

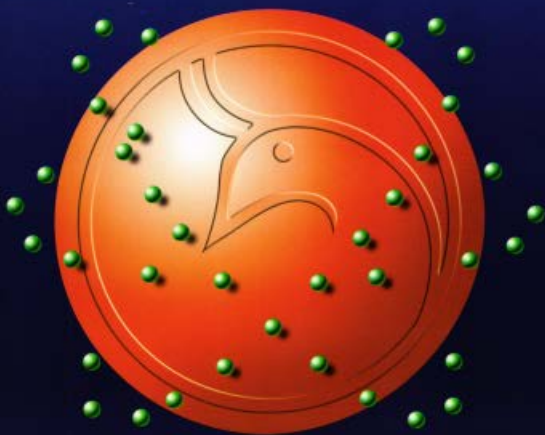


# Al-Mustansiriyah

## ISSN 1814 - 635X

Journal of Science

Vol. 24, No. 1, 2013



Issued by College of Science - Mustansiriya University

Vol. 24  
No. 1  
2013

# Al-Mustansiriyah Journal of Science

Issued by College of Science, Al-Mustansiriyah  
University, Baghdad, Iraq

**Editor -in-chief**  
Prof. Dr. Redha I. AL-Bayati

## Editorial Board

Dr. Inaam Abdul-Rahman	Member
Dr. Fatin Fadhil	Member
Dr. Iman Natiq	Member
Dr. Ahmed Azeez	Member
Dr. Muneam Hakeem	Member
Dr. Omar Abbas	Member
Dr. Kareem Qasim	Member
Dr. Saad Owaid	Member

## Consultant Committee

Dr. Tariq Salih Abdul-Razaq	Member
Dr. Hasan Hashim	Member
Dr. Tariq Suhail Najim	Member
Dr. Ali Hussein Dehya	Member
Dr. Abd Al-Muneam Salih	Member
Dr. Layla Salih	Member

## INSTRUCTION FOR AUTHORS

1. The journal accepts manuscripts in Arabic and English languages. Which had not been published before.
2. Author (s) has to introduce an application requesting publication of his manuscript in the journal. Four copies (one original) of the manuscript should be submitted. Should be printed by on the computer by laser printer and re produced on A4 white paper in three coppice with floppy disc should be also submitted.
3. The title of the manuscript together with the name and address of the author (s) should typed on a separate sheet in both Arabic and English. Only manuscripts title to be typed again with the manuscript.
4. For manuscripts written in English, full name (S) of author (s) and only first letters of the words (except prepositions and auxiliaries) forming title of the manuscript should be written in capital letters. Author (s) address (es) to be written in small letters.
5. Both Arabic and English abstracts are required for each manuscript. They should be typed on two separate sheets (not more then 250 words each).
6. References should be denoted by a number between two bracket on the same level of the line and directly at the end of the sentence. A list of references should be given on a separate sheet of paper, following the interactional style for names and abbreviations of journals.
7. Whenever possible, research papers should follow this pattem: INTRODUCTION, EXPERIMENTAL (MATERIALS AND METHODS), RESULTS AND DISCUSSION, and REFERENCES. All written in capital letters at the middle of the page. Without numbers or underneath lines.
8. The following pattern should be followed upon writing the references on the reference sheet: Sumame (s), initials of author (s), title of the paper, name or abbreviation of the journal, volume, number, pages and (Year). For books give the author(s) name(s), the title, edition, pages, publisher, place of publication and (Year).
9. A publication fees in the amount of ID. 50 thousand is charged upon a Receipt of the paper and 25 thousand upon the acceptance for publication for their ID. 75 thousand should be paid for the editorial board.

# CONTENTS

ITEM	Page No.
The Effect Of Luteolin On Lymphocyte Cells In Leukemia Patient Entessar H.A. Al-Mosawe	1-8
A Study of Antibacterial Activity And Histological Effects of Eruca Sativa (L.) Seeds On Male Mice Asmma E. Al-Niaame	9-22
A Novel Biochemical Study On Pectate Lyase Produced By Erwinia Chrysanthemi Isolated From Spoilt Potatoes Infected With Blackleg Disease Sahira N. Muslim	23-36
Genetic Analysis of ABO and Rh (D) Blood Groups in Arab Baghdadi Ethnic Groups Alia Essam Mahmood AL-Ubadi	37-46
Digital Dermatoglyphics In a sample from Baghdad / Iraq Abdalamer Naser Ghaloub and Aqeel Mahmood Ali Al- Lami	47-52
In-Vitro Antibacterial Activity Of Proanthocyanidins Against Some Of Pathogenic Bacterial Isolates Ali Murtatha Hasan	53-60
Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas fluorescens/ putida group isolated from patients in Baghdad Layla Abdul Hamid Said	61-76
Synthesis and Characterization of Some Heterocyclic Compounds Based on 2,5 – Disubstitued – 1,3,4 – Oxadiazole Iman Mahdy Mohammed Hasan	77-92
Study and Comparison the Photodegradation and Biodegradation of Poly Vinylchloride in Absence and Presence Alizarin Dye And 2-(Benzylidine) Benzothiazole Hydrazone - Pd Complex Zainab Naeif Majeed <sup>1</sup> , Thana M. Zayer <sup>2</sup> , Waeel M. Hamud <sup>3</sup> and Hamid Hashim Mohammed	93-104
Melamine-Attapalgite And Attapalgite- Melamine-Formaldehyde Physical Interactions: Synthesis And Characterzation Isam H. Ali <sup>1</sup> Yousif I. Mohammed <sup>2</sup> and Takialdin A. Himdan	105-114
Energy Levels for Transitions in He-Like Ti XXI, V XXII and Cr XXIII by Fully Relativistic Configuration-Interaction Approach Wave Function Raad Aedan Haleot	115-126
Structural and Mechanical Differences Between Neat and UV Stabilized Polyamide 6,6 Subjected to Heat Treatment Nabil N. Rammo and May A. Mohammad	127-134



Complete and Incomplete Elliptic Curves Over the Finite Field of order 11 and 13	135-142
Emad Bakr Abdulkareem Al-Zangana	
Estimating Global Solar Radiation on Horizontal Surface For Selected Stations over Iraq	143-154
Hadil .J.Assi	

## The Effect of Luteolin on Lymphocyte Cells In Leukemia Patient

Entessar H.A. Al-Mosawe

Biotechnology Division, Applied Sciences Department/ University of Technology, Iraq-Baghdad.

Received 8/5/2012 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

هدفت الدراسة الى معرفة تأثير مادة الليوتيولين على تحول الخلايا اللمفاوية لمرضى ابيضاض الدم الحاد وتأثير المضاد للسرطان لليوتيولين في العراق حيث اخذت العينات من المرضى المصابين لهذا المرض وكان عددهم 28 مريضاً ( 14 رجال، 14 نساء)، حيث جمعت العينات من المرضى المصابين بأبيضاض الدم الحاد الذين لم يبدأوا بالعلاج بعد. تم فصل خلايا اللمف من عينات الدم وتمييزها على وسط lymph prepare واضيف للوسط الليوتيولين بتركيز 0.2 ملي غرام لكل مليلتر لمعرفة تأثيره على تحول الخلايا اللمفاوية بحساب عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة lymphoblast ولوحظ من النتائج انخفاض واضح بعدد الخلايا المنقسمة قبل اضافة الليوتيولين ( $0.5 \pm 8.9$ ) مقارنة بالنتائج بعد اضافة الليوتيولين ( $0.4 \pm 12.4$ ) حيث اوضحت النتائج فعالية الليوتيولين بكونه مضاداً للسرطان وذلك باعتبار نوع من انواع الفلافونات.

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of luteoline on the ability of lymphocytes cells to transform in patients with acute lymphoblastic leukaemia. The anticancer effect of luteolin on growth of lymphocyte cells to the patient with leukemia in Iraq by take blood sample from the patient in this dieses 28 patient (14 men , 14 women) the sample collect from the patients before treatment with any drugs . The lymphocyte separate from blood and growth in lymph prepare media and then add luteolin 0.2 mg/ml in growth to study the effect of it to transform of lymphoblast the no. of lymphocyte the results, before addition luteolin presence of a significant decrease ( $8.9 \pm 0.5$ ) in ability of lymphocytes cells to transform in the patients when compared it with the result after addition luteolin to the growth ( $12.4 \pm 0.4$ ) that mean the luteolin have anticancer effect by the increase of the percentage of ability of lymphocytes cells to transform luteolin is type of flavonoid.

### INTRODUCTION

Leukaemia are malignant disorders of haematopoietic stem cell associated with increased numbers of white blood cells in bone marrow and peripheral blood[1] . the cause of leukaemia is unknown The factors associated with the development of leukaemia are [2]:

1. chromosomal abnormalities.
2. Ionising radiation.
3. Chemicals
4. viruses
5. Immunological causes
6. genetic factors

Classification:

Leukaemia classified into two types acute & chronic leukaemia.

Acute leukaemia: there is a failure of cell maturation .

Classification of acute leukaemia :

Acute leukaemia could be classified according to the morphology of the blasts into [3]:

1. Acute lymphoid (lymphoblastic) leukaemia (ALL)

2. Acute Myeloid leukaemia (AML)

Common symptoms of acute leukaemia

1. Anaemia & bleeding

2. infection especially of respiratory tract

3. bone pain

4. fever & fatigue

5. general aches & pain & malaise

Luteoline is a flavonoid found in parsley, artichoke, basil, celery and other plants. Over the last three years, a large number of published studies have demonstrated the anti-cancer properties of luteoline. To study the effects of various plant constituents, an examination was made of 21 different flavonoids on the growth of human breast cancer cells [4]. Luteoline was shown to be the most effective anti-proliferative flavonoid tested. A related study showed that flavonoids such as luteoline bind to estrogen receptor sites on cell membranes in order to prevent over-proliferation of these cells in response to estrogen. A study assessed the antioxidant potencies of several dietary flavonoids compared with vitamin C [5]. Pretreatment with all flavonoids and vitamin C produced dose-dependent reductions in oxidative DNA damage. Luteolin, rutin and quercetin have more effective than vitamin C in reducing DNA oxidative damage and was tested to ascertain its effect on human leukemia cells. Luteolin was shown to induce apoptosis more effectively than quercetin and other flavonoids tested. The researchers attributed a unique mechanism of inducing apoptosis to the cancer preventive activity of luteolin [6]. Another study showed that luteolin and another flavonoid called apigenin strongly inhibited the growth of human leukemia cells and induced these cells to differentiate. Topoisomerases are involved in many aspects of leukemia cell DNA metabolism such as replication and transcription reactions. In one study, luteolin were shown to inhibit topoisomerase-catalyzed DNA irregularities. In a study of various agents used to induce differentiation of human promyelocytic leukemia cells, luteolin and apigenin were among the flavonoids shown to cause these leukemia cells to mature into healthy monocytes and macrophages, luteolin was shown to inhibit cancer cell signal transduction and induce apoptosis [7]. The scientists concluded that luteolin may provide a new approach for the treatment of human anaplastic thyroid carcinoma for which no effective therapy is presently available. Another study compared the effects of genistein, apigenin, luteolin, chrysin and other flavonoids on human thyroid

carcinoma cell lines. Among the flavonoids tested, luteolin and apigenin were shown to be the most potent inhibitors of these cancer cell lines. The scientists noted that because these thyroid cancer cells lacked an anti-estrogen receptor binding site and an estrogen receptor, that luteolin and apigenin are inhibiting these cancer cells via previously unknown mechanisms. The scientists concluded that luteolin and apigenin may represent a new class of therapeutic agents in the management of thyroid cancer [8]. In this study we used luteolin extraction and purification from plants to find drug or anticancer agent used to treatment leukemia patients.

## MATERIALS AND METHODS

We collected the sample from Baghdad hospitals and luteolin took from Sigma (standard) used the method that detect in the (9).

1. Took blood samples from different hospitals in Baghdad (table 1) from leukemia patients by syringe size 5ml .and put 3ml in test tube contain Anti- coagulant heparin .and shacked the tubes .
2. Diluted blood samples by normal saline HBSS rate 1:1 and mixing.
3. put 5ml lymph prepare medium in test tube and by used pipette we added dilute blood on the surface of the medium slowly to avoid mixing of blood with medium
4. Put the tubes in centrifuge 2000 R/min about 20-25 min in 4°C.
5. With draw the lymphocytes layer by using Pasteur pipette and it represent the second layer after plasma.
6. Counted no. of WBC by number chambers and put 50 ml from the mixture of lymphocyte cells on the surface of the count slide and put the cover slide and count the no. of WBC [9].
7. took blood samples for 28 (leukemia patient 14 men , 14 women) (7 control ,7test) (7 control,7test).
8. took 5ml from patient and put 3ml in test tube contain anti-coagulant.
9. put 2.5 ml of media in silicon tubes (that have 2 tube every sample) in first tube put 0.1 ml lymphocyte and 0.1 ml (PHA 10 mg /ml), another content tube put 2.5 ml media and 0.1 ml lymphocyte and 0.1 ml (PHA 10 mg /ml) and add 0.1 ml luteolin 0.2mg/ml , shacked the tubes and put it incubator at 37°C for 72 hr. [9]
10. The tubes taken out and examined the cells by using centrifuge for 5min .
11. The precipitated cells was taken and count lymphocyte cells on the glass slide staining with Gemza stain for 15 min .
12. Examined the slide by using microscope where was calculated 100 lymphocyte cells and calculated the Transformed cells as in the equation:

$$\text{Transformed cells \%} = \frac{\text{no. of lymphoblastic}}{\text{Total no. of (lymphoblastic +lymphocyte)}} \times 100$$

Table-1: the name of hospetial that sample take from it.

Name of hospetial	No. of sample
Al-Ermok /Baghdad	10
Baghdad/Baghdad	10
Al-Nahren / baghdad	8

*Statistical data analysis:* Data were statistically analyzed using SPSS statistical software (version 11.5). The values are given as mean  $\pm$  standard error.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the results that transformed lymphoblast in percentage is low before add the luteolin the minimum percentage is 7 (in female) but the maximum percentage is 12 (in female) but in male is 8-11% and the total of lymphoblast transfer is  $8.9 \pm 0.5$  notes table (2).

Table-2: transformed lymphoblast before &amp; after adding luteolin.

Case no.	Age	Sex	Lymph.trans.100% befor add luteolin	Lymph.trans.100% after add luteolin
1	18	M	8	12
2	20	M	10	14
3	27	M	10	13
4	17	M	9	14
5	19	M	8	13
6	21	M	11	15
7	22	M	8	14
8	30	F	12	12
9	33	F	7	15
10	20	F	9	13
11	22	F	7	10
12	28	F	8	10
13	29	F	10	12
14	30	F	7	11
SE $\pm$ $\mu$			$8.9 \pm 0.5$	$12.7 \pm 0.4$

But we can notes that transformed lymphoblast percentage upper after adding luteolin the minimum percentage is 10 (in female) but the maximum percentage is 15 (in female & male) and the total of lymphoblast transfer is  $12.4 \pm 0.4$  table (2).

The research was interested in the possible beneficial biological effects of natural compounds and their derivatives on malignant disease. In this work, we explored the effects of luteolin in leukemia, flavonoid commonly present in human diet, which is emerging not only as potent cancer-preventing agent, but also useful for adjuvant therapy[10] Although the induction of apoptosis and cell-cycle arrest, and inhibition of cancer-promoting signaling pathways, certainly supports the chemo preventive action, especially as untransformed lymphocytes do not seem to be really affected by the compound, the observed interaction with



therapeutically relevant drugs seems to rule this compound out for adjuvant therapy as it may actually hamper treatment of established disease [11].

In HL60 cells, luteolin induced cell-cycle arrest in  $G_2/M$ , whereas TF1 cells were arrested in the  $G_0/G_1$  phase. The control of cell cycle is mediated by many protein complexes, such as CDK and cyclins. Cdc2, normally driving cells into mitosis, is the ultimate target of pathways that mediate rapid arrest in  $G_2$ , in response to DNA damage. CDK6 forms a complex with cyclin-D and targets the retinoblastoma protein, allowing passage through the  $G_1/S$  phase restriction point [12]. Many studies have reported that luteolin blocks cell cycle in cancer cells depending on the cell type, luteolin can arrest the cell cycle in different phases, example, it can lead  $G_2/M$  arrest in colon carcinoma, breast cancer and pancreatic. Nevertheless, in human prostate cancer. LNCap and PC3 cells, luteolin induced cell-cycle arrest in  $G_0/G_1$ . The results of this study extend these observations that, depending on the cyclins affected, even in the leukemic compartment responses may be substantially different [13]. The outcome of cell-cycle arrest may depend on the phase in which the cell is arrested. Numerous studies, including those using dietary compounds, have linked  $G_2/M$  arrest with subsequent apoptosis, as was observed for HL60 cells in our study. In contrast,  $G_0/G_1$  arrest is seen on reduction of mTOR activity, and has been associated with induction of autophagy, reminiscent of luteolin effects in TF1 cells [14]. p70S6K/S6 signaling has been implicated in inhibition of autophagy, and inactivation of the mTOR signaling pathway is a prominent consequence of PTEN activation [15]. In this study, although luteolin was not able to activate PTEN in TF1 cells, mTOR was strongly down regulated by luteolin this flavonoid may be an attractive therapeutic agent for treating tumors carrying inactivated PTEN [16]. Studies with cancer stem cells have shown that inhibition of mTOR pathways by rapamycin can block the generation or maintenance of leukemia-initiating cells in the PTEN-deficient mice [17].

The role of autophagy in cell survival is a dual one; it can either help cells to survive during stress or end in apoptosis in the absence of cell rescue. The autophagic characteristics observed in HL60 cells suggest that the latter predominates in this cell type following exposure to luteolin, whereas in TF1 cells autophagy is not followed by apoptosis, in apparent agreement with the therapy-resistant phenotype of these cells. Only after 36-h of stringent luteolin treatment did a small fraction of TF1 cells show signs of (a caspase-independent form of) apoptosis. Interestingly, although showing hallmarks of apoptosis on TNF $\alpha$  treatment, for example, cleavage of PARP and caspase activation, EM analysis of TNF $\alpha$ -treated cells showed characteristics of autophagy, confirmed by high levels of sentinel autophagic proteins beclin-1.

LC3BII, and Atg5, 7 and 12. In addition, TNF $\alpha$  induced activation of the p70S6K/S6 pathway, indicating that the induction of autophagy in TNF $\alpha$ -treated cells is induced by high expression of autophagic genes related to vacuoles, rather as of inhibition of P70S6K/S6 pathway [18].

Flavonoids have the potential to bind to the ATP-binding sites of a large number of proteins due to their similarity to ATP structure, which makes flavonoids competitive inhibitors of protein kinases. luteolin had already been reported to be a competitive inhibitor of protein tyrosine kinases. In this work we clearly observed that luteolin inhibited PKB/PI3K pathway in HL60 cells, through activation of PTEN and down regulation of PDK-1 and PI3K[19]. Unlike HL60, TF1 showed no changes in PI3K/PKB pathway under luteolin treatment. Furthermore, MAPKp38 was activated in HL60 cells treated with luteolin, but not in TF1 cells. Recently, it has been suggested that p38 and JNK may be involved in the apoptotic process by repression of ERK pathways [20]. Thus, the differential effects of luteolin observed on leukemia cell cycle are reflected by differential effects on kinase activities.

Interestingly, the only common target of luteolin in both types of leukemia was the c-Src/JAK/STAT pathway, which constitutes a major mediator of cytokine activity. Constitutively active JAK2 proteins are associated with myeloproliferative disorders, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia and acute megakaryoblastic leukemia, and inhibition of STAT3 leads to increased apoptosis, decreased proliferation, and decreased tumor size. JAK/STAT pathway is regulated by SHP-2, which can stabilize JAK2 protein or induce Src kinase activation. Constitutive activation of SHP-2 in mice cooperates with progression of myeloproliferative disorders. In this work we observed that luteolin downregulated SHP-2 and thereby JAK2, which led to a decreased phosphorylation and activation of STAT3 and 5. This effect was more apparent in TF1 cells, which can be explained by the increased level and activity of LMWPTP, another JAK/STAT down regulator, in this cell line [21]. Further experimentation should reveal whether the JAK/STAT signaling cassette is really the principal target for luteolin effect in cancer in general because luteolin induced cell-cycle arrest and autophagy in TF1 cells, we hypothesized that apigenin could inhibit the action of chemotherapeutic agents against leukemic cells. One of the most common chemotherapeutics is vincristine, and indeed on luteolin treatment, cells became more resistant to vincristine-induced cell death. Vincristine binds to tubulin dimers, inhibiting the formation of microtubules. Disruption of the microtubules arrests mitosis in metaphase, therefore, luteolin-induced blockage of TF1 cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase might enable these cells to escape the action of vincristine. This action of luteolin clearly disqualifies this compound for adjuvant strategies once disease is established, at least in relation to vincristine. However, it is important to mention that when we combined luteolin with imatinib or mitoxantrone no difference was observed (unpublished data). Therefore, this observation reinforces our hypothesis that the undesirable action of apigenin in the presence of vincristine might be related to the action mechanism of chemotherapeutics. In conclusion, luteolin

is a potential chemo preventive and chemotherapeutic agent in leukemia due to the stimulation on signaling pathways that provoke inhibition of cell proliferation and cell-cycle arrest of fast-cycling cells. This work emphasizes the importance of a deep analysis of molecular mechanism and biochemical details modified by a natural compound with clinically useful properties. Extreme care regarding consumption of such luteolin-like compounds during chemotherapy must be exercised to prevent compromising clinical success, and trials using such compound should not be frivolously initiated. However, the possibility of using luteolin as a model for drug design should not be discarded [22].

## REFERENCES

1. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti F, Natali P, Brunetti M, et al. Flavonoids luteolin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer*. 2000;**87**:595–600. Wang W, Heideman L, Chung C, Pelling J, Koehler K, Birt D. Cell-cycle arrest at G<sub>2</sub>/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog*. 2000;**28**:102–110
2. Wang I, Lin-Shiau S, Lin JK. Induction of apoptosis by luteolin and related flavonoids through cytochrome *c* release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*. 1999;**35**:1517–1525.
3. Chen D, Daniel K, Chen M, Ku D, Landis-Piowar K, Dou Q. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;**69**:1421–1432]
4. Kim J, Eom J, Cheong J, Choi A, Lee J, Yang W, et al. Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2007;
5. Monasterio A, Urdaci M, Pinchuk I, López-Moratalla N, Martínez-Irujo J. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr Cancer*. 2004;**50**:90–100.
6. Vargo M, Voss O, Poustka F, Cardounel A, Grotewold E, Doseff AI. luteolin-induced- apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2006;**72**:681–692.
7. Way T-D, Kao M-C, Lin J-K. luteolin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2004;**279**:4479–4489.
8. Rigacci S, Guidotti V, Parri M, Berti A. Modulation of STAT5 interaction with LMW-PTP during early megakaryocyte differentiation. *Biochemistry*. 2008;**47**:1482–1489.
9. Nilsson, J.; Saderbery, O.; Nilsson, K. and Rosen, A. (2000). Thiorodoxim prolongs survival of B-type (CLL) cells. *Blood*; 95: 1420-1426.
10. de Sousa RRR, Queiroz K, Souza A, Gurgueira S, Augusto A, Miranda M, et al. Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkappaB



- expression are affected by fisetin. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007;**22**:439–444.
11. de Souza A, Kodach L, Gadelha F, Bos C, Cavagis A, Aoyama H, et al. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. 2006;
  12. Ferreira C, Bos C, Versteeg H, Justo G, Duran N, Peppelenbosch M. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*. 2004;**104**:1459–1464
  13. Queiroz K, Zambuzzi WF, Santos de Souza AC, da Silva R, Machado D, Justo G, et al. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett*. 2007;**258**:126–134
  14. Stark G, Taylor W. Control of the G<sub>2</sub>/M transition. *Mol Biotechnol*. 2006;**32**:227–248
  15. Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G<sub>1</sub> checkpoint. *Mol Cell Biol*. 1996;**16**:6917–6925.
  16. Choi EJ, Kim G-H. luteolin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem*. 2009;**20**:285–290
  17. Lepley D, Pelling J. Induction of p21/WAF1 and G<sub>1</sub> cell-cycle arrest by the chemopreventive agent luteolin. *Mol Carcinog*. 1997;**19**:74–82.
  18. Ujiki M, Ding X-Z, Salabat M, Bentrem D, Golkar L, Milam B, et al. luteolin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. *Mol Cancer*. 2006;**5**:76
  19. Shukla S, Gupta S. luteolin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med*. 2008;**44**:1833–1845.
  20. Chou L-C, Yang J-S, Huang L-J, Wu H-C, Lu C-C, Chiang J-H, et al. The synthesized 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one (CHM-1) promoted G<sub>2</sub>/M arrest through inhibition of CDK1 and induced apoptosis through the mitochondrial-dependent pathway in CT-26 murine colorectal adenocarcinoma cells. *J Gastroenterol*. 2009;**44**:1055–1063
  21. Hsu Y-L, Uen Y-H, Chen Y, Liang H-L, Kuo P-L. Tricetin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma mcf-7 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2009;**57**:8688–8695
  22. Hidayat S, Yoshino K-i, Tokunaga C, Hara K, Matsuo M, Yonezawa K. Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a leucine derivative induces G<sub>1</sub> arrest in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;**301**:417–423.

## A Study of Antibacterial Activity And Histological Effects of *Eruca Sativa* (L.) Seeds On Male Mice

Asmma E. Al-Niaame

Department of Science - College of Basic Education- Al- Mustansiriya University

Received 28/2/2011 – Accepted 27/5/2012

### الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى تحديد التركيب الكيميائي للمستخلص الميثانولي لبذور نبات الجرجير ودراسة فعاليته التثبيطية للنمو البكتيري فضلا عن التأثيرات النسجية له على بعض الاعضاء الحيوية لذكور الفئران . اظهرت نتائج دراسة التحليل الكيميائي لبذور الجرجير بأنه ذات قيمة غذائية عالية، من خلال احتواءه على كل من البروتينات والألياف والرماد والدهون والكربوهيدرات والعناصر لاسيما النحاس والمغنيسيوم والحديد. فضلا عن غياب احتواءه على العناصر الثقيلة والمتمثلة بكل من الرصاص والكاديوم والكوبلت. اما بخصوص الفعالية التثبيطية للنمو البكتيري و لكل من المستخلصات المائية والميثانولي والزيتي ضد بعض الانواع البكتيرية المرضية للإنسان والمتمثلة بـ *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* . بينت النتائج بأن المستخلص الزيتي ذو فعالية عالية ، اذ اعطى منطقة تثبيط تتراوح ما بين 13 - 31 مل عند تركيز 100 % ومن ثم الميثانولي 13 - 21 مل وعند تركيز 200 ملغم/مل. في حين لم يظهر المستخلص المائي اي منطقة تثبيط مقارنة بمجاميع السيطرة وباستخدام طريقة الحفر بالأكار. وأن للمستخلص الزيتي فعالية واسعة الطيف ضد البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، اذ بلغ تركيز الحد الأدنى التثبيطي 6,25 % . وعند دراسة التأثيرات الامراضية للمستخلص الميثانولي لبذور الجرجير على ذكور الفئران وبعد تجريبيها فمويا وبجرع متفاوتة 4 ، 40 ، 400 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا ولمدة 14 يوم، تبين بأن الجرعة الواطئة التركيز 4 ، 40 ملغم /كغم لم تظهر اي تغيرات مرضية نسجية على الاعضاء الحيوية لاسيما الكبد والكلية والقلب والخصى. في حين قد اظهرت الجرعة عالية التركيز 400 ملغم /كغم تغيرات مرضية ملحوظة على كل من الكبد والخصى. من خلال توسع الجيبانيات وتغيرات دهنية في الكبد فضلا عن تحطم الغشاء القاعدي للنيبيات المنوية في الخصى مقارنة بمجموعة السيطرة. لذا نقترح بأجراء دراسات اضافية لتحديد مدى الجرعة السمية والمميتة للإنسان.

### ABSTRACT

The aims of this study were to determine chemical composition of methanolic seeds extract of *Eruca sativa* L as well as antibacterial activity and histological effects on selected organs (liver, kidney, heart, testis) of the male mice. The present study was performed to investigate the chemical composition of the seeds of *Eruca sativa*. Proximate analysis and elements of seeds were carried out with the view to assess the therapeutic value. The result revealed the presence of Crude Proteins, Crude fiber, Total minerals ash, Crude fats, Total Carbohydrates and elements Cu, Mg, Fe. But the absence of heavy metals could be an indication that the investigated samples are free of toxic metals. The antibacterial activity of Aqueous, Methanol, and Oil extracts of the seeds of *Eruca sativa* L. by employing well diffusion techniques and Minimum inhibitory concentration (MIC) assay with some human pathogenic bacterial strains viz *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. The oil extract showed the highest activity zone of inhibition of 13-31 mm at 100% concentration followed by methanol 13-21 mm extracts at 200mg/mL, but aqueous extract there was no zone of inhibition observed with any organism. A minimum inhibitory concentration (MIC) of 6.25% was found for the oil extract against all bacteria tested indicating the presence of broad spectrum antibacterial compounds. methanolic seeds extract of *Eruca sativa* was given to male mice orally, via polythene cannula doses of 4, 40 and 400mg/kg/day 14days. Mice were sacrificed at the end of the treatment period and their effects were studied specifically focusing on the histology of the liver, kidney, heart and testis. No pathological changes were evident at 4, 40mg dose for liver, kidney and heart and Testis sections. However, the result of the work showed two harmful effects that are consistent with the treated group of animals of dose 400 mg/kg/day for 14 - days. The harmful effects were seen in the liver showed sinusoidal dilated and fatty changes and Testis showed



destruction of basement membrane of the seminiferous tubules, but the kidney and heart of all the animals appeared normal compared to the control. In view of these pathological relevant results, it is not advisable to use such high doses of methanolic seeds extract of *Eruca sativa*. Additional future pharmacokinetics studies are suggested.

**Key word:** *Eruca sativa* seed, chemical composition, antibacterial activity, methanol extract and histological effects

## INTRODUCTION

Dependence on herbs as medicine in the treatment of diseases is common among a large proportion of the rural populace because of its availability and affordability (1). Scientific scrutiny of the therapeutic potential and safety of these herbs has also increased, thereby providing physicians with data to help patients make wise decisions about their use (2). However, a history of traditional usage is not always a reliable guarantee of safety since it is difficult for traditional practitioners to detect or monitor delayed effects (e.g. mutagenicity), rare adverse effects and adverse effects arising from long term use (3). Some medicinal plants contain both useful and harmful substances which could either promote or retard the health of an individual. Base on this it is paramount to screen and rescreen medicinal plants for the purpose of identifying the active ingredients as well as harmful and non harmful(4). Herbs not only provide us chemicals of medicinal value but also provide us nutrition and trace elements. Minerals and trace elements are chemical elements required by our bodies for numerous biological and physiological processes that are necessary for the maintenance of health. Minerals include compounds of the elements calcium, magnesium, phosphorus, sodium, potassium sulfur and chlorine. Trace elements that are necessary for human health include iron, iodine, copper, manganese, zinc, molybdenum, selenium, and chromium etc. (5). Microorganisms have the genetic ability to transmit and acquire resistance to antibiotics and have become a major global health problem. This compelled the scientists to search out new drugs from plant origin (6). Plant derived antimicrobial compounds might inhibit bacteria through different mechanisms and provide clinical values for the treatment of infections caused by resistant microbes (7). There is a need to evaluate the herbs scientifically for their antimicrobial activity against the antibiotic-resistant microorganism in order to develop new drug from plant origin (8). *Eruca sativa* Miller (Brassicaceae, synonym *Eruca vesicaria* Rocket), commonly known as Tarmira, Rocket salad or Garden salad or Jarjeer and is an endemic species of the Brassicaceae family which is produced mostly in Mediterranean countries such as Italy, Greece and Turkey. It is a dark green annual plant, about 20 to 50 cm in height, with a spicy-pungent taste (9). The seeds are usually yellow, but occasionally are red-yellow or mottled with green-brown spots(10). The seeds have long been used in folk medicine as a lactagogue, aphrodisiac, diuretic, antis -corbutic, antimicrobial, to disintegrate renal calculi and induce vomiting (11). Flanders and Abdel-Karim (12) proved that *Eruca sativa* seed oil contain 93.8 % fatty

acids: 6.7 %saturated acids, 58.5 %erucic acid, 4.5 % oleic acid, 28.5 % linoleic acid and 1-2 % linolenic acid. according to EL-Gendy (13), *Eruca Sativa* oil increased RBC's count and its haemoglobin content. Analysis of serum elements revealed normal concentrations of sodium, K and Mg following *Eruca Sativa* oil treatment whereas iron concentrations increased as the dose increased. The seeds and tender leaves are known in Arabian countries to increase sexual desire and are considered to be an aphrodisiac. It is also used as a carminative and to alleviate abdominal discomfort and improve digestion. And the powdered seed possesses antibacterial activity, but no alkaloids have been isolated (14). In view of the common use of this plant, both as food and as herbal medicine, the aims of this study were to determine chemical composition as well as antibacterial activity and evaluation of the possible histopathological effects of methanolic seeds extract of *Eruca sativa*(L.) on selected organs of the male mice.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant sample collection

Seeds of *E. sativa* were obtained from the local herbal store, Baghdad, Iraq in April 2012 , and the identity of these seeds were confirmed by an expert a plant taxonomist Dr. Ali Al-mosawi , Department of Biology, Baghdad University, Baghdad.

### Preparation of seed powder:

The seeds were manually cleaned to remove all foreign matter such as dust, dirt, stones and chaff and washed under running tap water, air dried and then homogenized to fine powder using electrical grinder and preserved in plastic bags at 4°C for further analysis.

### Extraction of plant material:

Extract of seeds were obtained according to following methodology

#### •Aqueous extraction

10g of air-dried powder was added to 100 ml of sterilized distilled water in a conical flask, plugged with cotton wool and kept for 24 h. After 24h the extract was filtered using Whatman filter paper NO.1 and centrifuged at  $\times 10000g$  for 15 min the supernatant was collected. The procedure was repeated twice and the supernatant was evaporated to dryness using oven at 40°C and was later stored at 4°C until used for antibacterial testing (15).

#### •Methanol extraction

40 g of the powdered seeds was wrapped in a filter paper and placed in a soxhlet for 6h and extracted with organic solvent absolute methanol. The extraction was done until the solvent in the soxhlet turned colourless. The extract was concentrated by recovering the solvent using the soxhlet apparatus until the extract became just pourable . And placed in oven at 40°C to dry (16).

• Plant extract were filtered by syring filter 0.2 $\mu$ m. Then The extracts were first dissolved, 2g of the dried plant extract was dissolved in 10 ml of dimethylsulfoxide 100% DMSO to obtain a final concentration of 200mg ml<sup>-1</sup>. And then serially two-fold dilutions were made in a concentration range from 200 to 3.125 mg ml<sup>-1</sup> (17).

Total oil was extracted by using solvent extraction in which 150 g of powdered sample was placed into cellulose paper cone and extracted by using light petroleum ether b.p 40°C -60°C in a 5 liter Soxhlet extractor for 8 h (18). Total oil was then recovered by evaporating solvent using rotary evaporator and residual solvent was removed by drying in an oven at 60°C and preserved at 4°C in air tight sealed glass vials covered with aluminium foil until used.

#### **Proximate analysis:**

Proximate analysis of seed samples consists of

1- Moisture and dry content

Total moisture of the sample was determined according to (19).

Dry content was calculated by subtracting value of moisture content from 100.

2- Crude Protein

Kjeldahl's method (19) was used to estimate nitrogen content and total crude protein using factor (6.25).

3- Crude fibre and ash content

Crude fibre content and ash content was determined by using methods of (19).

4- Crude fats

Crude fats in the sample were determined by Soxhlet extraction method using n-hexane as solvent (19)

5- Total Carbohydrates

Total carbohydrates in the sample were estimated by finding the difference [100-(crude protein + crude fats + ash + crude fibre)] (20).

For trace elements and heavy metals the plant material was digested with a mixture of perchloric acid and nitric acid in fume hood (21). Estimation was done by using Fast Sequential Atomic Absorption Spectrophotometer. Data was analyzed using computer program SPSS.

#### **Determination of antibacterial activity:**

##### **Bacterial cultures:**

Total eight clinical isolates which included 3 Gram positive including 2 isolates of *Enterococcus faecalis* isolated from urine and 1 isolate of *Enterococcus faecium* isolated from urine too and 5 Gram-negative including *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens such as urine (n= 1), wound swabs (n=1), blood (n=1), sputum (n=2) selected for this study. All



isolates were identified using conventional technique (22). Active cultures for experimental use were prepared by transferring a loopful of cells from stock cultures to flasks and inoculated in Luria-Bertani (LB) broth medium at 37°C for 24 h. Cultures of each bacterial strains were maintained on LB agar medium at 4°C and subculture every 15 days interval as well as at -20°C by making their suspension in 10% glycerol.

#### **Preparation of inoculum:**

A loopful of isolated colonies was inoculated into 4 ml of peptone water, incubated at 37°C for 4h. This activity growing bacterial suspension was then adjusted with pepton water so as to obtain a turbidity visually comparable to that of 0.5 McFarland standard prepared by mixing 0.5ml of 1.75% w/v barium chloride dehydrate ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) with 99.5ml of 1% V/V sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). This turbidity is equivalent to approximately  $1.5 \times 10^8$  colony forming units per ml CFU/ml (23). This 2-h grown suspension was used for further testing.

#### **Agar well diffusion method :**

Screening of antimicrobial activity was performed by well diffusion technique (24). The Mueller Hinton Agar (MHA) plates were seeded with 0.1 ml of the standardized inoculum in LB broth suspension containing  $10^7$  cfu/ml of bacteria (25). The inoculum was spread evenly over plates with glass spreader. The cultured plates were allowed to dry in the incubator at 25-35°C for 20 minutes. A standard sterilized stainless steel cork borer of 8 mm was used to cut uniform 4 wells at the distance of approximately 3 cm on the surface of MHA, and 100 µl of each extract was introduced in the wells.

Two wells were for sample, 100 µl of each dilution 200 and 100 mg/ml, was poured into each well. Before incubation, all Petri dishes were kept at 4°C for 4 h. And incubated at 37°C for 24 hours. The diameter of the zone of inhibition against the tested bacteria was measured in millimeter and compared with DMSO, gentamicin 40mg/ml were used as negative and positive controls respectively. The bacteria with clear zone of inhibition of more than 12 mm were considered to be sensitive.

#### **Minimum inhibitory concentration (MIC):**

Minimum inhibitory concentration of the effective seed extracts was worked out by agar dilution method (26). Muller Hinton agar plates containing varying concentration 3.125-200 mg/ml of different seed extract were prepared and inoculated with 0.1ml of the inoculums. The plates were incubated at 37°C for 24h and the lowest concentration of the extract causing complete inhibition of the bacterial growth was taken as MIC (27). The results were compared with DMSO, gentamicin 40 mg/ml were used as negative and positive controls respectively.

**Experimental animals:**

Twelve male Albino mice were used for the experiment. They were obtained from the animal house of National Center For Drug Control and Research, weighing between 23-25 g. The animals were housed in separate cages, and kept under controlled environmental conditions of temperature ( $25 \pm 50^\circ\text{C}$ ), relative humidity ( $50 \pm 5\%$ ) and 12 hour light/dark cycle. and food with commercial feed pellets and water *ad-libitum*. All animals were treated in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (28).

**Experimental Design:**

Twelve male albino mice were randomly selected and divided into four groups A, B, C and D of three animals each. Groups A, B, C and study groups were treated orally 4, 40 and 400 mg/kg b.d. wt with of methanolic seeds extract of *Eruca sativa* respectively, while group D control received equivalent quantity normal saline for the same period. Animals received their doses once a day at 5:00 pm daily orally, via polythene cannula for a period of 14 days. The mice were observed daily for clinical/pharmacological signs of toxicity, throughout the period of study. At the end of the treatment period, the mice were humanely sacrificed by cervical dislocation. Internal organs including liver, kidney, heart, testis were surgically removed, physically examined for possible lesions. The specimens for histopathology were fixed in 10% neutral, buffered formalin for 18 h at  $4^\circ\text{C}$ .

**Histological examination of vital organs:**

The fixed tissues of mice were dehydrated with progressively increasing concentrations of ethanol. The tissues were passed through xylene solution to clear the ethanol and facilitate molten paraffin wax infiltration  $55^\circ\text{C}$ . After that, they were embedded in a wax block. Paraffin sections of 3-4  $\mu\text{m}$  thickness were cut with the rotary microtome and placed on cleaned glass slides. Finally, the sections were stained with hematoxylin and eosin. Photomicrographs of the slides 10x were taken for histological examination and the slides in tests were compared to that



## RESULTS AND DISCUSSION

Table-1: Reveals the proximate composition of *Eruca sativa* seeds. Seeds contain moisture 6.6%, Crude Proteins 25.17%, Crude fiber 2.4%, Total minerals ash 9.1%, Crude fats Proximate and element contents of of *Eruca sativa* seeds.

Nutrients	Seeds(%)
Moisture	6.6
Crude Proteins	25.17
Crude fiber	2.4
Total minerals(ash)	9.1
Crude fats	23.82
Total Carbohydrates	35.4
Elements	Concentration (ug/g)
Cu	0.0705
Pb	ND
Mg	3.8427
Fe	0.4480
Cd	0.0035
Co	0.0034

ND -Indicates not detected

Their moisture contents are relatively low and could imply long shelf life. The importance of moisture in the body of organisms cannot be overstated. It acts as a dissolving medium for substrates, transport materials; regulate temperature, etc (30). The protein contents of the investigated samples 25.17%. Aside contributing to diets, the relative impact of proteins in body system should not be over looked. As chemical compounds, they repair and replace worn out cells, form structural and globular materials that holds the body, form blood proteins, boost immune system, etc (31). Dietary fibres alter the colonic environment in such a way as to protect against colorectal diseases. It provides protection by increasing faecal bulk, which dilutes the increased colonic bile acid concentrations that occur with a high fat diet (32). Ash constituents of the investigated samples could be related to their mineral contents and these minerals, which are mostly in forms of chemical compounds, play numerous functions towards the improvement of health in the body of organisms (33). Generally, fats have many functions. Aside insulation and conservation of body temperature in organisms, their fatty acid components, have been reported to improve health (34), Carbohydrates are related to energy generation (33). Observed carbohydrates in the investigated samples may be an indication that the samples could produce energy to power the cells and tissues of the body on consumption. And the results indicated the presence of elements such as Cu, Pb, Mg, Fe, Cd, Co in concentrations 0.0705, 0.0000, 3.8427, 0.4480, 0.0035, 0.0034 ug/g respectively Table(2). Copper helps in the absorption of Iron, it is therefore often seen with Iron naturally (35). magnesium Mg are reported to be responsible for the repair of worn out cells, strong bones and teeth, building of

red blood cells and for body mechanisms .And Iron is important for the building up of red corpuscles, essential for formation of haemoglobin, the oxygen - carrying pigment in red blood cells. Iron is used against anaemia, tuberculosis and disorder of growth (36). The absence of lead and negligible amounts in both cadmium, and cobalt could be an indication that the investigated samples are free of toxic metals(37). The biological effects of the trace elements in living system strongly depend upon their concentration and thus should be carefully controlled especially when herbs and drugs are used in human (38)

The antibacterial activity of the aqueous, methanol, oil seed extracts of *Eruca sativa* against eight bacterial strains were examined in the present study and their potency were quantitatively assessed by zone of inhibition which are reported in Table (2).The antibacterial activity was noted to be in dose – dependent manner i.e. 200mg/ml showed higher activity than 100 mg /ml of methanolic extract against among tested bacteria .The diameters of growth inhibition zone ranged from 13-21 mm .The methanol extract showed similar activity on Gram –ve and Gram+ve. On the other hand oil extract of *Eruca sativa* seeds had great antibacterial activity against all the bacterial strains. The diameters of growth inhibition zone ranged from 13-31mm. However, none of the aqueous extract showed any activity against all organisms tested.Positive control gentamicin had average zone of inhibition of 18.6mm. The negative control did not show any zone of inhibition. On the other hand ,oil extract of *Eruca sativa* seeds had great antibacterial activity all the bacterial strains. The diameters of growth inhibition zone ranged from (13-31mm).The results indicated that oil seed extract of *Eruca sativa* showed the highest activity among all the tested extracts and inhibited the growth of all the bacterial strains. The findings of the present study are in agreement with the previous report that shown maximum zone of inhibition was observed from seed oil followed by methanolic seed extracts of *Eruca sativa* from all bacterial strains (39). Since the discovery of the first antibiotic, penicillin, the need for antimicrobial agents is yet to be satisfied. This has been attributed to the emergence of antibiotic resistant strains of micro organisms (40). As a result, there is a continuous search for antimicrobials from plant sources. And many workers believed that antimicrobial activity of *Eruca* oil is mainly due to higher concentration of Erucic acid, which was present in both free and triglyceride form (41).

Table-2:Antibacterial activity of aqueous, methanolic and oil seeds extracts of *Eruca sativa* showing zones of inhibition at different concentrations of the extract.

	Test microorganism		Zone of Inhibition diameter (mm)						
			Aqueous		Methanol		Oil		
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	s	-	-	21	19	17	22	-
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	s	-	-	13	13	30	18	-
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	w	-	-	21	15	30	17	-
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	b	-	-	13	13	25	16	-
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	u	-	-	19	14	25	19	-
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	u	-	-	21	13	13	22	-
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	u	-	-	13	13	21	17	-
8	<i>Enterococcus faecium</i>	u	-	-	13	13	31	18	-
Concentration of extract(mg/ml)			200	100	200	100	100%*	C+	C-

s=sputum,w=wound swabs,b=blood,u=urine,+C=Gentamicin 40mg/ml , -C= DMSO , - = no zone of inhibition, 100%\*= concentration.

The minimum inhibitory concentration (MIC) for Gram -ve and Gram +ve bacteria was determined Table(3). The methanolic and oil seed extracts showed antibacterial activity in the concentration of 25mg/ml,6.25% respectively ,for Gram-ve and +ve bacteria .Whereas , MIC value of reference compound Gentamicin was found in 2.5mg/ml.For both Gram – ve and +ve bacteria showed.

Table -3: Minimum inhibitory concentrations of methanolic and oil seeds extracts of *Eruca sativa*.

	Test microorganism	Concentration of extract													
		200		100		100%		50		50%		25		25%	
		M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
8	<i>Enterococcus faecium</i>	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

- = No growth ,+ = Growth, M= Methanol (mg/ml) , O = Oil(%),

The presence of zones of inhibition on the seeded agar plates showed that the plant extract possesses antibacterial activity on the tested organisms which included both Gram positive and Gram negative organisms. Although the zones of inhibition were lower than that exhibited by the standard drug gentamicin, this could be due to the fact that the plant extract is crude and contains other constituents that do not possess antibacterial property. Also the ability of the extract to diffuse through the gel may be hindered because of large molecules stearic hindrance. At higher concentrations of the extract, the zones of inhibition with the standard drug were comparable. *Eruca Sativa* is known in Egypt as

Gargir. The seeds have long been used in folk medicine as a lactagogue, aphrodisiac, diuretic, antis -corbutic, antimicrobial, to disintegrate renal calculi and induce vomiting (42). Plant derived antimicrobial compounds might inhibit bacteria through different mechanisms and provide clinical values for the treatment of infections caused by resistant microbes (43). In control group no structural changes were identified by histopathology in the heart, liver, testes, and kidneys suggesting that these animals were healthy and the conditions under which the experiment was conducted were proper. Histological sections of the heart, liver, kidneys, and testis derived from experimental mice treated with methanolic seeds extract of *Eruca sativa* 4,40 mg/kg bd./day for 14 -days appeared normal when compared with the control group whereas serious abnormalities were observed in sections from mice treated with a dose 400 mg/kg bd. /day. Histological sections of the liver derived from mice treated with the dose of 400 mg/kg bd. /day, showed sinusoidal dilated and fatty changes compared to the controls (Figure 1). The findings of the present study are in agreement with findings of Abdelgadir *et al.*, (44) in the liver of Wister rats had taken seed extracts of *Lawsonia inermis*. Liver is the major site of detoxification in the body for all drugs/toxins. Therefore it is an important organ in any toxicological study (45). Interestingly, many medicinal plants have been found to be toxic to the liver suggestive of a possible toxic effect of Henna leaves at high dose to rats (46). And distruction of basement membrane of the seminiferous tubules. was observed in histological sections of testis derived from mice treated with 400mg dose compared to the control (Figure 2) these finding agreed with the work of (47). There were no observable microscopic lesions in the heart and kidneys the mice in the group.

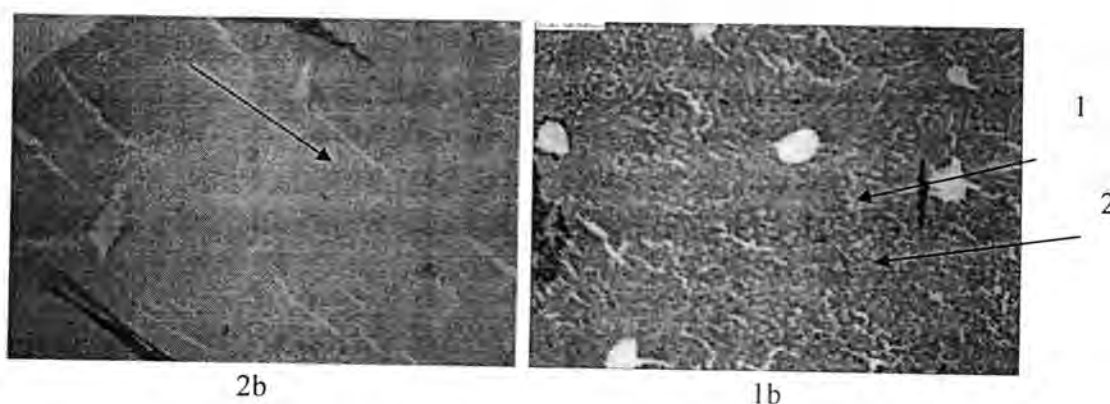


Figure-1:H&E stained sections of Liver at 100X magnification.

1a) Liver sections of control animal showing normal histology (black arrow).

1b) Liver sections of treated animals ( with methanolic seeds extract of *Eruca sativa*), of dose 400 mg/kg/day for 14 - days, showing 1- sinusoidal dilated and 2- fatty changes(black arrow).



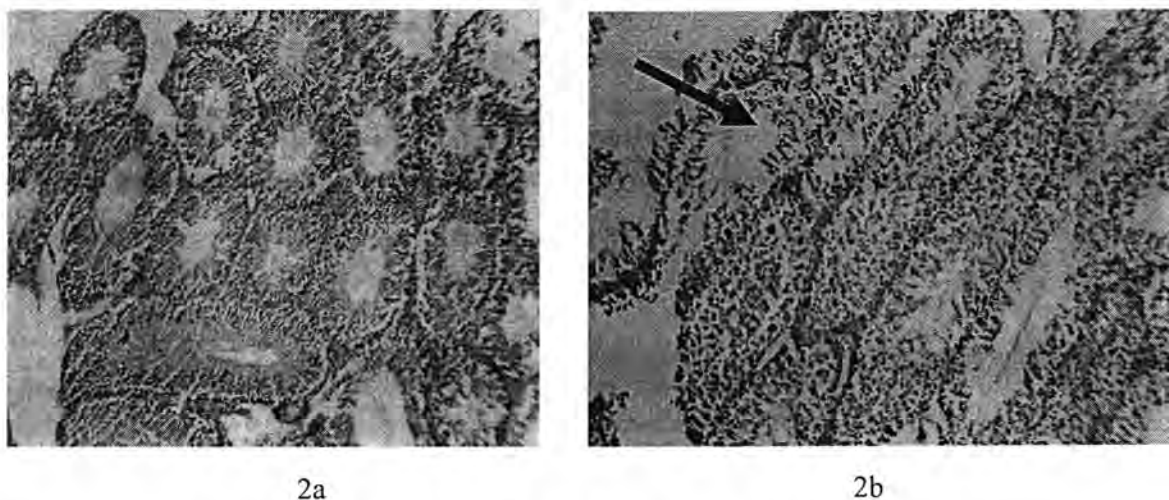


Figure-2:H&E stained sections of Testis at 100X magnification.

2a) Testis sections of control animal showing normal histology (black arrow).

2b) Testis sections of treated animals ( with methanolic seeds extract of *Eruca sativa*) of dose 400 mg/kg/day for 14 - days, showing destruction of basement membrane of the seminiferous tubules (black arrow).

The result of the work showed two harmful effects that are consistent with the treated group of animals ( with methanolic seeds extract of *Eruca sativa*), of dose 400 mg/kg/day for 14 - days. It is therefore necessary for each plant to be scientifically screened for safety before it is registered for use by drug regulatory authorities.

## REFERENCES

1. Sani, D.; Sanni, S. and Ngulde, S.I.. Effect of intake of aqueous stem extract of *Anisopus Mannii* on haematological parameters in rats.2(3). pp: 22-28. (2009).
2. 'O' Hara, M.; Kiefer, D.; Farrel, K. and Kemper, K. A Review Of 12 Commonly Used Medicinal Herbs. Archives Of Family Medicine. 7.pp: 523- 536.(1998).
3. Ernst, E. Harmless Herbs? A Review Of The Recent Literature. *Am. J. Med.* 104.pp:170-178. (1998).
4. Oyewo, O. ; Onyije, F. M.; Ashamu, E. A.; Akintude, O. W.and Akinola, A.E. Evaluation of ethanolic extract of ginger on the histology of the testis and sperm of adult wistar rats. *International Journal Of Scientific & Technology Research* .1.pp:50-53.(2012).
5. Hendler, E. and Sheldon ,S. The Doctors' Vitamin And Mineral Encyclopedia. New York, NY: Simon & Schuster, pp:112-207. (1990) .
6. Khoobchandani, M.;Ojeswi ,B.K. ; Ganesh, N.; Srivastava, M.M. ; Gabbanini, S. Matera, R. ; Iori, R. and Valgimigli, L. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil:



- Comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chem.* 120.pp: 217- 224. ( 2010).
7. Stein, A.C., Sortino, M.; Avancini ,C.; Zacchino, S. and Von, P.G Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 99.pp: 211-214. ( 2005).
8. Simoes, M.; Bennett R.N., and Rosa, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports.* 26(6)pp: 746-757. (2009).
9. Morales, M.and Janick, J. (2002). Arugula: A Promising Specialty Leaf Vegetable. In: Trends In New Crops And New Uses. Janick J, Whipkey A (Eds.). Alexandria, VA: ASHS Press, pp: 418–423.
10. Koocheki, A.;Razavi, M. A. and Hesarinejad , M A. Effect of extraction procedures on functional properties of *Eruca sativa* seed mucilage. *Food Biophysics* .7.PP:84-92. (2012).
11. Boulos , L. Medical Plants of North Africa. Text book, single ed. Weiss L, El sevir New York, P71. (1983).
12. Flander, A.and Abdel - Karim, S.M. A study of certain drugs used in folk medicine. *J Am. Oil Chem. Soc.* 62 (7)pp : 1137 - 1145. (1985).
13. El-gendy, A.M. Effect of *Eruca sativa* oil on some heamatological and biochemical parameter in male albino rats. a preliminary study .*J. Egypt. Ger. Zool.* 32 (A), Comparative Physiology.PP: 25- 266. (2000).
14. Chopra, R.N.; Nayar, S.L. and Chopra, I.C. Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.(1986).
15. Arora DS,KaurGj.Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *J Nat Med*;61:313-317.(2007).
16. Gotep,J.G.;Agade,G.O.A.;Gbise,D.S. and Chollom,S. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Acalypha Wilkesiana* leaves growing in Jos,Plateau State, Nigeria.*Malaysian Journal of Microbiology* .6(2)pp:69-74. (2010).
17. Sadish KS,Kumary,Sardar Yar KM,Guptac V and De Clercq. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Turbinaria Conoides* (J.Agardh)Kutez. *Iran J.Pharm. Res.*9(4).pp:411-416.(2010).
18. Anonymous. Official Methods Of Analysis, 14<sup>th</sup> Ed .Association Of Analytical Chemwasts, Arlington, VA .(1984).
19. Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods Of Analysis (16<sup>th</sup> Ed.). Washington, DC. (1995).
20. Khalifa, A. Physio-chemical characteristic of fatty acid composition and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oil. *J. Agri. Food Chem.* 44.pp:966-968. (1996).

21. Halvin, J.L. and Soltanpour, P.N. A nitric Acid Plant Tissue Digestion Method With ICP Spectrometry For Contaminate Soil And Plant. *Anal. Chem.*, 11.pp: 969-980.(1980).
22. Cheesbrough, M. District Laboratory Practice In Tropical Countries, Part 2 Cambridge University Press, Cambridge, UK,. pp: 137- 150. (2006).
23. Roopashree, T.S.; Dang, R.; Rani, RH. S. and Narendra, C. Antibacterial activity of antipsoriatic herb: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 1(3).PP: 20-28. ( 2008).
24. Kivanc, M. and Kunduhoglu, B. Antimicrobial activity of fresh plant juice on the growth of bacteria and yeast. *J. Qafqaz Univ.* .1.PP:26-53.(1997).
25. NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards). Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. (2000).
26. Mahajan, V.Ph D Thesis. MD University,Rohtak,India.Comparative Evalution Of Sensitivity Of Human Pathogenic Bacteria To Tea ,Coffee And Antibiotic. (1992)
27. Ettebong, E. and Nwafor, P. In vitro antimicrobial activities of extracts of *Caepolobia Lutea* root. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3) PP: 335-338.(2009).
28. National Research Council (NCR). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH publication No. 86-23. Bethesda, National Institutes of Health . (1985).
29. Drury, R. and Willington, E.A. Carlethon Histopathological Techniques; 4<sup>th</sup> ed. Oxford University Press London. pp:21-70. (1979).
30. Uwakwe, A.A., and Ayalogu, O. Biochemistry (A tropical approach) Vol.1.Fius Publishers,Port Harcourt, Nigeria.pp:3-5. (1998).
31. Olusanya,J.O.Proteins in essentials of food and nutrition. *Apex Books Limited, Lagos*.pp:13-21. (2008)
32. Dillard, C.J., and German,E, M. Coconut In support of good health in the 21<sup>st</sup> century;pp:1-27. .(1990).
33. Olusanya,J.O.Proteins in essentials of food and nutrition. *Apex Books Limited, Lagos*.pp:13-21. (2008).
34. Fite, B.The Healing Miracle Of Coconut Oil. Piccadilly Books Ltd,Healthwise Publications Colorado Springs, Co. pp: 1-4 .(2000).
35. Claude, B.and Paule, S. The Manual Of Natural Living. 1<sup>Ed</sup>. Biddles Ltd, Guildford, Surrey, pp: 98- 101( 1979).
36. 36.Gbolahan, DLesson Note On Medical Importance Of Trace Elements. Centre for Natural Health Studies. .( 2001).
37. 37.Arukwe, U.; Amadi, B.A.; Duru, M. K.C.;Agomuo,E.N.;Adindu, E. A.; Odika, P.C., Lele, K.C.; Egejuru, L., and Anudike, J. Chemical composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed. *Ijrras*. 11 (2).pp :346-349.(2012).

38. Jacob, A. InTextbook of Clinical Chemistry: (Ed.): Tietz, N.W. Saunders, Philadelphia, PA .pp: 965-980.38. (1994).
39. Gulfraz, M.; Sadiq, A.; Tariq, H.; Imran, M.; Qureshi, R .T.and Zeenat, A. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot* 43(2).PP: 1351-1359.(2011).
40. Davies, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistant genes. *Science* .264.PP: 375- 382. (1994).
41. Khoobchandani, M.;Ojeswi ,B.K. ; Ganesh, N.; Srivastava, M.M. ; Gabbanini, S. Matera, R. ; Iori, R. and Valgimigli, L. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chem.* 120.pp: 217- 224 .( 2010).
42. Boulos , L. Medical Plants of North Africa. Text book, single ed. Weiss L, El sevir New York, P:71. (1983)..
43. Stein, A.C.; Sortino, M.; Avancini C. ; Zacchino S. and Von. P.G. Ethno veterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmal.* 99. pp: 211-214. (2005).
44. Abdelgadir, E.H.; Ahmed, R.H.; Adam, S.L.Y. and Husein, A.M. Evaluation of toxicological activity (acute and sub-chronic toxicities) of *Lawsonia innermis* seeds on Wister rats. *J. Pharmacol. Toxicol.* 5(7).pp:324-333. (2010).
45. Treadway, S. An ayurvedic herbal approach to a healthy liver. *Clinical Nutrition Insights.* 6(16)pp: 1-3.(1998).
46. Sofowora, A. Medical Plants and Traditional Medicine in Africa. (eds.) John Willey and Sons Ltd., (1984). Ibadan, Nigeria.
47. Oyewo, O. ; Onyije, F. M.; Ashamu, E. A.; Akintude, O. W.and Akinola, A.E. Evaluation of ethanolic extract of ginger on the histology of the testisand sperm of adult wistar rats. *International Journal Of Scientific & Technology Research* .1.pp:50-53 .(2012).

## A Novel Biochemical Study On *Pectate Lyase* Produced By *Erwinia Chrysanthemi* Isolated From Spoilt Potatoes Infected With Blackleg Disease

Sahira N. Muslim

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

Received 8/5/2012 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

من مجموع 25 عينة بطاطا تالفة مأخوذة من الاسواق المحلية في مدينة بغداد تم الحصول على 6 عزلات تعود لبكتريا *Erwinia chrysanthemi* بنسبة (24 %). العزلة التي اعطت اعلى فعالية لانزيم البكتيت لاييز اُختيرت لتنقية ذلك الانزيم باستخدام مرحلتين للتنقية تضمنت الترسيب بالايثانول والترشيح الهلامي باستخدام Sephacryl S-100 بعدد مرات تنقية 35.3 ، فعالية نوعية 60 وحدة/ملغم بروتين وحصيلة نهائية 36 % . تم توصيف الانزيم المنقى ووجد بأن وزنه الجزيئي 42 كيلو دالتن باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي. ووجد بأن اقصى فعالية للانزيم كانت بعد فترة حضانة 25 دقيقة ودرجة حرارة 50 °م ورقم هيدروجيني 8.5. لقد وجد بأن اضافة الاحماض الفينولية بتركيز 0.05 ملي مولر والثايولات بتركيز 1 ملي مولر قد تثبطت فعالية الانزيم ما عدا L-cystine الذي ادى الى زيادة الفعالية الانزيمية الى 115 % . كذلك وجد بأن اقصى فعالية للانزيم كانت بوجود حامض polygalacturonic acid بنسبة 0.9 % وزن/حجم كمادة اساس عند الرقم الهيدروجيني 8.5 ودرجة حرارة 50°م

### ABSTRACT

Out of 25 spoilt potatoes samples from local markets in Baghdad city. Six isolates from *Erwinia chrysanthemi* were obtained (24%). The isolate that gave higher pectate lyase activity was choised to purify pectate lyase through two stages of purification including (ethanol precipitation and gel filtration by Sephacryl S-100) with 35.2- fold purification, 60 U mg-1 specific activity and 36% yield. The molecular weight of the enzyme was 42 kDa by gel filtration chromatography. The maximum activity of the enzyme was found after 25 min incubation at 50°C and pH 8.5. The addition of phenolic acids (0.05 mM) and thiols (1 mM) had inhibitory effect on the enzyme activity except L-cystine that showed an increase in the enzyme activity to 115%. The enzyme revealed maximum activity in the presence of polygalacturonic acid (0.1% w/v) as substrate at pH 8.5 and 50°C.

### INTRODUCTION

*Erwinia chrysanthemi* is a gram-negative, facultatively anaerobic, rod-shaped bacteria and belongs to family Enterobacteriaceae [1,2]. This bacterium is a soft rot pathogen degrading succulent fleshy plant organs such as roots, tubers, stem cuttings and thick leaves. It is also a vascular wilt pathogen, colonizing xylem and becoming systemic within the plant [3,4], also it is able to survive in the soil [3].

*Erwinia chrysanthemi* is a plant pathogen which can cause disease in a wide range of plants, including bananas, maize, and onions, but is best known in temperate regions for causing blackleg (stem rot) and tuber soft rot in potatoes its success partly lies in its ability to produce many pectinases that are able to macerate and break down the plant cell wall material. This exposed part of the plant releases nutrients that can



facilitate bacterial growth. Tubers are an important source of the disease for potatoes [1,3,5]. Blackleg symptoms are expressed when *Erwinia chrysanthemi* predominates in rotting mother tubers, invade the stems and multiply in xylem vessels under favourable weather conditions[6,7]. Pectins are high molecular weight acid polysaccharides primarily made up of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) linked D-galacturonic acid residues with a small number of rhamnose residues in the main chain and arabinose, galactose and xylose on its side chain [8,9]. Pectinase is a generic name for a family of enzymes that catalyse hydrolysis of the glycosidic bonds in the pectic polymers-pectinases are one of the most widely enzymes in bacteria, fungi and plants [9]. *Erwinia chrysanthemi* pectinases include pectin esterase (E.C.3.1.1.11), polygalacturonase (E.C.3.2.1.15), galacturan 1,4- $\alpha$ -galacturonase (E.C.3.2.1.67), exopoly- $\alpha$ -galacturonosidase (E.C.3.2.1.82), endo-pectate lyase(E.C.4.2.2.2),exo-pectate lyase (E.C.4.2.2.9) and endo- pectin lyase (4.2.2.10), classified on the basis of their mode of action [4,8,10]. Pectate lyase is an enzyme involved in the maceration and soft rotting of plant tissue. Pectate lyase is responsible for the eliminative cleavage of pectate, yielding oligosaccharides with 4- deoxy- $\alpha$ -D-mann-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends[11].

Pectate lyase has great commercial significance in industrial applications, such as extraction and clarification of fruit juices, maceration of vegetables, scoring of cotton fabric, retting of flax, degumming of plant fibers, waste water treatment, oil extraction, tea and coffee fermentations, bleaching of paper, in poultry feed additives and in the alcoholic beverages and food industries[12,13,14]. For these reasons, the aim of this study was aimed to purify pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* and to characterize this enzyme by detection of its molecular weight, the optimum conditions for its activity and the effect of some materials on its activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of samples

Twenty- five spoilt potatoes samples were collected from local markets in Baghdad city. These samples were analyzed according to the method that described by[15]. Briefly, 25 g of potatoes sample was blended with 200 ml peptone water 0.1% by using a blender for 2 min and incubated at 30°C for 18-24h.

### Isolation and identification of *Erwinia chrysanthemi*

One loopfull of potatoes samples was plated on blood agar and MacConkeys agar, then incubated at 30°C for 18-24 h. For isolation of *Erwinia* spp., cells were grown on PT medium that containing the

following [g/L]:(polygalacturonic acid, 5;NaNO<sub>3</sub>, 1;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4;MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O,0.2;1N NaOH,1ml and agarose,18) [16].Several biochemical tests were done to differentiate *Erwinia chrysanthemi* from the other species. These include the following tests:a negative indol test, a positive lipase test, ability to phosphatase and lecithinase production and inability to produce acid from trehalose and maltose[17,18,19].In addition to these biochemical tests, API 20E identification was used to differentiate *Erwinia chrysanthemi* from the other species.

#### **Pectinolytic activity on media**

10µl of cultures were placed into wells (5 mm in diameter) in Luria-Bertani agar plates supplemented with 0.4%(w/v) polygalacturonic acid. After growth, plates were flooded with 1M CaCl<sub>2</sub> and pectinase-producing colonies were detected by the appearance of a halo around them[20,21].

#### **Pectate lyase assay**

Pectate lyase activity was assayed by adding 0.3 ml of dluted sample to a solution containing 1 ml of 0.9% polygalacturonic acid and 0.7 ml of 50 mM glycine buffer pH 8.5 containing 0.5mM CaCl<sub>2</sub>. The mixture was incubated at 50°C for 30 min. After incubation, 2 ml of dinitro salicylic acid (DNSA) reagent was added and the solution was boiled for 5 min to stop the reaction. The absorbance was measured at 232 nm and the galacturonic acid content was obtained by using calibration curve relating galacturonic acid concentrations (0-2.5 mM) to 232 nm. One unit of pectate lyase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 µmol of reducing sugars (galacturonic acid) from polygalacturonic acid per minute[13,20,22].

#### **Determination of protein concentration**

This was determined by the method of Lowry[23] by spectrophotometric assay at 600 nm in each stage of pectate lyase purification.

#### **Purification of pectate lyase fom *Erwinia chrysanthemi***

*Erwinia chrysanthemi* cells were grown at 30°C in shaker incubator for 18-24h in PL-producing medium (per litre: polygalacturonic acid,5g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,0.2g, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>,3g and casamino acids,5g)[24]. *Erwinia chrysanthemi* extracellular pectate lyase was purified by a modification of the method used by Memillan *et al.*[25]. After centrifugation at 10000xg for 30 min at 4°C the supernatant was curefully removed and pectate lyase activity in supernatant (crude enzyme) was assayed.



Pectate lyase was purified to homogeneity by chilled ethanol(60%) precipitation and column chromatography. The partial purification of enzyme was done by adding chilled ethanol(60%) to crude enzyme and keeping it for overnight incubation. The precipitates thus obtained were spun at 1500 rpm for 15 min at 4°C. The pellet obtained was dissolved in minimum volume of assay buffer (20 mM Tris-HCl buffer), pH8.5. It was again centrifuged at 2500 rpm for 20 min at 4°C to obtain a viscous sample and for this sample pectate lyase activity was assayed. The precipitated enzyme was filtered through 0.22 $\mu$  filter, and 2 ml of this filtered precipitated enzyme was loaded on gel- permeation column Sephacryl S-100(bed volume 120 ml and dimensions(1.5 $\times$ 68cm)) which had be equilibrated and washed with 20 mM phosphate buffer (pH 7.5) and the elution done by the same buffer. All the eluted fractions were estimated for enzyme activity and absorbance at 280 nm. The fractions showing the highest pectate lyase activity were pooled and assayed for protein content. The specific activity of purified enzyme fractions was compared to that of crude enzyme and fold purification was calculated.

## **Characterization of pectate lyase**

### **1-Estimation of the molecular weight**

The relative molecular weight of the purified enzyme was estimated by gel filtration according to the method that described by[26]. Gel filtration was carried out in Sephacryl S-100 column. This column was equilibrated in 20 mM phosphate buffer (pH 7.5). The void volume( $V_o$ ) was determined by using blue dextran. Elution volumes( $V_e$ ) of proteins of known molecular weight (Bovine serum albumin[67kDa], ovalbumin [43kDa],chemotrypsinogen A[25kDa] and ribonuclease A [13kDa] dissolved in 20 mM phosphate buffer) were measured and used as reference standards in pectate lyase native molecular mass determination. The relationship between ( $V_e/V_o$ ) and log molecular weight for standard proteins was plotted to obtain the standard curve. The molecular mass for pectate lyase was evaluated from incidence ( $V_e/V_o$ ) value for pectate lyase on the standard curve.

### **2-Optimization of temperature and pH**

The optimum temperature and pH of the enzyme were determined by measuring the pectate lyase activity at various temperatures(35,40,45,55 and 60°C) in 50 mM glycine- NaOH buffer (pH 8.5) and pH values(6,6.5,7,7.5,8,8.5 and 9) at 50°C using different suitable buffers such as 50 Mm sodium phosphate (pH 6,6.5,7,7.5 and 8) and 50 mM glycine- NaOH(8.5 and 9), respectively.

### 3-Optimization of incubation time

Optimum reaction time was determined by incubating the reactants for different time intervals(5,10,15,20,25 and 30 min) and performing the assay for pectate lyase activity at optimized temperature and pH.

### 4-Substrate specificity

A study of substrate specificity for pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* was made by using polygalacturonic acid, pectin citrus, pectin apple, potato dextrose agar and amylopectin[27].

### 5-Effect of phenolics

The assay was performed in the presence of various phenolic acids (chlorogenic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, 2,4-dinitro salicylic acid and cinnamic acid) at a final concentration of 0.05 mM in 50 mM glycine- NaOH buffer, pH8.5, by preincubating the enzyme for 5 min at 37°C before starting the reaction with polygalacturonic acid[28].

### 6-Effect of thiols reducing agents

A study of different thiols was performed by preincubating the enzyme (0.3 ml) for 5 min at 37°C before starting the reaction with polygalacturonic acid making the final concentration of thiols to 1 mM with 50 mM glycine-NaOH buffer, Ph 8.5[20].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolation and identification of *Erwinia chrysanthemi*

In this study the results revealed that 6(24%) isolates of *Erwinia chrysanthemi* were obtained out of 25 spoilt potatoes samples. This bacterium causes blackleg of potatoes of which it is the chief, if not the only cause, in cold climates. However, in warmer climates *Erwinia chrysanthemi* and *Erwinia carotovora* can cause similar or identical symptoms[29]. *Erwinia chrysanthemi* survived for 5 months at temperatures of 10°C and 20°C and relative humidities of 81 and 93%, and temperatures of 30°C and 35°C[30]. Uesug *et al.*, [31] were reported that *Erwinia chrysanthemi* strains were isolated from potatoes, cucumber, broccoli, radish, tomato and sweet pepper. *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* can cause symptoms similar to blackleg and contribute to tuber rotting, also *Erwinia chrysanthemi* can cause a slow wilt in the field with darkened vascular tissue and a brown discoloration in the stems[32,33].

### Pectinolytic activity on media

By measuring the diameter of clear zone of lysis in Luria- Bertani agar plates supplemented with polygalacturonic acid, six isolates of *Erwinia*



*chrysanthemi* were tested for detection the pectate lyase activity (figure-1).

