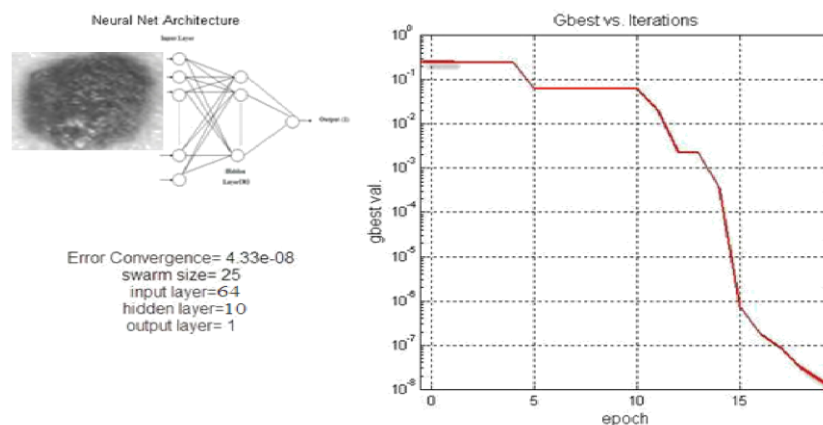
#### 4.1 Simulation Results of One Image Skin Diseases using FNN-BP and PSO

In table (2), The results show that FNNPSO convergence time depends on the swarm size and search space, so that, sometimes is fast and another times is slow depending on the initial weights, which are randomly generated in search space, these initial weights are changed over entire the search space when the run of program is repeated. Thus different convergence time is carried out for each run. Now for image diseases test. The convergence time for FNN learning based on PSO algorithm is 10 seconds at 20 iterations, compared with FNNBP, where it

Table (2) Results of FNNPSO and FNNBP on One Image Diseases.

FNNBP	FNNPSO	Results
602	20	Learning Iterations
7.93819e-07	4.33e-08	Error Convergence
4.4380 sec	10 sec	Convergence Time
97.5	100	Accuracy (%)

Figure (8) (A) The Training FNNBP for One Image Skin Diseases. (B) The relationship between desired and actual output.



(A) Error against iterations

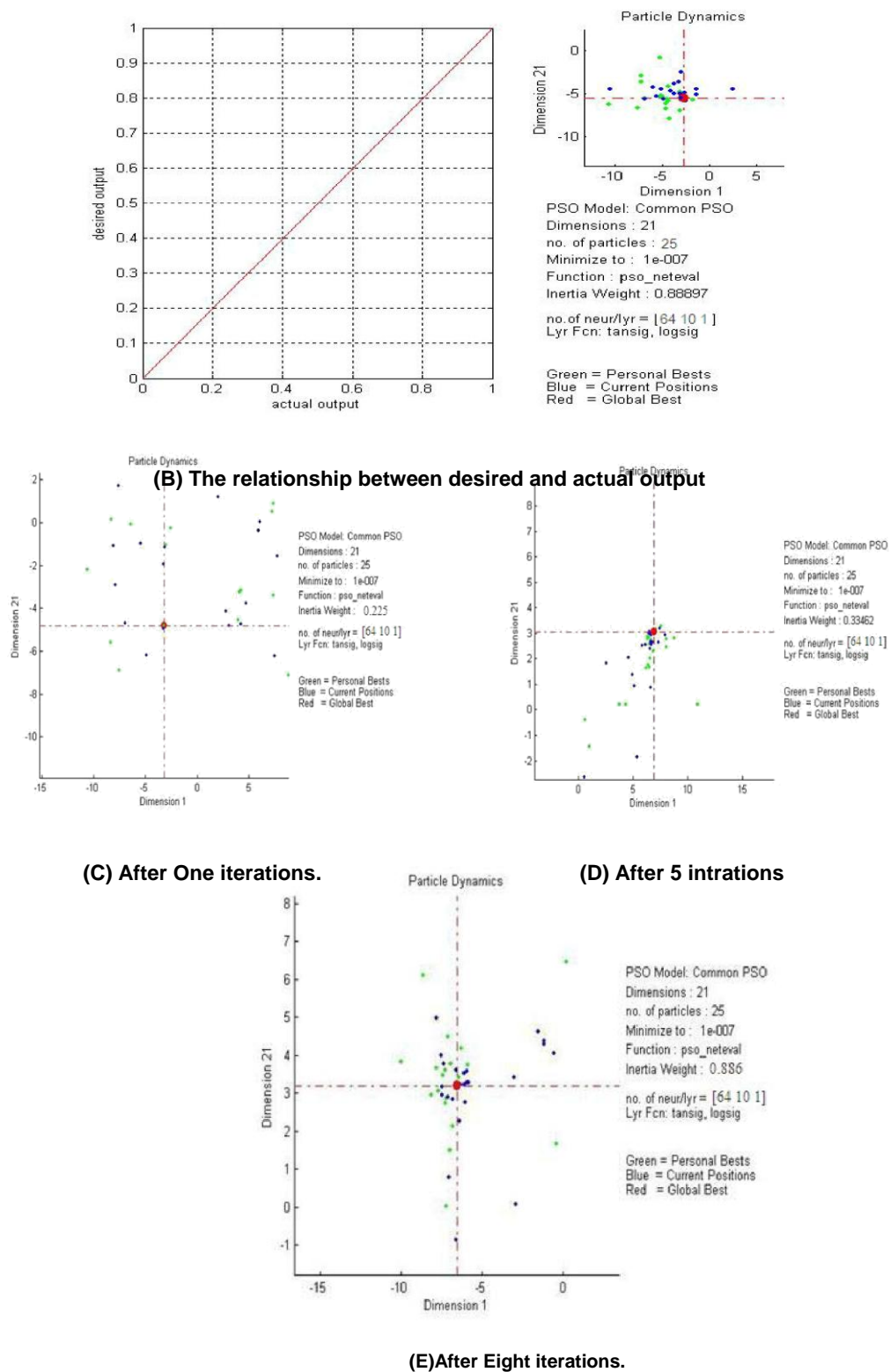


Figure (9) The Accuracy of Performance for FNNPSO for One Image Skin Diseases.

- (A) Error against iterations.
- (B) The relationship between desired and actual output.
- (C) After One iterations.
- (D) After Five iterations.
- (E) After Eight iterations.

Table (3) Results of FNNPSO and FNNBP on Two Image Skin Diseases.

FNNBP	FNNPSO	Results
1000	1800	Learning Iterations
8.43268e-05	1.3201-08	Error Convergence
12.130 sec	30.562 sec	Convergence Time
85.5	100	Accuracy (%)

for each bit and comparison with Pbest). Both algorithms are converged using the minimum error criteria. For the correct accuracy percentage, it shows that FNNPSO result is better than FNNBP with 100% compared to 85.5% but FNNBP convergence time is faster at 1000 iterations compared with 1800 iterations in FNNPSO show in figure (10) & (11).

#### 4.2 Simulation Results of two Image Skin Diseases using FNN-BP and PSO

From Table (3), the results show that FNNPSO convergence time is slow, where it takes 30562sec at 1800 iterations compared with FNNBP, where it takes 12.130 sec at iteration 1000 for overall learning process.

Because the number of fitness evaluation (calculate minimum error

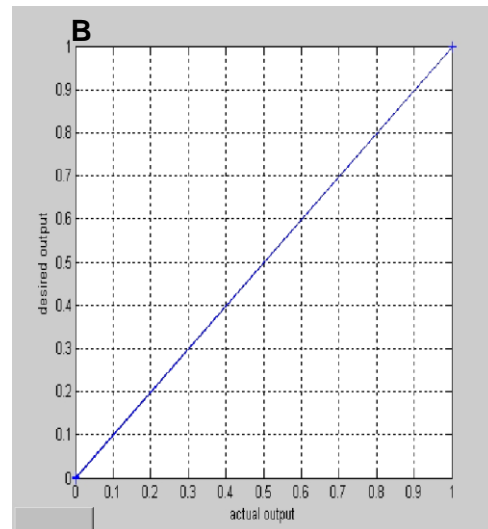
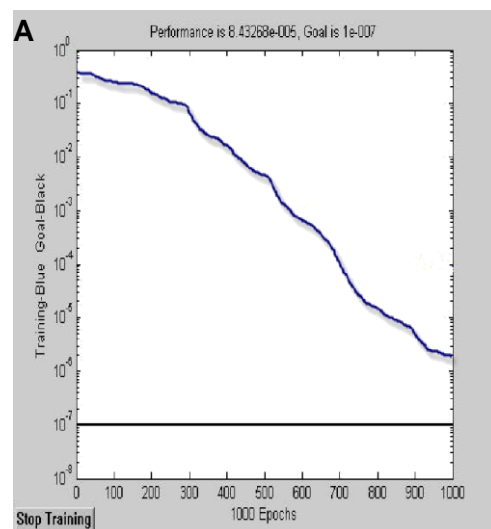
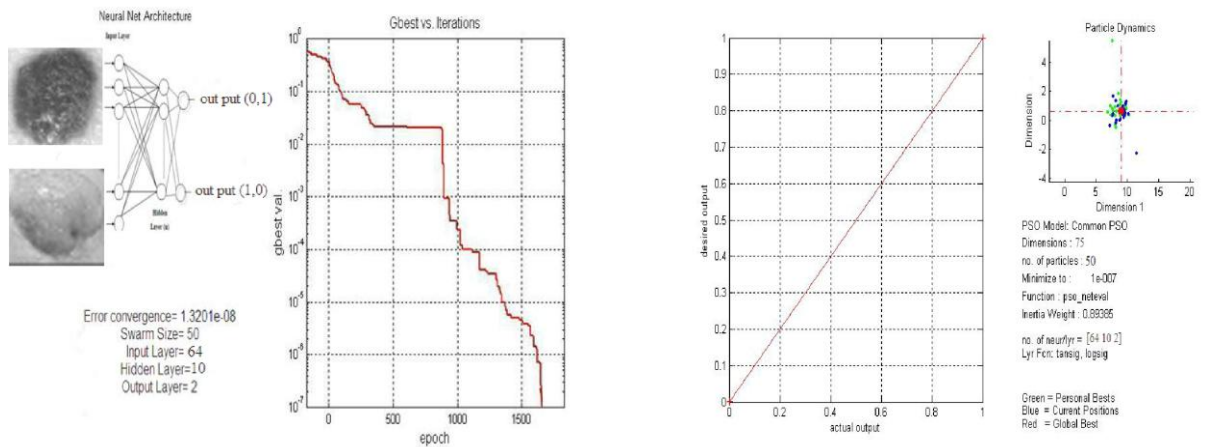
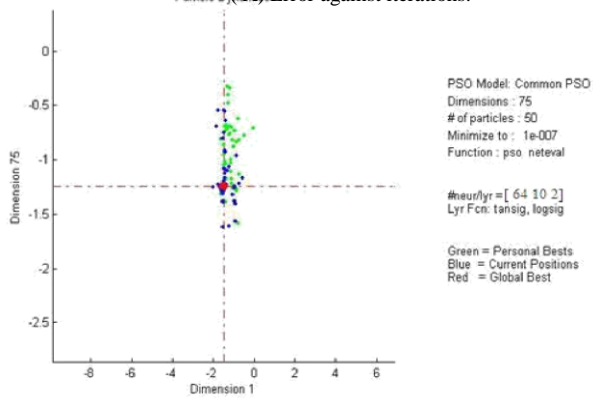


Figure (10) (A) The Training FNNBP for Two Image Diseases.  
(B) The relationship between desired and actual output

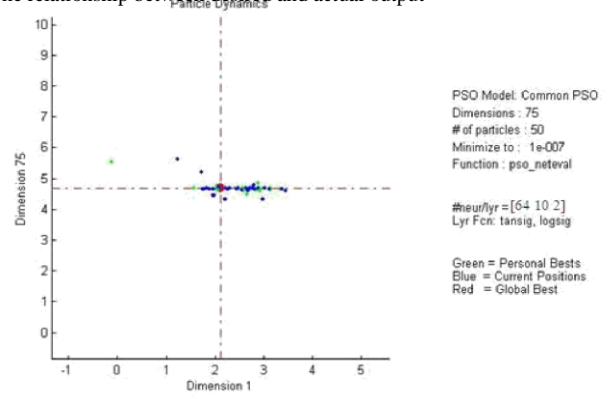


(A) Error against iterations.

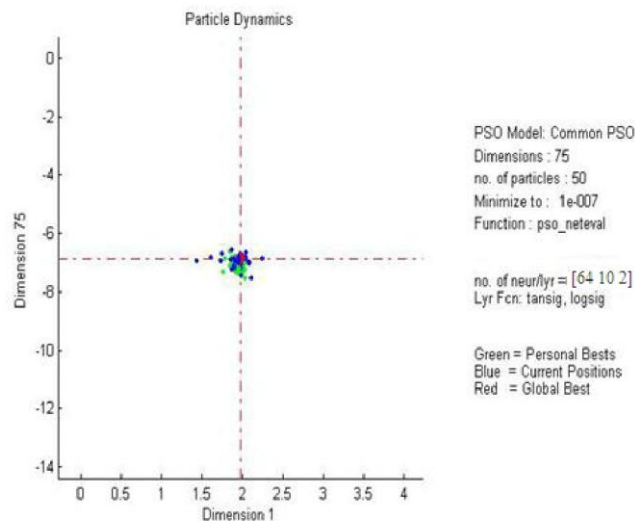
(B) The relationship between desired and actual output



(C) After 100 iteration.



(D) After 1000 iterations.



(E) After 1700 iterations.

Figure (11) The Accuracy of Performance for FNNPSO for Two Image Skin Diseases.

- (A) Error against iterations.
- (B) The relationship between desired and actual output.
- (C) After 100 iteration.
- (D) After 1000 iterations.

(E) After 1700 iterations.

weights (position) and also reduces the problem dimension.

In this work, there are several times that FNNPSO runs with reduced number of hidden nodes, and the results have proven that the learning becomes faster. However, to have fair comparison, Kolmogorov theorem is chosen in this work and both algorithms need to use the same network architecture. Choosing FNNPSO parameters also depend on the problem and pattern to be optimized. This parameter can be adjusted to achieve better optimization. But to have better comparison in this study, the same parameters for all patterns have been used. For FNNBP, learning rate and momentum rate are the same for all pattern.

The results in Figures (5, 7, and 9) indicate that the Convergence Time and Learning Iterations of Back-Propagation method is suboptimal compared to PSO. The suboptimal Convergence is not as noticeable, by comparison, in the smaller data case.

Conversely, the results in Figures (6, 8, and 10) indicate that PSO algorithm is more robust with more consistent convergence characteristics. Thus, PSO algorithm can be applied to wide-range nonlinear optimization problems with reliable performance. In addition, PSO and similar algorithms do not add a considerable computational burden.

#### 4.3 Simulation Results of three Image Skin Diseases using FNN-BP and PSO

From Table (4), The results show that FNNPSO is the best in terms of accuracy. But the convergence time is slow because the learning process by PSO tries to check all particle positions in search space, which is the best position. Thus the learning process by PSO depends on the swarm size and search space compared to FNNBP, where it takes 38.021sec at iteration 1000 for overall learning process. Both algorithms are converged using the minimum error criteria. For the correct accuracy percentage, it shows that FNNPSO result is better than FNNBP with 100% compared with 60% show in figure (12) & (13).

The experiments are carried out to analyze the optimization algorithm called PSO that is applied on FNN to explore the classification accuracy and convergence time compared to Back-Propagation Neural Network. Based on the results, it is clear that FNNPSO is better than FNNBP in terms of multi-starting points (initial weights), size of search space and accuracy of results. In FNNPSO, network architecture and selection of network parameters for the pattern influence the convergence and the performance of network learning. By reducing the hidden nodes, it minimizes the number of

Table (3) Results of FNNPSO and FNNBP on Three Image Skin Diseases.

FNNBP	FNNPSO	Results
1000	4700	Learning Iterations
0.0197712	2.301e-07	Error Convergence
38.012 sec	60sec	Convergence Time
60%	100	Accuracy (%)

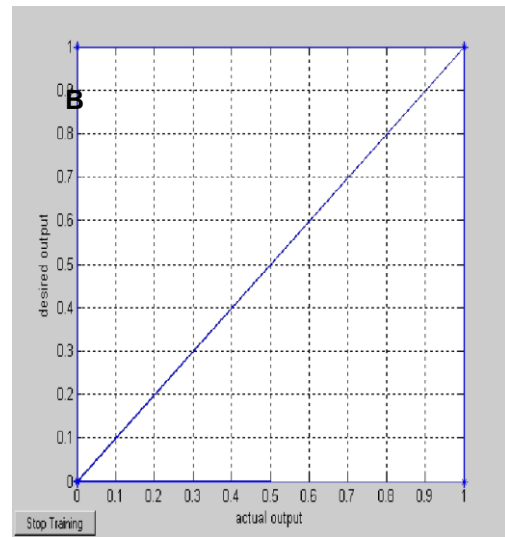
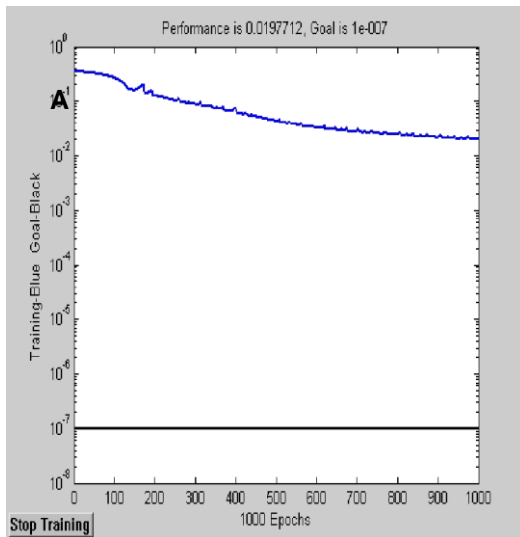
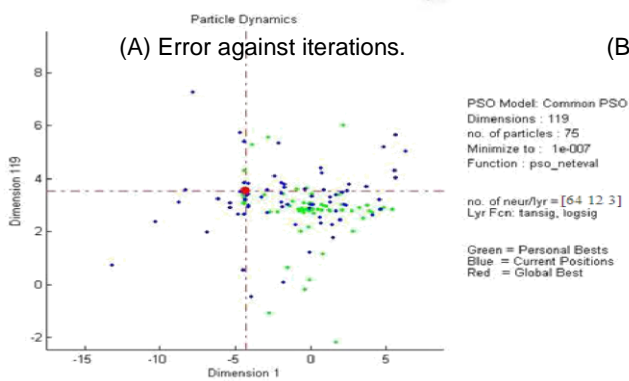
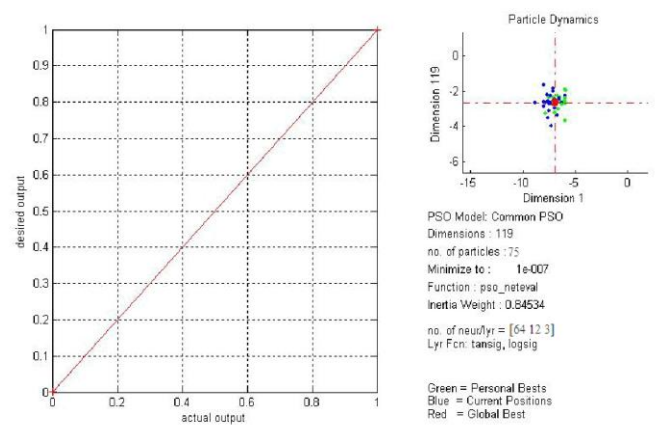
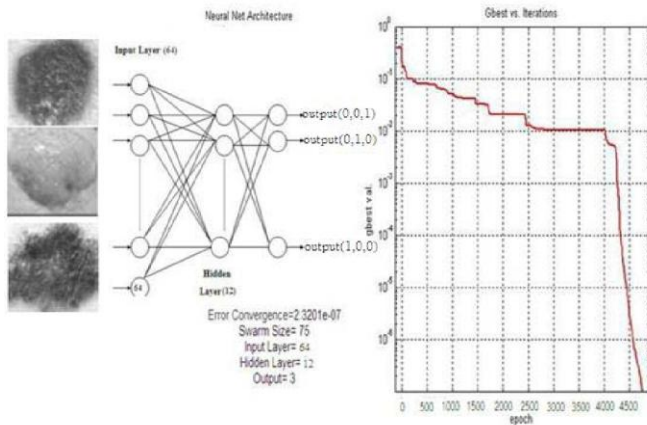
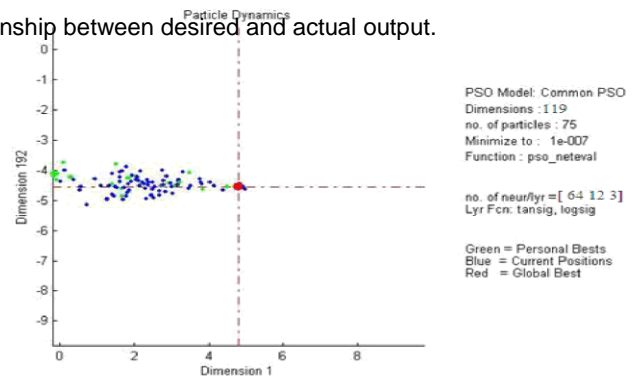


Figure (12) (A) The Training FNNBP for Three Image Diseases.  
(B) The relationship between desired and actual output



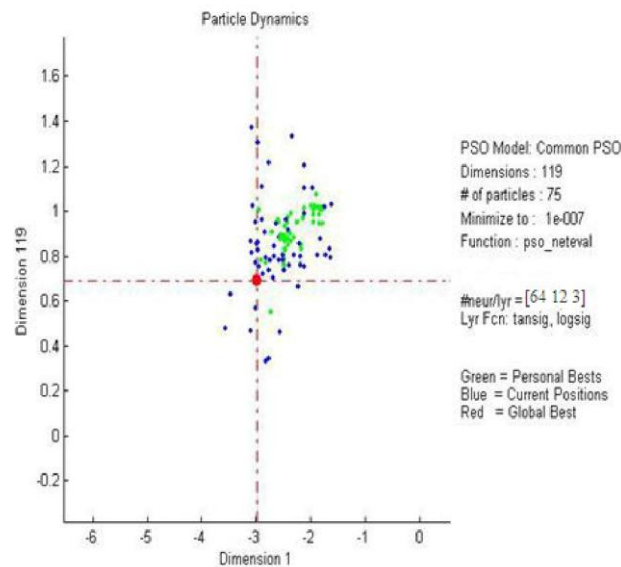
(B) The relationship between desired and actual output.



(C) After 500 iterations.

(D) After 1500 iterations





(E) After 3500 iterations.

Figure (13) The Accuracy of Performance for FNNPSO for Three Image Skin Diseases.

- (A) Error against iterations.
- (B) The relationship between desired and actual output.
- (C) After 500 iteration.
- (D) After 1500 iterations.
- (E) After 3500 iterations.

Images.

5. With parallel search strategy, it can locate the global Optimization Consistently.

6. Its velocity – displacement search model is simple and easy To Implement.

7. Few parameters should be considered and setup.

8. This work was to reduce the number of neurons needed for The training process, and also reduces the single neuron

Complexity by the abstraction of the multiplication Process needed to multiply each input by the corresponding Weight.

9. PSO optimization algorithm was the most suitable training Algorithm required to our application, implementation of Training image skin Diseases using ANN, because of its advantages, specially its free

## CONCLUSION

In this paper, the latest optimization algorithm called PSO is applied in feed forward neural network to improve the neural network learning. PSO is an optimization algorithm based on swarm intelligence. It directs the search through the intelligence generated from cooperation and competition among the individuals. The merits of this proposed algorithm can be summarized as follows:

1. Used DWT to compression image (8×8) .
2. Neural Network is very fast detections because the Topology of this Neural Network and the input values from Features extraction stage.
3. Training ANN Using PSO and back propagation for Image Skin Diseases.
4. Min and Max particle couldn't be used to discriminate Between Skins



6. Wang L, Wang X, Fu J, and Zhen L(2008) A Novel Probability Binary Partical Swarm Optimization Algorithm and its Application", *Academy publisher, Journal of software, China*, 3( 9): 56-64
7. Xie X, Zhang W and Yang Z(2002) Adaptive Particle Swarm Optimization on Individual Level, *IEEE International Conference on Signal Processing (ICSP)*, China, 1215-1218.
8. Eberhart R, and Shi Y (2001) Particle Swarm Optimization: Developments, Applications and Resources", *IEEE Int. Conf. on Evolutionary Computation*, 81-86
9. Kennedy J (1997) The Particle Swarm: Social Adaptation of knowledg, *IEEE Int. Conf. on Evolutionary Computation*,303-308
10. Gudise VC, and Venayagamoorthy GK (2004) FPGA Placement and Routing Using Particle Swarm Optimization. *IEEE ,Computer Society Annual Symposium on VLSI Emerging Trends in VLSI Systems Design*:125-128
11. Kendall G and Su Y(2005) A Particle Swarm Optimization Approach in the Construction of Optimal Risky Portfolios", *Proceedings of a 23<sup>rd</sup> IASTED International Multi-Conference Artificial Intelligence and Applications, Australia*, 140-145
12. Chandramouli K and Izquierdo E (2006) Image Classification using Chaotic Particle Swarm Optimization", *IEEE. ICIP*, 3001-3004
13. Gudise VG and Venayagamoorthy GK (2003) Comparison of Particle Swarm Optimization and Backpropagation as Training Algorithms for Neural Networks, *IEEE Symposium on Swarm Intelligence, USA*: 110-117

derivative activation function and multi starting points.

10. NNs are trained by minimizing the mean square error function in search space based on weights. PSO generates possible solutions and measure their quality by using a forward propagation through the NN to obtain the value of error function (minimized error to zero). This error value is used as the particle's fitness function to direct it towards more promising solution. The global best particle corresponded to the desired trained after adequate iterations. The result of training Feed-Forward NN using PSO has shown that PSO is an efficient alternative to feed forward NN ordinary training algorithms like Back-Propagation. Results have shown also that PSO training algorithm has more accurate results than other training algorithms.

MATLAB modified PSO toolbox was used in the training of the ANNs minimum weights required to get the higher accuracy 100%) is calculated using trial and error method.

## REFERENCES

1. Engelbrecht,AP (2007) Computational Intelligence: An Introduction, *John Wiley & Sons Ltd, South Aferica*
2. Graupe D (2007) Principle of Artificial Neural Networks, *World Scientific Publishing Co. Pte. Lte.,*
3. Du KL, Swamy MN. (2006) *Neural Network in Soft Computing, Springer – Verlag*
4. Chen J (2005) *Neural Network Applications in Agriculture Economics. Jianhua Chen*:212-262
5. Kennedy J and Eberhart R (1995) Particle Swarm Optimization", *IEEE Int Conf. on Neural Networks, Australia*, 1942-1948

18. Venayagamoorthy GK, Harley RG (2007) *Swarm Intelligence for Transmission System Control*, IEEE, 110-119
19. Clerc M (2006) *Particle Swarm Optimization*, ISTE Ltd.92-97
20. Meissner M, Schmuker M, and Schnieder G (2006) *Optimized Particle Swarm Optimization (OPSO) and Its Application to Artificial Neural Network* BMC Bioinformatics.7(125), 1471-2105.
21. Engelbrecht AP (2007) *Computational Intelligence, an Introduction*, John Wiley & Sons Ltd.,48-51
22. BIN Abdull Hamed HN (2006) *Particle Swarm Optimization for Neural Network Learning Enhancement*. Master Thesis, University of Technology, Malaysia:33-38
14. Cui Z, Zeng J, Sun G (2006) A Fast Particle Swarm Optimization. Int. J. Innovative Computing-Information and Control, 2(6):76-81
15. Zha W, Venayagamoorthy GK (2005) Neural Networks Based Non Uniform Scalar Quantizer Design with Particle Swarm Optimization. IEEE Transactions:23-29
16. Zhang J , Lok T and Lyu Y (2007) A hybrid Particle Swarm Optimization Back-Propagation Algorithm for Feedforward Neural Network Training. Applied Mathematics and Computation 185, 1026-1037
17. Hung-Quoc L, Steven T (2004) ENEE631 Digital Image Processing: Wavelet-Based Image Compression..Dept. of Electrical and Computer Engineering, University of Maryland

## Assessment of Wastewater Treatment Plants Performance and Reuse Opportunities

**Laila Al-Khatib & Feras Fraige**

*Faculty of Engineering, Al-Hussein Bin Talal University- Jordan*

*E-mail: laila@ahu.edu.jo*

### **ABSTRACT**

Jordan suffers from increasing water shortage due to normal and forced population growth, very limited resources, and irregular rainfall. This indicates the importance of finding new resources. Wastewater emerges as a potential resource. However, to safely reuse the reclaimed wastewater, effluent water should conform to standards and guidelines for possible reuse options. In this work, characterizations of influent and effluent wastewater from four wastewater treatment plants in Jordan were evaluated in terms of: BOD<sub>5</sub>, COD, TSS, TDS, E.Coli, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, DO, turbidity, and pH. The quality of the treated wastewater was compared with national Jordanian and international WHO standards. The effluent from Wadi Mousa treatment plant complied with Jordanian standard in all reuse purposes, but it did not comply with WHO in toilet flushing. The other plants effluent did not comply with Jordanian standard in ground water recharge, but there was a variation in their compliance with the other applications.

**Keywords:** wastewater quality, reclaimed water, effluent.

## INTRODCUTION

Water shortage is currently one of the biggest concerns of human being worldwide and it becomes a global problem that affects seriously the life of large number of the world population. Water is an essential element for the economic development and political stability and limited water resources are recognized as the most important obstacle to the development of the agricultural and industrial sectors [1]. In order to overcome the increasing shortage in water resources, wastewater (WW) reuse has emerged as an important and viable means of supplementing dwindling water supplies in a large number of regions throughout the world [2]. Practice of wastewater reuse mainly depends on a country's economy, infrastructural status covering wastewater treatment capacity and capability, educational level, climate, water supply, balance between water requirement and demand, intensity of agricultural activities, population, social habits like cultural and religious prejudice, and many other factors [3, 4].

In order to reduce the environmental and health impacts of wastewater reuse, countries have adopted several standards and guidelines. While most of the developed countries have established low risk guidelines or standards based on a high technology/high-cost approach, many developing countries have adopted an approach based on WHO guidelines that refer to low-cost technologies and focus on health risks. However, the current situation in some developing countries is the direct use of untreated wastewater for irrigation without taking

into account the stated guidelines and standards, and associated risks. Jordan suffers from shortage in water supply for domestic, industrial and agricultural purposes. It is considered one of the ten poorest countries of water resources in the world [5]. Jordan is striving to improve the efficiency of water resources use and search for alternatives [6]. The limited fresh water resources in Jordan are estimated at 780 million m<sup>3</sup> per year split between surface and ground water resources. Furthermore the climate has an important role in water shortage in the country. Its climate is arid to semi arid; rainfall is on average 75 mm and ranges between 50mm in the desert region to about 600mm in the eastern mountains adjacent to the Jordan Valley. The total rainfall is about 8.5 billion m<sup>3</sup> of which about 85% is lost due to evaporation with the reminder flowing into valley [5,7-9].

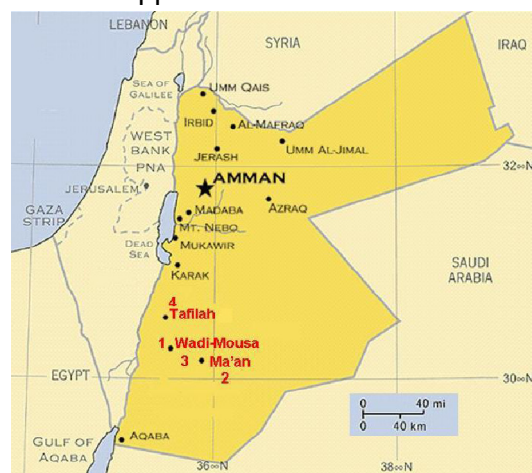
On the other hand, the water demand is ever increasing for different reasons such as the rapid rate of population growth, economic development, rising standard of living, increase agriculture water requirements, and rising share of industrial activity in the economy [10]. So in 1997 the government of Jordan decided as part of its water strategy that wastewater should be considered as a resource. Wastewater should be collected and treated to standards which make its reuse safe in agriculture and other non domestic purposes, such as ground water recharge [11]. Reuse of reclaimed wastewater in Jordan is imperative. Treated wastewater has, and will continue to be a major component of the national water budget. It is therefore vital that the anticipated increases in reclaimed water be

managed to safely and economically exchange for present and future uses of freshwater, and to maximize the returns from this water resource [12].

Now there are 23 working wastewater treatment plants (WWTPs) distributed in different locations in Jordan. The total amount of discharge from all treatment plants in 2005 is about 79 million m<sup>3</sup>. Within the treatment plants and in their vicinity, about 1.400 ha is used for restricted agriculture, mainly fodder crops, cereals and trees. In the central and southern Jordan Valley diluted reclaimed water is used for unrestricted irrigation on about 11.000 ha [11]. Wastewater characterization is very important when designing or upgrading a wastewater treatment plant [13-15]. In addition, characterization of the effluent is significant to determine the safe reuse options [16-19]. The Jordanian standard JS 893/2002 offers five routes for reclaimed water reuse as explained later in the materials and methods section.

In this study, characteristics of wastewater for four wastewater treatment plants: Wadi-Mousa Treatment Plant (WMTP), Ma'an Treatment Plant (MTP), AL-Hussein Bin Talal University Treatment Plant (AHUTP), and Tafilah Treatment Plant (TTP) were determined. Figure 1 shows the geographical location of these plants. Characterization of WW was evaluated in terms of measuring BOD<sub>5</sub>, COD, TSS, TDS, E.Coli, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, DO, turbidity, and pH for the influent and effluent from the selected plants. The performance of the four WWTPs was evaluated and the quality of the reclaimed WW was compared with Jordanian and World Health Organization (WHO) standards to determine its suitability for reuse and evaluate the feasibility of

expanding reuse of treated water in different application.



**Figure 1: Jordan map shows the geographical distribution of the wastewater treatment plants in red. 1- WMTP, 2- MTP, 3- AHUTP and 4- TTP**

## **MATERIALS AND METHODS**

The wastewater treatment plants under investigation employ different treatment processes. TTP utilizes trickling filter system, while AHUTP employs upflow sludge blanket filtration. Activated sludge is used in the other treatment plants (WMTP and MTP). In WMTP an oxidation ditch activated sludge is utilized. While MTP uses a modified extended aeration activated sludge. The design and actual hydraulic loads, BOD<sub>5</sub> and TSS for the plants are shown in Table 1. It is observed that all plants are operating below the design loads except the AHUTP which deals with TSS slightly larger than the design load.

In order to determine the characteristics of wastewater for the selected plants, samples were taken from the inlet and outlet of these plants during January 2008 to January 2009. Representative samples were collected carefully to avoid agitation or any contact with air. Samples were transported to the laboratory and analyzed as soon as possible. All of

the testing materials and methods used in this research are based on Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater by APHA, AWWA and WEF unless is stated otherwise [20].

The dissolved Oxygen (DO) was done by DO4000 LaMotte probe in situ. Closed reflux, titrimetric method was used to determine COD concentration. Culture tubes were washed and capped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then the samples tubes were put in a block digester preheated to 150 °C and refluxed for 2 h. After digestion period, the sample were cooled to room temperature and titrated by 0.025 N standard ferrous ammonium sulfate. The COD (mg O<sub>2</sub>/L) is calculated according to:

$$\text{COD} = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{V_s} \quad (1)$$

Where, *A* and *B* are the volumes of standard ferrous ammonium sulfate used for blank and sample in mL, respectively, *M* is the molarity of standard ferrous ammonium sulfate, *V<sub>s</sub>* is the sample volume in mL, and 8000 is a conversion factor. The 5-day BOD test where used to determine

BOD. After dilution, the BOD<sub>5</sub> samples were incubated at 20 °C for 5 days. The percent depletion of Oxygen was measured to determine the BOD<sub>5</sub> concentration (in mg/L) according to:

$$\text{BOD}_5 = \frac{(D_1 - D_2) V}{P} \quad (2)$$

Where *D<sub>1</sub>* and *D<sub>2</sub>* are the dissolved oxygen of diluted sample immediately after preparation and after 5 days of incubation at 20 °C (in mg/L) respectively. *V* and *P* are the volumes of test bottle and sample in (mL) respectively.

In order to determine TSS and TDS concentrations, samples were filtered through a weighed standard glass-fiber filter with 2 µm diameter. The filtrate was evaporated to dryness in a weighted dish and dried at 180 °C. The increase in dish weighted represents TDS weight. The residue on the filter was dried at 105 °C. The increase in the weight of the filter represents the total suspended solid.

The determination of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> is performed using ultraviolet spectrophotometric screening method.

**Table ( 1): The design and actual hydraulic loads, BOD<sub>5</sub> and TSS for the plants under consideration.**

Criterion		WMTP	MTP	AHUTP	TTP
Hydraulic Load (m <sup>3</sup> /day)	Actual <sup>(a)</sup>	1200	2400	165	1138
	Design	4990	7000	800	1600
BOD <sub>5</sub> (mg/L )	Actual <sup>(a)</sup>	614	565	265	750
	Design	1700	700	650	1050
TSS (mg/L )	Actual <sup>(a)</sup>	972	545	358	539
	Design	1700	700	350	1000
Type of Treatment		Activated Sludge ( Oxidation Ditch)	Activated Sludge ( modified Extended Aeration basin)	Up flow Sludge Blanket Filtration	Trickling Filter

a- Actual values as in 2008

The amount of E.coli (in MPN) is tested by multiple tube fermentation technique using EC – MUG medium. The Phosphate Ion ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) concentration is measured by using phosphate comparator technique. In this study, when comparing the quality of effluent from the treatment plants with the Jordanian standard the following representation of reuse options is used:

JS1: represents the reclaimed water quality used for discharging to streams, wadis or water bodies, JS2: indicate the standard of reusing reclaimed water for artificial recharge of groundwater aquifers, JS3 to JS5: represent the use reclaimed water for irrigation purposes – JS3 for category A, which includes plants such as cooked vegetables, parks, playgrounds and sides of roads within city limits, JS4 for category B which includes plants such as fruit trees, sides of roads outside city limits, and landscape, and JS5 for category C which includes plants such as field crops, industrial crops and forest trees.

## RESULTS AND DISCUSSION

The average values of  $\text{BOD}_5$ , COD, TSS, TDS, DO,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , Phosphate ion, and E.coli of wastewater from the treatment plants considered in this study are shown in Table 2. Also the percentage removal of  $\text{BOD}_5$ , COD, TSS, TDS, and  $\text{NH}_4^+$  were calculated. The most important parameters used to define the characteristics of municipal wastewater are  $\text{BOD}_5$ , COD and TSS. The values of  $\text{BOD}_5$  concentration for the influent wastewater range from 262- 635 mg/L, and from 314-984 mg/L for COD, while TSS was found to range from 358-872 mg/L and TDS range from 925-2023

mg/L. Based on these values, wastewater in these area is classified as a strong domestic wastewater where the concentration of pollutants is much higher than the international figures. This could be explained by the fact that Jordan is one of the arid and semi-arid countries, which suffers from water shortage, and consequently water use is often fairly low, hence sewage tends to be strong [21, 22].

The average available fresh water for Jordanian citizen is about 200 cubic meters per year per person compared with 9,000 cubic meters per year per person for a U.S citizen [23].

### 1 Compliance of WWTP effluents with Jordanian Standard JS 893/2002:

Figure 2 shows the effluent  $\text{BOD}_5$  values for the selected treatment plants along with the Jordanian standard 893/2002 requirements. It can be seen that the  $\text{BOD}_5$  value range from 4.5 to 40.3 mg/L where the highest value is for TTP. Compliance of wastewater treatment plants are varies. Effluents from WMTP and AHUTP comply with the  $\text{BOD}_5$  requirements of reuse options in the Jordanian standard (JS1 to JS5). While, effluents from MTP and TTP do not comply with JS2. The latter also fails to comply with JS3. The lowest  $\text{BOD}_5$  value obtained for WMTP effluent. This reflects the effectiveness of the applied process in that plant, while it can be noted that TTP has a highest  $\text{BOD}_5$  value, and that might be due to the existing operational problems in the primary sedimentation, where there are accumulation of sludge on its sides.

The effluent COD values for the selected treatment plants are shown in Figure 3. Effluent from WMTP complies with Jordanian standard for

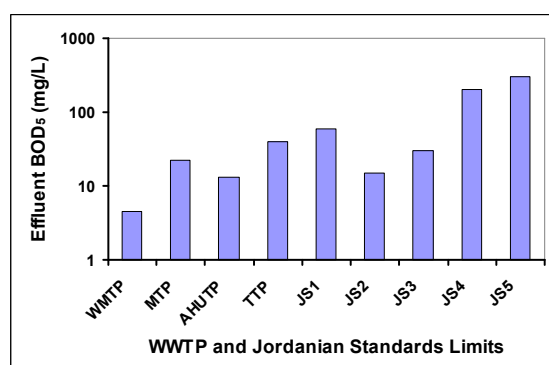
all WW reuse purposes, while TTP and MTP do not comply with JS2 and JS3. AHUTP has been found to comply with all the standards except

with JS2. As in BOD<sub>5</sub> WMTP has the lowest values for COD and that due to disinfection step where chlorine is used to disinfect the WW.

**Table 2: Characteristics of influent and effluent from the WWTPs**

Parameter	Unit	WMTP	MTP	AHUTP	TTP
<b>BOD<sub>5</sub> inf</b>	mg/L	262	565	265	714
<b>BOD<sub>5</sub> eff</b>	mg/L	4.5	22.5	13	40.3
<b>BOD<sub>5</sub> removal</b>	%	98	96	95	94
<b>COD inf</b>	mg/L	807	660	314	1014
<b>COD eff</b>	mg/L	22.7	184	62	144
<b>COD removal</b>	%	97	72	80	86
<b>TSS inf</b>	mg/L	872	545.3	358	694
<b>TSS eff</b>	mg/L	16.9	41.7	54	39
<b>TSS removal</b>	%	98	92	85	94
<b>TDS inf</b>	mg/L	925	994	2023	1235
<b>TDS eff</b>	mg/L	810	888	824	1040
<b>TDS removal</b>	%	12	11	59	16
<b>NH<sub>4</sub> inf</b>	mg/L	64.8	79.7	115.67	74
<b>NH<sub>4</sub> eff</b>	mg/L	0.13	27.2	0.83	50
<b>NH<sub>4</sub> removal</b>	%	99.7	66	99	32
<b>DO inf</b>	mg/L	4.93	0.99	2	NA*
<b>DO eff</b>	mg/L	9.49	7.8	4.1	
<b>pH inf</b>	—	7.1	7.7	8	7.56
<b>pH eff</b>	—	7.37	8.2	8.01	7.87
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> eff</b>	mg/L	10	1.14	8.33	8.67
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> eff</b>	mg/L	7.7	11.33	3.07	11.33
<b>Turbidity eff</b>	NTU	0.94	10.4	4.31	14.17
<b>E.Coli eff</b>	MPN	0.943	>>1000	1.9	>>1000

\* NA: Not available



**Figure 2: Reclaimed wastewater effluent BOD<sub>5</sub> for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.**

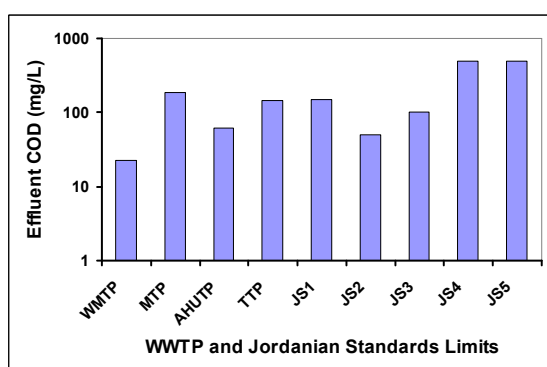
Although AHUTP disinfects the treated water but it has a higher value than WMTP and that due to irregular chlorine dosage. As a result of absence of chlorination in MTP and TTP a higher values of COD is observed.

The effluent TSS values for the selected treatment plants are shown in Figure 4. It can be seen that the effluent from TTP, WMTP, and MTP complies with all requirements of the Jordanian standard for the reclaimed WW. Results show high TSS removal



efficiency of the WWTPs ranging from 85% for AHUTP to 98% for WMTP (as shown in Table 2). However, the effluent of AHUTP has been found to comply with all the above standards except JS2 and JS3. This may be related to that the influent to the plant exceeding the design limit.

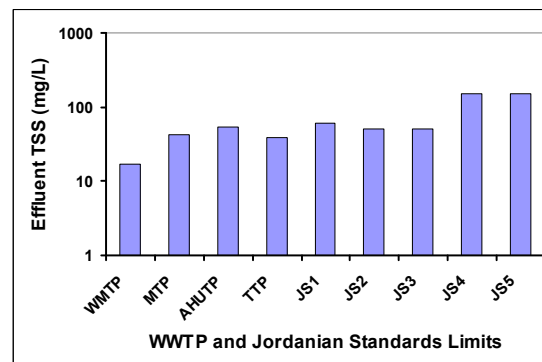
TDS results shown in Figure 5 indicate that the effluents from the studied WWTPs have TDS values range from 810-1040 mg/L. These values show that treated wastewater has a high salinity. This could be due to the high salinity of domestic water supply which is on average 580 mg/L in Jordan [5, 24], and the average domestic water consumption is low in Jordan as compared with worldwide consumption as explained earlier. Comparing these TDS with Jordanian standards, show that all treatment plants produce effluents of TDS less than the Jordanian standard requirement for all reuse applications.



**Figure 3: Reclaimed wastewater effluent COD for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.**

However, this is an important parameter for treated effluent to be used in agricultural irrigation. Salinity must be low enough to maintain

favorable osmotic pressures for plants to take up water. Thus even that all plants effluent can be used for agricultural irrigation, they may have adverse effect on sensitive crops. The TDS of effluents can be minimized by using membrane processes such as reverse osmosis or electrodialysis.



**Figure 4: Reclaimed wastewater effluent TSS for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.**

A similar behavior to the one that was observed for TDS values is obtained for the phosphate and nitrate ion values for the effluent from the four WWTPs as shown in Figure 6 and 7, respectively.

In Figure 6 it can be noticed that the lowest value of phosphate is recorded for AHUTP. This could be due to the fact that AHUTP has the lowest influent flow rate, and the plant serves the university campus which does not consume large quantities of phosphorus. Phosphate ion is usually produced from detergents, fertilizer and from bioactivities of aquatic plant, in which these materials are not utilized in plentiful quantities in the university.

The concentrations of DO for the effluent from the studied plants are shown in Figure 8. It can be noticed that the effluent DO concentrations are complied with JS2 and JS3 (while it is not specified for the other reuse categories).

The Jordanian standard requires that the pH of the reclaimed water is 6 – 9. The different plants comply with this requirement. They ranged from 7.37 to 8.2 as shown in Table 2.

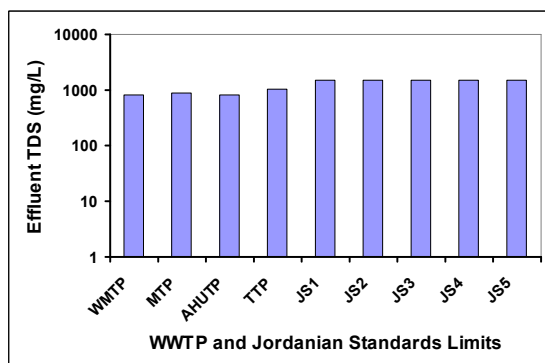


Figure 5: Reclaimed wastewater effluent TDS for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.

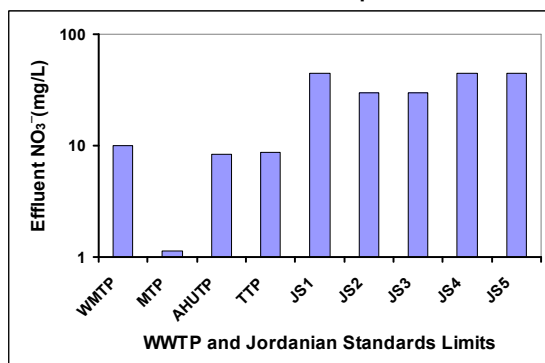


Figure 6: Reclaimed wastewater effluent NO<sub>3</sub><sup>-</sup> for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.

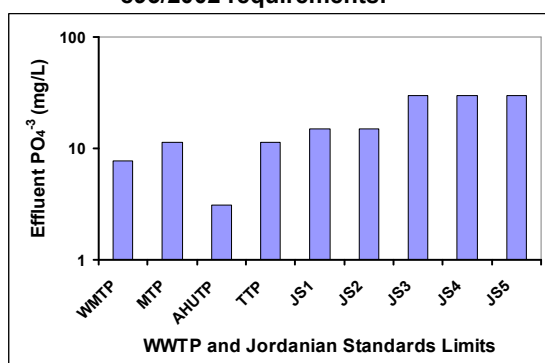


Figure 7: Reclaimed wastewater effluent PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.

Regarding the effluent turbidity the JS2 has an allowable limit of 2 NTU while JS3 has 10 NTU allowable limits.

WMTP is the only plant that complies with both standards, while TTP does not comply with any standard; on the other hand MTP and AHUTP effluent are complied with JS3 (as shown in Table 2).

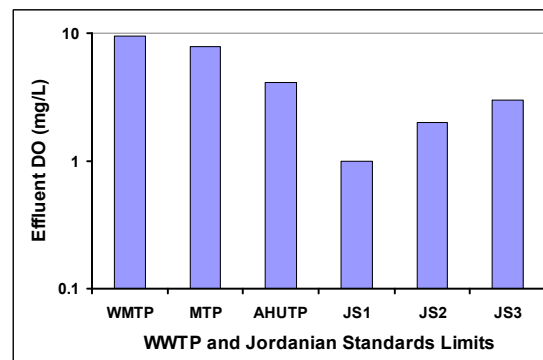


Figure 8: Reclaimed wastewater effluent DO for the selected treatment plants compared with the Jordanian standard 893/2002 requirements.

Reusing reclaimed water for artificial recharge of groundwater aquifers has an allowable limit equal to 5 mg/L of NH<sub>4</sub> in effluent. Comparing this with NH<sub>4</sub> in effluent of the studied plants, as shown in Table 2, shows that effluents from AHU and WMTP comply with this requirement, while the effluent from TTP and MTP fail to meet with this standard. The E.Coli values for the WWTPs have been tested and the results are shown in Table 2. By comparing these results with Jordanian standard for different reuse options where MPN of E. Coli per 100 ml must be less than 2, 100 and 1000 to comply with JS2, JS3 and (JS1 and JS4) respectively. It has been found that both WMTP and AHUTP comply with all Jordanian standards. On the

other hand, it has been found that MTP and TTP have a very high E.Coli value ( $>>1000$ ) and fail to meet any of reuse standards options. Thus both plants should efficiently operate their disinfection units in their treatment systems. Since the presence of pathogens can pose health risk especially for effluent reuse for agriculture purposes on both farmers and consumers of crops irrigated with such water.

## 2 Compliance of WWTP with WHO standard

A comparison of effluent BOD<sub>5</sub> and TSS values with WHO standards are shown in Table 3. The BOD<sub>5</sub> effluent from WMTP complies with all WHO standards for the three different applications. On the other hand all of the studied plants are complied with WHO standard for irrigation of ornamental fruit, trees and fodder crops. While, AHUTP complies with WHO standard for irrigation of vegetables likely to be eaten uncooked as well.

**Table 3: Performance of WWTP against WHO standard.**

Parameter	WMTP	MTP	AHU	TTP	Permitted Limit		
					(A) Irrigation of ornamental fruit trees and fodder crops	(B) Irrigation of vegetable likely to be eaten uncooked	(C) Toilet flushing
<b>BOD<sub>5</sub> (mg/L)</b>	A, B, and C	A	A, and B	A	≤ 240	≤ 20	≤ 10
<b>TSS (mg/L)</b>	A, and B	A	A	A	≤ 140	≤ 20	≤ 10

The TSS values of the effluent compared with WHO standard are shown in Table 3. The results indicate that all the plants comply with WHO standard for irrigation of ornamental fruit, trees and fodder crops, while all of them do not comply with WHO standard for toilet flushing, WMTP is the only plant that complies with WHO

standard for irrigation of vegetables likely to be eaten uncooked.

## **DISCUSSION AND CONCLUSION**

(1) Reuse of reclaimed WW has essential aims; the most important one is reducing the consumption of potable water in the fields which do not require high water quality. In Jordan reuse of reclaimed water started to expand in

recent years to overcome the problem of water shortage. A Reclaimed Domestic Wastewater Jordanian standard has been established to regulate reclaimed water reuse.

(2) Characteristics of wastewater for four wastewater treatment plants in Jordan were investigated. The performance of the plants was evaluated and the quality of the reclaimed WW was compared with Jordanian and World Health Organization (WHO) standards to determine its suitability for reuse.

(3) The WMTP was found to comply with Jordanian standard for all purposes. Furthermore, WMTP has a good quality of reclaimed water comparing with the other plants. WMTP effluent also can be used according to WHO standard in irrigation of ornamental fruits trees, fodder crops irrigation and uncooked vegetables irrigation. However, it fails to meet the requirements for toilet flushing. These results indicate the possibility of expanding reuse of reclaimed water from WMTP for other purposes, like groundwater discharge, irrigation of cooked vegetables, parking areas, play ground, side of roads inside cities, and vegetables likely to be eaten uncooked. Also it can be used for toilet flushing after improving its effluent regarding TSS to comply with WHO standard, especially

it can be used in hotels as the plant exists in a tourist area of Petra.

(4) MTP effluent quality meets with Jordanian standard in the plenteous trees, side of road outside city, and landscape irrigation, field crops, industrial crops and forest trees irrigation, in all investigated parameters except the E.Coli value. However, MTP effluent does not meet the standard for ground water recharge and in discharge to streams, wadis (valleys) and water storage area due to its COD value which is larger than the standard in the case of discharge to stream, and due to the fact that BOD<sub>5</sub> and COD values are larger than the standard in the case of ground water recharge.

(5) TTP effluent quality is found to meet the JS4 and JS5 in all investigated parameters except the E.Coli value. On the other hand, it doesn't agree with discharge to ground water due to COD, BOD<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and turbidity values which are greater than Jordanian standard for these reuse applications.

(6) MTP and TTP produce reclaimed water with high E.Coli content, which do not comply with Jordanian standard for all reuse purposes. These plants have to overcome this deficiency. As an initial step towards expanding MTP and TTP effluent reuse in irrigation, they must efficiently operate their

disinfection units in their treatment systems.

(7) AHUTP effluent quality is suitable for all reuse applications except discharging into ground water due to its high COD, TSS and turbidity values.

(8) The performance of the TTP, MTP, AHU plants against WHO standard shows that effluents could be utilized for ornamental fruits trees and fodder crops irrigation only.

(9) Finally, it is important that the farmers are informed on the safe use of effluents in irrigation. This should be accomplished under serious control and monitoring of the effluent quality. Public awareness and training is another important issue that should be considered. In addition further research needs to be conducted in order to improve the quality of reclaimed WW for different purposes and to increase public confidence in using such reclaimed water.

## REFERENCES

1. Luigi P, Annika K, and Al Baz, I (2007) The EMWater project — promoting efficient wastewater management and reuse in Mediterranean countries, *Desalination* 215, 56-63.
2. Huertasa E, Salgota M, Hollenderb J, Weberb S, Dottb W, Khanc S, Schäferd DA, Messaleme R, Bisf B A. Aharonig A and Chikurelg H (2008) Key objectives for water reuse concepts, *Desalination* 218, 120-131.
3. Arslan-Alaton I, Aysegul T, Suleyman O, Gulen I, Melike G, Derin O (2007) Reuse potential of urban wastewater treatment plant effluents in Turkey: a case study on selected plants, *Desalination* 215, 159–165.
4. Lallana C, Krinner W, Estrela T, Nixon S, Leonard J, and Berland JM (2001) Sustainable water use in Europe, Part 2: Demand Management, European Environment Agency (EEA), Environmental Issue Report, No. 19, Copenhagen, available online [www.eea.europa.eu](http://www.eea.europa.eu), accessed 15-11-2010.
5. Ammary B.Y. (2007) Wastewater reuse in Jordan: Present status and future plans, *Desalination* 211, 164-176.
6. Al-Zboon K and Al-Ananzeh N (2008) Performance of wastewater treatment plants in Jordan and suitability for reuse, *African J. Biotech.* 7, 2621-2629.
7. Werner D, Salman AZ, Al-Karablieh AK, and Wolff HP (2002) The impact of water price strategies on the allocation of irrigation water: the case of Jordan valley, *J. Agri.W.Manag.* 55, 171-182.
8. Abu-Zanat M. (2010) Jordan country report, International livestock research institute, available online [http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/full\\_docs/wana/jordan.htm](http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/full_docs/wana/jordan.htm), accessed 16-11-2010.
9. Hamdan MR and Salman AZ (2010) Impact of irrigation water scarcity and food security in, available online <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a65/05002237.pdf>, accessed 17-11-2010.
10. World Bank (2010) Hashemite Kingdom of Jordan update- Strategic issues for further development of the education sector, available online <http://siteresources.worldbank.org>, accessed 15-11-2010.

11. Vallentin A (2006) Agricultural use of reclaimed water - experiences in Jordan, W. Prac.& Tech. 1:151-156.
12. Al-Alawi M. (2007) Health assessment of wastewater reuse in Jordan chapter in Wastewater Reuse–Risk Assessment: Decision-Making and Environmental Security, Mohammed K. Zaidi (Editor), Springer Netherlands.
13. Mozaheb SA, Ghaneian MT, Ghanizadeh GH and Fallahzadeh M (2010) Evaluation the stabilization ponds performance for municipal wastewater treatment in Yazd-Iran, Middle-East J. Sci. Res. 6:76-82.
14. Sadeghpour M, Hosseini B and Najafpour GD (2009) Assessment of wastewater treatment plant's performance in Amol industrial park, American-Eurasian J. Agri. & Env. Sci., 5:707-711.
15. Shah Teli SK (2008) Performance Evaluation of Central Wastewater Treatment Plant: a Case Study of Hetauda Industrial District, Nepal, Environment and Nat. Resour.J..6: 502-509.
16. Mndreadakis A, Mamais D, Gavalaki E, Panagiotopoulou V (2003) Evaluation of treatment schemes appropriate for wastewater reuse in Greece, Global Nest: the Int. J. 5:1-8.
17. Al Nasir FA, Batarseh MI (2008) Agricultural reuse of reclaimed water and uptake of organic compounds: Pilot study at Mutah University wastewater treatment plant, Jordan, Chemosphere 72, 1203–1214.
18. Arslan-Alaton I, Tanik A, Suleyman O, Gulen I, Melike G, Derin O (2007) Reuse potential of urban wastewater treatment plant effluents in Turkey: a case study on selected plants, Desalination 215, 159–165.
19. Kalavrouziotis IK , Robolas P, Koukoulakis PC , Papadopoulos AV (2008) Effects of municipal reclaimed wastewater on the macro- and micro-elements status of soil and of Brassica oleracea var. Italica, and B. oleracea var. Gemmifera, agri w. Manag.9 (5): 419 – 426.
20. AWWA-WEF A (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation)( 2005) Standard methods for the examination of water and wastewater,. 21 Ed., Washington DC: APHA-AWW, A-WEF.
21. Pescod MB (1992) Wastewater treatment and use in agriculture - FAO irrigation and drainage paper 47, available online [http://www.fao.org/documents/pub\\_detail.asp?pub\\_id=21103&lang=en](http://www.fao.org/documents/pub_detail.asp?pub_id=21103&lang=en) , accessed 5-9-2010.
22. Nazzal YK, Mansour M, Al Najjar M, McCornick PC (2000) Wastewater Reuse Law and Standards in the Kingdom of Jordan, available online <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.130.7039>, accessed 1-10-2010.
23. USaid (2010) Wastewater Reuse in Jordan: A USAID Initiative, available online [http://jordan.usaid.gov/press\\_display.cfm?id=929](http://jordan.usaid.gov/press_display.cfm?id=929), accessed 1-10-2010.
24. Jordanian Ministry of Water and Irrigation (2010) Waste water policy, available online <http://www.mwi.gov.jo>, accessed 13-11-2010.

## Molecular Diagnosis of TWIST Mutation in Nasal Septum's Deviations by Using PCR

Shaymaa' J. Ahmed & Nawfal K. Yas

Anatomy Dept., College of Medicine - Baghdad University- Iraq

E-mail: shaymajamal@yahoo.com

### ABSTRACT

Deviation of the nasal septum (D.N.S) is a common problem which has a considerable percentage of congenital etiology. This study aims at studying if or not, a genetic character or chromosomal abnormality is responsible for this disorder by using PCR and determination predisposition of disease by screening if this patient homozygous or heterozygous for different polymorphisms in the gene.

Blood was collected from 60 samples which were grouped into two groups: the first one was the control group constituting 15 cases with no nasal complaint. The second group contained 45 patients with D.N.S, dealt with as the experimental group. The DNA was extracted and the TWIST mutation was detected by using PCR.

By using PCR technique there is a fragment with (800bp) in 21 (46%) of patients, there is highly significant between the control versus experimental groups and significant between experimental with +ve family history F.Hx versus experimental with -ve F.Hx and there is insignificant between female versus male.

As conclusion the PCR has been successfully used to detect the DNS patients. It is a fast and effective technique that should be done upfront at diagnosis in patients.

**Keywords:** Deviated nasal septum (D.N.S), TWIST mutation, PCR

### الخلاصة باللغة العربية

يعتبر انحراف حاجز الأنف (D.N.S) مشكلة عامة سببها خلقي، تهدف هذه الدراسة لإجراء التشخيص الوراثي لهذا المرض ودراسة هل هناك تشوهات كروموسومية مسئولة عنه باستعمال تقنية PCR فضلاً عن تحديد التحري المشخص عن هذا المرض، وهل كون المرضى هم الحاملين للنسخة المتماثل هو المختلفة لأنماط الجينات الوراثية.

تم جمع (60) عينة والتي قسمت إلى مجموعتين: المجموعة الأولى كانت (15) مجموعة السيطرة (6) إناث و (9) ذكور وهم لا يعانون من مشاكل الانحراف الأنفي أما المجموعة الثانية فكانت (45) من المرضى (حالات الانحراف الأنفي).

إذ تم عزل DNA ومن ثم التحري على طفرة TWIST باستعمال تقنية PCR.

وقد ظهر باستعمال تقنية PCR أن هناك قطعة بطول (800) زوج قاعدي في (21) (46%) من المرضى. وأن هناك فروقات معنوية عالية بين مجموعة السيطرة ومجموعة التجربة وكانت هنالك أيضاً فروقات معنوية عالية بين مجموعة التجربة الذين لهم تاريخ عائلي للمرض والذين ليس لهم تاريخ عائلي للمرض (ضمن نفس المجموعة)، كما بينت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين إصابة الذكور وإصابة الإناث.

ويستنتج من ذلك أن تقنية PCR كانت ناجحة في تشخيص مرضى الانحراف الأنفي، وهي تقنية سريعة وفعالة في تشخيص الحالات المرضية.

Abnormal nasal cycle & impaired sinus drainage result in nasal obstruction of variable degree depending on the severity of the deviation, sneezing, throat discomfort, headaches, bloody noses, and sleeping disorders such as snoring or sleep apnea. (2)

The *TWIST* gene, originally identified in *Drosophila melanogaster*, is highly conserved from *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, to humans. It is localized at human chromosome 7p21 and has two exons and one intron of 538 bp. The first exon, which is 772 bp long, contains the entire coding region. The mRNA is at least 1396 bp long, and the transcription initiation site is unknown. The 202-amino-acid protein encoded by the *TWIST* gene is a basic helix-loop-helix (HLH) motif-containing transcription factor (5). The HLH region of this motif is important for homo- or heterodimerization, whereas the basic domain is essential for the binding of the dimer complex to a target DNA-binding sequence(s). *TWIST* is thought to be a negative transcriptional regulator that acts by direct binding to the PCAF and EP300 domain of histone acetyltransferases and by inhibiting their acetyltransferase activities (6). It is also involved in osteoblast and myoblast differentiation and maturation by negative transcriptional regulation (7; 8). The pathway of molecular components involved in craniofacial and limb development includes not only *TWIST*, but also fibroblast growth factor receptors (FGFRs), which may be negatively regulated by *TWIST* (9).

## PATIENTS AND METHODS

(45) Patients with symptomatic D.N.S were subjected to this study. They were received in the out patient clinic in Baghdad hospital during the period from January – December 2010. Their age ranged between 18 & 43 years, 28 of them were males & 17 were females.

## INTRODUCTION

The nasal septum is the bone and cartilage in the nose that separates the nasal cavity into the two nostrils. Normally, the septum lies centrally, and thus the nasal passages are symmetrical. (1)

A deviated septum is an abnormal condition which the cartilaginous and/or the bony septum leans to the left or the right, causing obstruction of the affected nasal passage. The condition can result in disturbances in the nasal cycle & poor drainage of the sinuses. (2)

It is most frequently caused by impact trauma, such as by a blow to the face. It can also be a congenital disorder, caused by compression of the nose during childbirth. (1)

Types of D.N.S:

The most convenient classification for D.N.S:

Type I: mild deviation which does not cross the midline

Type II: anterior vertical deviation

Type III: posterior vertical deviation (in the region of middle turbinate)

Type IV: S – septum (anterior to one side & posterior to the other side)

Type V: horizontal spur on one side

Type VI: type V + groove on the concave side

Type VII: combination of more than one type from II – VI (3)

Deviated septum is associated with genetic connective tissue disorders such as Marfan syndrome, Ehlers Danlos Syndrome (4) and Saethre-Chotzen syndrome (5).