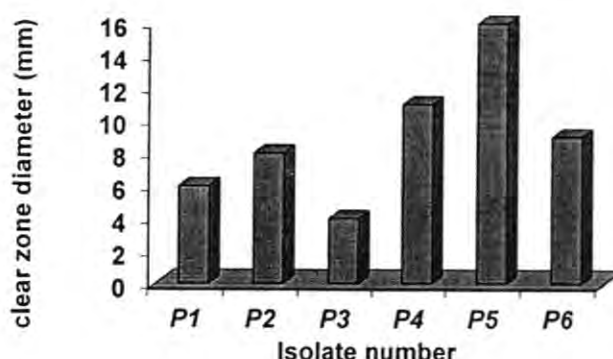


Figure-1: Activity of pectate lyase with respect to clear zone formation from different *Erwinia chrysanthemi* isolates

According to figure(1) we can conclude that *Erwinia chrysanthemi* P5 produced pectate lyase in higher level, therefore; this isolate was chosen for purification experiment. The pectinases are inducible enzymes that require the presence of the inducer to be synthesized. Although pectin is a natural inducer for pectinases production, its elevated cost makes it difficult to use it at industrial level[9].

In a study done by Kuhad *et al.*, [8] reported that pectinase production was optimal when a combination of glucose and citrus pectin was added along with urea in the basal medium devoid of yeas extract and peptone, also found that amino acids and vitamins greatly induced pectinase production. While Torres *et al.*, [9] showed that the agricultural products containing pectin and other polysaccharides have been used for pectinase production. In addition, El-hendawy and Osman[34] found that the addition of glycine betaine to the media containing NaCl increased the extracellular enzyme activity (pectate lyase) and reduced the activity of the cell associated enzyme.

#### **Purification of pectate lyase**

In the present study two steps purification procedure consisting of ethanol precipitation and gel filtration chromatography was developed to obtain a highly purified pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*. The effectiveness of each purification step is given in table(1).

Table-1: Purification of extracellular pectate lyase produced by *Erwinia chrysanthemi*

Step	Volume (ml)	Total a protein (mg/ml)	Pectinolytic activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Fold purification	Yield %
Crude extract	95	33	55	1.7	5225	1	100
Ethanol precipitation	21	12	122	10.2	2562	6.0	49
Sephacryl S-100	10	3.2	192	60	1920	35.3	36.74

The starting material for the purification was 95 ml of the concentrated crude enzyme solution containing 33 mg of protein  $\text{ml}^{-1}$  with specific pectate lyase activity of  $1.7 \text{ U mg}^{-1}$ . The addition of ethanol solution at 60% saturation to the crude extract led to rise in the specific activity to  $10.2 \text{ U mg}^{-1}$  and revealed 6 fold of purification with 49% pectate lyase yield. In the last purification step the enzyme was purified about 35.3-fold with specific activity of  $60 \text{ U mg}^{-1}$  giving a yield of 36% after Sephacryl S-100 gel filtration chromatography (figure-2) which resulted in almost a single peak when absorbance was recorded at 280 nm. Pectate lyase was purified from other species of *Erwinia*, such as *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* with 32% recovery by ion exchange chromatography on a S-Sepharose fast flow column[25]. In contrast, this enzyme was purified from the same bacteria by using the same column with 42% recovery[35]. Pectate lyase was Also purified from many fungal species such as *Amycolata* sp. by anion- and cation-exchange chromatographies followed by hydrophobic interaction chromatography with 37% recovery[27].

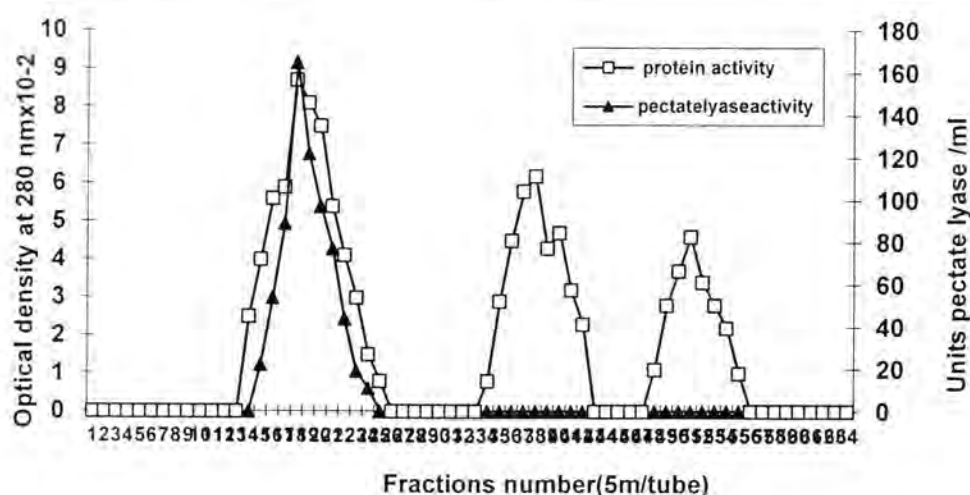


Figure-2: Gel filtration of pectate lyase produced by *Erwinia chrysanthemi* by using Sephacryl S-100 column (1.5×68cm) at flow rate 0.4 ml/min and fractions of 5 ml/tube were collected

### Characterization of pectate lyase

The molecular weight of purified pectate lyase was evaluated by gel filtration with Sephacryl S-100. The results showed that the purified pectate lyase of approximately 42 kDa (figure-3). Many studies [9,35] revealed that the molecular weight for *Erwinia carotovora* and *Erwinia areideae* were 31 and 28 kDa, respectively. In the other hand, an extracellular pectinase that purified from *Acrophialophora* had a molecular weight 35000 daltons by SDS-PAGE[36].

The purified enzyme exhibited optimum pectate lyase activity at 50°C (figure-4) and at pH 8.5(figure-5). Pectate lyase produced by *Erwinia chrysanthemi* has a pH optimum of 8-10[37]. [9] reported that *Erwinia areideae* pectinase was reached to its optimum activity at 40°C and pH 8. In contrast, *Bacillus* sp. pectate lyase was most active in a narrow alkaline pH values, showing the highest activity at pH 10[20]. The purified enzyme that produced by *Pseudomonas fluorescens* has a molecular weight of 42300 daltons and this enzyme is maximally active at pH 9.9[28].

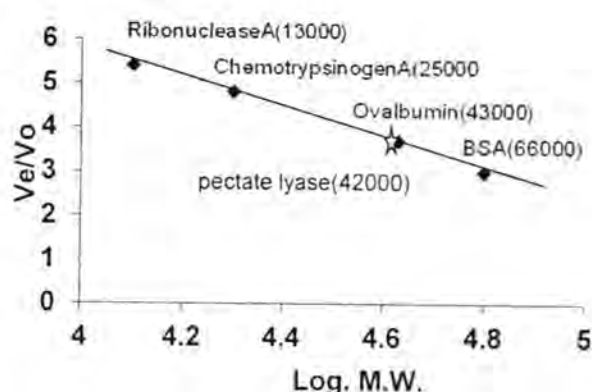


Figure-3: The standard curve of determination molecular weight of pectate lyase by gel filtration on Sephacryl S-100

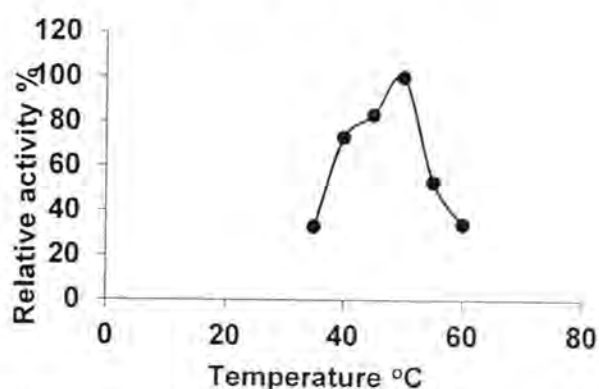


Figure-4: Effect of temperature on the activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

The maximum activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* was obtained when 20 $\mu$ l of enzyme after 25 min incubation at 50°C and pH of 8.5 were used (figure-6)

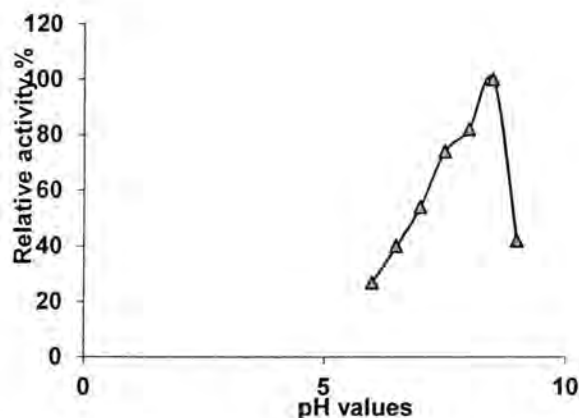


Figure-5: Effect of pH on the activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

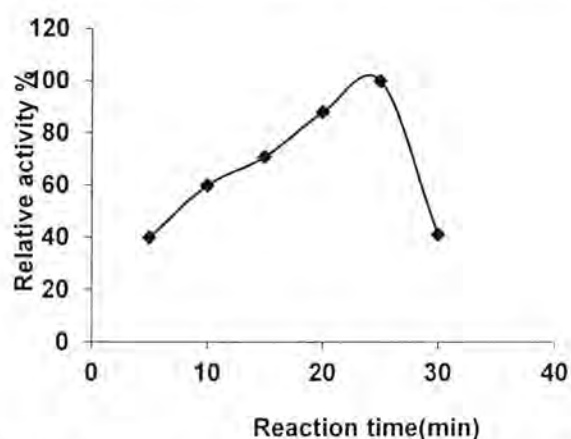


Figure-6: Effect of reaction time on the activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

The purified pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* showed maximum activity with polygalacturonic acid (0.1% w/v), but it decreased with all other substrates such as amylo pectin, potato dextrose agar, pectin citrus, and pectin apple indicating that polygalacturonic acid might be the suitable substrate for maximum enzyme activity (table-2).



Table-2: Effect of substrates on activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

Substrate	Enzyme activity(IU/ml)	Relative activity(%)
Polygalacturonic acid	4.5	100
Amylo pectin	0.23	5
Potato dextrose agar	0.21	5
Pectin citrus	0.45	10
Pectin apple	0.81	40

\*The experiment was carried out at a temperature of 50°C and pH 8.5.

Pectate lyase activity was inhibited in the presence of thiols compared to the control. Only L-cystine activated the reaction at 1 mM concentration and showed enzyme activity 5.20 U ml<sup>-1</sup> compared to 4.5 U ml<sup>-1</sup> of control (table-3). Mercuric chloride was the strongest inhibitor of enzyme at 1 mM concentration followed by ascorbic acid. Antioxidants such as mercapto-ethanol cleaves the disulfide bonds in the protein structure to thiol groups which can then cause disulfide exchange and this improper linkages of disulfide bonds were responsible for reduction in biological activity of protein[38].

Table-3: Effect of thiols on activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

Thiols(1mM)	Enzyme activity(IU/ml)	Relative activity(%)
L-cystine	5.20	115
Ascorbic acid	0.62	14
B-Mercaptoethanol	2.41	53
Mercuric chloride	0.31	7
Sodium metabisulphite	2.20	49
Control	4.5	100

Phenolic acids, namely, cinnamic acid, chlorogen acid, p-coumaric acid, ferulic acid and 2,4- dinitro salicylic acid inhibited the enzyme activity. Cinnamic acid showed maximum inhibition of enzyme activity followed by 2,4- dinitro salicylic acid (table-4). denaturing agents destroy the native conformation of a protein, these agents form hydrogen bonds with the peptide bond, destabilizing the secondary structure of water, thereby increasing the solubility of nonpolar side chains and weakening the hydrophobic interactions that help to stabilize the native conformation[39].

Table-4: Effect of phenolics on activity of pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi*

Phenolics	Enzyme activity(IU/ml)	Relative activity(%)
Cinnamic acid	1.64	36
Chlorogenic acid	2.15	48
p-Coumaric acid	1.9	42
Ferulic acid	2	44
2,4-dinitro salicylic acid	1.8	40
Control	4.5	100

Thus, pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* can be exposed for its potential applications such as juice clarification, textile, plant fiber processing, tea, coffee, oil extraction, and treatment of industrial waste water containing pectinaceous material. In the present investigation, although pectate lyase from *Erwinia chrysanthemi* has effectively been purified and characterized, the enzyme properties may, however, be further improved via efficient immobilization onto a suitable matrix.

## REFERENCES

1. Anone. *Erwinia chrysanthemi*. Wikipedia. 1-2 (2011).
2. Boer S.H. Blackleg of potato. Plant Health Instruc. 71(1).(2011)
3. Bortel H. and Sauthoff W. *Erwinia chrysanthemi*. Eppo. 2(53): 212-216(2000).
4. Nelson S. Bacterial leaf blight of aglaonema. Plant Dis. 64(2009).
5. Duarte V.; Boer S.; Ward L .G. and Oliveira A.M. Characterization of a typical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. J. Appl. Microbiol. 96(3): 535-545(2004).
6. Perombelon M.C. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathol. 51(1):1-12(2002).
7. Rowe R.C.; Miller S.A. and Riedel R.M. Blackleg, aerial stem rot, and tuber soft rot of potato. Plant Pathol. 5(2): 12-16.(2010).
8. Kuhad R.C.; Kapoor M. and Rustagi R. Enhanced production of an alkaline pectate lyase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid state cultivation. World J. Microbiol. Biotechnol. 20(3):257-263(2004).
9. Torres E.F.; Aguilar C.; Esquivel J.C.C. and Gonzalez, G.V. Pectinases. In. Pandey A.; Webb C.; Soccol R. and Larroche C. Enzyme technology. Vol. 1. P:273-284(2004). Black Well Publishing.
10. Dubey A.K.; Yadav S.; Kuma M.; Singh V.K.; Sarangi B.K. and Yadav D. In silico characterization of potato lyase protein sequences from different source organisms. Enzyme Res. 11(2):1-11(2010).
11. Anone. Pectate lyase. Wikipedia. 1-2 (2007).
12. Hartman J.R. and Nesmith W.C. Blackleg and soft rot disease of potato. PPA. 14(5).(2010).



13. Yugandha N.M.; Kumar D.V.R.; Prasanthi V.; Kumar N. and Reddy S. Optimization of pectinase production from *Maninot utilissima* by *Aspergillus niger* NCIM 548 using statistical experimental design. Research J. Microbiol. 3(1):9-16(2008).
  14. Singh R.; Sexene S. and Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem. 40(9):2931-2944(2005).
  15. Rose B.E. and Okrend A.J.G. Isolation and identification of *Aeromonas* species from meat and poultry products. 3<sup>rd</sup>(ed.) .(1998). Laboratory Guidebook
  16. Burry J.T. and Schroth M.N. Occurrence of soft- rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. Phytopathol. 67:1382-1387(1997).
  17. Holt J.G. Kriey N.R.; Sneath P.H.A.; Staley J.T. and Williams S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 4<sup>th</sup>(ed.).P:179-207 .(1994).Williams and Wilkins, U.S.A
  18. Johnson M.T. Microbiology Laboratory Notebook. 7<sup>th</sup>(ed.).(2007) . Black Well Publishing.
- India university school of medicine
19. Patrick R.M.; Ellem J. and Baron J.J. Manual of Clinical Microbiology. Vol.1.(2007). Black Well Publishing
  20. Soriano M.; Blanco A.; Diaz P. and Postor F.L. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. Microbiol. 14(6):89-95.(2000).
  21. Al-gashgari R.M.G. Occurrence of fungi and pectinolytic activity in fruit juices from Saudi Arabia. Pakistan J.Biolog. Sci. 5(5):609-611.(2002).
  22. Pericin D.; Autov M.; Dimic N. and Vujicic B. Rapid method for detecting low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus*. Biotechnol. Tech.2(12):833-836.(1997).
  23. Lowry O.H.; Rosebrongh N.J.; Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.(1951).
  24. Favey S.; Bourson C.; Bertheau Y.; Kotoujansky A. and Boccara M. Purification of the acidic pectate lyase and nucleotide sequence of the corresponding gene(*pel A*) of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. J. Gener. Microbiol. 138:499-508(1992).

25. Memillan G.P.; Johns D.J. and Permobelon M.C. Purification to homogeneity of extracellular polygalacturonase and isoenzymes of pectate lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by column chromatography. J. Appli. Bacteriol. 73(1):83-86(1992).
26. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. Biochem. J. 91:222-232.(1964).
27. Bruhlman F. Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. Appli. Environ. Microbiol. 61(10):3580-3585(1995).
28. Rombouts F.M.; Spaansen C.H.; Visser J. and Pilnik W. Purification and some characteristics of pectate lyase from *Pseudomonas fluorescens* GK-5. J. Food Biochem. 2(1):1-22.(2009).
29. Kohno J.;Anderson P.L. and Kempo J.L. European Handbook of Plant Diseases. (2005). Black Well Publishing.
30. Anilkumar J.B. and Chakravarti B.P. Survival of *Pseudomonas lapsa* and *Erwinia carotovora* stalk rot pathogens of maize in seed and a medium for isolation and detection of *Erwinia carotovora* in soil. India Phytopath. 36(5):322-326(1999).
31. Uesug C.H.; Tsuchiya K.; Tsuno K.; Matsuyama N. and Wakimoto S. Membrane proteins of *Erwinia carotovora* strains analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 56:591-596(1990).
32. Anone. Blackleg. Agricul. Horticul. develop. Board. 1-5.(2008).
33. Abram M. Irrigation water not to blame for home- grown *Erwinia chrysanthemi* seed potato infection. Farmers.(2008).
34. El-hendawy H.H. and Osman M.E. Effect of sodium chloride and glycine betaine on growth and pectate lyase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Pakistan J. Biol. Sci. 8(2):330-334(2005).
35. Godfrey V. and Perombelon M.C.M. Purification and characterization of pectin lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strain SCRI 1043. Mechan. Plant Defen. Respon. P:76-78.(1993).
36. Celestino S.M.S.; Freitas S.M.; Medrana F.J. and Bouse M.V. Purification and characterization of a novel pectinase from



*Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. J. Biotechnol. 123(1):33-42(2006).

37. Wong D.W.S. Food enzymes. Black Well Publishing.P:224-225(2002).
38. Nassar M.N.(1993). Formulation and stability of protein drugs. The Second Arab Conference on Perspectives of modern Biotechnology. Amman, Jordn.
39. Rawn J.D.(1989). Biochemistry. Neil. Palterson Pub. U.S.A.

## Genetic Analysis of ABO and Rh (D) Blood Groups in Arab Baghdadi Ethnic Groups

Alia Essam Mahmood AL-Ubadi

Biology Department, College of Science, Al-Mustansiriya University

Received 18/6/2012 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية الى معرفة توزيع مجاميع الدم ABO ومعامل الـ Rh لعينة عشوائية للمجموعة العرقية الرئيسية وهم (السكان العرب) في بغداد و الإستفادة منها في دراسة وراثية العشائر. وتم تحديد مجاميع الدم باستخدام اختبار التلازن الضد المستضدي لـ 4958 فرد. أظهرت النتائج إختلاف في نسب التوزيع لمجاميع الدم بين الذكور والإناث إذ أن أقل تكرار كان ضمن مجموعة مجموعة الـ A حيث كان تردد المظهري يساوي 13% و 14,5% ومجموعة الـ B كانت 13,7% و 14,9% ومجموعة الـ AB كان التردد المظهري يساوي 3,8% و 4,8%، أما مجموعة الـ O فكانت 17,5% و 18% على التوالي. وأظهرت الدراسة أن تردد معامل الريصي الموجب والسالب كان 90,33% و 9,66% على التوالي. أكدت هذه الدراسة بأن مجموعة الدم O هي الأكثر شيوعاً بين مجاميع الدم في مجتمع الدراسة، ومجموعة الدم AB كانت الأقل تكراراً والعامل الريصي الموجب كان الأكثر شيوعاً من العامل السالب.

### ABSTRACT

This study was aimed to have information on the distribution of ABO and Rh blood groups among the major ethnic group (Arab population), so they are useful in population genetic studies. Blood groups and Rh factor determination was carried out by the antigen-antibody agglutination test encompassed 4958 subjects. The results showed the percentages of various groups among male and female subjects, respectively, were recorded as 13% and 14.5% (for blood group A), 13.7% and 14.9% (for blood group B), 3.8% and 4.8% (for blood group AB) and 17.5% and 18% (for blood group O). The Rh positive and negative distribution in the studied population was 90.33% and 9.66% respectively. This study concludes to confirm that blood group O was the most common of the ABO blood group system in the population studied. AB blood group was quite rare and Rhesus D was more common than Rhesus D negative phenotype.

### INTRODUCTION

Up till now about 400 red cells antigen have been identified. The majority are inherited by Mendelian Fashion and ever since the discovery of ABO blood groups by Landsteiner and his pupils(1), comprehensive works have accumulated in literature on the relation of ABO blood groups to transfusion, on its anthropological and genetical applications, on its use in medico-legal identification and disputed paternity and also on its relationship to various diseases.

All humans and many other primates can be typed for the ABO blood group. There are different versions of the same gene are referred to as alleles, these arise by various combinations of the three blood-type alleles; the A-allele, the B-allele, and the O-allele and The mode of inheritance of the ABO blood group follows the multiple allelic mode of inheritance and is quite stable to be used to exclude paternity in

paternity issues. There are two antigens and two antibodies that are mostly responsible for the ABO types. It is easy and inexpensive to determine an individual's ABO type from a few drops of blood. Blood group typing is the process of testing red blood cells to determine which antigens are present and which are absent. The need for Frequency distribution of blood groups is important as it is used in modern medicine, genetic research, anthropology, and tracing ancestral relations of humans (2). The ABO and Rh blood groups varies worldwide and are not found in equal numbers even among ethnic groups (3). All human populations share the same blood group systems, differing only in the frequencies of specific types (1). The Hardy-Weinberg model describes a mathematical relationship that allows the prediction of the frequency of offspring genotypes based on parental allele frequencies. It also predicts that allele frequencies will not change from one generation to the next, indicative of non-evolution (4).

Blood groups are genetically controlled traits that are suitable for studying population variation, as they are not subjected to environmental influence (5). Interestingly, apart from the importance of ABO and Rh blood groups in blood transfusion practice, they are useful in population genetic studies, researching population migration pattern. It is, therefore, imperative to have information on the distribution of these blood groups in any population group that comprise different ethnic groups. However, this present study was investigated to have information on the distribution of ABO and Rh blood groups among the Arab ethnic group.

## MATERIAL AND METHODS

All subjects were of known Arab ethnicity tribes from Baghdad population other minorities and individuals with chronic illnesses were excluded. Blood samples were collected from 4958 who were identified by their national Iraqi ID cards. The majority of study population were from attendants of Al-kindy Hospital Laboratory, Nursing Home Hospital and Medico-Legal Institute. Blood testing for ABO and Rh (D) typing for different reasons were done for unrelated individuals, from both genders (2376 male, 2582 female).

The blood samples of the study population were typed by slide method, using ABO and Rh (D) Typing Antisera, Biotec Laboratories, United Kingdom. Manufacturer's procedural instructions were followed.

### Statistical analysis

Preliminary estimates were calculated manually as:

$p = 1 - \sqrt{B+O}$ ,  $q = 1 - \sqrt{A+O}$ ,  $r = \sqrt{O}$  ( $p$ ,  $q$ ,  $r$  denote allele frequencies and  $A$ ,  $B$ ,  $O$  denote observed frequencies of blood groups  $A$ ,  $B$  and  $O$ ).

Allele frequencies were calculated under the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium Law that says the equilibrium,

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2rp + 2qr = 1$$

, where  $p^2$  is the probability of  $I^A I^A$  and  $2pr$  is the probability of  $I^A i$  (thus probability of type A =  $p^2 + 2pr$ ),  $q^2$  is the probability of  $I^B I^B$  and  $2qr$  is the probability of  $I^B i$  (thus probability of type B =  $q^2 + 2qr$ ),  $r^2$  is the probability of  $ii$  (thus probability of type O =  $r^2$ ), and  $2pq$  is the probability of  $I^A I^B$  (thus probability of type AB =  $2pq$ ).

Chi-square test was used to compare observed allelic and genotypic frequency distributions of the blood group. And we use S2 ABOestimator by SilvaSquare is a program to estimate the allele frequencies of the ABO blood group system, and perform a couple of statistical tests on the data, particularly to compare simple heuristic estimates of the allele frequencies, to show the EM algorithm in action, to obtain maximum likelihood (ML) estimates of the allele frequencies and to perform goodness-of-fit tests of the Hardy-Weinberg assumption. The allele frequencies ( $p$ ,  $q$ , and  $r$ ) calculated for the ABO locus for population, assuming Hardy-Weinberg equilibrium. After making Bernstein's and maximum-likelihood estimate corrections, we obtained the adjusted estimates of the allele frequencies.

## RESULTS AND DISCUSSION

The prevalence of A, B, AB, O, and Rh phenotypes are shown in Table 1.

Table-1:Prevalence of the phenotype of ABO and Rh (D) in studied by gender population in Baghdad/Iraq

Blood groups	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-	O+	O-	Total
Male	569	75	627	50	171	17	762	105	2376
Female	674	43	670	66	207	30	799	93	2582

The frequencies of the phenotypes for Rh blood group were 93.92% for DD and Dd and 6.1% for dd. With Rh+ being the more dominant allele and Rh- expression being almost recessive table 2, figure 1.

Table -2:Distribution of the Rh blood groups among Baghdad population

Rh group	No. (%)
Rh+	90.33%(4479)
Rh-	9.66%(479)
Total	(99.99%)4958



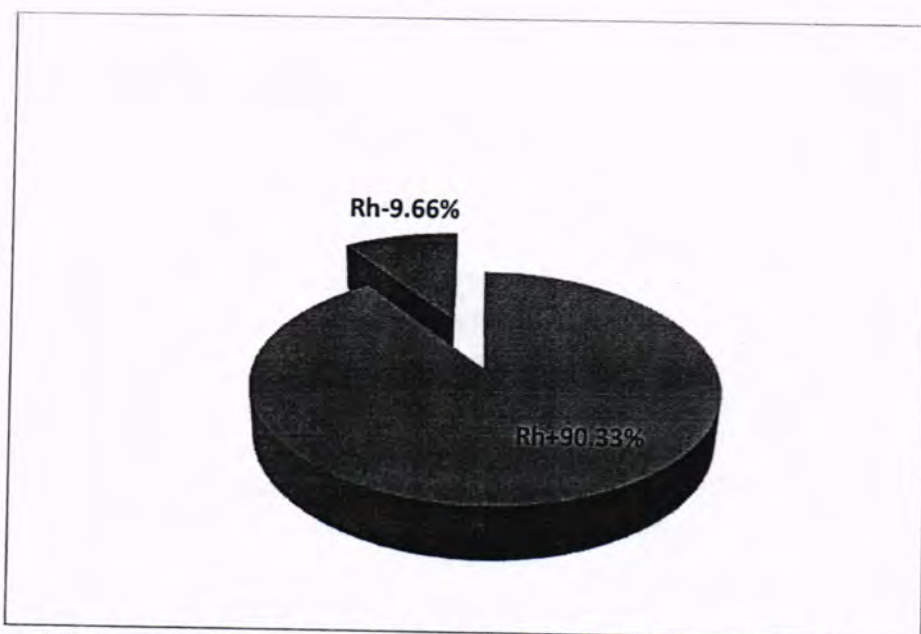


Figure-1:Percentage distribution of the Rh blood groups among Baghdad population

A common pattern on the distribution of blood types among the populations is seen in Table (3) and Figure (2) shows that the ABO phenotypes were as follows: 35.5 %, 28.5 %, 27.5 % and 8.6 % for each of O, B, A and AB blood groups respectively, the pattern observed was O>B>A>AB. Where in blood type O is most prominent, followed by blood type B, blood type A, then the least common blood type AB. Gender had no effect on the distribution of both blood group systems studied as shown in tables(3).

Table -3:Percentage distribution of ABO blood group by gender in population

Blood groups	A	B	AB	O
Male	644(13%)	677(13.7%)	188(3.8%)	867(17.5%)
Female	717(14.5%)	736(14.9%)	237(4.8%)	892(18%)
Total	1361(27.5)	1413(28.5)	425(8.6)	1759(35.5)

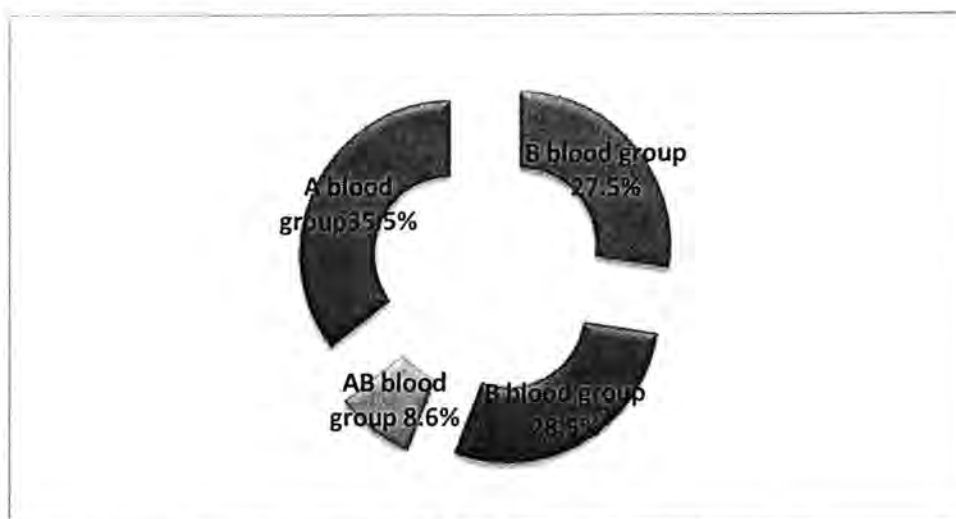


Figure-2:Percentage distribution of ABO blood group in population

The test of goodness of fit indicates that there is no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium among the studied population for the ABO system table (4). In addition, the chi-square test (with 1 degree of freedom) based on allele frequencies showed no significant deviation for studied population (0.9559). However, chi square test showed that is no significant relationship between ABO blood groups and origin.

Table-4:Distribution of the ABO blood group among Baghdad population

Prevalence of the ABO blood group in Baghdad					
Blood group	A (%)	B (%)	AB (%)	O (%)	Total (%)
Observed No.	1361(27.5)	1413(28.5)	425(8.6)	1759(35.5)	4958(100)
Expected No.	1374.77	1426.73	409.24	1747.26	4958
X <sup>2</sup> test	0.138	0.132	0.607	0.079	0.9559
Pearson's x <sup>2</sup> test=0.9559 df=1 P value=0.3282					

The Hardy-Weinberg Law says that at equilibrium,  $(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2rp + 2qr = 1$ , so as shows in table (5) the allele frequency's to be in Hardy-Weinberg equilibrium =0.9999987 nearly to one.

Table -5:Allele Frequency (p, q, r) Variation at the ABO Locus among Baghdad population

Allele frequency of the ABO blood groups in Baghdad				
Allele frequency	p(A)	q(B)	r(O)	Total
Allele frequency	0.199891	0.206466	0.593641	0.9999987
Stander Deviation	0.0042518	0.0043130	0.0053378	
Hardy-Weinberg Log Likelihood=-3988.1734 P-value=0.3139				



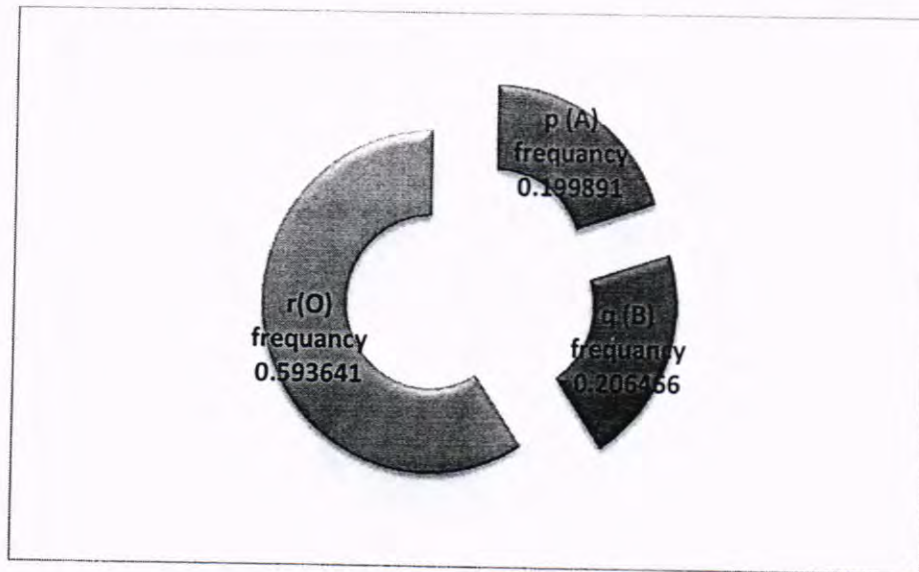


Figure-5: Allele Frequency ( $p$ ,  $q$ ,  $r$ ) Variation at the ABO Locus among Baghdad population

A person's blood group is one of his physical characteristics can be used to divide mankind into races. Phenotype frequencies of these antigens vary among different racial groups and Baghdad by its geographic location represents a common basin where several nationalities and minorities live together Arabs, Kurds, Christians and Turkman. In present study, the frequency distribution of blood group O was the highest with percentage frequency of 35.5% followed by blood group B and blood group A, and the least percentage frequency is that of blood group AB in the ethnic group as observed in previous studies (6, 7, 8, 9, 10) table (6). This results show that the ABO blood groups and Rhesus factor frequencies are in broad general agreement with most of the other published studies for Iraqi population which record a high frequency of O blood type and positive Rh factor as we see in table (6). The results of this study in Baghdad population, are in accordance with Mouhaus's and Jaff 's studies which recorded high prevalence of Rh+ over the Rh-, these results draw attention to the shortage of negative blood types in the population ( 7 , 8, 11).

Blood groups differ regionally and ethnically, The frequency of ABO blood groups and Rh positive subjects among the major Iraqi/Baghdadi ethnic group was similar to that reported from neighboring regions mean Arabian Gulf population, (6, 9, 10) table (6), but it was slightly made different in comparison to previous relevant studies that include

peoples of the Levant Sham like Syrian and Jordanian population , it was significant increase was recorded with respect to the emergence of blood group A in the population investigated, and a considerable reduction was noted in blood group O(12,13) , may be because different populations are under different selective pressures, different alleles, both "good" and "bad," are present in different populations in different percentages. Al-Arrayed et al., 2001 says that frequencies of groups A and B in Bahrain and in neighboring countries of the Arabian Gulf appear to be intermediate between Europe and South/South-East Asia. the allele frequency's to be in Hardy-Weinberg equilibrium  $=0.9999987$  nearly to one, the following assumptions are required to hold: random mating, no mutation, no migration, no stochastic effects or genetic drift due to small population size, and equal fertility for all genotype groups so that no selection is occurring (14). Violation of any of these assumptions can result to evolutionary change in terms of allelic frequency distribution (4). These conditions, however, seldom occur simultaneously, resulting to most populations not exhibiting Hardy-Weinberg equilibrium and are therefore evolving.

Table-6: ABO and Rh blood phenotypes distribution among other population

Population	A frequency	B frequency	AB frequency	O frequency	Rh frequency	References
Iraqi population/ Arab Baghdadi	27.5	28.5	8.6	35.5	90.33	Present study
Iraqi population/ Missan province	22.57	33.26	8.75	35.42	88.66	(7)
Iraqi population/ Basrah province	27.8	29.1	6.3	36.8	91.8	(11)
Iraqi population/ Kurd	32.47	23.84	6.53	37.16	91.73	(8)
Kuwaiti population	26.7	24.1	4.6	44.6	ND	(9)
Al Jouf Province / Saudi population	27.5	25.5	7.3	39.8	91.2	(6)
Southwest Saudi population	33.4	6	3.8	56.8	92.8	(15)
Jordanian population	38.36	18.04	6.98	36.62	ND	(12)
Syrian Arabs population	46.25	13.13	3.12	37.5	ND	(13)
Bahraini population	20.1	23.1	3.44	53.4	92.82	(10)
Pakistani population	27.92	32.4	10.58	29.1	90	(16)
Nigerian population	19.7	26.6	4.7	49	ND	(17)
Mauritanian population	28.28	18.56	4.05	49.10	94.23	(18)



The most widely studied ABO blood groups show that in general, the allele frequencies of the total population of the world in found to be Blood group O is the commonest blood group in, followed by A, B, and AB. More than 91% of the study population is Rh positive. Also, we can conclude that distribution of ABO and Rh blood groups in Kurds, in addition to being close to the mean of the world's population, is closest to Iranians, with similar trend to the neighboring countries, and appears to be intermediate between eastern (Asian) and western European (Caucasian) data.

### **Conclusion**

The present study is the first comprehensive study that documents the frequencies of ABO, in addition, this study will give the chance to researchers to explore the reasons of increasing of one blood group to another by linking it to genetic influences and effects of consanguineous marriages. This study further confirms that blood group O was the most common of the ABO blood group system in the population studied.

AB blood group was quite rare and Rhesus D positive phenotype was more common than Rhesus D negative phenotype.

### **Acknowledgement**

We are very thankful for their valuable support and guidelines in collection of blood samples; and their concerns in the overall publication of this article.

## **REFERENCES**

- 1- Landsteiner, K. "Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe". Zentralblatt Bakteriologie 27: 357-62(1900).
- 2- Akinnuga A.M, Bamidele O., Amosu A.M. and Ugwah G.U. Distribution of ABO and Rh Blood Groups among Major Ethnic Groups of Medical Students of Madonna University Teaching Hospital, Elele, Nigeria. Asian J. Med. Sci., 3(3): 106-109(2011).
- 3- Guzman R.M.S., Gervasio R. N.R., Fontanilla I.K.C.,and Cao E.P. Frequency Distribution of Blood Groups ABO, MN and Rh Factor in Philippine Cosmopolitan, Regional, and the National Populations Science Diliman 21(2):43-49(2010) .
- 4- Mayo, O. A century of Hardy-Weinberg Equilibrium. Twin Research and Human Genetics 11(3):249-256(2008).

- 5- Meitei S.Y. and Kshatriya G.K. Distribution of A1A2BO and Rh Blood Group among the Rajputs and Warlis of Naroli Village Panchayat,Dadra and Nagar Haveli. *Anthropologist*, 11(1): 65-66(2009).
- 6- Eweidah M.H., Rahiman S., Ali MD.H., and Al-Shamary A.M.D. Distribution of ABO and Rhesus (RHD) Blood Groups in Al-Jouf Province of the Saudi Arabia. *Anthropologist*, 13(2): 99-102(2011).
- 7- Mouhaus H.A., Abbas S.H., Musa A.S., Mahawi H.K. A study of ABO blood group and Rhesus factor distribution among sample of Missan province population *Journal of Basrah Researches ((Sciences))*Vol. (36). No.(5) p 48-53.ISSN 2695 1817(2010).
- 8- Jaff M.S. ABO and rhesus blood group distribution in Kurds *J Blood Med*. 2010; 1: 143–146(2010).
- 9- Al-Bustan S, El-Zawahri M, Al-Azmi D, Al-Bashir AA. Allele frequencies and molecular genotyping of the ABO blood group system in a Kuwaiti population. *Int J Hematol*. Feb;75(2):147-53(2002).
- 10- Al-Arrayed Sh., Shome D. K., Hafadh N., Amin Sh. Al Mukhareq H., Al Mulla M., Sanad H., Darwish F.A. ABO Blood Group and Rhd Phenotypes in Bahrain: Results of Screening School Children and Blood Donors, *Bahrain Medical Bulletin, Bahrain Med Bull*; 23(3):112-15(2001).
- 11- Abdullah N F. Human Blood Groups in Basrah . *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* Vol. 11, No. 2 pp. 239-242(1976).
- 12- Hanania S S, Hassawi D S, and Irshaid N M. Allele Frequency and Molecular Genotypes of ABO Blood Group System in a Jordanian Population. *J.Med.Sci*. 7(1):51-58(2007).
- 13- Nofal' KhK , Sakharov RS . The frequency of ABO blood groups and the expression of group antigens and isohemagglutinins in Syrian Arabs. *Sud Med Ekspert* . 39(2):34-6(1996).
- 14- Minelli, C., Thompson, J.R., Abrams K.R., Thakkinstian, A., Attia J. How should we use information about HWE in the meta-analyses of genetic association studies? *International Journal of Epidemiology* 37: 136-146(2007).
- 15- Sarhan MA, Saleh KA, Bin-Dajem SM. Distribution of ABO blood groups and rhesus factor in Southwest Saudi Arabia. *Saudi Med J*. Jan; 30(1):116-9(2009).

- 16- Khattak ID, Khan TM, Khan P, Shah SM, Khattak ST, Ali A. Frequency of ABO and Rhesus blood groups in District Swat, Pakistan. J Ayub Med Coll Abbottabad.20(4):127-129(2008).
- 17- Damulak O.D., Bolorunduro S., Deme K.S., Yakubu R.S., ZhakomP.N., Tokbam L. ABO Blood Group Distribution among Voluntary Blood Donors in North Central Nigeria: The Implications on Blood Units Expiration. Journal of Medicine in the Tropics 13:2: 102-104(2011).
- 18- Hamed C. T., Bollahi M A, Abdelhamid I , Med Mahmoud M A , BA B, Ghaber S , Habti N , Houmeida A . Frequencies and ethnic distribution of ABO and Rh (D) blood groups in Mauritania: results of first nationwide study. International Journal of Immunogenetics. 39(2) 151–154(2012).

## Digital Dermatoglyphics In a sample from Baghdad / Iraq

Abdalamer Naser Ghaloub and Aqeel Mahmood Ali Al- Lami  
Al- Mustanseria University/ College of Science /Biology Department

Received 5/10/2011 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

أنماط طبغات الاصابع ومعامل شدة النمط فحصت في عينة عشوائية مكونة من (90) ذكر بالغ من عدة مناطق في محافظة بغداد ، ومقارنتها بعينة عشوائية ثانية من نفس المناطق مكونة من (38) ذكرا بالغاً . هذه الطبغات للاصابع حلت نوعياً ( وصفيًا ) و كمياً لغرض تحديد فيما إذا كانت صفات الخطوط الجلدية تكشف التباين المحلي بين عينات نفس المنطقة أو لا . خلال النتائج لا توجد أي فروقات جوهرية بالنسبة لدراسة أنماط بصمات الاصابع ومعامل شدة النمط في العينتين المدروستين . وذلك لكون هاتين العينتين مشتقة من نفس المنطقة الجغرافية .

### ABSTRACT

Finger print's patterns and patterns intensity were examined in a random group of unrelated (90) adult males from several regions in Baghdad . sample A which compared with sample B - unrelated (38) adults males from several regions in Baghdad - .

These finger patterns were analyzed qualitatively and quantitatively, in order to establish whether or not the dermatoglyphic characteristics can reveal regional genetic variation .

No significant difference for the all finger patterns incidence for the pattern intensity index. Thus the present study revealed that, there is no clear differences in the studied factors in spite of the investigated samples belong to different origins.

### INTRODUCTION

Many different types of finger print patterns are called dermatoglyphic patterns according to Galton 1892 [1]. Dermatoglyphic ridges might correspond to the lines of curvatures of the skin of the embryo at the time when the ridges were being formed [2].

Another use of dermatoglyphics has been in anthropology. Population studies reveal distinct variation according to type and sub-type and have been used to determine the origin of various groups Until recently (when DNA testing took over), the most scientifically acceptable test to determine whether twins came from the same egg or not was the dermatoglyphic test [3].

In biology and medicine using of dermatoglyphics have long been interested in abnormal psychology and congenital defects. In 1978 studies had been performed in relationship to mental retardation, congenital heart defects, diabetes mellitus, several child psychiatric groups, retarded growth, and a number of syndromes[4]. Autosomal trisomies, Trisomy 21 (Downs Syndrome), Trisomy 13 and 18 and trisomy 8 (Mosaicism) have long been the subjected to studies in relationship to dermatoglyphic patterns.[5] and schizophrenia subjects,



radicals [1],[3] . Phenolics in grapes have been reported to inhibit oxidation of human low density lipoproteins (LDL) *in vitro*[4].

Proanthocyanidins are naturally occurring plant metabolites widely available in fruits, vegetables, nuts, seeds, flowers, and bark [5]. Also known as procyanidins, these substances are the main precursors of the blue-violet and red pigments in plants. These compounds are part of a specific group of polyphenolic compounds the flavonoids. Flavonoids is further categorized by sub-groups. Proanthocyanidins belong to the category known as condensed tannins, one of the two main categories of plant tannins [6].

Proanthocyanidins are high-molecular-weight polymers comprised of the monomeric unit flavan-3-ol (+)catechin and (-) epicatechin. Oxidative condensation occurs between carbon C-4 of the heterocycle and carbons C-6 or C-8 of the attached A and B rings [6] . The procyanidins B1-B4, characterized by the C4-C8 linkage, are the most common dimers, occasionally accompanied by corresponding C4-C6 linked isomers (B5-B8) [7] . The biological properties of flavonoids, including proanthocyanidins, have been extensively reviewed [8]. In addition to their free radical scavenging and antioxidant activity [9]. Proanthocyanidins have been reported to have antibacterial, antiviral, anticarcinogenic, anti-inflammatory, anti-allergic, and vasodilatory actions [5],[10] Proanthocyanidins have also been shown to inhibit lipid peroxidation, platelet aggregation, capillary permeability and fragility, and to affect enzyme systems including phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase [5, 9, 10].

Resistance to antimicrobial agents has become an increasingly important and pressing global problem. Substantial investment and research in the field of anti-infective are now desperately needed if a public health crisis is to be averted. Structural modification of antimicrobial drugs to which resistance has developed has proven to be an effective means of extending the lifespan of various antibacterial agents including -lactams and quinolones [11].

The aim of this study is to investigate inhibitory activity of Proanthocyanidins extracted from (*Vitis vinifera*) in vitro on some of pathogenic bacterial isolates and to compare with the effect of some antibiotics.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Proanthocyanidins:

Proanthocyanidins was prepared as described by [12] .

### Test microorganisms

Eight isolates of pathogenic bacteria : 4 isolates of *Salmonella typhimurium* 1,2,3,4 ,one isolate for *Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella alexanderi* , *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*. were

collected from Biology department - labs / College of Science/Al Mustansiriya University the organisms were identified by standard microbiological techniques including colony morphology, and by Api Staph, Api20 E biochemical characteristics [13] .

#### **The antimicrobial activity of Proanthocyanidins:**

The antimicrobial activity of Proanthocyanidins was determined by agar well diffusion method against the isolates of bacteria in this method, pure isolate of 24hrs growth was cultured in Muller-Hinton Agar plate (Hi Media, Mumbai, India) by using sterile swab so as to achieve a confluent growth. The plates were allowed to dry and a sterile cork borer of diameter 8.0mm was used to bore five wells in each agar plates. Five concentration of the crude extract were made by dissolving (1) gram of the crude extract in (2) ml distilled water to obtain 500mg/ml filtered in Millipore filter paper and used as stock to prepare the other concentration (100,200,300,400,500) mg/ml .A 10 $\mu$ L volume of each concentration was applied by micropipette in the wells into Muller-Hinton Agar plate. Distilled water served as control [14] . The plates were allowed to stand for 1hr or more for diffusion to take place and then incubated at 37°C for 24hrs. The zone of inhibition was recorded. Each experiment was performed in duplicate.

#### **Sensitivity to antimicrobial agents**

All isolates were tested against ten different antimicrobial agents including :

N0.	Antibiotics	Symbol	Concentration
1	Ampicillin	Am	10 mcg/disk
2	Augmentin	AMC	20/10 mcg/disk
3	Aztreonam	ATM	30 mcg/disk
4	Ceftriaxone	CRO	30mcg/disk
5	Cephalexin	CL	30mcg/disk
6	Ciprofloxacin	CIP	5 mcg/disk
7	Doxycycline	DO	30 mcg/disk
8	Erythromycin	E	15 mcg/disk
9	Gentamicin	CN	10 mcg/disk
10	Tetracycline	TE	30 mcg/disk

And this was done by taking 100 $\mu$ l of bacterial suspension and streaked onto a Muller-Hinton agar plate using a sterile cotton swab. After 10-15 minutes, antibiotic disks were put onto the agar plates using a sterile forceps then incubated at 37°C for 24 hours. The diameters of inhibition

zones were measured and bacteria were determined as sensitive or resistant according to the standard measurements [15] .

## RESULTS AND DISCUSSIONS

The study was performed for measuring the antibacterial activity of Proanthocyanidins which extracted from grape seed (*vitis vinifera*) seed, against number of pathogenic bacteria which isolated from different clinical sample (urine, skin, blood, stool). There were :4 isolate of *Salmonella*: *Salmonella typhimurium* sero var 1, *Salmonella typhimurium* sero var 2, *Salmonella typhimurium* sero var 3, *Salmonella typhimurium* sero var 4, and one isolate of *Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella alexanderi*, *Staphylococcus aureus* ,and *Escheria coli*.

These isolates were tested for antibiotic susceptibility against 10 antibiotic which include : (Ciprofloxacin, Tetracyclin, Gentamicin, Ampicillin, Doxycycline, Cephalexin, Ceftriaxone, Augmentin, Aztreonam, Erythromycin), by disk diffusion method and the results of antibiotic susceptibility revealed that the isolates showed multiple drug resistance listed in table 1 : *Pseudomonas aeruginosa* isolate was highly resistance for all tested antibiotics in 100% .While the percentage of resistance to *Staphylococcus aureus* was 70% and sensitive to CN, CRO antibiotic , the percentage of resistance of the isolate *Salmonella typhimurium* sero var 1,2 and *Klebsiella alexanderi* was 60%, for the isolate 3,4 50%, and for the isolate of *E.coli* was 40% . , *E. coli* was less 50% and its sensitive to antibiotics TE, CN, CIP, CRO, ATM, CL, these results agree with other paper[16,17].

Table-1 : Antibiotic sensitivity test.

Test organism	CIP 5mcg	TE 30mcg	CN 10mcg	AM 10mcg	ATM 30mcg	DO 30mcg	CL 30mcg	CRO 30mcg	AMC 20/10mcg	E 15mcg
	Zone of inhibition[mm]									
<i>Salmonella</i> 1	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> 2	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> 3	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R
<i>Salmonella</i> 4	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Klebsiella alexanderi</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R
<i>Escheria coli</i>	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R

CIP:Ciprofloxacin(5mcg),TE:Tetracyclin(30mcg),CN:Gentamicin(10mcg), AM :Ampicillin (10mcg), ATM:Aztreonam (30mcg), DO: Doxycycline(30mcg), CL:Cephalexin(30mcg), CRO: Ceftriaxone(30mcg), AMC: Augmentin (20/10mcg) ,E:Erythromycin(15mcg).

MIC ( Minimum inhibitory concentration) was also detected as showed in table 2 : the MIC of some antibiotics (CRO, DO, CL, ATM) were also determined using the two fold dilution methods . The isolates determent resistance or sensitive according to the (break point) value.

Table-2: MIC of the antibiotics against pathogenic bacterial isolates.

Antibiotic Test organism	CRO R $\geq$ 64	DO R $\geq$ 16	CL R $\geq$ 14	ATM R $\geq$ 32
<i>Salmonella</i> 1	512	128	256	32
<i>Salmonella</i> 2	512	128	14	32
<i>Salmonella</i> 3	32	128	128	32
<i>Salmonella</i> 4	512	128	14	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	512	256	1024	1024
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	8	128	1024
<i>Klebsiella alexanderi</i>	32	8	14	32
<i>Escheria coli</i>	32	8	14	32

The results revealed that the isolates of bacteria tested were grown in highly concentration of the antibiotic , this results agree with similar results obtained found the antibiotic have highly activity against most of isolates [18,19,20].

#### Antibacterial activity of Proanthocyanidin:

As shown in table 3 some isolates showed inhibition zone against Proanthocyanidin extract in all concentrations and zone of inhibition increased by increasing in the concentration of the Proanthocyanidin extract. Proanthocyanidin showed highly antibacterial activity against all isolate of *Salmonella typhimurium* and *Escheria coli* this activity increased with concentration as showed in table 3 .The inhibition zone was (24 – 33) in the concentration of 500 mg/ml , While other isolate showed less response against Proanthocyanidin, the inhibition zone was (10 – 27) in the other concentration (100, 200, 300, 400) mg/ml

The results agree with similar results found that Proanthocyanidins are also known to possess antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, anti-allergic, and vasodilator properties [21].



Table-3: Antimicrobial activity of Proanthocyanidin from grape (*Vitis vinifera*) against bacterial isolates.

Test organism	Proanthocyanidin extract concentration mg\ml					
	100mg\ml	200mg\ml	300mg\ml	400mg\ml	500mg\ml	Control
	Inhibition zone [mm]					
<i>Salmonella</i> 1	Growth	13	15	17	24	Growth
<i>Salmonella</i> 2	Growth	13	15	20	30	Growth
<i>Salmonella</i> 3	Growth	17	20	27	33	Growth
<i>Salmonella</i> 4	Growth	14	16	21	25	Growth
<i>Staphylococcus aureus</i>	Growth	Growth	12	12	17	Growth
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Growth	Growth	Growth	Growth	12	Growth
<i>Klebsiella alexanderi</i>	Growth	Growth	Growth	12	15	Growth
<i>Escheria coli</i>	Growth	10	20	25	30	Growth

\*Inhibition zone (mm)

Previous investigations have reported that proanthocyanidin protects multiple target organs from drug- and chemical-induced toxicity. GSPE protects cells against acetaminophen-induced hepato- and nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity, doxorubicin-induced cardiotoxicity, and dimethylnitrosamine-induced spleen toxicity [22].

## REFERENCES

1. Yilmaz Y, Toledo R. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Sci*; 15: 422-433. [2004].
2. Jayaprakasha G, Selvi T, Sakariah K. Antibacterial and antioxidant activities of grape [*Vitis vinifera*] seed extracts. *Food Res Int*; 36: 117-122. [2003].
3. El-Alfy A, Ahmed A, Fatani A. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol.Res*; 52: 264-270. [2005].
4. Teissedre P, Frankel E, Waterhouse A, Peleg H, German J. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J Sci of Food and Agri*; 70: 55-61. [1996].
5. Bagchi D, Krohn RL, Bagchi M, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*; 95: 179-189. [1997].

6. Bravo L. Polyphenols. chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*;56:317-333. [1998].
7. Bombardelli E, Morazzoni P. *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia* ;66:291-317. [1995].
8. Bombardelli E, Morazzoni P, Carini M, et al. Biological activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L. *BioFactors* ;6:429-431. [1997].
9. Murray M, Pizzorno J. Procyanidolic oligomers. In: Murray M, Pizzorno J, eds. *The Textbook of Natural Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. London:Churchill Livingstone;899-902. [1999].
10. Bagchi D, Garg A, Krohn R, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol* ;30:771-776. [1998].
11. Poole K. Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *J Pharm Pharmacol* ;53:283-94. [2001].
12. Feng JG, Chen LQ . Determination of Procyanidin in Grape Seed Extracts. *China Food Additives* 6: 103-105. [2003].
13. Holt JG [Ed]. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and M.E. Sharpe, Baltimore, Md: Williams and Williams. vol. 2,4th ed. S.T. [1986].
14. Crespo, M.E.; Jimenez, J.; Gomis, E. and Navarro, C .. Antibacterial activity of the essential oil of *thymus serpylloides* sub species *gadorenensis*. *Microbios*. 61:181-184. [1990].
15. Clinical and Laboratory Standard Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02-A10 and M07-A8 . Performance standard for antimicrobial susceptibility testing ; twenty first informational supplement . January Vol. 30 No. 1 and Vol. 30 No. 15. [2011].
16. Al- Harthi, A. A. and Al- Fifi, S. H. Antibiotic resistance pattern and empirical therapy for urinary tract infections in children. *Saudi. Med. J.*, 29(6):854-858. [2008].
17. Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Asano, N., Yoda, Y., Hara, Y. and Shimamura, T. Epigallocatechin gallate synergistically enhance the activity of carpenems against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46:558-560. [2002].
18. Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J.M.T. and Taylor. P.W. Modulation of  $\beta$ - lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23:462-467. [2004].
19. Schroeder, W. A.; Locke, T. R. and Jensen, S.F. Resistance to  $\beta$ -lactam inhibitor protein dose not parallel resistance to clavulanic

- acid in TEM  $\beta$ -lactam mutant. J. Antimicrob. Agents Chemother . 46(11:3568-3573) .[2003].
20. Raksha ,R.; Srinivasa, H. and Macaden, R.S. Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in Urinary Trach Infection . Indian . J .Med. Microbial. (2: 102-107). [2003].
  21. Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. Altern Med Rev, 5:144-151. [2000].
  22. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. Ann N Y Acad Sci, 957:260-270. [2002].

## Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens/putida* group isolated from patients in Baghdad

Layla Abdul Hamid Said

Biology Department, College of Science, Al-Mustansiriya University, Baghdad, Iraq

Received 24/9/2012 – Accepted 4/12/2012

### الخلاصة

تم الحصول على البروتينات الذائبة الكلية لاربعة عشر عزلة تعود للبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) وستة عزلات لمجموعة *Pseudomonas fluorescens/putida* (Pf/p) وتحليلها باستخدام تقنية (SDS-PAGE) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis، تم تحديد الحزم البروتينية ونسبها حسب مخطط تم الحصول عليه ببرمجيات خاصة تعرف بالتسمية Photo Molecular Weigh Software, 200. Version 10.01. أظهرت تقنية (SDS-PAGE) اثني عشر نسقاً للبروتينات الذائبة الكلية واحتواء العزلة المفردة على 20-26 حزمة بروتينية ذات اوزان جزيئية تراوحت ما بين 406-14 كيلو دالتون. تم الاستعانة بانماط البروتينات المرحلة كهربائياً كأساس للتحليل العددي المعتمد على معامل جاكارد  $S_j$  و UPGMA لعزلات Pa و Pf/p. نجم عن التحليل العددي لنسق البروتينات الذائبة الكلية لهذه العزلات مخطط شجري مكون من عنقودين رئيسيين والذان امكن تمييزهما عند  $S_j \geq 66.7\%$  مع بقاء عزلتان فقط خارج هذان العنقودان، اجتمعت عزلات Pa و Pf/p معاً ونسب وصلت  $S_j \geq 100\%$  ضمن العنقودان مما يدل على القرابة بين هذه العزلات.

### ABSTRACT

Whole cell protein patterns obtained from 14 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (pa) and 6 isolates of *Pseudomonas fluorescens/putida* (pf/p) group using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were analyzed. The protein bands and its percentage were determined according to the schematic diagram obtained by special software (Photo Molecular Weigh Software, 200 Version 10.01). The SDS-PAGE technique generated 12 different protein profile patterns; the individual isolate had 20 to 26 protein bands ranging in their molecular weight from 406 to 14 KDa. The resulting electrophoretic protein patterns obtained were used as bases for numerical taxonomy based on Jaccard's coefficient ( $S_j$ ) and Unweighted Pair Method using Arithmetic Averages (UPGMA). Cluster analysis of the whole cell protein profile (WCPP) of Pa and Pf/p isolates obtained a dendrogram consisted of two major clusters that could be distinguished at  $S_j \geq 66.7\%$  for both, only two isolates remains outside. After numerical analysis of the resulting electrophoretic protein patterns Pa and Pf/p isolates grouped together with  $S_j$  reaches  $\geq 100\%$  in the two clusters which indicate the close relationship among these isolates.

### INTRODUCTION

*Pseudomonas* is a genus of Gammaproteobacteria belonging to the family *Pseudomonadaceae*, certain members of this genus has become an important cause of different human infections. One of the species of this genus is Pa. It is an opportunistic pathogen that can cause high epidemic spread in wound and burn infections, urinary tract infections, bacteremia, septicemia and meningitis. Mucoid strains have frequently recovered from cystic fibrosis patients. Pf/p is much less commonly



found in clinical specimens than Pa, they may cause opportunistic infection in immunocompromised hosts (1, 2). Most strains of Pa are resistant to relatively high levels of most antibiotics used. Unlike Pf/p which are sensitive to a wide range of antibiotics (3-7). For reliable identification of *Pseudomonas* spp. biotyping, antibiotyping and serotyping are routinely used in the reference laboratories. Nevertheless molecular techniques such as SDS-PAGE of the whole cell protein profile (WCPP), Polymerase chain reaction (PCR) based systems, 16S rRNA, & DNA Amplification fingerprinting (DAF) and Fourier transform spectroscopy (FTIR) are the most efficient precise identification of bacterial isolates. (8) Compared the genes *amp C*, *fab D*, *pro C*, *pbp-2*, *rpo D* and *rpos* of *Pseudomonas aeruginosa* in terms of expression stability by RT-PCR. (9) Characterize novel fluorescent *Pseudomonas* strains using SDS-PAGE, BOX-PCR and 16S rRNA. (10) Used SDS-PAGE and FTIR for characterization of *Pseudomonas aeruginosa* concluded that SDS-PAGE is a better technique for identification at species level as compared to FTIR. (11) Detect phenol degrading *Pseudomonas putida* in activated sludge by PCR. (12) Identified *Pseudomonas putida* strain (designated P.putida Mm3) on the basis of 16S rRNA. (13) Develop a novel qPCR, using *ecfx* as a specific target gene, for the rapid and accurate identification of *Pseudomonas aeruginosa* from positive blood culture. (14) Found that the qRT-PCR offers an opportunity to increase the detection of Pa in cough swab. (15) Identified *Pseudomonas fluorescens* LP1 by 16S rRNA during the tracking of *Pseudomonas* sp. from the marine environment in Turkey. Thus, given the great interest in Pa and Pf/p isolates and their pathogenicity, this work aimed to establish a taxonomic, molecular framework to enable identification of these isolates from clinical specimens. The isolates that were initially classified according to their phenotypic characteristics are further identified by SDS-PAGE.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial isolates:** The study included 14 Pa and 6 Pf/p isolates previously identified by (7). The isolates were from patients attending Al-Kindey Hospital in Baghdad during July and August 2009 and have been characterized by oxidase and catalase tests, pigmentation on King A and King B medium. This identification has been confirmed by the conventional biochemical test on api 20E system (Biomérieux, Marcy, L'Etiole, France) and its complementary test. Pa isolates were further identified serologically. Overall 40% of the isolates were obtained from wound swabs, 25% blood cultures, 20% from sputum and 5% from ear swabs. These pathogens were from adult male and female patients 3:7.

**Electrophoresis:** Total cell protein extract of *Pseudomonas* isolates was determined as described by (16). The cultures were used as an inoculums 1% v/v in 10ml Nutrient Broth and incubated at 37°C for 24h. The pellet washed two of three times with sodium phosphate buffer (0.01M) containing 0.8% NaCl (pH7.3, sodium phosphate buffered saline). The extracts were sonicated on ice during 45 seconds. The sonicated extracts were centrifuged at 5000 rpm for 10min. After discarding the pellet, the supernatant was supplemented with sample buffer (0.062 M Tris-HCl 0.75, 2-merkapto ethanol 5ml, glycerol 10 ml, bromophenol blue, 1mg) and added 20% SDS, 0.1ml, heated for 10min at 95°C.

SDS-PAGE was performed according to the Laemmli (17) methods, proteins were separated by using a ten column electrophoresis apparatus utilizing stainless steel wires electrodes and two cubic reservoirs (17 cm deep and 11 X 16 cm in dimensions) constructed from 12cm glass tubing. An acrylamide gel (0.5 cm diameter X 10 cm length) was used. The gel consists of stacking gel which proteins (stocked) and a running gel part on which proteins separate. Running gel containing 10% acrylamide was polymerized 2 hrs before electrophoresis and stacking gel containing 4% acrylamide was poured and polymerized 2hrs before sample application. Each sample was mixed with a sample buffer which contained 10% glycerol, 2% mercaptoethanol, 2% SDS and 0.01 bromphenol blue. Protein concentrations were adjusted to 2 µg/µl and 0.2 µg/µl, and then heat denatured and run on the SDS-PAGE. For SDS-PAGE, 20µl sample loaded on the stacking gel. mA per sample applied for 150 min, by EISCO power supply. The bromphenol blue was present on the lowest side of the gel. A standard protein solution containing 6 proteins ranging in size from 14 to 230 Kd was used as a molecular weight marker and for the normalization and interpolation of the protein patterns. Following electrophoresis, the proteins were stained with 0.125% commassie brilliant blue R-250 in 40% ethanol and 7% acetic acid -and then destained in acetic acid.

Protein bands and its percentages were determined according to the schematic diagrams obtained by Photo Capt Molecular Weight Software (18).

**Calculations:** According to the statistical computer program: Statistical Package for Social Science (SPSS), numerical analysis based on (Sj) and (UPGMA) cluster analysis of the WCPP of *Pseudomonas* isolates were done.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, molecular typing methods were employed in order to identify and classify Pa and Pf/p isolates. Twenty Pa and Pf/p isolates

previously characterized by a rapid identification system api 20E were subjected to whole cell protein electrophoresis (SDS-PAGE) analysis.

**General features of patterns:** SDS-PAGE of whole cell protein extracts of Pa and Pf/p isolates produced twelve protein profile patterns (Table 1); the WCPP indicated that the individual isolates had 20 to 26 protein bands ranging in their molecular weight from 406 to 14 KDa.

Table-1: SDS-PAGE protein profile patterns of pa and pf/p isolates

Sex	Source	Isolate	Protein bands molecular weight range					Protein profile patterns
			14-61	62-96	67-205	206-323	324-406	
♀	ws	Pa31	0	1	1	1	1	I
♀	ws	pf/p 21	1	1	1	1	1	
♀	ws	Pa 18	0	1	1	1	1	
♀	bc	Pf/p15	1	1	1	1	0	II
♂	sp	Pf/p	1	1	1	1	0	
♀	sp	Pa34	1	1	1	1	0	
♀	es	Pa19	1	1	0	0	1	III
♂	ws	Pa22	0	0	1	1	0	IV
♂	ws	Pa27	0	0	1	1	0	
♀	sp	Pf/p26	0	1	0	1	1	V
♀	bc	Pa29	0	1	1	1	0	VI
♀	ws	Pd/p25	0	1	1	1	0	
♀	bc	Pa30	0	1	1	0	1	
♂	ws	Pa35	0	1	1	0	1	VII
♀	bc	Pa38	0	1	1	0	1	
♀	bc	Pa32	0	1	1	0	0	VIII
♂	ws	Pf/p33	0	0	1	0	1	IX
♀	es	Pa37	1	0	0	1	0	X
♀	es	Pa24	0	0	1	1	1	XI
♂	sp	Pa36	1	0	1	1	0	XII

1= 6 to 10 bands recorded in this position, 0= 1-5 bands recorded in this position.

### Numerical analysis of patterns:

A similarity matrix (Table 2) and a dendrogram (Fig.1) were obtained from the numerical analysis based on S<sub>j</sub> and UPGMA clustering, as shown in (Fig 1), the dendrogram was consisted of two major clusters A and B that could be distinguished at S<sub>j</sub> ≥ 66.7 for both, Only two isolates (Pa 37 & Pa 19) remains outside and were linked to them at significantly lower level S<sub>j</sub> ≥ 0, 50% respectively.

Table -2: Similarity matrix based on numerical analysis of WCPP of Pa and Pf/p isolates

Jaccard Measure																	Case
Pa24	Pa37	Pf/p33	Pa32	Pa38	Pa35	Pa30	Pf/p25	Pa29	Pf/p26	Pa27	Pa22	Pa19	Pa34	Pf/p20	Pf/p15	Pa18	Pf/p21
																	1.000
																1.000	Pa18
															.600	.600	Pf/p15
														1.000	.600	.600	Pf/p20
													1.000	1.000	.600	.600	Pa34
												.400	.400	.400	.400	.400	Pa19
											.000	.500	.500	.500	.500	.500	Pa22
								1.000	.000	.500	.500	.500	.500	.500	.500	.500	Pa27
								.250	.250	.500	.400	.400	.400	.400	.750	.750	Pf/p26
								.500	.667	.667	.200	.750	.750	.750	.750	.750	Pa29
								1.000	.500	.667	.667	.200	.750	.750	.750	.750	Pf/p25
						.500	.500	.500	.250	.250	.500	.400	.400	.400	.750	.750	Pa30
					1.000	.500	.500	.500	.250	.250	.500	.400	.400	.400	.750	.750	Pa35
					1.000	1.000	.500	.500	.250	.250	.500	.400	.400	.400	.750	.750	Pa38
			.667	.667	.667	.667	.667	.250	.333	.333	.250	.500	.500	.500	.500	.500	Pa32
		.333	.667	.667	.667	.667	.250	.250	.250	.333	.333	.250	.200	.200	.500	.500	Pf/p33
	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.250	.250	.250	.333	.333	.250	.500	.500	.200	.200	Pa37
.250	.667	.667	.250	.500	.500	.500	.500	.500	.667	.667	.200	.400	.400	.400	.750	.750	Pa24
.500	.667	.250	.250	.200	.200	.200	.500	.500	.200	.667	.667	.200	.750	.750	.400	.400	Pa36



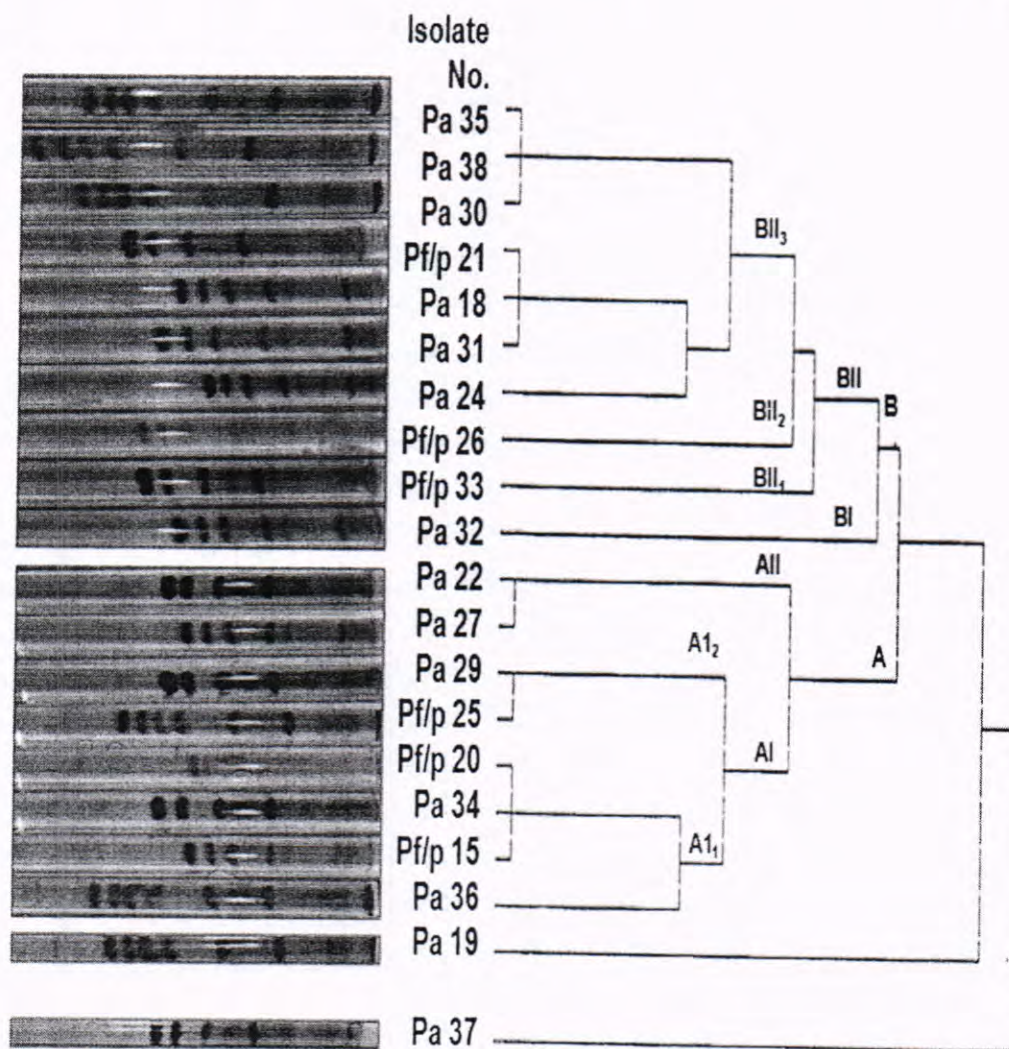


Fig. -1: Clustering of WCPP electrophoresis of 20 Pa & Pf/p Isolate based on Sj & UPGMA method

Isolates Pa 37 and Pa 19 showed 21, 25 protein bands respectively and were isolated from females ear swabs. Table 3 presents the schematic diagrams and the quantitative parameters of electrophoretic patterns of Pa37&Pa19 isolates.

Table -3: Schematic diagrams and the quantitative parameters of electrophoretic patterns of Pa37&amp;Pa19 isolates.

Sample Number	schematic diagrams of electrophoretic pattern	quantitative parameters of electrophoretic pattern																																																																																																																																												
37		<table> <tr> <th>Number</th><th>Volume</th><th>Height</th><th>Area</th><th>M.W.</th><th>Number</th><th>Volume</th><th>Height</th><th>Area</th><th>M.W.</th></tr> <tr> <td>1</td><td>11715</td><td>53</td><td>496</td><td>134.122</td><td>12</td><td>75374</td><td>69</td><td>2106</td><td>112.225</td></tr> <tr> <td>2</td><td>5386</td><td>41</td><td>248</td><td>947.042</td><td>13</td><td>1927</td><td>71</td><td>62</td><td>83.123</td></tr> <tr> <td>3</td><td>15610</td><td>45</td><td>724</td><td>324.407</td><td>14</td><td>53920</td><td>91</td><td>1612</td><td>45.124</td></tr> <tr> <td>4</td><td>76554</td><td>95</td><td>2044</td><td>305.902</td><td>15</td><td>12073</td><td>57</td><td>920</td><td>75.541</td></tr> <tr> <td>5</td><td>10491</td><td>79</td><td>910</td><td>277.458</td><td>16</td><td>55750</td><td>89</td><td>1550</td><td>69.333</td></tr> <tr> <td>6</td><td>20780</td><td>75</td><td>620</td><td>266.410</td><td>17</td><td>43093</td><td>99</td><td>1054</td><td>60.716</td></tr> <tr> <td>7</td><td>21257</td><td>43</td><td>744</td><td>246.983</td><td>18</td><td>13920</td><td>63</td><td>748</td><td>56.184</td></tr> <tr> <td>8</td><td>44593</td><td>97</td><td>2030</td><td>287.794</td><td>19</td><td>12140</td><td>51</td><td>744</td><td>65.270</td></tr> <tr> <td>9</td><td>19970</td><td>73</td><td>620</td><td>179.041</td><td>20</td><td>5570</td><td>41</td><td>558</td><td>41.659</td></tr> <tr> <td>10</td><td>22322</td><td>91</td><td>680</td><td>159.093</td><td>21</td><td>27832</td><td>37</td><td>5139</td><td>27.245</td></tr> <tr> <td>11</td><td>30809</td><td>107</td><td>1240</td><td>143.098</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.	1	11715	53	496	134.122	12	75374	69	2106	112.225	2	5386	41	248	947.042	13	1927	71	62	83.123	3	15610	45	724	324.407	14	53920	91	1612	45.124	4	76554	95	2044	305.902	15	12073	57	920	75.541	5	10491	79	910	277.458	16	55750	89	1550	69.333	6	20780	75	620	266.410	17	43093	99	1054	60.716	7	21257	43	744	246.983	18	13920	63	748	56.184	8	44593	97	2030	287.794	19	12140	51	744	65.270	9	19970	73	620	179.041	20	5570	41	558	41.659	10	22322	91	680	159.093	21	27832	37	5139	27.245	11	30809	107	1240	143.098																									
Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.																																																																																																																																					
1	11715	53	496	134.122	12	75374	69	2106	112.225																																																																																																																																					
2	5386	41	248	947.042	13	1927	71	62	83.123																																																																																																																																					
3	15610	45	724	324.407	14	53920	91	1612	45.124																																																																																																																																					
4	76554	95	2044	305.902	15	12073	57	920	75.541																																																																																																																																					
5	10491	79	910	277.458	16	55750	89	1550	69.333																																																																																																																																					
6	20780	75	620	266.410	17	43093	99	1054	60.716																																																																																																																																					
7	21257	43	744	246.983	18	13920	63	748	56.184																																																																																																																																					
8	44593	97	2030	287.794	19	12140	51	744	65.270																																																																																																																																					
9	19970	73	620	179.041	20	5570	41	558	41.659																																																																																																																																					
10	22322	91	680	159.093	21	27832	37	5139	27.245																																																																																																																																					
11	30809	107	1240	143.098																																																																																																																																										
19		<table> <tr> <th>Number</th><th>Volume</th><th>Height</th><th>Area</th><th>M.W.</th><th>Number</th><th>Volume</th><th>Height</th><th>Area</th><th>M.W.</th></tr> <tr> <td>1</td><td>12744</td><td>87</td><td>1543</td><td>428.127</td><td>14</td><td>7599</td><td>71</td><td>682</td><td>83.321</td></tr> <tr> <td>2</td><td>12713</td><td>15</td><td>930</td><td>294.571</td><td>15</td><td>2748</td><td>51</td><td>434</td><td>62.597</td></tr> <tr> <td>3</td><td>24984</td><td>103</td><td>930</td><td>357.347</td><td>16</td><td>870</td><td>39</td><td>124</td><td>65.495</td></tr> <tr> <td>4</td><td>13157</td><td>83</td><td>476</td><td>344.286</td><td>17</td><td>4126</td><td>49</td><td>682</td><td>78.222</td></tr> <tr> <td>5</td><td>6777</td><td>69</td><td>310</td><td>323.361</td><td>18</td><td>4925</td><td>59</td><td>356</td><td>76.543</td></tr> <tr> <td>6</td><td>17711</td><td>95</td><td>1279</td><td>305.457</td><td>19</td><td>42195</td><td>87</td><td>1424</td><td>73.214</td></tr> <tr> <td>7</td><td>37149</td><td>88</td><td>1240</td><td>270.874</td><td>20</td><td>84109</td><td>107</td><td>1674</td><td>63.965</td></tr> <tr> <td>8</td><td>35342</td><td>77</td><td>1812</td><td>239.796</td><td>21</td><td>37519</td><td>97</td><td>992</td><td>54.628</td></tr> <tr> <td>9</td><td>1344</td><td>69</td><td>124</td><td>207.443</td><td>22</td><td>84449</td><td>93</td><td>846</td><td>44.705</td></tr> <tr> <td>10</td><td>65519</td><td>123</td><td>2418</td><td>174.912</td><td>23</td><td>12748</td><td>67</td><td>558</td><td>38.416</td></tr> <tr> <td>11</td><td>8518</td><td>69</td><td>472</td><td>194.804</td><td>24</td><td>5175</td><td>53</td><td>958</td><td>32.664</td></tr> <tr> <td>12</td><td>76736</td><td>67</td><td>1116</td><td>116.740</td><td>25</td><td>24341</td><td>43</td><td>5070</td><td>27.560</td></tr> <tr> <td>13</td><td>41470</td><td>95</td><td>1428</td><td>120.971</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.	1	12744	87	1543	428.127	14	7599	71	682	83.321	2	12713	15	930	294.571	15	2748	51	434	62.597	3	24984	103	930	357.347	16	870	39	124	65.495	4	13157	83	476	344.286	17	4126	49	682	78.222	5	6777	69	310	323.361	18	4925	59	356	76.543	6	17711	95	1279	305.457	19	42195	87	1424	73.214	7	37149	88	1240	270.874	20	84109	107	1674	63.965	8	35342	77	1812	239.796	21	37519	97	992	54.628	9	1344	69	124	207.443	22	84449	93	846	44.705	10	65519	123	2418	174.912	23	12748	67	558	38.416	11	8518	69	472	194.804	24	5175	53	958	32.664	12	76736	67	1116	116.740	25	24341	43	5070	27.560	13	41470	95	1428	120.971					
Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.																																																																																																																																					
1	12744	87	1543	428.127	14	7599	71	682	83.321																																																																																																																																					
2	12713	15	930	294.571	15	2748	51	434	62.597																																																																																																																																					
3	24984	103	930	357.347	16	870	39	124	65.495																																																																																																																																					
4	13157	83	476	344.286	17	4126	49	682	78.222																																																																																																																																					
5	6777	69	310	323.361	18	4925	59	356	76.543																																																																																																																																					
6	17711	95	1279	305.457	19	42195	87	1424	73.214																																																																																																																																					
7	37149	88	1240	270.874	20	84109	107	1674	63.965																																																																																																																																					
8	35342	77	1812	239.796	21	37519	97	992	54.628																																																																																																																																					
9	1344	69	124	207.443	22	84449	93	846	44.705																																																																																																																																					
10	65519	123	2418	174.912	23	12748	67	558	38.416																																																																																																																																					
11	8518	69	472	194.804	24	5175	53	958	32.664																																																																																																																																					
12	76736	67	1116	116.740	25	24341	43	5070	27.560																																																																																																																																					
13	41470	95	1428	120.971																																																																																																																																										

Cluster A could be subdivided to give several sub clusters. Their average and between group similarities are listed in the similarity matrix (Table 3). 85, 70, 70, 50, 30% of cluster A isolates shared in bands their molecular weight range 97-205, 62-96, 206-323, 324-406, 14-61 respectively (Table 1).

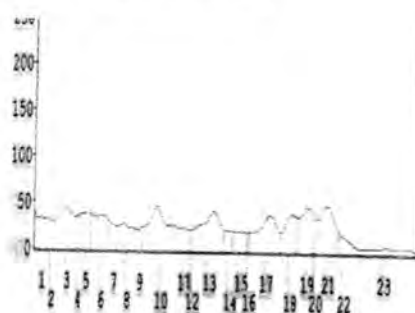
Cluster A  $S_j \geq 66.7\%$  included 2 sub cluster namely AI and AII. Sub cluster AI contained 2 groups. The first group AI1 included Pa 36, Pf/p 15, Pa 34, Pf/p 20, whereas the second group AI2 consisted of Pf/p 25 and Pa 29. Sub cluster AII was possessing one group which includes Pa 27 and Pa 22. It was found out that the highest similarities ( $S_j \geq 100\%$ ) between the isolates of cluster A were among the isolates Pf/p15, Pa14; Pf/p15, Pf/p20; Pa34, Pf/p2; Pf/p15, Pa25 and Pa27, Pa22.

The eighth isolates of sub cluster A were belonged to 4 protein profile patterns (Table 1), 100, 100, 62.5, 50% of cluster A isolates shared in bands their molecular weight range 206-323, 324-406, 62-96, 14-61 respectively, while non of these isolates shared protein bands their molecular weight range 324-406. Isolates of this clusters shows between 22-26 protein bands which differs in their molecular weight. Isolates were male and female patients' ratio 1:1 and were from different clinical sources, 37.5, 25, and 37.5% from wound swabs, blood cultures, and sputum respectively.

Table-4:Represents the schematic diagrams & the quantitative parameters of electrophoretic patterns of cluster A isolates

Sample Number  
36

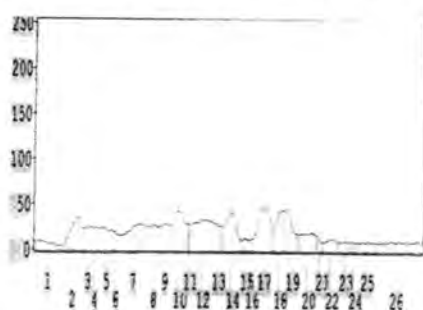
schematic diagrams of electrophoretic pattern



quantitative parameters of electrophoretic pattern

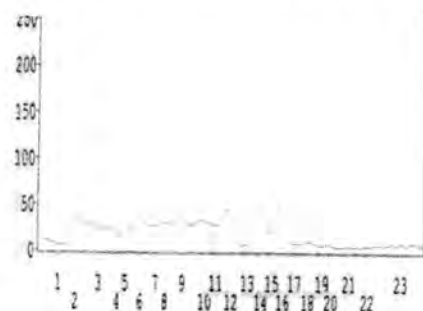
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	13649	53	1674		358.814	14	40176	97	1302		89.387
2	33426	73	1612		305.932	15	5312	38	434		79.184
3	7867	65	310		288.305	16	3112	47	248		77.255
4	14143	63	559		272.034	17	46847	97	1364		73.421
5	21814	67	930		241.196	18	26142	91	682		66.589
6	3842	61	186		247.627	19	27125	109	868		62.614
7	48817	75	2108		213.324	20	23493	59	1240		57.733
8	16592	78	620		185.816	21	4987	53	434		46.549
9	18767	75	682		166.993	22	9241	41	906		36.878
10	41315	87	1176		151.287	23	9877	35	992		29.936
11	3546	83	124		136.545	24	2352	35	248		25.559
12	49835	85	1550		120.009	25	13366	45	1364		19.948
13	13996	78	496		104.647	26	24450	53	2480		14.374

15



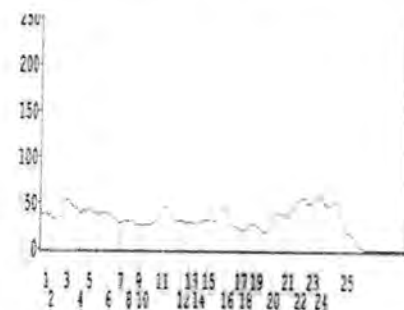
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	13649	53	1674		358.814	14	40176	97	1302		89.387
2	33426	73	1612		305.932	15	5312	38	434		79.184
3	7867	65	310		288.305	16	3112	47	248		77.255
4	14143	63	559		272.034	17	46847	97	1364		73.421
5	21814	67	930		241.196	18	26142	91	682		66.589
6	3842	61	186		247.627	19	27125	109	868		62.614
7	48817	75	2108		213.324	20	23493	59	1240		57.733
8	16592	78	620		185.816	21	4987	53	434		46.549
9	18767	75	682		166.993	22	9241	41	906		36.878
10	41315	87	1176		151.287	23	9877	35	992		29.936
11	3546	83	124		136.545	24	2352	35	248		25.559
12	49835	85	1550		120.009	25	13366	45	1364		19.948
13	13996	78	496		104.647	26	24450	53	2480		14.374

34



Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	12214	75	1018		342.549	13	2712	32	372		79.184
2	42974	83	1216		309.844	14	44821	101	1302		74.180
3	51717	78	1802		287.787	15	1420	67	42		70.152
4	12884	41	620		283.051	16	50186	99	1364		67.404
5	9743	51	372		232.712	17	1142	32	174		65.676
6	45213	78	1560		214.711	18	15144	41	1570		51.107
7	37786	88	496		191.271	19	2021	31	310		44.924
8	32545	89	744		170.968	20	7170	45	852		45.543
9	35768	80	1688		153.873	21	7432	37	1368		45.545
10	41181	85	1302		121.154	22	6664	47	1176		19.136
11	3508	72	324		106.994	23	25983	41	1471		14.000
12	52458	85	1788		94.787						

20



Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	9410	89	248		360.149	14	9088	73	810		127.741
2	10944	59	310		347.966	15	74020	79	1054		112.218
3	84308	91	1922		327.427	16	58588	95	1612		85.287
4	2370	65	62		303.220	17	4132	49	166		75.184
5	51283	79	1180		169.661	18	10748	53	896		76.121
6	34647	75	1488		257.119	19	25678	58	992		72.152
7	3594	67	124		238.136	20	10784	85	1302		63.540
8	51798	67	1054		230.000	21	26469	87	682		56.194
9	5170	77	186		210.552	22	62474	109	1178		46.003
10	6594	71	248		202.259	23	22052	91	434		41.653
11	47532	83	2542		166.821	24	52012	88	930		35.843
12	13110	78	434		147.088	25	74477	107	2724		28.564
13	18146	75	620		134.128						

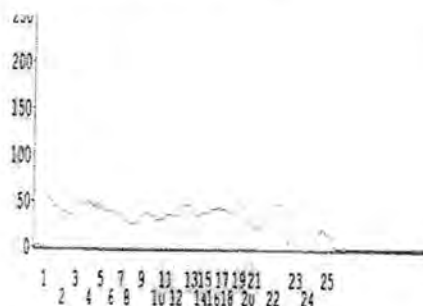


25



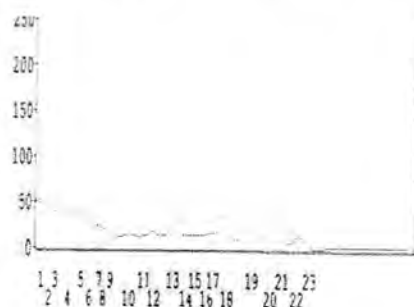
Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	1770	91	146	356.814	14	50544	97	1352	157.756
2	20552	67	652	343.895	15	4029	77	166	134.128
3	21942	67	558	326.271	16	29428	95	806	121.254
4	38926	61	856	310.000	17	21820	87	558	114.397
5	18672	77	474	297.797	18	71772	117	1674	86.606
6	19533	81	682	293.017	19	12136	61	456	79.854
7	11992	72	310	277.458	20	14189	69	558	76.408
8	23142	83	682	265.234	21	42422	97	992	73.421
9	5072	65	198	251.695	22	15934	99	434	66.579
10	4180	61	186	244.915	23	24564	105	434	66.172
11	55174	77	1922	209.169	24	25460	107	620	63.993
12	7794	67	248	194.009	25	34652	61	1178	56.194
13	47126	77	1240	179.041	26	17953	63	4340	49.270

29



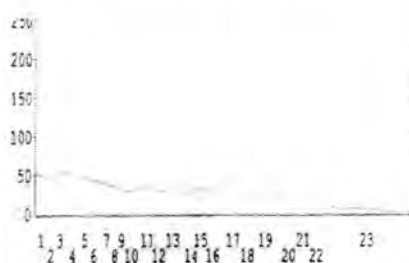
Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	26094	87	1402	494.694	14	4398	93	122	132.981
2	42721	75	1037	390.000	15	7063	87	183	129.645
3	33178	87	732	355.714	16	40736	85	976	119.889
4	53188	95	1088	326.327	17	2618	83	61	108.466
5	14622	85	366	313.265	18	30118	87	732	102.058
6	36826	83	915	296.939	19	33742	101	732	91.156
7	13213	75	366	274.292	20	15025	87	427	86.253
8	4961	79	305	262.853	21	7362	77	305	80.988
9	48785	89	1525	224.772	22	13815	101	3196	74.901
10	17866	79	549	210.889	23	31075	91	732	68.545
11	12155	75	366	185.491	24	43738	103	976	65.748
12	36509	87	1037	158.704	25	20607	41	1586	56.293
13	46834	103	1099	147.174					

27



Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	29660	81	558	362.881	13	32460	85	1489	155.170
2	23128	79	456	350.678	14	3880	49	248	137.759
3	12106	83	248	335.763	15	13244	47	868	120.009
4	45036	79	1484	376.740	16	9639	57	558	109.994
5	8184	43	248	295.063	17	6402	57	372	102.837
6	31414	91	868	288.305	18	26597	79	1489	90.165
7	8510	83	172	273.390	19	44323	83	1640	76.602
8	7076	47	724	263.892	20	14548	85	620	69.194
9	12884	83	144	328.475	21	71894	97	942	64.492
10	22474	55	1402	224.436	22	10778	33	992	58.100
11	4370	47	310	195.574	23	3301	31	620	51.491
12	17490	85	1024	355.618					

22



Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	13962	83	143	322.727	13	81924	97	1796	144.154
2	27094	83	496	337.436	14	17808	71	670	124.016
3	71541	41	892	321.438	15	19000	71	620	115.491
4	67649	87	1116	301.273	16	27250	73	868	99.056
5	17146	75	712	282.343	17	84968	91	1674	84.533
6	50448	86	744	278.451	18	5706	61	248	75.517
7	31774	95	604	251.818	19	73422	88	2046	73.110
8	4939	—	249	243.742	20	35740	95	892	62.270
9	18120	77	434	231.450	21	48379	102	992	60.888
10	21694	85	764	267.149	22	15294	45	620	48.445
11	47124	77	1040	185.596	23	46549	69	6149	45.176
12	1458	57	62	173.250					

Cluster B could be subdivided to give several sub clusters. Their average and between group similarities are listed in the similarity matrix (Table2).

Cluster B  $S_j \geq 66.7\%$  include 2 sub clusters namely BI and BII. Only one isolate (Pf/p 32) was found in the sub cluster BI, sub cluster BII contained 3 groups. The first group BI1 included one isolate Pf/p33; the second group BII2 included Pf/p 26 isolate, whereas the third group BII3 consisted of Pa24, Pa31, Pa18, Pf/p21, Pa30, Pa38, Pa35 isolates. It was found out that the highest similarities ( $S_j \geq 100\%$ ) between the



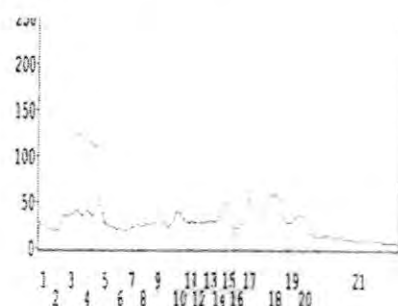
isolates of cluster B were among the isolates Pa31, Pa18; Pa31, Pf/p21; Pa18, Pf/p21; Pa30, Pa38; Pa30, Pa35 and Pa38, Pa35.

The tenth isolates of sub cluster B were belonged to 6 protein profile patterns (Table 1), 90, 90, 80, 50% of the isolates shared in bands their molecular weight range 57-205, 324-406, 62-96, 206-323 respectively while none of the isolates shared protein bands their molecular weight range 14-61%. Isolates of this cluster shows between 21 to 25 protein bands which differs in their molecular weight, isolates were from male and female patients ratio 0.1: 0.4 and were from different clinical sources, 50, 30, 10, 10% from wound swabs, blood culture, sputum and ear swabs respectively. Table (5) represents the schematic diagrams & the quantitative parameters of electrophoretic patterns of cluster B isolates.

Table-5: Schematic diagrams & the quantitative parameters of electrophoretic patterns of cluster B isolates

Sample  
Number  
32

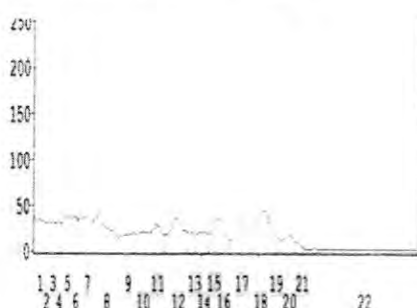
schematic diagrams of electrophoretic  
pattern



quantitative parameters of electrophoretic  
pattern

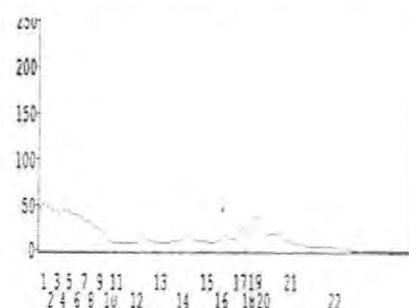
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	17123	125	743		355.000	12	25658	69	866		110.393
2	17249	67	806		330.364	13	18696	65	620		101.756
3	48638	77	1364		304.142	14	14790	75	434		92.561
4	26523	75	682		283.818	15	37156	99	930		85.272
5	57429	99	1674		266.364	16	2906	43	124		81.034
6	6584	63	705		371.455	17	56646	89	1488		77.120
7	27195	69	1178		305.635	18	80336	99	1954		67.000
8	7490	65	310		382.141	19	5394	51	186		59.905
9	48458	75	1674		144.009	20	48086	65	1674		52.237
10	19456	93	1178		140.819	21	59273	27	5527		39.785
11	9552	69	310		124.016						

33



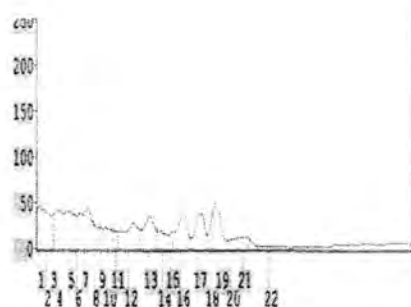
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	15514	71	434		365.149	12	41644	83	1550		147.543
2	12160	59	372		362.034	13	31106	55	558		134.128
3	15182	51	370		338.475	14	15544	55	744		117.741
4	11954	57	372		330.339	15	12370	49	495		101.850
5	20922	65	558		315.424	16	25570	79	666		94.397
6	16332	73	434		301.864	17	37780	83	1425		78.658
7	27912	67	1704		286.949	18	37768	91	1116		73.105
8	45912	81	1411		249.322	19	18370	67	906		70.772
9	20951	59	1126		238.874	20	14408	35	930		60.716
10	14444	55	482		196.128	21	5112	25	682		57.223
11	28014	67	1176		180.332	22	21413	17	7873		47.639

26



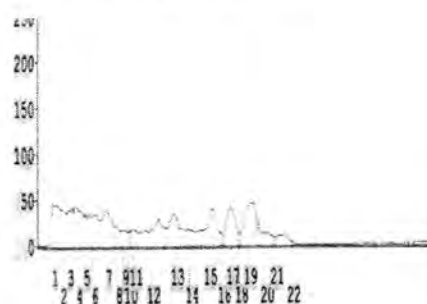
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	27065	85	549		358.814	12	29473	43	2745		202.259
2	14700	81	305		349.321	13	4111	25	427		180.392
3	18889	73	427		341.186	14	32639	45	2684		140.193
4	16200	69	364		328.583	15	5991	33	549		114.397
5	14324	75	364		313.559	16	18027	43	1403		90.997
6	24302	73	670		314.068	17	20035	73	1037		78.638
7	6635	45	183		299.153	18	2565	61	122		77.255
8	30769	59	670		288.305	19	24072	61	732		74.953
9	15578	53	488		277.458	20	6582	101	366		73.105
10	6939	29	671		245.254	21	40819	37	3294		63.262
11	537	15	41		249.863	22	10299	17	2785		44.368

24



Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	9295	71	143		362.081	12	35195	87	1529		223.046
2	26665	71	671		357.449	13	30467	69	1099		181.271
3	1544	75	123		341.188	14	12061	65	671		179.041
4	21339	75	671		335.763	15	5269	44	305		187.176
5	31471	89	793		319.136	16	33253	91	1220		141.414
6	2267	77	41		304.576	17	29389	91	1099		120.009
7	34036	83	894		298.305	18	12595	103	421		102.637
8	11495	69	489		287.525	19	26732	133	915		98.959
9	5976	55	244		269.322	20	6490	47	610		82.733
10	13531	69	610		257.119	21	10105	43	793		79.184
11	1949	67	505		242.203	22	8941	35	2745		75.433

31



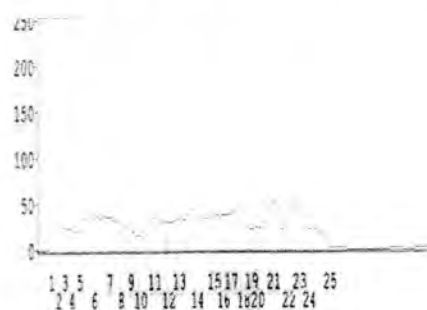
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	25400	78	806		403.061	12	34684	79	1798		205.725
2	14494	69	372		391.633	13	35309	67	1426		183.845
3	14630	73	496		373.673	14	10928	71	620		154.296
4	24700	89	620		365.510	15	42270	91	1798		120.951
5	9739	71	246		347.551	16	1672	53	124		109.647
6	25347	75	744		326.327	17	30766	103	1054		96.505
7	33769	117	1094		310.000	18	1456	45	124		91.959
8	7355	77	372		286.776	19	45817	95	1116		84.972
9	1466	71	310		274.062	20	15741	79	1116		76.847
10	3915	59	246		262.652	21	1124	23	124		76.541
11	8412	49	496		254.490	22	12135	43	2170		73.971

18



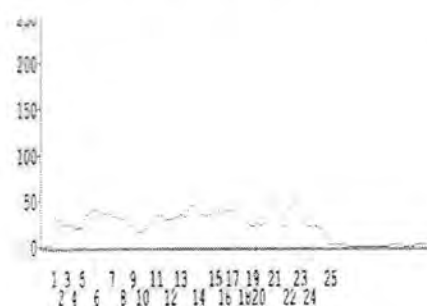
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	2644	91	44		409.061	13	20679	87	496		175.731
2	14564	67	372		393.020	14	81271	95	1054		154.296
3	1062	53	41		385.204	15	85676	69	1927		124.173
4	14966	75	434		373.673	16	93399	95	1240		104.932
5	44229	77	1178		357.785	17	8500	49	245		91.196
6	37626	45	662		323.041	18	34720	95	866		82.041
7	27519	85	434		310.000	19	15964	91	310		80.000
8	8783	101	944		290.409	20	45072	97	930		78.266
9	15443	75	434		275.714	21	6236	75	186		76.541
10	7447	75	1116		234.946	22	29772	57	992		74.961
11	47909	89	1426		214.347	23	15436	43	2120		71.278
12	4779	75	124		194.891						

21



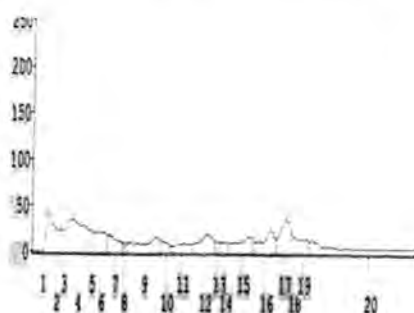
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	6931	65	489		406.727	14	50985	67	1281		141.249
2	8770	55	305		407.429	15	36660	53	976		114.979
3	11007	55	427		395.102	16	4385	45	244		109.647
4	10062	59	407		378.306	17	31491	65	793		97.445
5	14974	59	610		350.816	18	76129	87	854		82.733
6	49971	81	1281		331.324	19	2945	65	122		84.972
7	31100	81	894		308.167	20	14994	53	610		74.961
8	27412	71	549		288.776	21	86410	97	1464		77.093
9	14992	59	732		272.449	22	16627	47	417		73.216
10	5974	55	305		244.694	23	46435	95	1037		70.611
11	9121	57	2709		223.291	24	1619	53	193		66.591
12	3904	75	102		192.142	25	29974	65	2684		61.055
13	4265	79	1281		159.704						

30



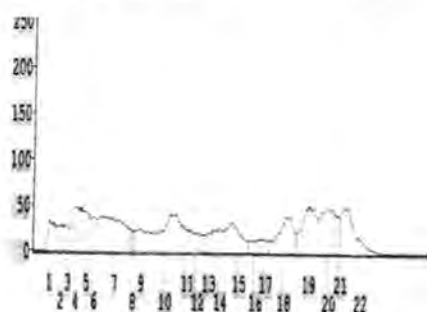
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	20940	77	1099		401.429	12	45803	101	1159		155.754
2	11720	59	489		390.204	13	32210	85	915		135.232
3	10119	73	427		360.612	14	29119	95	793		122.019
4	39981	95	976		336.122	15	60017	91	1647		102.058
5	11580	79	407		314.694	16	2472	51	122		86.253
6	27399	61	1037		314.998	17	25406	87	976		79.234
7	11270	99	305		288.100	18	39259	95	405		77.789
8	27679	89	1037		275.714	19	15974	91	489		74.961
9	10230	87	1029		234.899	20	52763	99	1405		71.837
10	8846	79	305		199.895	21	44710	57	6174		63.963
11	11231	59	671		175.732						

38



Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	24442	78	1621	401.429	11	14116	55	1535	140.878
2	4353	73	248	390.000	12	23915	67	2412	111.193
3	13544	67	558	348.776	13	3281	53	248	103.888
4	49142	77	2412	342.453	14	6222	39	558	94.321
5	5653	48	248	323.063	15	37647	59	1796	79.447
6	19458	41	810	311.613	16	24258	59	1494	75.543
7	14556	63	952	297.143	17	27257	95	930	71.837
8	1918	58	194	241.020	18	8694	51	434	68.545
9	29575	68	2342	204.011	19	13086	57	864	61.554
10	5949	43	558	182.204	20	47169	49	8418	54.291

35

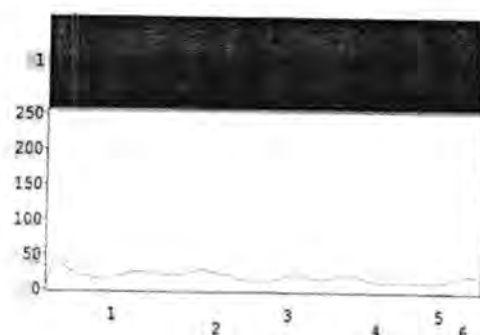


Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	17748	62	888	404.494	12	15552	71	744	140.878
2	15459	73	256	369.367	13	12688	65	620	118.933
3	8935	51	310	370.438	14	18946	65	836	105.777
4	35462	90	744	355.714	15	38548	79	1674	83.321
5	23940	89	558	344.286	16	9306	35	620	18.398
6	15623	71	434	334.163	17	6798	43	620	17.446
7	81873	80	2418	289.510	18	47589	82	1796	72.684
8	2866	40	124	249.592	19	40530	103	1550	43.960
9	20324	69	864	224.772	20	56106	101	1242	54.619
10	47627	83	1356	178.932	21	1134	43	184	44.709
11	15494	91	440	155.754	22	39174	109	2726	38.228

Table-6: The electrophoretic patterns, the schematic diagrams & the quantitative parameters of electrophoretic patterns of standard proteins

Electrophoretic patterns and schematic diagrams

Quantitative parameters of electrophoretic patterns



Number	Volume	Height	Area	M.W.	Number	Volume	Height	Area	M.W.
1	171197	61	9332	230.000	4	80000	77	4392	67.000
2	93390	73	4148	160.000	5	67633	67	3782	20.000
3	56181	77	2867	80.000	6	39582	61	3477	14.000

In the present study with the whole cell protein profile Pa and Pf/p grouped together in cluster A and B, it was noticed that the higher similarities (ex:  $S_j \geq 100\%$ ) were between isolate that belonged to the same or different species of the genus *Pseudomonas* under study which indicate the close relationship among these isolates. Considering the close relationship among *Pseudomonas* spp.; many authors have suggested the reclassification of the *Pseudomonas* genus (19, 20, 21).

In this concern, Sorensen *et al.* (22) hand found out that a small number of protein fragment bands appearing in SDS-PAGE analysis of whole cell lysates of environmental isolates of fluorescent *Pseudomonas*

seems adequate for the rapid identification at the species level of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*, on the other hand another hand Essam (23) noted that the SDS-PAGE of extracellular products of *Pseudomonas flourescens* isolated from fresh water fishes revealed the presence of one common band of about 35 KDa in all isolates. Khan (24) studied 42 isolates of Pa and indicated the presence of 45 protein bands of different molecular weight. A previous study carried by Tryfinopoulou *et al.* (25) reported that both the phenotypic characterization and SDS-PAGE grouped their 115 isolates of *Pseudomonas* from the Mediterranean Sea in five clusters. Essa *et al.* (26) collected "*Oreochromis niloticus*" from Qaroun and El-Rayan Lakes in Egypt and they examined the presence of *Pseudomonas* species, their work indicated that the pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* and *P. anguilliseptica* had 9-11 protein bands ranged from 23.4 to 100.05 KDa in molecular weight, while non pathogenic isolates of *Pseudomonas fluorescens* biovars I, II and III showed 7-9 protein bands and of molecular weight ranged from 22 to 87 KDa. El-Hady and Samy (27) reported that typing of *Pseudomonas* species by protein profile analysis by SDS-PAGE revealed that one isolate from *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. anguilliseptica* species shared in one band that was present at 14-14.8 KDa. Shams- Eldin *et al.* (28) found out that the outer protein profile of fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates showed an additional band with an approximate molecular weight 50-54 KDa.

In conclusion, Pa & Pf/p isolates in this study were closely related, the SDS-PAGE patterns of their cellular proteins provides a useful approach towards clarifying relationship within these isolates, and it is important to monitor the presence of Pa and Pf/p isolates due to their potential medical significance and in order to make conclusions about their role in the human health, one must acquire further information regarding these isolates, using the phenotypic and molecular method such as SDS-PAGE of WCPP discussed in this investigation.

## REFERENCES

1. Bodey, G. P. Bolivar, R.; Fainstein, V. and Jadeja, L. Infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* "Review of infections Diseases". 5(2): 279-313(2008).
2. Ryan, K. L.; Ray, C.G. (editors) Sherris Medical Microbiology (4<sup>th</sup> ed.) McGraw Hill. (2004)
3. Chikwendu, C.I., Amadi, E.S. and Obi, R.K. Prevalence and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella*



- pneumoniae* isolates from non-clinical urine samples. New York Science Journal: 3(11): 194-200 (2011).
4. Bolaji, A.S.; Akanda, I.O.; Iromini, F.A.; Adewoye, S.O. and Opasola, O.A. Antibiotic resistance pattern of bacteria spp. isolated from hospital waste in Ede South West Nigeria, Nigeria, and European journal of Experimental Biology. 1(4): 66-71. (2011).
5. Ullah, A.; Durrani, R.; Ali. G.; Ahmed, S. Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring contaminated with domestic sewage. Journal of Biological and Food Science Research. 1(2): 19-22. (2012).
6. Igbinos, O.; Odjadjare, E.E.; Igbinos, I.H.; Orhue, P.O.; Omoigberale, N.O. and Amhanre, N.I., Antibiotic synergy interaction against multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Abattoir effluent environment. The Scientific World Journal volume 2012. Article ID 308034, 5 pages doi: 10.1100/2012/308034. (2012).
7. Said, L.A.H.; Muhammad, M.K. and Hsooni; A. Numerical classification by cluster analysis of non-fermenter bacteria isolated from clinical specimens in Baghdad-accepted for publication. Journal of Babylon University. 21(10). (2013).
8. Salvi, H.; Karadenizli, A.; Kolayli, F.; Gundes, S.; Ozbek, U. and Vahaboglu, H. Expression stability of six house keeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. Journal of Medical Microbiology, 52, 403-408. (2003).
9. Parneel, M.; Heyrman, J.; Adioba, A.; De Maeyer, K.; Raaijmakers, J.M.; De Vos, P. and Hofte, M. Characterization of CMRFc and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. J. Appl. Microbiol ISSN 1364-5072. (2007).
10. Durrani, R.; Abubakar, M.; Arshed, M.; Saleha, S.; Ullah, I and ALi, Q. Biological characterization and protein profile of two model bacteria by SDS-PAGE and FT-IR. ARPN. Journal of Agricultural and Biological Science. 3(5 & 6) 6-16. (2008).
11. Movahedyan, H.; Khorsandi, H.; Salehi, R and Nikaeen, M. Detection of phenol degrading bacteria and *Pseudomonas putida* in activated sludge by polymerase chain reaction. Iran.J.Environ. Health. Sci. Eng. 6 (2): 115-120. (2009).
12. Marinho, P.R.; Moreira, A.P.B.; Pellegrino, F.; Muricy, G.; Bastos, M.; Dos Santos, K. de Marval, M. and Laport, M. Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial substances antibiotic resistant bacteria. Men. Inst. Oswaldo. Cruz. 104 (5): 678-682. (2009).

13. Cattoir, V.; Gilibert, A.; Le Glaunec, J.; Launay, N. Bait-mérabet, L. and Legrand, P. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* from positive blood cultures by quantitative PCR. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial* 9: 21-26. (2010).
14. McCulloch, E.; Lucas, C.; Ramage, G. and Williams, C. Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real time PCR prevent chronic colonization in pediatric cystic fibrosis population. *Journal of Cystic Fibrosis* 10(1): 21-24. (2011).
15. Ugur, A.; Ceylan, O. and Aslim, B. Characterization of *Pseudomonas* spp. From seawater of the southwest coast of Turkey. *J. Biol. Environ. Sci*: 6(16) 15-23. (2012).
16. Pot, B.; Vandamme, P.; Kersters, K. Analysis of the electrophoretic whole. Organism protein fingerprints. In: M. Goodfellow: A.G.O. Donnell, ed.; *Chemical Methods in prokaryotic systematic*. Chichester, UK: Wiley. (1994)
17. Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. (1970).
18. Photo Capt Molecular Weight Software, 2001 Version 10.01 copyright (1999-2001).
19. Anzzai, Y.; Kudo, Y. and Oyaizu The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas* and *Pseudomonas* supports synonymy of those three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 249-251. (1997).
20. Yamamoto, S.; Kasai, H.; Arnold, D.L.; Jackson, R.W.; Vivian, A. and Harayamas, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyr B and rpo D genes. *Microbiology*. 146: 2385-2394. (2000).
21. Alatossava, P.M. and Alatossava, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated with psychotropic bacteria. *Microbiological Research*. 161 (4): 334-346. (2006).
22. Sorensen, j.; skouv, J.; Jorgensen, A and Nybroe, O. Rapid identification of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *P.fluorescens* and *P.putida* by SDS-PAGE analysis of whole cell protein patterns. *FEMS. Microbiology Ecology*, 101(1): 41-50. (1992).
23. Essam, S.A. Immunological studies on *Aeromonas* and *Pseudomonas* bacterial infections in freshwater fishes. Ph.D. thesis, faculty of Veterinary Medicine, Cairo University. (1994).
24. Khan, F.G.; A preliminary study of fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* of whole cell protein analysis by SDS-PAGE. *Indian Journal of Medical Research*. 104: 342-348. (1996).
25. Tryfinopoulou, P.; Tsakalidou, E and Nychas, G.J.E. Characterization of *Pseudomonas* associated with spoilage of gilt-

- head sea bream stored under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. 68 (1) 65-72. (2002).
26. Eissa, N.M.E.; Abou El-Ghiet, E.N.; Shaheen A.A. and Abbad, A. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from Tilapia "*Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi El-Rayan Lakes, Egypt. Global Veterinaria. 5(2): 116-121. (2010).
  27. EL-Hady, M.A. and Samy, A.A. Molecular typing of *Pseudomonas* species isolated from some cultured fishes in Egypt. Global Veterinaria. 7(6): 576-580. (2011).
  28. Shams- Eldin, E.; Abdalla, S.; Shawki, A.E.M. and Galal- Eldin, A. Comparison between outer membrane protein profile of fluoroquinolones sensitive and resistant *P.aeruginosa* isolated from Egyptian patients. Journal of American Science. 7(1): 100-104. (2011).

## Synthesis and Characterization of Some Heterocyclic Compounds Based on 2,5 – Disubstitued – 1,3,4 – Oxadiazole

Iman Mahdy Mohammed Hasan

Department of Chemistry College of Science For Women University

Received 15/2/2012 – Accepted 2/6/2012

### الخلاصة

الهدف من البحث تحضير عدد من المركبات الحلقية غير المتجانسة ابتداءً من المركب بس (-4,4') 5,2 - ثنائي امينوفينيل - 4,3,1 - او كساديازول من خلال تكثيفه اولاً مع بعض الألديهيدات والكيوتونات الاروماتية للحصول على قواعد شيف [7-2] ثم نحضر مركبات غير متجانسة سباعية الحلقة الاوكسازفين [13-8] من خلال تفاعل قواعد شيف [7-2] مع انهدريد الفثاليك، كما حضرت مركبات التترازول [14-19] غير المتجانسة الحلقة من خلال تفاعل قواعد شيف [7-2] مع ازيد الصوديوم. شخّصت هذه المركبات باستخدام تقنيات FTIR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  والتحليل الدقيق للعناصر (C.H.N) لبعض منها اضافة الى تعيين الخواص الفيزيائية ودراسة الفعالية البيولوجية ضد ثلاثة انواع من البكتريا. وجميعها اجريت في المركز الاستشاري للدراسات في الجامعة الاردنية.

### ABSTRACT

The aim of the present study is to determine the useful of Schiff bases derivatives containing (oxazepine, tetrazole) compounds excepted biological activity which used as drug and antimicrobial, the present work involved starting from [Bis (2,5(4,4'-diaminophenyl) – 1,3,4 – oxadiazole]. A variety of Schiff bases and heterocyclic (oxazepine, tetrazole) have been synthesized, and supported by physical properties and FTIR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , elemental analysis, Microbial study against two type of bacteria (staphylococcus aurea and klebsiella pneumonia) and (Canadida albncans) fungi.

### INTRODUCTION

The development of simple Synthesis route to widely used organic compounds ring using readily available reagent is one of the main objective of organic synthesis, Nitrogen heterocyclic are of special interest because they constitute an important class of natural and non natural products which exhibit useful biological activities. One-pot efficient synthesis of heterocyclic derivatives, permit the development of novel therapies for the treatment of epilepsy, pain and other neurodegen disorder [1].

Some Schiff bases bearing aryl group[2], or heterocyclic residues posses excellent biological activities[3]. and attracted many researcher's attention in recent year. They have been reported to used as analgesic, anthelmintic, antitubercuier, plant growth regular, antiviral, antifungal and anticancer. Derivatives like the other members (oxazepine, tetrazole)[4,5] and all the (1,3,4 – oxadiazole) series have been widely applied as therapeutic agent due to their anticonvulsant, vasorelaxant and anti-inflammatory properties[5].



The occurrence of (1,3,4 – oxadiazole) nucleus in many natural and synthesis biological active compounds contributed to the development of new synthesis methodologies[6].

Various heterocyclic Schiff bases derivatives as well as known to posses an array of physiological activities, such anticancer, muscle relexant, hypnotic, anti-inflammatory[7], diuretic and anti hypertertensive . According to the mentioned facts it was thought worth while to synthesize new compounds via introductioning the two biologically active moieties (oxazepine, tetrazole) or other heterocyclic in frame work followed by their antimicrobial screening.

## MATERIALS AND METHODS

### **General:**

Melting point were determined on Gallenkamp (melting point) apparatus and were uncorrected, IR spectra were designated by (SHIMADZU) / FTIR 8300 spectrometer as KBr. disc, result were given in ( $\text{cm}^{-1}$ ) ,  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded at 200.13 and 50.32  $\text{MHz}$  respectively in ( $\text{DMSO-d}_6$ ) which were reported in part per million (ppm) down field from internal tetramethylsilane (TMS) (chemical shift in  $\delta$  values). Elemental analysis were run using a perkin – Elmer RE2400 (C.H.N) analyzer,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR. All analysis were performed in center of consulatation university of Jordan.

### **Material**

All the chemical used were supplied by (Merk, Fluka and BDH) chemical, the solvent purified by distillation and dried with calcium chlorid.

### **Synthesis Bis (2,5-(4,4'-diaminophenyl)- 1,3,4- oxadiazole[1] <sup>(8)</sup>:**

A mixture of (0.02 mol) (4-amino benzoic acid) with (0.01 mol) hydrazine hydrate and (5 ml) poly phosphorus acid, refluxing gently at ( $100\text{-}125^\circ\text{C}$ ) until the solution turned dark brown. The cold reaction mixture was neutralized with Sodium bicarbonate and the resulting solid was filtered, dried and recrystallized from (ethanol) to give the desired oxadiazole derivative.

### **Synthesis of Schiff bases [2-7] <sup>(9)</sup>:**

A series of Schiff bases were prepared from reaction (0.01 mol) compound [1] with (0.02 mol) of different aromatic aldehyde and ketones in (15 ml) abs. ethanol and (1-2) drops glycial acetic acid. The resulting mixture was refluxed for 4h, the mixture was cooled, precipitate was obtained, then recrystallized from suitable solvent.

**Synthesis of oxazepine compounds [8-13] <sup>(10)</sup>:**

A mixture of Schiff bases [2-7] (0.01 mol) with (0.02 mol) phthalic anhydride was heated under reflux for 5h, in oil bath (60-65) °C with (15 ml) dry benzene, the solid product precipitate then separated upon cooling was filtered off and recrystallized from suitable solvent.

**Synthesis of tetrazole compounds [14-19] <sup>(11,12)</sup>:**

Oxazepin compounds [8-13] (0.01 mol) with (0.02 mol) Sodium azide, the mixture heated under reflux in oil bath at (50-60) °C with (15 ml) THF). The end of reaction checking by (TLC.), the solid product formed was filtered and recrystallized from suitable solvent.

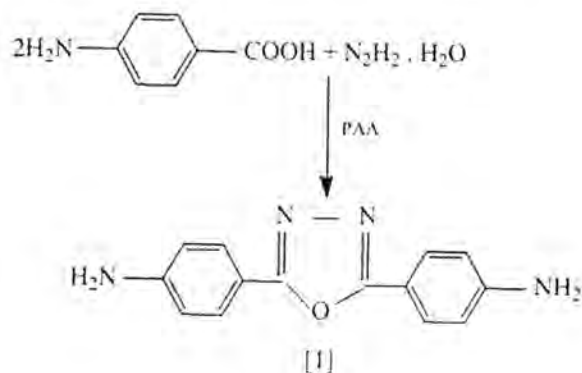
**Microbiological tests <sup>(13)</sup>:**

Nutrient agar was added to (1L) of distilled water in suitable conical flask with stirring and heating until complete dissolving then the flask was stoppered by cotton and the medium sterilized in an autoclave for (20 min) at (121) °C under pressure of (15 bound/inch). The medium was placed in petridishes about (20 ml) for each one and was left to cool and solidified. The studied bacteria and fungi were placed on the nutrient agar surface using the loop and by streaking processor then the discs saturated tested compound solutions. The samples were incubated for 24h at 37 °C.

All these synthesis steps were summarized in schemes (1-4), Physical properties, FTIR, Microbial study, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, Elemental analysis (C.H.N), , are listed in table (1-5) respectively.

**RESULTS AND DISCUSSION**

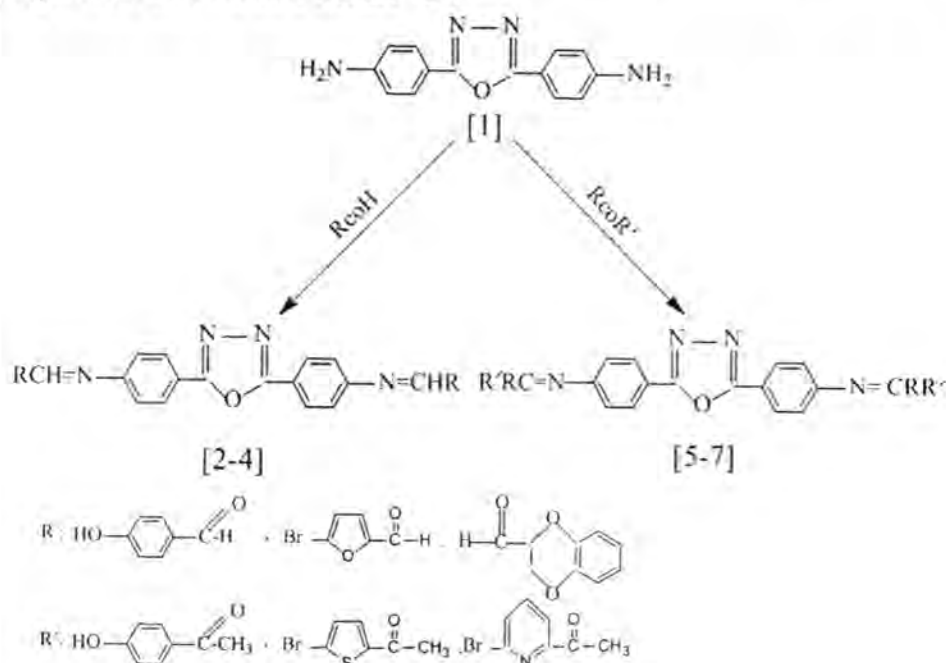
Considerable interest have been expressed in synthesis of Schiff bases in recent year due to their industrial and biological importance, starting from bis [2,5 – (4,4'- diaminophenyl) – 1,3,4 – oxadiazole] [1]:



Scheme -1-

The FTIR Spectrum showed the strong stretching vibration ( $3420-3375$ )  $\text{cm}^{-1}$  due to ( $\text{NH}_2$ ), ( $1200-1040$ )  $\text{cm}^{-1}$  for PPA C), ( $830$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (1,4-disubst), ( $3080$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (Ar-H), ( $1420$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (C-N), ( $1593-1510$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (aromatic C=C),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : ( $7.4-7.6$ )ppm for (Ar-H), ( $8.7-9.3$ )ppm due to ( $2\text{H}$ ,  $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : the four down field resonance ( $162.3$ ,  $163.18$ ,  $164.18$ ,  $164.65$  and  $165.94$ ) ppm are of benzene ring carbons at position (2,5) carbons bonded PPA = Polyphosphoric acid ( $72.4-72.8$ ) ppm due to (C-O-C), ( $143.1-144.6$ ) ppm due to (C-N). Elemental analysis for compound [1]  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ : [C,  $66.7$  ( $67.1$ ); H,  $4.76$  ( $5.45$ ); N,  $22.22$  ( $23.10$ )].

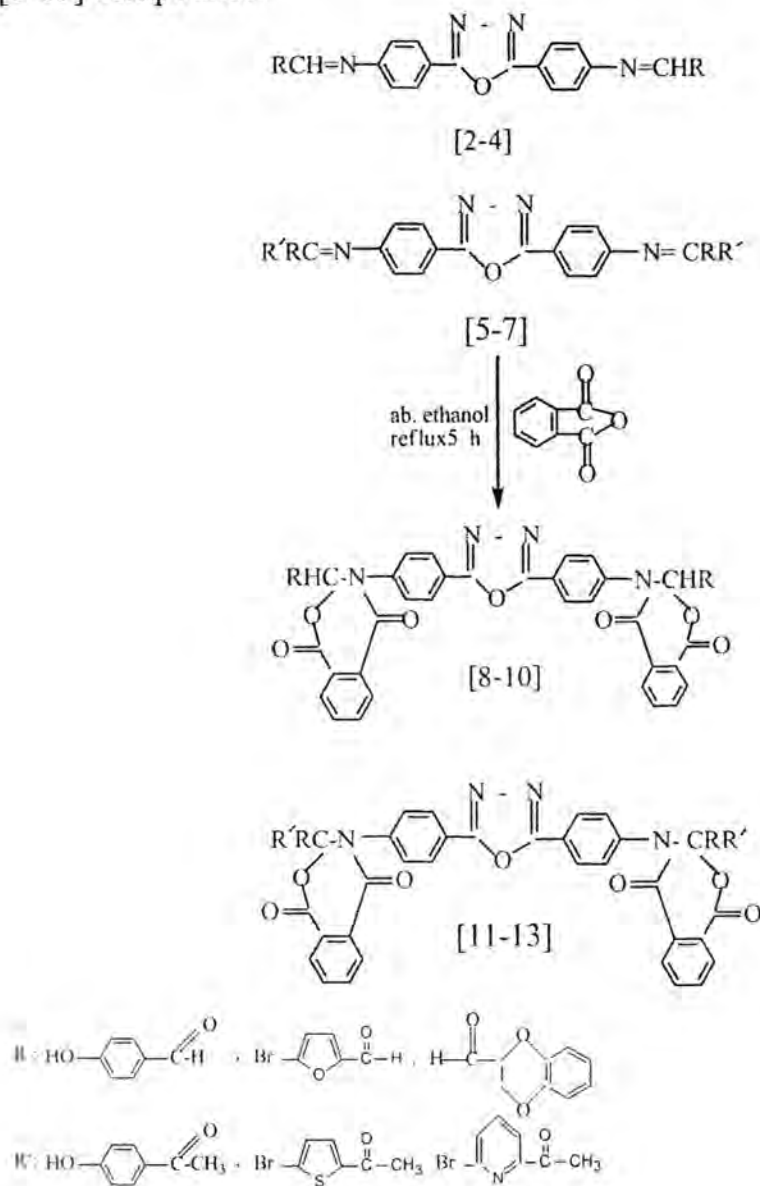
Schiff bases [2-7] prepared through condensation of the corresponding compound [1] with (aromatic aldehydes and ketons). The reaction proceeds by the nucleophilic attached of the nucleophilic nitrogen atom of the amine on the carbonyl group of aldehyde or keton with the loss of water molecule to give a stable compounds in good yield, which shown in Scheme -2-,



Scheme -2-

The FTIR spectrum showed the strong bands at ( $1602-1604$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (C=N) combined with disappearance of ( $\text{NH}_2$ ) bands, ( $2900-2845$ )  $\text{cm}^{-1}$  due to ( $\text{CH}_3$ ), ( $670$ )  $\text{cm}^{-1}$  for (Br) ; for compounds (2,5),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : ( $7.1-7.9$ ) ppm due to (Ar-H), ( $2.10-2.25$ ) ppm for ( $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ), ( $10.1-10.6$ ) ppm for (H, OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : ( $148.2-152.6$ ) ppm due to (C=N), ( $130.2-132.4$ ) (aromatic carbons), ( $115.3-116.1$ ) ppm for (C,  $\text{CH}_3$ ). Elemental analysis compound [2]  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$

[C, 73.04 (74.02); H, 4.35 (5.32); N, 12.17 (13.15)] and for compound [5]  $C_{30}H_{24}N_4O_3$ : [C, 73.77 (74.80); H, 4.92 (5.92); N, 11.48 (12.46)]. Compounds [2-7] reacts with phthalic anhydride afforded (oxazepine) [8-13] compounds:

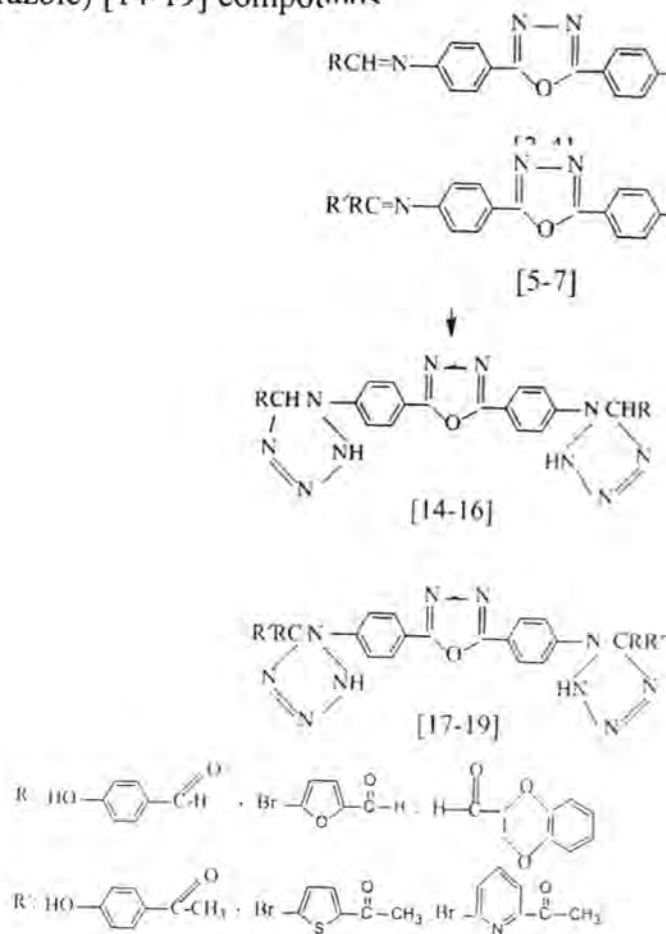


Scheme -3-

The FTIR spectrum (oxazepine) derivatives displayed the strong bands at  $(1755-1740) \text{ cm}^{-1}$  for  $(C=O)$  combined with disappearance for  $(C=N)$  bands,  $(1225-1200) \text{ cm}^{-1}$  for  $(C-O-C)$ ,  $(1280-1300) \text{ cm}^{-1}$  for  $(C=C)$ , for compounds (8,11);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : (7.5-8.1) due to (Ar-H), (10.6-11.1) ppm due to (H,OH), (2-2.1) ppm for (3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : (160-164) ppm due to  $(C=O)$ , (148.2-151.1) ppm due to (aromatic carbons), (72.1-72.4) ppm for  $(C-O-C)$ , (26.3-26.4) ppm due to (C,  $\text{CH}_3$ ). Elemental analysis for compound [8]



$C_{44}H_{28}N_4O_9$  [C, 78.11 (79.10); H, 4.14 (5.10); N, 8.28 (9.25)], compound [11]  $C_{46}H_{32}N_4O_9$  [C, 70.05 (71.03); H, 4.06 (5.04); N, 7.11 (8.10)]. Compounds [8-13] similarly reacts with Sodium azide afforded (tetrazole) [14-19] compounds



Scheme -4-

The FTIR [14-19] (tetrazole) derivatives displayed strong bands (1450-1525)  $cm^{-1}$  (N=N) combined with disappearance (C=O), (3230)  $cm^{-1}$  for (NH), (1260-1280)  $cm^{-1}$  for (C-N);  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : (7.6-8.8)ppm due to (Ar-H), (9.4-9.7) ppm due to (H-OH),  $\delta$ : (1.9-2) for (3H, CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : (9.1-9.2) ppm due to (H, NH), (151-156) ppm due to (aromatic carbons) (120-121) ppm due to (N=N). Elemental analysis for compound [14]  $C_{28}H_{22}N_{12}O_3$  [C, 58.54 (59.52); H, 3.83 (4.80); N, 29.27 (30.28)]; compound (17)  $C_{30}H_{22}N_{10}O_3$ : [C, 63.16 (64.10); H, 3.86 (4.86); N, 24.56 (25.50)].

### Microbial Study:

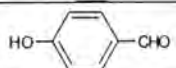
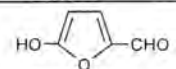
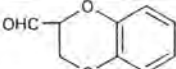


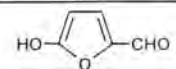
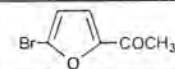
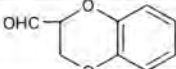
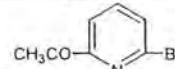

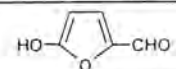
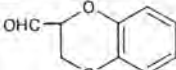
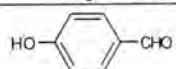
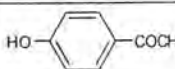

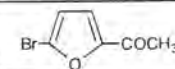
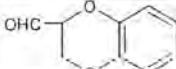
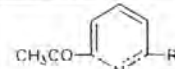
The last part in this work involved evaluated of antimicrobial activity of the prepared Schiff bases derivatives against (staphylococcus aureus  $G^+Ve$  bacteria (klebsiella pneumonia)  $G^-Ve$  bacteria and (candida albicans) fungi. Inhibition zones caused by the various

prepared compounds were determined and the results are listed in table (3).

The results showed that biological activity of the studied compounds depend on nature of substituents in their molecular, thus the compound (6,7,9,10,13,15,18,19) showed high biological activity due to the presence of (Br) and electron releasing substituents ( $\text{CH}_3$ ) and (heterocyclic ring)[13]. Results at table (3) indicated that many (oxazepine) possess moderate to high biological activity against ( $\text{G}^+\text{Ve}$ ) bacteria and this was due to the hydrophilic properties of these compounds and cell wall of ( $\text{G}^+\text{Ve}$ ) bacteria, on other hand the molecules of the prepared (tetrazole) have hydrophilic properties and this in turn made these ( $\text{G}^+\text{Ve}$ ) bacteria which posses complex (Lipo poly Soccharides) in their cell wall, Finally both (oxazepine, tetrazole) showed different biological activity against (candida albicans).


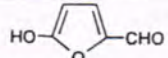
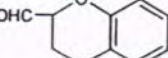
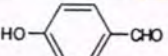

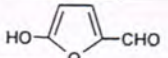
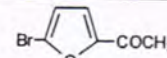
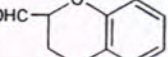
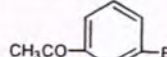
Thus mostly compounds showed highly biologically activity while other moderate or weak activity.

Table-1: Physical properties of (1-19) compounds

Comp No	Molecular formula	R	R'	M-P C°	Colour	Yield %	Purification solvent
1	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$			198-200	brown	90	Ethanol
2	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$		—	208-220	deep orang	75	Ethanol
3	$\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2\text{Br}_2$		—	135-137	coffee	65	Ethanol
4	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$		—	208-40	deep orang	60	Ethanol
5	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$			204-206	deep orang	60	Ethanol
6	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2\text{Br}_2$			164-166	coffee	75	Ethanol
7	$\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5\text{Br}_2$			150-152	coffee	55	Ethanol
8	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$		—	200-202	brown	65	Ethanol
9	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2\text{Br}_2$		—	deco	light brown	80	Ethanol
10	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_7$		—	deco	light brown	65	Ethanol
11	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_7$			Deco	light brown	70	Ethanol
12	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2\text{Br}_2$			Deco	coffee	75	Ethanol
13	$\text{C}_{44}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_7\text{Br}_2$			Deco	coffee	75	Ethanol

Synthesis and Characterization of Some Heterocyclic Compounds Based on 2,5 – Disubstituted – 1,3,4 – Oxadiazole

Iman

14	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>		—	Deco	light brown	65	Methanol
15	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> S <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>		—	Deco	light brown	60	Methanol
16	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>5</sub>		—	Deco	brown	55	Methanol
17	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>			Deco	brown	55	Methanol
18	C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>10</sub> S <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>			Deco	light brown	60	Methanol
19	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> N <sub>10</sub> Br <sub>2</sub>			Deco	light brown	65	Methanol

Dec: Decomposition

Table-2: FTIR Spectral of compound (1-19)

Comp No	V <sub>OH</sub>	V <sub>C=O</sub>	V <sub>C=C</sub>	V <sub>C-H</sub>	Others (V)	Comp No	V <sub>OH</sub>	V <sub>C=O</sub>	V <sub>C=C</sub>	V <sub>C-H</sub>	Others (V)
1	-	-	1597	-	NH <sub>2</sub> (3420) (3375)	11	3280	1230	1590 1586	2980	C=O (1712) C-O-C (1230)
2	3400 3215	1602	1581	-	Δr-H(3010)	12	-	1255	1540 1535	2980 2880	C-Br (710) C=O (1722)
3	-	1610	1565	-	C-Br (670) C-S (1200)	13	-	1235	1550	2898	C=O (1730) C-Br (740)
4	-	1612	1598	2900 2850	C-O-C (1255)	14	3300 3200	1199	1593	-	NH (3210) N=N (1435-1555)
5	3350 3150	1610	1580	2985	C-O (1190)	15	-	1183	1597	-	NH (3300), N=N C-Br (705) (1445)
6	-	1613	1550	1875	C-Br (690) C-S (1250)	16	-	1180	1560	-	NH (3305) C-O-C (1200), N=N (1425)
7	-	1620	1572	2915	C-Br (695) C-N (1140)	17	3300	1200	1545	2910	NH (3295) C-Br (705), N=N (1420)
8	3200	-	1573 1492	-	C=O (1755), C-N (1140) C-O-C (1213)	18	-	1205	1538	2886	NH (3297) C-Br (699), N=N (1430)
9	-	-	1590 1570	-	C-Br (680) C=O (1739)	19	-	1210	1545	2940	NH (3200) N=N C-Br (678), (1422)
10	-	-	1538 1530	2885 2870	C=O (1722) C-O-C (1210)	-	-	-	-	-	-

Table-3: Microbiological activities of compounds (2-19)

Comp No	Staphylococcus aureus	Klebsiella pneumonia	Candida albicans (fungi)	Zone inhibition in (mm)	Comp No	Staphylococcus aureus	Klebsiella pneumonia	Candida albicans (fungi)	Zone inhibition in (mm)
2	8	5	3	3	11	8	R	10	9
3	13	13	17	12	12	15	15	16	11
4	7	5	R	3	13	19	19	23	12
5	8	R	R	6	14	11	11	R	6
6	17	17	22	15	15	17	16	17	12
7	19	21	23	17	16	8	10	R	5
8	8	R	R	5	17	10	9	R	8
9	17	20	8	12	18	20	22	20	13
10	19	22	9	11	19	29	23	19	13

Key of symbols: R=Resistant; Inhibition zone < 6mm=inactive.

Inhibition zone (6-9)mm = Slightly active ; Inhibition zone (9-12)mm= moderately active ; Inhibition zone > highly active.