It is common for nasal septa to depart from the exact centerline; the septum is only considered deviated if the shift is substantial or is adversely affecting the patient. Many people with a deviation are unaware they have it until some pain is produced. But by itself a deviated septum can go undetected for years and thus be without any need for correction such deviation should not be considered a medical issue. (1)



## RESULTS

A total of 60 blood samples were collected, 15 were as control group and 45 were experimental patients (table 1).

Statistical analysis of the results was done using SPSS software version 16 by application of Chi square test to find the significance of difference in the prevalence of twist gene in:

- Control & experimental groups
- Experimental group with +ve family history with those with -ve family history
- The effect of gender in the prevalence of this gene

**Table (1): Characteristics of samples**

Grade	control	Exp. Total Number	Exp. +ve F.Hx*	Exp. -ve F.Hx.	Exp. Twist +ve F.Hx.	Exp. Twist -ve F.Hx.
Females	6(10%)	17 (28%)	8 (18%)	3 (7%)	8 (18%)	0
Males	9(15%)	28 (47%)	13 (28%)	5 (11%)	13 (28%)	0
Total	**15 (25%)	**45 (75%)	21 (46%)	8 (18%)	21 (46%)	0

\* family history(FHx) for DNS.

\*\*total samples=60 (Control & experimental groups)

Results revealed that P value was as shown in table (2), a value less than 0.001 is regarded as highly significant, between 0.001 & 0.005 is regarded significant & greater than 0.005 is regarded insignificant.

By using PCR, only single bands with molecular weight about (800bp) were detected in PCR products which were (8) samples as fig(1) was shown.

All patients gave negative history of any trauma to the nose, 37 gave positive family history of chronic nasal disease (23 of them were males & 14 were females).

All patients were carefully examined clinically by anterior rhinoscopy, confirmed by plain X-ray of paranasal sinuses (occipito-mental or Water's view) which revealed positive radiological evidence of deviation in their nasal septa.

1 milliliter of blood was collected from each one of them, kept in a test tube with EDTA anticoagulant & preserved in the freeze for further processing.

Another group of 15 individuals randomly selected as a control, 9 were males & 6 were females, all of them gave no history of nasal complaint. They were carefully examined & investigated like those in the experimental group, no evidence of D.N.S was recorded in any of them. Blood was collected from them & dealt with as in the experimental group.

The DNA extraction was done by using Promega Kit (USA) instruction. PCR primers used for amplification were:

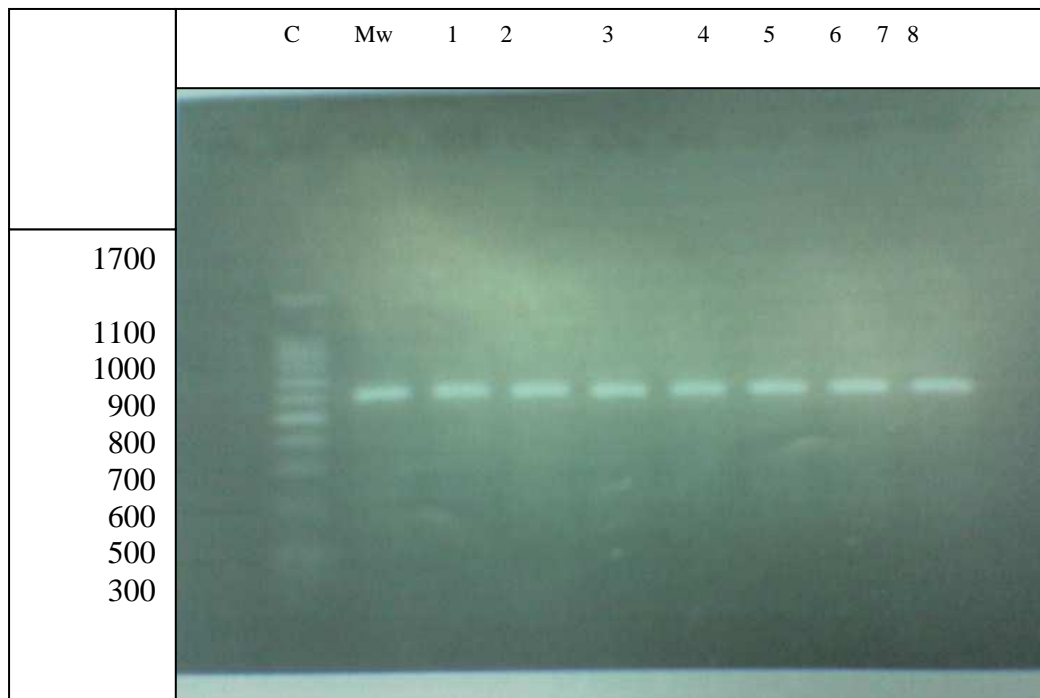
Forward 5'-GAGGCGCCCCGCTCTTCTCC-3'  
Reverse 5'-AATCGAGGTGGACTGGGAACCG-3',

PCRs were performed in 40- $\mu$ l volumes that contained 200 ng genomic DNA, 1x High Fidelity PCR buffer, 0.2 mM each dNTPs, (Promega, USA), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 U Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). PCR parameters were: 94°C for 6 min; 38 cycles of 94°C for 1 min, 66°C for 15 s, and 68°C for 45 s; followed by 68°C for 7 min. The PCR products were electrophoresed on agarose gel (1.2%) according to Sambrook *et al.*(10).

Findings were compared statistically between the two groups using chi square test for nominal data comparison.

**Table (2): Significance of twist gene in this experiment according to Chi square test**

	Groups	P value	Significance
1	Control versus experimental	0.000	Highly significant
2	Experimental with +ve F.Hx versus experimental with -ve F.Hx	0.003	Significant
3	Male versus female	0.604	Insignificant

**Fig(1): PCR products: lane -1- control group, lane -2- DNA Lambda, lane no.(1-8)the TWIST mutation. Electrophoresis was carried out in 1.2% agarose gel at 5V/cm for 60minutes.**

Second, we have tried to increase the sensitivity of the screen for TWIST mutation by using separate SPSS software analysis after using PCR detection, there is a fragment with (800bp) as shown in fig-1- in 21 (46%), the females were 8 (18%) and the males were 13 (28%).

Third there is highly significant between the control versus experimental groups table-2- and significant between experimental with +ve family history F.Hx versus experimental with -ve F.Hx(table-1) and there is insignificant between female versus male.

We found that the TWIST mutation is one of the reasons of DNS which

## DISCUSSION

We screened for TWIST mutation in DNS patients, which is localized at human chromosome 7p21 and has two exon, the first exon of 772 bp in long and one intron of 538 bp(5).

In this study, we have tried to address three important issues when screening for TWIST mutation.

First we have taken a (45) patients of DNS as experimental group as shown in table-1, the females were 17 (28%) and males were 28 (47%).

6. Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y and Kedes L (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 96:405–413.

7. Funato N, Ohtani K, Ohyama K, Kuroda T and Nakamura M (2001) Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 21:7416–7428.

8. Jabs EW (2001) A TWIST in the fate of human osteoblasts identifies signaling molecules involved in skull development. *J Clin Invest* 107:1075–1077.

9. Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, Maxson RE, Thesleff I (2000) Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 127:1845–1855.

10. Sambrook J. , Fritsoh E.F.and Maniatis T.(1989).Molecular cloning : A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition.

11. Morgan GA, Leech NL, GloecknerGW, Barret KC (2004).SPSS for Introductory Statistics. Use & Interpretation. 2<sup>nd</sup> ed. Lawrence ErlbawmAssociate Publishers. 99-111.

detected by using PCR technique, therefore, it is very important to examined TWIST mutation in the DNS patients.

## REFERENCES

1. Metson R.and Mardon S. (2005). The Harvard Medical School Guide to Healing Your Sinuses. 1<sup>st</sup> ed. McGraw-Hill Professional. 159–161

2. Fact sheet: Deviated septum. American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery. <http://www.entnet.org/HealthInformation/deviatedSeptum.cfm>. Accessed December 25, 2010.

3. Chalabi YE.and Khadim H.(2010).Clinical manifestation in different types of nasal septal deviation. *The N. Iraqi J. Med.*;6(3):24-29.

4. Beighton PH. Solomon L. Soskolone CL(1973). Articular mobility in an African population. *Am Rheum Dis.*;32:413-18

5. Cai J., Goodman BK., Patel AS., Mulliken JB., Maldergem LV., Hoganson GE., Paznekas WA., Ben-Neriah Z, Sheffer R., Cunningham ML., Daentl DL. and Jabs EW. (2003). Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. *Human Genetics*. 10.1007:1107-1012

## Incidence of *Listeria* in table-eggs in Baghdad Markets

Ali Hassan Ahmed AL-Shamary (1) & Moutaz A. W. Abdul Mounam (2)

Food Hygiene / Vet. Public Health / (1) & Zoonotic Diseases Unit (2)

College of Veterinary Medicine / Baghdad University- Iraq

E-mail: alihahdalshammary@yahoo.com (1) drmoutaz@yahoo.com (2)

### ABSTRACT

The aim of this study was concerned on the prevalence of *Listeria spp.* in the table-eggs samples collected from the different markets and downtown stores of Baghdad province during November 2010 till March 2011. A total of 300 table-eggs (150 white eggs shells and 150 brown eggs shells from different origins) were analyzed and processed according to the standard protocols of Food and Drug Administration (FDA) and International Organization for Standardization (ISO) with some modifications. After preparation of sterile media, a portion of analytic sample was added to 9 portions of *Listeria* enrichment broth, shaken for 2-3 minutes inside stomacher, and then incubated at 30 °C for 24-48 hours. After 24 and 48 hour enrichment processing, the culture was made on the *Listeria* Selective Agar (ALOA, OCLA, Oxoid). *Listeria monocytogenes* appeared on chromogenic ALOA (OCLA) Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar) as a blue-green colored, smooth, convex, circular or crenate colonies with entire margins and opaque halo while the others *Listeria spp.* appear as blue-green colonies without any halo. Confirmation of *Listeria* isolates was done by Latex Agglutination test (Oxoid, UK), and differentiation of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria spp.* was done by Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.mono test kit, Oxoid). Growth of *Listeria spp.* was determined in 54 (18%) of total samples as 30 (10%) isolates from brown eggs shells, from which 6 (2%) isolates were confirmed as *Listeria monocytogenes*, and 24 (8%) isolates from white eggs shells, from which 3 (1%) isolates were confirmed as *Listeria monocytogenes*. These findings suggest that *Listeria* contaminates table-eggs and *Listeria* infections are not a potential risk in Baghdad province, but it is strongly recommended that these products are monitored carefully.

**Key Words:** *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, table-eggs, food microbiology.

### الخلاصة باللغة العربية

هدفت الدراسة إلى التحري عن تواجد جرثومة الليستيريا في بيض المائدة المباع في الأسواق المحلية في مدينة بغداد للمدة من تشرين الثاني 2010 لغاية آذار 2011. جمعت 300 بيضة مائدة بواقع 150 بيضة ذات قشرة بيضاء و 150 بيضة ذات قشرة بنية من مناطق مختلفة من مدينة بغداد، وعوملت النماذج حيث تم تحليلها ومعالجتها وفقاً للطرائق القياسية الموحدة لإدارة الغذاء والدواء (FDA) والمنظمة الدولية للتوحيد القياسي (ISO) مع بعض التحويرات. بعد إعداد وسائط الزرع المعقمة، أضيف جزء من الأنموذج التحليلي إلى 9 أجزاء من مرق أنعاش الليستيريا، خلطت بشكل جيد داخل الهاضم وحضنت في 30 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة. بعد 24 و 48 ساعة تم زرعها على أجار الانتقائية الليستيريا (ALOA). ظهرت مستعمرات *Listeria monocytogenes* خضراء إلى زرقاء اللون، محدبة دائرية أو مسننة مع هوامش كاملة وهالة معتمة بينما الأجناس الأخرى ظهرت مستعمراتها من دون أي هالة. تم تأكيد العزلات بوساطة اختبار ترانس اللاتكس (Oxoid)، المملكة المتحدة، وتم عزّل الجنس *Listeria monocytogenes* عن بقية الأجناس بوساطة اختبار عدة O.B.I.S. mono (Oxoid)، المملكة المتحدة. أظهرت النتائج عزل وتشخيص جرثومة الليستيريا بواقع 54 عزلة (18%) من 100 أنموذج: 30 عزلة (10%) من نماذج البيض ذو القشرة البنية كان منها 6 عزلات (2%) النمط المصلي *Listeria monocytogenes* و 24 عزلة (8%) من نماذج البيض ذو القشرة البيضاء كان منها 3 عزلات (1%) النمط المصلي *Listeria . monocytogenes*. نستنتج من هذه الدراسة تلوث بيض المائدة بجرثومة الليستيريا وينصح بمراقبة هذه المنتجات لضمان الصحة العامة.

of gram positive bacteria causing cell lysis (8,9) thus reducing contamination unless carrier flocks and contaminated eggs cartons causing recontamination of hatching and table eggs (3,5). Egg white also contains avidin, which forms a complex with biotin, thereby making this vitamin unavailable to microorganisms (3). In addition, egg white has a high pH (about 9.3) and contains conalbumin, which forms a complex with iron, thus rendering it unavailable to microorganisms (3). On the other hand, the nutrient content of the yolk material and its pH in fresh eggs (about 6.8) make it an excellent source of growth for most microorganisms (3). Freshly laid eggs are generally sterile. However, in a relatively short period of time after laying, numerous microorganisms may be found on the outside and, under the proper conditions, may enter eggs, grow, and cause spoilage (3). The speed at which microbes enter eggs is related to temperature of storage, age of eggs, and level of contamination (3). The entry of microorganisms into whole eggs is favored by high humidity and climatic periods (2). Under such conditions, growth of microorganisms on the surface of eggs is favored, followed by penetration through the shell and inner membrane. The latter structure is the most important barrier to the penetration of bacteria into eggs, followed by the shell and the outer membrane (3). Due to the growing interest in healthy foods and the lacks in information about contamination rates in listeriosis associated with table eggs in Baghdad city, there was a need to run this investigation to put our hands on the incidence of *Listeria* especially *L. monocytogenes* in table eggs and to how extent listeriosis can occur.

## INTRODUCTION

*Listeria* especially *Listeria monocytogenes* are gram-positive, rod-shaped bacteria found in soil, stream water, sewage, plants and food especially in raw, unpasteurized milk and its products as well as, in low grade quality and post-thermal treated products of food especially milk (1,2,3,4,5). They are responsible for listeriosis, a rare but potentially lethal food borne infection ranging from flu-like syndrome or gastroenteritis to deadline infection of nervous system causing meningitis and abortion in pregnant women (4). *Listeria* species are incredibly and hardy able to grow in refrigerator at 4 C° to 37 C° the body's internal temperature (4). The presence of any *Listeria spp.* in food may be an indicator of poor hygiene (3). Eggs have been found to be 90% sterile when laid. However, eggs have the potential to become contaminated with bacteria from the hen's intestinal tract, feces, and from the surrounding environment (2,3). *Listeria monocytogenes* is found in both wild and domestic mammals as well as birds and some species of fish and shellfish (3). *Listeria monocytogenes* can be found in both the egg processing plant environment as well as in the egg itself (6). Bacteria especially *Salmonellae* can rapidly penetrate the shell of a freshly laid egg (7). An egg contaminated at the breeder farm can then cause contamination at the hatchery, creating a reservoir of *salmonellae* (7). The hen's egg is an excellent example of a product that normally is well protected by its intrinsic parameters (3). Externally, a fresh egg has three structures, each effective to some degree in retarding the entry of microorganisms: the outer waxy shell membrane; the shell; and the inner shell membrane (3). Internally, lysozyme is present in egg white as antibacterial properties of eggs which hydrolyze the polysaccharide bacterial cell wall especially the peptidoglycans

separately in Trypton Soya Yeast Extract Agar (HiMedia, India). After that, the colonies were checked morphologically and their purity controlled by Gram staining. Later, the separated colonies were then subjected to carbohydrate fermentation tests (mannitol, D-xylose, rhamnose), catalase activity, oxidase activity, modified motility test with triphenyltetrazolium chloride salts (Umbrella formation), esculin hydrolysis (13). The colonies isolated as *Listeria* were then subjected to  $\beta$ -hemolysis in a 7% sheep blood agar for species identification. Confirmation of *Listeria* isolates was done by Latex Agglutination test (Oxoid, UK), and differentiation of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria spp.* was done by Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.mono test kit, Oxoid).

## RESULTS AND DISCUSSION

Results revealed that out of the 300 samples, 54 samples (18%) were contaminated with different *Listeria* species as 30 (10%) isolates from brown eggs shells, from which 6 (2%) isolates were confirmed as *Listeria monocytogenes*, and 24 (8%) isolates from white eggs shells, from which 3 (1%) isolates was confirmed as *Listeria monocytogenes*, as shown in table (1).

**Table (1). Isolation of *Listeria* species from table-eggs.**

Sample Type	Brown shells eggs		Total	White shells eggs		Total
	Shells	Internal contents	150	Shells	Internal contents	150
<i>Listeria spp.</i>	21(7%)	9 (3%)	30 (10%)	18 (6%)	6 (2%)	24 (8%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	3 (1%)	3 (1%)	6 (2%)	3 (1%)	none	3 (1%)

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of table-eggs Samples:

This study was conducted on table-eggs sold in different locally markets in Baghdad province. A 300 table-eggs (150 white shell eggs and 150 brown shell eggs from different origins) were collected into sterile none durable plastic bags and transported aseptically to the laboratory of food hygiene in Baghdad Veterinary College during November 2010 till March 2011. Each 5 eggs (mixed composite samples) were divided into two parts: broken homogenized shells and mixed internal contents, then refrigerated at 4C° for 3-5 days as critical step in isolation of *listeria*.

### Isolation of the *Listeria* species:

After preparation of sterile media, a (5-10) g or ml of sample was added to a (45-90) ml of Trypton Soya Yeast Extract Broth (HiMedia, India), then inoculated according to standard protocols, in which a portion of analytic sample was added to 9 portions of *Listeria* enrichment broth (10,11,12,13). For a homogenous distribution of the sample in the medium it was shaken for 2-3 minutes inside stomacher. Media so inoculated were then incubated at 30 C° for 24-48 hours. After 24 and 48 hours enrichment processing, the culture was made on the *Listeria* Selective Agar (ALOA, OCLA, Oxoid). The planted plates were incubated for 24-48 hours at (35-37) C° under aerobic conditions. At the end of the incubation, they were evaluated as typical colonies with a blue-green colored, smooth, convex, circular or crenate with entire margins and opaque halo of 1-3 mm in diameter while the others *Listeria spp.* appear as blue-green colonies without any halo (14,15). The typical *Listeria* colonies observed on the culture medium were selected and cultured

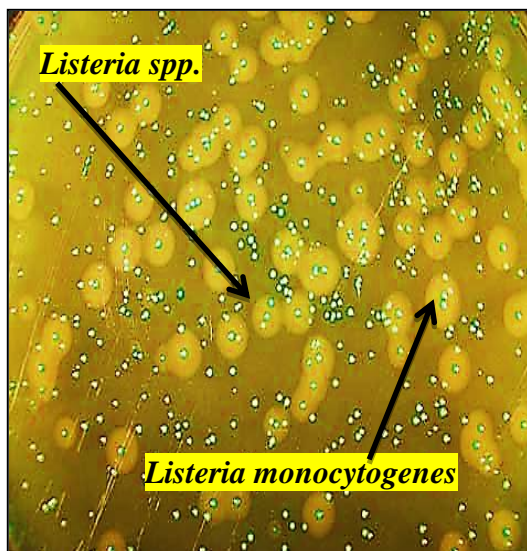


Figure (1): *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*

Table eggs are one of the few foods that are used among the popular dishes consumed by people at home, restaurants and convenience stores in their natural states with no artificial additives (9). Most freshly laid eggs are sterile, at least from inside in case of good flock management and absence of vertical transmission also by the presence of cuticle, shell membranes and the antimicrobial properties of eggs (8). But eggs may constitute, if contaminated with pathogens, a public health hazard. The ability of *Listeria* to grow in hen's eggs was first recognized in 1940 when Paterson (3) inoculated a laboratory culture of *L. monocytogenes* into the chorioallantoic membrane of a chicken embryo. An added concern with poultry relates to eggs that can become contaminated with this pathogen during collection and processing. Eggs have the potential to become contaminated with bacteria from the hen's intestinal tract, feces, and from the surrounding environment (3). The results revealed high incidence for isolation of *listeria* especially *Listeria monocytogenes* from table eggs due to contamination from the shells during the breaking process or from the processing environment (16), with incidence

*Listeria monocytogenes* appeared on chromogenic ALOA (OCLA) Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar) as a blue-green colored, smooth, convex, circular or crenate colonies with entire margins and opaque halo while the others *Listeria* spp. appear as blue-green colonies without any halo (13) as shown in figure (1). The results of biochemical tests, *Listeria* latex agglutination test and O.B.I.S.mono test to differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* spp. are present in table (2).

Table (2). *Listeria* biochemical and confirmation tests.

Test	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.
Gram-positive rod	+	+
Umbrella formation	+	+
$\beta$ -Hemolysis	+	-
Catalase activity	+	+
Oxidase activity	-	-
Esculin hydrolysis	+	+
Rhamnose fermentation	+	v
D-Xylose fermentation	-	v
Mannitol fermentation	-	v
<i>Listeria</i> latex agglutination	+++	+
O.B.I.S.mono	+	-

+ = positive test, - = negative test, v = variable results and +++ = strongly fast positive result

## REFERENCES

1. الشمري , علي حسن أحمد 2009. التحري عن جرثومة *Listeria monocytogenes* في الحليب وبعض منتجات الألبان في بغداد, أطروحة دكتوراه, كلية الطب البيطري, جامعة بغداد.
2. عبد المنعم , معتز عبد الواحد 1992. تأثير درجة حرارة الخزن على الحمل الجرثومي لببيض المائدة, رسالة ماجستير, كلية الطب البيطري, جامعة بغداد.
3. Ryser ET. 1999. Foodborne *listeriosis*. In: Ryser ET and Marth EH. (ed.). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA. , p. 299-358.
4. Dong YL. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1<sup>st</sup> ed. CRC Press, USA.
5. Jay JM., Loessner MJ. and Golden DA. 2005. Modern Food Microbiology, 7<sup>th</sup> ed., Aspen Pub. Gathersburg MD, USA.
6. Egg Safety Center. 2010. The Egg Safety Center works to educate consumers on ways to further reduce the incidence of food-borne illness related to egg products, USA. [www.eggsafety.org]
7. Berrang, ME., Frank JE. and Mauldin JM. 1997. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the egg production period. J Appl. Poultry Res. 6: 298-305.
8. Yadava NK. and Vadehra DV. 1977. Mechanism of egg white resistance to bacterial growth. J. Food Sci. 42:97-99.
9. Mohammed S., Moemen AA., Mahmoud F. and Rafaat H. 2009. Using of PCR assay for identification of *Listeria monocytogenes* recovered from table eggs. Veterinary World 2(12):453-455.
10. Hitchins, A. D. 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In George J. Jackson, Robert I. Merker, and Ruth Bandler (ed.), Bacteriological analytical manual online, 8th ed. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. [Online.]

inside internal contents may be due to transmission of *listeria* through shell cracks during processing, collection, transport and bad storage or through carrier hens or eggs cartons with high dose (microbial load) leading to these hazard findings. Hence, it is necessary to adopt strict hygienic measures for controlling *listeria* especially *Listeria monocytogenes* in table-eggs (17) such as: 1) choosing of healthy mother's hens (to obtain eggs-free pathogens), 2) hygienic measures in the farms during handling and storage, 3) using of hot soapy water with those come in contact with eggs and eggs containing foods in work areas, 4) eggs must be held at low temperature (5 C°) to prevent proliferation of pathogens, 5) cleaning with sanitizer minimizes the contamination of shells, 6) educational programs for consumers informed the risks resulted from eating under cooked eggs particularly the elderly and immune-comprised persons who are more susceptible to infection, and 7) pasteurization of egg products as statutory requirements in many countries.

## CONCLUSION

Since *Listeria* species were found to a large extent in our table-eggs samples and *Listeria monocytogenes* was encountered, it should be mandatory to perform routine controls to screen table-eggs for detection of *Listeria spp*. Our findings suggest that *Listerial* infections are not a potential risk in Baghdad province; it is strongly recommended however that these products are monitored carefully. The implementation of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) Programs in table-eggs industries is essential for addressing food safety for population of Baghdad province, as well as intervention and education of people involved in the production, processing and monitoring the table-eggs.



studying the best cooking methods for their destruction. Assiut Vet Med J 54:59-77.

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.

11. FDA Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual. 8. Ed. AOAC International Gaithersburg M.D., p.562.
12. International Organization for Standardization, 11290-1. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. ISO, Geneva, Switzerland.
13. Pagotto F., Daley E., Farber J. and Warburton D. 2001. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. HPB-30, Health products and food branch, HPB Method, Ottawa, Canada.
14. Ottaviani F., Ottaviani M. and Agosti M. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*, Quimper Froid Symposium Proceedings, p.6, A.D.R.I.A. Quimper, 16-18.
15. Vlaemynck G., Lafargue V. and Scotter S. 2000. Improvement of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J Appl Microbiol 88: 430.
16. Foegeding PM. and Leasor SB. 1989. Heat resistance and growth of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. J Food Prot 85-89.
17. Korashy E., Wahba N. and Hassanein R. 2008. Public health hazards of some bacterial pathogens associated with consumption of eggs and

قسم الدراسات العربية

**ARABIC SECTION**

## تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الانيولينيز Inulinase Enzyme المنتج من خميرة *Kluyveromyces marixians*

غازي منعم عزيز، وسحر إرحيم حسين، وزيد علي حسين

قسم التقنيات الإحيائية - كلية العلوم / جامعة بغداد - العراق

البريد الإلكتروني: saharalassadi@yahoo.comr

### الخلاصة باللغة العربية

تم الحصول على خميرة *Kluyveromyces marixians* من جامعة بغداد - كلية الزراعة / قسم الصناعات الغذائية والتقنيات الحيوية بعد عزلها وتشخيصها ، حددت الظروف المثلى لانتاج الانزيم Inulinase enzyme بطريقة المزارع المغمورة للعزلة المحلية باستخدام وسط السكر وسطح السكر ومستخلص الخميرة والبيتون كوسط امثل لانتاج الانزيم وحدد التركيز الامثل للسكر وسطحاً كربونياً 3%، والبيتون ومستخلص الخميرة 1.5% مصدراً نيتروجينياً ، عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 4.5 بعد 24 ساعة من الحضانة بدرجة حرارة 35 °م بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة.

### ABSTRACT

We obtained the Yeast *Kluyveromyces marixians* from Baghdad University - College of Agriculture / Department of food industries and biotechnology after its isolation and diagnosis, identified the optimal conditions for the production of the inulinase enzyme from the local isolate, by using submerged culture by using the sucrose, yeast extract and peptone medium. Optimization studies revealed that sucrose was the best carbon source at 3%, peptone and yeast extract 1.5% as a nitrogen source, at initial pH 4.5 for 24 hours at 35°C by using shaking incubator at 150 rpm

## المقدمة

تهدف الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الانيوولينيز المستخلص من العزل المحلية لخميرة *Kluyveromyces marixians*.

## المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص خميرة *Kluyveromyces marixians*

تم الحصول على خميرة *Kluyveromyces marixians* من جامعة بغداد - كلية الزراعة / قسم الصناعات الغذائية والتقنيات الحيوية بعد عزلها وتشخيصها بتتميتها على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) واعتماد الفحوصات المجهرية والكيموحيوية لثبيت الصفات الزرعوية للمستعمرات .

## تقدير فعالية انزيم الانيوولينيز وتركيز البروتين

قدرت فعالية انزيم الانيوولينيز في المحاليل الناتجة بعد فصل خلايا الخميرة وفق الطريقة الموصوفة من قبل Miller (10) التي تعتمد على تحليل الانيوولين ( مادة التفاعل المحضرة بتركيز 1% في داري خلاص الصوديوم ) الى السكريات المختزلة المكونة له بفعل الانزيم ، تعرف وحدة الفعالية الانزيمية (وحدة / مللتر) على انها كمية الانزيم التي تحرر مايكرومولا من السكريات المختزلة (الفركتوز) في الدقيقة الواحدة وتحت الظروف القياسية. اماطريقة تقدير البروتين فقد قدرت وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford وجماعته (11) بالاعتماد على المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري واستعمال صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 عند طول موجي 595 نانوميتر .

## تحديد الظروف المثلى لانتاج الانيوولينيز

1. تعيين نوع الوسط الامثل لانتاج انزيم الانيوولينيز:

تم انتخاب مجموعة الاوساط الانتاجية لانتاج انزيم الانيوولينيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* بتتميتها في كل وسط من هذه الاوساط على حدة بعدها تم استخلاص الانزيم وقيست فعاليته وتركيز البروتين في كل وسط من هذه الاوساط.

2. تعيين تركيز المصدر الكربوني الامثل لانتاج الانيوولينيز:

تم تعيين تركيز المصدر الكربوني الامثل لانتاج انزيم الانيوولينيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* باضافة السكر الى الوسط وبتراكيز مختلفة وهي (0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 2.5 ، 3 ، 3.5 ،

يعد الفركتوز من السكريات الاحادية ذات الحلاوة العالية ( 170% مقارنة بحلاوة السكروز) كما انه يتميز بقابلية ذوبان عالية ولزوجة قليلة ( 1) كما اثبتت الابحاث ان للفركتوز دور في زيادة قابلية امتصاص الحديد لدى الاطفال وزيادة قدرة الجسم للتخلص من الايثانول(2) ويمكن الحصول عليه من تحليل النشا ويكون ناتج حاوي على 42% فركتوز و 50% كلوكوز و 8% سكريات اخرى (3). يعتبر الفركتوز وحدة البناء الاساسية في الانيوولين حيث يتكسبون الاخير من سلسلة خطية تحتوي على اصرة من نوع  $\beta$ -2,1-fructose ، وتحتوي نهاية السلسلة على سكر السكروز (4) ، ويعد الفركتوز من الالياف الذائبة الموجودة في العديد من النباتات مثل درنات الالمازة *Jerusalem artichoke* وغيرها (5) والذي يمكن تكسيره بطريقة كيميائية اما باستخدام الحامض والحرارة فينتج اضافة للفركتوز والكلوكوز مركبات اخرى غير مرغوب بها مثل مركبات الفورفورال وغيرها، او بطريقة انزيمية باستخدام انزيم الانيوولينيز فينتج الفركتوز 95% اضافة للكلوكوز 5% دون اي مركبات اخرى ومن الممكن استخدام ناتج التحلل في العديد من الصناعات الاخرى مثل انتاج الايثانول(6) .

ينتمي انزيم الانيوولينيز الى صنف مهم من اصناف الانزيمات الصناعية Industrial enzymes وهو انزيم قادر على تحليل الانيوولين مائيا حيث يقوم بتحليل سلسلة  $\beta$ -fructan linkage of  $\beta$ -(2-1) ، ويضم هذا الانزيم تحت صنفين هما Exo-Inulinase ( $\beta$ -D-fructopyranoside fructo-hydrolase) (E.C.3.2.1.80) والذي يعمل على تحليل الفركتوز الطرفي في سلسلة الانيوولين بينما Endo-Inulinase ( $\beta$ -D-fructopyranoside fructo-hydrolase) (E.C.3.2.1.7) والذي يختزل السلسلة الطويلة في الانيوولين الى سلسلة قصيرة من الـ Oligosaccharides والتي تشبه الـ Fructooligosaccharides (7) .

الكثير من الاحياء المجهرية ومنها الفطريات الخيطية Filamentous Fungi والخميرة والبكتريا لها القابلية على انتاج انزيم الانيوولينيز لكن استقطب انتاجه من الخمائر والاعفان برغم انتاجه من العديد من الاحياء المجهرية (8) وذلك لسهولة استخلاصه بعد افرازه في بيئة النمو فضلا عن متطلبات هذه الاحياء التغذوية اليسيرة اضافة الى ملائمتها لتخميرات الحالة الصلبة Solid State Fermentation مقارنة بالمزارع المغمورة كما يمكن استغلال المخلفات الزراعية والصناعية في انتاج الانزيمات مما ينعكس على خفض تكاليف الانتاج (9) .

## النتائج والمناقشة

4% وتم استخلاص الانزيم وقياس فعاليته وتركيز البروتين.

### 3. تعيين تركيز المصدر النتروجيني (الببتون) الامثل لانتاج الانبولىنيز:

درس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من المصدر النتروجيني (الببتون) في انتاج انزيم الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* بتميته على الوسط الانتاجي وباستخدام تراكيز مختلفة من الببتون في هذا الوسط شملت (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3 %) بعدها تم استخلاص الانزيم وقدرت فعاليته وتركيز البروتين في كل تركيز من هذه التراكيز لتحديد التركيز الامثل من الببتون في انتاج الانزيم.

### 4. تعيين تركيز المصدر النتروجيني (مستخلص الخميرة) الامثل لانتاج الانبولىنيز:

درس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من المصدر النتروجيني (مستخلص الخميرة) في انتاج انزيم الانبولىنيز من الخميرة بتميته على الوسط الانتاجي وباستخدام تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة في هذا الوسط شملت (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3 %) بعدها تم استخلاص الانزيم وقدرت فعاليته وتركيز البروتين في كل تركيز من هذه التراكيز لتحديد التركيز الامثل من مستخلص الخميرة في انتاج الانزيم.

### 5. تعيين مدة الحضانة المثلى لانتاج الانبولىنيز:

تم متابعة انتاج الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* بمدد زمنية مختلفة هي: (24، 48، 72، 96، 120) ساعة لتحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج انزيم الانبولىنيز.

### 6. تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل:

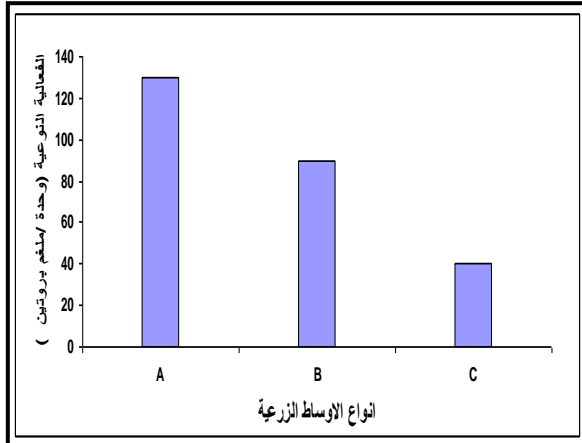
حضر الوسط الانتاجي للانبولىنيز بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (3.5-7) وبفارق 0.5 بين درجة واخرى كلا على افراد لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم .

### 7. تحديد درجة الحرارة المثلى

حضر الوسط الغذائي لانتاج الانبولىنيز بدرجات حرارة مختلفة شملت (25، 30، 35، 40، 45، 50 درجة مئوية) لمدة 24 ساعة كلا على افراد لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* .

### تحديد الوسط الامثل في انتاج الانبولىنيز

اختبرت ثلاثة اوساط زرعية في تنمية العزلة المحلية من خميرة *Kluyveromyces marixians* ودراسة تأثيرها في انتاج انزيم الانبولىنيز تمثلت بالوسط A و B و C ، اذا تغايرت هذه الاوساط في تراكيز مكوناتها من السكرز ومستخلص الخميرة والببتون و  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  و  $NH_4NO_3$  و  $K_2HPO_4$  وظهرت العزلة المنتخبة تباينا في قابليتها على انتاج الانبولىنيز في الاوساط المختلفة فقد عد الوسط A المتكون من (3 غم من السكرز ، 2 غم من مستخلص الخميرة و 2 غم من الببتون كمصدر نتروجيني ، 0.5 غم من  $NaCl$  ، 0.4 غم من  $K_2HPO_4$  ، 0.25 غم من  $NH_4NO_3$  ، 0.05 غم من  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ، 0.01 غم من  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) من افضل الاوساط الغذائية لكفائته في انتاج الانبولىنيز ، اذ بلغت الفعالية النوعية 130 وحدة / ملغم بروتين يليه الوسط B بفعالية نوعية 89.79 وحدة / ملغم بروتين ويليه الوسط C بفعالية نوعية 40 وحدة / ملغم بروتين ، كما هو موضح في (الشكل-1) .

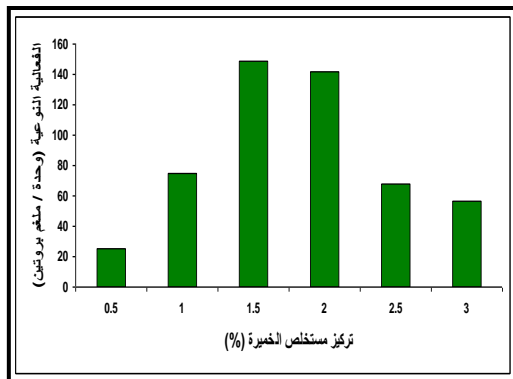


(الشكل-1) كفاءة الاوساط الغذائية المختلفة في انتاج الانبولىنيز من العزلة المحلية لخميرة *Kluyveromyces marixians*

جاءت هذا النتائج مطابقة الى ما اشار اليه الباحث Vandamme (12) ، كذلك كانت هذا النتيجة مطابقة الى نتائج الباحث Ettalibi (13) الذي اشار الى ان انتخاب الوسط الامثل لانتاج انزيم الانبولىنيز من فطر *Aspergillus ficuam* تعتمد على تغيير في تراكيز مكونات الوسط الزراعي.

تحديد تركيز المصدر الكربوني الامثل في انتاج الانزيم

**Kluyveromyces marixians** اذ لوحظ ان افضل تركيز للبيتون كان 1.5% اذ بلغت الفعالية النوعية 134.8 وحدة / ملغم بروتين قياسا بباقي التراكيز المستعملة ( الشكل - 3 ) ، كانت هذه النتائج مقارنة لنتيجة الباحث **Kalil** وجماعته (17) الذي بين ان التركيز الامثل من البيتون كان 2% لانتاج انزيم الانيزولينيز من خميرة **Kluyveromyces marixians**.



(الشكل-3) تأثير تراكيز مختلفة من البيتون في انتاج الانيزولينيز من العزلة المحلية لخميرة **Kluyveromyces marixians**

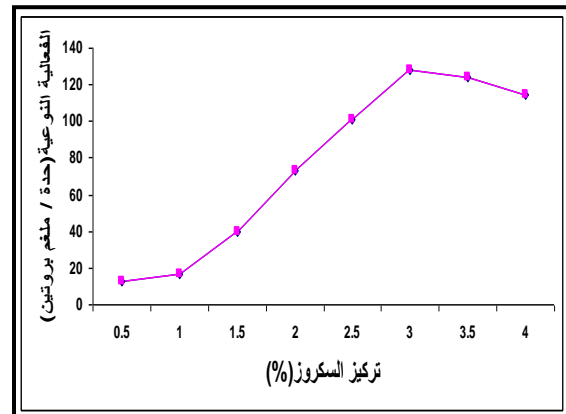
#### تحديد التركيز الامثل من مستخلص الخميرة في انتاج الانزيم

لوحظ انخفاض في الفعالية النوعية عند المعاملة المحتوية على ( 0.5% و 1% ) من مستخلص الخميرة (الشكل - 4) ، حيث لم تتجاوز الفعالية النوعية للانزيم عن 69.3 وحدة / ملغم بروتين ، ووصلت حوالي 138.4 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 1.5 % ثم بدأت بالانخفاض مع زيادة تركيز مستخلص الخميرة لتصل الى 72 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 3 % ، وقد يعزى هذا الانخفاض في الفعالية مع زيادة تركيز المصدر النروجيني الى التأثير التثبيطي للامحاض الامينية الناتجة من هضم مستخلص الخميرة على انتاج الانزيم (18).

كانت هذه النتائج مقارنة لنتيجة الباحث **Kalil** وجماعته (17) الذي وضع ان التركيز الامثل من مستخلص الخميرة كان 1% لانتاج انزيم الانيزولينيز من خميرة **Kluyveromyces marixians** ، توضح هذه النتائج ان انتاجية الانيزولينيز تتحدد بمكونات الوسط الزراعي اذ اظهرت انتاجية عالية عند تزويد الوسط الزراعي بالمصدر النروجيني البيتون ومستخلص الخميرة بتركيز 1.5% ، ويؤدي التباين في تراكيز المواد المجهزة للوسط الزراعي دوراً مهماً في انتاجية الانزيم من قبل الاحياء المجهرية (19)

اضيف سكر السكروز الى الوسط الانتاجي بتركيز مختلفة بوصفه مصدراً كربونياً لانتاج الانيزولينيز من العزلة **Kluyveromyces marixians** لبيان تأثيره في انتاج الانزيم (الشكل-2) . لوحظ انخفاض في الفعالية النوعية عند التراكيز (0.5-2.5) % اذ لم تتجاوز الفعالية النوعية للانزيم 100.8 وحدة / ملغم بروتين ، مع زيادة تدريجية بلغت حوالي 127.9 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 3 % ثم بدأت بالانخفاض لتصل الى 114.8 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 4 % . بين الباحث Marcia (14) ان التركيز الامثل من السكروز لانتاج الانيزولينيز من خميرة

**Kluyveromyces marixians** كان 1% ، كما اشار الباحث Mughal وجماعته (15) الى ان التركيز الامثل من السكروز في انتاج الانيزولينيز من فطر **Geotrichum candidum** هو 0.5% ، يلعب المصدر الكربوني دوراً مهماً في تجهيز الطاقة التي يحتاجها الكائن الحي في النمو والتكاثر والانتاج ، ويمكن ان يعزى انخفاض انتاجية الانزيم عند التراكيز المنخفضة من السكروز الى عدم كفاية هذه التراكيز من السكر في نمو البكتريا وتحفيزها على انتاج الانزيم . وقد يعود انخفاض الانتاجية عند التراكيز العالية من السكر الى تغير حامضية الوسط الغذائي وانخفاضها بسبب نواتج الايض الخلوي اثناء مدة التخمر (16).

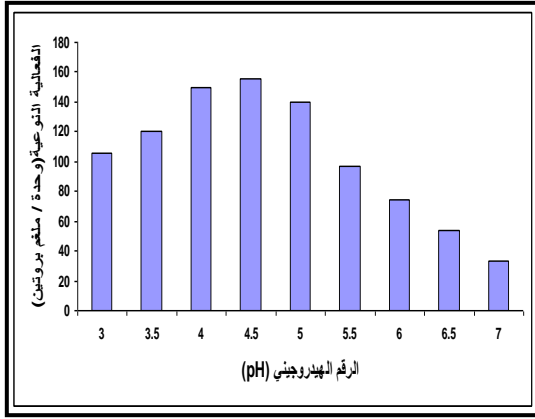


(الشكل-2) تحديد التركيز الامثل من السكروز لانتاج الانيزولينيز من العزلة المحلية لخميرة

**marixians Kluyveromyces**

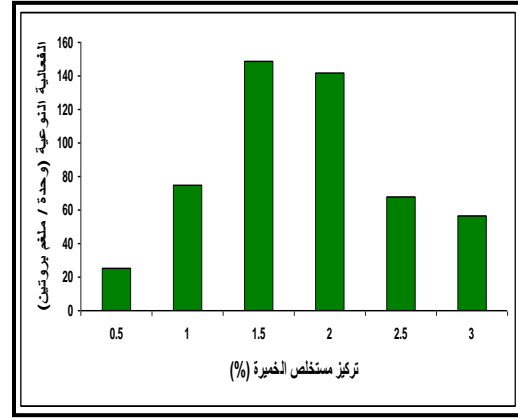
#### تحديد تركيز المصدر النروجيني الامثل (البيتون) في انتاج الانيزولينيز

لاجل تحديد التركيز الامثل للبيتون اضيفت الى الوسط الانتاجي بتركيز مختلفة بوصفه مصدراً مهماً للنتروجين لانتاج الانيزولينيز من العزلة المحلية لخميرة



(الشكل-5) تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الانبولىنيز من خميرة

*Kluyveromyces marixians*



(الشكل-4) تعيين التركيز الأمثل من مستخلص الخميرة في إنتاج الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians*

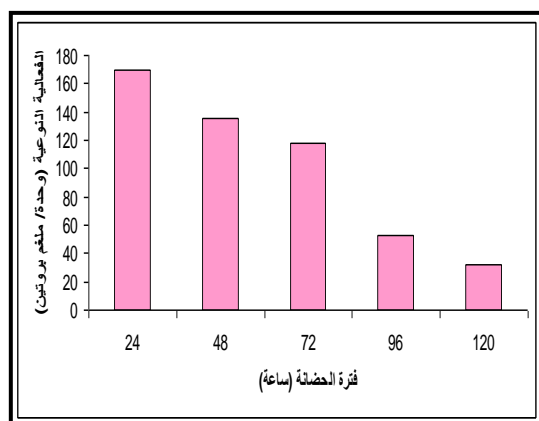
#### تعيين درجة الحرارة المثلى في إنتاج الانزيم

درس تأثير مدى من درجات الحرارة في إنتاج الانبولىنيز وبينت النتائج ان درجة الحرارة 35 °م هي الأفضل لإنتاج الانزيم اذ بلغت الفعالية النوعية لإنتاج الانزيم من خميرة *Kluyveromyces marixians* 147.2 وحدة/ملغم بروتين (الشكل-6). لقد لوحظ ظهور فعالية انزيمية منخفضة عند الدرجات الحرارية المتطرفة (البعيدة عن 35 °م<sup>0</sup>)، ويمكن ان يعزى ذلك الى عدم ملائمة هذه الدرجات لنمو البكتيريا اذ يتباطأ النمو ويتأخر بناء الانزيم نتيجة لانخفاض وارتفاع درجة الحرارة فضلاً عن دنثرة (مسخ) الانزيمات عند ارتفاع درجة الحرارة عن حدودها المثلى. ان درجة الحرارة لها تأثير مهم في إنتاج الانزيم من الاحياء المجهرية عن طريق تأثيرها في ذائبية الاوكسجين بالوسط الغذائي، وزيادة الطاقة الحركية للجزيئات، وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية وينعكس ذلك سلباً او ايجابياً في إنتاج الانزيم (22)، كذلك وضع العالم Darija وجماعته (20) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* كانت بين (30-33) م<sup>0</sup>، كما وضحت الباحثة Maria وجماعته (6) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانبولىنيز من فطر *Aspergillus niveus* كانت 45 م<sup>0</sup>.

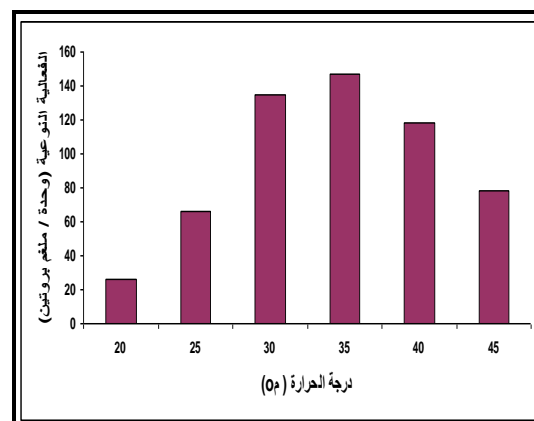
#### تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل في إنتاج الانزيم

اختبرت قابلية العزلة المحلية لخميرة *Kluyveromyces marixians* على إنتاج الانبولىنيز باستخدام الوسط الانتاجي بارقام هيدروجينية مختلفة واطهرت النتائج ان افضل رقم هيدروجيني للإنتاج هو 4.5 اذ بلغت الفعالية النوعية للعزلة المحلية لخميرة *Kluyveromyces marixians* 156 وحدة/ملغم بروتين (الشكل-5).

لقد وضع الباحث Darija وجماعته (20) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الانبولىنيز من خميرة *Kluyveromyces marixians* كان 3.6، كذلك بينت الباحثة Maria وجماعته (6). ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الانبولىنيز من فطر *Aspergillus niveus* كان 4 و4.8، ويأتي تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي الى دوره في ذائبية المركبات في الوسط فضلاً عن تأثيره في الفعاليات الايضية للكائن الحي وتأمين و ثباتية المركبات الحيوية خلال عمليات التخمر ومن ثم تأثيره في نمو الخميرة وإنتاج الانزيم، وتذكر العديد من الدراسات الى ضرورة السيطرة ومتابعة الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي لاجل الحصول على انتاجية مثلى للمواد المفروزة من الاحياء المجهرية فضلاً عن المحافظة على فعاليتها وثباتها (21). ان اعلى إنتاج لمعظم الانزيمات الخارج - خلويه يكون في الارقام الهيدروجينية المثلى للنمو مع بعض الاستثناءات التي يكون فيها الرقم الهيدروجيني الأمثل للنمو يختلف قليلاً عن قيمه في إنتاج الانزيم (22).



(الشكل-7) تحديد فترة الحضانة المثلى لإنتاج الأنزيم من خميرة *Kluyveromyces marxianus*



(الشكل-6) تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم من خميرة *Kluyveromyces marxianus*

#### المصادر

1. السعيد ، جاسم محمد (2003) تنقية وتوصيف انزيم الانفرتين المنتج من العزلة المحلية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* FY3 . رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد - العراق
2. Sarup SR, Dhaliwal R and Puri M (2007) Partial purification of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high - fructose syrup. J. Micro. Bio.17 (5):731-738.
3. Mazutti M, Bender P and Treichel H (2007) Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugar cane bagasse as substrate. Curr. Opin micro.6:315-319.
4. Ertan F, AktacT, Kabogly A. and Baker E. (2003) Determination of optimum conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*.
5. Parekh SR and Margaritis A (1986) Continuous hydrolysis of fructans of Jerusalem artichoke extracts using immobilized nonviable cell of *Kluyveromyces marxianus*. J Food.Science.51(3):854-855.
6. Maria. C. and Auxiliadora M (2005) *Aspergillus niveus* Blochwitz 4125 URM: New Source for inulinase

#### تحديد مدة الحضانة المثلى لإنتاج الأنزيم

تم متابعة إنتاج الأنزيم من العزلة المحلية لخميرة *Kluyveromyces marxianus* في درجة الحرارة المثلى (35°C) لمدة زمنية مختلفة. وظهرت النتائج أن أفضل إنتاج للأنزيم كان بعد 24 ساعة من الحضانة إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 170 وحدة/ملغم بروتين (الشكل - 7). بعدها انخفضت الإنتاجية حتى وصلت أدنى مستوياتها بعد 96 ساعة من الحضانة وهذا يعني أن جزءاً غير قليل من الأنزيم المنتج من الخميرة قد يكون تعرض إلى التدهور إما بفعل ما طرأ على وسط الإنتاج من تغيرات لاسيما في الرقم الهيدروجيني أو بسبب إفرازات إنزيمات أخرى من البكتيريا نفسها إلى وسط الإنتاج ومنها الأنزيمات المحللة للبروتينات (proteases) التي يحتمل أنها حلت جزءاً من جزيئات أنزيم الأنزيم الموجودة في الوسط (23)، كذلك يمكن أن يعزى الانخفاض في الفعالية الإنزيمية عند إطالة مدة الحضانة أكثر من 24 ساعة إلى قلة المحتوى الغذائي في الوسط الزراعي مع تراكم مواد الأيض المختلفة والنواتج من نمو البكتيريا إضافة إلى إنتاج بعض المواد المثبطة لنمو الخلايا في الوسط الغذائي (24)، أو بسبب حدوث هضم ذاتي للأنزيم أو تثبيط بواسطة النواتج النهائية الذي ينعكس سلباً على فعالية الأنزيم (25)، جاءت هذه النتائج مغايرة إلى ما أشار إليه الباحث Kumar (26)، الذي بين أن أنزيم الأنزيم المستخلص من خميرة *Kluyveromyces marxianus* يمكن أن ينتج بعد 72 ساعة، كما أشار الباحث Sheng إلى أن فترة الحضانة المثلى لإنتاج أنزيم الأنزيم من خميرة *Cryptococcus aureus* هي 42 ساعة (27)



- flourocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using two-factorial design . Bioresource technology. (14) : 3657-3662
16. Cohen J O (1969) Effect culture medium composition and pH on the production of M protein and proteinase by group A streptococci. J. Bacteriol., 99: 737 – 744.
17. Kalil SJ, Suzan R, Maugeri F, Rodrigues MI. (2001) Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. Appl Biochem Biotechnol. 94(3):257-64.
18. White TC and Agabia N. (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. Isoenzyme pattern is determined by cell type and levels are determined by enviromental factors. J. Bacteriol., 177(18): 5215-5221.
19. Englar S. and Seifter S. (1990) Precipitation techneques .In: Methods in enzymology (ed Deutseher,M.D.), 189: 286-300. Acadimic Press.
20. Darija V, Želimir K. (2005) Modelling and optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*.Anal.Chem.31:426-428
21. Parente E and Ricciardi A. (1999). Production,recovery and purifications from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52 : 628– 638.
22. Volesky B and Luong L. (1985) Microbiol enzymes. Production, purification and isolation. Critical Rev. Biotechnol., 2: 119– 146.
23. Santos E D and Martins M LL(2003) Effect of the medium composition on formation amylase by *Bacillus* sp. Brazil .Arch . Biolo . Technol . 46 (1) : 129 -134.
- production. Braz. Arc. Bio. Tech. 48: 343 - 350.
7. Kochhar A., Kaur N and Gupta AK (1997) Inulinase from *Aspergillus versicolor* . Apotential enzyme for production fructose fron inulin. J. Sic. Ind. Rec.56: 721-726
8. عودة ، جاسم محمد (2008) دراسة الظروف المثلى لانتاج الانبولىنيز للعزلة محلية للعفن *Aspergillus niger* J3 .مجلة العلوم الزراعية العراقية. 39(5) 52-60.
9. الراوي ، رشا محمد (2004) انتاج الانفريتيز من العفن *Aspergillus terreus* بواسطة تخمرات الحالة الصلبة. رسالة ماجستير – كلية الزراعة- جامعة بغداد- العراق
10. Miller GL. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31: 426-428
11. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72 : 248-254.
12. Vandamme EJ, Derycke DG (1983) Microbial inulinase fermentation process, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol. 29:139-176.
13. Ettalibi M, Baratti JC. (1987) Purification properties and comparison of invertase exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuam* .Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 13-20.
14. Marcia LC. (2008) Effect of Conditioning on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* through fed-batch fermentation. J. Appl. Microbiol. 87: 141-147.
15. Mughal MS, Ali S, Ashiq M. and Talish AS (2009). Kinetics of an extracellular exo-inulinase production from a 5-

newly Isolated *Aspergillus niger* AUP19 . World Journal of Microbiology and Biotechnology . 21(8-9)1359-1361.

27. Sheng J, Chi Z, Li J, Gao L, and Gong F(2007) Inulinase production by marine yeast *Cryptococcus aureus* and inulin hydrolysis by crude inulinase. [www.paper.edu.cn](http://www.paper.edu.cn)

24. Lazazzera BA. (2000) Quorum sensing and starvation. Signals for entry into the stationary phase . Curr. Microbiol., 3 : 177 – 182.

25. Suntornsuk W, Tongjunl J, Onnim P, Oyama H, Ratanakanochai K, Kusamran T, and Oda K. (2005) Purification & characterization of keratinase from a thermotolerant feather –degrading bacterium. World J. Microbiol. Biotech., 21:1111-1117.

26. Kumar G, Kunamneni A, Prabhakar T, and Ellaiah P. (2007) Optimization of process parameters for the production of inulinase from a

## العلاقة التعايشية بين بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحرارة النامية في درجات حرارة مختلفة و تأثيرها على بعض الصفات للمنتوج النهائي

حسين أحمد مهدي

هيئة التعليم التقني – المعهد الطبي التقني المنصور

البريد الإلكتروني: dr.hussein50@yahoo.com

### الخلاصة باللغة العربية

صنعت منتجات الألبان المتخمرة مثلًا اللبن الرائب من حليب بقري خالي الدسم باستخدام بوائء من سلالات منتخبة من بكتريا thermophilic والتي استخدمت بشكل منفرد وبشكل خليط من بكتريا *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* and *Streptococcus thermophilus* . تم احتساب العدد الكلي للبكتريا والحموضة معبر عنه بالأس الهيدروجيني pH وكذلك لزوجة المنتج النهائي بعد فترة الحضان لمدة 24 ساعة في درجة 30م° ولمدة 6 ساعات في درجة 45م°. أظهرت النتائج ان البادئ الخليط رقم 1

*Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* (27558) , *Streptococcus thermophilus* (14485) و لخليط رقم 3

*Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* (21815) , *Streptococcus thermophilus* (14485) لهما فعالية عالية من التعايش عند الحضانة في درجة 30م°. وان lactobacilli حسنت نمو بكتريا streptococci وكذلك فان المستخلص الناتج من بكتريا lactobacilli شجع نمو بكتريا streptococci مما أدى إلى تحسين لزوجة الناتج النهائي للمنتوج الحاصل باستخدام بكتريا streptococci السلالتين (14485) ، (19258) هذا التحسن في لزوجة الناتج النهائي قد يعود إلى زيادة الحموضة.

### ABSTRACT

Fermented dairy products like yoghurt were prepared from skimmed cow's milk by using the following different thermophilic starter strains of *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* and *Streptococcus thermophilus* , which they are used as single and mixed cultures . The bacterial count , the acidity which reflected by pH value and the rheological assessment (consistency) of the final product were measured after 24 hours at 30C° and 6 hours at 45C° of incubations . The result of mixed cultures No.1 *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* (27558) , *Streptococcus thermophilus* (14485) and No.3 *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulagaricus* (21815) , *Streptococcus thermophilus* (14485) showed high synergistic effect when incubated at 30C° as well as the lactobacilli cultures enhanced the growth of streptococci strains. The supplementation of streptococci by the supernatants of lactobacilli improved the consistency of the final product which produced by *Streptococcus thermophilus* strains (14485) and (19258), this improvement of consistency could be attributed to the increase of acidity.

## المقدمة

إن بكتريا حامض اللاكتيك والتي تعتبر الكائن المجهرى الأكثر فائدة للمجتمع ، تساهم في إنتاج الآلاف من الأغذية المتخمرة. وتساهم أيضا في إضافة بعض النكهات المميزة للطعام ، كما إنها تمنع تكاثر البكتريا المسببة للأمراض والبكتريا المسببة للتلف في الأغذية المتخمرة [1]. تستخدم بكتريا thermophilic كبادئ ممكن توظيفها بدرجات حرارة تتراوح بين 30 م° إلى 45 م° والأمثلة على ذلك خليط من عدة بواضع تحتوي على سلالات منتخبة من بكتريا

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*

حيث يتم استخدام هذه السلالات المنتخبة عموما في إنتاج اللبن الرائب وبعض أنواع الأجبان الطرية.

تستخدم سلالات *Streptococcus thermophilus* في صناعة اللبن الرائب وبعض الأنواع من الأجبان مثل جبن Emmenthal. ويمكن استخدامها بمفردها أو بإضافتها إلى نوع آخر من بكتريا حامض البروبيونيك *Probionnic acid bacteria* و يحدث الشيء نفسه لسلالات بكتريا

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* والتي تعتبر مميزة في إنتاج بعض مركبات النكهة والتي يمكن استخدامها بمفردها أو بإضافتها إلى نوع آخر من بكتريا حامض اللاكتيك كما إن بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ممكن أن تخلط مع أنواع أخرى من البكتريا حامض اللاكتيك

كبكتريا *Bifidobacterium spp.* لغرض إنتاج اللبن الرائب وبعض منتجات الألبان المتخمرة التي تحتوي حامض البروبيونيك *Proboinic acid* والتي تسمى *Proboitic milk products*. هنالك نوع آخر من بكتريا حامض اللاكتيك وهي *Lactobacillus*

*helveticus* يمكن استخدامها بمفردها أو على شكل خليط مع أنواع أخرى من بكتريا حامض اللاكتيك وهذه البكتريا لها القدرة على إنتاج كمية عالية من الحامض ولها قابلية تحليل عالية [2] . و أكد [3] و [4]. أن هناك علاقة تكافلية *Proto-cooperation* بين بكتريا

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* و بكتريا *Streptococcus*

*thermophilus* عندما يتم تنميتها سوياً في الحليب حيث يلاحظ عملية تكون الحامض اسرع بسبب إن كل بكتريا تحفز نمو الأخرى وبالنتيجة سيكون وقت التخثر اقصر. أن مثل هذه العلاقة تُعرف بأنها علاقة تكافلية أو تعايشية *Symbiosis* [5] و [6]. أن إنزيمات التحلل البروتيني المنتجة من قبل *Lactobacillus*

*delbrückii* subsp. *bulgaricus* تقوم بعملية تحليل الكازين *casein* و تنتج حوامض امينية و ببتيدات ذات اوزان جزيئية واطئة و التي تعتبر عوامل محفزة لنمو بكتريا *Streptococcus*

*thermophilus* [7]. من الناحية الأخرى إن بكتريا *Streptococcus thermophilus* تعمل على تحفيز نمو بكتريا

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* بانتاجها كمية كافية من حامض الفورميك *formic acid* وغاز ثاني اوكسيد الكربون [8 و 9]. وكذلك إنتاج كمية من حامض البايروفك *Pyruvic acid* [10].

إن الغرض من هذه الدراسة هو لمقارنة العلاقة التكافلية أو التعايشية بين سلالات مختلفة لبكتريا *thermophilic* النامية في درجات حرارة حضان مختلفة لملاحظة النمو البكتيري ، إنتاج الحموضة و لزوجة الناتج النهائي.

## المواد وطرق العمل

## البادئ:

تم الحصول على بادئ تجاري من شركة ( Natural sales company, Pittsburgh, Pennsylvania) على شكل مسحوق مجفف يحتوي سلالات منتخبة من بكتريا *Streptococcus thermophilus* (19258 ، 14485) وسلالات منتخبة من بكتريا

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (27558 ، 21815) مع اللاكتوز والحليب الفرز المجفف. هذه السلالات تم استخدامها

استنادا إلى توصيات الشركة المجهزة وهي تلقح 10 مل من حليب خالي الدسم معامل بدرجات الحرارة العالية UHT من هذه السلالات للحصول على عدد بكتيري أولي (  $10^7$  cfu / ml ) . لقد تم إعداد ما يقارب من أربع بواضع خليطه وذلك بخلط ما نسبته

1:1 من كل من بكتريا *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* و من بكتريا *Streptococcus thermophilus* وكما موضح أدناه:

1- بادئ رقم 1:

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (27558) ، *Streptococcus thermophilus* (14485)

2- بادئ رقم 2:

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (27558) ، *Streptococcus thermophilus* (19258)

3- بادئ رقم 3:

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (21815) ، *Streptococcus thermophilus* (14485)

4- بادئ رقم 4:

*Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (21815) ، *Streptococcus thermophilus* (19258)

### قياس لزوجة المنتج:

تم استخدام جهاز تناوب مقياس اللزوجة Rotational viscometer من (Heake Rotovisco RV2, Germany) لقياس لزوجة معبر عنها بالـ (mpa-s) one milipascal second للناتج النهائي حسب ما موضح [10].

### التحليل الإحصائي:

تم استخدام برنامج ANOVA لاجل معرفة الفروقات بين متوسطات المعاملات عند مستوى  $P < 0.05$  بالاستعانة بطريقة LSD [13].

### النتائج والمناقشة

جدول رقم 1 ورقم 2 يوضحان بعض الصفات المميزة للنتائج النهائي المستحصل باستخدام سلالات نقية مفردة وخليطة من بكتريا lactobacilli وبكتريا streptococci. إن البودائ النقية الحاوية على سلالة بكتيرية مفردة لكل من streptococci و lactobacilli أنتجت أن العدد الكلي لبكتريا streptococci أعلى من العدد الكلي لبكتريا lactobacilli كذلك النتائج بينت أن عدد بكتريا lactobacilli للبودائ ذات السلالة المفردة والخليطة كانت تقريبا متشابهة ( $P < 0.05$ ) ويشير ذلك إلى أن بكتريا lactobacilli نمت بشكل بطيء وضعيف وهذا يعود ربما لأنها لم تحفز من قبل بكتريا streptococci بكمية كافية من حامض اللاكتيك والفورميك [14]. من الناحية الأخرى أظهرت النتائج أن السلالات المفردة لبكتريا streptococci كانت أعدادها أقل بالمقارنة مع البودائ الخليطة ( $P < 0.05$ ) كما موضح في جدول رقم (1) ورقم (2) وهذه الزيادة في العدد ربما تعود إلى العلاقة التعايشية بين بكتريا streptococci و بكتريا lactobacilli وهذا ما يأكده [14 و 15]. كما بينت النتائج أن نمو بكتريا streptococci سلالة (19258) و (14485) كان جيدا ربما قد تم تحفيزها بشكل جيد من قبل بكتريا lactobacilli. إن تطور حامض اللاكتيك كان ملحوظا بالنسبة للبودائ الخليطة والتي نمت على درجة حرارة 30°م ( $P < 0.05$ ).

أن جميع هذه البودائ أعلاه تم تنشيطها وتنميتها اعتمادا إلى توصيات الشركة المجهزة كما ذكر في أعلاه. هي سلالات مفردة وخليطة بحدود ( $10^7$ ) cfu / ml حظنت في درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة و 45°م لمدة 6 ساعات. لقد تم إجراء تجربتين مستقلتين لكل سلالة مفردة وخليطة وعلى درجتي الحرارة المذكورتين في أعلاه.

### عينات الحليب:

تم استخدام حليب بقري خالي الدسم و المنتج من قبل شركة المراعي السعودية والمعامل بدرجات الحرارة العالية UHT و تم الحصول عليه من الأسواق المحلية.