Table-4:  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectral data for some compounds

Comp No	Compound Structure	$^1\text{H}$ -NMR/ data	$^{13}\text{C}$ -NMR/ data
1		$\delta$ : 7.4-7.6 (Ar-H) $\delta$ : 8.7-9.3(2H, NH <sub>2</sub> )	$\delta$ : 162.3-164.65 (benzene ring) $\delta$ : 72.4-72.8 (C-O-C) $\delta$ : 143.1-144.6(Ar-NH <sub>2</sub> )
5		$\delta$ : 7.1-7.9(Ar-H) $\delta$ : 10.1-10.6(H,OH) $\delta$ : 2.10-2.25 (3H,CH <sub>3</sub> )	$\delta$ : 130.2-132.4 (aromatic carbons) $\delta$ : 148.2-151.6(C=N) $\delta$ : 155.3-116.1(C, CH <sub>3</sub> )
8		$\delta$ : 7.5-8.1 (Ar-H) $\delta$ : 10.6-11.1(H,OH) $\delta$ : 2-2.1(3H,CH <sub>3</sub> )	$\delta$ : 160-164 (C=O) $\delta$ : 148.1-151.1 (aromatic carbons) $\delta$ : 72.1-72.4 (C-O-C) $\delta$ : 26.3-26.4 (C, CH <sub>3</sub> )
14		$\delta$ : 7.6-8.8(Ar-H) $\delta$ : 9.4-9.7(H,OH) $\delta$ : 1.9-2 (3H,CH <sub>3</sub> )	$\delta$ : 9.1-9.2 (H,NH) $\delta$ : 151-156 (aromatic carbons) $\delta$ : 120-121 (N=N)

Table-5: Elemental analysis (C,H,N) for Some Compounds

Comp No.	(C,H,N) analysis calculated (found)			Comp No.	(C,H,N) analysis calculated (found)		
	%C	%H	%N		%C	%H	%N
1	66.7 (67.7)	4.76 (5.40)	22.22 (23.10)	8	78.11 (79.10)	4.14 (5.10)	8.28 (9.25)
2	73.04 (74.02)	4.35 (5.32)	12.17 (13.15)	11	70.05 (71.03)	4.06 (5.04)	7.11 (8.10)
5	73.77 (74.80)	4.92 (5.92)	11.48 (12.46)	14	58.54 (59.52)	3.83 (4.80)	29.27 (30.28)
				17	63.16 (64.10)	3.86 (4.86)	24.56 (25.50)



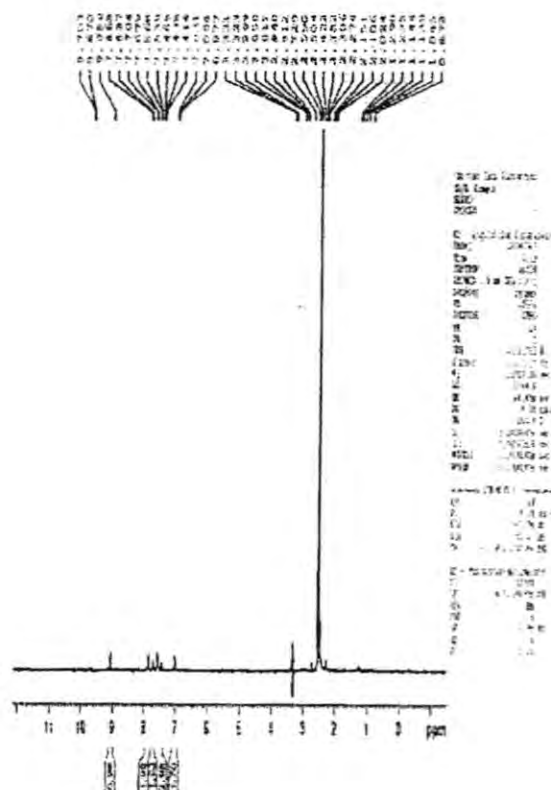


Figure-1: HNMR Spectrum of Compound (1)

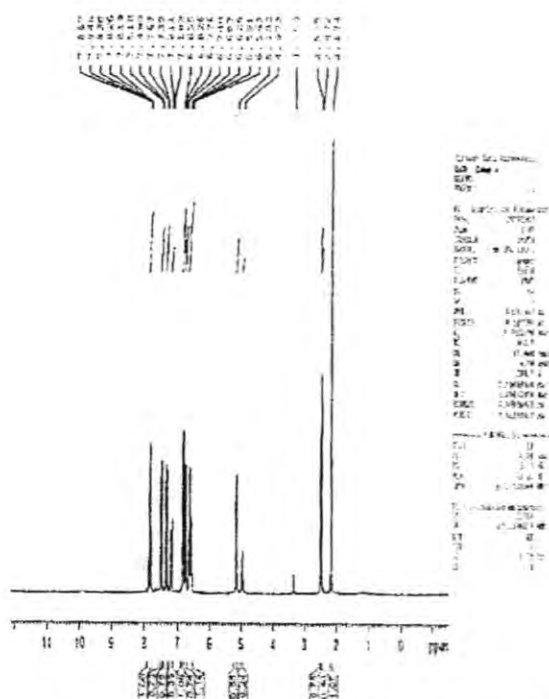


Figure- 2: HNMR Spectrum of Compound (5)

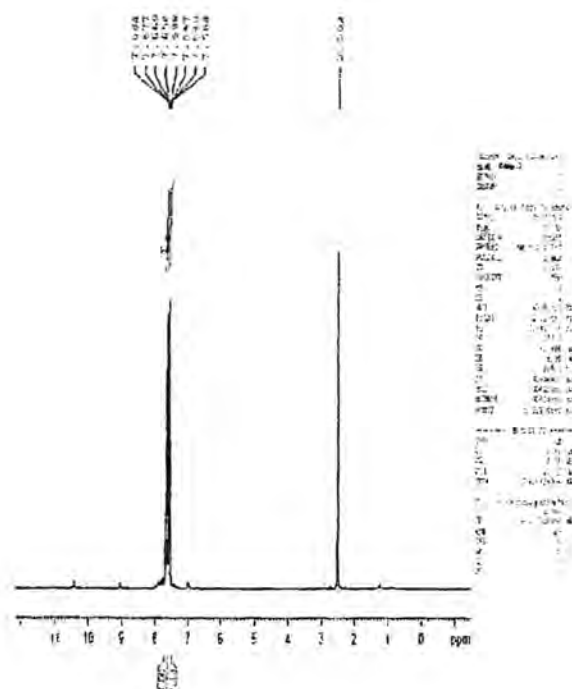


Figure-3: HNMR Spectrum of Compound (8)

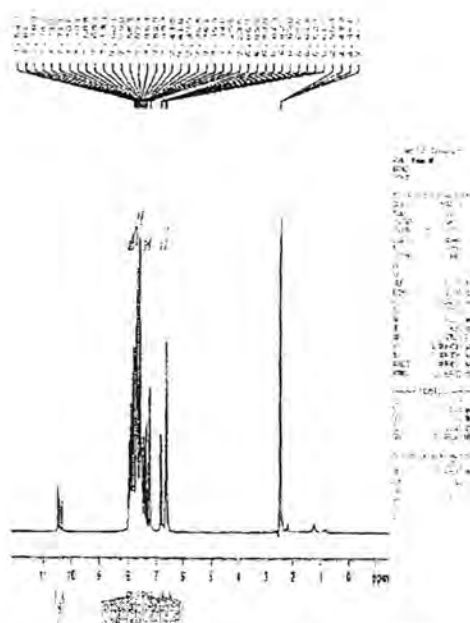


Figure-4: HNMR Spectrum of Compound (14)

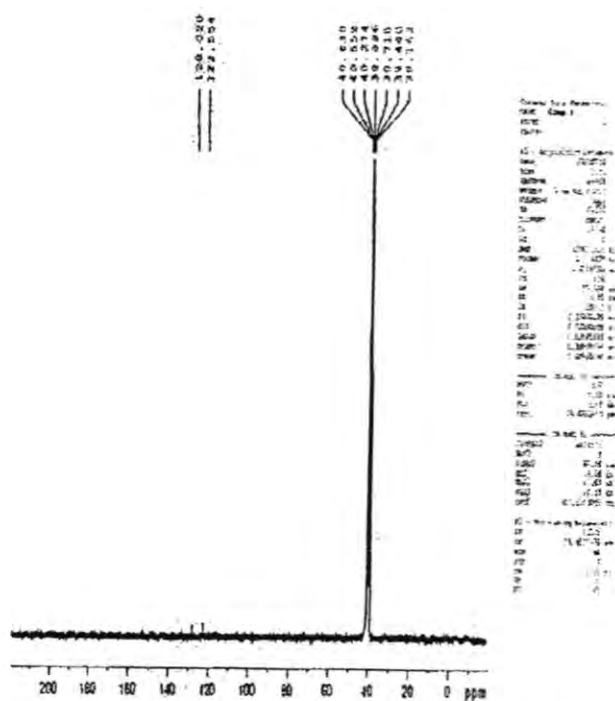


Figure-5:  $^{13}\text{C}$ NMR Spectrum of Compound (1)

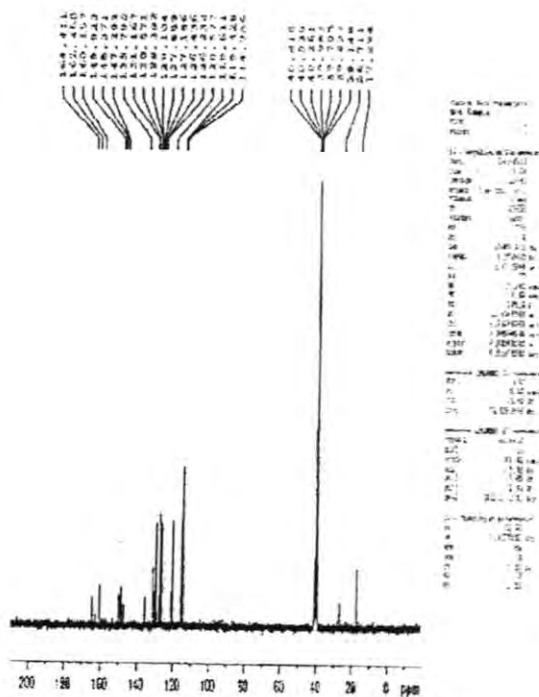
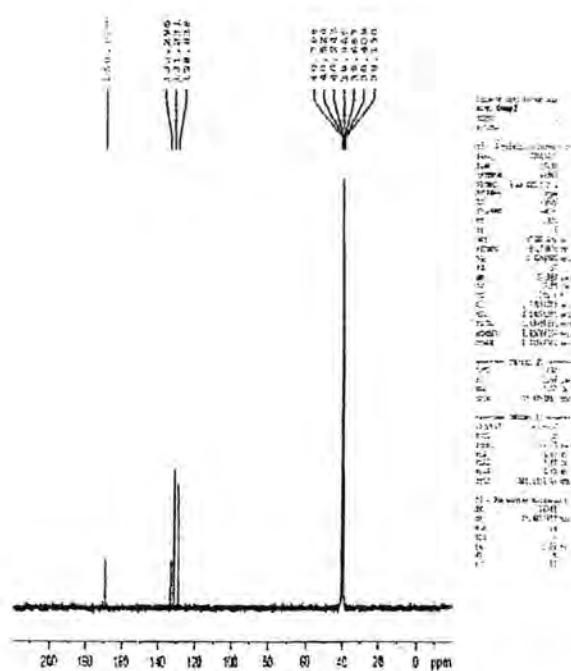
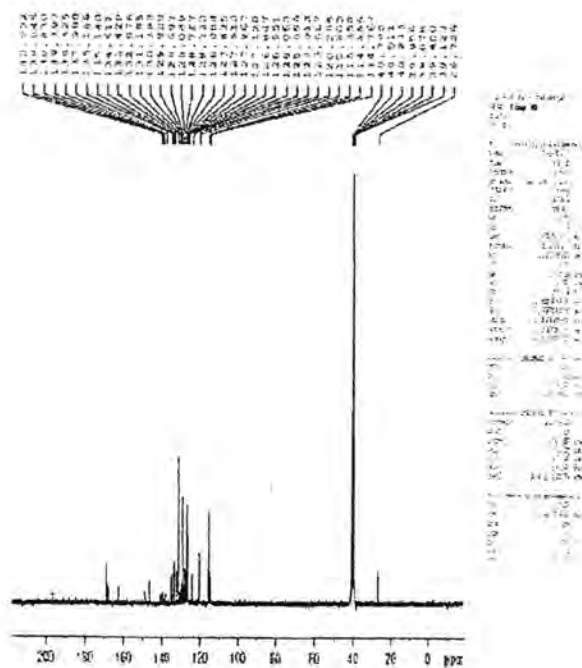


Figure- 6:  $^{13}\text{C}$ NMR Spectrum of Compound (5)

Figure-7:  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of Compound (8)Figure-8:  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of Compound (14)



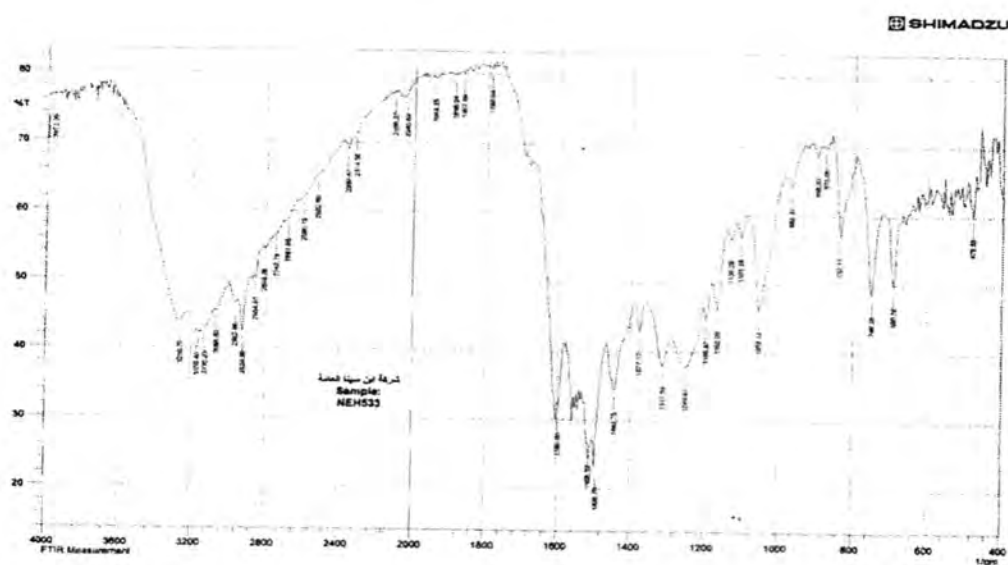


Figure-9: FIRT Spectrum of Compound (1)

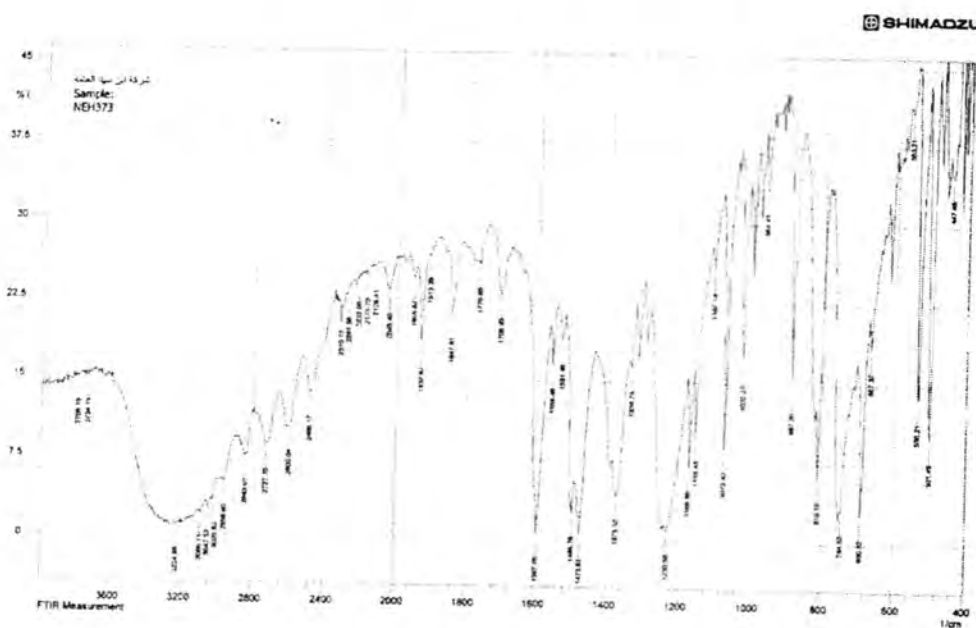


Figure-10: FIRT Spectrum of Compound (5)

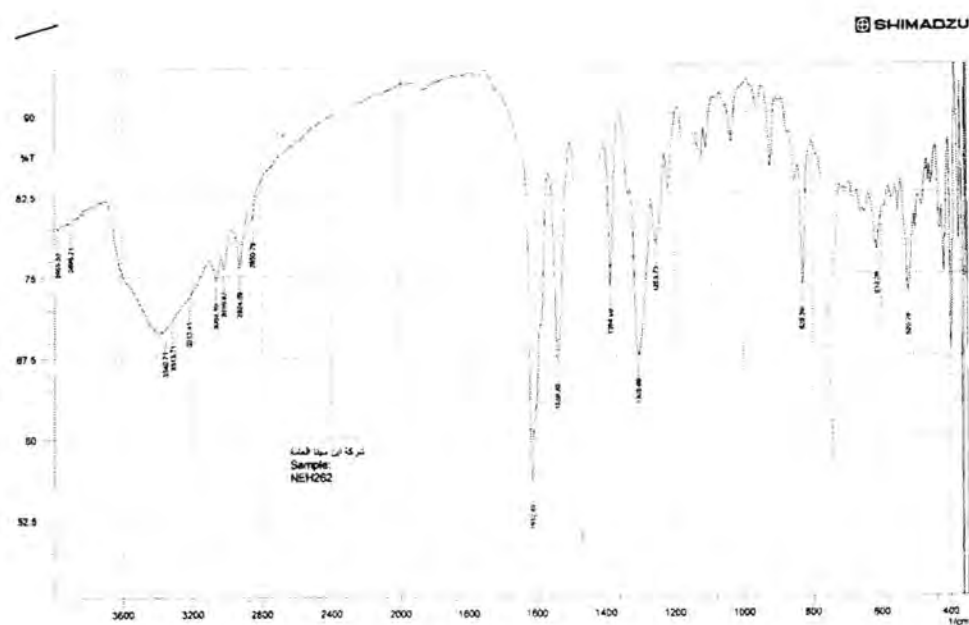


Figure-11: FIRT Spectrum of Compound (8)

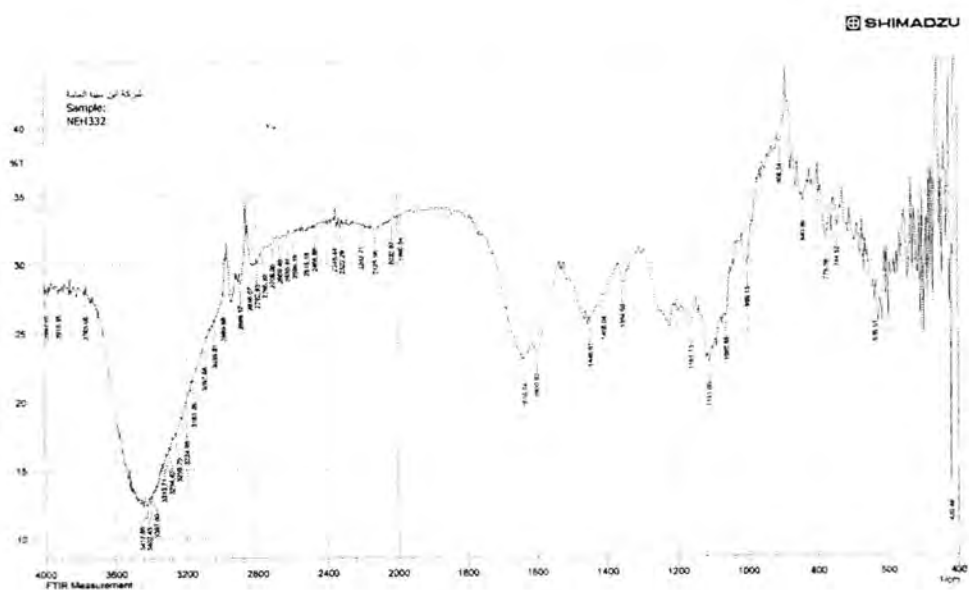


Figure-12: FIRT Spectrum of Compound (14)

## REFERENCES

1. A.R. Katritzky, A.V.Vakulenko, R.A. Gedu, A. V. Rachi and T.W. Rogers , Regiospecific Preparation of 1,,4,5-trisubstituted pyrazoles from 2-(1H-1,2,3-benzotriazol-1-yl)-3-(4-aryl)-2-propenals, *ARKIVOCi*, 8555-60. (2007)

2. Y.Dundar, B. Cakiv, E.kupeli, M. Sahin and N. Noyanoclpn, Synthesis of some New 1-Acylthiosemicarbazides and 1,2,4-Triazol-5-Thiones and their analgesic and Anti-inflammatory Activites, *Turk. J. Chem.* 31, 301-13. , (2007)
3. O. Bekiran and H. Bektas; Synthesis of New Bis-1,2,4-Triazole Derivatives, *Molecules*, 11, 469-73 (2006).
4. A. Farghaly, E. Clereq and H. El--Kashef , Synthesis and antiviral activity of noval [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles, [1,2,4] triazolo[3,4-b][1,2,4] thiadiazines and [1,2,4] triazolo [3,4-b][1,3,4] thiadiazepines; *ARKIVOCi*, 137-42. (2006)
5. K. Alder , "*New Methods of Preparative Organic Chemistry*", Enter Science, New York , (1948)
6. M. Kataoka, K. Hino and Y. Ochi , (1995), "*Dainippon pharmaceutical*", Japan, A2, 12p.
7. M. Nath; Saini, P.K.; Kumar, A. New di- and triorganotin(IV) complexes of tripodal Schiff base ligand containing three imidazole arms: Synthesis, structural characterization, anti-inflammatory activity and thermal studies. *J. Organomet. Chem.*, 625, 1353-1362. (2010).
8. A. Attia and O.I. Abdel-Salam , (1977), *Egypt; J. Chem.* , 40(5), 363.
9. M.G. Mahmoud , ;,Z.M. Al-Rnbaity;, R.K. Al-Knbaisy;,M.M. Al-Najafi and,H. M. Al-Gumaily, synthesis antimicrobial evaluation of 2-amino-5-thiol-1,3,4-thiadiazole derivatives, *IBN AL-HAITHAM.J.For pure and Appl.sci.*, 17(1:103-110. (2004).
10. ,F.A. Hussein ; M. J. Mahmoud and M . T. Taufiq, synthesis of substituted 1,3-oxazepines and 1,3- diazepines via Schiff bases , *Al-mustansirya J.Sci.* 17(1): (2006) .
11. A.R. Karitzky, Z. wang and R.J. Offer man , S,S'- and S,N-disubstituted derivatives of 1,3,4- thiadiazole dithiones (pages 139–142); *J. Heterocyclic. Chem.*, 27, 139-45. (1990).
12. F.Li, Y. Feng, Q. Meng, W.Li, Z. Li Q. Wang and F. Tao , An efficient construction of quinazolin-4- (3H)-ones under microwave irradiation; *ARKIVOCi*, 40-46, (2007).
13. A.A. Chavan, N.R. Pai , Synthesis and Biological Activity of N-substituted-3chloro-2-azetidinones, "*Molecules*", 2467, 12, (2007).
14. R.M. Silverstein, G. C. Bassler and T.C. Morill, "*Spectrometric Identification of Organic Compounds*", 4<sup>th</sup> Edition , John Wiley and Sons, (1981).

## Study and Comparison the Photodegradation and Biodegradation of Poly Vinylchloride in Absence and Presence Alizarin Dye And 2- (Benzylidene) Benzothiazole Hydrazone - Pd Complex

Zainab Naeif Majeed<sup>1</sup>, Thana M. Zayer<sup>2</sup>, Waeel M. Hamud<sup>3</sup> and Hamid Hashim Mohammed<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Al-Mustansiriya University, College of Science, unit of research polymer, Baghdad, Iraq

<sup>2</sup> Al-Mustansiriya University, College of Science, Department of Biology

<sup>3,4</sup> Al-Mustansiriya University, College of Science, Department of Chemistry, Baghdad, Iraq

Received 9/2/2012 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

تضمن هذا البحث دراسة ومقارنة التجزئة الضوئية المحتثة لافلام البولي فاينيل كلورايد في الهواء بوجود وعدم وجود المتحسس الضوئي صبغة الاليزارين (كصبغة عضوية) و معقد البلاديوم (كصبغة لاعضوية). وقد تم التشعيع بواسطة جهاز المعجل الحاوي على مصابيح فلورسنت ولمدة 200 ساعة لدراسة عملية التجزئة الضوئية هذه. ان اضافة (0.1% wt/v) من الصبغة او معقد البلاديوم الى افلام البولي فاينيل كلورايد بسمك (25 مايكرومتر) يزيد التجزئة الضوئية للبوليمر .

تم قياس و متابعة التجزئة الضوئية بواسطة الزيادة في امتصاص مجموعة الكربونيل باستخدام أطياف الاشعة تحت الحمراء و الاشعة فوق البنفسجية و المرئية. ومن النتائج الطيفية تم اقتراح ميكانيكية لعملية التجزئة للبوليمر وباستخدام ضوء بطول موجي 313 نانوميتر وشدة امتصاص مقدارها  $3.49 \times 10^{-5} \text{ einsteins.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$  ودرجة حرارة 45 °م .

تم دراسة التجزئة الحيوية للبوليمرات المتجزئة ضوئياً بواسطة البكتريا المعزولة من النفط (*Pseudomonas aeruginosa*) ، ان مصدر الكربون هو البوليمر المتجزء ، حيث ان البكتريا قادرة على استهلاك البوليمر. ويستنتج من هذه الدراسة بان الصبغة تزيد التجزئة الضوئية للبوليمر اسرع من المعقد.

### ABSTRACT

The induced photodegradation of poly vinylchloride films in air was investigated (for 200 hrs.) in the presence and absence of alizarin dye (as organic dye) and 2- (benzylidene) benzothiazole hydrazone - pd complex (as inorganic dye) (photosensitizer) by accelerated weathering tester.

The addition of (0.1wt %) of alizarin dye or 2- (benzylidene) benzothiazole hydrazone - pd complex to poly vinylchloride films (25µm in thickness) enhanced the photodegradation of the polymer films. The photodegradation rate was followed by increase in carbonyl absorbance of polymers using infrared (I.R.) and UV-visible spectra respectively.

According to the spectra results, the induced photodegradation mechanisms of polymer films were suggested under the experimental conditions employed using UV-radiation at  $\lambda = 313 \text{ nm}$  , light intensity  $3.49 \times 10^{-5} \text{ einsteins.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$  at temperature 45 °C. The biodegradability of photodegradable polymers has been also studied using isolated bacteria from crude oil (*Pseudomonas aeruginosa* ). This type of bacteria is known to be capable of utilizing the degraded polymers. The concluded from this work the alizarin dye enhance degradation of polymer than Pd complex.

### INTRODUCTION

Poly vinyl chloride (PVC) is the second most product and used plastic (polyethylene being the first). Its use is widespread and diverse, ranging from everyday products to highly specialized applications<sup>(1)</sup>



There are many routes that polymers encounter with metals or metallic compounds. For examples, catalyst residues<sup>2</sup>, pigments<sup>3</sup>, metal particles contaminated during machine processing<sup>4</sup>, and so on can be considered. It is also well known that in a minor amount of metals or metallic compounds as well as oxygenated groups in substrates play extremely important roles either in the photodegradation or in the thermal degradation of polymers.

The role of these metals and /or metallic salts (compounds) in polymer photooxidative degradation has been reviewed and depends on<sup>(5)</sup> :

1-The nature of polymer. 2- Environmental conditions to which the polymer has been exposed. 3- The nature of metal (transition or not-transition). 4- The valance of the metal, 5- the anion or ligand of the metallic compounds. 6- The spin state of the transition metal and the symmetry of its ligand field. 7- Photochemistry of a metal salt or a metal coordination compounds. External metal salts and metal compounds play an evident role in the photooxidative degradation and environmental ageing of polymers<sup>(5)</sup>.

Alizarin (1,2-Dihydroxyanthraquinone) is a polycyclic bio-organic molecule which occurs in plants such as *Rubia tinctorium* in combination with the sugars glucose and xylose. Coordination complexes of alizarin molecules with metal atoms are used as natural pigments since ancient times , one of the earliest known metal chelate is the calcium aluminum complex of alizarin (alizarin [Al]) , first used as a pigment in India<sup>(6)</sup>.

During UV-irradiation of polymers the concentration of functional groups on the chain ends and inside macromolecules (double bonds and carbonyl groups) increases. It probably makes polymers more susceptible to attack of bacteria in natural environment. It is also well known that the efficient main chain scission in irradiated polymers causes their mechanical deterioration and breaking on to small pieces. Thus, the access of oxygen and microorganisms is facilitated to the bulk of such destroyed products. In this way polymers become biodegradable<sup>(7)</sup>.

The biological degradability is defined as the degradation and deterioration of polymers solely by living organisms (including microorganisms and /or enzymes excreted by microorganisms)<sup>(8)</sup> . The biochemical attack on polymers can occur at the side chain and /or directly at the backbone. In the first instance the properties are certainly altered, but basic polymeric structure may be retained and the material is not degraded. The reduction in molecular mass is an essential requirement for polymers in order to serve as nutrient for microorganisms because only low molecular substances can be transported into the cells and incorporated in internal cycles<sup>(8)</sup> . The aim

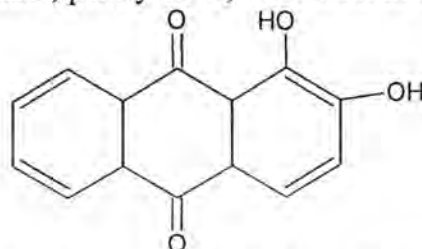
of this work is study and comparison the biodegradation of photodegraded poly vinylchloride, this type of polymers have found useful applications: in industry. Study of their either UV-light degradation or biodegradation may give an understanding of their application as degradable polymer.

### Experimental

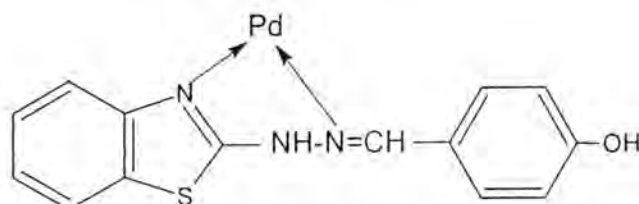
#### The following materials were used

a- Laboratory poly vinyl chloride powder ( B.D.H. Ltd A.R.Grade , purity 99%) was used at the test sample .

b- Laboratory alizarin dye (1,2-Dihydroxyanthraquinone) powder ( B.D.H. Ltd A.R.Grade , purity 99%) was used at the test sample .



c- **2- (benzylidene) benzothiazole hydrazone - pd complex**  
 $[Pd(C_{14}H_{11}N_3OS)_2]Cl_2$  was prepared and characterization as literature<sup>(9)</sup>



#### Ultraviolet visible spectrophotometry (U.V):

The absorption spectra was recorded using the ultraviolet visible spectrophotometer using the Hitachi U-2000 and Cary 100 conc. to record the absorption spectra in the wavelength range between (200-600)nm.

#### Infrared spectrophotometry (IR)

A Pye-Unicam SP<sub>3</sub>-100 infrared spectrophotometer was used to record the IR spectra between (600-4000)  $cm^{-1}$ .

#### Film preparations

0.1% solution of alizarin dye or 2- (benzylidene) benzothiazole hydrazone - pd complex (in tetrahydrofuran) was added to 1% solution of poly vinyl chloride in tetrahydrofuran .A thickness of about 25 $\mu m$  was measured by a micrometer type, (2610 , Germany) , poly vinylchloride films with and without dye and complex were obtained by casting of solutions into horizontal glass plate . After solvent evaporation, samples

were dried in vacuum for 24 hrs. this was found to be adequate to completely remove of solvent from films .

### Irradiation

The accelerated weather-o- meter, Q.U.V. tester, (Q-panel company , U.S.A), was used for irradiation of poly vinylchloride films. The films were positioned (25 $\mu$ m) apart from the UV.lamps (eight fluorescent lamps give essentially monochromatic light at  $\lambda=313$  nm) . Temperature of the tester chamber is nearly constant at 45 °C

### Analysis

The photodegradation of the polymer film was followed by I.R and UV-visible spectrophotometer. The absorption spectra ( for I.R method) of the film samples were recorded in the wavenumber ranged from 600 to 4000  $cm^{-1}$ . Carbonyl index were calculated by comparison of the I.R absorption peak at 1720  $cm^{-1}$  for (C=O) group with reference peak at 1430 $cm^{-1}$  for (-CH<sub>2</sub> ) group for poly vinyl chloride. The ultraviolet-visible spectrophotometer was used to measure the change in the U.V-Visible spectrum during irradiation.

### Biodegradation method

Bacteria isolated from crude oil, type *Pseudomonas aeruginosa* was grown on irradiated polymers, poly vinyl chloride without and with photosensitizer (dye and complex ), as a sole source of carbon and energy in order to ensure their ability to utilize them. Five milliliters of mineral salt medium (table 1) distributed in 25 ml tube. The tube was sterilized by autoclaving at 120 °C for 15 minute, the tubes were inoculated with 1% of fresh culture (18hrs.), then 1g/l of polymer was added and incubated with shaking (180 rpm) at 37°C for two weeks.

Table -1: Mineral Salt Medium for growth bacteria type *Pseudomonas aeruginosa*<sup>(10)</sup>

Salt	Weight(g)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.170
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.121
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.121
NH <sub>4</sub> CL	2.140
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.28
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.06
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.005
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.061
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.06
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.00006
Distilled water	1000 ml



The pH was adjusted to 7.5 by buffer solution ( $K_2HPO_4$  1.17g and  $KH_2PO_4$  0.121g in 100mL). The %loss weight of polymer calculated as following:

%loss weight = weight of polymer before biodegradation - weight of polymer after biodegradation

### Bacteria strains

The bacteria isolates used in this study is :

Bacterial isolate	phenotype
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neo <sup>r</sup> ., sm <sup>s</sup>

Neo<sup>r</sup> : neomycin resistant

sm<sup>s</sup> : streptomycine resistant

## RESULTS AND DISCUSSION

The photodegradation of polymer films has been studied. The UV.-visible spectra of poly vinyl chloride films (control) irradiated with different time intervals . After 200 hrs. of irradiation, the absorbance is increase ,the rate of increase is relatively much greater than in the wavelength region of ( $\lambda = 245-350$ )nm. The increase in absorbance is due to the formation carbonyl groups in polymer.

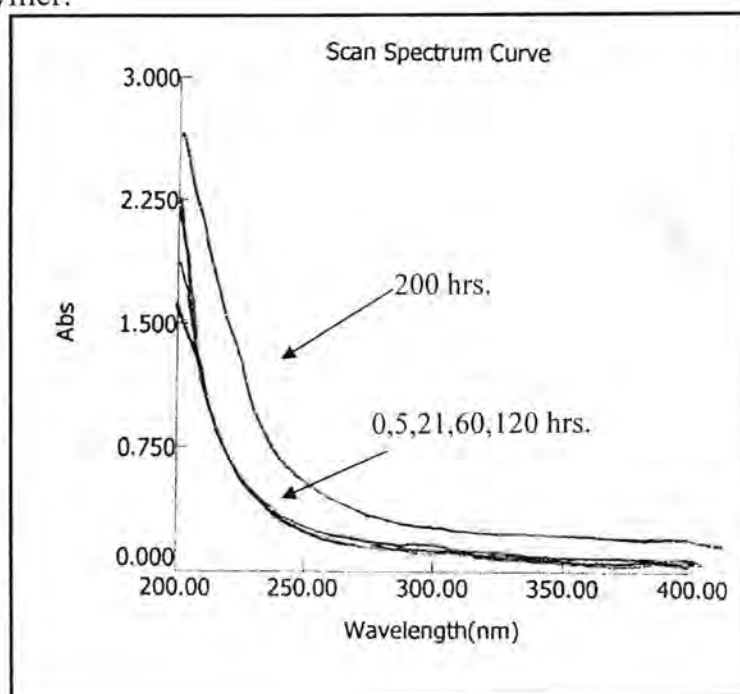


Figure -1: UV, -visible spectral change of PVC film without photosensitizer (25  $\mu$ m in thickness)



In the present work, the photodegradation of polymer films was studied using (dye and complex) photosensitizers. The spectral changes during photolysis of polymer films, with 0.1%w/v of photosensitizers(dye and complex) are shown in figures (2) and (3) for poly vinyl chloride with dye and complex respectively.

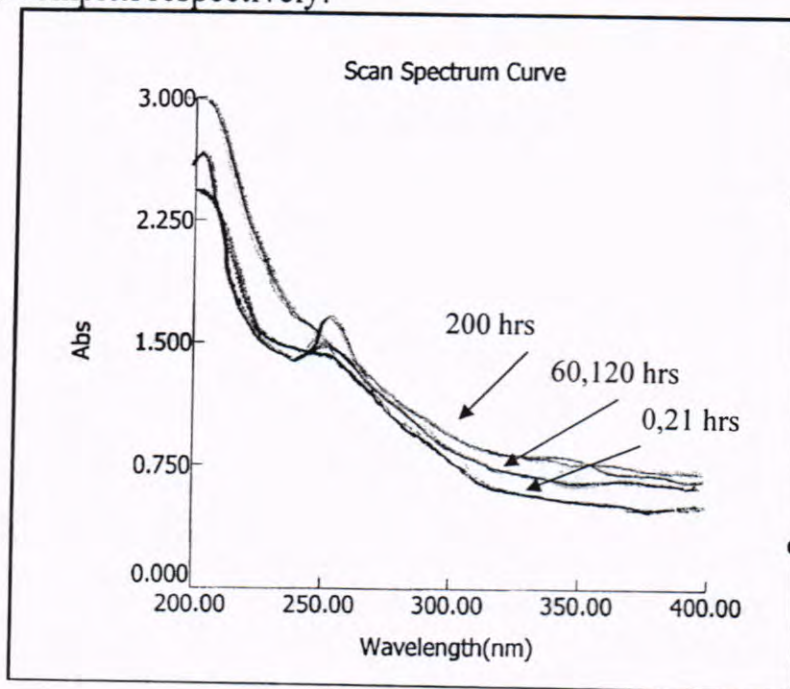


Figure-2: UV. -visible spectral change of PVC film with dye photosensitizer (25  $\mu\text{m}$  in thickness)

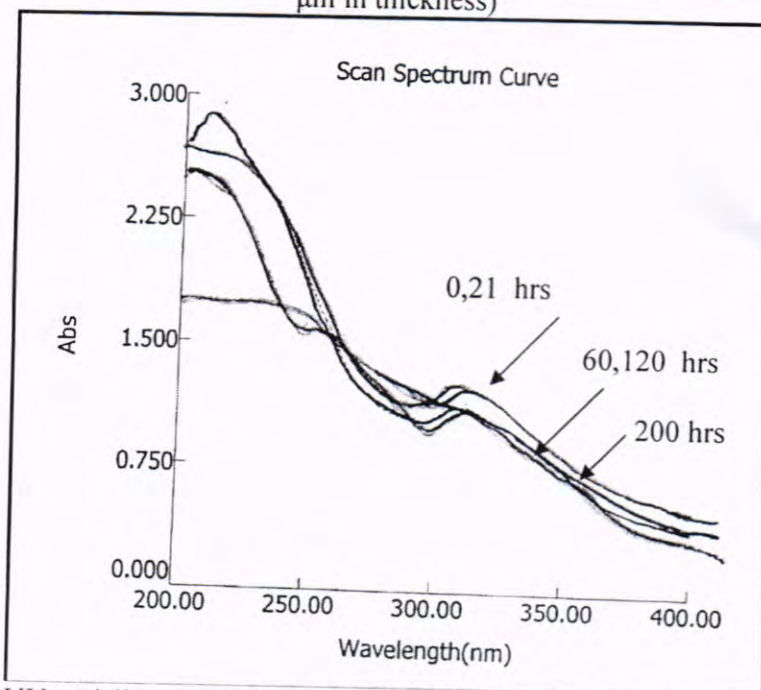


Figure -3: UV. -visible spectral change of PVC film with complex photosensitizer (25  $\mu\text{m}$  in thickness)

From the results obtained in these figures, one can be observed that the absorbance of the polymer with dye in the wavelength 300-400 nm range increases with irradiation time but with complex the absorbance of the polymer in the wavelength 300-350 nm range decrease because the photodissociation of the Pd complex with polymer.

When the polymer film (control) samples, irradiated with wavelength ( $\lambda=313$  nm), the FTIR shows the high growth of carbonyl groups absorbance in the wavenumber  $1720\text{ cm}^{-1}$ , and this band intensity increases exponentially with irradiation time. which is expressed in term carbonyl index ( $I_{CO}$ ).

The relationship between the carbonyl index ( $I_{CO}$ ) with irradiation time is showed in figures (4).

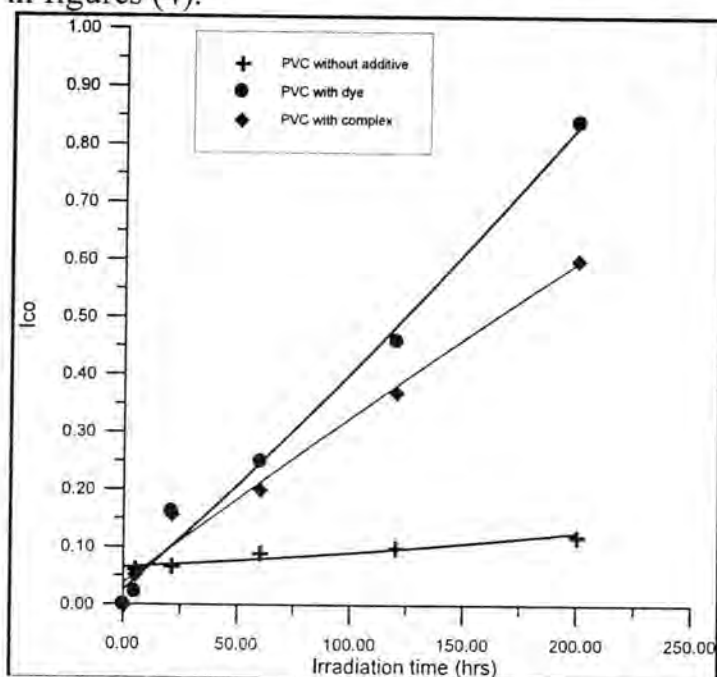
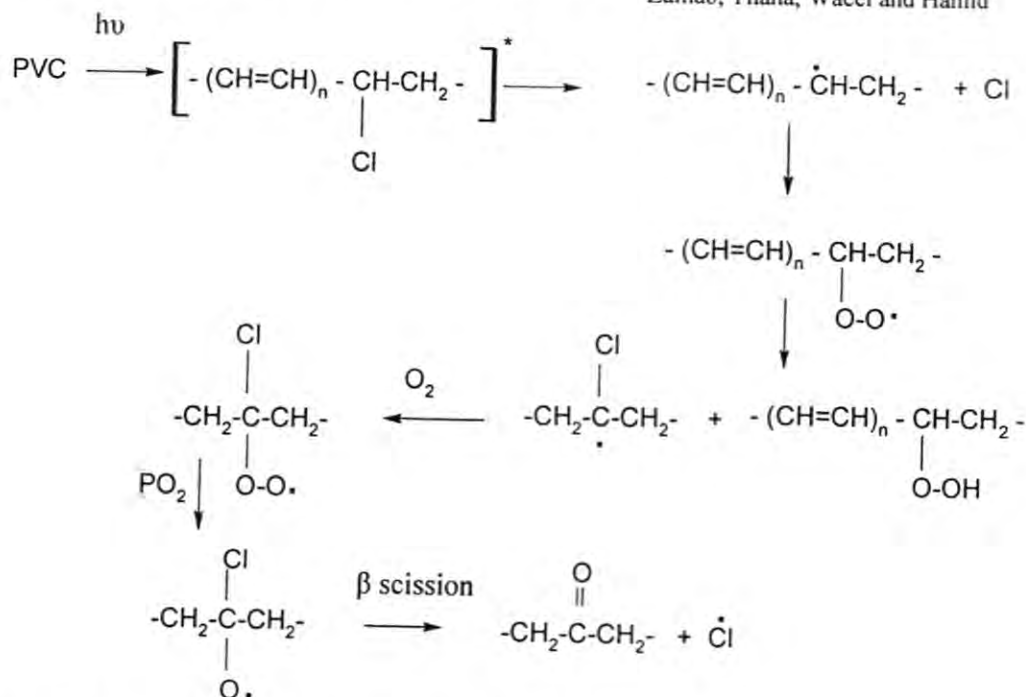


Figure -4: The relationship between carbonyl index and irradiation time for poly vinyl chloride films with and without (0.1% w/w) of photosensitizers

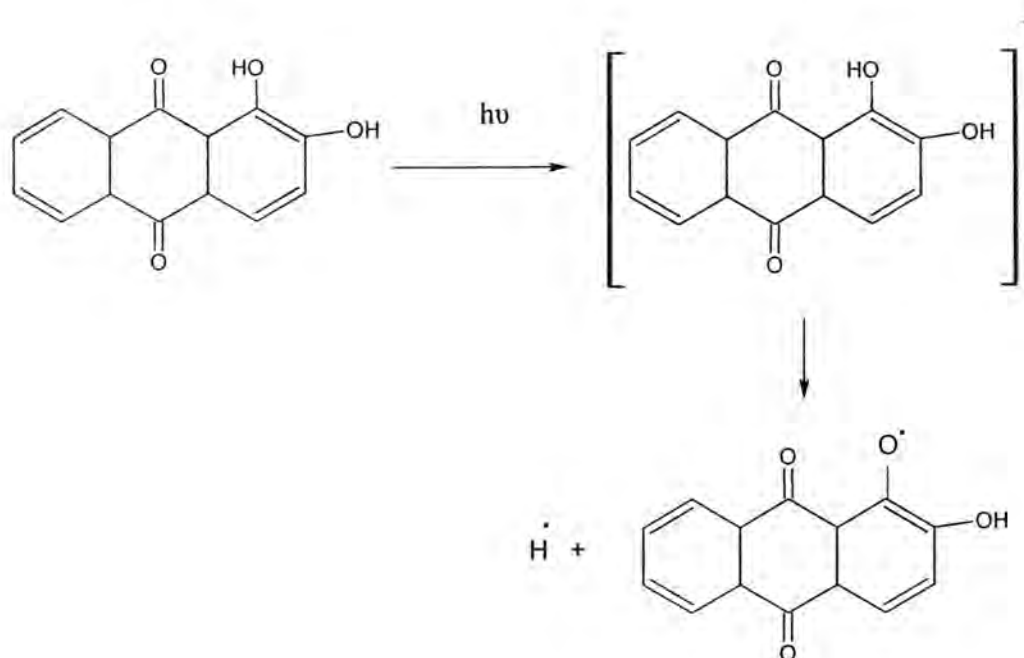
It has been observed that the carbonyl index greatly increases with irradiation time for poly vinyl chloride film with dye and complex photosensitizers. The degradation of polymers and formation of carbonyl groups are similar to general mechanism in literatures<sup>(11)</sup>.



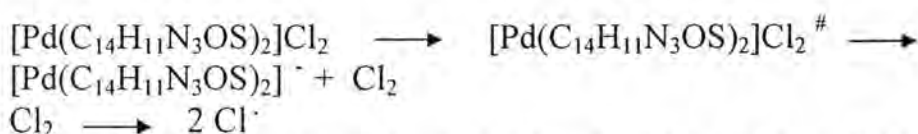
Scheme -1: Reaction scheme for the photodegradation of PVC in the presence of  $\text{O}_2$

So these photosensitizers (i.e dye and complex) are all considered as photodegradation inducers for poly vinyl chloride , as the growth of carbonyl index with these photosensitizers is higher than polymer without photosensitizers. Also results ,show that (dye) act as better-inducer of polymer photodegradation compared to other photosensitizer (complex ),this is because the increased in carbonyl index ( $I_{\text{CO}}$ )are higher than that for polymer(control) or with photosensitizers complex and also the stability of Pd complex, these results are in agreement with literatures<sup>(12-16)</sup>.

Ones therefore, might suggest the following mechanism for the photodecomposition of the photosensitizers used in this work. The UV. light and free radical generated effectively initiating the photodegradation of the poly vinyl chloride as :



Scheme -2: Reaction scheme for the photodegradation of Alizarin dye



Scheme (3) : Reaction scheme for the photodegradation of Pd complex

### Biodegradation of polymers

The bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, used in this work, was isolated from crude oil is utilizing aliphatic and aromatic hydrocarbons (such as phenol and n-hexane). In order to ensure that the isolated bacteria was indeed capable to growth in procure of irradiated polymers (as the sole available carbon source), a series of experiments were carried out in which the growth in the polymer environment was compared with that in control (mineral medium free of carbon source). A typical result are shown in table (2)

Table-2: Growth of bacteria on polymers after 200 hours photolysis

Compounds	Bacterial growth	% loss weight
1. PVC before irradiated	0	0
2. PVC after irradiated	1	8.1
3. PVC with dye before irradiated	1	9.1
4. PVC with dye after irradiated	4	62
5. PVC with complex before irradiated	1	9
6. PVC with complex after irradiated	2	29.2



ASTM rating: <sup>(17)</sup>

( 0 ) = no visible growth , ( 1 ) = 10% surface growth , ( 2 ) = 10-30% surface growth , ( 3 ) = 30-60% surface growth , ( 4 ) = 60-100% surface growth

It was concluded from such data that these bacteria were indeed capable of a significant amount of growth when the only carbon source present was the polymer. Color changes from colorless solution to green solution indicate to microbial growth as in figure (5).

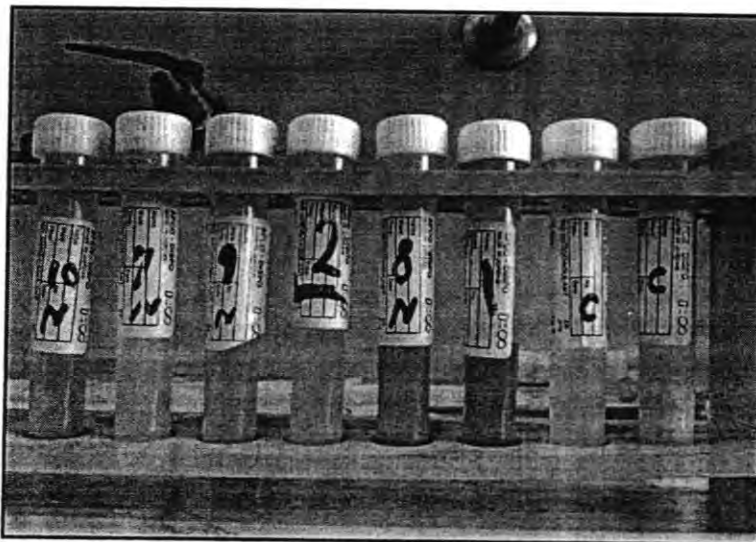


Figure -5: The Color changes for PVC before and after irradiation , for PVA with dye or complex before and after irradiation

Where (C) : the control without any polymer or sensitizer , (1) : PVC with dye before irradiated, (2) : PVC with complex before irradiated , (7) : PVC before irradiated , (8) : PVC with dye after irradiated , (9) : PVC with complex after irradiated , (10) : PVC after irradiated

The biodegradation are followed by percentage weight loss of polymer after biodegradation, where the polymer precipitated from bacterial solution by ethanol ,then dried under vacuum.

**%loss weight = weight of polymer before biodegradation - weight of polymer after biodegradation**

In general, during UV-irradiation of polymers the concentration of functional groups on the chain ends and inside macromolecules (double bonds and carbonyl groups) increases. It probably makes polymers more susceptible to attack by bacteria in natural environment. It is also well-known that the efficient main chain scission in irradiated polymers causes their mechanical deterioration and breaking on to small pieces. Thus, the access of oxygen and microorganisms is facilitated to the bulk

of such destroyed products. In this way polymers become biodegradable.

From above results, the irradiation polymers contain dye and complex was biodegraded higher than irradiation polymer without sensitizer where sensitizer increases photodegradation of polymer into small species, then the molecular weight was reduced. This results agreement with literatures<sup>(18-21)</sup>.

### CONCLUSIONS

It can be concluded that addition of small amount (0.1% w/v) of low-molecular compounds such dye and complex effectively influences the photoprocesses in polymer. It has been found that photo-oxidative degradation of polymer is more efficient in the presence of these sensitizers and dye action is strongest as inducer for poly vinyl chloride and complex is less for poly vinyl chloride. These results confirm that polymer fragments produced by photodegradation of certain plastic molecules indeed attacked and metabolized by soil microorganism.

The use of biodegradation offers a cheap method for recycling nutrients efficiently and, when optimized, at a faster rate than under natural conditions. It would appear to be low in its energy requirements.

### REFERENCES

1. Sinan B., Msc. Thesis, "The mechanism of hydroquinone assisted photodegradation of PVC", Bilkent university, (2002).
2. Fujiwara S., "Instrumental analysis of polymers", Hirokawa, Tokyo, p.80,(1961)
3. Takahashi T., Suzuki K., and Kagaku K., Polym. Chem., Japan, 23,792(1966)
4. Richeter P., Macromolecules, 3,262(1972)
5. Rabec J.F., " Polymer photodegradation : mechanisms and experimental methods", Chapman and Hall, London, (1995).
6. Trixier F., Markert T., Lackinger M., Jamitzky F., and Heckl W.M., "Bioorganic semiconductor alizarin : structure, properties and metal complexation investigated via STM", Chem. Eur. J., 13, 7785-7790, (2007).
7. Scott G., ICS- INDO Report. "Environmental Degradable Plastics". 20-24 March, (2000).
8. Fritz H.-G., Seidenstucker T., Bolz U., Juza M., Schroeter J. and Endres H.- J., " Study on Production of Thermoplastics and Fibres Based Mainly on Biological Materials", Stuttgart, June (1994).
9. Hamid H. Mohammed , Firyal W. Askar , Khitam J. Nabhan, "Preparation and antimicrobial studies of metal complexes for

- schiff bases 2- (benzylidene) benzothiazole hydrazone", Journal of the college of basic Education, 15, No. 59, p. 133-144, (2009)
10. Unichiyama H. and Tabuchi T., "Aerobic degradation of trichloroethylene at high concentration by a methan utilizing mixed culture, Agric. Boil. Chem., 53 , 1019, (1988).
11. Decker C., "Degradation of poly (vinylchloride) by u.v. radiation –II : Mechanism", Eur. Polym. J., 20, No. 2, 149-155, (1984) .
12. Vymazl Z., Svorcik V., Volka K., and Vymalova Z., "Photodegradation of PVC stabilized by Ba, Ca, Cd, and Zn Stearates", Eur. Polym. J., 21, No. 1, 151-154, (1985) .
13. Anthony L.A., "Photodegradation of rigid PVC formulations : spectral sensitivity to light-induced yellowing by polychromatic light", Journal of Applied Polymer Science, 37, 2789-2802, (1989)
14. Stephanic S., and Amanda F., "An XPS study on the effect of pigment on the UV Degradation of an Epoxy system", Proceedings of the 81<sup>st</sup> annual meeting technical program of the FSCT, USA, (2003) .
15. Clodoaldo S., Maria I.F., Fabio Z., and Marco G., "Influence of diazo pigment on polycarbonate photodegradation", Journal of Applied Polymer Science, 107, 1071-1079, (2007) .
16. Hamid H. Mohammed ,Zainab Naeif Majeed and Abeer Abd Al-razaq, "Photodegradation of methyl cellulose and cellulose triacetate in the presence of complexes of Cr (III) and Cu(II) with 2[(5-amino – 1,3,4 – oxadiazole-2-yl ) oxy] ethanol" , Journal of college of Education, Vol. 2, No. 1, 527-548, (2010) .
17. Fritz H.-G., Seidenstucker T., Bolz U., Juza M., Schroeter J. and Endres H.- J., " Study on Production of Thermoplastics and Fibres Based Mainly on Biological Materials", Stuttgart, June (1994).
18. Unichiyama H. and Tabuchi T., "Aerobic degradation of trichloroethylene at high concentration by a methan utilizing mixed culture", Agric. Boil. Chem., 53 , 1019 , (1988).
19. Zainab N. M., PhD .Thesis, department of chemistry, college of science, university of al-mustansiryah" Induced Photodegradation of Some Cellulose Derivatives" AL-Mustansiriah Univerisity ,(2006) .
20. Artham T. and Doble M., "Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates", Macromolecular Bioscience, 8 , 14, (2007) .
21. Yousif Ali Al-Fattahi ,Salah M. Aliwi , and Hamid H. Mohammed, "Photodegradation and biodegradation of poly (exo-galactosene-co-styrene) and poly (exo-galactosene-co-acrylonitrile), Al-Mustansiriyah Journal of Science 21, No.(5), 278-290, (2010).

## Melamine-Attapulgite And Attapulgite- Melamine-Formaldehyde Physical Interactions: Synthesis And Characterization

Isam H. Ali<sup>1</sup> Yousif I. Mohammed<sup>2</sup> and Takialdin A. Himdan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Science, Department of Chemistry, Al-Mustanseria University

<sup>2,3</sup>College of Education Ibn Al Haitham, Department of Chemistry, University of Baghdad

Received 12/4/2012 – Accepted 6/11/2012

### الخلاصة

في هذه الدراسة تم تعيين التداخل الجزيئي بين طين الاتابلكايت العراقي مع الميلامين باستخدام تقنيتي FT-IR و XRD اللتين اظهرت ان البوليمر قد تكون في الفضاءات القطرية بين طبقات معدن الاتابلكايت حيث سبب تكون البوليمر رجوع التركيب البلوري للاتابلكايت لما كان عليه قبل تكوين المعقد مع الميلامين باستثناء زيادة صفته البلورية وخاصة ضمن المستويات القطرية للطين .

### ABSTRACT

In this study the interaction between Iraqi Attapulgite clay and Melamine was estimated by using FT-IR and XRD methods these methods indicate the Melamine molecule form complex with Attapulgite silica tetrahedral and alumina octahedral layers of unit crystal and interact through Hydrogen bonding and electrostatic forces with remaining frame of the crystal this interaction slightly change the space dimension of Attapulgite crystal unit cell, the obtained complex was used to prepare the second complex by reaction with formaldehyde. The XRD pattern and FT-IR spectra show that the formation of the polymer was happen inside Attapulgite crystals this led to decreasing the order nature of Attapulgite crystals and returning the Attapulgite to its initial fibrous structure including bulk of Melamine formaldehyde polymer.

### INTRODUCTION

In recent years polymer clay complexes have attracted great interest, both in industry and in academy, because they often exhibit remarkable improvement in materials properties when compared with virgin polymer or conventional micro and macro-composites. These improvements can include high module [1, 9], increased strength and heat resistance [10], decreased gas permeability [11, 12] and flammability [13, 14], and increased biodegradability of biodegradable polymers [15]. On the other hand, there has been considerable interest in theory and simulations addressing the preparation and properties of these materials [16, 17], and they are also considered to be unique model systems to study the structure and dynamics of polymers in confined environments [18, 19]. Although the intercalation chemistry of polymers when mixed with appropriately modified layered silicate and synthetic layered silicates has long been known [20, 21], the field of these systems nano-composites has gained momentum recently. Two major findings have stimulated the revival of interest in these materials:



first, the report from the Toyota research group of a Nylon-6 (N6) Montmorillonite nano-composite [22], for which very small amounts of layered silicate loadings resulted in pronounced improvements of thermal and mechanical properties; and second, the observation by Vaia et al. [23] that it is possible to melt-mix polymers with layered silicates, without the use of organic solvents. Today, efforts are being conducted globally, using almost all types of polymer matrices.

Attapulgite has an elongated morphology and is similar in structure to minerals of the amphibole group, differing from sepiolite only in minor respects. In attapulgite, the basic sheet unit is smaller in the b-axis direction of the crystal. The units themselves are combined in an identical fashion to those of sepiolite. The indefinite development of these units along the c-axis of the crystal results in an amphibole-like double chain of  $\text{SiO}_4$  tetrahedral. However, the structure of attapulgite is more diverse than that of sepiolite; attapulgite has one orthorhombic and three different monoclinic unit cell geometries. This diversity accounts for the long fiber forms found in Russia (which were once mistaken for asbestos), the shorter fiber gelling clay found in the southern part of Meigs-Attapulgis-Quincy district (GA, United States) and the even shorter fiber non-gelling type found in the northern part of this district figure(1). Cell parameters of orthorhombic samples are as follows:  $a = 1.27\text{-}1.29$ ,  $b = 1.78\text{-}1.81$ ,  $c = 0.51\text{-}0.53$  nm and  $\alpha = 92^\circ 14'$  and  $\beta = 95^\circ 46'\text{-}95^\circ 50'$ . As with sepiolite, the structural arrangement of attapulgite results in long, thin or lath-like crystals figure(2)[24].

The aim of this study is modifying Iraqi Attapulgite clay with Melamine and Melamine formaldehyde polymer and observing its crystallographic changes in addition to the nature of interaction type between the Monomer and polymer with the clay.

## MATERIALS AND METHODS

### i) Materials and instruments.

Attapulgite was obtained from Iraqi Company of Mining and Geological scanning, Melamine, Formalin, Hydrochloric acid were analytical grade from BDH. FT-IR spectra were done using SHIMADZU, FT-IR-8400s. FOURIER TRANSFORM also XRD patterns were done by SHIMADZU XRD-6000-general-purpose X-ray Diffractometer with CuK $\alpha$  (wavelength = 0.154 nm).

### ii) Preparation of Complexes.

The Attapulgite was washed with dilute HCl (1%) for activation then filtered and washed several times with deionized water to remove the acid and soluble materials, then dried in the oven at  $100^\circ\text{C}$  for 3 hours. The obtained Attapulgite was blended and put in closed

containers. Complex Attapulgite-Melamine was prepared by mixing 25g from the clay with 5g of Melamine by using ceramic mortar with addition few drops of water to the mixture to complete the interaction, the mixing process was continued for 30 minutes, then the resulted mixture was left for one week in a closed flask to complete the diffusion process, the polymer was prepared by addition 6ml of formalin to the last prepared complex using mortar and addition of 2ml of 0.1 HCl drop to the mixing process was continued for half hour then put in water bath for two hours to complete the cross linking between Melamine Formaldehyde polymer chains.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figures (3), (4) and (5) indicate X-ray patterns of Iraqi Attapulgite (A), Attapulgite-Melamine complex (AM) and Attapulgite Melamine Formaldehyde complex (AMF), in figure (3) the band at  $7^\circ$  in  $2\Theta$  axis that analogous to d value of  $12.12 \text{ \AA}$  belongs to (100) plane [25] also the band at  $2\Theta=8.5^\circ$ ,  $d=10.4 \text{ \AA}$  belong to the plane (020) these planes is one of the major characteristic planes of in Attapulgite mineral[24] the broadness of this band due to different moisture content and orientation in the clay sample, the band at  $2\Theta=11.6^\circ$ ,  $d=7.62 \text{ \AA}$  belongs to (110) plane[26]. The second characteristic band of Attapulgite is  $2\Theta$  axis is  $19.91^\circ$  corresponds to d value  $4.46 \text{ \AA}$  this band belong to (220) plane [27], the band at  $2\Theta=21^\circ$ ,  $d=4.23 \text{ \AA}$  which belong to the plane (040) combined with the band  $2\Theta=23.2^\circ$ ,  $d=3.83 \text{ \AA}$  for (300) plane, also there is band at  $2\Theta=26.7^\circ$ ,  $d=3.34 \text{ \AA}$  belong to the plane (050). The last major characteristic band is  $2\Theta=29.5^\circ$ ,  $d=3.03 \text{ \AA}$  belongs to (400)[28] plane which has the highest intensity of this mineral, the remaining bands at  $2\Theta$  greater than the last one are less importance and belong to high order reflections of the secondary planes of Attapulgite. Figure(4) that shows X-ray diffraction pattern of MB complex show number of interesting features the first one is that: the intensity of the band at  $2\Theta=7^\circ$ ,  $d=12.12 \text{ \AA}$  which belong to the plane (100) become more sharp this indicate the orientation in this plane become more ordered than the case of Attapulgite clay alone, the peak at  $2\Theta=11.6^\circ$ ,  $d=7.62 \text{ \AA}$  that belong to (110) plane showing a decrease in intensity of its peak as a result of increasing disorder of this diagonal plane at the same time the rising of the weak peaks at  $2\Theta=13.25^\circ$ ,  $d=6.06 \text{ \AA}$ ,  $2\Theta=15^\circ$ ,  $d=5.6 \text{ \AA}$  and moderate peak at  $2\Theta=17.7^\circ$ ,  $d=5.2 \text{ \AA}$  for (200), (030) and (001) respectively that mean increasing of order along the main three axis of crystal unit cell may be take place as a result of arranging the planer Melamine molecules in a positions parallel to the main three axis of the crystal unit cell and these positions are perpendicular to the diagonal axis of it. Also there is a new doublet band at  $2\Theta=21.75^\circ$ ,  $d=4.08 \text{ \AA}$  and

$2\Theta=22^\circ$ ,  $d=4.04\text{\AA}$  and splitting of the bands  $2\Theta=26.57^\circ$ ,  $d=3.35\text{\AA}$ ,  $2\Theta=29.35^\circ$ ,  $d=3.04\text{\AA}$  which belongs to the major planes (005) and (400) and appearing of new bands  $2\Theta=26.13^\circ$ ,  $d=3.4\text{\AA}$  and  $2\Theta=28.75^\circ$ ,  $d=3.1\text{\AA}$ , we think these changes were took place of substituting number of water molecules that bind with silica tetrahedral layer and alumina octahedral layer of the clay with Melamine molecules that act to push out slightly the tetrahedral layer. Figure (5) belong to the X-ray diffraction pattern of BMF complex show continues decrease of the peak heights and re-disappearance of the peaks that belong to (200), (030) and (001) planes also these results explained by the formation of amorphous polymer act to decrease the order of most crystal planes in addition there is no splitting in the peaks of (220), (040), (300), (050) and (400) planes because Melamine molecules now are attached to the polymer structure and they have no tendency to interact with clay frame as strong as before. Figure(6) show FT-IR spectra for the Attapulgite mineral, moderate bands at  $3628\text{cm}^{-1}$  to  $3406\text{cm}^{-1}$  belongs to stretching vibration of hydroxyl group at different environments [30] the broadness in this band is due to hydrogen bonding formation with interlayer water molecules the bending vibration band of water molecule is  $1624\text{cm}^{-1}$ , the band at  $1429\text{cm}^{-1}$  indicate the presence of calcite as impurities[Nakamoto] the strong band at  $1034\text{cm}^{-1}$  belong to the asymmetric vibration of the unit  $[\text{Si-O-Si(Al)}]$  [32] while its symmetric vibration at  $520\text{cm}^{-1}$ [32]. Figure (7) show FT-IR spectra of Melamine which indicate several bands above  $3000\text{cm}^{-1}$  due to symmetric and asymmetric vibrations of  $\text{NH}_2$  groups these bands originally must be 6 equal to the number of N-H bonds but these six vibrations are overlap with each other to produce two sharp bands at  $3418, 3470\text{cm}^{-1}$  and two broad bands at  $3131, 3333\text{cm}^{-1}$  [33], bands at  $1651, 1550, 1462$  and  $1435\text{cm}^{-1}$  belong to stretching vibration of  $\text{C=N}$  bonds[34]. Figure (8) is FT-IR spectra for complex A-M this figure shows increasing OH frequency of Attapulgite to  $3648\text{cm}^{-1}$  and remaining the other frequency at  $3545\text{cm}^{-1}$  unchanged meaning certain types of Attapulgite OH groups can form a Hydrogen bonding complex with Melamine molecule while the other OH groups are left without interaction also the shifting to the higher frequency of interacted OH group means the OH group will act as donor of Oxygen lone pair for the reasons will explained later, the four N-H vibration frequencies are also shifted to higher frequency except the last highest one which remained unchanged, this blue shift also means the amine groups of Melamine act as lone pair donor and the acceptor in this case will be the metal central atoms in the octahedral layer which support the results obtained from XRD for this reason the aromatic Melamine ring will charged with positive sign act to attract with negative charges of lone pairs that



located on OH groups of the outer surface of Attapulgite. in addition the bands that belong to C=N vibration frequencies all of they show a blue shift as indication to the increase of their strength by appearance the positive charge on the Melamine molecule, the band of the structural Attapulgite Si-O-Si (Al) at  $1031\text{cm}^{-1}$  indicate weakness of this bond this may be resulted by interaction of the positively charged Melamine molecules with negatively charged aluminosilic groups of Attapulgite. Figure (9) shows the formation the interacted polymer with Attapulgite, we observed the one disappear of  $\text{NH}_2$  Melamine groups, contentious decrease of Attapulgite OH frequencies resulted from stronger H-bonding interaction with polymer N atoms in this case OH group acts as proton donor, the bands between  $1300$  to  $1700\text{ cm}^{-1}$  that belong to C=N group indicate the increase the variety of its types as consequence of the formation of new types of this bond through polymerization process also the frequency of Si-O-Si(Al) band decreased from AM complex case and become more broad this means the electrostatic interaction with polymer units become weaker and the broadness belong to the variety of interaction.

### CONCLUSION

The XRD and FT-IR measurements on the Iraqi Attapulgite clay that modified with Melamine indicate that the Melamine molecules form interlayer complex with Attapulgite crystal sheets through hydrogen bonding and electrostatic forces this interaction increases the space dimension among clay sheets, when these Melamine molecules form a polymer from this growing polymer acts to alter the crystal structure of the clay those we expect from these results the improving the Attapulgite properties for industrial use such as fiber glass filler and pollution removing and this will be a project for future studies.

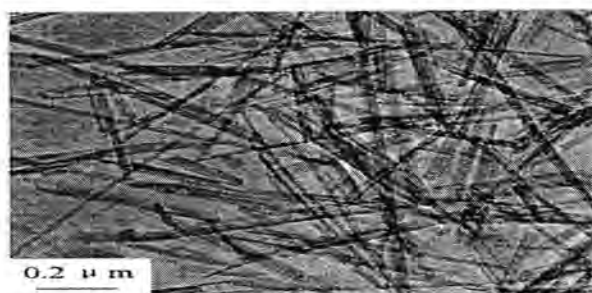


Figure -1: SEM picture of Attapulgite fibers.



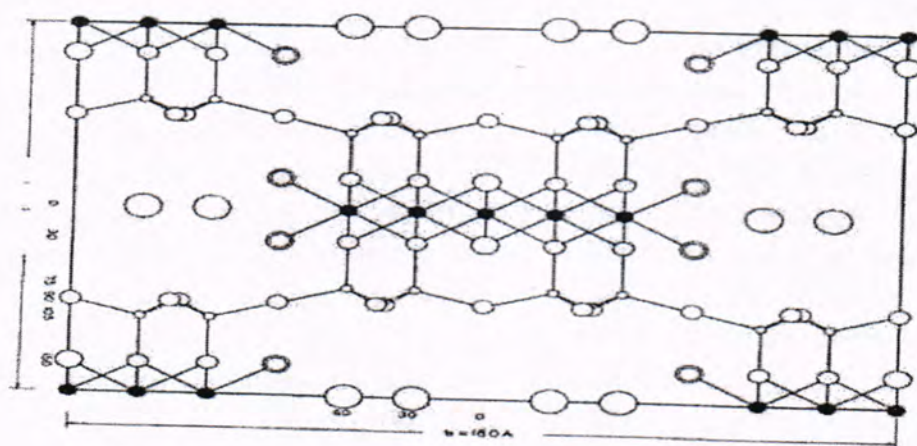


Figure-2:Attapulgite unit crystal structure.



Figure-3:XRD pattern of Attapulgite A.

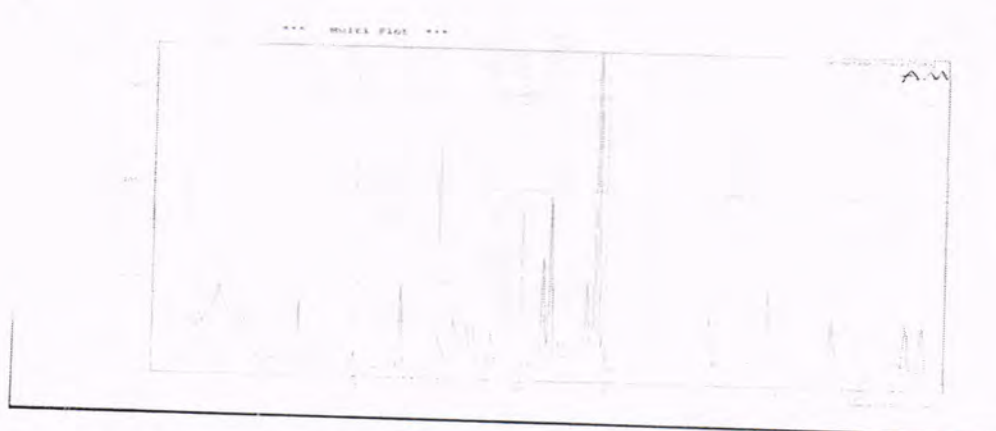


Figure-4: XRD pattern of Attapulgite-Melamine AM complex.

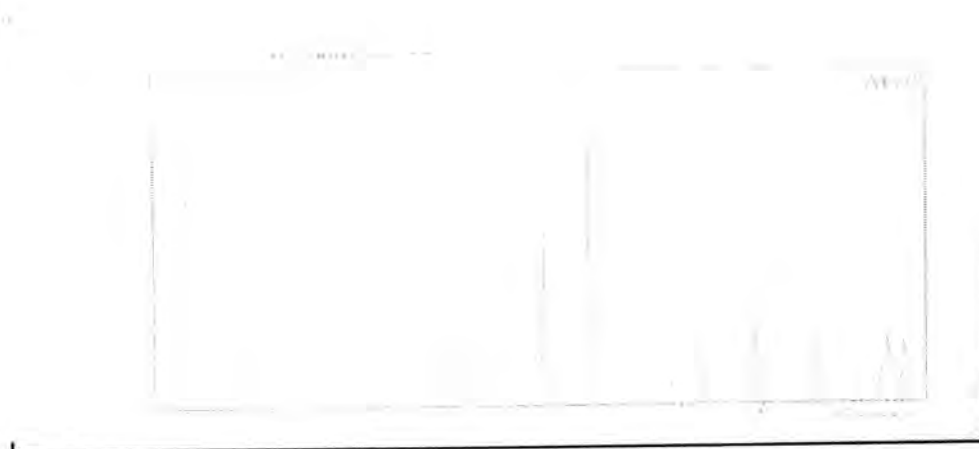


Figure -5: XRD pattern of Attapulgite-Melamineformaldehyde polymer AMF complex.

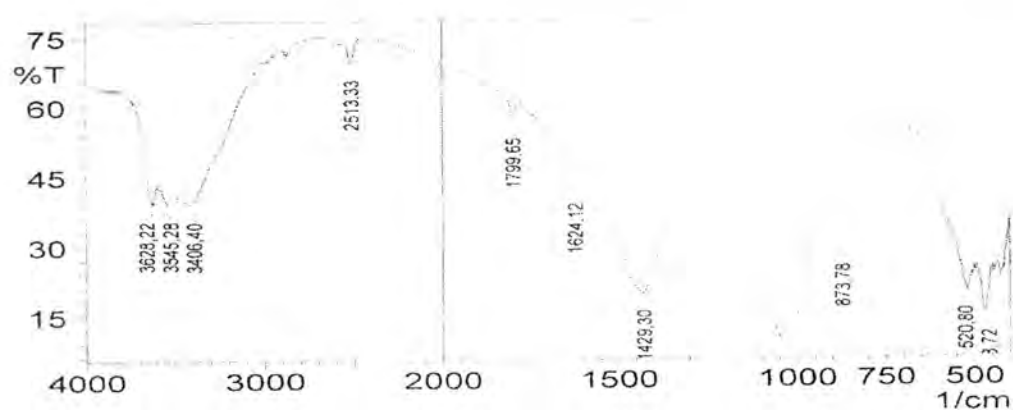


Figure -6: FT-IR spectra of Attapulgite.

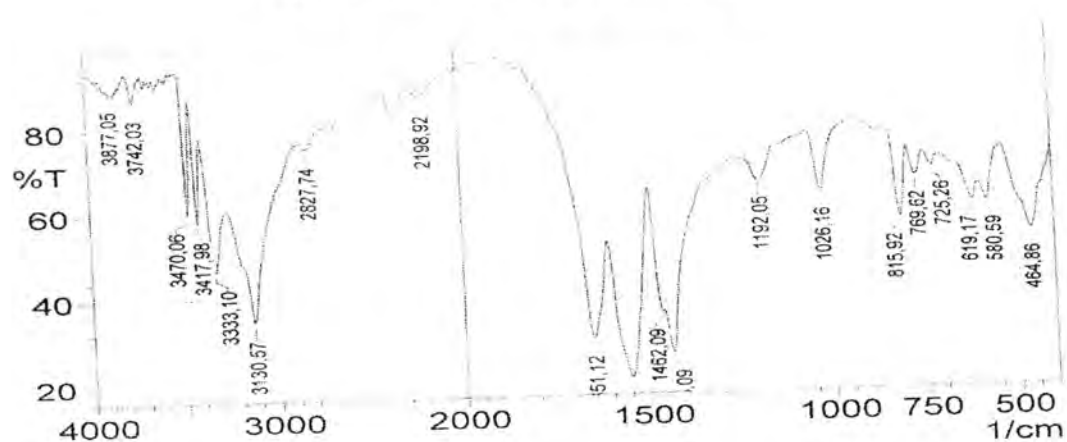


Figure -7: FT-IR spectra of Melaminer

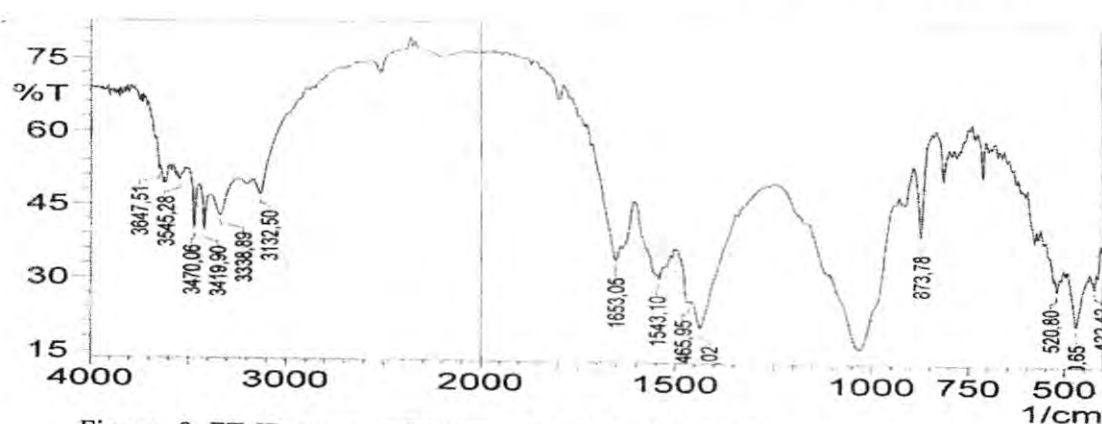


Figure -8: FT-IR spectra of Attapulgite-Melamine AM complex.

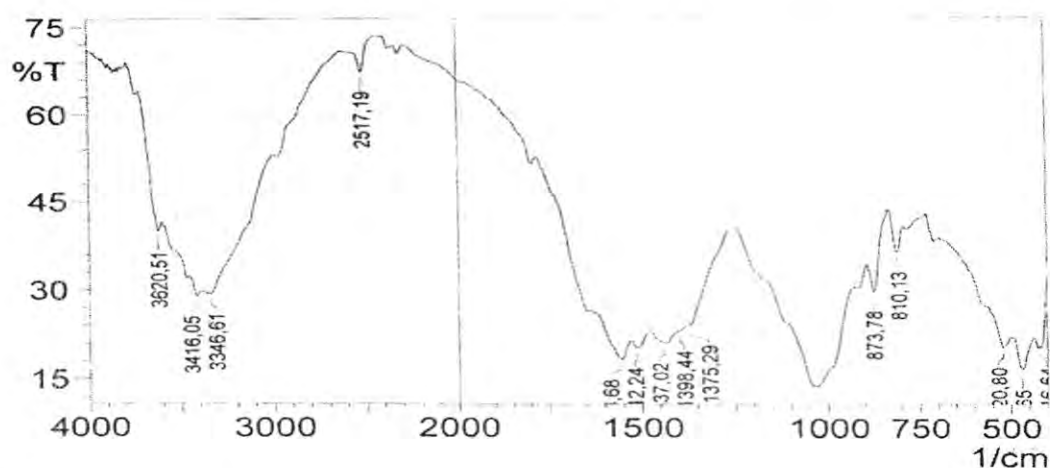


Figure -9: FT-IR spectra of Attapulgite-Melamineformaldehyde polymer AMF complex.