### المواد المحفزة:

تم تحضير المواد المحفزة (الراشح) بموجب تعليمات [11] إذ تم استخدام جهاز الطرد المركزي لمزارع من بكتريا lactobacillus نمت على درجة حرارة 30°م وفي طور الثبات Stationary Phase وذلك باستخدام قوة طرد مركزي 10000g لمدة 20 دقيقة وعلى درجة حرارة 10°م ومن ثم تنقية الراشح باستخدام مرشح دقيق قطر تقويه 0.45 ملم (Millipore water, Association) ولقد استخدم الراشح لفحص أي تحسن في النمو على بكتريا streptococci. وتم التعرف على طور الثبات بملاحظة عدد الخلايا البكتيرية الحية بقی ثابتا و لم يلاحظ فيه لا زياده و لا نقصان و هذا ما يأكده [10]

### حساب العدد الكلي للبكتريا:

قدر العدد الكلي الأولي للبكتريا بموجب مقاييس الاتحاد الدولي للألبان [12] باستخدام الوسط الزراعي Plate count agars و المجهز من (Oxide Ltd. Basingstoke, hunts, UK) حيث تمت عملية الحضانة على درجة حرارة 30°م لمدة 24-72 ساعة وتحت الظروف الهوائية.

### قيمة الرقم الهيدروجيني pH:

تم قياس قيمة الرقم الهيدروجيني بالاستعانة بجهاز (pH-meter) نوع (Pyre pH meter model Pye 290 MK2, UK) Unicom Ltd. Cambridge بموجب تعليمات [11].

جدول رقم ( 1 ) يبين العدد الكلي للبكتريا وكذلك الحموضة pH و اللزوجة لبكتريا lactobacilli و streptococci و المنماة على درجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة .

البادئ	العدد الكلي للبكتريا		pH	اللزوجة *mpa- s
	Lactobacilli	Streptococci		
سلالة مفردة من lactobacilli 27558 21815	4x10 <sup>5</sup> 3x10 <sup>6</sup>	----- -----	4.6 4.8	17 10
سلالة مفردة من streptococci 14485 19258	---	1.4 x 10 <sup>4</sup> 4.2 x 10 <sup>7</sup>	4.7 5.1	10.5 6
بادئ خليط				
+14485	3.9x10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>8</sup>	4.01	29
27558 خليط 1	2.9x10 <sup>5</sup>	9.4 x 10 <sup>8</sup>	4	7.2
+19258	3.9x10 <sup>6</sup>	3.3 x 10 <sup>8</sup>	4.13	20
27558 خليط 2	1.75x10 <sup>6</sup>	9.6 x 10 <sup>8</sup>	4.82	6.1
+14485				
21815 خليط 3				
+ 19258				
21815 خليط 4				

النتائج أعلاه هي معدل لثلاث قراءات .

\*centipoises (one milipascal second)

هذه النتائج تتفق مع النتائج التي نشرت من قبل [7] و [14]. من الناحية الأخرى لم تحدث فروقات (  $P < 0.05$  ) في إنتاج حامض اللاكتيك فيما يخص البوادئ ذات السلالات المفردة لبكتريا streptococci في حين لوحظ إن نفس السلالات عندما دعمت برواشح بكتيريا lactobacilli شهدت تنوعا في قيمة pH مما يشي ر إلى إن أضافه رواشح بكتريا lactobacilli إلى مزارع بكتريا streptococci ممكن أن يؤدي إلى تحسن و تقصير وقت عملية التخثر للمنتوج النهائي الناتج عن خلط المجموعتين و هذا يتفق مع النتائج التي نشرت من قبل [6]. كذلك النتائج أظهرت ان المزارع النقية لبكتريا streptococci سلالة (14485) أعطت منتوجا أكثر لزوجة ومثانة عندما نميت سوية كبادئ خليط مع بكتريا lactobacilli سلالة (27558) و سلالة (21815) في درجة حرارة 30م مما هو الحال على درجة حرارة 45م (  $P < 0.05$  ) كما موضح في جدول رقم (1) و هذا قد يعزى الى طبيعة و نوع السلالة المستخدمة و نوع درجة حرارة الحضان المستخدمة و ظروف تحضير المنتج و كما اكده [10].

جدول رقم (2) يوضح كل البوادئ الخليطة التي حظنت على درجة حرارة 45م أعطت منتوجا متشابهها في تماسكه و لزوجته باستثناء بادئ رقم 1 و 3. النتائج أوضحت ايضا ان هنالك فرق معنوي (  $P < 0.05$  ) في تماسك الناتج النهائي الحاصل من إضافة خليط رقم 1 و 3 بالمقارنة مع السلالات المفردة لكلا النوعين من البكتريا في درجة الحرارة 30م و 45م بالرغم من أن تأثير الخلط كان أعلى على درجة حرارة 30م مما ه و عليه الحال عند درجة حرارة 45م.

إن تماسك الخثرة للناتج النهائي يعتمد على كمية السكريات المتعددة الناتجة وعلى كمية الحامض المنتج . أن الزيادة في التماسك للمنتوج الحاصل من استخدام بادئ خليط متكون من lactobacilli ، streptococci سلالة (14485) بالمقارنة مع بادئ النقي lactobacilli كان أكثر على درجة حرارة 30م مما عليه 45م وهذه يعزى إلى الإنتاج العالي للسكريات المتعددة على درجات حرارة واطئة. ان هذه النتائج تتفق مع النتائج التي نشرت من قبل باحثين آخرين [16 و 17] كانوا قد وجدوا ان كل سلالة منتجه للسكريات المتعددة يمكن ان يكون لها إنتاج أفضل في درجات الحرارة الواطئة. ان سلالات streptococci (14485) و (19258) و التي تم دعمها برواشح بكتريا lactobacilli سلالة (27558) و (21815) أعطت ناتج نهائي بتماسك عالي بالمقارنة مع السلالات المفردة لبكتريا streptococci سلالة (14485) و (19258). لقد لوحظ أن التأثير التعاوني للخليط فيما يخص التماسك وقوام الناتج النهائي يكون أفضل على درجة حرارة 30م . بالاضافه إلى ذلك إن الراشح الحاصل من بكتريا lactobacilli والمضاف إلى بكتريا streptococci كان له اثر كبير في تحفيزها و على النمو و تماسك الناتج النهائي و هذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصلت من قبل [18].

7. Rajagopal SN. and Sandine WE (1990) Associative growth and proteolysis of *S.thermophilus* and *L.bulagaricus* in skim milk. J.Dairy sci. 73:894-899.
8. Driessan FM , Kingama F and Stadholders J . (1982) Neth. Milk Dairy j., 36,135.
9. Shanker PA.and Davies FL.(1977) J.Appl., 43,VIII.
10. Tamime AY, and Robinson RK (1985) Yoghurt: science and technology, pergamon perss. Oxford. 266-281,340-341 and 368-391.
11. Association of official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis. (1984) AOAC 16.023.
12. International Dairy federation, BRUSSELS. (1981) liquid milk: Enumeration of microorganisms – colony count - Standard method 100.
13. Sokal RR and Rohlf F (1969) The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: W.H.Freeman and company.
14. Tamime AY and Robinson RK (2003) Yoghurt: science and technology, CRC press, NewYourk..661.
15. Mihail A. (2009) Revue de Genie Industrial ISSN 1313-8871, 3,4-12.
16. Gancle F, and Novel G (1994) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* SSp. *Thermophilus* cultures. L. conditions of production. J.Dairy Sci. 77:685-688.
17. Mozzi FG, Oliver GS, De G, and De VD (1995) Influence of temperature on the production of Exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 50:80-82.
18. Teggatz J, Morris A (1990) Changes in the rheology and microstructure of ropy yoghurt during shearing. *Food struct.* 9: 133-138.

جدول ( 2 ) يبين العدد الكلي للبكتيريا وكذلك الحموضة pH و اللزوجة لبكتيريا lactobacilli و streptococci و النمطة على درجة حرارة 45° لمدة 6 ساعات.

اللزوجة mpa- s	pH	العدد الكلي للبكتيريا		البادئ
		lactobacilli	Streptococci	
9,4 9,6	4.57 4.59	3.8x10 5 3.2x10 5	---- ----	سلالة مفردة من lactobacilli 27558 21815
8,7 7,95	4.5 4.3	--- ---	1.3x10 3 3.8x10 7	سلالة مفردة من streptococci 14485 19258
				بادئ خليط
16 9,1 18 8,5	4.05 4.12 4.15 4.02	4x10 2 3x10 4 4x10 5 2x10 5	3.8x10 7 9.2x10 7 3.2x10 8 9.3x10 8	14485 + 27558 خليط 1 19258 + 27558 خليط 2 14485 + 21815 خليط 3 21815 + 19258 خليط 4

النتائج أعلاه هي معدل لثلاث قراءات.

#### المصادر

1. Morisi El Soda N, Ahmed N. Omran G, and morisi A (2003) Isolation, Identification and selection of lactic acid bacteria cultures for chees making. *Emis. J.Agric. Sci.* 15 (2): 15-71.
2. EMEA/CVMP/267/99\_FINAL. (2000) 217\_717.
3. Marshal VME (1986) In " progress in Industrial microbiology " ( M. R. Adams , Ed ) 32. Eslevies Science , Amsterdam : 1-44 .
4. Dellaglio F. (1988) Fermented milk Science and Technology. *BULLETIN NO.227, International Dairy Federation, BRUSSELS:* 27-34.
5. Beal G, and Corrieu G (1994) Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *St.thermophilus* 404 and *L.bulgaricus* 398 at the different steps of their production. *Wiss. Technol.* 27:86-92.
6. Higashio K, Yoshioka Y and kikuuchi T (1977) Isolation and identification of a growth factor of *S.thermophilus* produced by *L.bulagaricus*. *J.Agric. Soc. Jpn.* 51:209-215.

## الحافات العلمية للهندسة الوراثية: مدخل الى علوم الحياة التركيبية

حسين فاضل الربيعي (1) وعبد الجاسم محيسن الجبوري (2)

دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا ص.ب. 765 بغداد (1)، مركز بحوث التقنيات الاحيائية، جامعة  
النهرين، بغداد (2)

البريد الالكتروني: dr\_aljibouri@yahoo.com

### الخلاصة باللغة العربية

تمثل علوم الحياة التركيبية تغييراً مهماً وجديداً في توجهات التقنيات الوراثية التي ركزت وخلال معظم العشرين سنة الماضية على فك مغالق المعلومات الوراثية وخصوصاً التعاقب الجيني بغية تشخيص وفهم دور الجينات الموجودة طبيعياً. وكنتيجة لذلك فإن بإمكان المختصين حالياً وعبر استخدام المفاهيم الهندسية المستمدة من علوم الالكترونيات والحاسبات من بناء انماط بسيطة من البكتريا واعادة برمجة جزيئات DNA وتركيب انظمه وراثية جديدة. ويعلمهم هذا تنبثق وبسرعة تقنيات حقيقية ذات تطبيقات ومضامين واسعة. ويتم حالياً ضخ الملايين من الدولارات الحكومية والشركات لدعم مختبرات علوم الحياة التركيبية، مما عزز نمو هذا المجال وشجع قيام العديد من الشركات المتخصصة التي تمتلك سندات براءات الاختراع المتنامية والمنتجات الصناعية المنتظرة في حقول انتاج الطاقة ومعالجة التغيرات في الطقس وازالة السموم وانتاج الانسجة والعدد الصيدلانية.

تتضمن هذه الدراسة استعراض الخطوط العامة للمنظور الجديد من علوم الحياة التركيبية وما تتضمنه من وسائل وطرائق رائدة متعددة هذا فضلاً عن تفحص بعضاً من التطبيقات الناشئة عن علوم الحياة التركيبية ومضامينها.

### ABSTRACT

Synthetic Biology represents an important change in the direction of genetic technology, which, over much of the past 20 years, has focused on deciphering genetic information (gene sequencing) in order to identify and understand the role of genes found in nature. As a result of that it is now possible by using engineering concepts borrowed from electronics and computing, synthetic biologists are building simplified versions of bacteria, re-programming DNA and assembling new genetic systems. As they do so, a real world technology with vast applications and implications is fast emerging.

Millions of dollars of government and corporate funding are already flowing into synthetic biology labs. Venture capital and government funding have nurtured the field and the first pure-play synbio companies are now open for business. They hold growing patent portfolios and foresee industrial products for uses as diverse as energy production, climate change remediation, toxic cleanup, textiles and pharmaceutical production. This study outlines the new landscape of synthetic biology by describing its tools, and the various approaches pioneering. It will examine some of the emerging applications of synthetic biology and its implications.



## المقدمة

انتاج الطاقة ومعالجة التغيرات في الطقس والتخلص من السموم وانتاج المواد الصيدلانية والانسجة. تهدف هذه الدراسة تحديد الخطوط العامة لمفهوم علوم الحياة التركيبية عن طريق وصف ادواتها وبعضاً من وسائلها الرائدة كما تتطرق الدراسة الى بعضاً من التطبيقات الحديثة لعلوم الحياة التركيبية واثارها المتشعبة.

## التعريف

يشار إلى علوم الحياة التركيبية في المصادر العلمية بمصطلحات مرادفة مثل Constructive Biology و Synthetic Genomics و System Biology وتعرف على انها تصميم وبناء أجزاء وأدوات وأنظمة حياتية جديدة غير موجودة طبيعياً كذلك إعادة تصميم ما موجود من أنظمة حياتية بهدف اداء مهمات خاصة بمقاربة المعطيات الحديثة للتقنيات الاحيائية وتقنيات النانو (nanotechnology) والتقنيات المعلوماتية (information tech). وعلم الادراك العصبي (Cognitive Neuroscience) (4).

## الأساسيات التقنية

انصب الاستخدام الرئيسي لتقنية التصنيع الجيني خلال الثلاثون السنة الماضية على انتاج البادئات (primers) او سلسلة النيوكليوتايد المتعددة oligonucleotides التي هي عبارة عن اشربة قصيرة من DNA بامكان المهندسين الوراثيين من استعمالها في عمليات استنساخ DNA الطبيعي. وحالياً هناك العشرات من الشركات المتخصصة بامكانها تلبية طلبات الباحثين لتصنيع أي سلسلة من الحامض النووي (مثل البلازميد او الجينات او اجزاء منها) ، فلا يوجد أي عائق تقني امام تصنيع أي طول لسلسلة الحامض النووي (5,6) ، وعلى سبيل المثال في العام الماضي قامت احدى الشركات المعنية بتصنيع وبيع قطعة من الحامض النووي تجاوز عدد ازواج القواعد النووية فيها على 35 ألف (7) ويتوقع المختصين بانه سيكون بالامكان وخلال السنتين القادمتين تصنيع جينوم بكتيري مكون من 12 مليون زوج من القواعد النووية (8)

كما تمكن العلماء من تصنيع جينوم الفيروس 174 phi X المكون من 65386 زوج من القواعد وخلال اقل من 14 يوماً (9). ان مثل هكذا تصنيع لسلاسل من الحامض النووي بالتاكيد ستقلص الوقت المستغرق في عزل ونقل ال DNA في عمليات انتاج الكائنات المحورة وراثياً (GMO) والتي تعد من الخطوات المتبعة وقد تأخذ حوالي 50% من وقت الباحثين . من المعروف ان المشفرات codons هي التي تسيطر على انتاج الحوامض الامينية داخل الخلايا ، وان كل مشفر عبارة عن سلسلة من ثلاثة قواعد نووية

ابتداءً يمكن القول بأن النباتات والمحاصيل المحورة وراثياً عبر تقنيات الهندسة الوراثية على سبيل المثال قد تصبح اخباراً قديمة امام نتائج وابحاث الجيل الجديد من التقنيات الاحيائية القصوى (extreme biotech) التي تصدرت بداية الحافات العلمية المستقبلية في مجال التلاعب بالمادة الوراثية وبنائها من نقطة المنطلق، وهذا ما يدعى علمياً بعلوم الحياة التركيبية (Synthetic biology). ان عمليات التحويل الوراثي المبنية على اساس تقنيات الهندسة الوراثية لجزيئات الحامض النووي DNA ، تعد من العمليات المشابهة لتلك الخاصة بمعالجة النصوص في انظمة الحاسوب مثل عمليات القطع (cut) واللصق (paste) ، حيث يقوم الباحثون بادخال جين محدد الى التركيبة الوراثية لكائن اخر موجود طبيعياً. بالمقابل فان الباحثون في مجال علوم الحياة التركيبية مسلحون بما يوازي بيولوجيا نظام معالجة النصوص (word processor) يستطيعون حالياً الانتقال من مرحلة التمكن من حل (قراءة) الشفرة الوراثية ، نحو المراحل الاولى للتمكن من كتابة مثل هذه الشفرات. فباستخدام مصنعات الجين (gene synthesizers) يقومون بكتابة "الجمل" الخاصة بالحامض النووي التي تشفر "حرف" واحد كل مرة. كما اصبح بامكانهم اضافة احرف جديدة غير مسبوقة التواجد طبيعياً وإعادة ترتيبها ضمن شبكة وراثية (genetic network) جديدة ومن ثم تجميع كل ذلك في "هيكل chassis" اصطناعي بامكانه الانطلاق والتضاعف (1).

ان علوم الحياة التركيبية تمثل تغيراً مهماً في توجهات التقنيات الوراثية التي ركزت خلال العشرين سنة السابقة على حل مغالق المعلومات الوراثية (السلسلة الجينية) بهدف تشخيص وفهم دور الجينات الموجودة في الطبيعة . وكنتيجة لسباق فك الشفرات الوراثية ورسم الخرائط الجينية فان بالامكان حالياً تشخيص السلسلة المتعاقبة لعشرات الالاف من أزواج القواعد النووية وخلال دقيقة من الوقت وبكلفة منخفضة . وكون ان الاهتمام قد تغير من (قراءة) المعلومات الوراثية نحو (كتابتها) ، فبامكان الباحثين من العمل على (تركيب او تصنيع) نماذج حياتية وحسب الطلب فباستخدام مفاهيم هندسية مستعارة من علم الالكترونيات والحاسبات الالكترونية يقوم العلماء ببناء أنواع بسيطة من البكتريا وإعادة برمجة الحامض النووي DNA وتشبيد نظم وراثية جديدة. ويعلمهم هذا تيزر وبسرعة ملامح تقنيات حقيقية جديدة ذات تطبيقات وتبعات عديدة (2,3)

وفي هذا الإطار تنفق الملايين من الدولارات من قبل المؤسسات الحكومية والشركات لدعم البحوث في هذا المجال العلمي الجديد، فقد تأسست شركات متخصصة لهذا الغرض تقوم بتوظيف العديد من براءات الاختراع لاحتمار المنتجات المتوقعة الاستخدام في مجالات

تعتقداً (14) وقد أطلقت تسمية الطابوق الاحيائي (BioBricks) او "الاجزاء القياسية" Standard ("parts") على مثل هذه الوحدات التركيبية من الـ DNA وتمتلك مؤسسة BioBricks Foundation اكثر من 1500 وحدة من الطابوق الاحيائي بالامكان استعمالها من قبل المختصين وبدون كلفة. ان كل وحدة من هذه الوحدات عبارة عن شريط من DNA صمم للقيام بفعالية واحدة ومن السهولة توافقة مع غيره من الوحدات لعمل دوائر وراثية اطول، ثم يتم ادخال هذه الدوائر الوراثية داخل بكتريا *E.coli* او الخميرة او أي عائل جرثومي اخر ومراقبة عملها (انها تشبه الى حد كبير لعبة الاطفال الليكو (BioBricks Org) Legos). وفي اطار التنافس على استغلال هذه التقنية تم التوصل الى العديد من الفعاليات التي قد تكون غير ملموسة الفائدة في الوقت الحالي مثل بكتريا تبعث الوان مختلفة وافلام احبائية بإمكانها من اخذ الصور البسيطة وابراز او اظهار الصور. في عام 2006 قام فريق من طلاب جامعة MIT بتصميم بكتريا *E.coli* بحيث تكون رائحتها مشابهة لرائحة الموز اذ يمكن في المستقبل اثبات انها عملية مفيدة (وابداعية) فالافلام الاحيائية يمكن ان تشكل القاعدة للاشكال الجديدة من الطباعة الحجرية lithography لتوظيف الدوائر الكهربائية في الكومبيوتر، ويمكن للبكتريا ذات الرائحة ان تجلب اهتمام مصنعي الروائح والمطابخ، ومن الافكار الاخرى في هذا المجال دراسة امكانية بناء دوائر وراثية داخل خلايا جسم الانسان بإمكانها حساب عدد مرات انقسام الخلايا بهدف منع الخلايا من الانقسامات غير المسيطر عليها (15)

### 3. بناء الخلايا الاصطناعية

هناك مجموعة بحثية تعمل حالياً على تركيب اشكال اصطناعية حيه من دون استعمال DNA . حيث يتم العمل على تصنيع المكونات الاساسية للحياة وخطها معاً في انبويه اختبار لتكوين خلايا حيه. ويعتقد الباحثون ان حاجة مثل هذه الخلايا الاولية protocell ستتحصر في ثلاثة مكونات لديمومة حياتها : عمليات التمثيل الحيوي للمواد للحصول على الطاقة وتوليدها وجزئته خازنة للمعلومات (مشابهة للـ DNA ) وغلاف لاحتواء هذه المكونات معاً (11)، ويتم العمل على جعل قطرة زيت بمثابة غلاف الخلية لضمان بقاء الماء خارجاً وبما يشابه اغشية الخلايا الحية ، اما عن الجزئية الخازنة للمعلومات فيتم الاستعاضة عن جزئية DNA الطبيعية بما يسمى الحامض النووي الببتيدي peptid nucleic acid حيث له نفس تركيبية DNA ويصنع من نفس القواعد النووية لكن العمود الفقري لمثل هذه الجزئيات يتم تركيبه من الببتيدات - الوحدة البنائية للبروتينات بدلاً من جزئيات السكر - الفوسفاتية وكما في جزئية DNA (16)

مرتبطة ببعض وبترتيب محدد يؤدي الى اضافة حامض أميني معين لجزئية البروتين تحت التصنيع أي باختصار فان كل مشفر يحمل الشفرة الخاصة بحامض اميني محدد. وهذا هو المستوى الذي يعمل عليه الباحثين المعنيين بالتقنيات الاحيائية التركيبية أي مستوى دون الجين وذلك بهدف تشخيص المشفرات واعادة ترتيبها ومن ثم بناء تركيبية جديدة من المعلومات الاحيائية (10)

### تقنيات علوم الحياة التركيبية: مجالات البحث الرئيسية

هناك العديد من التوجهات البحثية التي بالامكان الاطلاع عليها في مختلف المصادر العلمية الحديثة ويمكن تلخيصها بالاتي:

#### 1- تصنيع الجراثيم الاصغر:

منذ منتصف تسعينات القرن الماضي، تم البدء بمشروع علمي يهدف الى اكتشاف العدد الاقل من الجينات المطلوب لكي تستمر البكتريا في النمو واداء فعاليتها الطبيعية، وقد تم اختيار نوع البكتريا *Mycoplasma genitalium* المسببة لالتهابات المجاري البولية لهذا الموضوع كونها تحوي على اصغر مجموعة جينية معروفة من بين الكائنات ( 517 جين مؤلف من حوالي 580 الف زوج من القواعد النووية المشكلة لجزئية DNA ) وبحلول عام 2005 اعلن العلماء عن امكانية تقليص عدد الجينات الى 386 جين ومن دون التأثير على حياة البكتريا (11)، من جهة اخرى وجد ان الجينات الضرورية لبكتريا *Bacillus subtilis* هو 271 من 4100 جين موجودة اصلاً ، وفي هذا الاطار يعمل باحثون اخرون على محاولة تقليص اعداد جينات بكتريا *E. coli* (12) ان الهدف النهائي لتقليص اعداد جينات بعض الكائنات المجهرية هو من اجل استعمالها كاساس في بناء كائنات تركيبية جديدة تكون مساراتها الجينية مبرمجة لاداء مهام انتاجية وتجارية محددة مثل توليد الوقود البديل (الايثانول او الهيدروجين) او التلاعب باليات عملية التركيب الضوئي وجعلها اكثر فاعلية في تجميع ثنائي اوكسيد الكربون كوسيلة لابطاء التغيرات المناخية (13)

#### 2. تصنيع الحامض النووي DNA

لقد تم تركيب عدة مئات من جزيئات DNA القياسية المتميزة التي تنصرف بما يشابه نوعاً من المكونات الالكترونية التي تتضمن وحدات متتابعة تقوم باغلاق او تشغيل الجينات وتنقل الاشارات ما بين الخلايا او تغيير اللون ما بين الاحمر والاخضر والاصفر والازرق. لاحقاً تم العمل على تجميع مثل هذه الوحدات القياسية من DNA ضمن دوائر وراثية اكثر

## 4. هندسة المسارات الوراثية

وبذلك من المؤمل ايجاد نظم وراثية اصطناعية جديدة مختلفة كما موجود طبيعيا على سطح الكرة الارضية.

## المفاهيم الضمنية لتقنيات علوم الحياة التركيبية (21)

## 1-بناء أنظمة بيولوجية جديدة

أصبح بالإمكان الحصول على سلاسل DNA مصنعة (oligonucleotides) خاصة بفيرس شلل الأطفال لها القابلية على اعطاء نسخة فعالة من هذا الفيروس الخطر، حيث قام الباحثون بزرق الفيروس المشكل من جديد داخل فئران التجارب لاثبات ان هذا الفيروس فعال (22). ومن ثم جاء العمل على فيروس انفلونزا الطيور الخطر جدا (H1N1) حيث تم نشر المعلومات الكاملة عن التركيبية الجينية وتفاصيل اعادة تشكيله، وبالفعل فقد تم انتاجه للاغراض البحثية (23) من جهة اخرى يمكن لباحثي هندسة المسارات التي تم التطرق اليها انفا من بناء الخريطة الوراثية التي تشفر لبروتينات معينة داخل الخلايا البكتيرية او الخمائر حيث تعمل هذه الكائنات وكأنها "معامل بيولوجية" لانتاج سموم بروتينية طبيعية مثل سموم الافاعي والحشرات والعناكب او السموم النباتية او البكتيرية مثل تلك التي تنتجها بكتريا الكوليرا والجمرة الخبيثة وغيرها (24، 25)

## 2-توفير مصادر طاقة اصطناعية جديدة

يتم العمل حاليا على تصنيع احياء مجهرية مهندسة وراثيا (26) باتجاه تسريع تحويل المخلفات الزراعية الى الايثانول الذي يمكن استخدامه كوقود غير مضر بالبيئة بعد ان اصبح انتاج الايثانول صناعيا واسع الانتشار وخصوصا في الولايات المتحدة الامريكية حيث توجد هناك اكثر من مئة محطة لانتاج الايثانول حيث بلغ معدل انتاجها بحدود عشرين بليون لتر سنويا. ان الطلب المتزايد والسريع على مثل هذا النوع من الوقود لا يمكن تلبيته عن طريق التقنيات الحالية المبنية على اساس تحطيم جزيئات النشا وتحويلها الى سكر الذي يخمر لينتج الايثانول وهذا يتطلب اراضي زراعية واسعة. اما التقنية الاخرى فتتضمن انتاجه من السليلوز النباتي وهذه التقنية هي الاخرى ليست كفوءة كونها تتطلب طاقة كبيرة لتحطيم السليلوز، تبعا لذلك يجري البحث عن احياء مجهرية تقوم بتحطيم السليلوز وبكفاءة اقل وبفعالية اعلى وهنا يأتي دور علوم الحياة التركيبية حيث التوجه نحو تصميم احياء مجهرية بإمكانها القيام بعدة مهام تتضمن آليات تحطيم السليلوز والانزيمات الخاصة بتكسير الكلوكوز ومسارات التمثيل الحيوي التي تؤدي الى تحويل الكتلة الحيوية السليلوزية وبفعالية الى وقود. وفي هذا السياق تمكن باحثون من جنوب افريقيا من هندسة احد انواع الخمائر التي بإمكانها العيش على السليلوز لوحده وتحطيم جدران الخلايا ومن ثم تقوم

هندسة المسارات (Pathway Engineering) الوراثية للخلايا بهدف جعلها تنتج مواد ذات قيمة دوائية او كيميائيات صناعية. وفريق العمل المعني في جامعة كاليفورنيا/بركلي قام بتصنيع حوالي 12 جين تعمل معا لتكوين المسار او الطريق الكيميائي اللازم لتصنيع نوع خاص من المركبات تدعى isoprenoids ذات القيمة العالية والمهمة في الصناعات الدوائية والكيميائية (AmyrisBiotech). وهذه المركبات موجودة طبيعيا في النباتات لكن كونها معقدة التركيب فان معظم محاولات تصنيعها كيميائيا تعد غير ذات جدوى من الناحية التجارية فضلا عن ان عزلها من النباتات لايفضي الا الى كميات ضئيلة جداً. فهدف الفريق البحثي هو تحويل البكتريا الى "معامل حية لانتاج الكيمياء" المهمة والنادرة، فهم يركزون على المركب المضاد للملاريا- الارتميزين (artemisinin). وتشير المصادر الى العديد من المركبات الصيدلانية وغيرها من المواد الكيميائية ذات القيمة العالية المستخلصة من غابات وبحار العالم التي سيتم انتاجها في مصانع بكتيرية (17). وهناك خطط لاستخدام هذه التقنيات في انتاج الادوية على المستوى التجاري والمواد البلاستيكية والملونات والمطيبات والوقود الاحيائي. كما يتم العمل على انتاج مواد لمعالجة النفايات المشعة وابطال السموم الخطرة مثل السارين. كما يتم العمل على اعادة هندسة مسارات التمثيل الحيوي المنتجة للمطاط الطبيعي وادخالها في البكتريا او في النباتات بهدف الارتقاء بمستوى انتاج المطاط. ومن الافكار الاخرى في هذا المجال اعادة هندسة بكتريا السالمونيلا لانتاج المادة البادئة لخياط العنكبوت التي تتصف بمتانتها ومرونتها العالية (18)، كما يتم العمل قريبا لانتاج الياف خاصة تستخدم في صناعة الملابس عن طريق خلط البكتريا المعاد هندستها وعصير الذرة في مخمرات خاصة (19)

## 5-توسيع النظام الوراثي الطبيعي Expanding Earths Genetic System

ويتم هذا الامر عن طريق تصنيع جزيئات مشابهة للحامض النووي DNA لكنها تحتوي على قواعد نووية جديدة من غير الاربعة المعروفة طبيعيا (Eragen Inc.) وفي احد المحاولات تم اضافة قاعدتين جديدتين لجزيئة DNA مصنعة. وازداد العدد لاحقا ليصبح اثنتي عشر قاعدة نوكلوتيدية. ويوجد حاليا بادئات للـ DNA مركبة من القواعد الاربعة الطبيعية والاثنتان المصنعتان وابتعد من ذلك تم تصميم نسخة من انزيم البوليميريز متوافقة مع هذه الجزيئة الاصطناعية من الـ DNA. وللاستفادة من هذه الانجازات العظيمة تم لاحقا تصنيع انزيم بإمكانه جعل جزيئات DNA الاصطناعية تتضاعف ذاتيا (20)

فضلاً عن السعي المتواصل والمحموم لتسجيل واحتكار ادعاءات الملكية الخاصة لنظم تشغيل الخلايا الحية فان المعنيين يبدون قلقهم من التوسع في احتكار براءات الاختراع الخاصة بالآلات الحاسبة ونظم تشغيلها وخصوصاً تلك التي تستخدم روتينياً من قبل العاملين في مجال علوم الحياة التركيبية. ان مثل هذه النظم تستخدم لتصميم دوائر وراثية genetic (circuits) على شرائح السليكون (*in silico*) وقبل تصنيع جزيئات DNA في انابيب الاختبار *invivo* (8) فمثلاً إحدى براءات الاختراع الامريكية (39) تصف الجينات على انها "دوائر" وتدعي بتصنيع "نظام وطريقة مناظرة لعمل الشبكات البيوكيميائية (التي) تتضمن الكمبيوتر الذي يمتلك ذاكرة تستخدم في خزن مجموعة من الاهداف، وكل هدف يمثل آلية بيوكيميائية في تلك الشبكة المراد ايجاد مناظر لها". ان تطبيق مثل هذه الادعاءات العريضة يمكن ان يخلق احتكاراً كبيراً في مجال علوم الحياة التركيبية حيث يتطلب عمليات حاسوبية وذاكرة واسعتين من اجل اتمام تصنيع وتصميم جزيئات DNA. وفي براءات اختراع اخرى نجد انها تتضمن ادوات منطقية لجزيئات DNA بإمكانها العمل بطريقة مناظرة لمثيلاتها الالكترونية من اجل القيام بالعمليات الحاسوبية وتوضيح الجين (gene expression)

#### 4. الحفاظ على المصادر الوراثية والتنوع الاحيائي

في عام 2005 وعند اعلان فريق من الباحثين المختصين بعلوم الحياة التركيبية نجاحهم في اعادة تركيب وبناء نسخة عاملة من فايروس الانفلونزا الذي اجتاح العالم في 1918، فانهم بهذا العمل وضعوا اللبنة الاولى للعصر الالكتروني للتنوع الاحيائي، أي بمعنى الخزن الرقمي digital storage للحامض النووي DNA (40) ويتوقع العلماء انه وخلال بضعة سنين سيكون من الاسهل تصنيع فايروس معين مقارنة بطلبه من بنوك المزارع الجرثومية او البحث عنه في الطبيعة (11) حالياً يقوم الاعضاء في الاتحاد الدولي لمجاميع المزارع (WFCC) بخزن اكثر من 1.3 مليون نموذج مختلف من البكتريا والفايروسات والفطريات وغيرها من الجراثيم (41). ويتوفر التمويل والوقت فان من المؤمل ان يتم التمكن من التعرف على سلاسل القواعد النووية للمواد الوراثية لاي من هذه النماذج واذا ما تم خزن هذه المعلومات على الحاسبة فانه يصبح بالامكان الحصول على جزيئات DNA وباي تسلسل وبمجرد الضغط على لوحة المفاتيح ومن أي مكان في العالم. ان حجر الاساس لما يدعى نظام DNA الرقمي هو قاعدة المعلومات الخاصة بسلاسل النيوكليوتيدات International Nucleotide Sequence Database) التي تضم المؤسسات European Molecular Biology Lab و (EMBL) Data library و (UK) Databank

بتخمير السكريات الناتجة وتحويلها الى الايثانول (27). وتتعامل مجموعة اخرى مع بكتريا محورة بإمكانها النمو تحت ظروف الحرارة العالية وانتاج الايثانول من عمليات التخمير. وفي جامعة بورديو (Purdue) تم تطوير خميرة محورة بإمكانها انتاج 40% اكثر من الايثانول مقارنة بالخميرة الطبيعية (28)، وضمن هذا السياق يتم البحث عن التركيبية الجينية للكائنات المجهرية التي تعيش في امعاء حشرة الارضة والمسؤولة عن تحطيم جزيئات السليلوز. من جهة اخرى يتم البحث عن احياء مجهرية بإمكانها انتاج الهيدروجين الذي من الممكن استخدامه كوقود، فضمن هذا المضمون تم اكتشاف نوع بكتيري جديد بإمكانه التقاط ضوء الشمس بوساطة مستلمات ضوئية وتحويله الى طاقة كيميائية وطالما ان عملية البناء الضوئي بإمكانها انتاج مستويات متدنية من الهيدروجين فان البحث يجري حول امكانية تغيير مسارات البناء الضوئي داخل الخلايا لانتاج الهيدروجين (29) كما تبذل جهود لاجل تصميم كائنات بإمكانها انتاج وقود مشابه للبنزين (30).