## REFERENCES

1. E. Giannelis, *Adv. Mater*, 8, 29(1996).
2. G. Ren and K. Sheng, *Advanced materials Research*, 148,679(2011)
3. IY. Li, G. Huo and B. He, *Advanced materials Research*, 150,223(2011)
4. H. Liu, T. Peng, H. Sun and Q. Xie, *Advanced materials Research*, 178,344(2011)
5. M. Chang, J. Lin, Y. peng, J. You and Y. Wang, *Advanced materials Research*, 194, 1876(2011)
6. H. Zhu, J. Li, L. Xu, K. Tao, L. Xue and X. Fan, *Advanced materials Research*, 295,315(2011)

7. Y. Fu and Y. Cui, *Advanced materials Research*, 335,230(2011)
8. N. Hamzah, W. Isahak, N. Adnan, N. Nordin, M. Kassim and M. Ambar, *Advanced materials Research*, 364,211(2011)
9. H. Shao, N. Cao and D. Wang, *Advanced materials Research*, 399, 1226(2012)
10. M. Biswas and S. Sinha Ray, *Adv. Polym. Sci.*, 155, 167(2001).
11. E. Giannelis, *Appl. Organomet. Chem.*, 12, 675(1998).
12. R. Xu, E. Manias, A. Snyder and J. Runt, *Macromolecules*, 34, 337(2001).
13. R. Bharadwaj, *Macromolecules*, 34, 1989(2001).
14. P. Messersmith and E. Giannelis, *J. Polym. Sci.*, 33, 1047(1995).
15. Y. Kojima, A. Usuki, M. Kawasumi, Y. Fukushima, A. Okada, T. Kurauchi and O. Kamigaito, *J Mater Res*, 8, 1179(1993).
16. S. Sinha Ray, K. Yamada, M. Okamoto and K. Ueda, *Nano. Lett.*, 2, 1093(2002).
17. F. Dabrowski, S. Bourbigot, R. Delbel and M. Bras, *Eur. Polym. J.*, 36, 273(2000).
18. V. Ginsburg and A. Balazs, *Adv. Mater.*, 12, 1805(2000).
19. E. Hackett, E. Manias and E. Giannelis, *J. Chem. Phys.*, 108, 7410(1998).
20. E. Manias and V. Kuppia, *Colloids Surf.*, A187, 509(2001).
21. A. Blumstein, *J. Polym. Sci.*, 3, 2665(1965).
22. B. Theng, "Formation and properties of clay-polymer Complexes", Elsevier, Amsterdam (1979).
23. R. Vaia, H. Ishii and E. Giannelis, *Chem. Mater.*, 5, 1694(1993).
24. D. Bish & G. Guthrie, *Iarc Monographs*, 68, 245(1996)
25. [www.dakotamatrix.com](http://www.dakotamatrix.com)
26. Z. Chen, F. Chen, X. Li, X. Lu, C. Ni and X. Zhao, *Journal of rare Earths*, 28, No. 4, 566(2010).
27. D. Ara\_ujo Melo, J. Ruiz, M. Melo, E. Sobrinho and M. Schmall, *Microporous and Mesoporous Materials*, 38, 345(2000).
28. W. Huff, J. Whiteman and C. Curtis, *Clays and Clay Minerals*, 32(4), 320(1984).
29. G. Herzberg, "Molecular spectra and molecular structure infrared and Raman spectra of poly atomic molecules", Van Nostrand Reinhold Co., New York (1971).



30. 95-K.Nakamoto, "Infrared spectra of Inorganic and coordination compounds", Mosul University press, Iraq (1982) [Arabic].
31. Y. Wang, A. Mebel, C. Wu, Y. Chen, C. Lin and J. Jiang, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 93, 3445(1997).
32. L. Kushnir, M. Bratychak, V. Bychkov and V. Puchin, *-Journal of Applied Spectroscopy*, 48(3), 314(1988).

## Energy Levels for Transitions in He-Like Ti XXI, V XXII and Cr XXIII by Fully Relativistic Configuration-Interaction Approach Wave Function

Raad Aedan Haleot

Al-Musatanseria University, College of Education, Physics Department

Received 23/4/2012 – Accepted 20/6/2012

### الخلاصة

تم حساب مستويات الطاقة للانتقالات في أشباه الهليوم (Cr XXIII و Ti XXI, V XXII) للانتقالات فيما بين المستويات الأقل من 49 مستوى لكل أيون. ثم قورنت النتائج مع بيانات مشابهة تم الحصول عليها من (National Institute of Standards and Technology). ان مستويات الطاقة والدوال الموجية المستخدمة في الحسابات تم الحصول عليها من تقريب تفاعل الهينة النسبي الكامل.

### ABSTRACT

Energy levels are calculated for transitions in He-like Ti XXI, V XXII and Cr XXIII for transitions among the lowest 49 levels of each ion, using the FAC (flexible atomic code). Comparisons are made with similar data obtained from NIST (National Institute of Standards and Technology). Energy levels and wave functions used in calculations are obtained from fully relativistic configuration-interaction approach.

### INTRODUCTION

Theoretical atomic data is important for many physics research fields including plasma modeling under various physical conditions, X-ray spectroscopy and astrophysics research. Emission lines of He-like ions have been widely observed from a variety of astrophysical and laboratory plasmas. For example, lines of many He-like ions detected in solar plasmas in the x-ray region (1–50 Å) have been listed by Dere *et al* [1]. Of particular interest are the resonance (w:  $1s^2 \ ^1S_0 - 1s2p \ ^1P_1^0$ ), intercombination (x and y:  $1s^2 \ ^1S_0 - 1s2p \ ^3P_{2,1}^0$ ) and forbidden (z:  $1s2 \ ^1S_0 - 1s2s \ ^3S_1$ ) lines, which are highly useful for solar plasma diagnostics—see, for example, [2–3]. However, to analyze observations, atomic data are required for a variety of parameters, such as energy levels, radiative rates and excitation rates or equivalently the effective collision strengths. Additionally, the transitions are important for studies of laser-produced [4] and fusion [5] plasmas. For our calculations we use fully relativistic configuration – interaction approach wave function and report results for energy levels for all transitions among the lowest 49 levels of the He-like ions, which belong to the  $1s2$ ,  $1s2\ell$ ,  $1s3\ell$ ,  $1s4\ell$  and  $1s5\ell$  configurations. We compare our level energies with the critically evaluated data compiled by NIST [6]. The National Institute of Standards and Technology (NIST) have compiled and critically evaluated (and adjusted) energy levels for many He-like ions, and have posted data at their website <http://www.nist.gov/pml/data/asd.cfm>. The Flexible Atomic Code (FAC) is adopted for calculating energy levels.

FAC are fully relativistic codes based on solving Dirac equations, which allows its application to ions with large values of nuclear charge and it is a public-freely powerful atomic. It has modified the numerical calculation methods of several fully relativistic codes in order to encompass their strengths [7].

### Calculation method:

The fully Relativistic Configuration Interaction Approach is briefly described. The bound states of the system are calculated in the configuration mixing approximations with convenient specification of the mixing scheme. The radial orbitals for the construction of the basis states are derived from the modified self-consistent Dirac-Fock-Slater iteration on a fictitious mean configuration with fractional occupation numbers representing the average electron cloud of the configurations included in the calculation.

In atomic units, the relativistic Hamiltonian ( $H$ ) of an ion with  $N$  electrons is given by [7]:

$$H = \sum_{i=1}^N H_D(i) + \sum_{i<j}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad \dots\dots (1)$$

Where,  $H_D(i)$  is the single electron Dirac Hamiltonian of a potential attributed to the nucleus charge which should be diagonalized in order to obtain energy levels.

The approximated atomic state functions are given by [7]:

$$\psi = \sum_{\mu} b_{\mu} \phi_{\mu}$$

where,  $b_{\mu}$  are the mixing coefficients obtained from the diagonalizing the total Hamiltonian and  $\phi_{\mu}$  are the bases states which are anti-symmetric sums of the products of the  $N$  Dirac spinors ( $\phi_{nkm}$ ) that are given by [7], [8]:

$$\phi_{nkm} = \frac{1}{r} \begin{pmatrix} P_{nk}(r) \chi_{km}(\phi, \varphi, \sigma) \\ -iQ_{nk}(r) \chi_{-km}(\phi, \varphi, \sigma) \end{pmatrix}$$

where,  $P_{nk}$  and  $Q_{nk}$  are the large and small components, respectively;  $\chi_{km}$  is the spin angular function,  $n$  is the principle quantum number,  $k$  is the relativistic angular momentum which is equal to  $(l-j)$  ( $2j+1$ ),  $m$  is the magnetic quantum number  $l$  is the orbital angular momentum and  $j$  is the total angular momentum.

$P_{nk}$  and  $Q_{nk}$  satisfy the coupled Dirac equation for central field  $V(r)$ : [7]

$$\begin{aligned} \left(\frac{d}{dr} + \frac{k}{r}\right)P_{nk} &= \alpha\left(\varepsilon_{nk} - V + \frac{2}{\alpha^2}\right)Q_{nk} \\ \left(\frac{d}{dr} - \frac{k}{r}\right)Q_{nk} &= \alpha(-\varepsilon_{nk} + V)P_{nk} \end{aligned} \quad \dots\dots (2)$$

Where,  $\alpha$  is the fine structure constant and  $\varepsilon_{nk}$  is the energy eigenvalues of the radial orbitals.  $V(r)$  is the local central potential which is the sum of the nuclear charge contribution potential ( $V_N(r)$ ) and the electron-electron interaction potential ( $V_{ee}(r)$ ).

$V_N(r)$  is given by [7]:

$$\begin{cases} \frac{Z}{2}\left(\frac{r}{R_N}\right)\left[3 - \left(\frac{r}{R_N}\right)^2\right], & r \leq R_N \\ Z, & r > R_N \end{cases} \quad \dots\dots (3)$$

Where,  $R_N$  is the statistical model radius of the nucleus calculated from the formula  $R_N = 2.2677 \times 10^{-5} A^{1/3}$  where  $A$  is the atomic mass [10]. The electron-electron interaction approximation is given by the following equation which is corrected at the asymptotic behavior (large  $r$ ) by excluding the self- interaction term [7]:

$$\begin{aligned} V_{(electron-electron)}(r) &= \frac{1}{r \sum_{nk} \omega_{nk} (P_{nk}^2(r) + Q_{nk}^2(r))} \left\{ \sum_{nk, n'k'} \omega_{nk} (\omega_{n'k'} - \delta_{nk, n'k'}) \right. \\ &* r \int_{r_>}^r (P_{n'k'}^2(r') + Q_{n'k'}^2(r')) dr' * (P_{nk}^2(r) + Q_{nk}^2(r)) + \sum_{nk} \omega_{nk} (\omega_{nk} - 1) \\ &* \sum_{K>0} - \left(1 + \frac{1}{2j_{nk}}\right) \begin{pmatrix} j_{nk} & K & j_{nk} \\ -\frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} \end{pmatrix}^2 * r \int_{r_>}^{r_K} (P_{nk}^2(r') + Q_{nk}^2(r')) dr' * \\ &(P_{nk}^2(r) + Q_{nk}^2(r)) + \sum_{nk \neq n'k'} \sum_K - \omega_{nk} \omega_{n'k'} \begin{pmatrix} j_{nk} & K & j_{nk} \\ -\frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} \end{pmatrix}^2 \\ &* r \int_{r_>}^{r_K} (P_{nk}(r')P_{n'k'}(r') + Q_{nk}(r')Q_{n'k'}(r')) dr' \\ &* (P_{nk}(r)P_{n'k'}(r) + Q_{nk}(r)Q_{n'k'}(r)) \Big\} \end{aligned} \quad \dots\dots (4)$$

Where [7]:

$$\begin{pmatrix} j_1 & j_2 & j_3 \\ m_1 & m_2 & m_3 \end{pmatrix}$$

is the Wigner 3  $j$  symbol and  $r_<$  and  $r_>$  are the less or grater of  $r$  and  $r'$ . The electron-electron interaction contribution to the average energy  $E_{e-e}$  is given by [7]:



$$E_{e-e} = \frac{1}{2} \sum_{nk} \omega_{nk} \langle n'k' | V_{e-e} | nk \rangle = \frac{1}{2} \sum_{nk} \omega_{nk} \int V_{e-e}(r) P_{nk}^2 + Q_{nk}^2(r) dr \quad \dots\dots (5)$$

The factor  $\frac{1}{2}$  is introduced in order to avoid double counting of electron pairs in the summation.

Equation 2 is solved by constructing a self-consistent iteration, in which the orbital wave function from the previous step is used to derive the potential. It is converted to a Schrödinger-like equation by eliminating the small component and performing the following transformation [7], [9]:

$$P_{nk} = \sqrt{1 + \frac{\alpha^2}{2} (\epsilon_{nk} - V(r))} F_{nk}(r)$$

$$Q_{nk} = \frac{\alpha}{2 \left( 1 + \frac{\alpha^2}{2} (\epsilon_{nk} - V(r)) \right)} \left( \frac{d}{dr} P_{nk} + \frac{K}{r} P_{nk} \right) \quad \dots\dots (6)$$

Equation 3 is rewritten as [7]:

$$\frac{d^2}{dr^2} F_{nk} + \left\{ 2[\epsilon_{nk} - U(r)] - \frac{K(K+1)}{r^2} \right\} F_{nk} = 0 \quad \dots\dots (7)$$

Where,  $U(r)$  is an effective potential defined as [7]:

$$U(r) = V(r) - \frac{\alpha^2}{2} \left\{ [V(r) - \epsilon_{nk}]^2 - \frac{1}{4 \left( 1 + \frac{\alpha^2}{2} (\epsilon_{nk} - V(r)) \right)} \left[ \frac{d^2}{dr^2} V(r) + \frac{3\alpha^2}{4 \left( 1 + \frac{\alpha^2}{2} (\epsilon_{nk} - V(r)) \right)} \left( \frac{d^2}{dr^2} V(r) \right)^2 - \frac{2K}{r} \frac{d}{dr} V(r) \right] \right\} \quad \dots\dots(8)$$

Another transformation may be performed [7]:

$$t = t(r) \quad \dots\dots (9)$$

$$F_{nk}(r) = \left( \frac{d}{dr} \right)^{\frac{1}{2}} G_{nk}(t) \quad \dots\dots\dots (10)$$

Where  $t(r)$

Therefore, Eq. 7 becomes a Schrödinger-like form given by [7]:

$$\frac{d^2}{dt^2} G_{nk}(t) = \left( \frac{dt}{dr} \right)^{-2} G_{nk}(t)$$

$$\left\{ \frac{K(K+1)}{r^2} - [\epsilon_{nk} - U(r)] + \frac{1}{2} \left( \frac{dt}{dr} \right)^{-1} \frac{d^3 t}{dr^3} - \frac{3}{4} \left( \frac{dt}{dr} \right)^{-2} \left( \frac{d^2 t}{dr^2} \right)^2 \right\} G_{nk}(t) = 0 \quad \dots\dots (11)$$

The used form of  $t(r)$  is [7]:

$$t(r) = c_1 \sqrt{r} + c_2 \ln(r) \quad \dots (12)$$

This form covers larger radial distance than a linear form for a given number of grid points does. The standard Numerov method is used to solve the Schrödinger like equation after the performed transformations (Eq. 7). The minimum and maximum distances on the radial grid are chosen to be within the nuclear charge distribution and the excited states to be below shell number 20 and the bound energies are less than the Coulomb potential at  $r_{\max}$  such that:  $r_{\min} = 10^{-6}/Z_{\text{eff}}$  and  $r_{\max} = 500/Z_{\text{eff}}$ ,  $Z_{\text{eff}}$  is the effective charge of the ion that the electron experiences at large  $r$  [7].

## RESULTS AND DISCUSSIONS

For checking the accuracy of the present work, this comparison had been made with theoretical data produced by [10] for Ca XIX in calculated energy levels among the lowest 49 levels and good accurate results are obtained, as it shown in table (1). Hence the results from [10] will be helpful in assessing the accuracy of our energy levels.

Table (2) shows the energy levels (in Ryd) of Ti XXI, V XXII and Cr XXIII.

Table-1. Energy levels (in Ryd) of Ca XIX.

Index	Configuration	term	Energy (NIST)	Energy (Ref.[10])	Energy (Present)
1	$1s^2$	$^1S_0$	0.00000	0.00000	0.00000
2	$1s2s$	$^3S_1$	283.7882	283.68921	283.6945
3	$1s2p$	$^3P_0^0$	285.3436	285.28061	285.283072
4	$1s2p$	$^3P_1^0$	285.4185	285.35190	285.3547317
5	$1s2s$	$^1S_0$	285.4858	285.43976	285.4457524
6	$1s2p$	$^3P_2^0$	285.7404	285.67554	285.6785417
7	$1s2p$	$^1P_1^0$	286.8105	286.79581	286.7988347
8	$1s3s$	$^3S_1$	335.9927	335.90472	335.902635
9	$1s3p$	$^3P_0^0$	336.4222	336.33923	336.3384592
10	$1s3p$	$^3P_1^0$	336.4422	336.36057	336.359671
11	$1s3s$	$^1S_0$	336.4392	336.36319	336.3609381
12	$1s3p$	$^3P_2^0$	336.5387	336.45746	336.4565091
13	$1s3d$	$^3D_1$		336.68375	336.6835869
14	$1s3d$	$^3D_2$		336.68341	336.6838853

Energy Levels for Transitions in He-Like Ti XXI, V XXII and Cr XXIII by Fully Relativistic Configuration-Interaction Approach Wave Function

Raad					
15	$1s3d$	$^3D_3$		336.72141	336.7215629
16	$1s3d$	$^1D_2$		336.73608	336.7362428
17	$1s3p$	$^1P_1^0$	336.8303	336.75745	336.7565041
18	$1s4s$	$^3S_1$	354.0334	353.93887	353.9372558
19	$1s4p$	$^3P_0^0$	354.2116	354.10986	354.1092558
20	$1s4s$	$^1S_0$	354.2143	354.12442	354.1225716
21	$1s4p$	$^3P_1^0$	354.2200	354.11896	354.1182138
22	$1s4p$	$^3P_2^0$	354.2608	354.16010	354.1592702
23	$1s4d$	$^3D_1$		354.26810	354.2682805
24	$1s4d$	$^3D_2$		354.26846	354.2686252
25	$1s4d$	$^3D_3$		354.28387	354.284018
26	$1s4f$	$^3F_2^0$		354.28183	354.2808575
27	$1s4f$	$^3F_3^0$		354.28073	354.2819167
28	$1s4d$	$^1D_2$		354.29150	354.2916493
29	$1s4p$	$^1P_1^0$	354.3797	354.28232	354.2815051
30	$1s4f$	$^3F_4^0$		354.28983	354.2899743
31	$1s4f$	$^1F_3^0$		354.29071	354.2908717
32	$1s5s$	$^3S_1$	362.3324	362.23334	362.2320784
33	$1s5p$	$^3P_0^0$	362.4225	362.31870	362.3181769
34	$1s5s$	$^1S_0$	362.4228	362.32654	362.3250785
35	$1s5p$	$^3P_1^0$	362.4269	362.32333	362.3227486
36	$1s5p$	$^3P_2^0$	362.4477	362.34439	362.3437427
37	$1s5d$	$^3D_1$		362.40491	362.4050766
38	$1s5d$	$^3D_2$		362.40521	362.4053456
39	$1s5d$	$^3D_3$		362.41296	362.4131004
40	$1s5f$	$^3F_2^0$		362.40927	362.4088684
41	$1s5f$	$^3F_3^0$		362.40872	362.4093946
42	$1s5d$	$^1D_2$		362.41721	362.4173274
43	$1s5p$	$^1P_1^0$	362.5078	362.40604	362.405339
44	$1s5f$	$^3F_4^0$		362.41339	362.4135032
45	$1s5f$	$^1F_3^0$		362.41385	362.4139854
46	$1s5g$	$^3G_3$		362.41357	362.4133525
47	$1s5g$	$^3G_4$		362.41324	362.4136804
48	$1s5g$	$^3G_5$		362.41605	362.4161712
49	$1s5g$	$^1G_4$		362.41629	362.4164321



Table-2. Energy levels (in Ryd) of (a)Ti XXI (b)V XXII and (c)Cr XXIII

(a) Ti XXI

Index	Configuration	term	Energy (NIST)	Energy (present)
1	$1s^2$	$^1S_0$	0.00	0.00
2	$1s\ 2s$	$^3S_1$	345.58782	345.4870849
3	$1s2p$	$^3P_0^0$	347.32725	347.2599113
4	$1s2p$	$^3P_1^0$	347.42293	347.3582113
5	$1s2s$	$^1S_0$	347.48107	347.4394222
6	$1s2p$	$^3P_2^0$	347.92741	347.8587048
7	$1s2p$	$^1P_1^0$	349.09128	349.068561
8	$1s3s$	$^3S_1$	409.26744	409.1714302
9	$1s3p$	$^3P_0^0$	409.74722	409.6582037
10	$1s3p$	$^3P_1^0$	409.77520	409.6869527
11	$1s3s$	$^1S_0$	409.76918	409.6827008
12	$1s3p$	$^3P_2^0$	409.92583	409.8367966
13	$1s3d$	$^3D_1$	410.19019	410.0911093
14	$1s3d$	$^3D_2$	410.18809	410.0897091
15	$1s3d$	$^3D_3$	410.24751	410.1481656
16	$1s3d$	$^1D_2$	410.26281	410.1650423
17	$1s3p$	$^1P_1^0$	410.24031	410.1606853
18	$1s4s$	$^3S_1$	431.2890	431.190579
19	$1s4p$	$^3P_0^0$	431.4904	431.383507
20	$1s4s$	$^1S_0$	431.4995	431.3973468
21	$1s4p$	$^3P_1^0$	431.5661	431.4591063
22	$1s4p$	$^3P_2^0$	431.5023	431.3955902
23	$1s4d$	$^3D_1$	431.6772	431.5792487
24	$1s4d$	$^3D_2$	431.676	431.5792428
25	$1s4d$	$^3D_3$	431.7018	431.6031262
26	$1s4f$	$^3F_2^0$	431.6991	431.6021023
27	$1s4f$	$^3F_3^0$		431.6006603
28	$1s4d$	$^1D_2$	431.7082	431.6117711
29	$1s4p$	$^1P_1^0$		431.5910643
30	$1s4f$	$^3F_4^0$		431.6142693
31	$1s4f$	$^1F_3^0$		431.6154622
32	$1s5s$	$^3S_1$	441.4250	441.3208651
33	$1s5p$	$^3P_0^0$	441.5237	441.4175386



34	$1s5s$	$^1S_0$	441.5326	441.4246364
35	$1s5p$	$^3P_1^0$	441.5663	441.4561901
36	$1s5p$	$^3P_2^0$	441.5335	441.4236963
37	$1s5d$	$^3D_1$		0.44152318
38	$1s5d$	$^3D_2$		0.441523305
39	$1s5d$	$^3D_3$		0.441535368
40	$1s5f$	$^3F_2^0$		441.5315321
41	$1s5f$	$^3F_3^0$		441.5322531
42	$1s5d$	$^1D_2$		0.441540133
43	$1s5p$	$^1P_1^0$	441.6337	441.5226799
44	$1s5f$	$^3F_4^0$		441.538463
45	$1s5f$	$^1F_3^0$		441.5390988
46	$1s5g$	$^3G_3$		441.5383263
47	$1s5g$	$^3G_4$		441.5387687
48	$1s5g$	$^3G_5$		441.5425253
49	$1s5g$	$^1G_4$		441.5428773

(b) V XXII

Index	Configuration	term	Energy (NIST)	Energy (present)
1	$1s^2$	$^1S_0$	0.00	0.00
2	$1s2s$	$^3S_1$	378.80351	378.7011418
3	$1s2p$	$^3P_0^0$	380.63743	380.5685647
4	$1s2p$	$^3P_1^0$	380.7465	380.6808942
5	$1s2s$	$^1S_0$	380.79873	380.755998
6	$1s2p$	$^3P_2^0$	381.36481	381.2944845
7	$1s2p$	$^1P_1^0$	382.57160	382.5468199
8	$1s3s$	$^3S_1$	448.65969	448.5623955
9	$1s3p$	$^3P_0^0$	449.16553	449.0752764
10	$1s3p$	$^3P_1^0$	449.1972	449.1079348
11	$1s3s$	$^1S_0$	449.18868	449.1006783
12	$1s3p$	$^3P_2^0$	449.38196	449.2917167
13	$1s3d$	$^3D_1$	449.65990	449.5595759
14	$1s3d$	$^3D_2$	449.65707	449.5574526
15	$1s3d$	$^3D_3$	449.72933	449.6287257
16	$1s3d$	$^1D_2$	449.74592	449.6468049
17	$1s3p$	$^1P_1^0$	449.70792	449.627033
18	$1s4s$	$^3S_1$	472.8255	472.7261776

19	$1s4p$	$^3P_0^0$	473.0378	472.9298196
20	$1s4s$	$^1S_0$	473.0469	472.9438835
21	$1s4p$	$^3P_1^0$	473.1289	473.0214084
22	$1s4p$	$^3P_2^0$	473.0515	472.943516
23	$1s4d$	$^3D_1$	473.2456	473.1471448
24	$1s4d$	$^3D_2$	473.2447	473.1469074
25	$1s4d$	$^3D_3$	473.2738	473.1761201
26	$1s4f$	$^3F_2^0$		473.1740071
27	$1s4f$	$^3F_3^0$		473.1756703
28	$1s4d$	$^1D_2$	473.2829	473.1853178
29	$1s4p$	$^1P_1^0$	473.2675	473.1580292
30	$1s4f$	$^3F_4^0$		473.1904009
31	$1s4f$	$^1F_3^0$		473.1917636
32	$1s5s$	$^3S_1$	483.9493	483.8442385
33	$1s5p$	$^3P_0^0$	484.05376	483.9463245
34	$1s5s$	$^1S_0$	484.0623	483.9535002
35	$1s5p$	$^3P_1^0$	484.0641	483.9532995
36	$1s5p$	$^3P_2^0$	484.1042	483.9931527
37	$1s5d$	$^3D_1$		484.0629911
38	$1s5d$	$^3D_2$		484.0630043
39	$1s5d$	$^3D_3$		484.0777827
40	$1s5f$	$^3F_2^0$		484.0741467
41	$1s5f$	$^3F_3^0$		484.0749795
42	$1s5d$	$^1D_2$		484.0828394
43	$1s5p$	$^1P_1^0$	484.174	484.0619923
44	$1s5f$	$^3F_4^0$		484.0825021
45	$1s5f$	$^1F_3^0$		484.0832253
46	$1s5g$	$^3G_3$		484.0823742
47	$1s5g$	$^3G_4$		484.082882
48	$1s5g$	$^3G_5$		484.0874279
49	$1s5g$	$^1G_4$		484.0878322



(b) Cr XXIII

Index	Configuration	term	Energy (NIST)	Energy (present)
1	$1s^2$	$^1S_0$	0.00	0.00
2	$1s2s$	$^3S_1$	413.57044	413.4665709
3	$1s2p$	$^3P_0^0$	415.50050	415.4303284
4	$1s2p$	$^3P_1^0$	415.62307	415.5567843
5	$1s2s$	$^1S_0$	415.66909	415.6253564
6	$1s2p$	$^3P_2^0$	416.37450	416.3027472
7	$1s2p$	$^1P_1^0$	417.62303	417.5963337
8	$1s3s$	$^3S_1$	489.8981	489.7992125
9	$1s3p$	$^3P_0^0$	490.43035	490.3386456
10	$1s3p$	$^3P_1^0$	490.46589	490.3751994
11	$1s3s$	$^1S_0$	490.45477	490.3648861
12	$1s3p$	$^3P_2^0$	490.69033	490.598697
13	$1s3d$	$^3D_1$	490.98194	490.8801564
14	$1s3d$	$^3D_2$	490.97829	490.8771878
15	$1s3d$	$^3D_3$	491.0654	490.963243
16	$1s3d$	$^1D_2$	491.08327	490.9825981
17	$1s3p$	$^1P_1^0$	491.02768	490.9451888
18	$1s4s$	$^3S_1$	516.3102	516.2098116
19	$1s4p$	$^3P_0^0$	516.534	516.4243439
20	$1s4s$	$^1S_0$	516.5435	516.4386056
21	$1s4p$	$^3P_1^0$	516.6438	516.5343516
22	$1s4p$	$^3P_2^0$	516.5490	516.4396405
23	$1s4d$	$^3D_1$	516.7668	516.6657157
24	$1s4d$	$^3D_2$	516.7650	516.6651814
25	$1s4d$	$^3D_3$	516.8014	516.700557
26	$1s4f$	$^3F_2^0$		516.6988011
27	$1s4f$	$^3F_3^0$		516.7007069
28	$1s4d$	$^1D_2$	516.8087	516.7103382
29	$1s4p$	$^1P_1^0$	516.7859	516.6755432
30	$1s4f$	$^3F_4^0$		516.7183775
31	$1s4f$	$^1F_3^0$		516.7199261
32	$1s5s$	$^3S_1$	528.4684	528.3625653
33	$1s5p$	$^3P_0^0$	528.5790	528.4701512
34	$1s5s$	$^1S_0$	528.5877	528.4773908
35	$1s5p$	$^3P_1^0$	528.6388	528.526399

36	$1s5p$	$^3P_2^0$	528.5905	528.4779354
37	$1s5d$	$^3D_1$		528.5989752
38	$1s5d$	$^3D_2$		528.5991001
39	$1s5d$	$^3D_3$		528.6168905
40	$1s5f$	$^3F_2^0$		528.6134566
41	$1s5f$	$^3F_3^0$		528.6144136
42	$1s5d$	$^1D_2$		528.6222559
43	$1s5p$	$^1P_1^0$	528.7117	528.5975434
44	$1s5f$	$^3F_4^0$		528.6234444
45	$1s5f$	$^1F_3^0$		528.6242646
46	$1s5g$	$^3G_3$		528.6233268
47	$1s5g$	$^3G_4$		528.6239074
48	$1s5g$	$^3G_5$		528.6293544
49	$1s5g$	$^1G_4$		528.629816

## CONCLUSIONS

Motivated by the need for accurate transition data in a variety of scientific applications, fully relativistic configuration – interaction approach wave function is used to calculate energy levels among the lowest 49 levels of Ti XXI, V XXII and Cr XXIII belonging to the  $n \leq 5$  configurations. The Flexible Atomic Code (FAC) is adopted for calculating energy levels. In this paper we have good accurate results by comparing it with NIST as it shown in table (2). The energy values are reported with respect to the ground state energy for the configuration  $1s^2$  which appears as  $(0.0 \text{ e}^0)$  in the table (2). Each level is assigned an index number which is used in the transition table to refer to its energy level value. The level orderings from present work are agreement with calculations from NIST, but differ in some instances, particularly for the  $n = 5$  levels. This is mainly because the degeneracy among the levels of the  $n = 5$  configurations is very small. Lines from He-like ions have been observed in a variety of plasmas by rockets and satellites [1, 11–13]. Additionally, the transitions are important for studies of laboratory and fusion plasmas [14], [15]. Therefore, atomic data for He-like ions are required for the modeling and diagnostics of a variety of plasmas, so we believe that the present results for energy levels for transitions of He-like ions Ti XXI, V XXII and Cr XXIII will be highly useful for the modeling of a variety of plasmas.



## REFERENCES

1. Dere K. P., Landi E., Young P. R. and Del Zanna G., *Astrophys. J. Suppl.*, **134**: 331, (2001).
2. Gabriel A. H. and Jordan C., *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, **145**: 241, (1969).
3. Porquet D., Mewe R., Dubau J., Raassen A. J. J. and Kaastra J. S., *Astron. Astrophys.*, **376**: 1113, (2001).
4. Gavrilov V. V., Gol'tsov A., Yu Koval'skii N. G., Koptyaev S. N., Magunov A. I., Pikuz T. A., Skobelev I. Yu and Faenov A. Ya, *Quantum Electron.*, **31**: 1071, (2001).
5. Coffey I. H., Keenan F. P., McAdam C. E., Barnsley R., Dickson W. J., Lawson K. D. and Peacock N. J. *Phys. Scr.*, **47**: 169, (1993).
6. Ralchenko, Yu., Kramida, A.E., Reader, J., and NIST ASD Team *NIST Atomic Spectra Database* (ver. 4.1.0), [Online]. Available: <http://physics.nist.gov/asd> [2012, March 19]. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, (2011).
7. M.F. Gu, *Can. J. Phys.*, **86**:675-689, (2008).
8. H. Hou, F. Kong, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **111**: 2505–2508, (2010)
9. L.V. Chernysheva, V.L. Yakhontov, *Comput. Phys. Commun.*, **119**:232-255, (1999).
- 10.K. M. Aggarwal, F. P. Keenan, *Phys. Scr.*, **85**: 025306, (2012).
- 11.Landi E. and Phillips K. J. H., *Astrophys. J. Suppl.*, **160**: 286, (2005).
- 12.Kepa A., Sylwester J., Sylwester B., Siarkowski M., Phillips K. J. H. and Kuznetsov V. D., *Ad. Space Res.*, **38**:1538, (2006).
- 13.Rodes-Roca J. J., Page K. L., Torrejon J. M., Osborne J. P. and Bernabeu G., *Astron. Astrophys.*, **526**: A64, (2011).
- 14.Keenan F. P., *Phys. Scr.*, **43**: 144, (1991).
- 15.Keenan F. P., McCann S. M., Kingston A. E., Barnsley R., Dunn J. and Peacock N. J., *Phys. Rev. A*, **44**: 3831, (1991).

## Structural and Mechanical Differences Between Neat and UV Stabilized Polyamide 6,6 Subjected to Heat Treatment

Nabil N. Rammo and May A. Mohammad

Physics Department, College of Education Ibn AlHaytham, Baghdad University

Received 29/12/2012 – Accepted 4/12/2012

### الخلاصة

درس في هذا العمل نوعين من البولي اميد 6,6 النظيف والمستقر بأسود الكربون محضرة بطريقة صب المحلول كإفلام رقيقة ، بواسطة حيود الأشعة السينية والاختبارات الميكانيكية ونمط الكسر بدلالة درجات حرارة مختلفة للدورة الحرارية. يبين كلا النوعين تغير في الشدة المستطارة من المستويات القاعدية (100) و (110) / (010) عند تغير درجة حرارة الدورة الحرارية. علاوة على ذلك فإن مقياس الحقول البلورية (البُلات) المنشأ على أساس تحليل العرض المتكامل بدلاً من مجرد استخدام العرض الكلي عند منتصف الشدة (FWHM) في تعيين مقياس البُلات، يظهر نقصاً بنتيجة الدورة الحرارية. تظهر مقاومة الشد ومعامل المرونة تحسن بالمعاملة الحرارية على حساب فقد بعض من التمتطية للبوليمر وكذلك جلب تغير في نمط الكسر من مطيلي إلى هش.

### ABSTRACT

In this study two modifications of polyamide 6,6 (neat and UV stabilized) prepared from solution cast as films and strips have been studied by X-ray diffraction (XRD) and mechanical testing (MT) subject to different temperature heating cycle. Both modifications show variation in the scattered X-ray intensity of the basal planes (100) and (010/110) as the temperature of the heating cycle is changed. Moreover, the domains (crystallites) size based on the analysis of integral breadth instead of mere FWHM has been included in the crystallite size determination, appear to narrow down as a result of the heating cycle. The tensile strength and elastic modulus improve upon heat treatment on the expense of losing some of the stretchability in the polymer and also bringing a change in the fracture mode from ductile to brittle.

### INTRODUCTION

Polyamides or nylons are the first engineering thermoplastics and still represent the most important class of these type of materials. Polyamides and in particular polyamide 6,6 with the nomenclature designating the number of carbon atoms separating the repeating amide group, are synthesized by condensation polymerization of hexamethylenediamine and adipic acid [1]. The chemical structure of the repeat unit of polyamide 6,6 is presented in Figure 1 [1].

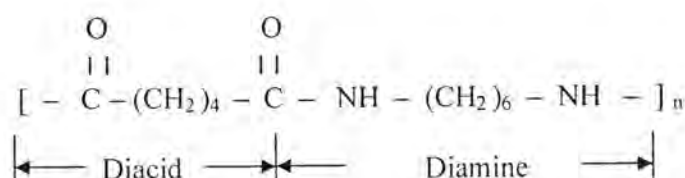


Figure-1: Repeat unit of polyamide 6,6 [1]

It is crystalline and the spherulitic structure observed is composed of chain folded lamellae, which are in turn composed of stacks of crystalline sheets held together by Van der Waals interactions. Two triclinic structures,  $\alpha$  and  $\beta$  for the crystalline domains forming the sheets, where the  $\alpha$  structure contains one chain per unit cell, and the  $\beta$  structure contains two chains per unit cell [2]. The crystal unit cells dimensions are given in Table 1 [3].

Table-1: Crystal phase unit cells and dimensions for polyamide 6,6 [3]

Phase	Unit cell	a (nm)	b (nm)	c (nm)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)
$\alpha_p$	triclinic	0.49	0.525	1.73	50	77	64
$\beta_p$	triclinic	0.49	0.801	1.73	90	77	66

Polyamides can be produced via a variety of techniques including injection molding, extrusion, blow molding and solution coating. Solution coating is utilized to produce membranes and films of polyamide 6,6 by a standard wet phase inversion process provided a suitable solvent is incorporated [4]. The crystalline nature of polyamide 6,6 and the high melt temperature of the crystal make it a good candidate for applications where properties such as high strength, excellent chemical and abrasion resistance and toughness are desired [5,6].

The work aims at shedding some light on the behavior of polyamide 6,6 molded from solution by employing two types of polyamide 6,6 – neat and UV stabilized by carbon black – as films and strips, subjected to different temperatures heating cycle and characterized by XRD, crystallite size analysis and mechanical testing.

#### Crystallite size analysis

Broadened diffraction peaks observed in powder diffractogram are related to crystallite size by the Scherrer formula [8].

$$\langle D_{hkl} \rangle_v = k \lambda / \beta \cos \theta \quad (1)$$

where  $\langle D_{hkl} \rangle_v$  is the volume-weighted domain (crystallite) size,  $k$  is the Scherrer constant,  $\lambda$  is the X-ray wavelength,  $\beta$  is the integral breadth of a reflection (hkl) (in radians) located at  $2\theta$ , defined as the width of a rectangle with the same height and area as the diffraction peak [9].  $\theta$  is the Bragg angle. By the same token  $\beta$  is related to the full width at half maximum FWHM ( $\Gamma$ ) for Gaussian peak shape by:

$$\beta = (\pi / 4 \ln 2)^{1/2} \Gamma \quad (2)$$

Correction for instrumental effect is based on the formula of Gaussian peak shape [10] as:

$$\beta = (\beta_{obs}^2 - \beta_{inst}^2)^{1/2} \quad (3)$$

where  $\beta_{obs}$  is the observed experimental integral breadth of a peak and  $\beta_{inst}$  is the integral breadth of the instrumental profile determined from

a separate scan of standard Si (SRM 640c) for the (111) peak at  $2\theta = 28.44$  deg.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials, preparation and treatment

Pellets of polyamide 6,6 (neat and UV stabilized by carbon black) were obtained from GSRC India. Formic acid and phenol from BDH UK. A casting solution was prepared by dissolving polyamide 6,6 pellets in a mixture of 1 : 1 vol. of formic acid and phenol at about 350 K. The solution was then cast onto a glass substrate incorporated with a mold that can shape the cast into film and strip with the desired thickness and dimension. The cast molds were left in a fume hood for slow evaporation of the solvents.

The prepared specimens were heat treated in  $10^{-2}$  torr vacuum oven Hearous Germany at temperatures from 300 K and up to 473 K for 30 minutes duration. Suitable loads were applied to the specimens at temperatures above 373 K to prevent films and strips from puckering.

### Testing methods

X-ray diffraction scans were performed on Shimadzu 6000 diffractometer fitted with monochromatic Cu K $\alpha$ 1 radiation at a scan speed of  $0.1 \text{ deg. s}^{-1}$  and  $2\theta$  angle between 5 to 30 degrees. Tensile tests on strips of polyamide 6,6 were performed according to ASTM 638 on a tensile testing machine H50KT from Tenius Olsen UK at a cross head speed of 5 mm / min.

## RESULTS AND DISCUSSION

### XRD

Wide angle X-ray diffraction (WAXRD) has been applied in the crystal structure evaluation of polyamide 6,6 films. Spectra of the polymers at three different temperatures are displayed in Figure 2 and 3 for neat and UV stabilized specimens respectively. Four distinct peaks are observed in the spectra, these were indexed by utilizing the unit cell of the  $\alpha_p$  phase given in Table 1 and the equation of interplaner spacing for triclinic system taken from [7]. The results are shown in Table 2.

Table-2: Miller indices (hkl) assigned for peaks in XRD spectrum for neat polyamide 6,6

Values from XRD spectrum		Values from unit cell	Miller indices
$2\theta_{\text{obs.}} \text{ (deg.)}$	$d_{\text{obs.}} \text{ (nm)}$	$d_{\text{calc.}} \text{ (nm)}$	hkl
6.71	1.2974	1.2824	(001)
13.64	0.6487	0.6412	(002)
20.16	0.4400	0.4389	(100)
24.16	0.3681	$\left\{ \begin{array}{l} 0.3690 \\ 0.3641 \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} (010) \\ (110) \end{array} \right\}$



The intensity of the (001) and (002) planes remain nearly unchanged in the neat polymer with increasing the heat treatment temperature up to 473 K, whereas the  $\{(010) / (110)\}$  planes start to decrease in intensity in favor of the increase in intensity of the (100). This is due to possible re-orientation in the molecular chains caused by the heating cycle. As for the UV stabilized, the behavior is different, the intensities of  $\{(010) / (110)\}$  and (100) planes remain nearly unchanged with the increase of treatment temperature to 473 K. The reason is that the carbon black particles are sited at the inter-chain positions preclude the re-orientation and relaxation of the molecular chains due to increased temperature.

Evaluation of volume-weighted crystallite size for the broadened peaks after correction for instrumental effect are given in Table 3.

Table-3: Volume-weighted crystallite size of neat and UV stabilized polyamide 6,6

(nm)		$\langle D_{(002)} \rangle_v$ (nm)	$\langle D_{(100)} \rangle_v$ (nm)	$\langle D_{(010/110)} \rangle_v$
neat	RT	5.9	6.1	5.9
	423 K	5.8	5.9	5.5
	473 K	5.8	5.6	5.3
UV	RT	5.9	6.8	6.5
	423 K	5.9	6.3	6.0
	473 K	5.8	-	5.2

It is noted that the crystallite size in the UV stabilized has enlarged slightly in the basal plane (ab), an indication that the particles in the UV stabilized specimens are located at the inter-chain sites. Moreover, heat treatment of both neat and UV stabilized specimens has caused the crystallite size to decrease due to loss of crystalline domains in favor of the progress of amorphous domains.

### Mechanical behavior

Figures 4, 5 and 6 show the mechanical behavior of neat and UV stabilized polyamide 6,6 in terms of tensile strength, elastic modulus and elongations respectively. Elongations are deduced at yield point, maximum stress and break point.

Both modifications show increased stress and elastic modulus with higher treatment temperature on the account of decrease in elongation, an indication to the transformation of some amorphous regions into crystalline by the effect of heat treatment. Elongation of specimens at the yield point especially at the highest treatment temperature shows a behavior where the mechanism of deformation changes from elastic – viscoelastic to elastic – plastic equivalent to the behavior seen in metals

(steel) [11], reflecting good toughness of both modifications of polyamide 6,6.

### Morphology of fracture

Strips of polyamide 6,6 fractured in the tensile test exhibited certain features that can be correlated with the mechanical behavior and heat treatment temperatures. At 323 K the fracture mode is elastic denoted by pronounced necking in the tested specimen, and this necking is progressively diminished as treatment temperature is raised (373 K and 423 K ) and at the highest treatment temperature of 473 K the fracture mode becomes brittle as shown in Figure 7. The elastic fracture mode is associated with high elongation and low stress and modulus whereas the brittle fracture mode is associated with low elongation and high stress and elastic modulus as revealed by the mechanical behavior.

## CONCLUSIONS

1. Details of the procedure of preparing polyamide 6,6 films from solution need to be scrutinized and elaborated in order to obtain premium quality films.
2. XRD results indicate that particles in UV stabilized polymer locate in the molecular inter-chain positions thus giving this modification of polyamide 6,6 better mechanical behavior.
3. Heat treatment although useful in achieving higher crystalline orientation in polymers and better mechanical properties, proved to be deleterious on the fracture mode changing it from ductile to brittle.

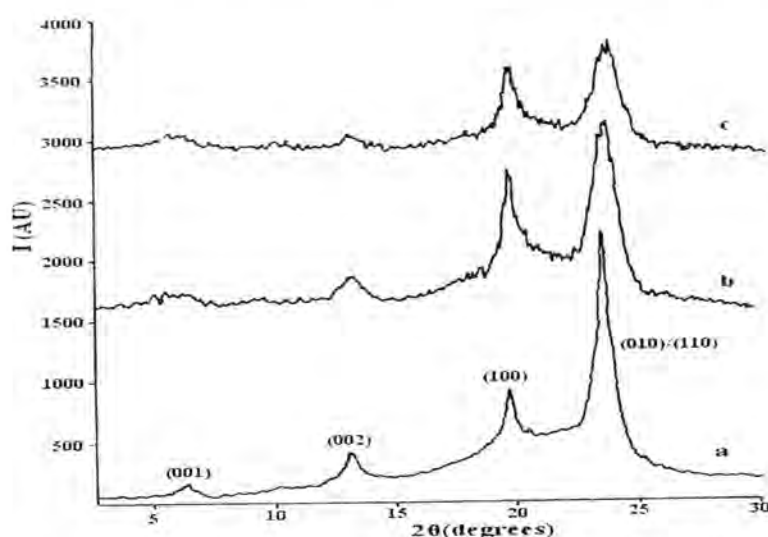


Figure-2: X-Ray diffraction spectra of neat polyamide 6,6 with peaks assigned by Miller indices  
(a) as cast mold,  
(b) and (c) as heat treated at 423 K and 473 K

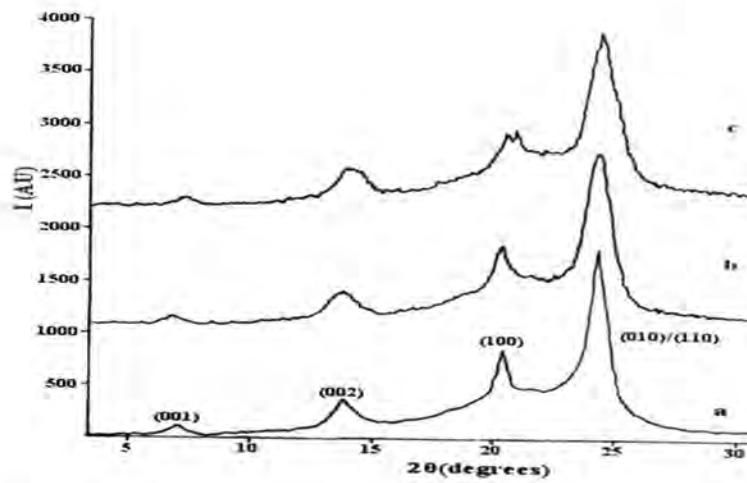


Figure-3: X-Ray diffraction spectra of UV stabilized polyamide 6,6 with peaks assigned by Miller indices  
(a) as cast mold,  
(b) and (c) as heat treated at 423 K and 473 K

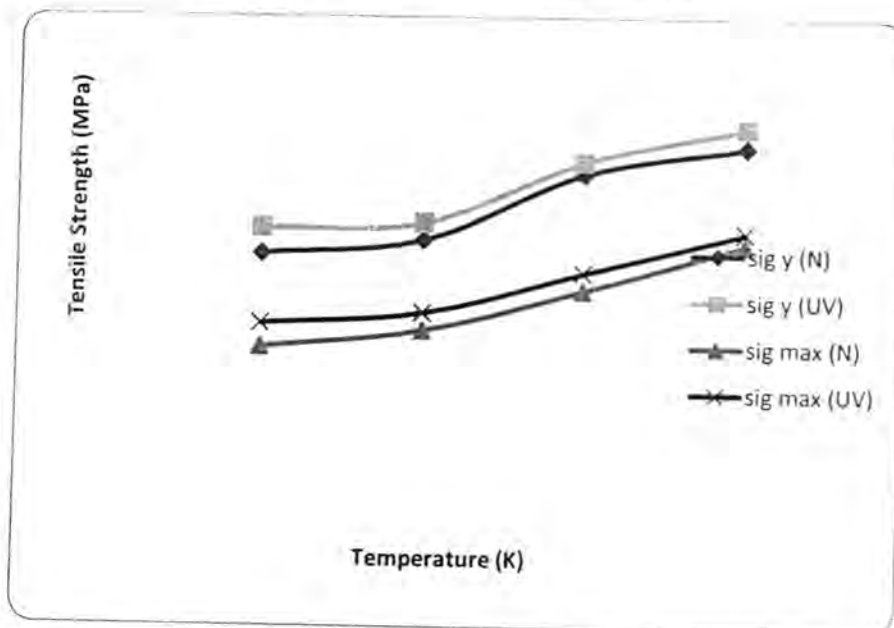


Figure- 4: Variation of tensile strength at yield ( $\sigma_y$ ) and ultimate ( $\sigma_{max}$ ) for neat (N) and UV stabilized (UV) polyamide 6,6 with heat treatment.

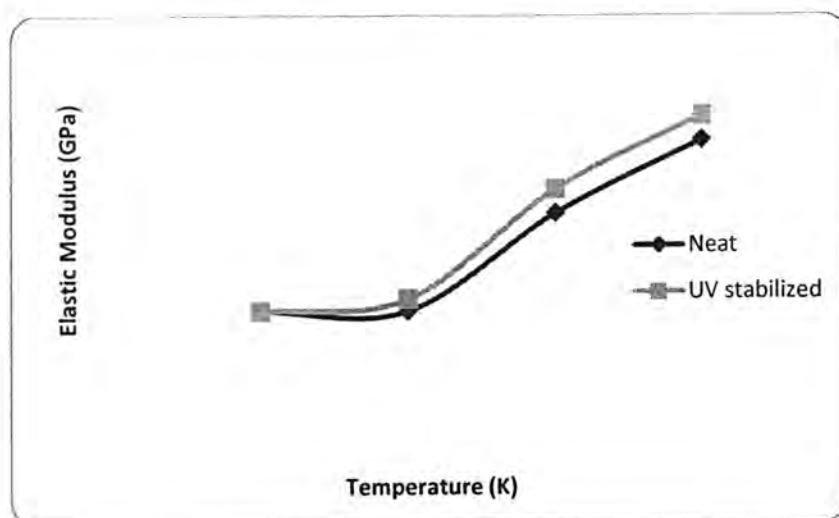


Figure-5: Variation of elastic modulus for neat and UV stabilized polyamide 6,6 with heat treatment.

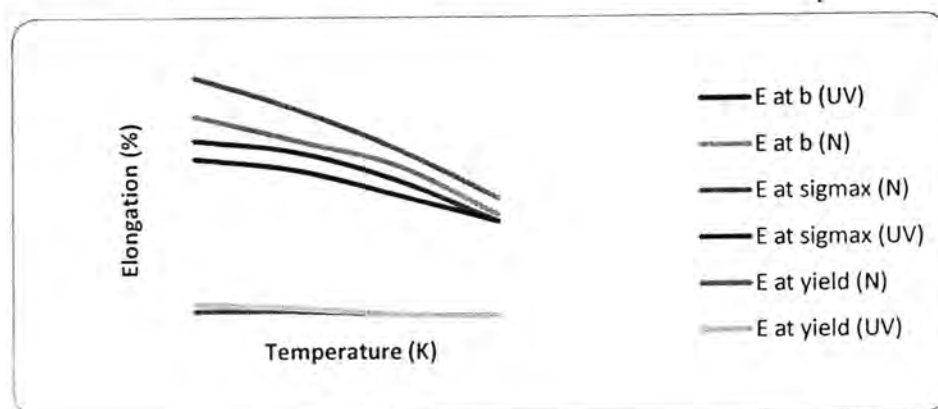


Figure-6: Variation in elongation ( $\epsilon$ ) at yield ( $\sigma_y$ ), ultimate stress ( $\sigma_{max}$ ) and break (b) for neat (N) and UV stabilized (UV) polyamide 6,6 with heat treatment.

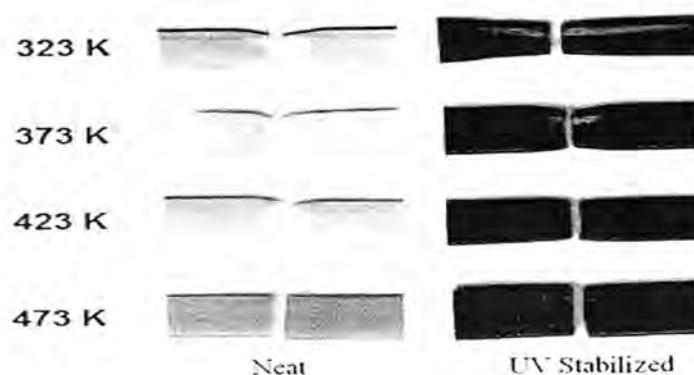


Figure-7: Photographs of fractured polyamide 6,6 at different treatment temperatures showing elastic and brittle mode of fracture.



## REFERENCES

1. Charles J. , Ramkumaar G.R., Azhagiri S. and Gunasekaran. FTIR and thermal studies on polyamide 6,6 and GFR polyamide 6,6, E- J. Chem. (2009), **6**(1), 23 -33.
2. Jones N.A. , Atkins E.D.T. and Hill M.J. Investigation of solution-grown, chain folded lamellar crystals of the even-even nylons 6,6 6,8 and 6,10, J. Polym. Sci, Part B: Polym. Phys., (2000), **38** (9): 1209 – 1221.
3. Beyer F.L. and Ziegler C. Wide-angle X-ray scattering characterization of the morphology of polyamide 6,6 obutator materials, Army Research Labioratory – TR – 3270, Aberdeen Proving Ground, MD, USA, (2004), 1 – 18.
4. Sun B.. Study of the mechanism of polyamide 6,6 dissolving process using  $\text{CaCl}_2$  / MeOH as the solvent, Chinese J. Polym. Sci., (1994), **12**(1), 57 – 65.
5. Linggu Li. , Christopher Y. Li. , Chaoying Ni. , Lixia Rong and Behjamin Hsiao. Structure and crystallization behavior of polyamide 6,6 / multi-walled carbon nanotube nanocomposites at low carbon nanotube contents, Polymer, (2007), **48**, 3452 – 3460.
6. Hdicke K. , Wittich H. , Mehler C. , Gruber F. and Altstadt V. . Crystallization behavior of polyamide 6 and 6,6 nanocomposites, Composite Sci. & Tech., (2006), **66**, 571 – 575.
7. Cullity B.D. Principles of X-ray diffraction, Addison Wesly, NY, (1978).
8. Balzar D. and Popovic S. Reliability of the simplified integral breadth in diffraction line broadening analysis, J Appl. Crys., (1996), **29**, 16 - 23.
9. Delhez R., Keijser T.H., Langford J.I., Louer D., Mittemeijer E.J., and Sonneveld E.J. The Rietveld Method. edited by R.A. Young, IUCr Monograph #5, Oxford University Press, ch.8, (1993).
10. Roe R.J. Methods of X-ray and neutron scattering in polymer science, Oxford University Press, NY, (2000).
11. Mitchell B.S. An introduction to materials engineering and science, Jonhn Wiley and Sons Inc. Publications, (2004).

## Complete and Incomplete Elliptic Curves Over the Finite Field of order 11 and 13

Emad Bakr Abdulkareem Al-Zangana

Department of Mathematics—College of Science—Al-Mustansiriyah University

Received 18/6/2012 – Accepted 4/12/2012

### الخلاصة

منحني ناقصي او منحني من الجنس الاول بالامكان اعتبارها كمنحني تكعيبي غير شاذ في المستوى. المنحنيات في المستوى يمكن تصنيفها حسب تكافؤ زمري او تكافؤ اسقاطي. في هذا البحث المنحنيات الناقصية الغير متكافئة اسقاطيا على الحقول المنتهية من الرتب 11 و 13 قد تم اعطائها و تم تحديد اذا كانت كاملة او غير كاملة. وكذلك اعظم حجم لمنحني ناقصي كامل من الدرجة الثالثة التي يمكن تشكيله من كل منحني ناقصي غير كامل قد اعطي.

### ABSTRACT

Elliptic curve or a curve of genus one can be regarded as a non-singular plane cubic curve. Plane cubics may be classified up to isomorphism or projective equivalence. In this paper, the projectively inequivalent elliptic curves over the finite field of order 11 and 13 are given and determined if they are complete or incomplete. Also, the maximum size of a complete elliptic curve that can be constructed from each incomplete ones are given.

### INTRODUCTION

Let  $F_q$  denote the Galois field of  $q$  elements and

$$V(3, q) = \{(a_1, a_2, a_3) | a_i \in F_q\}$$

be the respective vector space of row vectors of length three with entries in  $F_q$ . Let  $PG(2, q)$  be the corresponding projective plane. The points  $[a_1; a_2; a_3]$  of  $PG(2, q)$  are the one-dimensional subspaces of  $V(3, q)$ . The lines of  $PG(2, q)$  are the two-dimensional subspaces of  $V(3, q)$ .

**Definition 1:[3]** Let  $F$  be a form. A projective plane curve  $\mathcal{F}$  is the set

$$\mathcal{F} = \{[X_0; X_1; X_2] \in PG(2, q) | F(X_0, X_1, X_2) = 0\}.$$

The problem of finding the number of points on a curve over a finite field has been studied for many years. Recently, the question how many points a curve of genus  $g$  over a finite field can have, has attracted a lot of attention. This was motivated partly by possible applications in coding theory and cryptography.

**Theorem 2: [1]** For a non-singular plane curve  $\mathcal{F}$  of genus  $g$  defined over  $F_q$ , let  $N_1$  be the number of rational points  $\mathcal{F}$  over  $F_q$ . Then

$$q + 1 - g[2\sqrt{q}] \leq N_1 \leq q + 1 + g[2\sqrt{q}],$$

where  $[x]$  is the integer part of  $x \in \mathbb{R}$ . This implies that if  $\mathcal{F}$  is an elliptic curve, then

$$q + 1 - \lfloor 2\sqrt{q} \rfloor \leq N_1 \leq q + 1 + \lfloor 2\sqrt{q} \rfloor.$$

**Definition 3:[1]** A rational inflexion point  $P$  of an elliptic curve  $\mathcal{F}$  is one for which the unique tangent at  $P$  has three-point contact.

The condition that the tangent line at  $P$  has triple contact with the curve is expressed algebraically by the requirement that

$$F(X_0, X_1, X_2) = f(X_0, X_1, X_2) \cdot g(X_0, X_1, X_2) + (aX_0 + bX_1 + cX_2)^3 \cdot h(X_0, X_1, X_2),$$

where  $F$  is a form of degree  $n$  and

- (i)  $f(X_0, X_1, X_2)$  is the linear form defining the tangent line at  $P$ ,
- (ii)  $g(X_0, X_1, X_2)$  is some form of degree  $n - 1$ ,
- (iii)  $h(X_0, X_1, X_2)$  is a form of degree  $n - 3$ ,
- (iv)  $(aX_0 + bX_1 + cX_2)$  is some linear form vanishing at  $P$ . See [2].

**Definition 4: [1]** An elliptic curve  $\mathcal{F}$  is called harmonic or equianharmonic if the four tangents through a point form a harmonic or equianharmonic set. An elliptic curve which is not harmonic or equianharmonic is called general.

It is well known that any elliptic curve  $\mathcal{F}$  has nine rational inflexions over  $\bar{F}_q$ ,  $q \not\equiv 0 \pmod{3}$ . Over  $F_q$ , the possible number of rational inflexions on an elliptic curve is 0, 1, 3 or 9 [3]. An elliptic curve exist with nine rational inflexions if  $q \equiv 1 \pmod{3}$  and with three rational inflexions for all  $q$  [3].

**Theorem 5: [1][4]** If  $P_q$  is the numbers of distinct elliptic curves up to projective equivalence over  $F_q$ , then

$$P_q = 3q + 2 + \left(\frac{-4}{q}\right) + \left(\frac{-3}{q}\right)^2 + 3\left(\frac{-3}{q}\right).$$

Here the bracketed numbers are Legendre and Legendre–Jacobi symbols taking the following values:

$$\left(\frac{-4}{c}\right) = \begin{cases} 1 & \text{if } c \equiv 1 \pmod{4}, \\ 0 & \text{if } c \equiv 0 \pmod{2}, \\ -1 & \text{if } c \equiv -1 \pmod{4}; \end{cases}$$

$$\left(\frac{-3}{c}\right) = \begin{cases} 1 & \text{if } c \equiv 1 \pmod{3}, \\ 0 & \text{if } c \equiv 0 \pmod{3}, \\ -1 & \text{if } c \equiv -1 \pmod{3}. \end{cases}$$

Let  $n_i$  for  $i = 0, 1, 3, 9$  be the number of projective equivalence classes with exactly  $i$  rational inflexions. So, according to  $n_i$ ,  $P_q = n_0 + n_1 + n_3 + n_9$ .

In [5], results on curves with many points over finite fields for small genus are stated.

**Definition 6: [1]** A rational inflexional triangle is a set of three lines over  $Fq$  through the nine inflexions of  $\mathcal{F}$ .

An elliptic curve  $\mathcal{F}$  over  $Fq$ ,  $q \not\equiv 0 \pmod{3}$ , is denoted by  $\mathcal{F}_n^r$ , where  $n$  is the number of rational inflexions and  $r$  is the number of rational inflexional triangles. Here,  $\mathcal{F}_n^r = \mathcal{G}_n^r, \mathcal{H}_n^r, \mathcal{E}_n^r$  when  $\mathcal{F}$  is respectively general, equianharmonic, harmonic. Also, if  $n = 3$  and the inflexions tangent are concurrent then  $\mathcal{F} = \bar{\mathcal{E}}$  and if  $n = 0$  and  $\mathcal{F}$  is equianharmonic, write  $\mathcal{F} = \bar{\mathcal{E}}_0^4$ .

**Definition 7: [1]** A  $(k; r)$ -arc is a set of  $k$  points of a projective plane such that some  $r$ , but no  $r + 1$  of them are collinear.

**Definition 8: [1]** A  $(k; r)$ -arc is called complete if it is not contained within  $(k + 1; r)$ -arc.

**Definition 9: [1]** The maximum size of a  $(k; r)$ -arc in  $PG(2, q)$  is denoted by  $m_r(2, q)$ .

**Definition 10: [1]** Let  $\mathcal{M}$  be a set of points in any plane. An  $i$ -secant is a line meeting  $\mathcal{M}$  in exactly  $i$  points.

**Remark 11:** In the projective plane, most of elliptic curves can be regarded as an arc of degree three.

**Definition 12: [6]** A projective linear code  $C$ ,  $[n, k, d]_q$ -code, is a subspace of  $V(n + 1, q)$ , where  $k = \dim C$ ,  $d = d(x, y) = \min\{|\{i | x_i \neq y_i\}|\}$  and any two columns of a generator matrix are linearly independent. If  $d = n - k$ , then  $C$  is called AMDS code.

**Theorem 13: [6]** There exists a projective  $[n, k, d]_q$ -code if and only if there exists an  $(n; n - d)$ -arc in  $PG(k - 1, q)$ .

In [7], a full classification of arc of degree three is given in  $PG(2, 11)$ .

In [8], the maximum arc of degree three has been found in  $PG(2, 13)$ .

In this paper, after giving the canonical form of the elliptic curves and number of the rational points on each of them in  $PG(2, 11)$  and  $PG(2, 13)$ , the complete and incomplete elliptic curves are determined with stabilizer group type. The size of complete arcs of degree three that contain the incomplete ones are given. Also, the relation with AMDS codes are given.



For full details on a canonical form of an elliptic curve over a finite field see [1].

### Elliptic curves over $F_{11}$

**Theorem 14:** In  $PG(2,11)$ , the following statements are satisfied:

- (1)  $P_{11} = 32$ .
- (2)  $n_0 = 10, n_1 = 12, n_3 = 10, n_9 = 0$ .
- (3)  $N_1$  takes every value between 6 and 18.
- (4) There are 90 elliptic curve of type general with at least one inflexion and 18 of them are inequivalent.
- (5) The 32 inequivalent elliptic curves divided into 7 complete and 25 incomplete.
- (6) An elliptic curve with  $k$  points is a complete  $(k; 3)$ -arc when  $k$  have the following values: 15, 16, 17, 18.

In Tables 1, 2, 3 the columns give the symbol of each type of  $\mathcal{F}_n^r$ , the canonical form, the number of rational points  $|\mathcal{F}_n^r|$ , the description, the maximum value  $M(\mathcal{F}_n^r)$  of  $k$  for a  $(k; 3)$ -arc containing the curve and the stabilizer groups types.

Table-1: Elliptic curves with exactly three rational inflexions

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_3^2$	1	$X_0X_1X_2 + 3(X_0 + X_1 + X_2)^3$	18	Complete	18	$S_3$
	2	$X_0X_1X_2 + 4(X_0 + X_1 + X_2)^3$	9	Incomplete	20	$S_3$
	3	$X_0X_1X_2 + 6(X_0 + X_1 + X_2)^3$	9	Incomplete	19	$S_3$
	4	$X_0X_1X_2 - 4(X_0 + X_1 + X_2)^3$	15	Complete	15	$S_3$
	5	$X_0X_1X_2 - 2(X_0 + X_1 + X_2)^3$	15	Incomplete	16	$S_3$
	6	$X_0X_1X_2 - (X_0 + X_1 + X_2)^3$	6	Incomplete	19	$S_3$
$\mathcal{E}_3^2$	7	$X_2^2X_1 + X_0^3 - 2X_1^3$	12	Incomplete	18	$S_3$
$\bar{\mathcal{E}}_3^2$	8	$X_2^2X_1 + X_0^3 - X_1^3$	12	Incomplete	16	$S_3$
$\mathcal{H}_3^2$	9	$X_0X_1X_2 + (X_0 + X_1 + X_2)^3$	12	Incomplete	15	$S_3$
	10	$X_0X_1X_2 - 3(X_0 + X_1 + X_2)^3$	12	Incomplete	16	$S_3$

Table- 2: Elliptic curves with exactly one rational inflexion

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_1^0$	1	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 - 5X_1^3$	17	Complete	17	$Z_3$
	2	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 - 4X_1^3$	16	Complete	16	$Z_3$
	3	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 - 2X_1^3$	14	Incomplete	16	$Z_3$
	4	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 + 2X_1^3$	10	Incomplete	20	$Z_3$
	5	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 + 4X_1^3$	8	Incomplete	19	$Z_3$
	6	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 5X_0X_1^2 + 5X_1^3$	7	Incomplete	19	$Z_3$
	7	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 - 5X_1^3$	14	Incomplete	15	$Z_3$
	8	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 - 3X_1^3$	11	Incomplete	18	$Z_3$
	9	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 - X_1^3$	8	Incomplete	19	$Z_3$
	10	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 + X_1^3$	16	Complete	16	$Z_3$
	11	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 + 3X_1^3$	13	Incomplete	16	$Z_3$
	12	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 2X_0X_1^2 + 5X_1^3$	10	Incomplete	19	$Z_3$

Table-3: Elliptic curves with no rational inflexions

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_0^1$	1	$X_2^3 + 3(X_0^2 - 5X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + 5X_1^3)$	9	Incomplete	19	$Z_3$
	2	$X_2^3 - 2(X_0^2 - 5X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + 5X_1^3)$	9	Incomplete	20	$Z_3$
	3	$X_2^3 + 3(X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	6	Incomplete	19	$Z_3$
	4	$X_2^3 - 2(X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	15	Complete	15	$Z_3$
	5	$X_2^3 - (X_0^2 - 5X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + 5X_1^3)$	18	Complete	18	$Z_3$
	6	$X_2^3 + (X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	15	Incomplete	16	$Z_3$
$\mathcal{E}_0^2$	7	$X_2^3 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	12	Incomplete	16	$Z_3$
	8	$X_2^3 - 3(X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	12	Incomplete	18	$Z_3$
$\mathcal{H}_0^2$	9	$X_2^3 + 5(X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	12	Incomplete	17	$Z_3$
	10	$X_2^3 - 2(X_0^2 - X_0X_1 + X_1^2)X_2 - (X_0^3 - 3X_0X_1^2 + X_1^3)$	12	Incomplete	16	$Z_3$

From Remark 11, Theorem 13 and Theorem 14 the following corollary is deduced.

**Corollary 15:** In  $PG(2, 11)$ , each elliptic curve in Table 1,2,3 gives a projective  $[n, 3, d]_{11}$ -code (AMDS), where  $6 \leq n \leq 18$  and  $3 \leq d \leq 15$ .



**Elliptic curves over  $F_{13}$** **Theorem 16:** In  $PG(2,13)$ , the following statements are satisfied:

- (1)  $P_{13} = 46$ .
- (2)  $n_0 = 14$ ,  $n_1 = 20$ ,  $n_3 = 10$ ,  $n_9 = 2$ .
- (3)  $N_1$  takes every value between 7 and 21.
- (4) There are 132 elliptic curve of type general with at least one inflexion and 22 of them are inequivalent.
- (5) The 46 inequivalent elliptic curves divided into 14 complete and 32 incomplete.
- (6) An elliptic curve with  $k$  points is a complete  $(k; 3)$ -arc when  $k$  have the following values: 16, 18, 19, 20, 21.

Full details on elliptic curves over  $F_{13}$  are given in Tables 4, 5, 6, 7.

Table-4: Elliptic curves with exactly nine rational inflexions

$\mathcal{F}_n^r$	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{E}_9^4$	$X_0^3 + X_1^3 + X_2^3$	9	Incomplete	21	$G_{54}$
$\mathcal{H}_9^4$	$X_2^2 X_1 + X_0^3 - X_0 X_1^2$	18	Complete	18	$G_{36}$

The group  $G_{54}$  is non abelian, has 9 elements of order 2, 26 elements of order 3, and 18 elements of order 6. The group  $G_{36}$  is non abelian, has 9 elements of order 2, 8 elements of order 3, and 18 elements of order 4.

Table-5: Elliptic curves with exactly three rational inflexions

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_3^4$	1	$X_0 X_1 X_2 + (X_0 + X_1 + X_2)^3$	18	Incomplete	19	$S_3$
	2	$X_0 X_1 X_2 + 2(X_0 + X_1 + X_2)^3$	12	Incomplete	19	$S_3$
	3	$X_0 X_1 X_2 + 3(X_0 + X_1 + X_2)^3$	15	Incomplete	18	$S_3$
	4	$X_0 X_1 X_2 + 5(X_0 + X_1 + X_2)^3$	9	Incomplete	21	$S_3$
	5	$X_0 X_1 X_2 + 6(X_0 + X_1 + X_2)^3$	12	Incomplete	18	$S_3$
	6	$X_0 X_1 X_2 - 3(X_0 + X_1 + X_2)^3$	12	Incomplete	22	$S_3$
	7	$X_0 X_1 X_2 - 4(X_0 + X_1 + X_2)^3$	15	Incomplete	18	$S_3$
	8	$X_0 X_1 X_2 - 5(X_0 + X_1 + X_2)^3$	18	Complete	18	$S_3$
$\mathcal{E}_3^1$	9	$X_2^2 X_1 + X_0^3 - X_1^3$	12	Incomplete	18	$S_3 \times Z_3$
	10	$X_2^2 X_1 + X_0^3 - 4X_1^3$	21	Complete	21	$S_3 \times Z_3$

Table-6: Elliptic curves with exactly one rational inflexion

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_1^0$	1	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 6X_0X_1^2 - 6X_1^3$	11	Incomplete	21	$S_3$
	2	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 6X_0X_1^2 - 5X_1^3$	20	Complete	20	$S_3$
	3	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 4X_0X_1^2 - 4X_1^3$	14	Incomplete	18	$S_3$
	4	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 3X_0X_1^2 - 6X_1^3$	14	Incomplete	19	$S_3$
	5	$X_1X_2^2 + X_0^3 + 2X_0X_1^2 - 4X_1^3$	17	Incomplete	18	$S_3$
	6	$X_1X_2^2 + X_0^3 + 2X_0X_1^2 - X_1^3$	8	Incomplete	21	$S_3$
$\mathcal{H}_1^0$	7	$X_1X_2^2 + X_0^3 + X_0X_1^2$	20	Complete	20	$S_3 \times Z_3$
	8	$X_1X_2^2 + X_0^3 + 4X_0X_1^2$	8	Incomplete	21	$S_3 \times Z_3$
$\mathcal{G}_1^1$	9	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 6X_0X_1^2 - 3X_1^3$	13	Incomplete	19	$Z_2$
	10	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 6X_0X_1^2 - 2X_1^3$	10	Incomplete	21	$Z_2$
	11	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 6X_0X_1^2 - X_1^3$	16	Incomplete	18	$Z_2$
	12	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 4X_0X_1^2 - 6X_1^3$	13	Incomplete	19	$Z_2$
	13	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 3X_0X_1^2 - 5X_1^3$	10	Incomplete	21	$Z_2$
	14	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 3X_0X_1^2 - X_1^3$	19	Complete	19	$Z_2$
	15	$X_1X_2^2 + X_0^3 - 3X_0X_1^2 - 3X_1^3$	16	Complete	16	$Z_2$
	16	$X_1X_2^2 + X_0^3 + 2X_0X_1^2 - 6X_1^3$	16	Complete	16	$Z_2$
$\mathcal{E}_1^1$	17	$X_2^2X_1 + X_0^3 + 5X_1^3$	16	Incomplete	18	$Z_6$
	18	$X_2^2X_1 + X_0^3 - 6X_1^3$	7	Incomplete	22	$Z_6$
$\mathcal{E}_1^4$	19	$X_2^2X_1 + X_0^3 - 2X_1^3$	19	Complete	19	$Z_6$
$\mathcal{H}_1^4$	20	$X_1X_2^2 + X_0^3 + 2X_0X_1^2$	10	Incomplete	21	$Z_4$



Table-7: Elliptic curves with no rational inflexions

$\mathcal{F}_n^r$	No.	Canonical form	$ \mathcal{F}_n^r $	Description	$M(\mathcal{F}_n^r)$	$G$
$\mathcal{G}_0^1$	1	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 2X_1X_2^2 - (X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2 - 6X_0X_1X_2)$	15	Incomplete	18	$Z_3$
	2	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 2X_1X_2^2 - 2(X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2 - 6X_0X_1X_2)$	12	Incomplete	19	$Z_3$
	3	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 2X_1X_2^2 - 4(X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2 - 6X_0X_1X_2)$	12	Incomplete	21	$Z_3$
	4	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 2X_1X_2^2 - 7(X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2 - 6X_0X_1X_2)$	18	Complete	18	$Z_3$
	5	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 4X_1X_2^2 - (X_0^3 + 4X_1^3 + 3X_2 + X_0X_1X_2)$	18	Complete	18	$Z_3$
	6	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 4X_1X_2^2 - 2(X_0^3 + 4X_1^3 + 3X_2 + X_0X_1X_2)$	9	Incomplete	21	$Z_3$
	7	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 4X_1X_2^2 - 4(X_0^3 + 4X_1^3 + 3X_2 + X_0X_1X_2)$	12	Incomplete	21	$Z_3$
	8	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 4X_1X_2^2 - (X_0^3 + 4X_1^3 + 3X_2 + X_0X_1X_2)$	15	Incomplete	18	$Z_3$
$\mathcal{E}_0^1$	9	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 2X_1X_2^2$	12	Incomplete	21	$Z_3 \times Z_3$
	10	$X_0X_1^2 + X_0^2X_2 + 4X_1X_2^2$	21	Complete	21	$Z_3 \times Z_3$
$\mathcal{E}_0^4$	11	$X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2^3 - X_0X_1X_2$	9	Incomplete	22	$Z_3 \times Z_3$
$\mathcal{H}_0^4$	12	$X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2^3 - 4X_0X_1X_2$	18	Complete	18	$Z_3 \times Z_3$
	13	$X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2^3 + 5X_0X_1X_2$	18	Complete	18	$Z_3 \times Z_3$
$\mathcal{E}_0^4$	14	$X_0^3 + 2X_1^3 + 4X_2^3$	9	Incomplete	21	$Z_3 \times Z_3 \times Z_3$

From Remark 11, Theorem 13 and Theorem 16 the following corollary is deduced.

**Corollary 17:** In  $PG(2, 13)$ , each elliptic curve in Table 4,5,6,7 gives a projective  $[n, 3, d]_{13}$ -code (AMDS), where  $7 \leq n \leq 21$  and  $4 \leq d \leq 18$ .

### REFERENCES

1. Hirschfeld, J. W. P., Projective geometries over finite fields, 2nd edition, Oxford Mathematical Monographs, The Clarendon Press, Oxford University Press, New York, 1998.
2. Hirschfeld, J. W. P., The numbers of points on a curve, and applications, Rend. Mat., Ser. VII, 26, Roma, pp. 13-28, 2006.
3. Bruen, A. A., Hirschfeld, J. W. P. and Wehlau, D. L., Cubic curves, finite geometry and cryptography, Acta Appl. Math., 115, 2011.
4. Hirschfeld, J. W. P., Curves of genus 3, Rend. Mat. Appl., 30, pp. 77-88, 2010.
5. Geer, G. and Vlught, M., Tables of curves with many points, Math. Comp., 69, pp. 797-810, 1999.
6. Daskalov, R. and Metodiev, E., Good  $(n; r)$ -arcs in  $PG(2, 23)$ , Varna, Bulgaria, pp. 69-74, 2009.
7. Cook, G.R., Arcs in a finite projective plane, Ph.D. thesis, University of Sussex, United Kingdom, 2011.
8. Marcugini, S., Milani, A. and Pambianco, F., Maximal  $(n; 3)$ -arcs in  $PG(2, 13)$ , Discrete Mathematics, 294, pp. 139-145, 2005.

## Estimating Global Solar Radiation on Horizontal Surface For Selected Stations over Iraq

Hadil J. Assi

Department of Atmospheric Sciences, College of Sciences, AL-Mustansiriyah University

Received 6/6/2012 – Accepted 4/12/2012

### الخلاصة

تناول هذا البحث حساب المعدل الشهري للأشعاع الشمسي الكلي على السطوح الأفقية لمناطق مختلفة من العراق تمثلت في بغداد على خط عرض (32° 14' N)، البصرة على خط عرض (30° 37' N)، الموصل على خط عرض (36° 19' N)، الرطبة على خط عرض (32° 02' N). باستخدام ثلاث نماذج معدلة لمعادلة أنكستروم تم حساب الأشعاع الشمسي الكلي للمحطات الأربعة ولل سنوات 1984، 1994، 2004، عدا محطة الرطبة التي لم تتوفر لها معدلات ساعات السطوح الفعلية لسنة 2004. تم الحصول على قيم ساعات السطوح الفعلية والتي طبقت للنماذج الثلاث لحساب الأشعاع الشمسي الكلي من الهيئة العامة للأنواء الجوية العراقية وبمقارنة النتائج المحسوبة لكل نموذج مع القيم المقاسة والتي تم الحصول عليها من:

(National Administration of Space Agency)

من خلال المقارنة وجد ان هناك توافق بين القيم المحسوبة و القيم المقاسة للمحطات الأربعة ولكل السنوات، ولبيان دقة النماذج المستخدمة فقد تم تطبيق القوانين الإحصائية المتمثلة بالنسبة المئوية لمعدل الخطأ للجذر التربيعي، معدل خطأ الانحياز، معدل الخطأ ومعامل الارتباط لكل نموذج وكانت نسب الخطأ قليلة نسبياً أما معامل الارتباط فكانت قيمته عالية لكل النماذج تقريباً ولكل المحطات. توصل هذا البحث الى امكانية اعتماد هذه النتائج لحساب الأشعاع الشمسي الكلي فوق مناطق العراق المختلفة التي لا تتوفر فيها قيم مقاسة.

### ABSTRACT

IN this paper to occur estimate the monthly average daily of global solar radiation on horizontal surface (G) over different selected stations represent the various weather conditions in Iraq. Baghdad at (32° 14' N), Basrah at (30° 37' N), Mousl at (36° 19' N), and Rutba at (32° 02' N). Three models have been used to calculate (G) for years 1984, 1994, and 2004, except Rutba we calculate (G) for years 1984 and 1994 because there is no number of hours of bright sunshine data for year 2004. The accuracy of the estimated global radiation data is tested by calculating the Root Mean Square error (RMSE%), Mean Bias Error (MBE), Mean Percentage Error (MPE), and correlation coefficient (Rc). Statistical result show that all three suggested models are accurately predicts the solar irradiance in these sites indicating a good predictive ability for modeling. Good agreement was observed between the measured and the estimated values for all three models. This study concludes that the three models can be used to estimate the Global solar radiation in case there are no measured values at any station in Iraq.

### INTRODUCTION

The duration of solar radiation and its energy that reaches the ground are becoming important special data. Solar radiation research is significant not only for meteorologists but also for foresters, agronomists, geographers and others. Solar energy on the other hand is almost unlimited, it considered to be the energy of the future [1,2]. Obviously, measured data is the best form of this knowledge. Unfortunately, there are very few meteorological stations that measure global solar radiation especially in undeveloping countries. For such stations where no measured data are available the common practice is to



estimate global solar radiation from other measured meteorological parameters like relative sunshine duration [3].

There are so many methods have been developed to calculate global solar radiation at different places in the world, these different places have differences local climate conditions, so that the suggested radiation models for one location may not successfully apply to other places. The availability of meteorological parameters which are used as the input to radiation models is an important key to choose the proper radiation models at any location[4].many researchers derived their models by using sunshine hours, relative humidity, latitude, and air temperature[5].Reddy suggested the use of number of rainy days, sunshine hours, latitude, and geographical factor (K) as the input to his model [ 5]. Using sunshine hours, maximum air temperature, latitude, and relative humidity, Sabbagh estimated the global solar radiation at various places. Their method was not capable of predicting the direct and diffuse component of radiation [6].Paltridge and Proctor employed cloud data and latitude in model which could predict the direct and diffuse daily solar radiation at the earth's surface [7].Rehman compared estimated daily radiation from 16 different radiation models for (14) cites in Saudi Arabia .He used latitude , altitude, sunshine hours, and albedo in this work [8] .Other studies such us those of AL-Mohammad [9], Almorox et al [10] ,and Zhou et al [11] , employed mainly sunshine hours for predicting surface global solar radiation for different places in the world .In this paper we used our model and two other models of Angstrom –type regression equation .Here we try to find the best model for estimating global solar radiation over Iraq.

### **Data and Methodology**

In this paper the measure values of global solar radiation (G) for stations at Baghdad, Basrah, Mousl, and Rutba ,have been used for years 1984, 1994, and 2004.Those data were supplied by the [NASA National Administration of Space Agency] [12].The monthly average daily number of hours of bright sunshine data (N) was obtained from the Iraqi meteorological organization .The first attempt at estimating global solar radiation was the well-known empirical relation between global solar radiation under clear sky condition and bright sunshine duration given by Angstrom relation [13] .Theoretical and empirical models have been postulated to compute the component of the insolation [14-15] .Some of these models are theoretical dealing with the isolation of the radiate transfer equation , while others are simply regression models .The generally accepted modified form of the Angstrom –type regression equation relating the monthly average daily global radiation to the average daily sunshine hours [5]:

$$\frac{\bar{G}}{\bar{G}_0} = a + b \left( \frac{\bar{N}}{\bar{N}_0} \right) \quad (1)$$

Where  $\bar{G}$  is the monthly average daily global solar radiation on horizontal surface ( $\text{W/m}^2$ ),  $\bar{G}_0$  is the monthly average daily extraterrestrial radiation on horizontal surface ( $\text{W/m}^2$ ),  $\bar{N}_0$  is the monthly average daily maximum number of hours of possible sunshine (or day length), and (a, b) are regression constant to be determined.  $\bar{N}$  is the monthly average daily number of hours of bright sunshine. The extraterrestrial solar radiation on a horizontal surface was calculated from the following equation [15]:

$$\bar{G}_0 = \frac{24 \times 3.6 \times 10^{-3} \times I_{sc}}{\pi} \left( 1 + 0.033 \cos\left(360 \frac{\bar{D}}{365}\right) \right) \cos \varnothing \cos \delta \sin w + w \sin \varnothing \sin \delta \quad (2)$$

Where  $\bar{D}$  is the Julian day number,  $I_{sc} = 1367 \text{ Wm}^{-2}$  is the solar constant,  $\varnothing$  is the latitude of the location

$$\delta = 23.45 \sin\left(360 \frac{248 + \bar{D}}{365}\right) \quad (3)$$

And  $w$  is the sunset hour angle given as:

$$W = \cos^{-1} (\tan \varnothing \tan \delta) \quad (4)$$

The possible sunshine duration  $\bar{N}_0$  is given by [16-17]:

$$\bar{N}_0 = \left( \frac{2}{15} \right) W \quad (5)$$

In this paper  $\bar{G}_0$  and  $\bar{N}_0$  were computed from equation (2) and (5) respectively. The global solar radiation was estimated from the next three regression equations:

a. Rietveld's model [18], an interesting correlation which is believed to be applicable anywhere in the world:

$$\frac{\bar{G}}{\bar{G}_0} = 0.18 + 0.62 \left( \frac{\bar{N}}{\bar{N}_0} \right) \quad (6)$$

b. McCulloch's model [19], which relates correlation model that takes into account the latitude effect as quoted by DE Miguel via:

$$\frac{\bar{G}}{\bar{G}_0} = 0.29 \cos \varnothing + 0.25 \left( \frac{\bar{N}}{\bar{N}_0} \right) \quad (7)$$

A new model was used in addition to the previous two models it's expressed in equation (8):

$$\frac{\bar{G}}{\bar{G}_0} = 0.66 + 0.753 \left( \frac{\bar{N}}{\bar{N}_0} \right) \quad (8)$$

The calculated and measured values of average daily global radiation on the horizontal surface were compared, to find out the best correlation that will fit the measured values of global solar radiation. The accuracy



of the estimated global solar radiation data is tested by calculating the mean bias error (MBE), root mean square error (RMSE %), and mean percentage errors (MPE). The MBE ( $W/m^2$ ), RMSE%, and MPE are defined as follows [20, 21]:

$$MBE = \frac{[\sum \bar{G}_{est} - \bar{G}_{meas}]}{n} \quad (9)$$

$$RMSE\% = 100 \left( \frac{1}{\bar{G}_M} \right) \left[ \left( \frac{\sum \bar{G}_{est} - \bar{G}_{meas}}{n} \right)^{0.5} \right] \quad (10)$$

$$MPE\% = \frac{[\sum (\bar{G}_{meas} - \bar{G}_{est} \times 100)]}{n} \quad (11)$$

Where  $\bar{G}_{est}$  and  $\bar{G}_{meas}$  the estimated and measured values,  $n$  is the total number of observations.  $\bar{G}_M$  is the arithmetic mean value of the measured values of the global solar radiation.

## RESULT AND DISCUSSIONS

the results were compared for the statistical tests between all selected stations in which summarized in table (1), table (2), table (3), and table (4), for the years (1984, 1994, 2004), at Baghdad, Basrah, Mosul, and Rutba stations respectively it is obvious that the values of the correlation coefficient ( $R_c$ ) are higher than 0.980 which indicate excellent fitting between the measured and estimated values for all three models. The higher value of correlation coefficients ( $R_c$ ) can be shown at Rutba, and Mosul the less value of ( $R_c$ ) is at Baghdad, and Basrah. The RMSE% and MPE values are also low indicating fairly good agreement; the positive MBE shows overestimation while a negative MBE indicates underestimation. The negative values of the MPE% in model 3 indicate that the present correlation slightly overestimates and record higher proportion error for all years and for all selected stations whereas the other two models that demonstrate a clearly come close to each other in their proportion error and its less than model 3 for all stations and all years.

Table-1: Statistical test results for three models at Baghdad station for years 1984, 1994, and 2004.

1984	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	c
Model 1	-72.42	8.47	5.68	0.983
Model 2	-358.36	8.17	11.02	0.983
Model 3	575.89	14.39	-6.70	0.983
1994	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model 1	-110.75	9.76	7.80	0.991
Model 2	-409.12	9.09	13.05	0.991
Model 3	553.96	15.81	-4.32	0.991
2004	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model 1	-469.68	12.04	13.89	0.981
Model 2	-731.74	13.32	18.26	0.981
Model 3	148.30	14.59	2.88	0.980

Table-2: Statistical test results for three models at Basrah station for years 1984, 1994, and 2004.

1984	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model1	-300.87	7.85	9.51	0.985
Model 2	-282.91	8.35	9.54	0.983
Model 3	309.18	10.70	-2.18	0.984
1994	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model1	-144.97	11.66	8.05	0.991
Model 2	-132.75	11.18	7.54	0.989
Model 3	511.59	17.45	-4.10	0.991
2004	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model1	-364.99	8.02	10.50	0.981
Model 2	-455.88	8.97	13.23	0.983
Model 3	313.82	10.77	-1.46	0.980

Table-3: Statistical test results for three models at Mousl station for years 1984, 1994, and 2004.

1984	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model1	-379.85	6.04	10.20	0.993
Model 2	-517.76	7.03	12.19	0.995
Model 3	281.45	8.17	-1.56	0.993
1994	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model1	-128.29	7.02	2.85	0.973
Model 2	-373.94	5.42	8.36	0.994
Model 3	433.87	8.92	-5.32	0.992



Table-4: Statistical test results for three models at Rutba station for years 1984, and 1994.

1984	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model 1	-205.212	7.06	9.02	0.988
Model 2	-269.43	6.41	9.59	0.988
Model 3	369.55	11.05	-1.95	0.988
1994	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model 1	-135.10	8.19	7.62	0.968
Model 2	-236.87	7.18	9.98	0.993
Model 3	411.83	13.92	-1.16	0.991
2004	MBE W/m <sup>2</sup>	RMSE%	MPE	Rc
Model 1	-324.08	8.25	11.46	0.985
Model 2	-384.67	7.72	11.85	0.986
Model 3	294.03	11.77	0.33	0.985

From figures 1 (a, b, c) , 2 (a, b, c), 3 (a, b, c), and 4 (a, b) from the comparative as curves between the results for three empirical models and measured values at Baghdad , Basrah, Mousl, and Rutba respectively for years 1984, 1994, 2004. Obviously that the curves of model 2 are more close to measured values curve's than the curves of model 1 and model 3 for all stations and all years. Model 3 are more close to the curve of measured values at January, February, November, and December, and far off the measured curve's at June for all stations and all years comparative with model 1, and model 2. But from the results of these figures it is clear that there is agreement between the curves for measured and estimated values even model 3.

### CONCLUSION

After being illustrate the results, that can be summarized as follows: The results show that all three models can be employed to estimate global solar radiation over all Iraq regions .the results of statistical tests showed that model 2 are more close to in its estimated values with measured values than model 1, and model 3. The three models record a good values of correlation coefficient were more than 0.980. The results of correlation coefficient record higher values at Rutba and Mousl than Baghdad and Basrah .

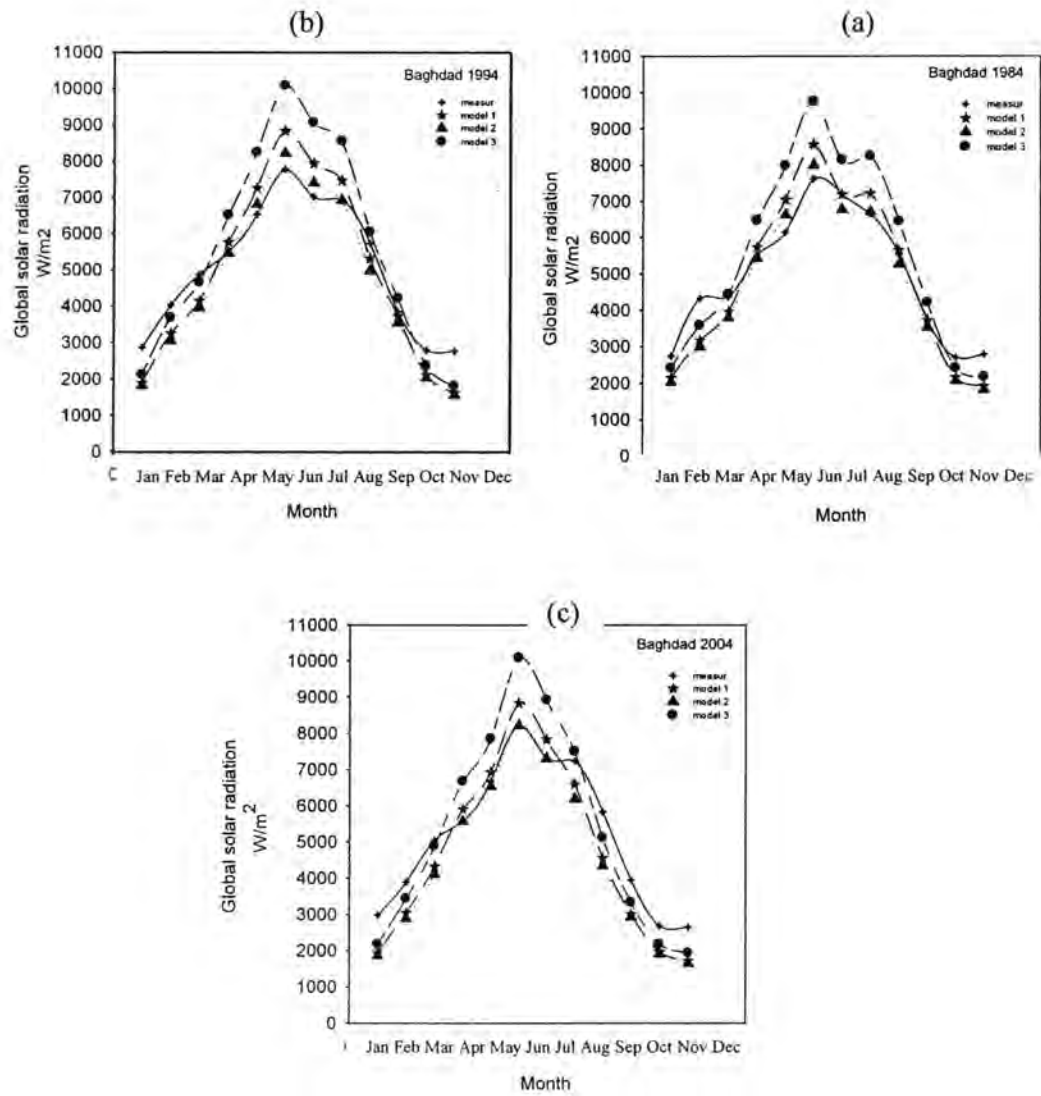


Fig-1: (a, b, c): comparison between measured values and calculated values for three models at Baghdad station for Years 1984, 1994, and 2004 respectively.



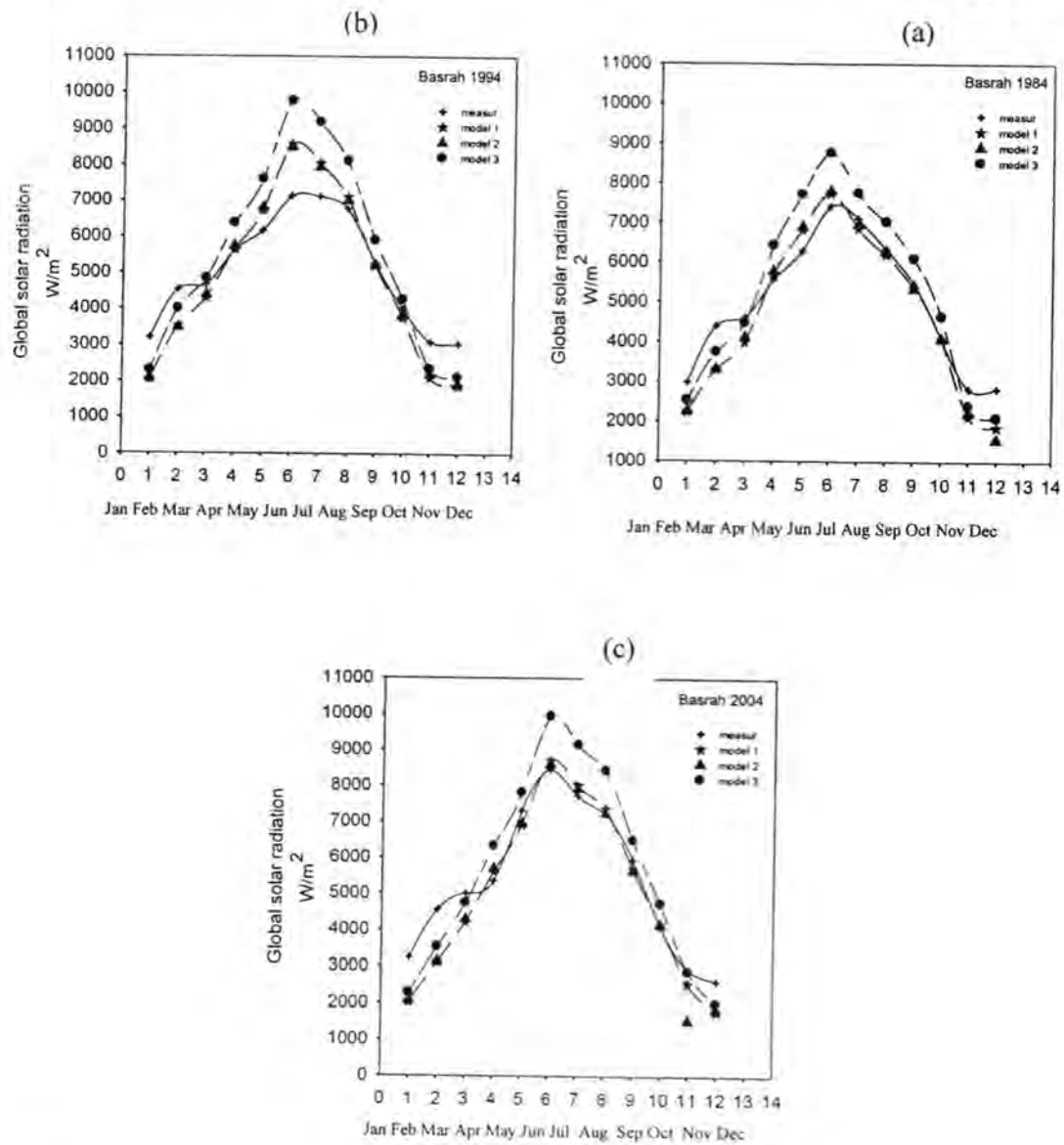


Fig- 2: (a, b, c): comparison between measured values and calculated values for three models at Basrah station for Years 1984, 1994, and 2004 respectively.

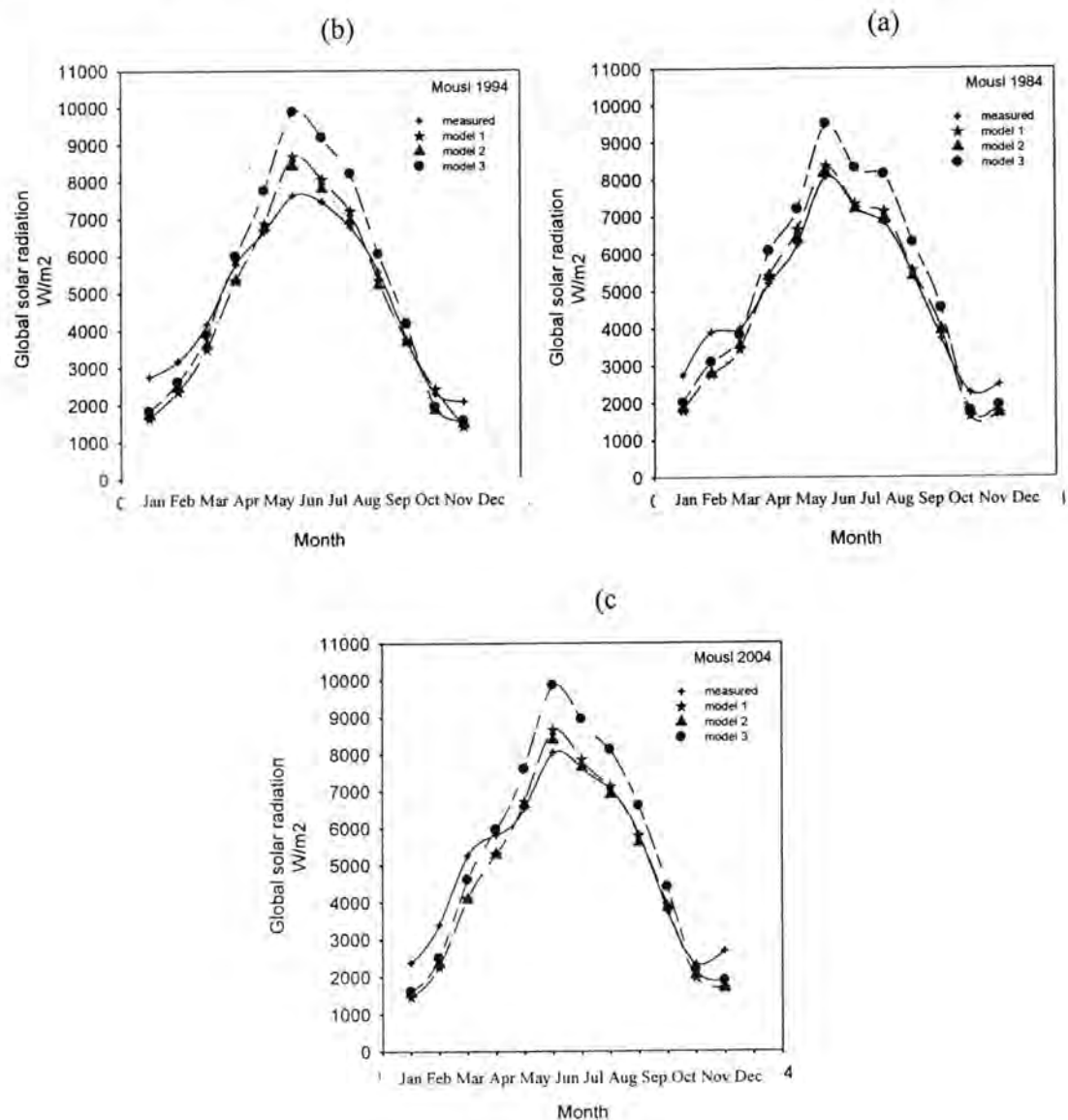


Fig -3: (a, b, c): comparison between measured values and calculated values for three models at Mosul station for Years 1984, 1994, and 2004 respectively.

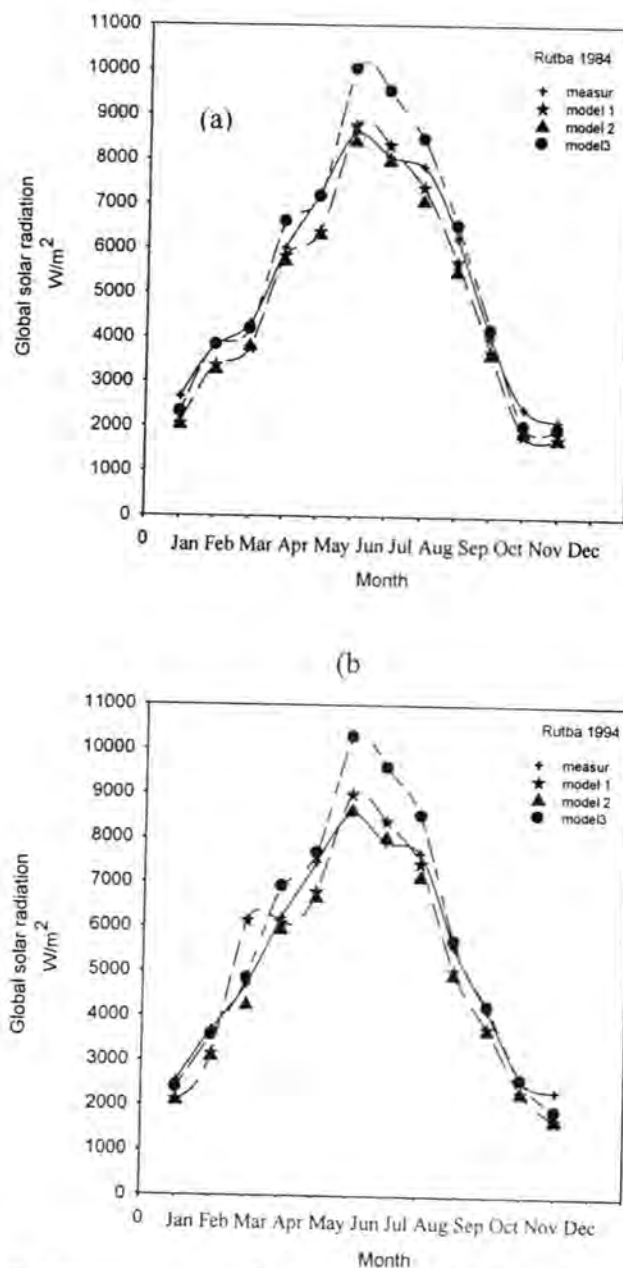


Fig-4:(a, b): comparison between measured values and calculated values for three models at Rutba station for Years 1984 and 1994 respectively.

## REFERENCE

1. Hunt, L.A, Kuchar, L., Swanaton, C.J., "Estimation of solar radiation for use in crop modeling", Agric.Forest Meteorol, Vol.91, and PP.293-300., (1998).
2. McKenny, D.W., Mackey, B.G.Zavitz, B.L., "Calibration and sensitivity analysis of a spatially distributed solar radiation model", International Journal of Geographical Information Science, Vol.13 (1), PP.49-65, (1999).

3. Louis E.Akpabio, Sunday E. ETUK, "Relationship between global solar radiation and sunshine duration for Onne, Nigeria", Turk.J.Phys, Vol.27, PP.161-167,(2003).
4. Ali A.Sabziparvar,"General formula for estimation of monthly mean global solar radiation in different climates on the south and north coasts of Iran", International Journal of Photo energy, Vol.2007, Article ID 94786, (2007).
5. S.J.Reddy,"An empirical method for the estimation of total solar radiation ", Solar Energy, Vol.13, No.2, PP.289-290, (1971).
6. J.A.Sabbagh, A.A.M.Sayghand E.M.A.AL-Salam, "Estimation of the total solar radiation from meteorological data", Solar Energy, Vol.19, No.3, PP.307-311, (1977).
7. G.W.Paltridge, D.Proctor,"Monthly mean solar radiation statistics for Australia", Solar Energy, Vol.18, No.3, PP.235-243, (1976).
8. Sh.Rehman,"Solar radiation over Saudi Arabia and comparisons with empirical models", Energy, Vol.23, No.12, PP.1077-1082, (1998).
9. A.AL-Mohammad, "Global direct and diffuse solar radiation in Syria", Applied Energy, Vol.79, No.2, PP.191-200, (2004).
10. J.Almorox, M.Benito and C.Hontoria,"Estimation of monthly Angstrom-Prescott equation coefficients from measured daily data in Teldo, Spain", Renewable Energy, Vol.30, No.6, PP.931-936, (2005).
11. J.Jhou, W.Yezheng, and Y.Gang,"General formula for estimation of monthly average daily global solar radiation in China", Energy Conversion and Management, Vol.46, No.2, PP.257-268, (2005).
12. (<http://WWW.easweb.larc.nasa.gov>).
13. Angstrom .A," Solar and terrestrial radiation ", Roy.met.soc, (1924), Vol.50, PP.121-127.
14. Prescott, J.A,"Evaporation from a water surface in relation to solar radiation ", Trans.R. Soc.S.Austr, Vol.64, PP.114-118, (1940).
15. Kamal, M.A., Shlaby, S.A., Mostafa, S. S."Solar radiation over Egypt: comparison of predicted and measured meteorological data", Solar Energy, (1993), Vol.50, PP.463-470.
16. J.A.Duffi, W.A.Beckman,"solar engineering of thermal processes,2<sup>nd</sup> Edn.John Wily, New York (1994).



17. L.E.Akpabio,"Comparison between solar radiation energy and the characteristic of wind power calculations in south eastern Nigeria", Nig.J.Phys. Vol.4, PP.15-20, (1992).
18. M.R.Rietveld,"A new method for estimating the regression coefficients in the formula relating solar radiation to sunshine ", Agricultural Meteorology, Vol.19, PP.243-252,(1978).
19. A. DEMeguil, J.Bilbao, S.Salson and A.Lage,"Solar radiation and sunshine hour maps in Castilla and Leon region, Spain", Renewable Energy, Vol.4, (1994).
20. B.T.Nguyen, T.L.Pryor,"The relationship between global solar radiation and sunshine duration in Vietnam", Renewable Energy, Vol.2, PP.47-60, (1994).
21. A.A.EL-Sebaili, A.A.Trabea,"Estimation of global solar radiation on horizontal surfaces over Egypt", Egypt. J.Solids, Vol.28, No.1, (2005).

Vol. 24  
No. 1  
2013

# مجلة علوم المستنصرية

تصدر عن كلية العلوم الجامعة المستنصرية

رئيس التحرير  
أ.د. رضا ابراهيم البياتي

## هيئة التحرير

عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا

د. انعام عبد الرحمن ملوكي  
د. فاتن فاضل القزاز  
د. ايمان ناطق ناجي  
د. احمد عزيز احمد  
د. منعم حكيم خلف  
د. عمر عباس حسن  
د. كريم قاسم حسين  
د. سعد عويد بديوي

## الهيئة الاستشارية

رئيسا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا  
عضوا

أ. د. طارق صالح عبد الرزاق  
أ. د. حسن هاشم سلمان  
أ. د. طارق سهيل نجم  
أ. د. علي حسين دحية  
أ. د. عبد المنعم صالح رحمن  
أ. د. ليلى صالح العلي

## مجلة علوم المستنصرية

هي مجلة علمية رصينة تصدر عن عمادة كلية العلوم في الجامعة المستنصرية في تخصصات الكيمياء والفيزياء وعلوم الحياة وعلوم الحاسبات وعلوم الجو. تقوم المجلة بنشر البحوث العلمية التي لم يسبق نشرها في مكان آخر بعد إخضاعها للتقويم العلمي من قبل مختصين وباللغتين العربية او الانكليزية وتُصدر المجلة عددين سنوياً بكل اللغتين.

### تعليمات النشر في المجلة

1. يقدم الباحث طلباً تحريرياً لنشر البحث في المجلة ويكون مرفقاً بأربع نسخ من البحث مطبوعة على ورق ابيض قياس (A4, 21.6×27.9 cm) مع ترك حاشية بمسافة انج واحد لكل اطراف الصفحة ومطبوعة باستخدام برنامج (Microsoft Word, 97-2003) بصيغة (doc.).
2. يرفق مع البحث ملخص باللغة العربية وآخر باللغة الإنجليزية على ان لا تزيد كلمات الملخص عن (150) كلمة.
3. عدد صفحات البحث لا تتجاوز 10 صفحة بضمنها الاشكال والجداول على ان تكون الاحرف بقياس 14 نوع (Time New Roman) وبمسافة مزدوجة بين الاسطر. وينبغي ترتيب اجزاء البحث دون ترقيم وبالخط العريض (Bold) كالآتي: صفحة العنوان، الخلاصة باللغة العربية، الخلاصة باللغة الإنجليزية، مقدمة، المواد وطرائق العمل (الجزء العملي)، النتائج والمناقشة، الاستنتاجات وقائمة المراجع.
4. يطبع عنوان البحث واسماء الباحثين (كاملة) وعناوينهم باللغتين العربية والانكليزية على ورقة منفصلة شرط ان لا تكتب اسماء الباحثين وعناوينهم في أي مكان اخر من البحث، وتعاد كتابة عنوان البحث فقط على الصفحة الاولى من البحث.
5. ترقم الجداول والاشكال على التوالي حسب ورودها في المخطوط، وتزود بعناوين، ويشار إلى كل منها بالتسلسل نفسه في متن البحث.
6. يشار الى المصدر برقم يوضع بين قوسين بمستوى السطر نفسه بعد الجملة مباشرة [1]، [2]، [3] وهكذا. تطبع المصادر على ورقة منفصلة، ويستخدم الاسلوب الدولي المتعارف عليه عند ذكر مختصرات اسماء المجلات.
7. يتبع الاسلوب الاتي عند كتابة قائمة المصادر على الصفحة الاخيرة كالآتي: ترقيم المصادر حسب تسلسل ورودها في البحث، يكتب الاسم الاخير (اللقب) للباحث او الباحثين ثم مختصر الاسمين الاولين فعنوان البحث، مختصر اسم المجلة، المجلد، العدد، الصفحات الاولى والاخيرة، سنة نشر البحث. وفي حالة كون المصدر كتاباً يكتب بعد اسم المؤلف او المؤلفين عنوان الكتاب، الطبعة، الصفحات، سنة النشر، المؤسسة الناشرة، الدولة مكان الطبع. بخصوص اجور النشر يتم دفع مبلغ (50000) خمسون الف دينار عند تقديم البحث للنشر وهي غير قابلة للرد ومن ثم يدفع الباحث (25000) عشرون الف دينار اخرى عند قبول البحث للنشر.

جميع البحوث ترسل الى:

رئيس تحرير المجلة

أ.د. رضا ابراهيم البياتي

كلية العلوم- الجامعة المستنصرية

البريد الالكتروني: mustjsci@yahoo.com



## المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
8-1	تأثير مدرر الحليب نبات الشمار <i>Foeniculum vulgare</i> على أوزان اناث الجرذان ألفت قيس عبد الجبار و نوري محمد السوداني و سالم رشيد العبيدي
18-9	تقييم الفعالية السمية لبعض المستخلصات النباتية المائية ضد الفطر <i>Fusariumoxysporum</i> امال عبد السلام الحبيب و لقاء جميل ابراهيم
28-19	تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم <i>alginase</i> من بكتريا <i>Bacillus sp.</i> المعزولة من التربة ساهرة نصيف مسلم و علياء معن عبد الحميد و عصام حامد حميد
38-29	دراسة التغيرات المرضية النسجية في الامعاء الدقيقة للفئران المجرعة بجرع مختلفة من مبيد الـ <i>Thiamethoxam</i> سحر عبد الهادي محمد جواد الشرقي
46-39	تحضير مستخلص اللحم بالطريقة الحامضية كوسط محلي لنمو البكتريا سعاد عبد علي عطية و استبرق حسن كاظم و حسنة وضاح معبيد و سوسن سلمان عطية
58-47	الخواص الطيفية لصبغة الكومارين - 120 العضوية مازن علي عبد علي
68-59	تنشيط البنتونايت العراقي: الجزء الرابع-التنشيط بحوامض مختلفة علوان نصيف جاسم و زهير خضير عباس و زينب اسماعيل عباس و زهراء علي عبد الأمير و أنوار شاكر إبراهيم و قريش عباس كاظم



## تأثير مدرر الحليب نبات الشمار *Foeniculum vulgare* على أوزان اناث الجرذان

ألفت قيس عبد الجبار<sup>1</sup> و نوري محمد السوداني<sup>2</sup> و سالم رشيد العبيدي<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>دائرة الدراسات و التخطيط و المتابعة/وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
<sup>2</sup>قسم علوم الحياة/كلية العلوم/الجامعة المستنصرية  
<sup>3</sup>قسم علم الامراض/كلية الطب/جامعة بغداد  
 تاريخ تقديم البحث 2012/9/2 - تاريخ قبول البحث 2012/11/6

### ABSTRACT

During the past centuries described many of the herbs and plants Milk-generating. It was among these herbs fennel seeds (sweet bean). As reported by the prescription of Therefore, shed light on the herbal medicine practitioners in many parts of the world. effect of fennel *Foeniculum vulgare* plant generating on the weights of the female rats of the three physiological situations (Virgin , Pregnant and Lactating)rats .. Used (90) rat Sprague-Dawley and divided into three groups key (Virgins , Pregnant and Lactating). Each group includes (30) animal, given her the fruit of a plant in concentration(5% and 10%) of the daily diet for a period of (10 and 20) day except for groups of control has tacked animal feed, then made a measurement of their weight after (10) days and (20) days. Show that increase actual weights of pregnant rats and virgins, when there appeared in a decrease in the weights of lactating rats. This gives an indication that the fruit of a plant fennel helps digestion and salted.

### الخلاصة

خلال القرون الماضية وصفت العديد من الأعشاب والنباتات كمدررة للحليب. وقد كان من بين هذه الاعشاب بذور الشمار (حبة الحلوة). حيث ذكرت الوصفات الطبية من قبل ممارسي طب الاعشاب في اماكن عديدة من العالم. و على اثر ذلك أجريت هذه الدراسة بهدف تسليط الضوء على تأثير نبات الشمار *Foeniculum vulgare* المدرر للحليب على أوزان اناث الجرذان بالحالات الفسلجية الثلاث (العذراء و الحامل و المرضع).. استخدم(90) جرذ نرويجي أبيض و قسمت الى ثلاث مجاميع رئيسية(عذارى و حوامل و مرضع) كل مجموعة تضم (30) حيوان ، اعطيت لها ثمرة نبات الشمار بتركيز (5% و 10%) من الغذاء اليومي لمدة (10 و 20) يوم كلاً حسب مجموعته عدا مجاميع السيطرة فقد تناولت العلف الحيواني المخصص لها، ثم اجري لها قياس أوزانها بعد (10) يوم و (20) يوم. تبين ان هنالك زيادة معنوية لأوزان الجرذان العذارى و الحوامل، في حين ظهر نقصان في أوزان الجرذان المرضعة وهذا يعطي مؤشراً ان ثمرة نبات الشمار تساعد على الهضم و فاتحة للشهية.

### المقدمة

ان دراسة النباتات الطبية من حيث قيمتها الغذائية والدوائية ذات أهمية اقتصادية كبيرة للاستفادة منها وبيان دورها الطبي والغذائي فالغذاء يتألف من العديد من المركبات الكيميائية الحيوية الفعالة المتواجدة كليا في النباتات و التي تستخدم العديد منها لاغراض التجارة الطبية لالاف السنين(1). و من بينهم نبات الشمار (حبة الحلوة) *Foeniculum vulgare* والذي ينتمي الى العائلة الخيمية Umbelliferae، و هو أحد النباتات الطبية المهمة في العراق و العالم لما يتميز به من فوائد طبية و غذائية و تعد ثمار الشمار أو حبة الحلوة كما تعرف في العراق من أكثر المواد استهلاكاً من قبل مركز طب الاعشاب العراقي كونها تدخل في تحضير العديد من الخلطات العشبية العلاجية (2). يوصف بأنه من النباتات العشبية العطرية القوية المعروفة من نباتات حوض المتوسط التي تزرع سنوياً(3).

يُعد نبات الشمار من النباتات الطبية المدرة للحليب(4). ينصح به الى مرضى السكر و التهاب القصبات الشعبية و لعلاج حصى الكلية و ايضا " مدر للبول و مفيد للمعدة (5 و 6 و 7 و 8).

## المواد وطرائق العمل

## الأجهزة المستخدمة Instruments

اسم الجهاز	الشركة المجهزة والمنشأ
ميزان الكتروني	China Electric balance
فرن كهربائي	Binder-Germany Electric oven

## المواد الكيميائية Chemicals

كلوروفورم	Chloroform	BDH-England
-----------	------------	-------------

## الحيوانات المستخدمة في التجربة

استخدمت الجرذان البيض نوع (Sprogue-Dawly) التي تم شراؤها من مركز تربية الحيوانات المختبرية التابع لكلية الطب/جامعة بغداد .  
أستخدم (90) جرذ أبيض، مقسمة حسب الحالة الفسلجية {عذارى بالغة بعمر شهرين و كان معدل أوزانها (60غم) و (حوامل في الثلث الاول للحمل) و كان معدل أوزانها (200غم) و (مرضعات بعد اليوم الاول للولادة) و كان معدل أوزانها (190غم) . قسمت حيوانات التجربة الى (3) مجاميع رئيسية و كل مجموعة قسمت الى (6) مجاميع فرعية ضمت كل منها (5) حيوانات ، و وضعت في أقفاص بلاستيكية خاصة بتربية الجرذان ، مزودة بغطاء حديدي مشبك يحتوي على معلف امامي ومجهز بقناتي خاصة بشرب الماء مزودة بحلمة في نهايتها، وكانت فترة الاضاءة (10) ساعات تقريبا طوال فترة الدراسة، قدم للحيوانات علف مركز بشكل طليق طوال فترة التجربة بالنسبة الى حيوانات السيطرة و لمدة (10) و (20) يوما"، أما حيوانات التجربة فاعطيت ثمرة النبات و بتركيزين (5% و 10%) من غذائها اليومي و لمدة (10) يوم و (20) يوما" لكل من التركيزين .

## 4-2 طريقة تحضير العليقة النباتية Preparation of food of plant material

استخدمت في تجارب البحث العليقة النباتية من اجل توفير طريقة تطبيقية غير مكلفة اقتصاديا وكما يلي:-

## 4-2-1 تحضير العليقة الغذائية من ثمرة نبات الشمار

تم الحصول على النبات من قسم طب الاعشاب/دائرة الامور الفنية التابع لوزارة الصحة ، وبعد ان تم تصنيفها من قبل المختصين في هذا القسم ، اقترح التركيز المعطى لثمرة نبات الشمار لحيوانات التجربة أن يكون (5%) و (10%) من الغذاء اليومي للجرذ الواحد و التي تتوافق مع طريقة اعطاء بذور نبات الشمار ضمن الدستور الامريكي للاعشاب الطبية (9) و بموافقة قسم طب الاعشاب بوزارة الصحة ، وكما يأتي:-

- 1- الغذاء الحيواني اليومي تراوح ما بين (20-30) غم من العلف الحيواني المركز يتضمن البروتينات و الفيتامينات و المعادن و الالياف.
- 2- احتسب تركيز ثمرة نبات الشمار { (5) % و (10) % } من غذاء الحيوان اليومي من خلال تقسيم مجاميع اناث الجرذان الثلاث الرئيسية الفسلجية {العذارى و الحوامل و المرضعات} و حسب الحاجة اليومية لكل حالة، حيث استخدم الطحين الاسمر في العليقة لما يحتويه من فيتامينات و حامض اليوريك و معادن و الياف.
- 3- خلطت العليقة بمقدار قليل من الماء لتصبح كعجينة ثم فرشت على سطح أملس و قطعت الى قطع صغيرة .
- 4- عُرضت الى ضوء الشمس لمدة (36) ساعة في بداية موسم الشتاء وخلال موسم الشتاء و لعدم كفاية ضوء الشمس وضعت العجينة بفرن كهربائي بحرارة تتراوح ما بين (100-150) درجة مئوية و بوقت تراوح ما بين (2-30) ساعة .



5- بعد تجفيف العجينة النباتية حفظت ثم قُدمت الى الحيوان كغذاء يومي .

## 5-2 تصميم التجربة

تم في هذه التجربة دراسة تأثير ثمرة نبات الشمار *Foeniculum vulgare* على أوزان اناث الجرذان اثناء مرحلة البلوغ Puperty والحمل pregnancy والرضاعة Lactating .  
تم ذلك على ثلاث مراحل فسلجية للجرذ لكل من التركيزين (5%) و(10%) من ثمرة نبات الشمار Fennel :-

❖ المرحلة الاولى: دراسة تأثير ثمرة نبات الشمار على أوزان الجرذان للغذاري.

أُستخدمت في هذه المرحلة (30) انثى من الجرذان البالغة جنسياً، ووضعت في اقفاص كبيرة وقسمت عشوائيا الى مجموعتين حيوانات سيطرة و أربعة مجاميع معاملة بالنبات، وكل مجموعة تضم (5) حيوانات، ثم عوملت الحيوانات على النحو التالي:-

### \* مجموعة السيطرة Control group

استمرت حيوانات هذه المجموعة بتناول العلف الحيواني المركز بصورة حرة طيلة فترة التجربة حيث استمرت المجموعة الاولى لمدة (10) أيام و المجموعة الثانية لمدة (20) يوما".

### • مجموعات المعاملة Treated groups

المجموعة الاولى: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام .  
المجموعة الثانية: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".  
المجموعة الثالثة : أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام.  
المجموعة الرابعة: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".

❖ المرحلة الثانية: دراسة تأثير ثمرة نبات الشمار على أوزان اناث الجرذان اثناء مرحلة الحمل

أُستخدمت في هذه التجربة (30) من الاناث الحوامل ، ووضعت في اقفاص كبيرة وذلك بعد ان تم توحيد عمر الحمل و جعله متقاربا". تم التأكد من حصول الاخصاب عن طريق مشاهدة الحيامن في المسحة المهبلية Vaginal smear ، وملاحظة السداة المهبلية Vaginal plug في اليوم الثاني من اطلاق الذكور. ثم قسمت عشوائيا الى مجموعتين حيوانات سيطرة وأربعة مجاميع معاملة بالنبات، و كل مجموعة تضم (5) حيوانات، وفي اليوم (5) من فترة الحمل عوملت الحيوانات على النحو التالي:-

### \* مجموعة السيطرة Control group

استمرت حيوانات هذه المجموعة بتناول العلف الحيواني المركز بصورة حرة طيلة فترة التجربة حيث استمرت المجموعة الاولى لمدة (10) أيام والمجموعة الثانية لمدة (20) يوما".

### \* مجموعات المعاملة Treated groups

المجموعة الاولى: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام .  
المجموعة الثانية: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".  
المجموعة الثالثة : أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام.  
المجموعة الرابعة: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10%) من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".

### ❖ المرحلة الثالثة: دراسة تأثير ثمرة نبات الشمار على أوزان اناث الجرذان اثناء مرحلة الرضاعة

تم استخدام (30) انثى مرضعة وقسمت عشوائيا الى مجموعتين حيوانات سيطرة و أربعة مجاميع معاملة بالنبات ، بعد اليوم الاول من الولادة ، و كل مجموعة تضم (5) حيوانات، وعوملت الحيوانات على النحو التالي:-

#### \*مجموعة السيطرة Control group

استمرت حيوانات هذه المجموعة بتناول العلف الحيواني المركز بصورة حرة طيلة فترة التجربة حيث استمرت المجموعة الاولى لمدة (10)أيام والمجموعة الثانية لمدة (20) يوما".

#### \* مجموعات المعاملة Treated groups

المجموعة الاولى: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5)% من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام .  
المجموعة الثانية: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (5)% من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".  
المجموعة الثالثة : أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10)% من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (10) أيام.  
المجموعة الرابعة: أعطيت حيوانات هذه المجموعة العليقة النباتية المتضمنة ثمرة نبات الشمار بتركيز (10)% من الغذاء اليومي لكل جرذ منها لمدة (20) يوما".  
وبعد مضي (10 و 20 ) يوم لكل جرذ من تناوله العليقة النباتية، خُدرت الحيوانات بواسطة الكلوروفورم للمجاميع المعاملة وغير المعاملة، ثم جرى قياس وزنها لملاحظة تأثير النبات على وزنها.

### النتائج والمناقشة

#### 1) مجموعة العذارى Virgins group

- الارتفاع المعنوي ( $P<0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بثمرة النبات بكلا تركيزيهما (5% و 10%) لمدة (10) يوم (189 و 196) غم على التوالي ومعدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بكلا تركيزيهما (5% و 10%) لمدة (20) يوم (197.8 و 209.2) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان مجموعة العذارى (السيطرة) لمدة (10 و 20) يوما" (169 و 174.6) غم على التوالي.
- الارتفاع المعنوي ( $P<0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (10) يوم (196) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (10) يوم (189) غم.
- الارتفاع المعنوي ( $P<0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (20) يوم (209.2) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (20) يوم (197.8) غم.
- الارتفاع المعنوي ( $P<0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (20) يوم (197.8 و 209.2) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان العذارى المعاملة بالتراكيز نفسها لمدة (10) يوم (189 و 196) غم على التوالي.



جدول 1- يوضح معدل أوزان الجرذان { العذاري المعاملة بثمرة نبات الشمار بتركيز (5% و 10%) من الغذاء اليومي لمدة (10 و 20) يوما".

	(10) يوم	(20) يوم
الحيوانات	معدل الأوزان $\pm$ SD	معدل الأوزان $\pm$ SD
عذاري (سيطرة)	169 $\pm$ 3.7	174.6 $\pm$ 8.9
عذاري معاملة بثمرة النبات بتركيز (5%) من الغذاء اليومي	189 $\pm$ 4.1*	197.8 $\pm$ 4*#
عذاري معاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) من الغذاء اليومي	196 $\pm$ 4.1*^	209.2 $\pm$ 2.9*^#

P<0.05

\* الفروقات المعنوية Significant differences ما بين حيوانات السيطرة و المعاملة بالثمرة.

^ الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة.

# الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة لمدة (10) يوم و لمدة (20) يوما".

## 2) مجموعة الحوامل Pregnant group

■ الارتفاع البسيط لمعدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5%) لمدة (10) يوم (209) غم والارتفاع المعنوي (P<0.05) لمعدل أوزان الحوامل المعاملة بتركيز (10%) لمدة (10) يوم (238) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان مجموعة الحوامل (السيطرة) لمدة (10) يوم (203.6) غم.

■ الارتفاع المعنوي (P<0.05) لمعدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (10) يوم (238) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (10) يوم (209) غم.

■ الارتفاع المعنوي (P<0.05) لمعدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (20) يوم (225 و 258) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان مجموعة الحوامل (السيطرة) لمدة (20) يوما (211) غم.

■ الارتفاع المعنوي (P<0.05) لمعدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (20) يوم (258) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (20) يوم (225) غم.

■ الارتفاع المعنوي (P<0.05) لمعدل أوزان الجرذان الحوامل المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (20) يوم (225 و 258) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان الحوامل المعاملة بالتراكيز نفسها لمدة (10) يوم (209 و 238) غم على التوالي.

جدول 2- يوضح معدل متوسط أوزان الجرذان { الحوامل المعاملة بثمرة نبات الشمار بتركيز (5% و 10%) من الغذاء اليومي لمدة (10 و 20) يوما".

	(10) يوم	(20) يوم
الحيوانات	معدل الأوزان $\pm$ SD	معدل الأوزان $\pm$ SD
حوامل (سيطرة)	203 $\pm$ 4.1	211 $\pm$ 7.4
حوامل معاملة بثمرة النبات بتركيز (5%) من الغذاء اليومي	209 $\pm$ 4.1*	225 $\pm$ 5*#
حوامل معاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) من الغذاء اليومي	238 $\pm$ 5.7*^	258 $\pm$ 5.7*^#

P<0.05

\* الفروقات المعنوية Significant differences ما بين حيوانات السيطرة و المعاملة بالثمرة.

^ الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة.

# الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة لمدة (10) يوم و لمدة (20) يوما".

**3) مجموعة المرضعات Lactating group**

الانخفاض المعنوي ( $P < 0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (10) يوم (178.6 و 167.2) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان مجموعة المرضعات (السيطرة) لمدة (10) يوم (185.6) غم.

■ الانخفاض المعنوي ( $P < 0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (10) يوم (167.2) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (10) يوم (178.6) غم.

■ الانخفاض المعنوي ( $P < 0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (20) يوم (170.2 و 153) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان مجموعة المرضعات (السيطرة) لمدة (20) يوم (181.6) غم.

■ الانخفاض المعنوي ( $P < 0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) لمدة (20) يوم (153) غم لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (20) يوم (170.2) غم.

■ الانخفاض المعنوي ( $P < 0.05$ ) لمعدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بثمرة النبات بتركيز (5% و 10%) لمدة (20) يوم (170.2 و 153) غم على التوالي لدى مقارنته مع معدل أوزان الجرذان المرضعات المعاملة بالتركيز (5%) لمدة (10) يوم (178.6 و 167.2) غم على التوالي.

جدول 3: يوضح معدل متوسط أوزان الجرذان { المرضعات المعاملة بثمرة نبات الشمار بتركيز (5% و 10%) من الغذاء اليومي لمدة (10 و 20) يوما".

	يوم (10)	يوم (20)
الحيوانات	معدل الأوزان $\pm$ SD	معدل الأوزان $\pm$ SD
مرضعات (سيطرة)	185.6 $\pm$ 3.7	181.6 $\pm$ 3.6
مرضعات معاملة بثمرة النبات بتركيز (5%) من الغذاء اليومي	178.6 $\pm$ 4.9*	170.2 $\pm$ 4.7*^#
مرضعات معاملة بثمرة النبات بتركيز (10%) من الغذاء اليومي	167.2 $\pm$ 5.6*	153 $\pm$ 4.4*^#

P &lt; 0.05

\* الفروقات المعنوية Significant differences ما بين حيوانات السيطرة و المعاملة بالثمرة.

^ الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة.

# الفروقات المعنوية Significant differences ما بين الحيوانات المعاملة لمدة (10) يوم و المعاملة لمدة (20) يوما".

بينت النتائج التي حصلنا عليها من جراء المعاملة بثمرة نبات الشمار بتركيز (5% و 10%) لمدة (10 و 20) يوما"، حصول تغير في معدل أوزان اناث الجرذان بالحالات الفسلجية الثلاث (العذراء و الحامل و المرضع)، وذلك من خلال زيادة معدل أوزان اناث الجرذان (العذاري و الحوامل) بكلا تركيزيها ولمدة (10 و 20) يوم ولاسيما بتركيز (10%) لمدة (20) يوم لان نبات الشمار من الأعشاب الطبيعية التي تستعمل لتحسين الهضم و فتح الشهية لاستعماله كتوابل و تحسين صناعة الخبز و الحلويات و يدخل ضمن مكسبات الطعم لكثير من الأغذية (10) (11). أما بالنسبة الى التغير الحاصل بمعدل أوزان الجرذان المرضعات و ذلك من خلال نقصان أوزانها بتركيز (5% و 10%) لمدة (10 و 20) يوم و لا سيما الانخفاض كان واضحا جدا" بتركيز (10%) لمدة (20) يوم ، ذلك ان المرضع تخسر الكثير من وزنها خلال الرضاعة لاستهلاك الكثير من المواد الكربوهيدراتية و البروتينات و الدهون من قبل المرضع (12)، و بذلك فإن النبات على الرغم من احتوائه على البروتينات و الدهون و الكربوهيدرات و الفيتامينات الا انه لم يقد بزيادة أوزان الجرذان المرضعة.

و قد جاءت نتائج الزيادة الوزنية لعذاري و حوامل الجرذان مطابقة لنتائج (13) في زيادة أوزان الجرذان العذاري و الحوامل من جراء المعاملة بالخلصة المائية لبذور نبات الحرمل و



الخلاصة المائية لنبات ورد لسان الثور. أما نتائج النقصان في اوزان مرضعات الجرذان فكانت مخالفة لنتائج اوزان المرضعات (13).

#### الاستنتاجات

1. أُسنتج من الدراسة ان لدى ثمرة نبات الشماربتركيز (5%) لمدة (10) يوم تأثير بسيط على اوزان الجرذان (العذاري و الحوامل) لانه احدث زيادة بسيطة في اوزانها بينما في حالة اطالة المدة الزمنية لمدة (20) يوما " احدث تأثيرا "عاليا" على اوزانها مما يعني ان لثمرة النبات تأثيرا" باطالة المدة الزمنية لهذا التركيز.
2. احدثت ثمرة نبات الشمار بتركيز (10%) تأثيرا " فاعلا" من خلال الزيادة العالية بأوزان الجرذان (العذاري و الحوامل) بكلتا المديتين الزمنية (10 و 20) يوما" ولاسيما بتركيز (10%) لمدة (20) يوم ، أي أن الثمرة احدثت التأثير بالزيادة الوزنية العالية من خلال تركيزها (10%) و من خلال اطالة المدة الزمنية لتناولها .
3. إن تأثير الثمرة على اوزان الجرذان (المرضعة) لم تظهر أي زيادة وزنية، بل على العكس من ذلك فقد احدثت انخفاضاً وزنياً " ملحوظاً" باختلاف تراكيزها و المدة الزمنية لتناولها و كان التأثير الأقوى من بين تراكيزها هو (10%) لمدة (20) يوم و هذا يعني ان الثمرة أثرت على اوزان المرضعات تأثيرا " فعليا" سواءا" أكان بتراكيزها المختلفة أو المدة الزمنية لتناولها . ويمكن الاستفادة في ذلك باستعماله كغذاء يومي أو مضافاً الى الأغذية كحلويات للمرضع بدون أن تحدث زيادة في وزنها .

#### المصادر

1. Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. (2006). Molecular target of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* 71, 1397-142.
2. الزبيدي، زهير نجيب وهدى بابان و فارس كاظم (1996). دليل العلاج بالاعشاب الطبية العراقية. مركز طب الاعشاب. وزارة الصحة/ الطبعة الاولى. 3، 47.
3. Piccaglia, R. and Marotti, M. (2001). Characterization of some Italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J. of Agri. and Food Chem.*, 49, 239-244.
4. Tanira, M. O. M., Shah, A. H., Mohsin, A., Ageel, A. M., and Qureshi, S. (1996). Pharmacological and toxicological investigations on *Foeniculum vulgare* dried fruit extract in experimental animals. *Phytotherapy Res.*, 10: 33-36.
5. Camejo-Rodrigues, J.S., Ascensão, L., Bone, T.M.À., and Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S. Mamede (Portugal). *J. Ethnopharmacol.* 89, 199-209.
6. Carvalho, A.M. (2005). Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal. Universidad Autnoma, Madrid.
7. Novais, H.M., Santos, I., Mendes, S., and Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arr.bida Natural Park. *J. Ethnopharmacol.* 93, 183-195.
8. Salgueiro, J. (2004). Ervas, usos e saberes. MARCA, Associacao de Desenvolvimento Local, Lisboa.

9. PDR for herbal medicines (1998). Medical economics company. 1<sup>st</sup> (ed.), 850-851.
10. الجنابي، بحرية (1988). الاعشاب والتوابل في حياتنا. دار اللام. لندن: ص 52 ، ص 119.
11. الدجوي، علي (1996). موسوعة النباتات الطبية و العطرية. الطبعة الاولى. مكتبة مدبولي/القاهرة. 150
12. Guyton, A.C. and Hall, J.E. (2011). Text book of medical physiology. 12<sup>th</sup> (ed.): 991-994, 1014-1016.
13. السعيد، وسن عبد الوهاب فائق (2005). تأثير بعض مدررات الحليب على الغدد اللبئية لاناث الجرذان: دراسة نسجية، كيميائية نسجية، كيميائية نسجية. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.



## تقييم الفعالية السمية لبعض المستخلصات النباتية المائية ضد الفطر *Fusariumoxysporum*

أمل عبد السلام الحبيب ولقاء جميل ابراهيم  
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/الجامعة المستنصرية  
تاريخ تقديم البحث 2012/2/28 - تاريخ قبول البحث 2012/11/6

### ABSTRACT

This laboratory study was carried to evaluate the toxic activity of the aqueous extract of *Sonchusoleraceus*, *Chenopodiummurale*, *Senecio vulgaris* and *Eucalyptus camaledulensis* leaves against *Fusariumoxysporum*. Results showed that significant effect of the *Eucalyptus* extract at 94,4% which showed high inhibition activity on fungal colony diameter growth. In concentration at (10g/100ml). Other extracts inhibition were 4.4 %, in *Sonchus* in the same oncentration. Also water extract were tested on percentage infection of tomato seedling( damping off), results showed significant effect reduction in infection percentage with same concentration was 75,3%. phenolic, steroid, tanin, coumarin, essensialoil, glycoside, terpenes resins and saponin were detected in different leaves extracts accepts *Sonchus* extract it had resins only.

### الخلاصة

تم تقييم الفعالية السمية للمستخلصات المائية لاوراق نباتات السوتكس *Sonchusoleraceus* الرغيلة *Chenopodiummurale*، المرير *Senecio vulgaris* والكاليبتوز *Eucalyptus camaledulensis* مستنصرية، وقد تفوق المستخلص المائي لاوراق نبات الكاليبتوز على جميع المستخلصات المائية حيث اعطى نسبة تثبيط لنمو الميسيليوم 94,4% بتركيز (في حين اعطى المستخلص المائي لاوراق نبات السونكس بنفس التركيز نسبة مئوية للتثبيط بلغت 4,4%. وان المستخلص المائي لاوراق الكاليبتوز بتركيز (غم مطحون الاوراق / 100 مل ماء مقطر) نسبة انبات لبذور الطماطة بنسبة 3 و 75 % مزروعة باطباق ملوثة بسبورات فطر الفيوزاريوم. دل الكشف الكيميائي على وجود المركبات صابونينية، تانينات، كليكوسيدات، فينولات، قلويدات، تربينات، ستيرويدات، راتنجيات، كومارينات وزيوت طيارة. وقد تميز المستخلص المائي لاوراق نبات السونكس بعدم احتوائه على مواد فعالة لكنه احتوى على مركبات راتنجية فقط.

### المقدمة

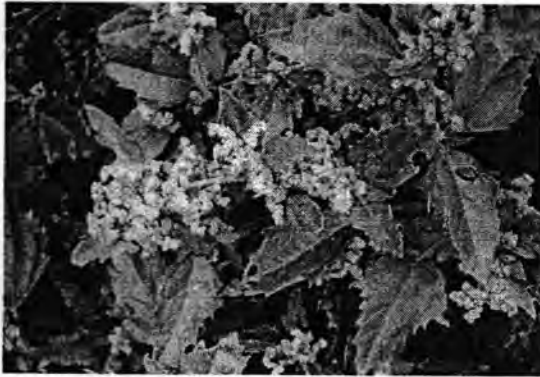
يعد مرض الذبول الوعائي المتسبب عن الفطر *Fusariumoxysporum* من الامراض المهمة التي تصيب مختلف العوائل النباتية مثل العائلة الباذنجانية، القثائية والخبازية وغيرها من العوائل، ويتميز الفطر بأن له أشكال فسيولوجية متخصصة بالنسبة للنبات العائل، ويحدث بها مجموعة من الاعراض على الاجزاء المصابة مثل تهدل معظم أو كل الاجزاء النباتية فوق سطح التربة (1). وتسبب أمراض الذبول الفيوزاريومي خسائر اقتصادية عالية لعدد كبير من النباتات والمحاصيل الحقلية والبساتين (2). حيث تسبب موت النبات ونقصاً في الانتاج ورياء النوعية، وللد من التوسع في استخدام المبيدات الكيميائية وخطورتها على بيئة وصحة الانسان علاوة على ارتفاع اسعارها فضلاً عن ظهور صفة المقاومة للعديد من هذه الممرضات نتيجة لسوء الاستخدام من قبل المزارعين وغش بعض الشركات المصنعة، لذا اتجهت الدراسات الحديثة الى استخدام بدائل نباتية طبيعية، تتميز بكونها رخيصة ومتوفرة بكميات كبيرة وتأثيراتها الجانبية قليلة وامينة لانها سريعة التحلل، لذا فقد استخدمت في العديد من الدراسات المستخلصات النباتية لازهار وجذور واوراق النباتات الحاوية على المواد الفعالة ذات التأثير المثبط للعديد من الافات الزراعية (الحشرية، البكتيرية، الفطرية).

لذلك كان هدف الدراسة هو لتقييم الفعالية السمية لبعض ادغال الحقول المنتشرة بصورة واسعة مثل نبات السونكس *Sonchusoleraceus* ، الرغيلة *chenopodiummurale* ، ونبات المرير *Senecio vulgaris* واوراق اشجار الكاليبتوز *Eucalyptus camaledulensis* ضد فطر *Fusariumoxysporum*.

*Sonchusoleraceus*: نبات حولي، قائم يصل ارتفاعه إلى متر تقريبا. ساقه مضلعة ومجوفة، ضعيفة. الأوراق عميقة التفصص، والفصوص مسننة غير منتظمة. الأزهار تتجمع في نورات هرمية لونها اصفر عند تفتحها. البذور مزودة بمضلة ريشية تساعد على حملها إلى مسافات بعيدة بواسطة الرياح وللنبات عصارة لينة بيضاء، تسيل عند جرحه ووجد ان جذوره تحتوي على كلايكوسيدات سامة للخلايا الحية (3).

*Chenopodiummurale* نبات عشبي حولي ينتمي الى عائلة *Chenopodiaceae* اوراقه خضراء غضة كاوراق السبانخ ملمسها املس وبودري تنتشر في فصل الربيع (4).

*Chenopodiummurale*



*Sonchusoleraceus*



*Senecio vulgaris*: نبات حولي يظهر في الربيع و يعود الى العائلة المركبة ونبات ساقه منتصب ويتفرع من القاعدة اوراقه جالسة وتغطي بشعيرات ملساء وتحتوي جميع اجزاء النبات على مركبات قلوية سامة (5).



*Senecio vulgaris*

*Eucalyptus camaledulensis*: ينتمي نبات اليوكالبتوس الى العائلة *Myrtaceae* ويبلغ ارتفاع الـ *E. camaledulensis* 40م وبقطر 2م تحتوي اوراق نبات اليوكالبتوس على



(تركيز عالي من الكلاكيوسيدات السامة) وان هذه السمية تزداد عندما ينمو النبات في الجو الجاف عنه في المناطق غزيرة الامطار (6).



*camaledulensis Eucalyptus*

### المواد وطرائق العمل

جمع وتحضير النماذج النباتية :-

جمعت أوراق النباتات من حدائق الجامعة المستنصرية في شهر اذار لسنة 2012 وتم تصنيفها في معشب كلية العلوم / جامعة بغداد، وأتبع طريقة Saadabi (7) في تحضير الأوراق النباتية للاستخلاص وذلك بغسل الأوراق النباتية بماء الحنفية بعدها بالماء المقطر، وقطعت إلى أجزاء صغيرة وتركت في ظروف المختبر لتجف، طحنت الأوراق الجافة بالمطحنة الكهربائية للحصول على مسحوق ناعم، حفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين الاستخدام.

تم خلط مطحون الاوراق مع الماء المقطر بنسبة 1غم مادة جافة / 10مل ماء مقطر وخلطت في الخلاط الكهربائي لمدة 10 دقائق وتركت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة، ثم رشح الخليط بواسطة قماش الشاش ثم رشح المستخلص بورق الترشيح ولزيادة النقاوة تم وضع المستخلص في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

تحضير الوسط الزراعي:- 1- تم تحضير الوسط الزراعي (P.D.A) وذلك باذابة 39 غم من المطحون الجاهز لل (P.D.A) في 1000 مل من المستخلص النباتي. واعتبر ذلك تركيز (1) من المستخلص النباتي

2- تركيز (0.5) فيحضر باذابة 39 غم من ال (P.D.A) في 500 مل ماء مقطر + 500 مل من المستخلص نباتي).

3- تركيز (صفر) فيحضر باذابة 39 غم من ال (P.D.A) في ماء مقطر فقط.

4- استخدم مبيد ريذوميل بتركيز 100/350 لتر كمقارنة

تم تعقيم جميع التراكيز السابقة (عدا معاملة المبيد) بواسطة جهاز Autoclave بدرجة حرارة 121 م وتحت ضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> ولمدة 20 دقيقة بعد عملية التعقيم يتم صب الأوساط الغذائية فيأطباق بتري التي تركت لتتصلب.

بعدها لقحت بأقراص فطرية بقطر (5) ملم قطعت بواسطة مثقاب فليني من مزرعة فطرية نقية ومشخصة بعمر ثمانية أيام ووضعت في مركز الطبق الزراعي (8) واستخدمت أطباق السيطرة بنوعين هي السيطرة رقم (1) (بدون إضافة أي مادة) والسيطرة رقم (2) (بإضافة مبيد ريذوميل). وبخمس مكررات لكل معاملة، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (28) م ولمدة اربعة

أيام ، ثم تم قياس معدل قطرين متعامدين للمستعمرات المثبطة وبعدها استخدمت المعادلة التالية لمعرفة نسب التثبيط (9) :-

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{متوسط قطر المقارنة} - \text{متوسط قطر المعاملة}}{\text{متوسط قطر المقارنة}} \times 100$$

اختبار فعالية المستخلص المائي في تثبيط انبات سبورات فطر الفيوزاريوم و اصابة بذور الطماطا في الإطباق الزراعية :-

اختبرت فعالية المستخلص المائي لاوراق الكالبيتوز (الاكثر تثبيطاً) حسب نتائج التجربة الاولى ضد الفطر *F. oxysporum* في الإطباق الزراعية باستخدام بذور الطماطا *Lycopersicon esculentum*، حيث وزعت البذور على الإطباق الحاوية على القطن الطبي بعدد (15) بذرة لكل طبق بعدها لقحت الإطباق ب (1) مل من وسط البطاطا السائل الحاوي على سبورات الفطر بعمر خمسة أيام ومن ثم أضيف المستخلص النباتي بتركيز مختلفة هي (1، 0.5 و 0) محضرة من تخفيف المستخلص بالماء المقطر ، وكررت المعاملة الواحدة ثلاث مرات. وللمقارنة استخدم المبيد الفطري ريدوميل مع وجود أطباق السيطرة المضاف إليها ماء مقطر فقط .