#### 3. احتكار الملكية الفكرية وبراءات الاختراع

لقد مهد النشاط المحموم بالملكية الفكرية وبراءات الاختراع في مجال التقنيات الاحيائية وخلال ربع القرن الماضي اعتماد مقترح ما يسمى العمل بالمثل (me-too) في مجال علوم الحياة التركيبية حيث يجري ومنذ فترة صراع على تسجيل براءات الاختراع او الاستحواذ عليها من قبل الشركات المتعددة التي انشأت لهذا الغرض (31). ان علوم الحياة التركيبية قد انطلقت او حثت اصلاً بوساطة تجميع او مقارنة علوم الحياة النانوية والتقنيات الاحيائية والهندسية وعلوم الحاسبات. وهذا يعني ان الادعاءات بالملكية الفكرية ذات العلاقة بعلوم الحياة التركيبية تتضمن ليس فقط جزيئات DNA متناهية الصغر (النانوية nanoscale) والمنتجة اصطناعياً وانما ايضاً الآلات الحاسبة (الكمبيوتر) ونظم تشغيلها (software). وفي هذا المجال تم منح براءات الاختراع للعديد من المنتجات والطرائق ذات العلاقة بعلوم الحياة التركيبية ومنها:

- طرائق بناء جزيئات DNA اصطناعية (32).
- آليات خلوية اصطناعية مثل رايوزومات محورة (33).
- جينات أو أجزاء منها ممثلة بوساطة نواتجها المتسلسلة (34).
- هندسة مسارات البناء الاحيائي biosynthetic (35).
- تركيب بروتينات واحماض امينية جديدة واخرى موجودة طبيعياً (36)
- إنتاج نيوكليوتايدات مبتكرة تعزز وتستعير عن تلك الموجودة طبيعياً في الحامض النووي (37)
- مسارات الخلايا الجذعية (38).

سلوكية هذه الكائنات من جيل لآخر، حيث لا يزال العلماء لا يعرفون الكثير عن وظيفة الجين المدخل الى الكائن المطلوب تحويره وراثياً او حتى وظيفة جزئية DNA المدخل اليها (49) من جهة اخرى وجد ان ما يدعى بقطعة DNA غير المشفرة non- DNA coding ربما تلعب دوراً مهماً في صحة ووراثة الكائنات (48).. كل ذلك يؤدي الى الاستنتاج بان من غير الممكن معاملة الكائنات الحية على انها مكائن منطقية ومفهومة فلا يزال الكثير عنها غير معروف او مكتشف. كذلك فان من المحتمل تسلسل الكائنات الحية الجديدة الى البيئة الخارجية وبالتالي التفاعل معها وبصورة لا يمكن توقعها قد تؤدي الى تطويرها مواصفات مضرّة وخطرة (50)، هذا فضلاً من احتمالية انتقال قطع DNA التركيبية وتحت ظروف معينة الى انواع البكتيريا الطبيعية عبر ما يدعى بالانتقال الافقي للجينات مما قد يؤدي الى تأثيرات غير منظورة على البيئة وبطرائق غير متوقعة.

#### المصادر

1. Check E (2005) Fast sequencing comes to light. Nature News, <http://www.nature.com/news/2005/050725/full/050725-14.html>.
2. Ross J, Arkin AP. (2008) Complex systems: from chemistry to systems biology. Proc Natl Acad Sci U S A. 23;105(51):20404-9.
3. ETC group (2006) <http://www.etcgroup.org/en/materials/publications>. Html? id = 8
4. Roco M, Bainbridge W. (2002) Converging Technologies for Improving Human Performance: Nanotechnology, Biotechnology, Information Technology and Cognitive Science. National Science Foundation /Department of Commerce Report.
5. Mulligan J (2006) An Introduction to Gene Synthesis. Meeting on Synthetic Genomics: Options for Governance, Washington, DC.
6. O'Malley MA, Powell A, Davies JF, Calvert J. (2010) Knowledge-making

DNA of Japan و GenBank (US)، وتتعاون هذه القواعد المعلوماتية للحفاظ على معلومات موحدة وشاملة عن سلاسل النيوكليوتيدات المجموعة. وفي منتصف عام 2006 قام GenBank بعمليات الخزن الرقمي لأكثر من 66 بليون قاعدة نيوكليوتيدية مستمدة من أكثر من 205 ألف كائن حي مشخص (42).

إن مثل هذه المؤسسات تمثل مصدر المعلومات الأولية (مثل المكتبات) للعاملين في حقل علوم الحياة التركيبية حيث يقومون بتجميع سلاسل DNA لبناء اشكالاً جديدة من الحياة، مثلهم مثل العاملين في مجال الاحياء المجهرية حيث يعتمدون على المؤسسات التي تقوم بتجميع نماذج المزارع الجرثومية ومثلهم مثل مربي النباتات الذين يحصلون على المواد الوراثية من بنوك الجينات المدعومة من قبل المؤسسات الدولية مثل CGIAR، وفي هذا الاطار فان محرك البحث الضخم Google قد اعلن اهتمامه بخزن كل المعلومات الجينية العالمية داخل google-farms (43) من جهة اخرى يتزايد الاهتمام بعمليات استخدام نماذج DNA لاستعادة المجاميع الجينية النادرة او تلك العائدة لانواع منقرضة. ففي امريكا قام فريق بحثي بتشخيص تسلسل قواعد 1% من مجموع جينات حيوان الماموث المنقرض (44)

#### 5-بضائع اصطناعية Synthetic Commodities

يعمل المختصون على هندسة المسارات الايضية لنباتات زهرة الشمس والتبغ بهدف تمكينها من انتاج المطاط الطبيعي ولو بكميات قليلة، من جهة اخرى يحاولون جعل انواع من الجراثيم قابلة لانتاج مطاط عالي الجودة، حيث يقومون بنقل المعلومات الوراثية اللازمة لانتاج المطاط الى انواع الجراثيم *E.coli* و *Saccharomyces cerevisiae* و *Aspergillus nidulans* واختيار الافضل منها لاحقاً (45، 46). كما توجد محاولات جادة لانتاج مواد ومركبات اخرى تتضمن ادوية وزيت ومغذيات ونكهات من خلال ما تتيحه تقنيات علوم الحياة التركيبية.

#### 6-الامان الحيوي الاصطناعي Synbiosafety

في الطريق الخاص بمحاولة تشكيل كائنات جديدة تختلف عن الطبيعية وتصنيع جزيئات DNA حسب الطلب يثار التسائل عن مستوى امان مثل هذه المنتجات (47). ويدعي المختصون ومنطلقاً من كونهم يقومون ببناء كامل الانظمة المطلوبة وليس ببساطة نقل الجينات فان باستطاعتهم هندسة الامان المطلوب من التقنية (48) مثلاً عبر برمجة الخلايا باتجاه التحطم الذاتي اذا ما حدث وان ابتدأت بالتكاثر المتسارع. مع ذلك فان المطلوب الكثير من الحذر والمعلومات عن

www. The- scientist .com / article/  
display / 13400.

17. Wilson EK. (2005) Engineering Cell-Based Factories. Chemical & Engineering News. 83(2) 6-12

18. Banga JR. (2008) Optimization in computational systems biology. BMC Syst Biol. 28;2:47.

19. Kassai, Lucia (2005) DuPont uses corn to produce bio-fiber. Gazeta Mercantil..69(104): 161-167

20. Ball Ph. (2006) Synthetic Biology: staring from scratch. Nature,431:624-626.

21. Endy D (2006) The Implications of Synthetic Biology. [http: / / mitworld . mit. edu / video / 363/](http://mitworld.mit.edu/video/363/) Eragen Inc. [http: / / www. eragen . com/ productsandservices. Html](http://www. eragen . com/ productsandservices. Html).

22. Cello J, Aniko V, Paul E W (2002) Chemical Synthesis of Polivirus cDNA : Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template. Science, 297( 5583):1016- 1018.

23. Willams M (2006) The Knowledge. Technology Review 12( 5):32.

24. Aldous P (2005) The bioweapon is in the post. New Scientist.67(26) 13.

25. Endler L, Rodriguez N, Juty N, Chelliah V, Laibe C, Li C, Le Novère N. (2009) Designing and encoding models for synthetic biology.Proc Natl Acad Sci U S A. 21;106(16):6433-4.

26. Shreeve J (2006) Redesigning Life to Make Ethanol. Technology Review. [http:// www. technology review. com/ articles/](http://www. technology review. com/ articles/)

27. US Department of Energy (2006) Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A joint Research

distinctions in synthetic biology. Integr Biol (Camb) 2(1):12-24

7. Buegl H. (2006) Synthetic gene firms evolve toward sustainable business. Nature Biotechnology, 1304.

8. Openwetwaer Org. (2006) Synthetic Genomics Study, [http:/ open wetwareorg. /wiki/Synthetic\\_ Genomics\\_ Study .](http://openwetwareorg./wiki/Synthetic_Genomics_Study)

9. Westphal, SP (2003) Virus synthesized in a fortnight. NewScientist. [http :/ / www. newscientist. com / article. ns?id = dn4383](http://www.newscientist.com/article.ns?id=dn4383).

10. Holmes B (2005) Alive! The race to create life from scratch .New Scientist. [http :/ / www. newscientist. com](http://www.newscientist.com).

11. Goho A (2005) Injectable Medibots: Programmable DNA could diagnose and treat cancer. Science News.165 (18) 275 .

12. Glass J I. (2005) Estimation of the Minimal Mycoplasma Gene Set Using Global Transposon Mutagenesis and Comparative Genomics. In Genomics to Life Contractor – Grantee Workshop III, Washington, DC. [http : / / www. Doegenomestolive](http://www.Doegenomestolive).

13. Ferber D (2004) Microbes Made to order. Science, 303 (5655):158-161.

14. Kämpf MM, Weber W. (2008) Synthetic biology in the analysis and engineering of signaling processes. Brief Bioinform. 9(5):404-21.

15. Parker J (2005) Computing with DNA. EMBO reports, 4(1) : 1- 7.

16. Constans, A (2006) Applications and developments in DNA – based computing. The Scientist , [http: / / www. the-scientist .com](http://www. the-scientist .com)

37. Rappaport H P, and Benner S (2006) Artificial DNA base pair analogues". US 5, 126, 439, and 'Methods for preparing oligonucleotides containing non-staDNArd nucleotides. US patent 6, 67,1.
38. Peltier J, Schaffer DV. (2010) Systems biology approaches to understanding stem cell fate choice. IET Syst Biol. 4(1):1-11.
39. Stanford University(2006) System and method for simulating operation of biochemical systems , US Patent 5, 914, 891.
40. Bonchev D, Thomas S, Apte A, Kier LB. (2010) Cellular automata modeling of biomolecular networks dynamics. SAR QSAR Environ Res. 1;21(1):77-102.
41. World Data Centre for Microorganisms (WDCM) Statistics (2006) The Culture Collection in this World. <http://wdcm.nig.ac.jp/statistics>. Html.
42. Benson D (2006) GenBank . Nucleic Acids Research, Vol. 34, Database Issue D16-D20 <http://nar.oxfordjournal.org>. BioBricks Org. <http://www.BioBricks.org>.
43. Vise D, and Malseed M (2006) The Google Story. New York: Delta Trade Paperbacks,
44. Britt, Robert Roy (2005) Decoding of Mammoth Genome Might Lead Resurrection Live Science, [http://www.livescience.com/animal/World/05219-mammoth\\_dna](http://www.livescience.com/animal/World/05219-mammoth_dna). Html.
45. Gibson D. (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic Mycoplasma genitalium genome. Proc Natl Acad Sci USA 105(51):20404–20409.
- Agenda- A Research Roadmap Resulting from the Biomass to Biofuels Workshop , Rockville, Maryland.
28. Ho N (2006) Ethanol Production. In Synthetic Biology 2.0 Conference, Berkeley. <http://webcast.Berkeley.edu/events/details.Php?webcastid=15766>.
29. Anonymous (2005) Solar to Fuel: Catalyzing the Science. <http://www.Lbl.gov/Science-Articles/Archive/sabl/2005/May/01-solar-to-fuel>. Html.
30. Chu S (2006) The Role of Synthetic Biology in Solving Energy Problem. In Synthetic Biology 2.0 Conference. <http://webcast.berkeley.edu/events/details.php?Webcastid=15766>.
31. Rai A, and Booley J (2006) Synthetic Biology: Caught Between Property Rights, The public Domain, and the Commons . PLOS, November 1
32. Egea Biosciences (2004) Method for the complete chemical synthesis and assembly of genes and genomes, US patent 6,521,427.
33. Sunguroff A (2005) Methods of Making Nan technological And Macromolecular Biomimetic Structures, WIPO Patent WO05123766A2
34. Evans PC (2005) DNA and Patent Law. <http://www.Thebiotechclub.org/industry/articles/dnapatentlaw.php>.
35. University of California: "Methods for Identifying A Biosynthetic Pathway Gene Product". WIPO Patent WO 05033287A3.
36. Ambrx Inc(2006) Biosynthetic polypeptides Utilizing Non- Naturally Encoded Amino Acids". WIPO patent WO 0609231A2.

46. US Department of Agriculture (2006) [http:// www. ars . usda. gov.\ research\ project. Htm ? ACCN. NO= 40518 & fy= 2005](http://www.ars.usda.gov/research/project.htm?ACCN.NO=40518&fy=2005).

47. Breithaupt H (2006) The engineers approach to biology. *EMBO reports*, 7( 1 ); 21 -23.

48. Gibbs WW (2004) The Unseen Genome: Gems among the Junk *Scientific American*: 98-101

49. Carlson Rob (2000) new York Times. [http:// www. synthesis /NYT- Letters- Dec-12-2000.pdf](http://www.synthesis/NYT-Letters-Dec-12-2000.pdf).

50. Tucker J and Zilinskas R (2006) The promise and peril of Synthetic Biology, *The New Atlantis* Spring :202-211



## تقييم تأثيرات العنصر الثقيل الرصاص على صحة العاملين في مصنع البطاريات

سندس حميد أحمد، و سراب كاظم، وجنان علي عبيد، و عصام شاكر، و فرقد عبد الله، ورواء جميل، و  
فلاح عبد الحسن، و محمد موسى

وزارة العلوم والتكنولوجيا- بغداد ، جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: hams\_63@yahoo.com

### الخلاصة باللغة العربية

تم اختيار 25 من المتبرعين من معمل البطاريات لتقييم مدى تعرضهم لعنصر الرصاص من خلال اجراء فحوصات الوراثة الخلوية (فحص النوى الصغيرة) ودراسة تركيز عنصر الرصاص في دم المتبرعين. أذ وجد ان اعلى نسبة تركيز من الرصاص ظهرت عند المتبرع رقم 21 وكانت 1,68 جزء بالمليون و عدد النوى الصغيرة 57 لكل 1000 خلية ,والقيمة الدنيا كانت 0,02 جزء بالمليون عند المتبرع رقم (11) وعدد النوى 2 اذا ماقورنت بالسيطرة 0,009 جزء بالمليون و عددالنوى الصغيرة صفر 0 تم انتقاء ثلاث متبرعين وهم الارقام 17 , 18 و 21 الذين ظهرت عندهم اعلى نسبة لتركيز الرصاص 0,5 , 3 , 1 و 1,68 جزء بالمليون من الرصاص في دمهم ووجد انه بزيادة تركيز الرصاص يؤدي الى انخفاض في فعالية الانزيم ALAD و زيادة تركيز ZPP و GSSG, TBARS.

### ABSTRACT

We have selected a number of battery factory workers, 25 volunteers to evaluate their exposure to the heavy metal lead, by cytogenetic method and by checking the concentration of lead in their blood . We found that the volunteer No. 21 had the highest concentration of lead about 1.68 (PPM ). & micro nuclei about 57 in 1000 mytotic cells and the lower value was 0.02 (PPM). micro nuclei 2 was found in the blood of the volunteer No. (11) when it is compared with the control 0.009 ppm. We selected three volunteers blood which have highest concentration of lead as No. 17, 18 and 21, the value of lead concentration was 0.51, 1.30, 1.68 (PPM ) respectively . We found that if the lead concentration elevated the ALAD activity declined and the concentration of GSH decreased and increase the concentration of GSSG, TBARS & ZPP.

## المقدمة

يهدف البحث: الى تقييم تاثيرات العنصر الثقيل الرصاص على صحة العاملين في معمل البطاريات من خلال اجراء الفحوصات البيوكيميائية ودراسة فحص النوى الصغيرة .

## المواد و طرائق العمل

## جمع العينات

تم جمع 25 عينة من دم العاملين في معمل البطاريات المتعرضين لعنصر الرصاص وجمعت 15 عينة من منتسبي وزارة العلوم والتكنولوجيا كسيطرة والاشخاص الذين قد تم انتخابهم بصحة جيدة ولا يعانون من اي مرض خطير او مزمن.

## - تقدير تركيز الرصاص

اتبعت طريقة Staudinger وجماعته (1998) (2) لتقدير تركيز الرصاص.

## - فحص النوى الصغير

اتبعت طريقة Streffer وجماعته (1998) (5) لاحتساب النوى الصغيرة

## - فحص الكلوتاتايون glutathione (GSH) والكلوتاتايون المتأكسد في الدم

اتبعت طريقة Hilf & Hissin (1993) (6) في تقدير قيمة الـ الكلوتاتايون (GSH) والكلوتاتايون المتأكسد (GSSG) في الدم

## - فحص aminolevulinic acid (ALAD) dehydratase في الدم

اتبعت طريقة Schaller & Berlin (1994) (9) في اجراء فحص الكشف عن فعالية الانزيم (ALAD)

## - فحص حامض الثايوباربيتورك (TBARS)

اتبعت طريقة Wilber وجماعته (2003) (8) في تقدير كمية حامض الثايوباربيتورك في الدم

- فحص Zinc protoporphrine (Zpp) اتبعت طريقة Grandjea (1999) (10) في تقدير كمية الـ Zpp

الرصاص عنصر موجود في الطبيعة ولا يزال يدخل في صناعة الكثير من المواد كل والبنزين ، وبه تطلّى أنابيب المياه ، ويدخل في صناعة بطاريات السيارات ، وصناعة الأختام، ولتعلّيب المواد المحفوظة كذلك . كما ويوجد في التربة أيضا ، وفي غبار البيوت القديمة المطلية بأصباغ يدخل في صناعتها الرصاص. وإن بات التسمم بالرصاص أكثر ندرة من قبل إلا أنه ما زال موجودا ويعاني منه الكبار والصغار ، والخطورة فيه تكمن في قدرة الرصاص على التراكم في النسيج العصبي وخاصة لدى الأطفال ما يجعله أشد خطرا عليهم. فهو إن لم يكن قاتلا إلا أنه يسبب لديهم البلادة وسوء الأداء الدراسي. أما في أوساط الكبار فأصحاب بعض المهن كالدهانين وصانعي الأختام وبطاريات السيارات هم الأكثر تعرضا للتسمم بالرصاص. وغالبا ما يكون التسمم مزمنًا يمر دون أن يشعر به المرء ، الأمر الذي يقتضي فحوصا دورية للعاملين في هذه الحقول (1). يشكل تسمم الأطفال بالرصاص أحد أسباب الأمراض العصبية والتأخر الذهني لدى الأطفال دون السادسة من العمر .وتدل الدراسات في الدول الغربية أن أكثر من 20% من الأطفال عرضة للإصابة بالمرض وقد تزيد هذه النسبة في الدول الصناعية أو المدن القديمة وذلك نتيجة التلوث المائي والغذائي والهوائي (2) يسبب الرصاص سمية جينية إذ يعمل على تحطيم الدنا (3) أن التعرض المزمن للرصاص يؤدي الى تراكمه في الاعضاء الحية وباعلى تركيز في الكلية (4) . ومن التأثيرات السامة هو ضعف تطور الدماغ ويمكن أن تنعكس من خلال التصرفات غير الطبيعية والتي تتضمن ضعف في التعلم ، ضعف في السمع ، ضعف في الادراك في الانسان وفي حيوانات التجارب . لقد أفترض العديد من الميكانيكيات لكيفية أستحداث الرصاص على احداث التغييرات الفسيولوجية في الكائن الحي ولكن لحد الآن لن يتوصلوا الى تفسير مقنع ( 5 ) . أن الجهد التأكسدي حديثا قد أثبت بأنه من أهم الميكانيكيات للتأثير السمي للرصاص أن تغيير نسبة الكلوتاتايون (GSH) Glutathion وكذلك تغيير فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة بسبب التأثير السمي للرصاص (6) أثبتت بعض الدراسات أن التأثير التراكمي للرصاص يؤدي الى تكوين الأوكسجين الفائق والذي يسمى :-

(Reactive oxygen species)(ROS) ، والذي من المحتمل يؤدي الى تحطيم الجزيئات البايولوجية المهمة كالبروتينات ، الليبيدات ، والدنا (DNA) (7) عند تولد الـ (ROS) مثل جذور الهيدروكسيل (OH) وبيروكسيد الهيدروجين (H2O2) والاكسجين الفائق (O2) والليبيدات المتأكسدة (LPO) والتي تؤدي الى انخفاض نسبة مضادات الاكسدة الدفاعية في جسم الكائن الحي (8) .

**مسحة الدم**

اتبعت طريقة Bain & Barbara (2005) (11) في عمل مسحة الدم

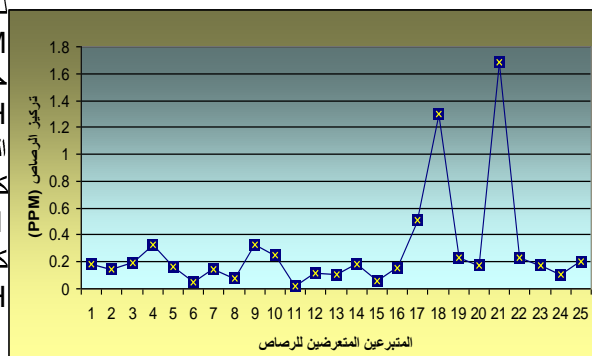
**التحليل الأحصائي**

- حللت النتائج أحصائياً باستخدام برنامج

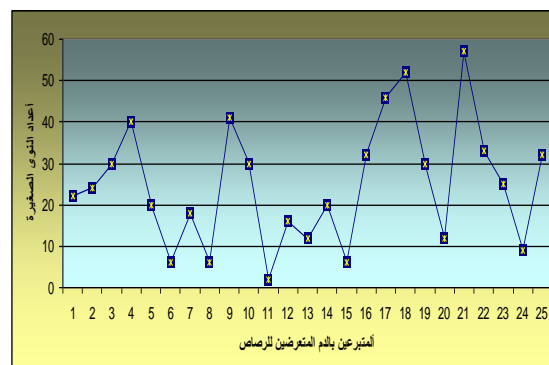
Statistical Packages for Social Sciences (SPSS)

**النتائج والمناقشة**

يبين الشكلين رقم (1 و 2) تركيز عنصر الرصاص وعدد النوى الصغيرة في دم المتبرعين بالدم من معمل البطاريات في بغداد / الرصافة اذ وجد بان زيادة تركيز عنصر الرصاص الثقيل في دم المتبرعين بالدم والمتعرضين يؤدي الى زيادة تكون النوى الصغيرة Micronuclei وان هذا الفحص يعد من الفحوصات الحديثة التي تستخدم للكشف عن وجود مواد مطفرة أو مسرطنة (3).



شكل رقم (1) تركيز الرصاص في دم المتبرعين المتعرضين للرصاص

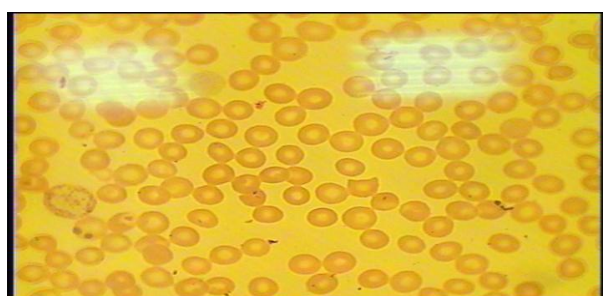


شكل رقم (2) يبين فيه اعداد النوى للمتبرعين المتعرضين للرصاص

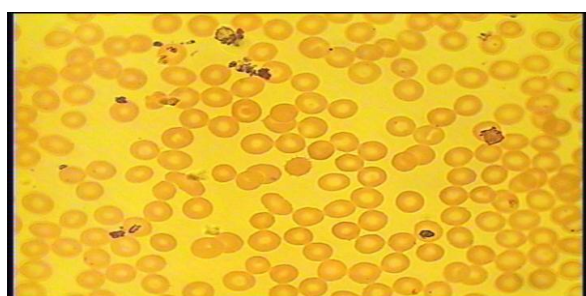
توضح النتائج زيادة تكون النوى الصغيرة في مجموعة الأفراد المتعرضين للتلوث بالرصاص عن افراد مجموعة السيطرة حيث تراوحت هذه القيمة بين (2-55) و السيطرة كانت قيمتها تتراوح بين (0.01- 0.005). إن الزيادة في تشكيل النوى الصغيرة ربما ناتج عن الحالات غير الطبيعية في انقسام القطع المركزية Centromeres للكروموسومات أو ناتجة بسبب أضرار في ال DNA تعود الى عدم فعالية القطع المركزية والى عدم تشكيل خيوط المغزل (12) وبالتالي تؤدي الى ظهور قطع كروموسومية خالية من القطع المركزية لديها القدرة على التحام نهاياتها لتكوين تشكيلات كروموسومية تشبه النواة وبحجم صغير جدا كنتيجة للتعرض للملوثات الكيميائية ، اشعاعية، أو غير ذلك. إن استخدام فحص النوى الصغيرة Mn يعتبر من الفحوصات البايولوجية الحساسة والدقيقة والتي تكشف عن التعرض للملوثات (12, 11). وجاءت هذه النتائج مترابطة مع قياس نسبة الرصاص في الدم حيث وجد ان هناك ارتفاع في تركيز الرصاص بالدم عن النسبة الطبيعية لدى الافراد المتعرضين مقارنة بافراد مجموعة السيطرة اذ وجد ان تركيز الرصاص عند المتبرعين ( 17, 18, 21 ) المتعرضين لعنصر الرصاص في معمل البطاريات هو ( 1.68, 1.3, 0.5 (PPM) جدول رقم (1) يبين فيه تقدير نسب (ALAD) و (GSH) و (ZPP) للعاملين لافراد مجموعة السيطرة والعاملين ذوي التركيز العالي من الرصاص كما موضح في شكل رقم (1,2) المتبرعين 17, 21 والسيطرة اذ وجد كلما زاد تركيز الرصاص كلما انخفضت فعالية ال (ALAD) وتركيز ال (GSH) وزاد تركيز (ZPP)

جدول (2) يبين فيه التغيرات البايوكيميائية نتيجة التعرض للرصاص كنتيجة للجهد التاكسدي

No. of Volunteers	GSH	GSSG	GSH/ GSSG	TBARS
	mg	mg/ g	Ratio	nmol of TBARS/ mg Protein
Control	2.60 ± 0.04	0.54 ± 0.13	4.81	2.8 ± 0.73
17	1.99 ± 0.15	0.91 ± 0.06	2.21	5.4 ± 0.30
18	1.05 ± 0.03	1.26 ± 0.07	1.5	6.3 ± 0.062
21	1.89 ± 0.13	0.72 ± 0.15	2.62	3.4 ± 0.17



شكل (3) : يبين تغيرات في شكل خلايا الدم الحمراء



شكل (4) : تبين تغير الدم في شكل و حجم خلايا الدم الحمراء

(Target cell , canthocyte , ovalocyte Burr cell ellepto cyte)

جدول (1) يبين فيه تقدير نسب بعض المتغيرات البايوكيميائية

N0. of Volunteers	ALAD	GSH	ZPP
	nmol/ min/ml RBC	mg/ml	mmol of ZP/mol Haem
Control	7.7 ± 0.92	3.2 ± 0.0	62.0 ± 4.0
17	3.8 ± 0.18	2.0 ± 0.11	70.0 ± 4.4
18	2.7 ± 0.52	1.0 ± 0.3	90.4 ± 2.4
21	3.6 ± 0.45	1.4 ± 0.02	84.6 ± 1.4

اما جدول رقم (2) يبين فيه انه كلما زاد تركيز الرصاص في الدم كلما انخفض تركيز الكلوتاثيون وزاد تركيز الكلوتاثيون المتأكسد وحامض الثايوباريتيورك فنجد أن السيطرة اعطت قراءة 2,60 بينما المتبرعين 17,18,21 كانت 1,89, 1,99, 1,05 µg/g للكلوتاثيون اما الكلوتاثيون المتأكسد يتزايد بتزايد تركيز الرصاص في الدم اذ وجد ان السيطرة والمتبرعين الآخرين اعطت تركيز 0.54, 0.9, 1.26, 0.72 µg/g كما بين ان هناك زيادة في تركيز حامض الثايوباريتيورك. اثبتت دراستنا الحالية ان هناك انخفاض في فعالية الانزيم (ALAD) وكذلك في تركيز الكلوتاثيون وزيادة تركيز الكلوتاثيون المتأكسد كما هو معروف ان كريات الدم الحمراء لها الفة عالية للرصاص ونتيجة لوجود نسبة عالية من الاوكسجين في الكريات الحمراء السبب الذي يؤدي الى اكسدة الليبيدات وتكون حامض الثايوباريتيورك وكذلك تاكسد الكلوتاثيون (6) بعد الفحص الجيد لجميع المسحات الدموية للمتبرعين 18, 17, 21 , وجدت تغيرات في شكل و حجم خلايا الدم الحمراء مثل Target cell , ovalocyte , elleptocyte شكل رقم (3) Burr cells , microcyte , Anisocyte شكل رقم (4) , spherocyte , tear drop , Anisochromasia , و شكل رقم (5) ظهور حالة فقر الدم من نوع عوز الحديد (Iron Deficiency Anemia )

N-acetyl cysteine and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 142-147.

5. Streffer C., Muller W, Krysico A., and Bocker W. (1998). Micronuclei- biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation *Mutation Research.* 404: 101-105.

6. Hissin PJ. and Hilf RA (1973) fluorometric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal. Biochem.* 74: 214- 226.

7. Pande M., Mehta A., Pant BP, and Flora SJS (2001) Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9: 173-184.-

8. Wilber KM., Baerheim F. and Shapiro OW (1949) The thiobarbituric acid Reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acid by various reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 24: 304- 311.