التحليل الإحصائي :-نفذت التجارب باستخدام التصميم التام العشوائية وحللت البيانات إحصائياً باستخدام جدول تحليل التباين (الراوي، 1980) وتقدير أقل فرق معنوي (LSD)

#### الكشف الكيميائي للمستخلصات النباتية

اعتمدت طريقة (McPherson, 1971)، حيث اخذت 25 غم من كل المعاملات المجففة والمطحونة واستخلصت بواسطة الكحول الايثيلي تركيز 80% بنسبة 1غم لكل 5مل من الكحول، ثم وضعت في الجهاز الهزاز لمدة 24 ساعة، بعدها رشحت بواسطة قماش الشاش وورق الترشيح ولزيادة النقاوة استعمل جهاز الطرد المركزي (سرعة 3000دورة / دقيقة) لمدة 15دقيقة. بعد تنقية المستخلصات الكحولية من الشوائب، تم معاماتها بالكواشف الكيميائية التالية والتي حضرت حسب طريقة (Atlas 1995) وهي:

- 1- الكشف عن الزيوت الطيارة ،ياخذ مل من المستخلص النباتي ،يتم ترشيحها بواسطة ورقة ترشيح ثم تفحص ورقة الترشيح بواسطة الاشعة فوق البنفسجية وان ظهور اللون الوردي البراق دليل على وجود الزيوت الطيارة.
- 2- الكشف عن الفينولات :وذلك بأذابة 1غم من كلوريد الحديد في 100مل ماء مقطر ،بعدها نأخذ 3مل من المستخلص واضافته الى 2مل من الكاشف وعند ظهور لون أصفر مزرق يدل على وجود الفينولات.
- 3-الكشف عن القلويدات: اضافة 3مل من المستخلص الى 2مل من محلول دراجندوف(اذابة 6 غم من ايوديد البوتاسيوم واذابتها في 10مل من الماء المقطر)،هذا المحلول الاول ، اما المحلول الثاني فيتكون من اذابة 0.6 من مركب Bismuth Sub nitrate واضيف الى 2مل حامض الهيدروكلوريك المركز و 10 مل ماء مقطر.
- عند مزج المحلولان الاول والثاني واطافة 7مل من حامض الهيدروكلوريك المركز واكمل الحجم الى 400 مل باستخدام الماء المقطر) يعطي لونا برتقاليا عند مزجه مع المواد الحاوية على القلويدات.

- 1- للكشف عن الكومارينات: اضافة 0.5 مل من المستخلص مع 1مل من الكحول في انبوبة اختبار ثم غطيت الانبوبة بورقة ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف ووضعت في حمام مائي بدرجة الغليان لبضعة دقائق ثم عرضت ورقة الترشيح للأشعة فوق البنفسجية، ان ظهور لون اصفر مخضر دليل على وجود الكومارين.

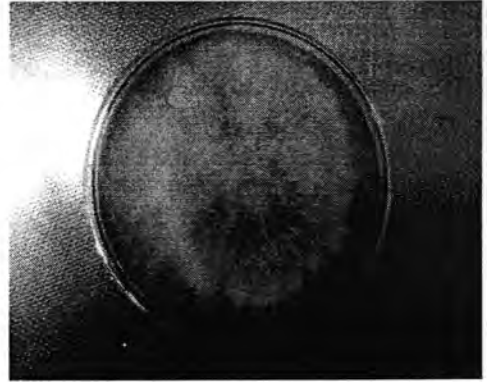
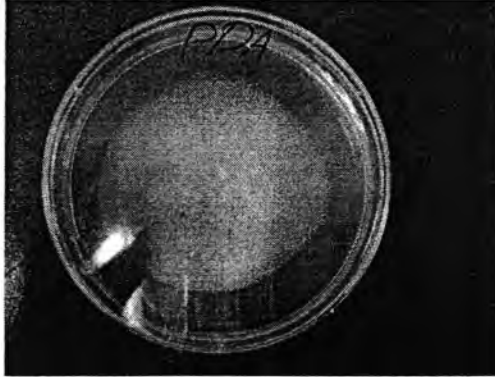


- 5-الكشف عن التانينات : تم أخذ 25 مل من المستخلص وأضافه 1% من محلول كلوريد الحديدك وعند ظهور اللون الأزرق دل على ايجابية الكشف.
- 6 --الكشف عن الراتنجات: تم أخذ 10 مل من المستخلص وأضيف له 20 مل ماء مقطر محمض بحامض الهيدروكلوريك HCL 4 % وعند ظهور العكارة في المحلول يدل على ايجابية الكشف.
- 7-الكشف عن التربينات والسترويدات: اتبعت طريقة وذلك بأذابة 1 غم من المستخلص الكحولي الجاف في قليل من الكلوروفورم ثم تضاف قطرة من حامض الخليك اللامائي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز. وبعد 1-2 دقيقة عند ظهور اللون البني دل على وجود التربين وعند ظهور اللون الأزرق بعد فترة دل على وجود السيترود).
- 8-الكشف عن الكلايكوسيدات: حيث وضع 1 مل من المستخلص في انبوبة اختبار وأضيف له 2مل من كاشف بندكت { يتكون من اذابة 137 غم من سترات الصوديوم و100 غم من كاربونات الصوديوم المائية في 800 مل من الماء المقطر، رشح المحلول وأضيف له محلول كبريتات النحاسيك 3 و17 غم في 100 مل ماء مقطر ، ثم اكمل الحجم الى 1000 مل باستعمال الماء المقطر } ثم نقل الى حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق وظهور اللون الاحمر يدل على احتواء المستخلص للكلايكوسيدات.
- 9- الكشف عن الصابونيات: تم اخذ 5 مل من المستخلص النباتي في انبوبة اختبار ورجه بشدة لمدة نصف دقيقة وعند ظهور رغوة كثيفة في الانبوبة دون اختفائها بعد مدة تتراوح من 3 - 5 دقيقة دل على وجود المواد الصابونية فيه.
- النتائج المناقشة:-
- يظهر من جدول (1) ان هناك فروق معنوية بين جميع المعاملات وبين معاملات السيطرة، عدا مستخلص نبات السونكس بتركيز 0.5 لم يختلف معنويا عن معاملة السيطرة (ماء مقطر + PDA)، بل ان نمو خيوط المايسيليوم قد نمت بشكل اكثر كثافة من معاملة السيطرة. ونجد ان هناك فروق معنوية بين تراكيز المعاملات فيما بينها كما يظهر من جدول(1).

جدول 1- تأثير المستخلصات على معدل أقطار نمو الفطر *F.oxysporum*

التسلسل	المعاملات	التراكيز	نمو فطر بالملم	نسبة التنشيط المنوية
1	اوراق السونكس	1	c86	4 و4
		0.5	b90	0
2	اوراق الرغيلة	1	d75	16 و6
		0.5	e60	33 و3
3	اوراق المريير	1	f40	55 و5
		0.5	g50	44 و4
4	اوراق الكالبيتوز	1	h5	94 و4
		0.5	i10	88 و7
5	السيطرة ماء مقطر	0	b86	0
6	السيطرة مييد ريديميل	350 غم/100 لتر	a0	100

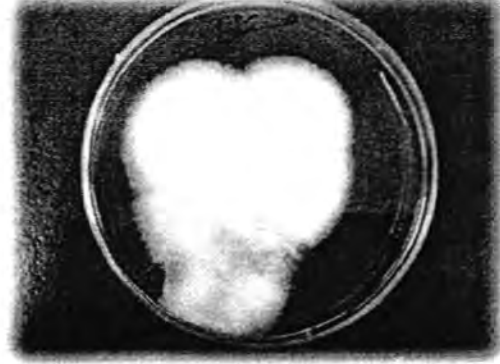
الحروف المختلفة بينها فرق معنوي (0.05) ، الحروف المتشابهة بين المعاملات لا يوجد بينها فرق معنوي



مستخلص السونكس بتركيز (0.5) ( السيطرة ماء مقطر + PDA )  
شكل -1: يبين الفرق بين نمو الميسيليوم بين معاملة 0.5 مستخلص السونكس بتركيز (0.5) وبين معاملة السيطرة : ( يبين ان المعاملة بتركيز (0.5) قد حفزت نمو الفيزاريوم )

اما مستخلص اوراق الكالبيتوز فقد اعطى اعلى نسبة تثبيط وهي 94 و 4 بتركيز (1) حيث كان معدل قطر المايسيلوم 5 ملم ، اما بتركيز 0.5 كان معدل قطر المايسيلوم 10 ملم واعطى نسبة تثبيط 7 و 88 %، ويأتي بعد الكالبيتوز نبات المرير حيث كانت النسبة المئوية للتثبيط في التركيزين 1 ، و 0.5 هي 5 و 55 % ، و 4 و 44 % على التوالي ، ونجد ان مستخلص اوراق الرغيلة كانت النسبة المئوية للتثبيط له منخفضة وهي 16 % ، و 3 و 33 % على التوالي مقارنة مع نسبة التثبيط التي اعطاها مستخلص اوراق الكالبيتوز .

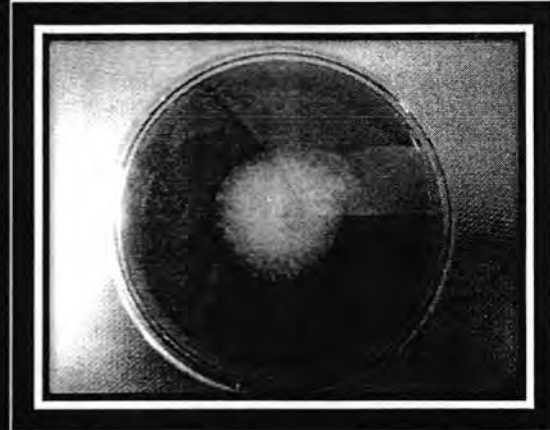
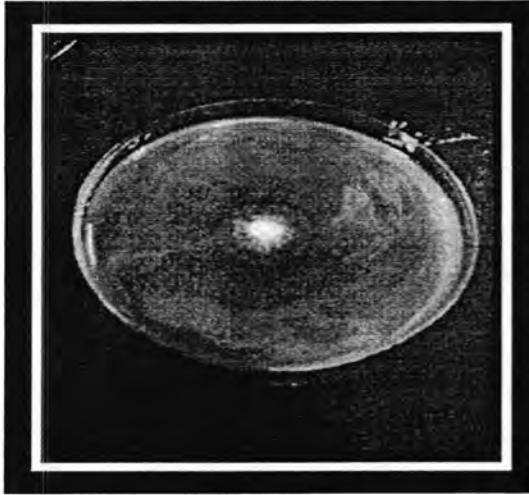
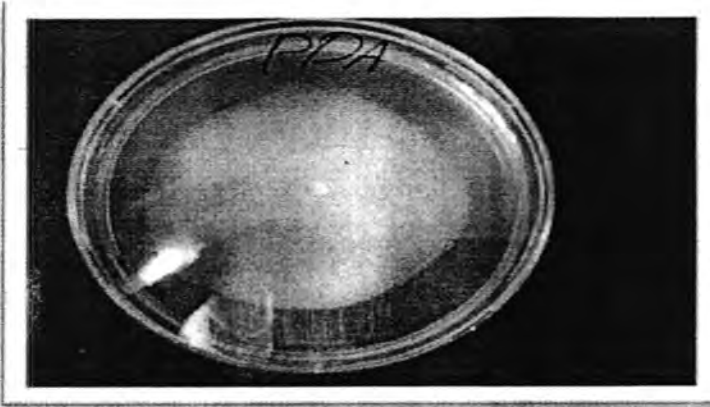
مستخلص نبات السونكس (1)



مستخلص نبات الرغيلة (2)



السيطرة (3)



(4) مستخلص نبات المرير (5) مستخلص نبات الكالبيتوز  
شكل-2: اقطار المايسيليوم في المستخلصات النباتية بتركيز (1) مقارنة مع معاملة السيطرة.

وتفوقت نتائج البحث الحالي على ما توصل اليه (13) من خلال استخدام المستخلصات المائية لنبات الداتورة واليوكالبتوز في تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum* إذ حقق النبات الأول نسبة تثبيط 67.5% والنبات الثاني 59.25% عند التركيز 25% (25 ملغم / مل) .

جدول-2: النسبة المئوية لانبات بذور الطماطة وعدد البادرات النامية في وسط زرع ملوث بسبورات الفيوزاريوم و تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي للكالبيتوز والمبيد الفطري

التراكيز (غم مطحون النبات /10 مل ماء) للمستخلص النباتي الكالبيتوز	النسبة المئوية لانبات البذور	عدد البادرات النامية
1	%80 c	c11
0.5	%70 b	b7
0	%60 a	a0
المبيدات مبيد ريدوميل 350 غم/100 لتر	%85 c	d13

الحروف المختلفة بينها فرق معنوي (0.05) .  
الحروف المتشابه بين المعاملات لا يوجد بينها فرق معنوي.

نجد في هذه التجربة انه كلما زاد التركيز مستخلص اوراق الكالبيتوز كلما زادت النسبة المئوية للانبات بذور الطماطة و عدد البادرات النامية وهذا يدل على ان زيادة التركيز ادى الى زيادة في عملية تثبيط انبات ونمو السبورات وبالتالي الى زيادة بزوغ ونمو البادرات كما هو مبين في جدول (2).

جدول-3: الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة في اوراق النباتات المختبرة

المركبات الفعالة	السونكس	الرغيلة	المرير	الكالبيتوز
صابونينات	-	+	-	++
تانيينات	-	-	-	+
كلايكوسيدات	-	+	+	-
فينولات	-	+	+	+
قلويدات	-	+	+	+
تربينات	0	+	+	+
ستيرويدات	-	-	-	-
راتنجات	+	-	+	+
كومارينات	-	+	+	++
زيوت طيارة	-	+	-	+

+ تعني وجود المركب ، ++ تعني الشدة اللونية العالية ، - تعني عدم وجود المركب

اما جدول (3) فيبين الكشف الكيميائي لجميع المستخلصات المستخدمة ونجد ان مستخلص نبات السونكس لم يكن يحتوي على المركبات الفعالة عدا مركب الراتنج وهذا يفسر عدم امكانية تثبيطه لفطر الفيوزاريوم بل نجد انه فاق وحفز نمو المايسيليوم في تركيز 0.5، ويمكن ان هناك مركبات عضوية تحفز نمو الفيوزاريوم،

ونجد ان باقي المستخلصات النباتية قد احتوت على المركبات الفعالة ولكن النسبة المئوية للتثبيط التي ظهرت في جدول (1) قد اختلفت حسب نوع المستخلص، ونجد ان مستخلص اوراق الكالبيتوز قد احتوى على اكثر المركبات الفعالة عددا واكثرها تركيزا كما مبين في جدول (3). وهذا يمكن ان يفسر سبب اعطائه اعلى نسبة تثبيط.

وان جميع هذه المركبات لها فعل تثبيطي لنمو الفطريات ،ففي دراسة وجد ان المركبات الكلايكوسيدية والراتنجية والتربينات التي لها تأثير مباشر في تثبيط نمو الفطريات (14) كما ان لها القدرة في تثبيط الفعالية الايضية للفطر (15)، والتأثير على الجدار الخلوي أو البروتين والأحماض الامينية أو على عملية البناء الخلوي وسلسلة نقل الإلكترون داخل الخلية الفطرية (



(16) ، كما وجد في دراسة أخرى ان الكلايكوسيدات والصابونينات والراتنجات والزيوت الطيارة والتربينات تؤثر على الأجزاء الأساسية للغشاء البلازمي في الخلية (17) كما أكد (Lunde) عام (2000) بأن فعالية المستخلصات النباتية تركزت في تحطيم تراكيب الأغشية الخلوية للفطريات الخيطية والخمائر. وأشار Tylor et.al (19) إلى أن مركبات الفينولات والتانينات لها فعالية مضادة للفطريات ، وتمتاز بقدرتها على الاتحاد مع بروتين الخلية وترسيبه فتغير من طبيعته . وان جميع هذه الدراسات تفسر السبب في كون مستخلص اوراق الكالبيتوز هو الاكثر تثبيطا لنمو قطر الفيوزاريوم ، لذا يمكن الاستفادة من اوراق الكالبيتوز وذلك بطحنها وخلطها مع التربة المصابة بهذا الفطر بدلا من استخدام المبيدات الفطرية الملوثة للبيئة .

### المصادر

- 1- جمال الدين ، إبراهيم ، كمال جلال محمد ، عبد الرحمن حسن يحيى ، أحمد زكي علي ( 1992 ) أساسيات أمراض النبات ( ترجمة ) الطبعة الثالثة ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة .
- 2- العروسي، حسين. سمير ميخائيل، محمد علي عبد الرحيم(2001) ،أمراض النبات. منشأة المعارف. الاسكندرية 500.
- 3- EhabSaadElkhayat, 2009Cytotoxic and Antibacterial Constituents from the Roots of *Sonchusoleraceus*L. Growing in Egypt, PharmacognosyMagazine . | Volume : 5 Issue :20 Page .324- 328.
- 4- F. Chittendon. RHS Dictionary of Plants plus Supplement. 1992 pp200.
- 5- Wei-Dong Xie,\* Xia Li, and Kyung Ho Row†2010, A New Pyrrolizidine Alkaloid from *Senecio vulgaris*. Notes Bull. Korean Chem. Soc, Vol. 31, No. 9 2715
- 6- Gleadow, R. M. & Woodrow, I. E. (2002). Defense chemistry of cyanogenicEucalyptascladocaly seedlings is affected by water supply. Tree Physiology 22, 939-945.
- 7- Saadabi ,Abdulmoniem M.A. (2006) Antifungal activity of some Saudi plants used in Traditional medicine J. plants Science , 5 : 907-909 .
- 8- Mashhadian ,NV.andRakhshandeh ,H. (2005) Antibacterial and Antifungal effects of *Nigella saliva* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicase* . J . Medical Science .vol 21 (1) : 47- 52.
- 9- Nwachukwa , E. O. and Umechuruba , C. I.(2001) Antifungal activities of some leaf extracts on seed-borne fungi of African Yam Bean seeds , seed germination and seedling Emergence . J. Applied Sciences & Environmental management , vol. 5, NO. 1: 29-32 .
- 10- الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. جامعة الموصل – دار الكتب للطباعة والنشر.
- 11- McPHerson.J.K., Chou, C.H., and Muller,C.H. 1971.Allelopathic constituents of the chaparral shrub Photochemistry 10:2925-2933.

- 12- Atlas, R.M.;Brown,A.E. and Parke,L.C. 1995. Laboratory Manual of Experimental Microbiology – Mosby Company – year book –Inc. 1st. Louis.
- 13- Satish, A. ; M. P. Raghavenra and K. A. Raveesha ( 2009 ) Antifungal potentiality of some plant extracts against *Fusarium* sp. . India . J. Archives of Phytopathology and Plant Protection . 42 (7) : 618-625 .
- 14- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. (2000).The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Research 17: 215-234.
- 15- Diniz , S. P. S. S. ; Lozano, V. ; Rezanden , D. ; Tona , N. and Souzal , ( 1996 ) conterde do desenvolvimento de *Fusariummonliniforme* , Alternaria fit pathological , Brasileira , Brasilia, 21:233-236 .
- 16- Dominguez , J.M. and J.J.Martin (1998) Identification of elongation factor as the essential protein targeted by sordarins in *candidiaalbicans*Antimicrob. Agents Chemother , 42: 2279- 2283
- 17- الموسوي ، محمد هاشم ياسر (2002) تأثير مستخلصات بعض النباتات المحلية على فاعلية الفطر *Fusariumspp*. أطروحة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .
- 18- Lunde , C. and Kubo ,I. (2000) Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*,Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44:1943-1953.
- 19- Tylor, R. S. ;Manadher , N.P. ; Hudson , J.b. and Towers , G.H.N.( 1996) . Antmicrobial activity of Nepalese medicinal plants. J. Ethnopharmacol .52 : 157- 163 .



## تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم alginase من بكتريا *Bacillus* sp. المعزولة من التربة

ساهرة نصيف مسلم<sup>1</sup> و علياء معن عبد الحميد<sup>2</sup> و عصام حامد حميد<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>الجامعة المستنصرية /كلية العلوم / قسم علوم الحياة  
<sup>2</sup>جامعة ديالى /كلية العلوم / قسم علوم الحياة والاحياء المجهرية

تاريخ تقديم البحث 2012/9/30 - تاريخ قبول البحث 2012/12/4

### ABSTRACT

Twenty five isolates belonged to *Bacillus* sp. were obtained from fifty samples from soil collected from different areas in Baekoba/ Diala governorate. Ability of alginase production by these isolates was screened. *Bacillus* sp. S7 isolate was the highest alginase producer. Alginase production conditions by *Bacillus* sp. S7 were studied, the highest production of alginase was observed where sodium alginate broth containing 1% nutrient broth in pH 8.5 inoculated with 0.2% of bacterial cells and incubated at 35°C in shaking incubator 120 rpm for 18 hr. The effect of some amino acids and salts on alginase production were studied and found that 0.1% of asparagine and 0.4% of NaCl increased the enzyme productivity, while KCl has no effect on its productivity.

### الخلاصة

تم الحصول على 25 عزلة تعود لبكتريا *Bacillus* sp. من اصل 50 عينة تربة جمعت من مناطق مختلفة في بعقوبة التابعة لمحافظة ديالى. اختبرت قابلية العزلات على انتاج الالجينيز وكانت العزلة *Bacillus* sp. S7 هي الاغزر انتاجا. بينت النتائج ان اعلى انتاجية للإنزيم كانت عند استخدام وسط مرق صوديوم الالجنيت الحاوي على 1% من وسط المرق المغذي ذي الرقم الهيدروجيني 8.5 والملح بـ 0.2% من المزروع البكتيري وحضنه بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 35°م. وجد ان اضافة الحامض الاميني الاسباراجين asparagine بتركيز 0.1% وملح كلوريد الصوديوم بتركيز 0.4% ادى الى زيادة انتاجية الالجينيز، بينما ملح كلوريد البوتاسيوم لم يكن له اي تأثير على الانتاجية.

### المقدمة

تمتاز اغلب انواع جنس *Bacillus* بامتلاكها العديد من الانزيمات ذات الاهمية الصناعية والاقتصادية، فضلا عن منتجات ايض ثانوي اخرى كانتاج العديد من المضادات الحياتية ومواد النكهة والمدعمات الغذائية [1]. تتواجد هذه البكتريا بشكل واسع في التربة وبنسب قليلة في مياه البحر ويمكن أن تتواجد في البيئات عالية الملوحة [2]. حامض الالجنينيك هو عبارة عن متعدد سكريد غير متفرع ويخلو من الوحدات الثانوية المتكررة unbranched polysaccharide polymer without repeating sub unit (structure)، غير ذائب في الماء والمذيبات العضوية وقليل الذوبان في الماء الدافئ وعلى العكس من ذلك فانه ينتفخ عند وضعه في الماء ويعطي أضعاف حجمه الطبيعي، له القابلية على التفاعل مع أيونات المعادن القوية والمغنيسيوم محرراً غاز CO<sub>2</sub> ومكوناً أملاحاً تعرف بالالجنينيت (alginate) التي تمتاز بقابليتها على الذوبان في الماء مكونة محاليل لزجة من مجموعة الغراوانيات تكون ألفة للماء وتمتلك مميزات حسنة مقارنة مع النشاء والأغار والجيلاتين والبكتين والصمغ النباتية [3] وتستخدم ألجينات الكالسيوم في تقيد الخلايا الحية (بكتريا، طحالب، خمائر، خلايا حيوانية، بروتوبلاست نباتي وخلايا نباتية)، وتحسين جودة الطباعة وعمل معجون الأسنان وفي علاج حموضة المعدة وفي مجال الصناعات الغذائية وفي دهان النباتات لتقليل تبخر الماء منها أثناء نقلها لمسافات طويلة من المشتل إلى الأرض المستديمة [4] وفي عملية تنقية مياه الشرب من خلال رفع كفاءة عمليات الترسيب وتجمع العوالق في المياه flocculation processes وكذلك يمكن إستخدامه في مجال عمل حشوات الأسنان نظراً لقوامه الجيد. وتوجد الالجنينات في الأسواق على هيئة alginic sodium acid [5]

potassium alginate , ammonium alginate , وتعد ألجينات البكتريا هي الأفضل مقارنة مع ألجينات الطحالب واللافقرات بسبب كون ألجينات البكتريا أكثر لزوجة بمقدار خمسة أضعاف من ألجينات الطحالب كما إنها أكثر تجانسا وتحتاج مواد خام رخيصة لإنتاجها [6]. يعد أنزيم الألبيناز من الأنزيمات المهمة الواسعة الانتشار في العديد من الأحياء المجهرية كالبكتيريا وخاصة بكتريا المياه، إضافة إلى الأجناس الأخرى المستوطنة في التربة [7,8]، كما ينتج أيضا من قبل الفطريات والطحالب [9]، والعائيات [10]، ومن بعض أجناس اللافقرات [11].

يوصف أنزيم الألبيناز باسم E.C.U.2.2.3 mannuronate lyase أو guluronate lyase E.C.U.2.2.11 بسبب قدرته على تكسير الأصرة الضعيفة التي تربط بين ذرتي الكربون رقم (5 و 4) المكونة لحمض الألبينيك علماً أن الحمض أعلاه يتكون من ثمالات حامض  $\alpha$ -L-guluronate (G)  $\beta$ -D-mannuronate (M) المرتبطة مع مركب uronic acid غير المشبع [12].

يحدد تكوين ألجينات alinate في الخلايا الميكروبية بتركيز الأوكسجين في وسط النمو، إذ يؤدي ارتفاع تركيزه في البيئة إلى أكثر من 2-5% بتحول مصدر الكربون في الغذاء إلى ألجينات بنسبة 0.45% من الوزن الجاف للخلية، في حين أن نسبة تكون ألجينات عند تركيز 1% أوكسجين تكون فقط 0.11% من وزن الخلية الجاف [6]. توجد بعض الخلايا البكتيرية التي لها القابلية على تكوين ألجينات بشكل exopoly saccharides قادرة في نفس الوقت على إنتاج أنزيم الألبيناز لكنها لا تمتلك الآلية لإستخدام هذا العديد كمصدر للكربون [7]. لوحظ أن الجنس البكتيري *Azotobacter vonrlandii* المنتج لأنزيم الألبيناز من نوع E.C.4.2.2.3 له القابلية على تحليل ألجينات المنتجة من نفس النوع البكتيري أعلاه وإستهلاكه كمصدر للكربون لكنه بعد ذلك تبين وجود Bacteriophage داخل نفس الخلية البكتيرية له القابلية على إنتاج الأنزيم alginatease وتحليل متعدد السكريد (alginats) [13]. على الرغم من فوائد ألجينات في العديد من الصناعات وفي مجال الزراعة وإستخدامها في المجالات الطبية لكنها في نفس الوقت تعتبر أهم عوامل الضراوة في بعض الأجناس البكتيرية الممرضة للإنسان والحيوانات والنباتات. حيث لوحظ أن الجنس البكتيري *Pseudomonas aeruginosa* له القابلية على إنتاج طبقات سميكة من متعدد السكريد thick exopolysaccharide يمكنه من البقاء في رئه الشخص المريض مسببة له مرض cystic fibrosis، لذلك تم العمل على إستخلاص وتنقية أنزيمات alginases من نفس النوع البكتيري لكن من سلالة أخرى لغرض تحليل هذا الغلاف الألبيني alginate coat المنتج من قبل البكتريا الممرضة أعلاه [14]. كذلك إستخدمت هذه الأنزيمات في مجالات الزراعة وتطبيقات الهندسة الوراثية والصناعات الغذائية والمجالات الطبية [15] من مخلفات المنتجات الزراعية والمبيدات [16]. كذلك أن السكريات الناتجة من تحليل ألجينات تسهل عملية إنبات البذور وإستطالة قمم السيقان والجذور. [17,18].

ونظرا لقلة الدراسات حول أنزيم الألبيناز المنتج من بكتريا *Bacillus* sp. جاءت هذه الدراسة من أجل الحصول على عزلات بيئية من البكتريا منتجة للأنزيم ودراسة بعض ظروف إنتاجه.

### المواد وطرائق العمل

#### الايوساط الغذائية

أولاً: الايوساط الغذائية المستخدمة في عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus*

أ- وسط المرق المغذي Nutrient Broth

ب- وسط الاكار المغذي Nutrient Agar

حضرت الأوساط الزرعية وفقا لتعليمات الشركة المصنعة.

ج- وسط تحليل الدم Heamolysis



- حضر وفقا لتعليمات الشركة المصنعة واضيف له 5% من دم الانسان بعد تبريده الى درجة 55°م وصب في اطباق بتري معقمة.
- د- وسط اختبار الحركة Motility test medium  
حضر هذا الوسط باذابته 0.4 غرام من الاكار في 100 مليلتر من المرق المغذي وصب في انابيب بواقع 10 مليلتر/انبوب وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة.
- هـ- وسط اسالة الجيلاتين Gelatin liquefaction  
حضر باذابة 12 غم جيلاتين لكل 100 مليلتر من المرق المغذي وعقم في المؤصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة.
- ثانيا: الاوساط المستعملة في انتاج انزيم الاليجينيز
- (1) وسط تربتيكيز الصويا السائل (Trypticase soy broth) حضر وفق تعليمات الشركة المصنعة واستعمل لتنشيط الخلايا وتحضير اللقاح.
- (2) وسط الجينات الصوديوم السائل sodium alginate broth  
استعمل لانتاج الانزيم ويتكون هذا الوسط من 0.5% Sodium alginate و 0.6 ملي مولار من  $MgCl_2$  و 0.5% من Yeast extract و 0.002% صبغة الميثيل الازرق، ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط الى 7.3 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 5 دقائق.
- (3) وسط الجينات الصوديوم الصلب Sodium alginate – agar media  
حضر بنفس مكونات وسط الجينات الصوديوم السائل مع اضافة الاكار بنسبة 1.5%، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.3 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 5 دقائق.

#### عزل البكتريا من التربة

جمعت 50 عينة تربة (بواقع 4 غرامات لكل عينة) من مناطق مختلفة من مدينة بعقوبة/محافظة ديالى واتبعت طريقة [19] في عزل بكتريا *Bacillus* وكما ياتي: نقلت عينة التربة الى دورق معقم يحتوي 20 مليلتر ماء مقطر معقم. سخن الدورق الى درجة 80°م في حمام مائي لمدة 10 دقائق مع التحريك الخفيف. نشر 0.1 مليلتر من الرائق على وسط الاكار المغذي وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 30°م. انتقيت مستعمرات بكتريا *Bacillus* اعتمادا على الصفات المظهرية للمستعمرات.

#### الاختبارات التشخيصية:

جرى التشخيص المبني لجنس *Bacillus* بدراسة الصفات المظهرية والكيموحيوية وطبقا لما جاء به [19].

#### الغربة شبه الكمية Semi quantitative screening

اتبعت طريقة الكشف النوعي لاختبار قدرة البكتريا المعزولة والمشخصة في هذه الدراسة على انتاج انزيم Alginase حيث نشطت العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط مرق تربتون الصويا بدرجة حرارة 35°م لمدة 24-28 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة ثم اخذ 0.1 مل من كل مزروع ملقح ووزع في أنابيب تحوي 5 مللتر من مرق صوديوم الاليجينين ثم زرعت العينات على الوسط الصلب بوضع 0.1 مللتر في وسط الطبق. وللتأكد من عدم تداخل عوامل اخرى قد تؤدي الى تغير الرقم الهيدروجيني للوسط، حضرت معاملة سيطرة أولى من نفس الوسط دون تلقيحه (سيطرة-1)، ومعاملة سيطرة ثانية خالية من الكاشف (سيطرة-2)، ومعاملة سيطرة ثالثة خالية من ملح الجينات الصوديوم (سيطرة-3)، واتبعت نفس الطريقة لتحضير معاملات السيطرة للوسط الصلب. تم متابعة تغير لون الكاشف للوسط من الازرق (المتعادل) الى الازرق الغامق بوصفه معيارا لانتاج الاليجينيز مع قياس الرقم الهيدروجيني للوسط بعد مدة الحضانة لانتخاب العزلة الافضل في انتاج الانزيم [20].

### الغربة الكمية Quantitative screening

استعمل نفس الوسط السائل المستعمل في الغربة شبه الكمية مع مراعاة عدم إضافة كاشف الميثيل الأزرق، ثم قيست فعالية الأنزيم وتركيز البروتين في الراشح.

#### تقدير فعالية الأنزيم

قيست فعالية الألبينيز وفق طريقة [21] إذ حضنت العزلات ذات الكفاءة في إنتاج الأنزيم بناءً على نتائج الغربة الكمية. أضيف 0.1 مللتر من محلول الأنزيم الخام إلى 1 مللتر من محلول 0.3% الجينات الصوديوم وأضيف للخليط 4.9 مللتر من داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7.3. حضن خليط التفاعل بدرجة حرارة 40°م لمدة 20 دقيقة، ثم قيست الامتصاصية الضوئية للمحلول على طول موجي 235 نانوميتر.

#### تعيين بعض ظروف إنتاج الأنزيم

##### (1) تأثير الوسط الغذائي على إنتاجية الأنزيم

اتبعت نفس خطوات تحضير الوسط الانتاجي مع إضافة كل من الأوساط التالية إلى وسط الإنتاج كلاً على حدة ( Yeast extract, Peptone water, Nutrient broth, Brain ) بنسبة 1%.

##### (2) تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاجية الأنزيم

حضر الوسط الانتاجي للأنزيم بآرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت من (6-10) ثم لقيح وحضن بحاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 35°م ولمدة 24 ساعة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية للطافي.

##### (3) تأثير كمية اللقاح على إنتاجية الأنزيم

لقيح الوسط الانتاجي بحجوم مختلفة من اللقاح البكتيري المنشط ( 0.1 ، 0.2 ، 0.3 ، 0.4 ، 0.5 )% وحضن بحاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 35°م ولمدة 24 ساعة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية للطافي.

##### (4) دراسة تأثير إضافة أحماض أمينية على إنتاجية الأنزيم

درس تأثير بعض الأحماض الأمينية شملت ( Asparagin , Cystin , Glutamine , Proline , Alanine ) المضافة بتركيز 0.1% إلى وسط الإنتاج على إنتاج الأنزيم ثم لقيح بحجم لقاح 0.2% وحضنت المعاملات الملقحة بحاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 35°م ولمدة 24 ساعة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية للطافي.

##### (5) دراسة تأثير إضافة ملح كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم على إنتاجية الأنزيم

أضيف لمحي كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم للوسط الانتاجي بتركيزات تراوحت بين (0.1-0.5)% ثم لقيحت بحجم لقاح 0.3% وحضنت بحاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 35°م ولمدة 24 ساعة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية للطافي.

### النتائج والمناقشة

#### الغربة شبه الكمية والكمية

بينت النتائج أن هناك اختلافاً واضحاً في قابلية العزلات على إنتاج الألبينيز عن طريق حدوث تغير في لون وسط الإنتاج السائل شكل (1) المزروع بالخلايا البكتيرية كما لوحظ حدوث الفرق في قيم الرقم الهيدروجيني حيث تراوحت من (7.5-8.2) مقارنة بعينة السيطرة. وأعطت العزلة *Bacillus sp. S7* المعزولة من التربة أعلى قيمة للرقم الهيدروجيني وصل إلى 8.2 بعد مرور فترة الحضن. ثم أخضعت العزلات الأكثر إنتاجية إلى الغربة الكمية ولوحظ وجود تطابق بينها وبين الغربة شبه الكمية حيث أعطت العزلة *Bacillus sp. S7* نفسها أعلى امتصاصية على الطول الموجي 235 نانوميتر للسكريات غير المشبعة الناتجة من تحليل المادة الأساس للوسط الزراعي sodium alginate وصلت إلى 2.2.



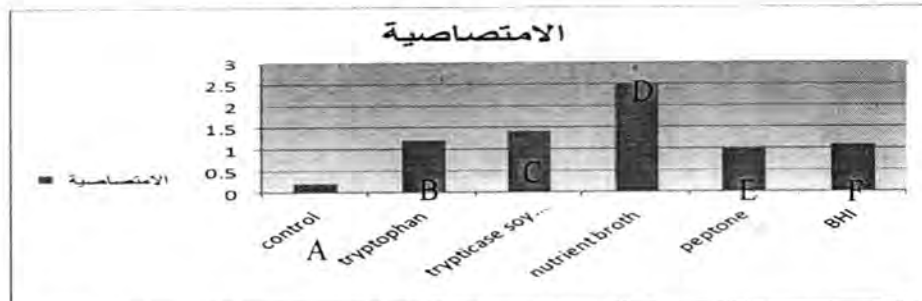
شكل 1: الغريلة شبه الكمية للenzats المنتجة للألجيناز.

### العزلة *Bacillus* 7 أعطت تغيراً أكثر مقارنة بعينة السيطرة

قد يعود الاختلاف في إنتاج الأنزيمات إلى نشاط الجينات المشفرة له كما يعود السبب إلى التنوع في مصادر العزل والاختلاف في نوع الكائن وفعاليته الحيوية [22] وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه [23] حيث اعتمد الطريقة اللونية والامتصاصية على الطول الموجي 235 نانومتر لتقدير فعالية أنزيم الألجيناز المعزول من خلايا بكتريا *Pseudomonas maltophilia* وكذلك استخدمت نفس طريقة التقدير الكمي لقياس فعالية الألجيناز الناتج من بكتريا *Ochrobacterium* sp. [24].

### تأثير الأوساط الغذائية المختلفة على انتاجية الأنزيم

يبين الشكل (2) تأثير إضافة أنواع مختلفة من الأوساط الزرعية إلى الوسط الانتاجي لتحديد أيهما أكثر تأثير في انتاجية أنزيم الألجيناز المنتج من العزلة البكتيرية *Bacillus* S7 ولوحظ أن وسط المرق المغذي nutrient broth بتركيز 1% أدى إلى زيادة فعالية أنزيم الألجيناز حيث أعطى الأنزيم امتصاصية قدرها 2.5 على الطول الموجي 235 نانومتر في حين انخفضت الفعالية الأنزيمية إلى 1 عند إضافة 1% من الببتون إلى وسط الإنتاج.

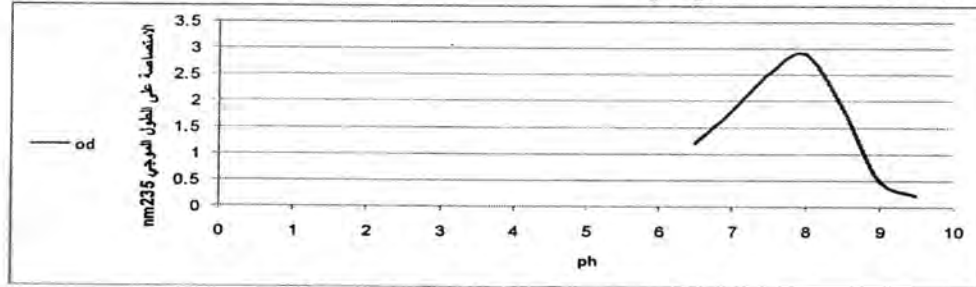


شكل 2: تأثير إضافة أنواع مختلفة من الأوساط الزرعية بتركيز 0.01 إلى الوسط الإنتاجي على انتاجية الألجيناز

نلاحظ وجود تباين في تأثير هذه الأوساط على انتاجية الأنزيم وقد يعود هذا التباين إلى اختلاف المواد العضوية الموجودة في الوسط الزرعي مثل البروتينات والكربوهيدرات والمواد اللاعضوية كأملاح الفوسفات والبوتاسيوم والمغنيسيوم والتي تعتبر مدعماً أساسية لزيادة الإنتاج. فضلاً عن الطبيعة الكيميائية للوسط كان تكون مواد معقدة أو بسيطة ومدى تعقيدها وارتباطها مع مواد أخرى مما يؤثر على قدرة الكائن على استغلالها في نموه وقيامه بفعاليات متنوعة. وتعود زيادة انتاجية الألجيناز بوجود الوسط الزرعي nutrient broth إلى احتوائه على سكريات متعددة ذات تركيب مشابه للسكريات في ملح الألجينات مما يجعل المرق المغذي كعامل محفز لعمل الأنزيم [25].

### تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاجية الانزيم

توضح نتائج الشكل (3) تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاجية الالجنينز من العزلة البكتيرية *Bacillus* sp. S7 حيث لوحظ إن أعلى انتاجية للإنزيم تكون عند الرقم الهيدروجيني 8.5 حيث بلغت الامتصاصية 2.9 على الطول الموجي 235 نانومتر ثم بدأت الفعالية الإنزيمية تقل تدريجيا مع ارتفاع قيمة الرقم الهيدروجيني الى ان وصلت الى 0.2 عند الرقم الهيدروجيني 10. ان تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الانزيمات يكون عن طريق تأثيره على طبيعة الوسط الغذائي وذائبية المواد الغذائية وانتقالها كما يؤثر في ثبات الانزيمات المتحررة من الخلايا البكتيرية [26].

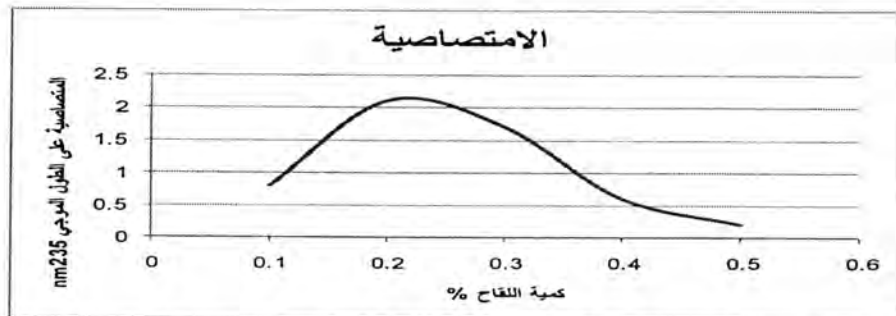


شكل-3: تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاجية الالجنينز

اشارت بعض الدراسات الى ان انتاجية انزيم الالجنينز من العزلة البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa* تكون مثالية عند الرقم الهيدروجيني 9.0 [14] كما اشارت دراسة اخرى الى كون العزلة البكتيرية *Azotobacter* sp. تكون اكثر فعالية في انتاج انزيم الالجنينز عند الرقم الهيدروجيني 8.5 [27] وبينت دراسات اخرى ان فعالية الالجنينز في اختزال السكريات المكونة لمركب الجينات الكالسيوم تزداد عند الرقم الهيدروجيني 8.5 وهذا مقارب لما توصل اليه [20].

### تأثير حجم اللقاح على انتاجية الانزيم

يبين الشكل (4) تأثير حجم اللقاح البكتيري على انتاج انزيم الالجنينز من العزلة *Bacillus* sp. S7 حيث تم استخدام تراكيز متدرجة من اللقاح البكتيري تراوحت بين 0.1 – 0.5 % وبلغت أعلى امتصاصية للانزيم عند تلقيح وسط الانتاج بحجم لقاح مقداره 0.2% حيث وصلت الى 2.1 ثم بدأت بالانخفاض تدريجيا مع ازدياد حجم اللقاح. قد يعود انخفاض الفعالية الإنزيمية الى حالات التنافس الشديدة لاعداد الخلايا الكبيرة على المواد الغذائية الاساسية في الوسط الغذائي فضلا عن تجمع مواد الايض الثانوي ادى الى تثبيط نمو الخلايا وبالتالي الانتاجية [27]. وتختلف نسبة حجم اللقاح التي تعطي انتاجية عالية للانزيم حسب نوع الكائن المنتج والظروف المستخدمة [28].



شكل-4: تأثير إضافة حجوم مختلفة من اللقاح البكتيري المنشط *Bacillus* S7 للوسط الإنتاجي على انتاجية الالجنينز



## تأثير اضافة بعض الاحماض الامينية على انتاجية الانزيم

اعطت النتائج في جدول (1) تفسيراً واضحاً بان للاحماض الامينية تأثيراً فعالاً في انتاجية الالجينيز من العزلة *Bacillus sp. S7* حيث ادى الحامض الاميني الاسبارجين asparagine بتركيز 0.1% الى زيادة الامتصاصية للانزيم الى ان وصلت 2.3. اذ ان الاحياء المجهرية تحصل على مصادر الطاقة عن طريق اكسدة مكونات الوسط الزراعي ومن اكثر المركبات النيتروجينية المستخدمة بوصفها مصادر طاقة هي الاحماض الامينية الموجودة في الوسط الغذائي اذ يعمل الكائن المجهرى على انتزاع مجموعة الامين او الكربوكسيل حسب الانزيمات التي يمتلكها واعتماداً على نوعية وظروف التنمية في الوسط الزراعي [29].

جدول 1- تأثير اضافة بعض الاحماض الامينية على انتاجية الالجينيز

الامتصاصية على الطول الموجي 235 nm	الحامض الأميني بتركيز 0.1%
0.2	Control
1	Glutamine
2.3	Asparagine
1.3	Proline
0.7	Alanine
0.1	Cystine

## تأثير اضافة ملح كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم على نتاجية الانزيم

يبين الجدول (2) تأثير اضافة تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم الى الوسط الانتاجي تراوحت بين (0.1-0.5)% على انتاج الانزيم ولوحظ ان انتاجية انزيم الالجينيز ازدادت تدريجياً مع زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم الى ان وصلت امتصاصية السكريات الغير مشبعة الناتجة من فعالية الانزيم الى 2.7 عند التركيز (0.4)% ثم بدأت الامتصاصية بالانخفاض تدريجياً بعد زيادة تركيز الملح. في حين لم يبد الملح كلوريد البوتاسيوم اي تأثير على فعالية الالجينيز المنتج من العزلة *Bacillus sp. S7*.

جدول 2- تأثير اضافة تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم على انتاجية الالجينيز

الامتصاصية على الطول الموجي 235 nm	KCl concentration	الامتصاصية على الطول الموجي 235 nm	NaCl concentration
0.2	Control	0.1	Control
0.4	0.1	0.7	0.1
0.2	0.2	0.8	0.2
0.13	0.3	1	0.3
0.4	0.4	2.7	0.4
0.3	0.5	1.5	0.5

ان تحفيز الجين المسؤول عن انتاج الالجينيز من عزلات بكتيريا *Pseudomonas sp.* يكون بواسطة اضافة ملح الطعام بتركيز 0.5% الى الوسط الانتاجي من خلال تأثيره في الحالة الاوزموزية اكثر من التأثير الايوني في فعالية الجين [30]. ايضاً اعتبر اضافة ملح الطعام NaCl بتركيز يتراوح بين (0.2-0.5)% الى الوسط الانتاجي مهم في انتاج نوعان من

إنزيم الألجينيز من بعض اجناس البكتريا المعزولة من مياه البحار [31]. ان التأثير المحفز للتركيز العالي للملح على فعالية الإنزيم ربما يكون بسبب تأثير شحنة ايون الملح على تكوين المعقد enzyme- alginate complex [32]. اشارت بعض الدراسات الى ان انتاجية الألجينيز من العزلة البكتيرية *Bacillus subtilis* تكون عالية عند اضافة 1% من كلوريد الصوديوم الى الوسط الانتاجي [33]. في دراسات اخرى وجد ان اضافة تركيز 0.1% من كلوريد البوتاسيوم الى الوسط الانتاجي يؤدي الى زيادة انتاج الألجينيز من خلايا بكتريا *Alginovibrio aqualis* [34]. فيما اعطى تركيز 3% من كلوريد الصوديوم انتاجية عالية للألجينيز في العزلة *Bacillus* sp. [35].

## REFERENCES

1. Akimoto, C. A. ; Dicosomo, H.F. and Tanaka, h.(2000) . synergistic effect of active oxygen species and alginate on chitinase production by wasabiagaponic cells and applications J.biosci.bioeng .8:9141 - 139.
2. Sharma, N.S.; Mondal, K.; Malhotre, S.P. and Singh, R. (2003). Oxidative stress and antioxidative systems in tomato fruits during storage. J.food biochem.27(6):515-527.
3. [3] Remminghost, A. and Rehm, S.(2009). Microbial production of alginate: biosynthesis and application .microbiol.(3):63-74.
4. Sutlon, A., Harrison, G. E., Carr, T. E. and Bartrop, D. (2010). Handbook of Pharmaceutical Excipients. academicpress.isbn.
5. Li, p., dai, y.n; zhang, j.p; wang, a.q. and wei, q.(2008). Chitosan – alginate nanoparticles as anoved drug delivery system for nifedipine .i.int. biomed.sci.4(3):221-228.
6. Al-Kady, M.El.(2008). The microbial production alginate. Agric. microbiol. 71(3).322-327.
7. Kennedy, D.; Kenneth, M. and Sutherland, I.W.(1992). Alginate from *Azotobacter* species. j.genral microbiol.138:2465-2471.
8. Bayer, A.R. and Wichek, M.(1992). Streptavidin contains an RYD sequence with minics. The RGD reseport domain of fibronectin .biochem.biophys.res.170(3):1236-1241.
9. Carver, T.L. ; Robbins, M.P; Zeyen .R.J. and Dearme, J.(1992).effect of pal –specific inhibition on suppression of active defense and quantitative susceptibility of oats to erysiphegraminis. pysiolo.mol.plant. patho. 41:149 -163.
10. Wong, T. Y.; Preston, L. A. and Schiller, L. N. (2000). Alginate-lyase review of major sources and enzyme Characteristics, Structure-function Analysis, Biological Roles and Applications. Ann. Rev. Macrobiol. 54:289-340.
11. Harwood, C.R.(1989). Introduction to the biotechnology. In: C.R.Harwood (Ed.) biotechnology handbooks, Vol.2 *bacillus*.1-4. Plenum press. London.

12. Hansen, J., Doubet, S.R. and Ram, J. (1984). Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*. *appl. And environmental microbiol.* 47(4):407-409.
13. Davidson, I.W., Lawson, C.I. and Sutherland, I.W. (1977). Alginate lyase from *azotobact ervinelandii* phage. *general microbial.* 98:223-229.
14. Eftekhari, F. and Schiller, N. (1994). partial purification and characterization of a mannuronan – specific alginate – lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. *current microbial.* 29:37-42.
15. Berhard, K. and Utz, R. (2000). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In Entwistle, P. F., Corys, B. A., Bailey, M. J., Higgs, S. (Eds.) (1993). *Bacillus thuringiensis*. An environmental Biopesticide, theory and practice. John Wiley and sons. Chichester. U.K.
16. Norris, J.R.; Berkeley, D. and Logan, N.A. (1981). The genera *Bacillus* and *sporolactobacillus* prokaryotes: A handbook on Habitats, Isolation and Identification of bacteria. 2. Springer-Verlag, Berlin.
17. Hu, X.; Jiang, X.; Hawang, H. and Liu, S. (2004). Promotive effects of alginate – derived oligo saccharide on mize seed germination. *J. appl. ohicol.* 16:73-76.
18. Xu, X.; Iwamoto, Y.; Kitamura, Y.; ODA, T. and Muramatsu, T. (2003). Root Growth –promoting Activity on Unsaturated Oligometric Urinates from Alginate on Carrot and rise Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:2022-2025.
19. Berkeley, R.C. and Logan, N.A. (1997). A poly-phasic reassessment of the genus *paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lauths*. *J. sys. bacteriol.* 47:808-817.
20. Tang, J. C.; Taniguchi, H.; Chu, Q.; Zhou, H. and Nagata, S. (2008). Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Applied Microbiol.* 48:38-43.
21. Zhou, M. H.; Fang, F. H.; Li, J. and Wei, X. Z. (2008). Isolation and identification of novel alginate –degrading bacterium *Ochrobacterum* sp. *J. Sci. Technol.* 30(2):135-140.
22. Imada, A.; Igarashi, S.; Nakahama, K. and Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of micro- organisms. *J. gen. microbiol.* 76:83-99.
23. Lyle, V.R. (1980). Algin digestion by *Q1Pseudomonas maltophilia*. *appl. environ. Microbiol.* 39.
24. Saker, S.; Arnab, P.; Anindita, M. Mukherjee, J. (2010). Bioprocessing Data for the Production of Marine Enzymes. *Mar. Drugs.* 8:1323-1372.



25. Doubet, R.S. and Quatrano.R.S.(1982). Isolation of marine bacteria capable of producing specific lyase for alginate degradation .*appl.environ.microbiol* .44:754 -756 .
26. Nishimura,a.; Oazaki,y.; Oymma,h. and murao,s.(1999) . purification and characterization of novel 5-oxoprolinase from *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Enviro. Microbiol* . 65(2):712-717.
27. Rose, A. H. (1976). Chemical microbiology an introduction to microbial physiology. 3<sup>rd</sup>(ed). Butter Worths. London. Baston.
28. Karsotkina,J., Borisova,A.A., Gervaziev.Y.V. and Sokolov,N.N.(2004). One step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia caratovora*.(abs).*biotechnol.appl.biochem*.39(ptz):215-221.
29. Xiao, L., Han, F; Yang, Z. and Yu, G. (2010). A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. QDO3. *Microbiol and Technool*. 22(1).167-172.
30. Penaloza,v.a.; Kidambi,a.; Chakrabarty , a.m. and Bender,c.l.(1997) . characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas* sp. *J. bacterial*.179:4464-4472.
31. Rahman. M. M.; Inoue, A. and Ojima, T. (2010). Isolation and characterization of two alginate lyase isoenzymes. Akaly28 and akaly33. From the common sea here aplysiakurodai. *Comp. Biochem. Phy*.157:317-325.
32. Jacobson,B.(1955). On the interpretation of dielectric constants of aqueous macromolecular solution . *j,am.chem.soc*.77:2919-2926.
33. Elahwany. A.M. and Elborai ;A.M,(2012). Optimization of medium composition for extra cellular alginate – lyase of marine bacterium. *African j.microbiol*,6(10):2403-2409.
34. Stevens, R. A. and Levin, R. E. (1976). Purification and characterization of an alginate from *alginovibrioaquatilis*. *Appl. Environ. Microbiol*. 3(5): 1156-1160.
35. Mody,k. and Chauhan, V.D.(2009). Alginate from marine bacterium. *J. Botanicamariana*.36(6).56-60.



## دراسة التغيرات المرضية النسجية في الامعاء الدقيقة للفئران المجرعة بجرع مختلفة من مبيد الـ Thiamethoxam

سحر عبد الهادي محمد جواد الشرقى  
قسم علوم الحياة/كلية العلوم/الجامعة المستنصرية  
تاريخ تقديم البحث 2012/6/18 - تاريخ قبول البحث 2012/11/6

### ABSTRACT

The aim of the study was to reveal the effect of the pesticide "Thiamethoxam" in white mice small intestine included histopathological changes, it was leveled sever according to the dosage and the duration, it has observed in dosage 0.004 mg /kg body weight for 14 and 28 day after the dosage, goblet cells hypertrophy with sever lymphocytes infiltration in lamina propria.

It has shown in dosage 0.008 mg /kg body weight for 14 and 28 day after dosage, necrosis and goblet cells proliferation. The histological changes were characterized in dosage 0.01 mg /kg body weight for 14 and 28 day after the dosage, damage of epithelial cells, in addition to the monocytes infiltration.

The sever of the changes increased in high dosage 0.03 mg /kg body weight for 14 and 28 day after dosages which is characterized by sever lymphocytes infiltration in lamina propria and goblet cells hypertrophy.

### الخلاصة

هدفت الدراسة الى التعرف على تأثير مبيد الـ Thiamethoxam في الامعاء الدقيقة للفئران البيض متضمنة التغيرات المرضية النسجية فيها ، وقد تدرجت شدتها حسب الجرعة والفترة الزمنية وقد لوحظ عند الجرعة 0,004 ملغم / كغم من وزن الجسم عند 14 و 28 يوم من التجريب تضخم الخلايا الكأسية وارتشاح شديد للخلايا اللمفية في الصفيحة الاساسية. كما ظهر عند الجرعة 0,008 ملغم / كغم من وزن الجسم عند 14 و 28 يوم من التجريب تنخر وتكاثر للخلايا الكأسية .  
تميزت التغيرات النسجية عند الجرعة 0,01 ملغم / كغم من وزن الجسم عند 14 و 28 يوم من التجريب بتضرر الخلايا الظهارية اضافة الى ارتشاح للخلايا وحيدة النواة . ازدادت شدة التغيرات وصولا الى اعلى جرعة 0,03 ملغم / كغم من وزن الجسم عند 14 و 28 يوم من التجريب اذ تميزت بشدة ارتشاح الخلايا اللمفية في الصفيحة الاساسية وتضخم الخلايا الكأسية.

### المقدمة

على الرغم مما قدمته المبيدات الكيماوية من مساهمات كبيرة في زيادة انتاجية المحاصيل المختلفة والقضاء على الامراض التي تنقلها الحشرات للانسان والحيوان ، فإن وجودها ينتج عنه تأثيرات ضارة للانسان والحيوان والنبات. لقد نبهت بعض المنظمات العالمية كمنظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة الغذاء والزراعة الدولية FAO الى المخاطر الصحية التي قد تنجم من استخدام المبيدات الكيماوية من عام 1950 م والكشف عن بقايا المبيدات في مختلف الاغذية ونسج النبات والحيوان ( 1 ) .

تعد المبيدات المتداولة والمستخدمة مواد ذات تأثير سام في الانسان والكانات الحية الاخرى وان هذا التأثير يقع بمديات مختلفة منها احداث السرطان ، رغم ان هذه المبيدات ساهمت بشكل فعال في زيادة الانتاج للمحاصيل الزراعية عن طريق وقايتها من الافات المختلفة ( 2 ) . ونتيجة للاستخدام الواسع للمبيدات الكيماوية ولازمان طويلة لاسيما بعد اكتشاف المبيدات الكيماوية الحديثة منذ بداية النصف الثاني للقرن الماضي ادى ذلك الى انتشارها ضمن اجزاء النظام البيئي ، وساعد على ذلك قدرتها على الانتقال ضمن مكونات النظام البيئي كذلك قدرتها على مقاومة التحطم الفيزيائي والتحلل الكيماوي والايضي ( 3 ) .

يعتبر مبيد الـ Thiamethoxam من المبيدات الحديثة المسجلة في الآونة الاخيرة ، فهو مبيد حشري ينتمي الى الصنف الجديد من المبيدات الحشرية المعروفة بـ Neonicotinoids )

4 ) يستخدم للسيطرة على الحشرات الماصة اذ يعمل على تثبيط مستقبلات نيكوتين استايل كولين ( nicotinic Acetylcholine Receptors ( nAchR ) في النظام العصبي المركزي للحشرات ( 5 ). له نشاط متبقي لمدة طويلة نسبيا ضد العديد من الحشرات من خلال التماس مع الحشرة وعن طريق المعدة ( 6 ).

تناولت العديد من الدراسات التأثيرات السمية الحادة وشبه المزمنة والمزمنة لمجموعة مبيدات الحشرات Neonicotinoid في عدد من الحيوانات الفقرية واللافقرية ، لوحظ ان لمبيد Thiamethoxam تأثيرات سمية واضحة في كبد وكلى وخصى الجرذان والفئران اضافة الى الجهاز العصبي واعضاء اخرى عند تعرضها الى الجرعة الحادة من المبيد ، بينما كانت التأثيرات السامة المزمنة في الفئران زيادة حدوث اورام سرطانية في الكبد ( 7 ). عموما ان سمية المبيد منخفضة في الثدييات للتعرض الحاد والمزمن ، وقليل السمية بالتعرض الحاد الى الطيور والاسماك ( 8 ).

نظرا لقلّة البحوث المتعلقة بدراسة سمية مبيد الـ Thiamethoxam في الفئران البيض جاءت هذه الدراسة بهدف التعرف على التغيرات المرضية النسجية في الامعاء الدقيقة بعد تعرضها اليومي الى مبيد عن طريق الفم لفترة 14 و 28 يوم .

### المواد وطرائق العمل

#### تهيئة الحيوانات

اجريت الدراسة على الفأر السويسري سلالة Balb/c وقد تم الحصول عليه من مختبرات التجارب الحيوانية ( كلية الطب – جامعة بغداد ) بعمر تسعة اسابيع ومعدل اوزانها  $24 \pm 5$  غم ، وضعت الحيوانات في اقفاص لدائنية مغطاة بأغطية معدنية مشبكة ومفروشة بنشارة الخشب. وضعت الحيوانات في جميع مراحل التجربة تحت ظروف مختبرية متشابهة من تهوية وإضاءة ودرجة حرارة تتراوح بين 24 – 26 م° ، وفرت للحيوانات العليقة الجاهزة إضافة للماء حسب الاحتياج خلال مدة المعاملة.

#### تجريع الحيوانات

جرعت حيوانات الدراسة بمبيد الـ Thiamethoxam عن طريق الفم بواسطة انبوبة تجريع بعد اذابته بالماء المقطر وقد حضرت منه الجرعات المستخدمة في الدراسة اعتمادا على قيمة 0,004 Acceptable Daily Intake (ADI) ملغم/كغم من وزن الجسم اضافة الى استخدامها كجرعة مقارنة ( 9 ).

#### تصميم التجربة

استخدمت في التجربة 54 فأرا وقد قسمت على النحو الآتي:

- المجموعة الاولى: 6 فئران اعطيت ماء مقطر فقط وقد اعتبرت كحيوانات سيطرة .
- المجموعة الثانية: 12 فأر قسمت الى مجموعتين متساويتين في العدد ، الاولى جرعت بـ 0,004 ملغم/كغم من وزن الجسم لفترة 14 يوم ، اما الثانية فقد جرعت بنفس الجرعة لفترة 28 يوم.
- المجموعة الثالثة: 12 فأر قسمت الى مجموعتين متساويتين في العدد ، الاولى جرعت بـ 0,008 ملغم/كغم من وزن الجسم لفترة 14 يوم ، اما الثانية فقد جرعت بنفس الجرعة لفترة 28 يوم.
- المجموعة الرابعة: 12 فأر قسمت الى مجموعتين متساويتين في العدد ، الاولى جرعت بـ 0,01 ملغم/كغم من وزن الجسم لفترة 14 يوم ، اما الثانية فقد جرعت بنفس الجرعة لفترة 28 يوم.



- المجموعة الخامسة: 12 فأر قُسمت الى مجموعتين متساويتين في العدد ، الاولى جرعت بـ 0,03 ملغم/كغم من وزن الجسم لفترة 14 يوم ، اما الثانية فقد جرعت بنفس الجرعة لفترة 28 يوم.

### الدراسة النسجية

تضمنت الدراسة النسجية دراسة نسيج الامعاء الدقيقة في الفئران المجرعة للفترتين (14 ، 28 ) يوم من التجريع ولجميع الجرعات وذلك بعد قتلها وتشريحها واخذ جزء من الامعاء الدقيقة بحجم  $1 \times 1$  سم<sup>2</sup> وثبتت في 10% فورمالين ، اجريت عملية الانكاز Dehydration بأمرار العينات في سلسلة من التراكيز التصاعديّة من الكحول ، ثم طمرت بشمع البرافين وقطعت العينات بأستخدام المشراح الدوار بسماك  $5 \mu m$  ثم صبغت بأستخدام صبغة Haematoxylin and Eosin (H&E) واتبعت في تحضير الشرائح النسجية طريقة ( 10 ) وتمت مقارنة التغيرات المرضية النسجية مع نسيج الامعاء الدقيقة لحيوانات السيطرة.

### النتائج والمناقشة

للتعرف على التغيرات المرضية التي يسببها المبيد الحشري Thiamethoxam في الفئران المختبرية ، درست نسيج الامعاء الدقيقة وقورنت التغيرات النسجية مع نسيج الامعاء الدقيقة لحيوانات السيطرة (شكل: 1).

بين الفحص المجهرى لنسج الامعاء الدقيقة لليوم 14 بعد التجريع للجرعة 0,004 ملغم/كغم من وزن الجسم تضخم الخلايا الكأسية hypertrophy مع ارتشاح شديد في الخلايا اللمفية في الصفيحة الاساسية للزغابات المعوية وفي الطبقة تحت الظهارية (شكل: 2) ، ولوحظت تغيرات مرضية لنسج الامعاء الدقيقة في اليوم 28 بعد التجريع تميزت بفرط تضخم الخلايا الكأسية مع انسلاخ وانفصال الطبقة الظهارية للزغابات المعوية (شكل: 3) ، مع تغيرات تنكسية في الخلايا المبطنة للزغابات.

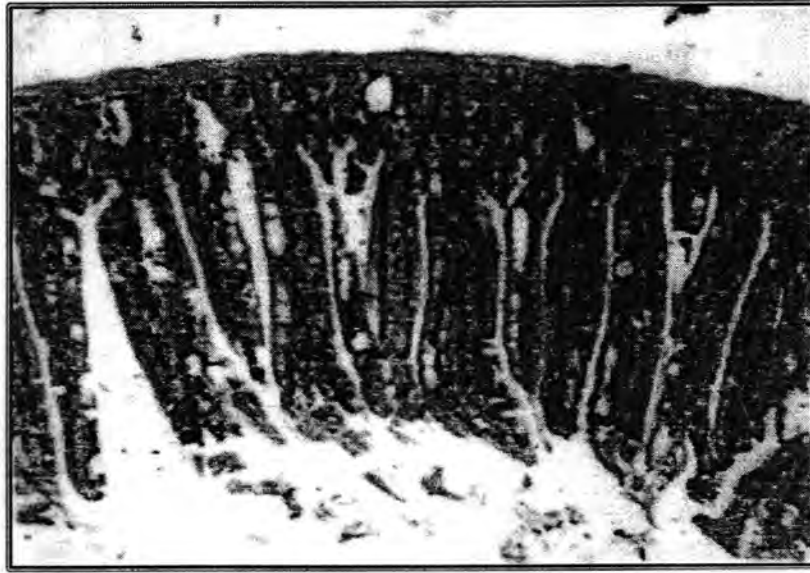
لم تكن هناك تغيرات واضحة لليوم 14 بعد التجريع عند الجرعة 0,008 ملغم/كغم من وزن الجسم سوى انسلاخ بسيط في ظهارة الخلايا المبطنة للزغابات (شكل: 4). اما اليوم 28 بعد التجريع لنفس الجرعة فقد لوحظ تنخر necrosis الخلايا المبطنة للزغابات مع تكاثر الخلايا الكأسية وارتشاح معتدل للخلايا اللمفية في الصفيحة الاساسية للامعاء (شكل: 5).

اظهر الفحص المجهرى لليوم 14 بعد التجريع وللجرعة 0,01 ملغم/كغم من وزن الجسم ضمور الزغابات المعوية واخذها الشكل الدائري مع ارتشاح الخلايا وحيدة النواة في الصفيحة الاساسية للزغابات مع فرط تنسج الخلايا الكأسية (شكل: 6). اما عند 28 يوم بعد التجريع لنفس الجرعة فقد لوحظ تكاثر الخلايا الكأسية مع ارتشاح طفيف للخلايا اللمفية في الصفيحة الاساسية للزغابات (شكل: 7).

تميزت التغيرات المرضية بعد 14 يوم من التجريع وعند الجرعة 0,03 ملغم/كغم من وزن الجسم ارتشاح معتدل لخلايا وحيدة النواة في الصفيحة الاساسية للزغابات المعوية وبين الغدد المخاطية (شكل: 8) ، مع انسلاخ وانفصال الخلايا المبطنة للخلايا الظهارية ، وعند الفحص المجهرى لليوم 28 بعد التجريع لنفس الجرعة لوحظ فرط تنسج الخلايا اللمفية والتي ظهرت على شكل عقد لمفية مع ارتشاح خلايا وحيدة النواة في الصفيحة الاساسية للزغابات المعوية (شكل: 9).

ان النتائج سابقة الذكر تبين التأثير السمي للمبيد الحشري Thiamethoxam في الامعاء الدقيقة للفئران اذ بدأت التغيرات المرضية النسجية عند الجرعة الاولى 0,004 ملغم/كغم من وزن الجسم وازدادت شدة التغيرات بزيادة الجرعة وفترة التجريع. ان ارتشاح الخلايا اللمفية وخلايا وحيدة النواة يمكن تفسيره الى التأثير السمي للمبيد والذي نتج عنه تفاعل التهابي في نسيج الامعاء الدقيقة مما ادى الى انجذاب هذه الخلايا الى موقع الاصابة لازالة الانسجة التالفة ( 11 ). اما زيادة اعداد واحجام الخلايا الكأسية للتعرض السمي الحاد والمزمن يعزى الى سمية المبيد وتخريشه لبطانة الامعاء الدقيقة مؤدية الى زيادة اعدادها واحجامها ويعتقد انها عملية دفاعية

وذلك لزيادة افراز المخاطين والتي تقلل من التأثير السمي على بطانة الامعاء الدقيقة (12) عند تعرض الفئران المزمّن الى جرّع مختلفة من مبيد Thiamethoxam ، وقد ظهرت نتائج ( 13 ، 14 ) متوافقة مع ما جاء من تغييرات مرضية نسيجية في الامعاء الدقيقة للفئران. كما ان وجود انسلاخ وانفصال الخلايا المبطنة للخلايا الظهارية وتنخر الخلايا المبطنة للزغابات ناجم عن سمية المبيد والذي له تأثير على بطانة الاوعية الدموية ينتج عنه زيادة نفاذية الوعاء وخروج السوائل الى خارجه ( 15 ). لقد توافقت نتائج البحث مع دراسات سابقة ( 16 ، 17 ) بحدوث تغييرات في نسيج الامعاء الدقيقة اذ كان للمبيد تأثير كبير على التركيب النسيجي لامعاء الفئران وخاصة في الزغابات المعوية .

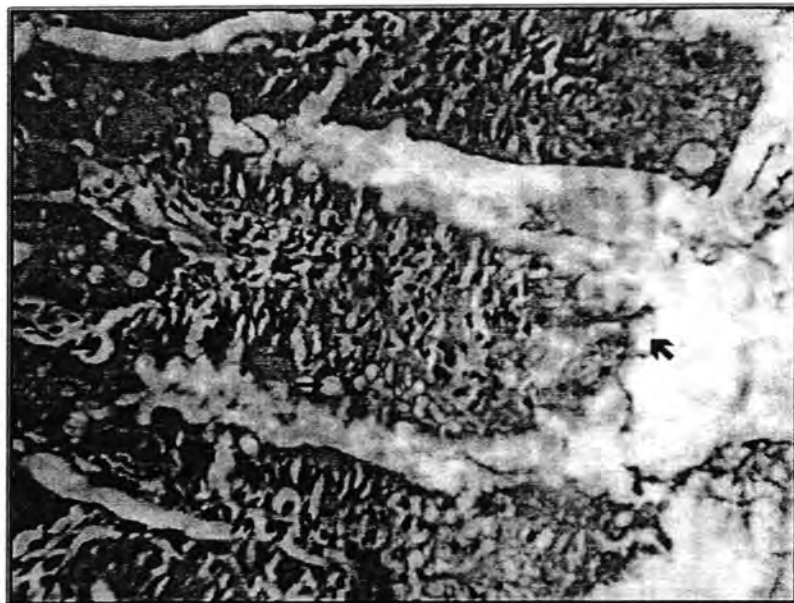


شكل:1- مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد حيوانات السيطرة يوضح التركيب النسيجي الطبيعي للامعاء {H &E, 10X}

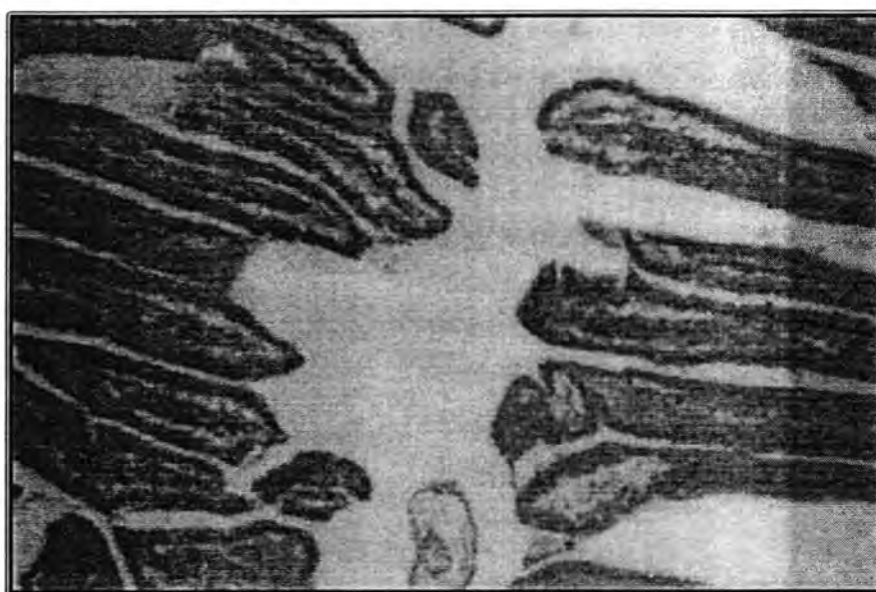


شكل:2- مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 14 يوم من التجريب بجرعة 0.004 ملغم/كغم من وزن الجسم يوضح تضخم الخلايا الكأسية (→) مع ارتشاح شديد في الخلايا اللمفية في الصفيحة الأساسية للزغابات المعوية (Ⓚ) {H &E, 40X} .