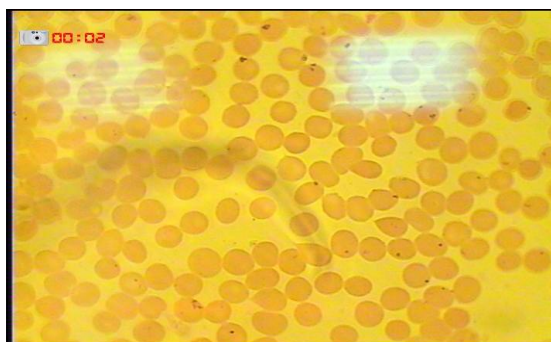
9. Berlin A. and Schaller KH.( 1974) European standardized method for the determination of delta- aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z. Klin.Chem. Klin. Biochem.* , 12: 389-390.

10. Grandjean, P. (1979) Occupational lead exposure in Denmark: Screening with a haematofluorimeter. *Br. J. Indus. Med.*, 36: 52-58.

11. Barbara J , Bain M. (2005) Diagnosis from blood smear . *N Engl J. med.* August 4, 3, A. and Schaller, K.H., European standardized method for de53:498-507.

12. Gantebery HW., Wuttke KSC (1991) Micronuclei in human lymphocytes irradiated *invitro* or *invivo* .*Radiat. R.es.*128:276-281.

13. Gurer H., Ozgunes H., Neal R., Spitz DR. and Ercal N.(1998) Antioxidant effects of N-acetyl cysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicology* . 128: 181-189



شكل (5): يبين تغيرات في شكل خلايا الدم الحمراء  
**Spherocyte**

أظهرت المسحات الدموية تغييرات في شكل و حجم خلايا الدم الحمراء لتداخل الرصاص مع الانزيمات التي تحافظ على سلامة غشاء الخلية مسبب ضرر واضح في الغشاء يجعله رقيق مما غير شكل الخلية و كما موضح بالصورة ( 5 ) . بينت المسحات الدموية حالة فقر الدم من نوع عوز الحديد لان الرصاص يتداخل مع نشاط الانزيمات الاساسية المسماة Delta ( amino evulinic acid dehydratase و ALAD) Ferrochelataze كعامل مساعد يربط حلقة Protoporphyrin مع الحديد  $Fe^{+2}$  الذي يعتبر المادة الاساسية لتكوين الهيموكلوبين . ان تداخل الرصاص بعملية صنع الحديد ينتج حلقة Zinc protoporphyrine التي تشبه كريات الدم الحمراء مسببة حالة فقر الدم من نوع عوز الحديد . ان هذه التغيرات تتفق مع ( 9, 12) .

#### المصادر

1. Saghoian S, and Sinert R H.(2009) Heavy metal toxicity .*Medicine Emergency Medicine, Hospital center. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34:201- 211.
2. Staudinger K C. & Roth V S(1998) Occupational lead poisoning. *American Family Physician* . February 15:1-14.
3. Bukvic G, Susca GF., Fanelli MS, Buouadonna GL., Capurso A., and Guanti G.(2001) Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centennials. *Mutation Research*, 498:159-167.
4. Banner W JR., Koch M., Capin, DM., Hoft SB., Chang S. and Tong T.G.(1986) Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with

## تأثير حقن بيض التفقيس بتركيزات مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني وبعض الصفات النوعية والفسلجية للافراخ الفاقسة

فرح خالد الجاف

قسم الثروة الحيوانية - كلية الزراعة - جامعة بغداد، العراق

### الخلاصة باللغة العربية

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير حقن بيض التفقيس بتركيزات مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني، على بعض الصفات النوعية للافراخ الفاقسة وصفات بلازما الدم، استخدم 400 بيضة فروج لحم نوع (Ross). وقسم البيض الى اربعة مجاميع بواقع 100 بيضة لكل مجموعة. T1 معاملة السيطرة (بدون حقن)، T2، T3 و T4 حقنت بـ 0.1 مل من محلول الاذابة الحاوي على تراكيز 0.4، 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12 / بيضة على التوالي. اشارت نتائج التجربة الى ان حقن بيض التفقيس بفيتامين B12 ادى الى ارتفاع عالي المعنوية ( $P \leq 0.01$ ) في طول الجنين وعدد ازواج البدينات، وكذلك ارتفاع معنوي ( $P \leq 0.05$ ) في قطر الاوعية الدموية عند عمر 48 ساعة حضن. وارتفاع عالي المعنوية ( $P \leq 0.01$ ) في نسبة وزن الجنين، وارتفاع معنوي ( $P < 0.05$ ) في نسبة وزن غشاء وسائل اللنتويس، وانخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في نسبة وزن الصفار ونسبة وزن البياض عند عمر 14 يوم حضن، كذلك ارتفاع عالي المعنوية ( $P \leq 0.01$ ) في نسبة التفقيس نسبة الى البيض المخصب وفي طول الفرخ وطول الصدر وارتفاع معنوي ( $P \leq 0.05$ ) في وزن الفرخ، طول الفخذ، طول عصا الطبل وطول الساق للافراخ الفاقسة بعمر 4-6 ساعات، وارتفاع معنوي ( $P \leq 0.05$ ) في وزن المعدة الحقيقية، وزن كيس الصفار المتبقي ووزن غدة فابريشيا وارتفاع عالي المعنوية ( $P \leq 0.01$ ) في وزن القانصة ووزن القلب للافراخ الفاقسة. وارتفاع معنوي ( $P \leq 0.05$ ) في كولسترول والبومين بلازما الدم للافراخ الفاقسة. يستنتج من هذه التجربة ان حقن بيض التفقيس بفيتامين B12 ادى الى تحسين واضح في مراحل التطور الجنيني المختلفة كذلك الصفات النوعية للافراخ وصفات بلازما الدم

### ABSTRACT

This study was conducted to examine the effect of in ovo injection with different levels of vitamin B12 on embryonic development, chick's quality and some blood characteristics. Tow hundred hatching eggs (Ross) were divided into four groups (100 eggs/group) and assigned randomly to four treatments, T1: control; T2: 0.4; T3: 0.8 and T4: 1.2  $\mu$ g B12 was injected for each group respectively. This study includes measuring embryo length, diameter of blood vessels, length of area pellucida, number of somites at 48hr. of incubation. Embryo weight, weight of allantoises, amnion sac and fluid, yolk weight, white weight at 14 days of incubation. Hatchability, chicks quality which include (chicks weight, chick length, back length, breast length, breast width, thigh length, drum stick length, and shank length). Internal organs weight, cholesterol, total protein, albumin, globulin, GOT and GPT enzymes. Results indicated that in ovo injection with B12 resulted in significant ( $P < 0.01$ ) increase in embryo length and number of somites and ( $p < 0.05$ ) higher in blood vessels diameter at 48 hr. of incubation. Embryo weight was significantly ( $P < 0.01$ ) higher, allantoises weight ( $P < 0.05$ ) higher, While yolk and albumin weight were significantly ( $P < 0.05$ ) lower at 14 days of incubation. Hatchability was significantly ( $p < 0.01$ ) higher in the B12 groups. Chick's weight, thigh length, drum stick length and leg length were significantly. ( $P < 0.05$ ) higher in B12 groups after 4-6 hr. post-hatch. Internal body organ weight, cholesterol and plasma albumin were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the control group. It could be included from this study that in ovo injection with vitamin B12 improve most of the parameters that were measured and could be used as good indicator of chicks quality.

## المقدمة

محلول الاذابة الحاوي على تراكيز 0.4 , 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12/بيضة على التوالي اذ تم تحضير المحاليل باضافة التراكيز 400, 800 , 1200 ملغم B12 (صنع الشركة البريطانية للادوية British Drugs house) في ثلاث حاويات زجاجية سعة 1 لتر من ماء المقطر (normal saline) على التوالي. تم الحقن بواسطة محقنة اوتوماتيكية بمعيار 0.1 مللتر, ادخلت من الجهة العريضة من البيضة بعد ثقب القشرة عبر الفجوة الهوائية الى البياض (37) وتم غلق الثقب بمادة شمع البرافين الطبي. تم كسر 10 بيضات من كل معاملة لغرض فحص التطور الجنيني بعمر 48 ساعة حضن وتم اخذ قياسات اطوال الاجنة, قطر المنطقة الشفافة و قطر الاوعية الدموية وتم القياس باستخدام فرجال مدبب من الطرفين ومقارنة مقياس الفرجال على ورق ملمتري حسب الطريقة التي استخدمها (عبد اللطيف واخرون, 2001) كما تم حساب عدد ازواج البدينات Somites وذلك بفصل الجنين عن غشاء الصفار بعمل حلقة من ورق الترشيح بحيث يكون القطر الداخلي منها يحيط بقطر شبكة الاوعية الدموية المحيطة بالجنين بعدها يقص غشاء الصفار حول القطر الخارجي للحلقة لفصل الجنين مع الاغشية المحيطة به ورفعها بملقط ويغسل الجنين من الصفار الملصق عليه بالماء ويوضع تحت المجهر الضوئي. الفحص الجنيني الثاني تم بعمر 14 يوم حضن, كسرت 10 بيضات من كل معاملة ووزنت بميزان كهربائي حساس وتكسر البيضات في صحن بتري وتم قياس وزن القشرة, الجنين, البياض, الصفار, الغشاء والسائل الامنيوني وغشاء وسائل الالنتويس وحسبت هذه الاوزان بنسب مئوية من وزن البيضة عند الفحص (78,2). حسب عدد الافراخ الفاقسة في نهاية اليوم 21 من التفقيس وحسبت نسبة الفقس على اساس البيض المخصب حسب المعادلة التالية:

## عدد الافراخ الفاقسة

$$\text{نسبة الفقس من البيض} = \frac{\text{عدد البيض المخصب}}{\text{عدد الافراخ الفاقسة}} \times 100$$

جمعت عينات الدم من الافراخ الفاقسة بعمر يوم عن طريق الوريد الوداجي jugular vein من ثلاث افراخ من كل معاملة حوالي 2-3 مل دم / عينه . وفصلت بلازما الدم بوضع انابيب جمع الدم في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة 1 دقيقة لمدة 15 دقيقة بعدها فصلت البلازما وتم حفظها فوراً تحت درجة (-20م°) لحين اجراء الفحوص عليها. تم فحص الكولسترول (40), البروتين الكلي (41), الالبومين (43), الكلوبولين والانزيمان أسيرتات امينو ترانسفيريز (Aspartate Aminotransferase GOT) و ألانين امينو ترانسفيريز (Alanine Aminotransferase GPT) (42). وتم قياس

فيتامين B12 من الفيتامينات الذاتية بالماء, تم اكتشافه عام 1926 عندما توفي 50000 شخص في الولايات المتحدة بسبب مرض الانيميا الخبيث pernicious anemia والذي يسببه سوء امتصاص فيتامين B12 في المعدة (36) ويعد بانه الفيتامين الاخير الذي تم اكتشافه وانتاجه صناعيا, وتم عزله من مركبات عامل البروتين الحيواني, حيث يوجد الفيتامين B12 الطبيعي فقط في الانسجة الحيوانية وفي براز الحيوانات وكذلك في سائل كرش الحيوانات المجتررة (4). وهو ضروري لتخفيض المركبات احادية الكربون التي تؤدي الى تكوين مجموعات المثيل, ولذلك فهو له علاقة وثيقة بالتركيب الحيوي لعدد من المركبات الضرورية مثل الاحماض النووية, الميثيونين والكولين, كما انه يلعب دورا مهما في العمليات الايضية, وليس له تأثير سمي مهما كانت الكمية المضافة (32). العديد من الدراسات اثبتت بان هذا الفيتامين ضروري لاكمال عملية تفقيس البيض بصورة طبيعية (14), حيث ان نقصه يسبب انخفاض انتاج البيض في دجاج الكهولون الابيض وانخفاض حاد في دجاج الرود ايلاند الاحمر (15) وان الهلاكات الجنينية قد ظهرت في الاسبوع الاول من الحضن بصورة كبيرة وبصورة اقل في الاسبوع الثاني والثالث من الحضن (16). ومن علامات انخفاض الفيتامين حدوث كدمة حول العين, ضعف نمو عضلات الساقين, قصر المنقار, النزف, وانخفاض الرأس بين الافخاذ (10,23).

قام كل من Ferguson و Couch (1954) باجراء تجربة على امهات فروج اللحم بتغذيتهم بعليقة منخفضة من فيتامين B12 ووجدوا ان الاجنة بعمر 17 يوم تعاني من ترييش ضعيف, وحدوث نزف حين ينزع الريش من الحويصلة, كذلك تشحم الكبد وتشوهات في شكل القلب وشحوب الكليتين, كذلك حدوث هلاكات عالية في الاجنة (32). وان اضافة فيتامين B12 الى علائق الامهات بكميات مناسبة قد زاد من وزن البيض ونسبة الفقس في البيض المنتج (26). لذلك تهدف هذه الدراسة الى معرفة تأثير حقن بيض التفقيس بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني ونسبة الفقس وبعض الصفات النوعية والفسلجية للافراخ الفاقسة.

## المواد وطرائق العمل

تم تجهيز 400 بيضة تفقيس فروج اللحم (Ross) من احد حقول امهات فروج اللحم, ولقد غذيت الامهات بعليقة تحتوي على 14.14% بروتين خام, وطاقة 2420.47 كيلو سعرة/كغم علف . ونقل البيض الى كلية الزراعة لاجراء الحقن. تم الحقن قبل وضع البيض في المفقس, حيث قسم البيض الى اربعة مجاميع T1 معاملة السيطرة تركت بدون حقن, والمعاملات T2 , T3 و T4 حقنت بـ 0.1 مل من



الجدول 1. تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني بعمر 48 ساعة حضن.

مستوى المعنوية	T4	T3	T2	T1	الصفات المدروسة
**	10.33±0.3 3 a	9.33±0.66 a	9.16±0.16 a	7.00±0.57 b	طول الجنين (ملم)
*	25.66±1.2 0 ab	26.00±2.0 0 ab	26.33±0.1 6 a	22.00±0.5 7 b	قطر الاوعية الدموية (ملم)
N.S.	14.16±1.3 0 a	14.33±0.3 3 a	12.83±0.1 6 a	11.66±0.8 8 a	طول المنطقة الشفافة (ملم)
**	43.33±0.6 6 a	44.66±2.9 0 a	41.66±0.8 8 a	35.00±1.0 0 b	عدد ازواج البدينات

T1, T2, T3 و T4 تعني معاملة السيطرة، حقن 0.4, 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12/بيضة على التوالي.  
الاحرف الصغيرة المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروق معنوية

\*\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.01)

\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.05)

N.S. يشير الى عدم وجود فروقات معنوية

كما يتضح من الجدول 2 انخفاض عالي المعنوية ( $p<0.01$ ) في النسبة المئوية لوزن القشرة الى وزن البيضة عند الفحص للمعاملة T3، مقارنة مع بقية المعاملات عند عمر 14 يوم حضن، وظهر ارتفاع عالي المعنوية ( $p<0.01$ ) في النسبة المئوية لوزن الجنين الى وزن البيضة في المعاملات T3 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، وارتفاع معنوي ( $p<0.05$ ) في النسبة المئوية لوزن غشاء وسائل الالنتويس في المعاملة T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، وانخفاض معنوي في النسبة المئوية لوزن الصفار ( $p<0.05$ ) للمعاملتين T2 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، وانخفاض معنوي ( $p<0.05$ ) في النسبة المئوية لوزن البياض في المعاملة T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1.

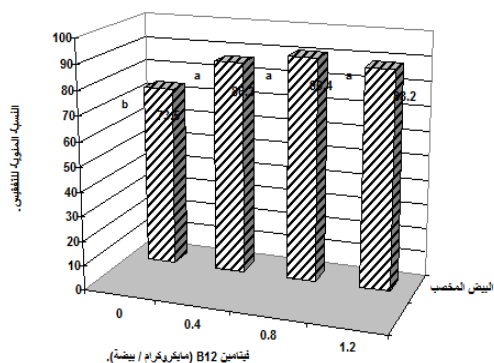
الصفات النوعية للافراخ الفاقسة (بعمر يوم واحد)، وزن الفرخ بميزان كهربائي حساس، طول الفرخ حيث تم قياس الطول بامداد الفرخ على طول مسطرة ملترية من نهاية المنقار الى نهاية اصفر الاصبع الثاني، كذلك تم ذبح الافراخ واخذت قياسات طول الصدر، طول الفخذ، طول عصا الطبال وطول الساق بواسطة فيرنيا رقمية. كذلك تم قياس اوزان الاحشاء الداخلية بميزان كهربائي حساس، وزن القانصة، المعدة الحقيقية، القلب، كيس الصفار، غدة فابريشيا والكبد. وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan's (1955) متعدد الحدود، واستعمل البرنامج SAS (1996) الاحصائي الجاهز في التحليل الاحصائي.

### النتائج والمناقشة

يتضح من الجدول (1) وجود فروق عالية المعنوية ( $p<0.01$ ) في طول الجنين بعمر 48 ساعة حضن، اذ تفوقت معاملات حقن البيض T2, T3 و T4 على معاملة السيطرة T1 وانعكست الزيادة على قطر الاوعية الدموية حيث كانت الفروق معنوية ( $p<0.05$ ) للمعاملة T2 مقارنة مع معاملة السيطرة T1 وارتفاع عدد ازواج البدينات (Somites) اعلى معنويا ( $P<0.01$ ) للمعاملات T2 و T3 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1 حيث يمثل هذا العمر من النمو الجنيني بداية المرحلة الاولى من حياة الجنين مرحلة تطور الاجهزة الداخلية للجنين وتكون الاغشية الجنينية (3, 24) ويمثل طول الجنين مدى التطور في نمو الاجنة اما قطر الاوعية الدموية فيمثل مدى تطور الجهاز الدموي خارج الجنين حيث تم ذلك الحلقة الصفارية من الدورة الدموية والتي تكون على شكل شبكة شعرية الدموية على الصفار (بداية تكوين غشاء الصفار Yolk sac) حيث تصل المواد الغذائية من الصفار الى الجنين بواسطة الاوردة الصفارية ويصل الدم الى الجنين بواسطة الشرايين أما ازواج البدينات فهي اجسام كثيفة تمثل البداية الجنينية الرئيسية والشوكية للمخ وبداية نشوء الهيكل العظمي (الحبل الشوكي Chorda) وتظهر في المراحل الاولى من عمر الجنين فقط وتتطور بعدها تدريجيا لتكون الهيكل العمود الفقري فيما بعد (6)، ومن النتائج المذكورة يمكننا الاستدلال على ان المعاملات T2 و T3 و T4 كانت الافضل في كثير من الصفات المدروسة والمتعلقة بالنمو الجنيني مقارنة مع مجموعة السيطرة T1.



86.2%, 90.4%, 88.2% و 73.5% على التوالي وتتفق هذه النتيجة مع ( 38,12) ويعود ذلك الى دور الفيتامين B12 في محافظة الجنين على البقاء وتطور العضلات, حيث ان نقصه يسبب الهلاكات الجنينية المبكرة, كذلك فإن الفحوصات التي اجريت خلال مراحل النمو الجنيني بينت مدى تفوق معاملات الحقن ببعض الصفات التي تعتبر مؤشرا لنمو افضل مقارنة مع معاملة السيطرة.



شكل 1. تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في نسبة البيض الفاقس نسبة للبيض المخصب.

يبين الجدول (3) بعض القياسات النوعية للافراخ الفاقسة حيث وجدت فروقات معنوية ( $P < 0.05$ ) في وزن الفرخ, طول عصا الطبل وطول الساق للمعاملة T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1, كذلك ارتفاع معنوي ( $P < 0.05$ ) في طول الفخذ للمعاملة T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1. وارتفاع عالي المعنوية ( $p < 0.01$ ) في طول الفرخ للمعاملتان T3 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1. وارتفاع عالي المعنوية ( $p < 0.01$ ) في طول الصدر T2, T3 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة. نظرا لتغيرات متطلبات السوق للحصول على افراخ ذات صفات نوعية بجودة عالية اجريت الكثير من البحوث حول ادارة المفاس وكيفية انتاج افراخ بجودة عالية في الصفات النوعية (20). الافراخ الفاقسة من المعاملات المحقونة بفيتامين B12 ادت الى زيادة في وزن الافراخ وبالتالي ازداد طول الفرخ (29), كذلك الزيادة في طول الصدر, طول الفخذ, طول عصا الطبل و طول الساق تعتبر مؤشرا لافراخ ذات نوعية عالية الجودة (22), الزيادة في طول الفخذ, طول عصا الطبل وطول الساق قد يكون السبب المباشر في زيادة طول عضلة الصدر وبالتالي تحدث زيادة في طول الصدر (39), وفي دراسة للباحث Msoffe (2001) بأن هنالك علاقة بين طول الساق وطول الفرخ مع وزن الفرخ الناتج, وهذا يعد المعيار الامثل لاختيار نوعية الافراخ من المفقسات لانتاج قطع فروج لحم بأوزان عالية, كذلك فإن معيار التطور الجيد للأجنة ممكن احتسابه عن طريق قياس طول الجنين (13).

جدول 2. تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في التطور الجنيني بعمر 14 يوم حضن.

الصفات المدروسة (غم)	T1	T2	T3	T4	مستوى المعنوية
القشرة	11.15±0.34 a	10.98±0.34 a	9.40±0.27 b	10.92±0.04 a	**
الجنين	20.06±0.81 b	22.26±0.48 ab	24.01±0.69 a	23.81±0.18 a	**
غشاء وسائل الامنيون	9.51±1.15 a	10.77±0.68 a	9.78±0.42 a	11.36±0.16 a	N.S.
غشاء وسائل اللنتويس	16.85±1.30 b	20.36±0.23 ab	22.48±1.52 a	18.36±0.16 ab	*
الصفار	30.02±1.22 a	26.55±0.73 b	28.20±0.56 ab	25.95±1.19 b	*
البياض	12.25±0.23 a	8.75±1.13 ab	5.57±1.85 b	9.03±1.47 ab	*

T1, T2, T3 و T4 تعني معاملة السيطرة, حقن 0.4, 0.8 و 1.2

مايكروغرام B12/بيضة على التوالي.

الاحرف الصغيرة المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروق معنوية

\*\* تشير الى فرق معنوي بمستوى ( $P < 0.01$ )

\* تشير الى فرق معنوي بمستوى ( $P < 0.05$ )

N.S. يشير الى عدم وجود فروقات معنوية

ان النسبة المئوية لوزن الجنين الى البيضة قد يكون مؤشرا لنسبة فقس اكبر وكذلك يدل على نوعية الجيدة للافراخ الفاقسة (18). يبدأ اللنتويس بالتكوين بعمر 3 ايام حضن ويقوم بنقل البومين الدم من الاوعية الدموية الى جسم الجنين كذلك يقوم بوظائف اجهزة الابراز والهضم ويتحد مع غشاء الكوريون ويكونان معا الكوريو اللنتويس chorioallantois الذي بدوره يعمل كناقل غذائي بين الاجهاز الوعائي والجنين ويقوم بعملية التبادل الغازي بين داخل وخارج البيضة عن طريق الخاصية النفاذية بين اغشية القشرة الخارجية والداخلية, حيث بين Romanoff (1960) بأن الناقلات الشعرية لهذا الغشاء (الكوريو اللنتويس) يقوم بنقل خلايا الدم باتجاه واحد بلا رجوع لتغذية الجنين. وكلما كان الجنين اكثر تطورا ونموا كان اكثر حاجة للغذاء واكثر افرازا نواتج الافعال الحيوية (24, 27) كما يعد معيارا قياسيا لانتاج افراخ ذات نوعية عالية الجودة (13). لقد اظهرت النتائج دور فيتامين B12 الفاعل في سرعة النمو الجنيني لهذه المعاملات من خلال استهلاك البياض والصفار وتحويلهما الى مادة غذائية (1, 12, 24)

يبين الشكل 1. يبين فروقات عالية المعنوية

( $P < 0.01$ ) في النسبة المئوية للبيض الفاقس على

اساس البيض المخصب اذ تفوقت معاملات حقن

البيض بفيتامين B12 T2, T3 و T4 مقارنة مع

معاملة السيطرة T1, حيث كانت القيم للمعاملات

الجدول 3. تأثير تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في بعض الصفات النوعية للافراخ الفاقسة.

الصفات المدروسة	T1	T2	T3	T4	المستوى
وزن الفرخ (غم)	40.95±2.20 b	44.40±0.32 ab	44.11±1.88 ab	47.05±1.41 a	*
طول الفرخ (سم)	18.70±0.11 b	19.00±0.11 ab	19.40±0.05 a	19.40±0.20 a	**
طول الظهر (سم)	50.46±1.10 a	53.17±5.44 a	54.94±1.97 a	51.18±1.19 a	N.S
طول الصدر (سم)	21.15±1.15 c	26.11±0.92 b	34.88±1.25 a	35.67±1.53 a	**
عرض الصدر (سم)	14.13±0.06 a	16.52±0.87 a	16.86±1.01 a	16.09±0.86 a	N.S
طول الفخذ (سم)	31.94±0.61 b	33.28±0.72 ab	37.58±2.10 a	35.75±2.15 ab	*
طول عصار الطحال (سم)	30.71±0.05 b	32.79±0.46 b	32.58±1.36 b	38.65±2.85 a	*
طول الساق (سم)	33.11±1.67 ab	29.22±0.46 b	33.04±4.07 ab	38.81±0.36 a	*

T1, T2, T3 و T4 تعني معاملة السيطرة، حقن 0.4, 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12/بيضة على التوالي.

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروق معنوية

\*\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.01)

\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.05)

N.S. يشير الى عدم وجود فروقات معنوية

مصنع تكوين الدهون lipid في جسم الافراخ (33)، وفي دراسة لـ Ali وآخرون (2007) بينت بأن وزن كيس الصفار المتبقي يعد معيارا في زيادة اوزان الافراخ الناتجة والتطور السريع في نموها خلال الاسبوع الاول من حياة الافراخ. اما الزيادة في وزن غدة الفابريشيا قد يعود الى دور فيتامين B12 في تعزيز المناعة الخلوية والخلطية وبما ان غدة فابريشيا هو مركز تطور الخلايا المناعية للمفاوية البائية (B- lymphocyte) لذا فان اي تطور في الجانب المناعي سوف يظهر تأثيره في زيادة الوزن النسبي لهذه الغدة (34,7).

جدول 4. تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في اوزان الاحشاء الداخلية للافراخ الفاقسة بعمر 4-6 ساعات.

الصفات المدروسة (غم)	T1	T2	T3	T4	مستوى المعنوية
القنصة	5.17±0.05 b	6.03±0.27 a	5.95±0.21 a	4.80±0.28 b	**
المعدة الحقيقية	1.05±0.07 b	0.98±0.20 b	0.94±0.08 b	1.51±0.10 a	*
القلب	0.70±0.02 c	0.89±0.03 a	0.88±0.01 a	0.79±0.01 b	**
الصفار	10.66±1.56 a	6.69±0.74 b	7.67±0.24 ab	6.68±0.58 b	*
غدة فابريشيا	0.17±0.02 b	0.21±0.00 a	0.20±0.00 ab	0.160.01 b	*
الكبد	3.10±0.04 a	3.70±0.38 a	3.48±0.10 a	3.08±0.05 a	N.S.

T1, T2, T3 و T4 تعني معاملة السيطرة، حقن 0.4, 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12/بيضة على التوالي.

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروق معنوية

\*\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.01)

\* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.05)

N.S. يشير الى عدم وجود فروقات معنوية

يبين الجدول (5) انخفاض معنوي (P<0.05) في تركيز كوليسترول بلازما الدم في معاملات الحقن T2 و T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، كما وان ارتفاعا معنويا (P<0.05) في تركيز البومين بلازما لعاملة T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1. ان معدلات تركيز الكوليسترول في بلازما الدم للافراخ الفاقسة من البيض المحقون بفيتامين B12 قد انخفض بسبب وجود كيس الصفار المتبقي حيث يرتبط الاثنان ارتباطا ايجابيا بحيث انه كلما انخفض الكوليسترول في بلازما الدم يعني ان الصفار المتبقي قد استهلك اكثر وبالتالي تنتج افراخ ذات اوزان عالية والقابلية على القيام بالافعال الحيوية الضرورية لنمو اسرع (19). البومين بلازما الدم هو البروتين الرئيسي من بروتينات البلازما، له القابلية على الحفاظ على ترابط جزيئات الماء، الكالسيوم، الصوديوم، البوتاسيوم، الاحماض الدهنية، المواد العقارية و البيليروبينات bilirubin، كذلك ينقل السموم بربطه بشكل حر مع

يبين الجدول (4) اوزان الاحشاء الداخلية للافراخ الفاقسة حيث ظهرت فروقات معنوية (P<0.05) في وزن المعدة الحقيقية في معاملة الحقن T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، ووزن غدة الفابريشيا في معاملة الحقن T2 مقارنة مع معاملة السيطرة T1. وفروق عالية المعنوية (P<0.01) في وزن القلب في معاملات الحقن T2, T3 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، ووزن القنصة في معاملات الحقن T2 و T3 مقارنة مع معاملة السيطرة T1، وانخفاض معنوي (P<0.05) في وزن الصفار في معاملات الحقن T2 و T4 مقارنة مع معاملة السيطرة. التطور في زيادة الوزن النسبي للقنصة والمعدة الحقيقية قد يعود الى تأثير فيتامين B12 في زيادة عمليات الهضم والايض في الاجنة (17). كذلك فان الزيادة الوزنية للقلب قد تكون بسبب زيادة فعاليات جهاز الدوران في الاجنة في نقل الغذاء والغازات عبر الاوعية الدموية (30)، الانخفاض الحاصل في وزن كيس الصفار المتبقي في بطن الافراخ الفاقسة من البيض المحقون بفيتامين B12 قد يعود بسبب قابلية الافراخ العالية بامتصاص وهضم الصفار الذي يعد

6. Bellairs R. and Osmond M (2005) The Atlas of Chick Development. Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, UK
7. Calnek F (1991) Disease of poultry. 2<sup>nd</sup> ed. The AVI publishing company, West port, Connecticut:226-229
8. Duncan's BD. (1955) Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11 : 1- 24
9. Ferguson TM, and Couch AR (1954) Further gross observations on the b12 deficient chick embryo. J. Nutr., (7): 361-370.
10. Ferguson TM., Rigdon RH, and Couch JR (1955) A pathological study of vitamin B12 deficient chick embryos. Arch. Pathol. 60:393-400.
11. Halick JV., Eeid AL, Brown CL and Couch JL. (1953) The vitamin BU content of egg yolks as influenced by oral and parenteral administration of the vitamin. J. Nutr., 50: 331-340
12. Hill D. (2001) Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality? Avian Poult. Biol. Rev. 12:188. (Abstr.)
13. Landauer W. (1967) The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. Monograph 1 (Revised). Storrs Agricultural Experiment Station, Storrs, CT.
14. Leeson S., Reinhart BS and Summers JD. (1979a) Response of White Leghorn and Rhode Island Red breeder hens to dietary deficiencies of synthetic vitamins. 1. Egg production, hatchability and chick growth. Can. J. Anim. Sci. 59:561-567.
15. Leeson S., Reinhart BS, and Summers JD (1979b) Response of White Leghorn and Rhode Island Red breeder hens to dietary deficiencies of synthetic

جزئيات الماء الموجودة في بلازما الدم مما يقلل من اثرها على الجسم ويقوم بنقله الى الكبد ليقوم بالعمليات الايضية للتخلص من تلك السموم, وظيفة البومينات الدم الاساسية هي المحافظة على الضغط الاوزموزي في الدم, والزيادة الحاصلة في البومين بلازما الدم للافراخ الفاقسة من البيض المعامل بفيتامين B12 تعد مؤشرا لانتاج افراخ بصفات دم ذا نوعية جيدة (28).

جدول 5. تأثير حقن بيض تفقيس فروج اللحم بمستويات مختلفة من فيتامين B12 في بعض صفات بلازما الدم للافراخ الفاقسة.

الصفات المدروسة	T1	T2	T3	T4	مستويات المعنوية
الكوليسترول mg/d	471.33±34.41 a	353.33±19.91 b	408.66±27.71 ab	392.50±2.50 ab	*
البروتين الكلي g/l	22.70±1.47 a	23.23±0.93 a	26.70±1.88 a	26.15±2.55 a	N.S.
الايوبمين g/l	9.36±0.92 b	9.73±0.64 b	13.13±0.74 a	9.20±0.10 b	*
الكوليوليول g/l	13.33±0.55 a	13.50±0.28 a	13.56±1.15 a	16.95±2.45 a	N.S.
الانزيم u/l GOT	33.00±4.04 a	30.00±1.73 a	35.00±2.30 a	33.50±4.50 a	N.S.
الانزيم u/l GPT	3.66±0.33 a	3.33±0.88 a	1.83±0.44 a	3.00±1.00 a	N.S.

T1, T2, T3 و T4 تعني معاملة السيطرة, حقن 0.4, 0.8 و 1.2 مايكروغرام B12/بيضة على التوالي.

الاحرف الصغيرة المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروق معنوية \* تشير الى فرق معنوي بمستوى (P<0.05) N.S. يشير الى عدم وجود فروقات معنوية

## المصادر

1. الجاف فرح خالد (2005) دراسة تأثير حقن بيض التفقيس بمستويات مختلفة من حامض الفوليك في التطور الجنيني ونسبة الفقس وتأثيرها على الصفات الاقتصادية والفسلجية للفروج الناتج. اطروحة ماجستير-كلية الزراعة- جامعة بغداد- العراق
2. عبد اللطيف خلدون محمود, ابراهيم ضياء خليل و الحسني ضياء حسن (2001) مقارنة النموالجنيني في البيض الناتج من ذكور الدجاج المحلي مع امهات فاوبرو. مجلة الزراعة العراقية. المجلد 6 العدد1:107-112.
3. ناجي, سعد عبد الحسين و العطار حامد عبد الواحد (1985) انتاج الدواجن ومشاريع فروج اللحم. مطبعة النقني. بغداد- العراق
4. الياسين, علي عبد الخالق (1990) الدواجن غذاء وتغذية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة صلاح الدين العراق.
5. Ali OHA., Elzubeir EA and. Elhadi HM (2007) Effect of residual yolk sac on growth, liver total lipids and serum total lipids in broiler chicks. Pak. J. Biol. Sci., 10: 4559-4562.

- Mc Graw Hill Book Co. , Inc.New york.
26. Peters T., Biamonte GT and Dumas BT (1983) Protein (total protein) in serum, urine and cerebrospinal fluid; albumin in serum. In: Selected methods of clinical chemistry, Vol. 9, W.R. Faulkner and S. Meites (Eds), Washington, D.C., Am. Assoc. Clin. Chem.: 56-59.
27. Reijrink IAM., Meijerhof R, Kemp B, Graat EMA and van den Brand HA. (2009) Influence of prestorage incubation on embryonic development, hatchability, and chick quality. Poult. Sci. 88:2649-2660.
28. Retnani, Y and Suprpti, E and Firmansyah, Indra and Herawati, L and Mutia, R (2009). Effect of Coloring Agent Addition in the Broiler Chicken Rations on Performance, Percentage of Bursa of Fabricius, Carcass and Viscera. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 34 (2). 115-121.
29. Retnani, Y and Suprpti, E and Firmansyah, Indra and Herawati, L and Mutia, R (2009) *Effect of Coloring Agent Addition in the Broiler Chicken Rations on Performance, Percentage of Bursa of Fabricius, Carcass and Viscera*. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 34 (2). 115-121
30. Roche S (1995) Roche products for animal nutrition and health. F. Hoffmann-La Roche., Basel, Swetzerland.
31. Romanoff AL. (1960) The Avian Embryo. Structural and Functional Development. New York: Macmillan
32. Sahin KM, Onderic N, Sahin MF, and Kucuk O (2003) Dietary vitamin C and Folic acid supplementation ameliorates the tetermental effects of heat stress in Japanese quail.The American vitamins. 2. Embryo mortality and abnormalities. Can. J. Anim. Sci. 59:569-575.
16. Lihninger AL.(1982) Princeples of biochemistry, Worth publishers Inc. N.Y., 271.
17. Louise JD., Hilary CA and Yesair DW. (1960) Vitamin B<sub>12</sub> in developing chick embryos from vitamin B<sub>12</sub>-deficient and control eggs. 90: (2) 250-253
18. Malik HEE., Ali OHA, Elhadi HA, and Elzubeir AE (2011) Residual yolk utilization in fast and slow-growing chicks, subjected to feed and water deprivation. Asian J. Biol. Sci. 4: 90-95.
19. Mather CM. and Laughlin KF (1976) Storage of hatching eggs: The effect on total incubation period. Br. Poult. Sci. 17:471-479.
20. Msoffe PLM., Minga UM, Olsen JM, Yongolo MGS, Juul-Madsen MU, PS, and Mtambo MMA. (2001) Phenotypes including immunocompetence in scavenging local chicken ecotypes in Tanzania. Trop. Anim. Health Prod. 33:341-354.
21. O'Dea EE., Fassenko GA, Feddes JJA, Robinson FA, Segura JE, Ouellette CA, and van Middelkoop JA. (2004) Investigating the eggshell conductance and embryonic metabolism of modern and unselected domestic avian genetic strains at two flock ages. Poult. Sci. 83:2059-2070.
22. Olcese O., Couch JR, Quisenberry JH, and Person PB (1950) Congenital anomalies in the chick due to a vitamin B12 deficiency. J. Nutr. 41:423-431.
23. Orlov MV(1987) Biological Control in Incubation ,3<sup>rd</sup> ed. Moschow, Russcellezgat (in Russian)
24. <http://www.nutrasanus.com/vitamin-b12.html>
25. Patten BM (1971) Early Embryology of of The Chick .5<sup>th</sup> ed

- Technics. New York: Harper and Row, PP: 503-557.
40. Reinhold RR. (1953) Determination of serum albumin. Clin. Chem., 21: 1370-1372.
  33. SAS, Institute (1996) SAS User Guide : statistics version 6<sup>th</sup> ed., SAS Institute Inc., Cary, NC.
  34. Shorb MS. (2009) A key contributor to the discovery of Vitamin B12. Department of Animal and Avian Sciences - University of Maryland, College Park
  35. Sunde ML., Cravens WW, Elvehjem CA and Halpin JG (1950) The Effects of folic acid on embryonic development of the domestic fowl. Poultry Sci .29: 696-702
  36. Willemsen H., Everaert N, Witters A, De S L, Debonne M, Verschuere F, Garain P, Berckmans D, Decuyper E and Bruggeman V. (2008) Critical Assessment of Chick Quality Measurements as an Indicator of Posthatch Performance. Poult Sci., 87:2358-2366.
  37. Zake B R, Dickenman E, Whie HB, and Cherney P (1954) Rapid estimation of free and total cholesterol. Am. J. Clin. Path., 24:1307.
  38. Dumas BT, Bayso D R, Carter J, Peters T and Schaffer J (1981) Determination of total serum protein. Clin. Chem., 27: 1642-1643.
  39. Giorgio DJ (1974) Nonprotein nitrogenous constituents in: Henry, R. and Cannon, J. Winkelman 2<sup>nd</sup> Eds. Clinical Chemistry: Principles and

## التحري عن بقايا مبيدات الكلور العضوية في اللحوم

عصام شاكر حمزة، عبود حيون مصلح ، عيسى عبد صالح ، فرقد عبدالله رشيد ، علي محمد جواد

مركز بحوث تلوث الغذاء-وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد-جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: isamhzmzash@yahoo.com

### الخلاصة باللغة العربية

تم التحري عن بقايا المبيدات الكلورية في (25) نموذج من اللحوم المحلية والمستوردة (عراقية، هندية، نيوزلندية وماليزية) سحبت بصورة عشوائية من الأسواق المحلية لمحافظة (بغداد، بابل، واسط والعمارة). استخدمت تقنية الكروماتوغرافيا الغازية وباستخدام كاشف Flamo Ionazation Detecror (FID) في التحري عن مبيد الـ DDT أو نواتج تحليله (P,P-DDT ، P,P-DDD ، P,P-DDE ، O,P-DDT ، O,P-DDD). بينت نتائج التحليل أن (16) عينة من اللحوم الهندية من أصل (20) عينة أي بنسبة 80% تلوثها ببقايا المبيدات الكلورية في حين أظهرت باقي النماذج خلوها من بقايا المبيدات. أن تناول اللحوم الملوثة بهذه ببقايا المبيدات بصورة مستمرة يؤدي إلى تراكمها في الأنسجة الدهنية للإنسان مما يشكل خطورة على صحته.

### ABSTRACT

Accomplished detection of Chlorinated Pesticide Residue in (25) samples of local and imported meat (Iraqi, Newzealand, Malaysia, Indian) collected randomly from local markets (Baghdad ,Babel ,Wasset ,Alomara).

Use the gas chromatography technique by using Flamo Ionazation Detecror (FID) for detection of DDT pesticide or his decomposed products (P,P-DDT, P,P-DDD ,P,P-DDE , O,P-DDD , O,P-DDT).

The results showed that (16) Indian meat samples from (20) samples which estimated 80% contaminated with Chlorinated Pesticide Residue , other samples appeared free from these pesticides.

Consumption of contaminated meat with pesticides Residue continuously , causing accumulation it in the lipid tissues and causing risk on his health.

## المقدمة

باللحوم العراقية وباقي اللحوم المستوردة، أن هذه اللحوم يجب أن تكون مطابقة للمواصفات القياسية للأغذية العالمية والمحلية وخالية من الملوثات الكيميائية لذا يهدف البحث في التحري عن بقايا المبيدات في اللحوم.

## المواد وطرائق العمل

## 1. النمذجة

تم إجراء البحث على ( 25 ) نموذج من اللحوم المستوردة و المحلية ( 20 نموذج لحم هندية، نموذج لحم نيوزلندي، نموذج لحم ماليزي وثلاث نماذج من اللحوم العراقية) سحبت بصورة عشوائية من الأسواق المحلية لمحافظة (بغداد، بابل، واسط والعمارة).

## 2- استخلاص الدهون من نماذج اللحوم

- أخذت عينات من اللحوم بوزن ( 2-3 ) كيلو غرام وبزال منها العظم ان وجد وقطعت الى قطع صغيرة وتم فرمها بألة فرم اللحوم.  
- أخذت عينة من النموذج وبضاف إليها كمية من كبريتات الصوديوم اللامائية ونقلت الى دورق سكسلت Fluted Filler Paper في جهاز الاستخلاص لمدة ست ساعات.  
- تم تبخير المذيب المستخدم بواسطة جهاز التبخير الدائري تترك العينة لتجف باستخدام الـ Desiccators بعدها تم الحصول على وزن من الدهون (8،7).

## 3- استخلاص بقايا المبيدات الكلورية من الدهون المستخلصة

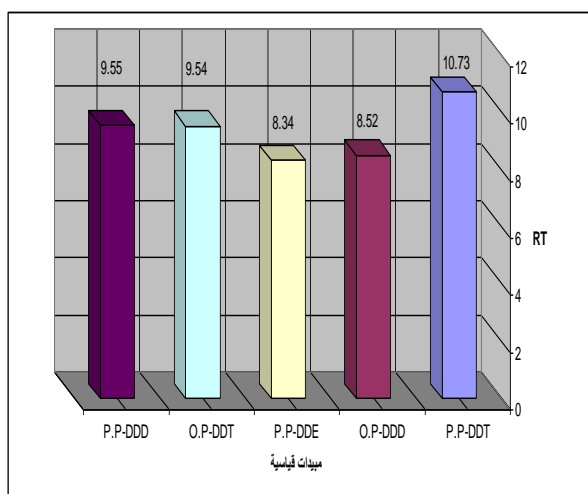
- تم أخذ وزن من الدهون المستخلصة ووضعت في قمع فصل وأضيف إليها إيثربترول ثم استنتريل ومزجت جيداً  
- أخذت طبقة الاستنتريل وأضيف إليها ماء مقطر ومحلول ملحي مشبع وإيثربترول وبعد خلط المزيج جيداً تم التخلص من الطبقة المائية  
- تم تمرير الطبقة العضوية عبر كبريتات الصوديوم اللامائية ثم من خلال عمود من الفلوراسيل المنشط وجمع الراشح وتم تبخيره في جهاز التجفيف تحت ضغط ودرجة حرارة ثابتة  
- عند جفاف العينة أضيف إليها الهكسان وبكمية قليلة تم حقنه في جهاز الكروماتوغرافيا الغازية باستخدام عمود KB-5 واختيار برنامج خاص للكشف عن هذه المبيدات في جهاز الكروماتوغرافيا الغازية بدرجات حرارة ( 180-250 ) °م حيث ترتفع درجة الحرارة 10°م في كل وقفة ثم يبقى لمدة 5 دقائق على الحرارة النهائية (250°م) (9،10،11).

المبيدات هي مواد كيميائية تستخدم في مجالات الزراعة والصحة العامة للقضاء على شتى أنواع الآفات من حشرات (Insecticides) وحشائش ونباتات ضارة (Herbicides) وفطريات (fungicides) وقوارض (Rodenticides) (1) وغالباً ما يتبقى جزء كبير من المبيدات في التربة لأعوام عديدة ( المبيدات الكلورينية العضوية ) والتي هي موضوع البحث حيث تمتص النباتات جزء من هذه المبيدات وتخزنها في سيقانها وأوراقها وثمارها ثم تنتقل إلى الحيوانات التي تتغذى على هذه النباتات وتظهر في ألبانها ولحومها ويتأثر الإنسان بهذه المبيدات بصورة مباشرة أو بصورة غير مباشرة ، ومما يزيد من خطورة هذه المبيدات تأثيرها التراكمي وإنها تنتقل ضمن حلقات السلسلة الغذائية مما يشكل خطر كبير على صحة الإنسان (2،3).

بشكل عام تنقسم المبيدات الحشرية إلى مجموعتين ، المجموعة الأولى تعرف باسم المبيدات الحشرية العضوية الكلورية (Organochlorin pesticides) حيث تتتركب هذه المجموعة كيميائياً من جزئين، الجزء الأول غير عضوي وهو مادة الكلور أما الجزء الثاني فيتكون من مادة عضوية ، ومن أنواع هذه المبيدات الـ (D.D.T.) و (D.D.D.) والدرين (Aldrin) والايزودرين (Isodrin) .... الخ (1،4) . أما المجموعة الثانية فهي المبيدات الحشرية غير العضوية مثل فوسفيد الألمنيوم (Aluminum Phosphide) وتتركب كيميائياً من جزئين غير عضويين الجزء الأول هو عنصر الألمنيوم أما الجزء الثاني فهو عنصر الفوسفات، وكلتا المجموعتين العضوية وغير العضوية لا تتواجد في النظم البيئية بصورة طبيعية إنما يتم تصنيعها في معامل خاصة لغرض استخدامها في مقاومة الآفات الزراعية (5).  
تتمثل خطورة هذه المبيدات في خاصيتين من خصائصها الطبيعية والكيميائية ، الخاصة الأولى كونها غير قابلة للتحلل في البيئة فتبقى سموماً في النظم البيئية لعشرات السنين أما الخاصة الثانية فإنها لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في الزيوت والأحماض الدهنية الموجودة في جميع أنسجة الكائنات الحية بما فيها أنسجة الإنسان (3،5) ، الأمر الذي يمكنها من التغلغل في جميع مستويات السلسلة الغذائية لجميع النظم البيئية فتنتقل من النباتات إلى الحشرات والحيوانات التي تتغذى على الأعشاب ثم من الحيوانات آكلة الأعشاب إلى الحيوانات آكلة اللحوم وهكذا تسري في السلسلة الغذائية ، مما تقدم نلاحظ إن بقايا المبيدات ممكن أن تسبب خطورة على صحة الإنسان فتسبب إحداث الفشل الكلوي والكبدية إضافة إلى الإصابة بالأمراض العضال وتعتبر من المواد المسرطنة (6).

لقد ازداد إقبال المواطنين في السنوات الأخيرة على استهلاك اللحوم المستوردة بصورة عامة واللحوم الهندية بصورة خاصة وذلك لرخص ثمنها مقارنة

## 4- استخدام المبيدات القياسية



شكل (1): يبين زمن الاحتجاز (دقيقة) للمبيدات القياسية

جدول (1) يبين نتائج تحليل المبيدات القياسية

ت	نوع المبيد	زمن الاحتجاز (دقيقة)
1	P,P - DDT	10.73
2	O,P - DDD	8.52
3	P,P - DDE	8.34
4	O,P - DDT	9.54
5	P,P - DDD	9.55

جدول (2) يبين نتائج تحليل اللحوم العراقية

ت	اسم النموذج	زمن الاحتجاز (دقيقة)	نوع الملوث
1	لحم عراقي / بغداد	*U.D.L.	—
2	لحم عراقي / واسط	U.D.L.	—
3	لحم عراقي / بابل	U.D.L.	—

\*U.D.L.= Under Detected Limit

أظهرت نتائج التحري عن بقايا المبيدات في اللحوم الهندية احتواء (16) نموذج من مجموع (20) نموذج على أكثر من نوع من بقايا المبيدات المذكورة جدول (3) شكل (2).  
أظهر نموذجي اللحم النيوزلندي والماليزي خلوهما من بقايا مبيدات الكلور العضوية جدول (4).

استخدمت خمسة مبيدات قياسية هي :

(P,P-Dichloro diphenyl trichloroethane)  
P,P – DDT  
(O,P-Dichloro diphenyl dichloroethane)  
O,P – DDD  
(P,P-Dichloro diphenyl dichloroethene)  
P,P – DDE  
(O,P-Dichloro diphenyl trichloroethane)  
O,P – DDT  
(P,P-Dichloro diphenyl trichloroethane)  
P,P – DDD

وتم تعيين زمن الاحتجاز لكل مبيد والذي اعتمد في تعيين وجود بقايا المبيدات من عدمه في نماذج اللحوم المفحوصة.

كما تم اعتماد تحليل عينات لا تحتوي على مبيدات Blank Samples مع عينات اللحم التي تم تحليلها للتأكد من عدم حدوث تلوث في العينات بأي من المبيدات أثناء عملية التخزين والاستخلاص والتحليل كما استخدمت مذيبات عضوية عالية النقاوة لاستخلاص بقايا المبيدات.

## النتائج والمناقشة

تم تعيين كفاءة الاستخلاص في التحليل لتجنب حدوث أي تأثيرات قد تحصل نتيجة فقدان المبيدات أثناء عملية الاستخلاص من عينات اللحوم ولذلك طبقت المعايرة اللازمة Validation باستخدام تراكيز قياسية للمبيدات في وسط مماثل لما تحتويه العينات التي تم فحصها.

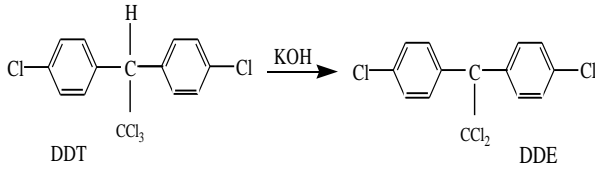
بينت نتائج التحليل للمبيدات القياسية أن زمن الاحتجاز لمبيد P,P-DDT هو 10,73 دقيقة ولمبيد O,P – DDD هو 8,52 دقيقة ولمبيد P,P – DDE هو 8,34 دقيقة ولمبيد O,P – DDT هو 9,54 دقيقة ولمبيد P,P – DDD هو 9,55 دقيقة، جدول (1) شكل (1).

لقد تم اعتماد زمن الاحتجاز للمبيدات القياسية كأساس في تحديد مدى احتواء نماذج اللحوم المفحوصة على المبيدات وتحديد أنواعها من خلال مقارنة زمن الاحتجاز للمبيدات في العينات المفحوصة مع زمن الاحتجاز للمبيدات القياسية.

بينت نتائج تحليل اللحوم العراقية خلوها من بقايا المبيدات المذكورة جدول (2)، أن عدم وجود تلوث للحوم العراقية بالمبيدات الكلورينية يعود إلى قلة استخدام هذه المبيدات منذ سبعينيات القرن الماضي في مكافحة الحشرات وبالتالي عدم تلوث الحشائش والنباتات وعلائق الحيوانات بهذه المبيدات وبالنتيجة خلو اللحوم منها.



وبتراكيز عالية حيث يتصف هذا المبيد بفترة بقاءه الطويلة في الطبيعة تصل الى عدة سنوات بسبب مقاومته العالية على التحلل حيث تتحمل المادة النقية درجات حرارة تصل إلى 190°م دون ان تتحلل إضافة إلى مقاومته إلى الرطوبة والمحافظة على استقراريته عند خزنه لفترات طويلة ، لوحظ عند معاملة المبيد او استخلاصه في محيط قلوي فانه يتحول الى مادة غير سامة ( DDE)  
Dichlorodiphenylethene حيث يفقد ذرة كلور وذرة هيدروجين وتدعى هذه العملية بـ  
Dehydrochlorination :



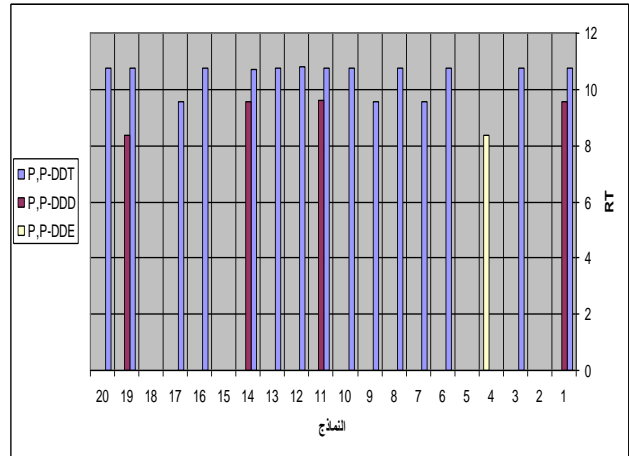
جدول(4) يبين نتائج تحليل لحوم أخرى

ت	اسم النموذج	زمن الاحتجاز (دقيقة)	نوع الملوث
1	لحم نيوزلندي	U.D.L.	—
2	لحم ماليزي	U.D.L.	—

يؤدي تناول اللحوم الحاوية على بقايا هذه المبيدات بصورة مستمرة إلى تراكمها في الأنسجة الدهنية للإنسان ولوحظ أن التراكيز القليلة منها التي لا تتجاوز الـ (0,01) جزء بالمليون تؤثر على الأعصاب الحسية لإحداثها خللاً في النفاذية لعنصري الصوديوم والبوتاسيوم خلال الأغشية العصبية (6)، أما نماذج اللحوم التي لم تظهر لها أطيايف كروماتوغرافيا فهذا يعني خلوها من بقايا مبيدات الكلور العضوية لاستخدام هذه المبيدات في مناطق زراعية دون أخرى.

جدول(3) يبين نتائج تحليل اللحوم الهندية

ت	اسم النموذج	زمن الاحتجاز (دقيقة)	نوع الملوث
1	لحم حبل هندي	9.57 / 10.78	P,P-DDD/P,P-DDT
2	لحم مثرور هندي	U.D.L.	—
3	ساق عجل هندي	10.78	P,P-DDT
4	ساق عجل هندي	8.36	P,P-DDE
5	لحم هندي / بغداد	U.D.L.	—
6	لحم هندي / بغداد	10.75	P,P-DDT
7	لحم هندي / بغداد	9.57	P,P-DDD
8	لحم هندي / عماره	10.78	P,P-DDT
9	لحم هندي / بابل	9.56	P,P-DDD
10	لحم هندي / المدحنية	10.78	P,P-DDT
11	لحم هندي / المدحنية	9.59 / 10.74	P,P-DDD/P,P-DDT
12	لحم هندي / الصورة	10.79	P,P-DDT
13	لحم هندي / واسط	10.74	P,P-DDT
14	لحم هندي / أبو غريب	9.57 / 10.73	P,P-DDD/P,P-DDT
15	لحم هندي / جسر ديالى	U.D.L.	—
16	لحم هندي / جميلة	10.78	P,P-DDT
17	لحم هندي / أبو دشير	9.56	P,P-DDD
18	لحم هندي / نفق الشرطة	U.D.L.	—
19	لحم هندي / 17	8.36 / 10.76	P,P-DDD/P,P-DDT
20	لحم هندي / 14	10.76	P,P-DDT



شكل (2): يبين زمن الاحتجاز لأنواع المبيدات العضوية المكلورة في نماذج اللحوم الهندية المفحوصة

ان تلوث اللحوم الهندية ببقايا مبيدات الكلور العضوية بهذه النسبة العالية 80% يعود إلى الاستخدام الواسع لمبيد الـ DDT في مكافحة الحشرات والذي ينتقل خلال السلسلة الغذائية ليصل إلى لحوم الحيوانات

9. Sweden – Noren K. and Meironyte D. (2000) Organo Chlorine pesticides contaminants, chemosphere 40 : 9-11

10. خالد عفيفي فتحي حمد (2000) التحليل الدقيق لمتبقيات السموم والملوثات البيئية في مكونات النظام البيئي، دار الفجر للنشر والتوزيع ، القاهرة: 56

11. يوسف احمد فوزي ( 2005 ) أجهزة وطرق تحليل التربة والمياه ، النشر العلمي والمطابع – جامعة الملك سعود – الرياض: 36-45

## المصادر

1. Hake HJ. and Grahwit G. (1987) .Residues of veterinary Drugs , feed additives and environmental chemicals Animal production and environmental health , chapter 7 : 219-244.

2. Mcleod HA , Aeey WR (1973) Analytical methods for pesticide residues in food: 172-179

3. York UK (1991) Food analysis performance assessment scheme (FAPAS) is a registered trademark of central science laboratories.

4. Hamieda NA.(1990) Reproductive toxicity in agrochemical exposures. In : proceedings of the International meeting on chemicals Hazards in Developing countries. Cairo, Egypt, 13-19

5. Gracey JF, Collins DS, and Huey R.J. (1994) meat hygiene .3<sup>rd</sup> ed.; Saunders Co., London: 79-82

6. Hemeida NA. (1998) The effect of some environmental pollutants on animal productivity and human health – A review .International conference on Veterinary medicine and human health in the 21<sup>st</sup> century , Kuwait.

7. Kegley SE; Hill BR , Orme S and Choi AH (2009) PAN Pesticide Database, pesticide North America (Sa fraacisco.) CA.

8. Pesticide analytical manual USA.(2000) Methods for individual residues 20852 , volume II.

## **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

### ***INTERNATIONAL JOURNAL of Science and Technology (IJST)***

#### **Aims and Scope**

***International Journal of Sciences and Technology (IJST)*** is an international scope journal. The journal is edited by an international recognized Editorial Board. It is published online and printing hard copies every three months.

IJST publishes original research papers on all aspects of science and technology including scientific disciplines of Microbiology, biotechnology, cell biology, ecology, entomology, environmental science, forestry, genomics, horticulture, animal science, plant sciences, proteomics, agricultural and food science, biostatistics, biological sciences and bioengineering, computer science and engineering and water resources.

Authors are required to sign a Copyright Form granting the publishing rights for all papers accepted for publication. Production will not start until we have received of a signed Copyright Form available at <http://www.icast-jo.com>

#### **General Instructions**

IJST will publish original full papers, short research communications, and letters to the editor. Full papers should be concise without compromising clarity and completeness, and should generally occupy no more than 10 published pages. Short research communications should not be more than 5 printed pages (excluding references and abstract). Results and Discussion section should be combined followed by conclusion. Materials and Methods will remain as a separate section.

#### **Submission of Manuscripts**

Authors are required to submit their articles to IJST online for quick and more efficient processing at <http://www.icast-jo.com>

Prior to submission, Authors may contact the editors to inquire about the suitability of their work.

### **Preparation of Manuscripts**

#### **Language**

Papers must be written in English and in Arabic, in both cases abstract in second language require. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Manuscripts that are deficient in this respect may be returned to the author for revision before scientific review.

### **Presentation of Manuscripts**

- \* Title
- \* Author names and addresses
- \* Abstracts (Not more than 250 words)
  - \* Key words
  - \* Introduction
  - \* Materials and Methods
  - \* Results and Discussions
- \* References (Use numbering in the text instead of full references.  
Give full references at the end of the manuscript
  - \* The photographs should be of high quality
- \* Graphs should be in clearly visible form so that it may become easy to redraw

The manuscript should be prepared using Microsoft Word with the following layout.

1. Manuscript should contain title page, abstract, main body, and references.
2. Tables should be added after references and each new table should be on a separate page.
3. Figures should follow the tables, putting each figure on a separate page ensuring that the figure is at least the size it will be in the final printed document. Number each figure outside the boundary of figure. Resolution of the figures should be at least 400 pixels/cm (1000 pixels/in).
4. Number manuscript pages consecutively and activate line numbering.
5. The manuscript should be double-spaced. The beginning of each new paragraph

must be clearly indicated by indentation. Left-justify the text and turn off automatic hyphenation. Use carriage returns only to end headings and paragraphs. Artificial word breaks at the end of lines must be avoided. Do not insert spaces before punctuation.

6. Please use standard fonts such as Normal Arial. Use consistent notations and spellings

7. Please follow internationally accepted rules and conventions for gene and protein names, units, for symbols, and for capitalization in text, tables, and figures.

### **Title Page**

The title page should include a concise and informative title, author names in full, and affiliations. The name of the corresponding author as well as his/her mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address should be provided in a footnote.

### **Abstract**

The abstract should be one paragraph, no longer than 250 words. No references should be cited in the abstract. Abbreviations should be avoided, but if they have to be used, they must be defined the first time they appear. A list of keywords (up to six) must be included after the abstract for indexing purposes. Words that appear in the title should not be repeated in the keywords.

### **General Arrangement of Text**

The text should be divided into sections with the headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Subheadings within sections except introduction can be used to clarify their contents. Introduction and Discussion sections may contain present tense to convey generally accepted information.

Materials and Methods and Results are normally written in the past tense.

#### *1. Introduction*

The introduction should define the problem and provide sufficient information to explain the background but there is usually no need for a comprehensive literature survey. The objectives should be stated but it should not contain a summary of the results.

#### *2. Materials and Methods*

Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. This section

should contain the experimental protocols and the origin of materials, tissue, cell lines, or organisms.

### *3. Results*

The Results section should be in logical order presenting the experimental results. Please do not include any interpretations, inferences, arguments or speculations in this section.

### *4. Discussion*

The authors should interpret their results clearly and suggest what they might mean in a larger context. Please do not repeat the information provided in the Results section.

### **Acknowledgements**

Assistance received from funding agencies and colleagues should be acknowledged in this section.

### **References**

Published or "in press" articles may be included in the reference list. Unpublished studies should be referred to as such or as a personal communication in the text.

Citations of references should use square brackets, e.g. [1,3,5-7]. The lists of references, tables or figures should be numbered consecutively starting from 1. The references should contain the last names and initials of up to four authors, year of publication, title of the paper, and the title of the journal. These should be followed by the volume and page numbers. References to books should include the title of the book, the year of publication, the publishing company and the place of publication.

Some examples are given below.

*Smith PF, Patel KR, Al-Shammari AJN. 1980. An Alde hydro-Phosphoglycolipid from Achleplasma granularum. Biochem.Biophys. Acta 617: 419-429*

*Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*

*McCarthy, AJ. 1989. Thermomonospora. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ed. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG), Vol. 4, pp. 2552-2572. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.*

If web site references are used, the URL should be included next to information in the text. Please check the references carefully for accuracy, missing information, and punctuations.

*Example*

Department of Health: The Interdepartmental Working Group on Tuberculosis 1999.  
The Prevention and Control of Tuberculosis in the United Kingdom [Online]  
[accessed 2000 September]. Available from URL <http://www.doh.gov.uk/tbguide1.htm>

**Tables and Figures**

Tabulation and illustration should not be used for points that can be adequately and concisely described in the text. Tables and figures should be understandable on their own without reference to the text. Explanatory footnotes should be related to the legend or table using superscript lower-case letters. All abbreviations should be defined after the footnotes below the table or by reference to a previous table in the same paper.

**Review Process**

The Journals aim at rapid publication of research results while maintaining a rigorous peer review process. The editors will provide an initial response to all pre-submission enquiries within a week. In addition, they will make every effort to give authors a decision following peer review within four to eight weeks of an article's submission. If the review process takes longer due to special circumstances, authors will be notified promptly by e-mail. Accepted articles will be published online within two weeks.

Suggestions by the editors about revision do not imply that a revised version will necessarily be accepted. If minor revision is required, authors should return a revised version in two weeks. If major revision is required, authors should return a revised version within three months. You must clearly indicate the changes that have been made. Revised manuscripts that are not resubmitted within the indicated time frames will be treated as a newly submitted manuscript. Authors who disagree with Editor's decisions may contact the Chief Editor for final decision. The Editor and the Publisher are not responsible for the scientific content and statements of the authors of accepted papers.

### **Proofs**

Manuscripts should be checked carefully before submission since substantial alterations will not be permitted at the 'proof' stage. The editors reserve the right to make minor alterations to the text without altering the scientific content. Corrections should be sent to publisher in one communication. If corrections are not received within 48 hours, publisher reserves the right to proceed with publication.

### **Reprints**

Reprints may be ordered in quantities of 30 using the form supplied with the proofs.

### **Publication Charges**

Because the IJST is auto- self dependent, we will ask the author to pay US\$200.00 as publication charge.

### **Ethical Issues**

It is assumed all authors have approved the submitted manuscript, which is the responsibility of corresponding author. If accepted, the article must not be published elsewhere in any form, without the consent of the editors and publisher.

### **Reproducing Published Articles**

Individuals wishing to reproduce figures, tables and excerpts of text from articles published in IJST for non-commercial purposes may do so providing the original publication is acknowledged accordingly and the authors' approval is obtained, and in this case no special permission is needed from either the publisher or the editors. Authors may also include the article in a thesis without special permission. In all other cases, permissions may be sought directly from IJST.

**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 © 2011** 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.