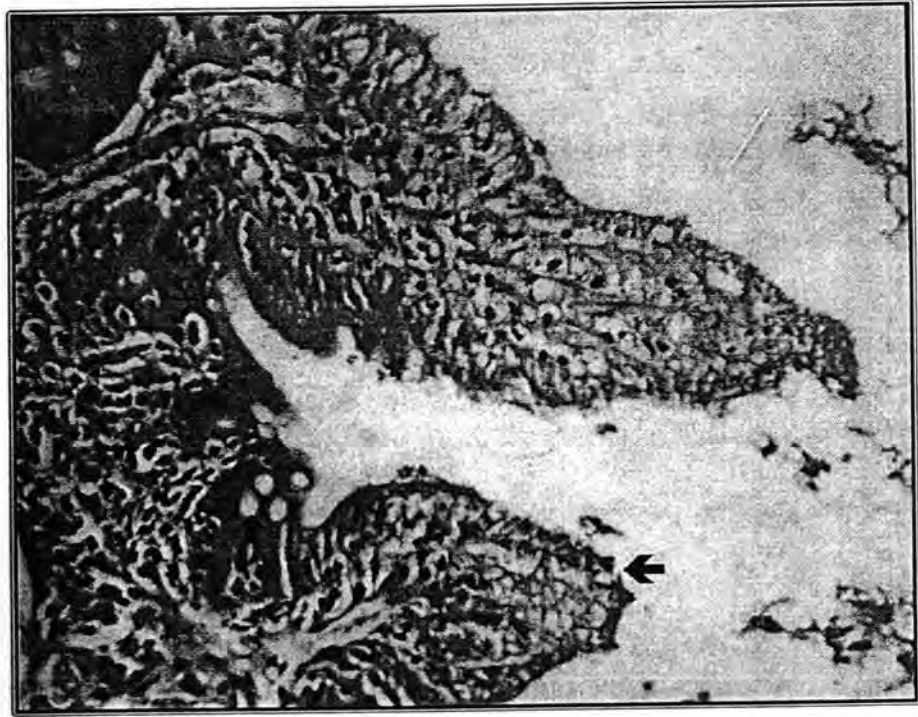




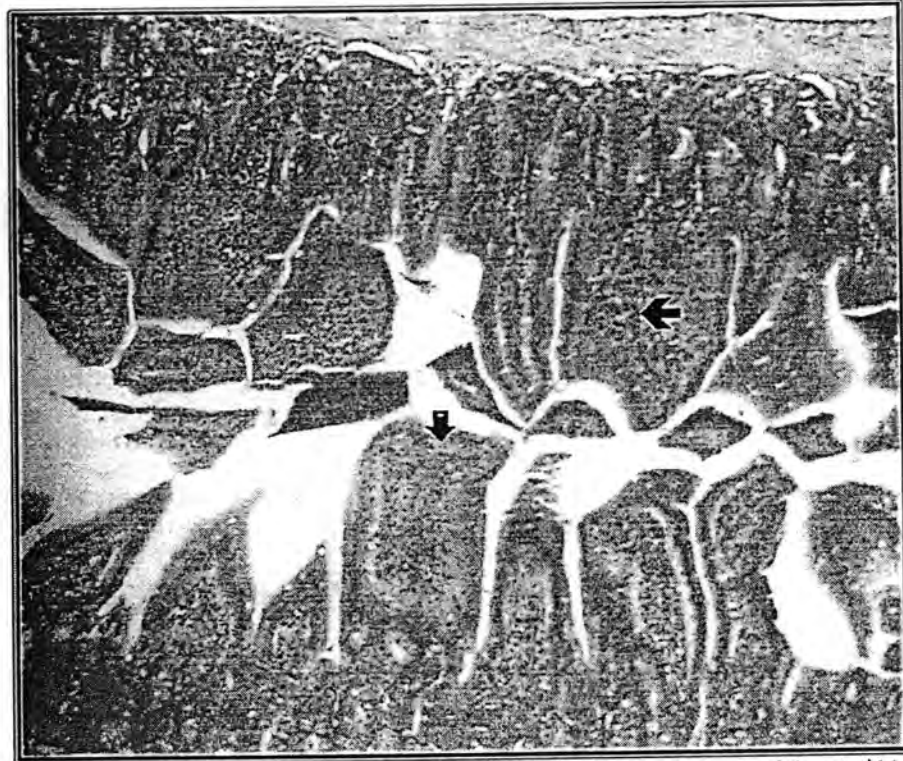
شكل-3: مقطع نسجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 28 يوم من التجريع بجرعة 0.004 ملغم /كغم من وزن الجسم يبين فرط تضخم الخلايا الكأسية (→) مع انسلاخ وانفصال الطبقة الظهارية للزغابات المعوية (Ⓜ) . {H &E, 40X}



شكل-4: مقطع نسجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 14 يوم من التجريع بجرعة 0.008 ملغم /كغم من وزن الجسم يوضح انسلاخ بسيط في ظهارة الخلايا المبطننة للزغابات (►) . {H &E, 40X}

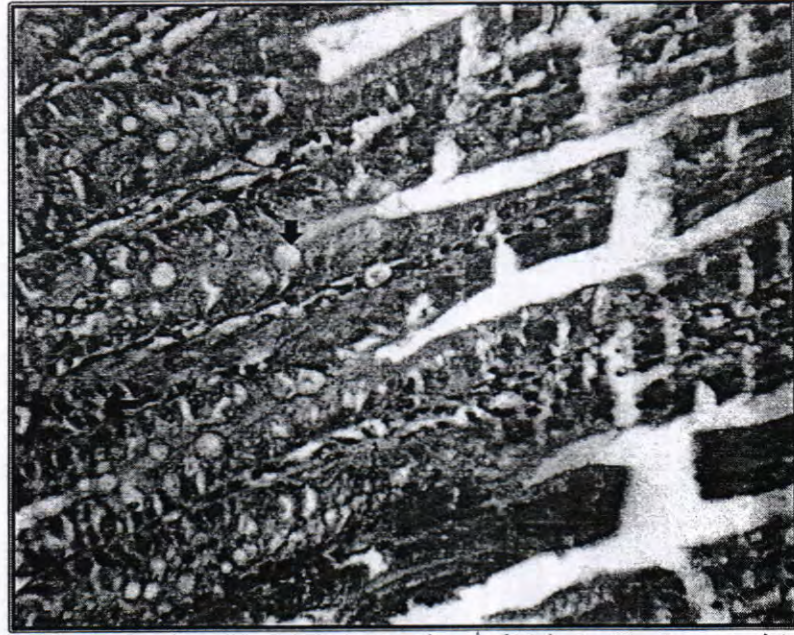


شكل-5: مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 28 يوم من التجريع بجرعة 0.008 ملغم/كغم من وزن الجسم يبين تنخر الخلايا المبطنة للزغابات (←) مع تكاثر الخلايا الكأسية (↑) وارتشاح معتدل للخلايا اللمفية في الصفيحة الأساسية للامعاء (→) {H &E, 40X}.

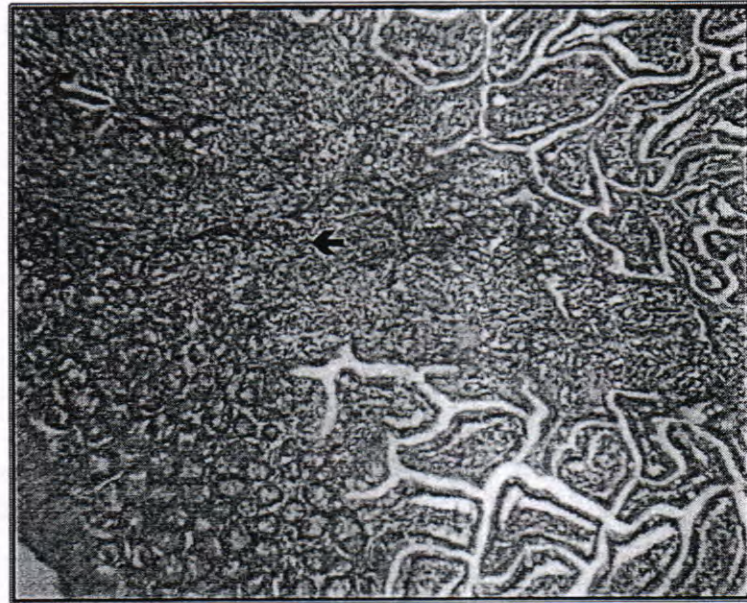


شكل-6: مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 14 يوم من التجريع بجرعة 0.01 ملغم/كغم من وزن الجسم يوضح ضمور الزغابات المعوية واخذها الشكل الدائري (↓) مع ارتشاح الخلايا وحيدة النواة في السفينة الأساسية للزغابات (←) {H &E, 10X}.

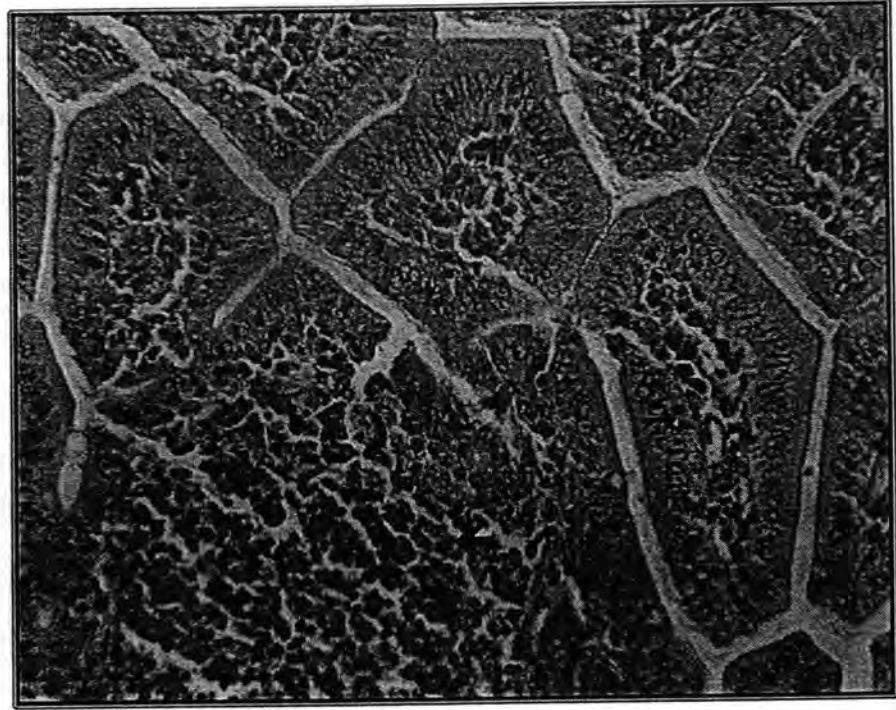




شكل-7: مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 28 يوم من التجريع بجرعة 0.01 ملغم /كغم من وزن الجسم يبين تكاثر الخلايا الكأسية (↓) مع ارتشاح طفيف للخلايا اللمفية في الصفيحة الأساسية للزغابات (↩) {H &E, 40X}.



شكل 8-مقطع نسيجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 14 يوم من التجريع بجرعة 0.03 ملغم /كغم من وزن الجسم يبين ارتشاح معتدل للخلايا وحيدة النواة في الصفيحة الأساسية للزغابات المعوية وبين الغدد المخاطية (↩) {H &E, 10X}.



شكل-9: مقطع نسجي في الامعاء الدقيقة لأحد الحيوانات بعد 28 يوم من التجريع بجرعة 0.03 ملغم /كغم من وزن الجسم يوضح فرط تنسج الخلايا اللمفية والتي ظهرت على شكل عقدة لمفية (←) مع ارتشاح الخلايا وحيدة النواة في الصفيحة الأساسية للزغابات المعوية (→) {H &E, 40X} .

نستنتج من الدراسة الحالية ان التعرض الحاد والمزمن للمبيد ادى الى حدوث تغيرات مرضية نسية واضحة في نسج الامعاء الدقيقة والتي من خلالها يظهر التأثير السمي للمبيد وخاصة عند الجرعة العالية ، ان عدم الاستخدام الصحيح لهذا المبيد وخاصة عند المزارعين يؤدي الى تراكمه في الانسجة الحية من خلال متبقيات في الفواكه والخضر.

### المصادر

1. العادل ، خالد محمد ، مولود ، كامل عبد. المبيدات الكيماوية في وقاية النبات : 327 – 328 (1979). وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد – كلية الزراعة . مطابع مؤسسة دار الكتب والنشر – جامعة الموصل.
2. يحيى ، محمد زكري. المبيدات انواعها واستخداماتها : 30 (1990). وزارة الزراعة والري ، الهيئة العامة للتعاون والتدريب والارشاد الزراعي.
3. Concon, J. M. Food toxicology. Part A: principles and concepts marcel deker Inc., New York and Basal: 675(1988).
4. Karmakar, R. and Kulshrestha, G. Persistence, metabolism and safety evaluation of thiamethoxam in tomato crop. Pest Manag. Sci. 65(8): 931–937(2009).



5. Byrne, F.J. ; Toscano, N.C. ; Urena, A.A. and Morse, J.G. Toxicity of systemic Neonicotinoid insecticides to avocado thrips in nursery avocado trees. *Pest Mang. Sci.* 63(9):660-666 (2007).
6. Prokopy, R.; Morin, G. and Spitko, R. Thiamethoxam, 24 th annual march message to Massachusetts tree fruit growers, university of Massachusetts:1-27 (2002).
7. Environmental Protection Agency. Thiamethoxam; Pesticide Tolerances. *Federal Register Volume 76, Number 159: 50904-50913*(2011).
8. Tomizawa, M. and Casida, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45:247-268 (2005).
9. دلالي، باسل كامل ; عواد، هاشم ابراهيم ; الجبوري ، ابراهيم جدوع وكسل، صلاح مجيد. المبيدات المسجلة والمستخدمه في الزراعة والصحة العامة في العراق: 138-139 (2002)، اللجنة الوطنية لتسجيل واعتماد المبيدات- وزارة الزراعة.
10. Bancroft, J. and Stevens, A. *Theory and Practice of histological techniques*. 2nd Ed., (1982). Churchill Livingstone, Edinburg, London.
11. Lichtman, M.A.; Ernest, B.; Thomas, J.K. and William, J.W. *Manual of hematology*. 6<sup>th</sup> Ed.:269-271(2003).Mc Graw-Hill, medical publishing division.
12. Mikami, N.; Yoshimura, J.; Kaneko, H.; Yamada, H. and Miyamoto, J. Metabolism in rats of 3-phenoxybenzil alcohol and 3-phenoxybenzoic acid glucoside conjugates formed in plants. *Pestic. Sci.*, 16:33-45(1985).
13. PMRA. Thiamethoxam. Pest Mangement Regulatory Agency, health Canada, ERC-01(2007).
14. Chiang, Y.H. ; Jen, L.N. ; Su, H.Y. ; Lii, C. K. ; Sheen, L.Y. and Liu, C.T. Effects of garlic oil and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and dilly trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15, 213(1):46-54(2006).
15. الصالحي، سراب رضا مصطفى. التأثيرات المرضية والنسجية ومتبقيات مبيد الديازينون في اسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio L.* رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري / جامعة بغداد(2002).

16. Stebbins, K.E.; Bond, D.M.; Novilla, M.N. and Reasor, M.J. Spinosad insecticide: subchronic and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in CD-1 mice. *Toxicol. Sci.* 65,276-287(2002).
17. Kavith, A.V. and Jagadessan, G. In vivo studies on the role of *Tribulus terrestris* extracton mercury intoxicated mice, *mus musculus*-large intestine-a histological survey. *J. Exph. Zoo. India*, 6(2):213-291(2002).

## تحضير مستخلص اللحم بالطريقة الحامضية كوسط محلي لنمو البكتريا

سعاد عبد علي عطية واستبرق حسن كاظم و حسنة وضاح معبيد و سوسن سلمان عطية  
وزارة العلوم والتكنولوجيا ص.ب 567 بغداد - العراق  
تاريخ تقديم البحث 2012/5/31 - تاريخ قبول البحث 2012/12/4

### ABSTRACT

Meat extract was prepared by modified acidic method. It was evaluated and gave identical results of physical properties to standard sample. The bacteriological test show good growth and identical bacterial properties when compared with standard sample by using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria.

The result of some amino acids concentrations assay for tyrosine, cystine and tryptophan was (0.349, 0.124, 0.074) ppm respectively and compared with standard sample which give the result (0.98, 0.30, 0.29) ppm respectively.

Some positive mineral elements ratios were estimated like sodium, calcium, magnesium, potassium, iron, manganese, lead and zinc of prepared sample, and the result was (1.240, 0.200, 0.026, 1.000, Nil, Nil, Nil, 0.0054)% respectively and compared with standard sample which give the result (0.630, 0.076, 0.066, 0.770, Nil, Nil, Nil, 0.24)% respectively. Also  $P_2O_5$  ratio was estimated and show the result 17.2% in prepared sample and 23.91% in standard sample.

We reached in this study, preparation and extraction of meat extract by acidic modified method and obtained product with identical physical and bacteriological properties, and near in analytical chemical results to standard sample. By depending on the obtained results, we recommended to study prepare of the important culture media that contain meat extract as main component, preparation study of the other culture media component and study the ability to prepare and extraction of meat extract in production level.

### الخلاصة

حُضِرَ مستخلص اللحم بالطريقة الحامضية المحورة وقيم مخبرياً واعطى نتائج مواصفات فيزيائية مطابقة للنموذج القياسي، أما الفحص البكتريولوجي فاعطى نمو جيد ومواصفات للبكتريا مطابقة للنموذج القياسي باستخدام البكتريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والايشريكية القولونية *Escherichia coli*، وكانت نتيجة قياس تراكيز بعض الاحماض الامينية التايروسين والسيستين والتربتوفان (0.074, 0.124, 0.349) جزء لكل مليون على التوالي في النموذج المحضر مقارنة بالنموذج القياسي الذي اعطى النتائج (0.29, 0.30, 0.98) جزء لكل مليون على التوالي. كما تم قياس النسب المئوية لبعض العناصر المعدنية الموجبة وهي الصوديوم والكالسيوم والمغنسيوم والبوتاسيوم والحديد والمنغنيز والرصاص والخراسين في النموذج المحضر وكانت النتيجة: (0.0054, Nil, Nil, Nil, Nil, 1.000, 0.026, 0.200, 1.240) % على التوالي، اما النموذج القياسي فاعطى النتيجة (0.066, 0.076, 0.770, Nil, Nil, Nil, 0.024, 0.630) % على التوالي وكذلك تم قياس النسبة المئوية لـ ( $P_2O_5$ ) فكانت النتيجة للنموذج المحضر 17.2% اما النموذج القياسي 23.91%.

لقد توصلنا في هذا البحث الى تحضير واستخلاص مستخلص اللحم بطريقة حامضية محورة والحصول على نتائج مطابق للنموذج القياسي قس المواصفات المظهرية والمواصفات البكتريولوجية ومقارنة له في النتائج الكيميائية التحليلية. وبالاعتماد على النتائج المستحصلة نوصي بدراسة تحضير اوساط زرع مهمة يدخل مستخلص اللحم كمكون رئيسي في مكوناتها، ودراسة تحضير المكونات الاخرى للاوساط الزرعية وكذلك دراسة امكانية تحضير واستخلاص المستخلص على مستوى انتاجي.

### المقدمة

تحتاج بعض الاحياء المجهرية الى عوامل نمو growth factors تستخدمها لبناء المركبات الخلوية وتصنف قسماً منها الى الحوامض الامينية التي تستعمل في بناء البروتين الخلوي والقواعد النيتروجينية كالبيورين Purin والبايريميدين Pyrimidin والتي تستغل في بناء الحوامض النووية والفيتامينات التي هي مجموعة من المركبات العضوية التي تشكل جزء من

المجموعة الفعالة للانزيمات<sup>(1)</sup>، ويصنف القسم الآخر الى العناصر المعدنية كالفسفور وتحصل عليه الاحياء المجهرية من الاوساط الغذائية<sup>(2)</sup>، تأخذ الكائنات الحية المغذيات من البيئة وتحولها الى مواد لجسمها خلال مختلف التفاعلات الكيميائية<sup>(3)</sup>.

يستعمل البيبتون في الاوساط الزراعية المايكروبيولوجية لدعم المتطلبات الغذائية للاحياء المجهرية، وكذلك في عمليات التخمر الصناعية ونتاج اللقاحات البشرية والبيطرية ويستخدم في الاوساط المغذية لتنمية البكتريا والفطريات وكذلك يستعمل لتشخيص الاحياء المجهرية<sup>(4)</sup> توجد عدة أنواع من البيبتونات ويعتبر مستخلص اللحم meat extract نوع من أنواع البيبتونات ذات المصدر الحيواني وهو مغذي جداً ويستعمل في تحضير الاوساط الزراعية البكتريولوجية<sup>(5)</sup>.

كانت اول إشارة لاستخدام البيبتون في الاوساط الزراعية من قبل العالم Naegli عام 1879 حيث اشار في تقريره الى ان البيبتون هو عبارة عن الهضم الانزيمي للحم الاحمر<sup>(6)</sup>. يُعد البيبتون المادة الذائبة في الماء والناجمة من تحلل البروتين ويحتوي خليطاً من الاحماض الامينية الحرة وبيبتيدات ويضيف عوالمأ أخرى للاوساط الزراعية مثل الاحماض النووية والمعادن والاملاح والفيتامينات، كما ويعد جزءاً من مكونات العديد من الاوساط الزراعية وهو مغذي جداً وله مدى واسع من الاستعمالات في التشخيص الروتيني والابحاث البكتريولوجية<sup>(7)</sup>. تحضير البيبتون يتم بالتحلل المائي بواسطة الانزيمات او الحوامض او القواعد القوية للمواد البروتينية وطريقة التحلل بواسطة الحوامض او القواعد القوية. وتقلل محتوى البيبتون من الفيتامينات والاحماض المعدنية<sup>(8)</sup>.

يحضر البيبتون باستخدام الانزيمات وهذه الطريقة تعطي نتائج أفضل من الطريقة الحامضية لكن هذه الطريقة مكلفة جداً لمدى واسع من التحليلات والهضم الانزيمي الذي يحدث عند درجة حرارة 37م° لمدة طويلة يجب حمايته من التلف البكتيري باضافة مواد حافظة من التلف<sup>(7)</sup>. تستورد الاوساط الغذائية المستعملة في تنمية الاحياء المجهرية من شركات ذات مناشيء اجنبية واساسها البيبتون كمكون رئيسي. هدفت الدراسة الى الاستعاضة عن هذه الاوساط الغذائية المستوردة بانتاج البيبتون محلياً وتحضير اوساط غذائية محلية يضاف لها البيبتون المنتج تفي حاجة البلد وتحرر الساحة العلمية عن طريق تأمين حاجاتها من داخل القطر ويمتاز البيبتون المنتج برخص الثمن وكونه في متناول اليد لاستعماله في شتى القطاعات الطبية والبايولوجية والصيدلانية، لذلك حضر مستخلص اللحم بالطريقة الحامضية ودرست المواصفات المظهرية والبكتريولوجية والتحليلية له.

## المواد وطرائق العمل

### 1- تهيئة اللحم

نُظف اللحم وغُسل جيداً بالماء بعد ازالة الشحوم والعظام والجلود. ثم نُرم بماكنة ثرم اللحم، كما ازيلت الدهون المتبقية باضافة المذيب كحول الايثانول بتركيز 95% مع المزج لمدة ساعة وبدرجة حرارة 25م° وسرعة 2000 rpm في الحاضنة الهزازة، بعدها ازيل الكحول وغسل اللحم جيداً بالماء المقطر<sup>(9)</sup>.

### 2- الاستخلاص :

تمت المعاملة الحامضية باضافة الماء المقطر الى اللحم بعد ازالة الدهون وجعل الـ pH للمزيج 1.5 باضافة حامض الهيدروكلوريك المركز ووضع في جهاز الحاضنة الهزازة وبدرجة حرارة 70م° لمدة 30 ساعة وبسرعة 2000 rpm. وبعد تمام عملية الاستخلاص عُدل الأس الهيدروجيني pH للمزيج الناتج الى 7.0 ورُشح بورقة ترشيح نوع No.4 حينها جُفف بجهاز التجفيد. وهذه الطريقة غير مذكورة في المصادر المعتمدة في هذا البحث بل استحدثت كتحويل لطريقة استخلاص النموذج المحضر.

### 3- تقييم النموذج المحضر:

#### 1- دراسة المواصفات المظهرية



تم تحضير 2% من النموذج المحضر وقورن مع النموذج القياسي وهو مستخلص اللحم شركة (Difco) وبالتركيز نفسه.

## 2- الدراسة البكتريولوجية

تم تحضير وسط الاكار المغذي Nutrient agar مضاف اليه النموذج المحضر بنسبة 3غم/ لتر بالمقارنة مع الوسط نفسه مضاف اليه النموذج القياسي ، ولقح بالبكتريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وبكتريا الايشريكية القولونية المزودة *Escherichia.coli* المزودة من (مختبر الصحة العامة المركزي/ بغداد) وحُضنت الاوساط بدرجة حرارة 37م° لمدة (18-24) ساعة.<sup>(10)</sup>

## 3- الدراسة التحليلية:

قيست تراكيز الاحماض الامينية التايروسين، والسيستين، والتريوفان، باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائلة ذات الكفاءة العالية (HPLC)، وقياس نسبة بعض العناصر الموجبة الصوديوم Sodium والكالسيوم calcium والمغنسيوم Magnesium والبوتاسيوم Potassium والحديد Iron والمنغنيز Manganies والرصاص Lead والارصين Zinc باستخدام جهاز طيف الامتصاص الذري اللهب Flame atomic absorption spectrophotometer وكذلك قياس نسبة  $P_2O_5$  باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الايوني Ionic chromatography.<sup>(11)</sup>

## النتائج والمناقشة

تم الحصول على المستخلص بطريقة المعاملة الحامضية مع إجراء بعض التحويلات علنها في حين اشارت دراسة اخرى الى امكانية تحضير هذا المستخلص باستخدام حامض الهيدروكلوريك بتركيز 15% ومعاملة حرارية 110م° واستخدام ضغط 1.5 بار/انج<sup>2</sup> لمدة 18 ساعة. و استخدمت طريقة تعرض اللحم الى ضغط عالي ودرجة حرارة في الحصول على السائل وتحتاج هذه الطريقة الى تقنية ومستلزمات خاصة<sup>(12)</sup>. بينما استخدمت الاسماك واستخدام طريقة التحلل المائي ثم التجفيف<sup>(13)</sup>. اما اللحم فقد استخدم بشكل واسع للحصول على ببتون ذو نوعية عالية<sup>(10)</sup>.

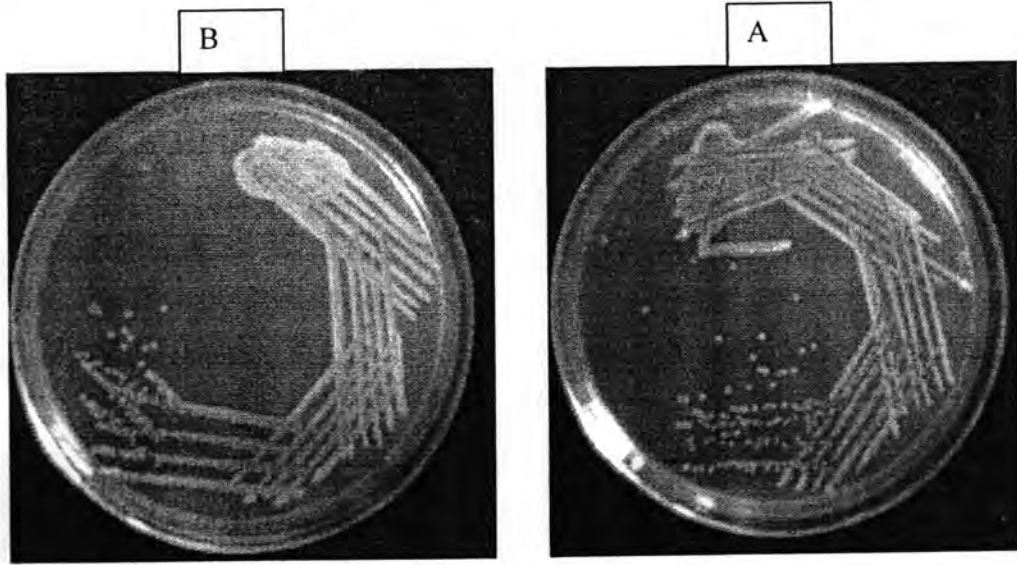
## دراسة المواصفات المظهرية :

المستخلص السائل الناتج ذو لون اصفر براق شفاف خالي من الشوائب والرواسب وذو أس هيدروجيني PH:6.9 مطابق للنموذج القياسي، والدهون تكون طبيعياً قليلة في الببتونات وعند وجودها بكميات كبيرة اكثر من 1% تتداخل مع درجة وضوح محلول الببتون<sup>(9)</sup>، ويبدو بعد تخفيفه بشكل مسحوق جاف اصفر مطابق للنموذج القياسي وخالي من الرطوبة لتجنب حدوث نمو ميكروبي وبالاخص عندما تكون نسبتها تفوق 5% مما يحدث تحولات كيميائية في الببتون وللكشف عن الرطوبة غير المرغوب فيها يُلاحظ تكتل مسحوق الببتون مما يزيد من تصلبه داخل الحاوية واسوداد في لونه وتغير في قيمة الاس الهيدروجيني pH هي جميعاً كواشف لانحطاط الببتون<sup>(9)</sup>.

اما مواصفات وسط الاكار المغذي الصلب والمحضر باستخدام النموذج المحلي فقد كان ذو لون اصفر شفاف رائق لعدم وجود شوائب ضبابية وهو مطابق للوسط المتضمن للنموذج القياسي<sup>(10)</sup>.

## نتائج الزرع البكتريولوجي :

كانت نتيجة الزرع البكتريولوجي باستخدام البكتريا العنقودية الذهبية على الوسط المتضمن النموذج المحضر فالنمو جيد وواضح، والمستعمرات المعزولة قد كانت ذات شكل دائري وحجم المستعمرة مطابق للوسط القياسي<sup>(7)</sup>. كما موضح في الصورة رقم (1).

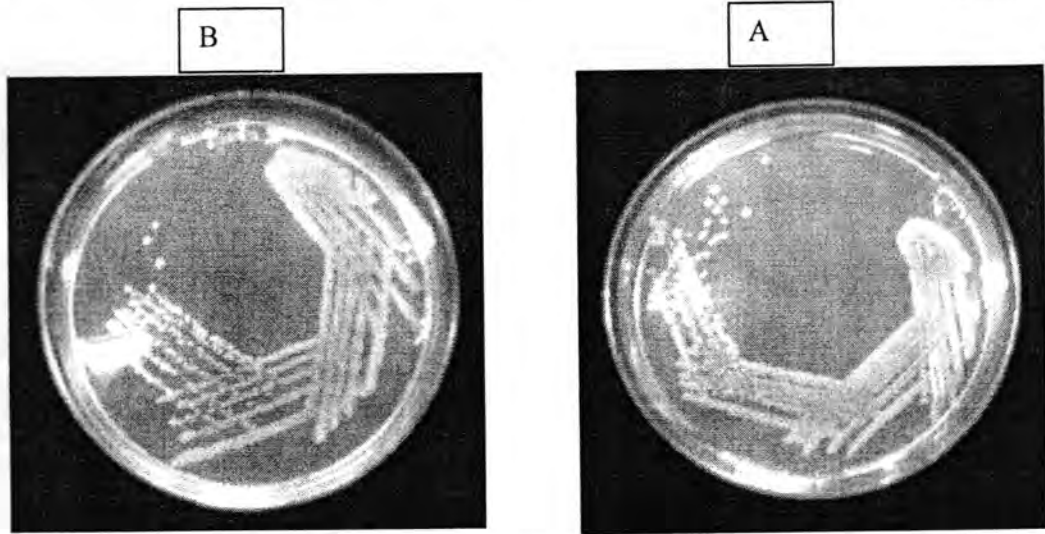


صورة-1 : نتيجة زرع البكتريا العنقودية الذهبية على وسط الاكار المغذي

A : الوسط المحتوى على النموذج المحضر

B: الوسط المحتوى على النموذج القياسي

اما نمو البكتريا الاشريكية القولونية على الوسط المتضمن النموذج المحضر فهو جيد وواضح، والمستعمرات المعزولة ذات سطح صقيل وذات حافة دائرية مطابقة للوسط المتضمن النموذج القياسي، كما موضح في الصورة رقم(2).



صورة-2 : نتيجة زرع البكتريا الاشريكية القولونية على وسط الاكار المغذي

A: الوسط المحتوي على النموذج المحضر

B: الوسط المحتوى على النموذج القياسي

يلاحظ من النتيجة اعلاه ان الوسط الزرعى المحتوى على النموذج المحضر يعادل في كفاءته الوسط المتضمن للنموذج القياسي في تنمية البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام لاحتوائه على العناصر المغذية الضرورية لتنمية البكتريا كالاحماض الامينية والكربوهيدرات والعناصر المعدنية الاساسية للتكاثر والانقسام. وبهذا يعتمد على الوسط الحاوي على النموذج المحضر في التشخيص البكتريولوجي من حيث مواصفات البكتريا.



الايوساط الزراعية الحاوية على هذا الببتون المغذي العالي مناسب لتنمية مختلف البكتريا مع مدى واسع من المتطلبات الغذائية<sup>(9)</sup> الكائنات الحية تأخذ المغذيات من البيئة المحيطة وتحولها الى مواد لجسمها خلال مختلف التفاعلات الكيميائية<sup>(3)</sup>.

ان النمو الحاصل على الوسط ذو النموذج المحضر من زيادة العدد ، وضوح النمو ، بما فيه العدد وشكل المستعمرة . دليل على توفر المواد المغذية بكل اشكالها وهذا يعكس لنا صورة واضحة ان الوسط كان مناسباً للنمو البكتيري<sup>(14)</sup>.

تبدأ الخلية البكتيرية بالنمو عند وضعها في بيئة مغذية مناسبة مع الحفاظ على ظروف فيزيائية وكيميائية مناسبة<sup>(14)</sup> . لان الخلية البكتيرية تحتاج الى مجموعة عوامل غذائية وفسولوجية وفيزيائية للنمو والتكاثر في الخلايا الحية لجسم الانسان والحيوان والطبيعة او في المختبر والايوساط الزراعية تنمو عليها مستعمرات البكتريا باشكالها واحجامها والوانها المختلفة والمميزة لكل نوع . وتحتوي هذه الاوساط على كافة العناصر الغذائية الحيوية من بروتينات وسكريات وفيتامينات وعناصر ومركبات كيميائية ضرورية لنمو وتكاثر البكتريا<sup>(7)</sup>.

يُعد الببتون من أهم المركبات الاساسية التي تضاف الى الاوساط الزراعية الخاصة بالبكتريا بسبب احتوائه على الاحماض الامينية وبقية المركبات النتروجينية الاخرى والتي يمكن استخدامها من قبل البكتريا<sup>(15)</sup>.

يجب وجود كل المواد المطلوبة لانتاج الطاقة والتصنيع الحيوي في بيئته كل كائن مجهري لذلك فالايوساط الزراعية المستخدمة لتنمية الاحياء المجهرية يجب ان تجهز كل المغذيات الضرورية للنمو الخلوي وللحفاظ على تلك الاحياء<sup>(10)</sup>.

إذ ان مستخلص اللحم يجهز الاحماض الامينية والفيتامينات والكربون في الاوساط الزراعية المايكروبيولوجية<sup>(16)</sup>.

#### نتائج قياس تراكيز الاحماض الامينية :

يبين الجدول رقم(1) نتائج قياس تراكيز بعض الاحماض الامينية في النموذج المحضر بالمقارنة مع النموذج القياسي.

جدول-1 : تراكيز بعض الاحماض الامينية

الحامض الاميني	التركيز ppm	
	النموذج القياسي	النموذج المحضر
التايروسين	0.98	0.349
السيستاتين	0.39	0.124
التربتوفان	0.29	0.074

يلاحظ ان تراكيز الاحماض الامينية للنموذج المحضر مقارنة للنموذج القياسي كانت مختلفة ، ويعود الاختلاف الى ان البروتين وكما هو معروف مكون من عدد من الاحماض الامينية التي ترتبط مع بعضها بواسطة الاواصر الببتيدية Peptide bond ولغرض كسر تلك الاواصر تمت المعاملة الحامضية والحرارية للحم ويؤدي هذا التحلل المائي بالحامض الى تحلل البروتين الى مكوناته من الاحماض الامينية<sup>(17)</sup> وتختلف مكونات الببتونات اعتمادا على مصدر الببتون وطريقة التحضير<sup>(18)</sup>.

كما يلاحظ انخفاض نسبة الاحماض الامينية التايروسين والسيستاتين والتربتوفان في النموذج المحضر أقل مما في النموذج القياسي . تؤدي المعاملة الحامضية الى التحطم الشامل او الجزئي لبعض الحوامض الامينية ، كالحامض الاميني والسيستاتين والسيرين والثريونين والتي تتحطم جزئياً<sup>(9)</sup>.

تسبب عملية التسخين الزائد الى فقدان الاحماض الامينية الحساسة والعوامل الاخرى<sup>(3)</sup>. لذلك اعتمد في هذه الطريقة على استخدام درجة حرارة 70م<sup>0</sup> بدون استخدام الضغط . بينما اشارت مصادر اخرى (9، 12) الى استخدام درجة حرارة 160م<sup>0</sup> وبضغط (1.5 بار/ انج<sup>2</sup>)

لمدة 18 ساعة، والى تعرض اللحم الى ضغط عالي درجة حرارة مرتفعة في الحصول على السوائل وتحتاج هذه الطريقة الى تقنية ومستلزمات خاصة على التوالي.

**نتائج قياس النسبة المئوية لبعض العناصر المعدنية الموجبة:**  
يبين الجدول رقم (2) نتائج قياس النسب المئوية لبعض العناصر المعدنية الموجبة في النموذج المحضر والنموذج القياسي.

جدول 2- النسب المئوية لبعض العناصر المعدنية لموجبة

العنصر	النموذج القياسي %	النموذج المحضر %
صوديوم Na	0.630	1.240
كاليوم Ca	0.076	0.200
مغنسيوم Mg	0.066	0.026
بوتاسيوم K	0.770	1.000
حديد Fe	Nil	Nil
منغنيز Mn	Nil	Nil
رصاص Pb	Nil	Nil
خارصين Zn	0.024	0.0054

لوحظ اختلاف النسب المئوية للعناصر المعدنية الموجبة في النموذج المحضر وكذلك في النموذج القياسي، ربما لا تحتوي الصيغة للمادة على العناصر والمعادن المتخصصة المذكورة او المثبتة، حيث تختلف مكونات الببتونات اعتماداً على مصدر الببتون وطريقة تحضيره<sup>(18)</sup>

يتطلب النمو البكتيري وجود المعادن والاملاح غير العضوية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والمغنسيوم والكالسيوم والحديد والفسفور وكميات نزرة traces من الزنك والكوبلت والمنغنيز والنحاس التي وتشتق جميعاً من مختلف مكونات الاوساط الزرعية<sup>(4)</sup>، وتعد الايونات المعدنية مهمة جداً لانظمة الوظائف البايولوجية<sup>(19)</sup>. لوحظ ان نسبة عنصر الصوديوم اعلى مما في النموذج القياسي ويعود ذلك الى طريقة التحضير بالطريقة الحامضية تتطلب معادلة للأس الهيدروجيني مما يؤدي الى ارتفاع نسبة الصوديوم في الببتون<sup>(9)</sup>، وكذلك كانت نسبة عناصر الكالسيوم والبوتاسيوم والخارصين اعلى مما في النموذج القياسي اما المغنسيوم فكانت نسبته اقل مما في النموذج القياسي. يتطلب الصوديوم عموماً ليس فقط لمعظم البكتريا وانما يضاف بعض الاحيان الى الاوساط الزرعية للمحافظة بصورة رئيسية على الضغط الاوزموزي الامثل<sup>(18)</sup>. اما الكالسيوم فهو اساسي لانتاج الابواغ الداخلية في البكتريا الايجابية لصبغة غرام<sup>(4)</sup>.

الايونات المعدنية تكون جزء اساسي في الاحياء المجهرية. من بينها المغنسيوم والكالسيوم تكون مطلوبة بكميات كبيرة. فالمغنسيوم اساسي للمحافظة على سلامة الرايبوسومات وكذلك يعمل كمعامل مساعد في العديد من التفاعلات الانزيمية<sup>(4)</sup>. اما البوتاسيوم فهو مهم للمحافظة على التوازن الايوني وكذلك يعمل كمعامل مساعد في العديد من التفاعلات الانزيمية وله دور مهم في وظيفة الرايبوسوم<sup>(16)</sup>.

اما الحديد والمنغنيز والرصاص فقد بينت النتائج عدم وجودها في كلا النموذجين المحضر والقياسي. فالرصاص والخارصين والنحاس والفضة لها تأثيرات سمية وكميات قليلة جداً<sup>(9)</sup>. كذلك تم قياس النسبة المئوية  $P_2O_5$  وكانت نسبتها في النموذج المحضر 17.2% اما في النموذج القياسي فكانت اعلى 23.91%. ان الفوسفات مادة مفيدة لقياسها في الببتون وهي لاتعمل فقط كدائري وانما لها دور مهم في ايض البكتريا<sup>(9)</sup>.

من هذه النتائج التحليلية نلاحظ تقارب النتائج ووجود اختلافات بسيطة بين النموذج المحضر والنموذج القياسي. وساعد تحضير مستخلص البروتين على انتاج ببتون قياسي وتحديث اختلافات بين وجبة تصنيعية وأخرى لوجود فروقات في المادة البروتينية على المستوى البايولوجي<sup>(9)</sup>.



## المصادر

- 1- Cunniff. P.A.U.S. Food and Drug Administration .Bacteriological Analytical Manual.(8<sup>th</sup>ed). AOAC International, Gaithersburg.MD. (1995).
- 2- Hummel. J.; Niemann, M. and Wienkoop, S." ProMex: A mass spectral reference database for proteins and protein phosphorylation sites" BMC Bioinformatics. 8, 216(2007).
- 3- Deutscher, M.P. Method in Enzymology. Guide to protein purification. Vol. 182. Elsevier science (USA). 1990.
- 4- Banerjee, A., K. and Banerjee, N." Fundamentalsof Microbiology and immunology". New central Book. Agency(p) Ltd India.(2008).
- 5- Stanier, R.Y.; Ingrahm, J.L.; Weelis.M.L., and Painter, P.R" General Microbiology".5<sup>th</sup> ed. MacMillan Education LTD. London. (1987).
- 6- Pirt, S.J. " Principles of Microbe and Cell cultivation". 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Scintific publications, Oxford. London.(1975).
- 7- Arora, D.R and Arora.B. Textbook of Microbiology.3<sup>rd</sup> ed. CBS Publishers and distributors. India. (2008).
- 8- Rodwell, V.W." Structure and functions of proteins and enzymes". In .R.K. Murray; D.K.Garnner; P.A.Mayes and V.W. Rodwell.(eds.) "Biochemistry" 24<sup>th</sup> ed. Pretice –Hall International. Inc.(1996).
- 9- Bridson, E.Y. and Brecker, A."Methods in Microbiology" Academic press, INC(London)LTD.(1976).
- 10- Dagallier,L.. "Microbiology Manual" 1<sup>st</sup> ed. Tulip Diagnostics (p) LTD. India(2006).
- 11- Clausen, C.; Jackson, O.; Jennifer, G. and Danielle, J. Water extracts: Extraction, separation and biological activity of rutin and quercitnin, J. Agric. Food chem., 57(17) pp 7763- 7770(2009).
- 12- Arnesen,J.A. and Gildberg, A.. Extraction of muscle proteins and gelatin form cod head. Process Biochemistry, 41, 697- 700.(2009).
- 13- Stainsby, G. Gelatines. In A.M. Pearson, T.R.Dutson, &A.J. Bailey(eds), Collagen as food. Advances in Meat Research, Vol.4. New York van Nostrand Reinhold company, Inc. (1987).
- 14- Greenwood, D.; Slack, R.;Peutherer, J. and Barer,M. " Medical Microbiology"7<sup>th</sup> ed. Churchill LivingstonElsevier.(2007).
- 15- Bridson, E.Y. " The Oxoid Manual".9<sup>th</sup> ed. Oxoid limited – wade Road, Basingstoke, England (2009).

- 16- Campbell,N.A.; Reece, J.B. ; Yrry, L.A.; Cain, M.L., and Minorsky, P.V."Biology" 8<sup>th</sup> ed. Pearson Benjamin Cummings. (2008).
- 17- Voet, D.J.; Voet, J.G. and Pratt, C.W. "Principles of Biochemistry" 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley and Sons. Inc. (2008).
- 18- Microxpress Microbiology Manual .Tulip Diagnostics(p)LTD. India .(2009).
- 19- Steven, S.Z., " Chemical principles". 6<sup>th</sup> ed. Houghton Mifflin Company Boston Newyork.(2007).

## الخواص الطيفية لصبغة الكومارين - 120 العضوية

مازن علي عبد علي  
الجامعة المستنصرية / كلية العلوم / قسم الفيزياء

تاريخ تقديم البحث 2012/5/28 - تاريخ قبول البحث 2012/11/6

## الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة الخواص الطيفية لصبغة الكومارين - 120 من خلال استخدام برنامج النمذجة الجزيئية HyperChem 7 وبأختيار إحدى الطرق الشبه تجريبية حيث تم اعتماد البرنامج على الطريقة MNDO/PM3. ان عدد الذرات للكومارين - 120 هي 22 ذرة اي انها تمتلك 60 نمطا اهتزازيا، حيث كانت الصبغة تمتلك 21 نمط اهتزازيا مديا و 39 نمط اهتزازيا انحنائيا. كانت عدد المدارات المشغولة بالالكترونات (HOMO) 33 مدارا وان اول مستوي يمثل اعلى مدار جزيئي مشغول بالالكترونات بطاقة (-8.79339eV). تماثل هذا المدار كان (33A) اما المدارات الغير مشغولة بالالكترونات (LOMO) فكانت 28 مدار وان اول مدار يمثل اوطأ مستوي جزيئي غير مشغول ومقدار طاقته (4.558096 eV) وتماثله (36A). تم توضيح هذه المدارات المشغولة والغير مشغولة ببعدين وبثلاثة ابعاد من خلال الرسوم كذلك تم حساب فجوة الطاقة فكانت (9.2491993eV). كذلك تم حساب كثافة الشحنة الكلية (Total Charge Density) وجهد الكهروستاتيكية (Electrostatic Potential) من خلال الرسوم التوضيحية ببعدين وبثلاثة ابعاد.

## ABSTRACT

In this research the spectroscopic properties of coumarin-120 has been studied using molecular modeling HyperChem 7 program and the choice of semi-empirical methods, where the program was depends on the MNDO/PM3. The number of atoms inner the C-120 is 22 atoms that is, they have 60 vibration modes, where the dye has 21 stretching vibration modes and 39 bending vibration modes. The number of occupied orbital by electrons (HOMO) were 33 orbital and it is first orbital represents the highest level molecular occupied by electrons with energy (-8.79339eV). The symmetry of this orbital was (33A). While the orbital of the unoccupied by electrons (LOMO) have 28 orbital. The first is the lowest orbital represents unoccupied molecular orbital with energy 0.455809 eV of symmetry is (36A). These occupied and unoccupied orbitals were clarified in two and three dimensions. From the curves the energy gap was (9.2491993eV). Also the total charge density and electrostatic potential were calculated from the diagram in 2D/3D dimensions.

## المقدمة

الصبغات الليزرية هي مركبات عضوية غير مشبعة معقدة تذاب في مذيبات عضوية كالماء ومثيل الكحول واثيل الكحول.. الخ لتكون محاليل عضوية لها صفات ضوئية معينة [1] وتتألف الصبغات الليزرية من جزيئات كبيرة تمتلك تركيباً معقداً ولها طيفي امتصاص وفلورة واسعين في منطقتي الطيف المرئي وفوق البنفسجي وتحت الحمراء القريبة من الطيف الكهرومغناطيسي مما جعلها كثيرة الاستخدام كواسط فعالة لتوليد ليزر ذو مدى تنعيم واسع [2]، وهي ذات وزن جزيئي كبير لاحتوائها على سلسلة اقترانية (Conjugated) مكونة من ذرات الكربون المرتبطة باواصر مفردة (Single) ومزدوجة (Double) متناوبة والتي يطلق عليها نظام الكروموفور (Chromophore) [3,4] والذي يمتاز بامتصاصه للضوء في المنطقة فوق البنفسجية والمرئية مما يجعل الصبغة ملونة لكون انتقال الامتصاص ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) حدث في المنطقة المرئية [5، 6]. ولهذا السبب تم اثاره الصبغات بواسطة الضخ البصري باستخدام الليزر ذات الصلبة ذات تشغيل نبضي عملاق او باستخدام مصابيح وميضية قادرة على تكوين نبضة قصيرة بصورة سريعة [1]. ومن الجدير بالذكر ان المركبات الليزرية التي تصلح كواسط فعالة في ليزرات الصبغة يجب ان تتميز بالخصائص الاتية [5، 7]:

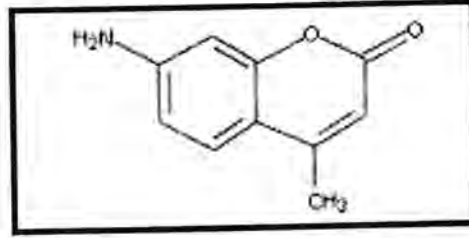


مازن

1. لها قابلية ذوبان عالية في عدد كبير من المذيبات دون توليد المعقدات الجزيئية وان تستجيب للعوامل المساعدة المستخدمة للتغلب على تكوين هذه المعقدات.
2. يتطابق فيها طيف امتصاص الصبغة مع التوزيع الطيفي لمصدر الضخ.
3. ذات حزمة انبعاث عريضة اي مدى تنعيم واسع.
4. ذات ناتج كمي عال من خلال هيمنة الانتقالات الاشعاعية.
5. تتمتع باستقرارية كيميائية - ضوئية عالية.

#### الجزء النظري

ان صبغات الكومارين هي من المركبات متعددة الحلقات (Hetrocyclic compounds) حيث تمتلك حلقتين (Bicyclic) تشكلان القوام الاساسي لها [5، 8]، يوضح الشكل (1) التركيب الجزيئي لصبغة الكومارين 120 ( $C_{10}H_9NO_2$ ) ذات الوزن الجزيئي  $175.19 \text{ gm/mol}$  [9]



شكل-1: التركيب الجزيئي لصبغة كومارين 120 [9]

ان صبغات الكومارين (الثنائية الحلقة) تتميز بأهمية وفائدة عملية كبيرة في المنطقة الزرقاء - الخضراء من الطيف الكهرومغناطيسي لكونها فعالة في هذه المنطقة [5، 8]. وتعتبر مركبات الكومارين التي تحتوي على مجموعة الامين ذات فعالية ليزيرية عالية خصوصاً عندما تتصلد (Rigidized) المجموعة بحلقتين سداسيتين كما في مركب الكومارين 120. وتتميز هذه المركبات بنتاجها الكمي العالي بسبب انخفاض معدل العمليات الاشعاعية كالعبور البيني [10]. فلو تأملنا جزيئة عدد ذراتها يساوي  $3N$  بذلك يكون عدد الإحداثيات الفراغية اللازمة لوصف حالة النظام الديناميكية يساوي  $3N$  وهذا العدد يسمى بدرجات الحرية للنظام (Degrees of Freedom)، فأنا سنتمكن من أن نشير إلى موضع كل ذرة بتحديد ثلاثة إحداثيات (x,y,z) أو بمعنى آخر تحليل حركة أي ذرة في الجزيئة إلى ثلاثة مكونات باتجاه الإحداثيات الثلاثة [11]. عند تثبيت الإحداثيات  $3N$  للجزيئة عندئذ بالامكان أن نحدد طول الأواصر والزوايا، وتستهمل ثلاث من درجات الحرية ( $3N$ ) لوصف الموضع أو حركة الجزيئة كلها باتجاه الإحداثيات الثلاث (الحركة الانتقالية) كما تستعمل ثلاث درجات أخرى لوصف الحركة الدورانية للجزيئة، أما المتبقي من درجات الحرية فانه يشير إلى خزن طاقة الحركة الاهتزازية للجزيئة [12].

#### الحزم الاهتزازية الاساسية (Fundamental Vibration Bands)

ان عدد انماط الحزم الاساسية تكون مساوية الى  $3N-6$  للجزيئات المتعددة الذرات اللاخطية ، ومساوية الى  $3N-5$  للجزيئات الخطية، وفي كلتا الحالتين لجزيئة تتألف من  $N$  من الذرات يكون عدد اواصرها مساويا الى  $(N-1)$  من الاهتزازات وبذلك يقسم هذا النوع من الحزم الى [11]:

#### 1- الاهتزازات المديّة للأواصر (Stretching Vibration)

وهي نوع من الانماط الاهتزازية التي تمتلك  $(N-1)$  من الاهتزازات المديّة للأواصر حيث تتحرك الذرات على طول محور الاصرة بشكل دوري باتجاهين متعاكسين (انكماش وتمدد).



## 2- الاهتزازات الانحنائية (Bending Vibration)

ان ما تبقى من درجات الحرية يكون للاهتزازات الانحنائية وعددها يساوي  $2N-5$  للجزيئات اللاخطية و  $2N-4$  للجزيئات الخطية، ويحدث نتيجة تغير الزاوية المشتركة بين الذرات [13,11] والجدول (1) يوضح انواع الاهتزازات.

جدول 1 - تقسيم درجات الحرية وانواع الاهتزازات للجزيئات الخطية واللاخطية [11]

عدد درجات الحرية الاهتزازية	الاهتزازات المدية للاواصر	الاهتزازات الانحنائية للاواصر
3N-5	N-1	2N-4
3N-6	N-1	2N-5

تعتبر بعض الاهتزازات الجزيئية (المسماة بالاهتزازات المشابهة لما يسمى ببصمات الاصابع Finger print) صفة مميزة للجزيئة ككل. بينما تتعلق الاخرى بمجاميع فعالة معينة. ومن الممكن تقسيم تأثير الاهتزازات هذه على الاواصر الكيميائية بين الذرات الى قسمين رئيسين. المط (v) والانحناء (δ). كما يمكن ان توصف هذه الاهتزازات ايضا ببعض المصطلحات: حركة المقص (σ) scissoring، تأرجح (ρ) rocking، ارتجاج (ω) Wagging، واللتواء (τ) twisting [14].

يعتمد تردد اهتزازات المد والانحناء بصورة كبيرة على كتل الذرات المهتزة وكذلك على رتبة الاواصر bond orders الكيميائية الرابطة بين الذرات. فكلما كانت الذرات اخف وزنا كان تردد اهتزازها اعلى. وكذلك كلما كانت رتبة الاصرة اعلى كان تردد الاهتزاز اعلى، وعليه يكون تردد اهتزاز الاصرة الثلاثية اعلى من تردد اهتزاز الاصرة المزدوجة والتي بدورها تهتز عند تردد اعلى من تردد الاصرة المفردة. الا ان اهتزازات المد، بصورة عامة تحتاج الى طاقة اعلى، ولهذا تحدث اهتزازات المد عند اعداد موجية اعلى (طول موجي اقصر) من اهتزازات الانحناء لنفس المجموعة [15].

### برنامج 7 Hyperchem

لقد تم استخدام برنامج Hyperchem لحساب الخصائص الطيفية لصبغة الكومارين 120 فيعد رسم الجزيئة وتحديد الذرات يتم اجراء الافضلية الهندسية الجزيئية للحصول على الشكل المستقر وبأقل طاقة جهد باختيار احد الطرق الشبه تجريبية حيث تم اعتماد هذا البرنامج على طريقة MNDO/ PM3 ومن ثم حساب الخصائص ومن هذه الخصائص التي تم حسابها.

- اعطاء ايجاز لمعلومات عن الجزيئة منها الطاقة الكلية (Total energy) بوحدة Kcal/mol و عزم ثنائي القطب Dipole moment بوحدة ديبياي D، الطاقة الالكترونية، مع اعطاء معلومات كاملة عن الذرات المكونة لها.
- وصف انماط الاهتزاز الاساسية وصفا كاملاً بتردداتها ومستوى تماثل كل نمط، ورسم هذه الانماط باسهم بحيث كل سهم يمثل اتجاه حركة الذرة مع الشدة.
- اعطاء القيم الذاتية الطاقية للمدارات مع تماثل كل مستوى ورسم هذه المستويات مع بيان اعلى مدار جزيئي مشغول بالالكترونات  $E_{HOMO}$  واوطأ مدار جزيئي غير مشغول ومقدار قيمته من الطاقة ايضاً  $E_{LUMO}$  ورسم هذه المدارات ببعدين (2D contours) وبثلاثة ابعاد (3D isosurface).
- بيان توزيع كثافة الشحنة Charge density distribution وجهد الكهربائية الساكنة Electrostatic potential ببعدين (2D) وبثلاثة ابعاد (3D).

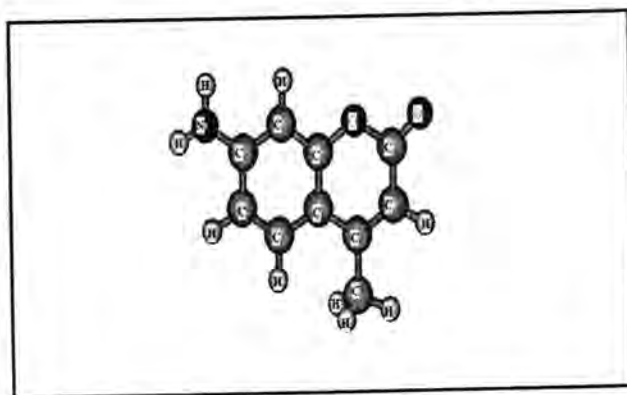
### النتائج والمناقشة

لغرض الحصول على نتائج دقيقة فقد تم اعتماد برنامج شبه تجريبي semiempirical وبطريقة MNDO/PM3، تم حساب الخواص الطيفية لصبغة الكومارين

مأزن

120 للتعرف على بعض المعلومات منها التردد الاهتزازي ومستويات الطاقة الجزيئية المشغولة HOMO والمستويات غير المشغولة LUMO والجهد الكهروستاتيكي مع كثافة التوزيع الشحني وعزوم القصور الذاتية بالإضافة الى عزم ثنائي القطب وذلك من خلال برنامج (Hyperchem7).

ان عدد الذرات المكونة لصبغة الكومارين 120 ( $C_{10}H_9NO_2$ ) هي ( $N=22$ ) وبذلك تكون عدد درجات الحرية ( $3N=66$ ) درجة، وعدد الدرجات للحركة الانتقالية ثلاث درجات، والاهتزازية بحسب القاعدة ( $3N-6$ ) لكونها جزيئة غير خطية هي (60) درجة، ومابقي ثلاث درجات للحركة الدورانية ولقد تم رسم الشكل التركيبي للجزيئة عن طريق برنامج الـ (Hyperchem7) وهو الشكل الهندسي عند حالة الاتزان للصبغة، اي اقل مستوى للطاقة، وبتكرار عملية الافضلية لاحسن وضع هندسي الـ (Optimization) لصبغة الكومارين 120 نحصل على افضل شكل متوازن ومستقر، حيث ان الطاقة الادنى هي المعيار في الشكل المستقر، وكما موضح في الشكل (2).



شكل-2: التركيب الجزيئي لصبغة الكومارين - 120 كما تم رسمها ببرنامج الـ (Hyperchem7)

تم الحصول على بعض الخصائص المهمة المختصرة عن طريق برنامج (Hyper chem) والجدول (2) يوضح أهم قيم هذه الخواص ووحدة القياس لكل منها.

الجدول- 2 : نتائج بعض الخصائص المهمة لصبغة الكومارين 120 المحسوبة ببرنامج الـ (Hyperchem)

Unit وحدة القياس	Magnitude مقدار الكمية	Quantity الكمية
Kcal/mol	-47803.86719	Total Energy الطاقة الكلية
Kcal/mol	-2460.058838	Binding Energy طاقة الربط
Kcal/mol	-259195.75	Electronic Energy الطاقة الالكترونية
Kcal/mol	211391.875	Nuclear Energy الطاقة النووية
Kcal/mol	-50.12277985	Heat of Formation حرارة التكوين
D	5.262	Total Dipole Moment عزم ثنائي القطب الكلي
Kcal/mol/Ang	0.104	Gradient درجة الانحراف

## حساب الترددات الاهتزازية لصبغة الكومارين 120 الليزرية

## Calculation of the Vibrational Frequency of Coumarin 120 Dye Laser

تم حساب الترددات الاهتزازية باستخدام برنامج الـ Hyper Chem. وبطريقة (MNDO-PM<sub>3</sub>) الشبه تجريبية بدلالة العدد الموجي وبوحدة (cm<sup>-1</sup>). ومن ثم حساب الطول الموجي عند كل تردد، ان التردد الاهتزازي للأصرة الكيميائية هو دالة لقوة الأصرة والكتلة المختزلة حسب العلاقة

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

حيث يكون ثابت القوة (K) للأصرة المزدوجة أعلى منه للأصرة المفردة، لقد تم حساب الترددات الاهتزازية للجزيئة ببرنامج الـ Hyper Chem. مع إعطاء بعض الخصائص الطيفية الأخرى مثل شدة كل نمط (Intensity) بوحدة (Km/mol) ونوع التماثل (Symmetry) لكل نمط من أنماط الاهتزازات الأساسية للصبغة، حيث كان أعلى نمط أساسي اهتزازي عند النمط (51A) الذي عدده موجي يساوي (2000.77 cm<sup>-1</sup>) وشدته (260.495 Km/mol)، بينما كان أدنى نمط أساسي اهتزازي عند النمط (47A) الذي عدده الموجي يساوي (1681.63 cm<sup>-1</sup>) وشدته (0.013 Km/mol). والجدول (3) يوضح أهم النتائج التي تم الحصول عليها للترددات الأساسية (Fundamental Frequencies) لصبغة كومارين 120 وقيم كل من الأطوال الموجية المقابلة لها ونوع التماثل وشدته.

جدول-3: الترددات الاهتزازية لصبغة كومارين 120 وقيم كل من الأطوال الموجية و شدة الاهتزاز ونوع التماثل المقابلة لها

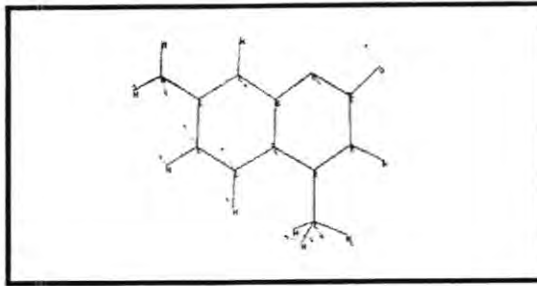
No. Vibration	Intensity(Km/mol)	Wave No.(cm <sup>-1</sup> )	Wavelength(μm)	Symmetry
1	0.846	76.22	131.199	1A
2	0.471	93.95	106.439	2A
3	0.030	147.91	67.608	3A
4	1.231	168.92	59.199	4A
5	1.257	220.06	45.442	5A
6	0.640	245.07	40.804	6A
7	3.622	263.25	37.986	7A
8	6.143	278.13	35.954	8A
9	1.099	325.25	30.745	9A
10	3.032	394.12	25.372	10A
11	4.479	412.56	24.238	11A
12	0.322	455.20	21.968	12A
13	2.124	487.29	20.52	13A
14	0.366	542.25	18.44	14A
15	1.757	546.48	18.298	15A
16	4.940	570.69	17.52	16A
17	8.003	598.56	16.706	17A
18	4.421	634.36	15.763	18A
19	0.980	702.08	14.243	19A
20	1.671	743.50	13.449	20A
21	4.159	777.02	12.86	21A
22	24.164	840.01	11.90	22A
23	6.254	858.18	11.65	23A
24	21.051	894.25	11.18	24A
25	71.439	903.89	11.06	25A
26	111.493	944.63	10.586	26A
27	21.401	982.29	10.18	27A
28	4.243	986.20	10.13	28A

مازن

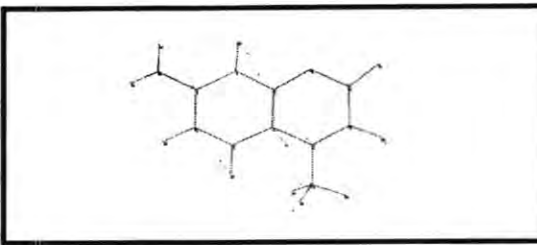
29	12.872	1018.62	9.817	29A
30	6.938	1021.60	9.788	30A
31	4.785	1070.16	9.344	31A
32	1.388	1104.44	9.05	32A
33	2.295	1157.63	8.638	33A
34	3.438	1183.39	8.45	34A
35	2.629	1215.02	8.23	35A
36	7.063	1236.53	8.08	36A
37	19.852	1253.62	7.976	37A
38	4.508	1347.14	7.423	38A
39	3.073	1362.44	7.339	39A
40	54.805	1392.17	7.183	40A
41	0.913	1395.65	7.165	41A
42	10.963	1406.26	7.111	42A
43	1.410	1450.64	6.893	43A
44	100.306	1515.36	6.599	44A
45	18.828	1576.10	6.344	45A
46	2.476	1637.01	6.108	46A
47	0.013	1681.63	5.946	47A
48	21.215	1752.18	5.707	48A
49	174.533	1794.21	5.573	49A
50	52.913	1840.66	5.432	50A
51	260.495	2000.77	4.99	51A
52	4.586	3041.13	3.288	52A
53	21.440	3052.16	3.276	53A
54	12.727	3059.48	3.268	54A
55	27.465	3067.50	3.259	55A
56	0.987	3068.86	3.258	56A
57	0.147	3073.64	3.253	57A
58	1.657	3166.54	3.158	58A
59	0.073	3419.64	2.924	59A
60	2.877	3534.25	2.829	60A

ولقد تم وصف 60 نمطا" لصبغة الكومارين 120 حسب القاعدة (6-3N) مع تبيان اتجاهات الحركة الموضحة بالأسهم ونوع النمط فيما إذا كان التواء أو مد أو ارتجاج أو انحناء....الخ من الأنماط والشكل (3) يبين بعض من هذه الأنواع من وصف الأنماط الجزيئية.

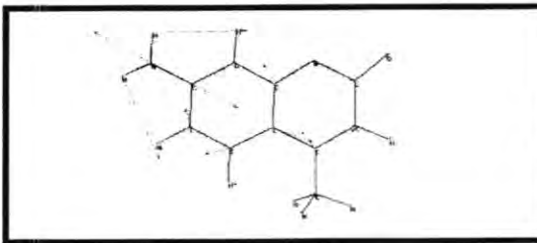




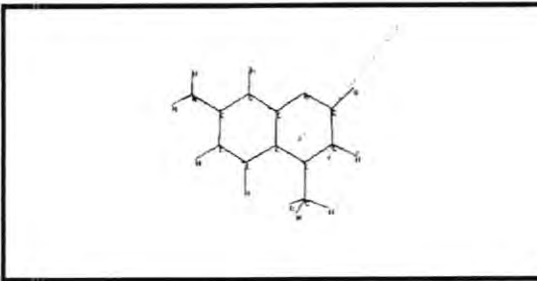
Normal Mode: 1  
Frequency= 76.22  $\text{cm}^{-1}$   
Intensity= 0.846 km/mol  
Symmetry= 1A



Normal Mode: 20  
Frequency= 743.50  $\text{cm}^{-1}$   
Intensity= 1.671 km/mol  
Symmetry= 20A



Normal Mode: 47  
Frequency= 1681.63  $\text{cm}^{-1}$   
Intensity= 0.013 km/mol  
Symmetry= 47A



Normal Mode: 51  
Frequency= 2000.77  $\text{cm}^{-1}$   
Intensity= 52.913 km/mol  
Symmetry= 51A

شكل- 3: بعض انماط الاهتزاز لصبغة كومارين 120

ولقد تم توضيح اتجاهات الحركة الاهتزازية بالأسهم، حيث ان طول السهم بالنسبة الى سهم اخر في نفس النمط يبين المقدار الذي تزاوح بها الذرة المرتبطة بها عند اية لحظة نسبة الى الإزاحة الأنية للذرة المرتبط بها السهم الأخر، وتعد أطوال الأسهم نسبة الى المسافات مابين الذرات في الرسوم مبالغاً فيه. وان المسافات مابين الذرات، وزوايا الأصرة وما يتعلق بالإحداثيات الداخلية للجزيئة لها علاقة بتحليل موجهاات الإزاحة للإشكال الاعتيادية. ومن خلال الجدول (3) تم حساب الاهتزازات المدية (stretching) لصبغة كومارين 120 وعددها (21) اما الاهتزازات الانحنائية (bending) للصبغة فكان عددها (39).

مازن

## القيم الذاتية للطاقة للمدارات الجزيئية لصبغة الكومارين 120

### Coumarin-120 Dye Orbital Eigen Values

لقد تم حساب ودراسة بعض الخواص الطيفية الأخرى لصبغة كومارين 120 من خلال برنامج الـ (Hyper Chem.) ومنها إيجاد قيم الطاقة للمدارات (Orbitals) المشغولة وغير المشغولة بالالكترونات. بعد الحصول على أفضل وضعية للجزيئة عندما تمتلك أقل طاقة كلية وتكون أكثر استقراراً (عند مسافة التوازن) تم رسمها في برنامج الـ (Hyper Chem.) وباختيار طريقة (MNDO-PM<sub>3</sub>) نحصل على المدارات الجزيئية والقيمة الطاقة لكل مدار وتمثل كل مستوى، ولقد كان عدد المدارات المشغولة بالالكترونات (Homo) 33 مدار، و28 مدار غير مشغولة بالالكترونات (Lomo)، والشكل (4) يمثل مخططاً يوضح بعض أهم الخصائص التي حصلنا عليها.

Symmetry	Energy (eV)	
40A	2.377451	
39A	2.168926	
38A	1.78797	
37A	1.76071	
36A	0.4558068	
$E_G = 9.2491993 \text{ eV}$		
33A	-8.79339	1L
32A	-9.71065	1L
31A	-10.44529	1L
30A	-11.07277	1L
29A	-11.81168	1L

LUMO

HOMO

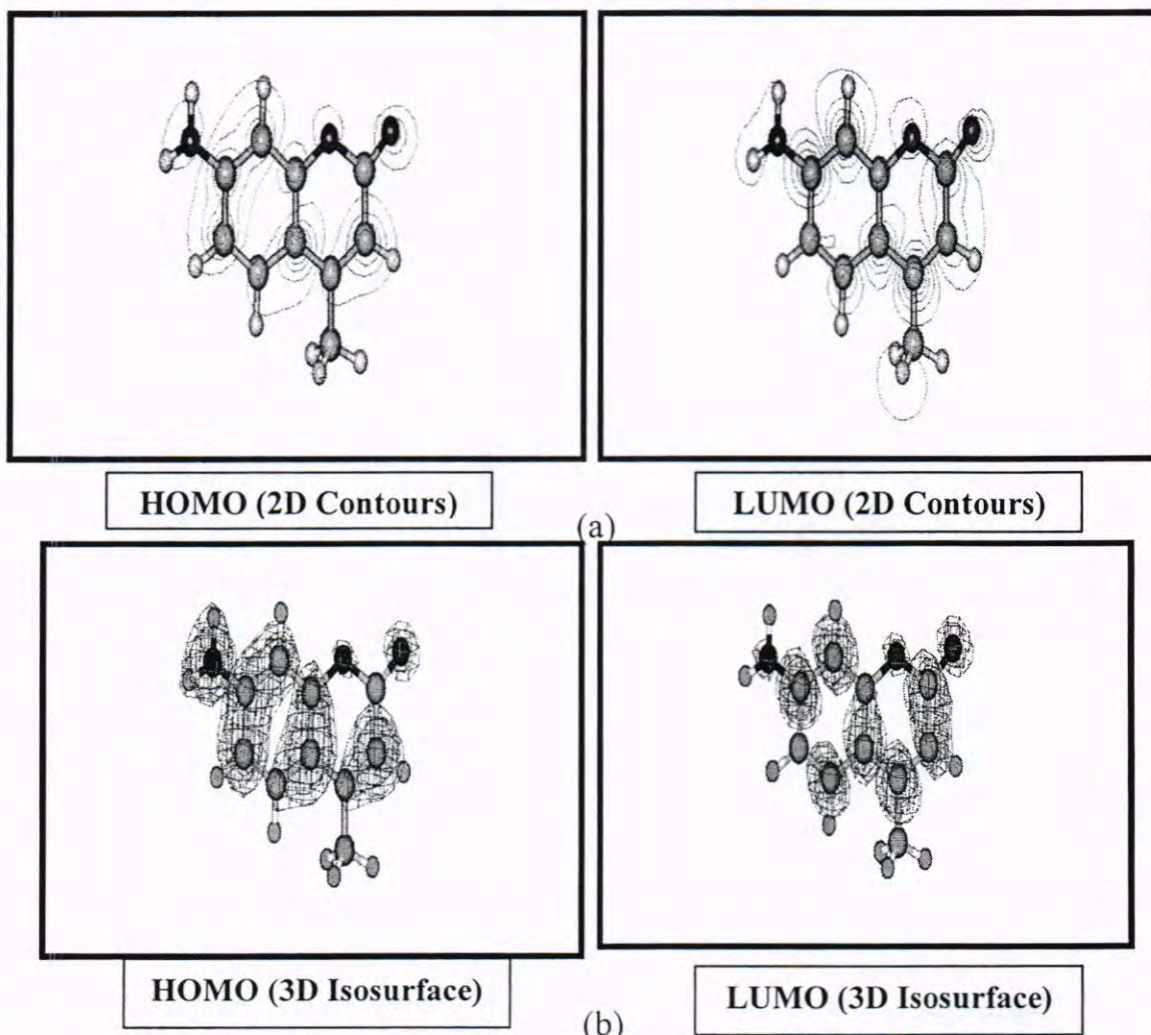
شكل 4- المستويات الطاقة لصبغة كومارين 120 وتوضيح أعلى مدار جزيئي مشغول  $E_{HOMO}$  وأوطأ مدار غير مشغول  $E_{LUMO}$  وتمثل كل مدار

نلاحظ من الشكل (4) ان عدد المدارات المشغولة بالالكترونات 33 مداراً وان اول مستوي يمثل أعلى مدار جزيئي مشغول (HOMO) ومقدار طاقته ( $E_{HOMO} = -8.79339 \text{ eV}$ ) اما تماثل هذا المستوي كان 33A. أما المدارات غير المشغولة بالالكترونات 28 مدار وان اول مدار يمثل اوطأ مدار جزيئي غير مشغول (LUMO) ومقدار طاقته ( $E_{LUMO} = 0.4558069 \text{ eV}$ ) وتماثله 36A. ان المدارات المشغولة تحتوي على الكترونين يختلفان بالاتجاه (البرم-Spin). وعند اخذ القيمة المطلقة لطاقة المدار المشغول نحصل على جهد التأين (Ionization Potential) ويرمز له بـ (I.P) وقيمته ( $I.P = 8.7933925 \text{ eV}$ ). ويمكن معرفة مقدار فجوة الطاقة (Energy Gap) لصبغة الكومارين 120 وذلك من حساب الفرق بين طاقة ادنى مدار جزيئي غير مشغول وطاقة اعلى مدار جزيئي مشغول وكما يلي:

$$E_g = E_{LUMO} - (-E_{HOMO})$$

$$E_g = 0.4558068 - (-8.7933925) \Rightarrow E_g = 9.2491993 \text{ eV}$$

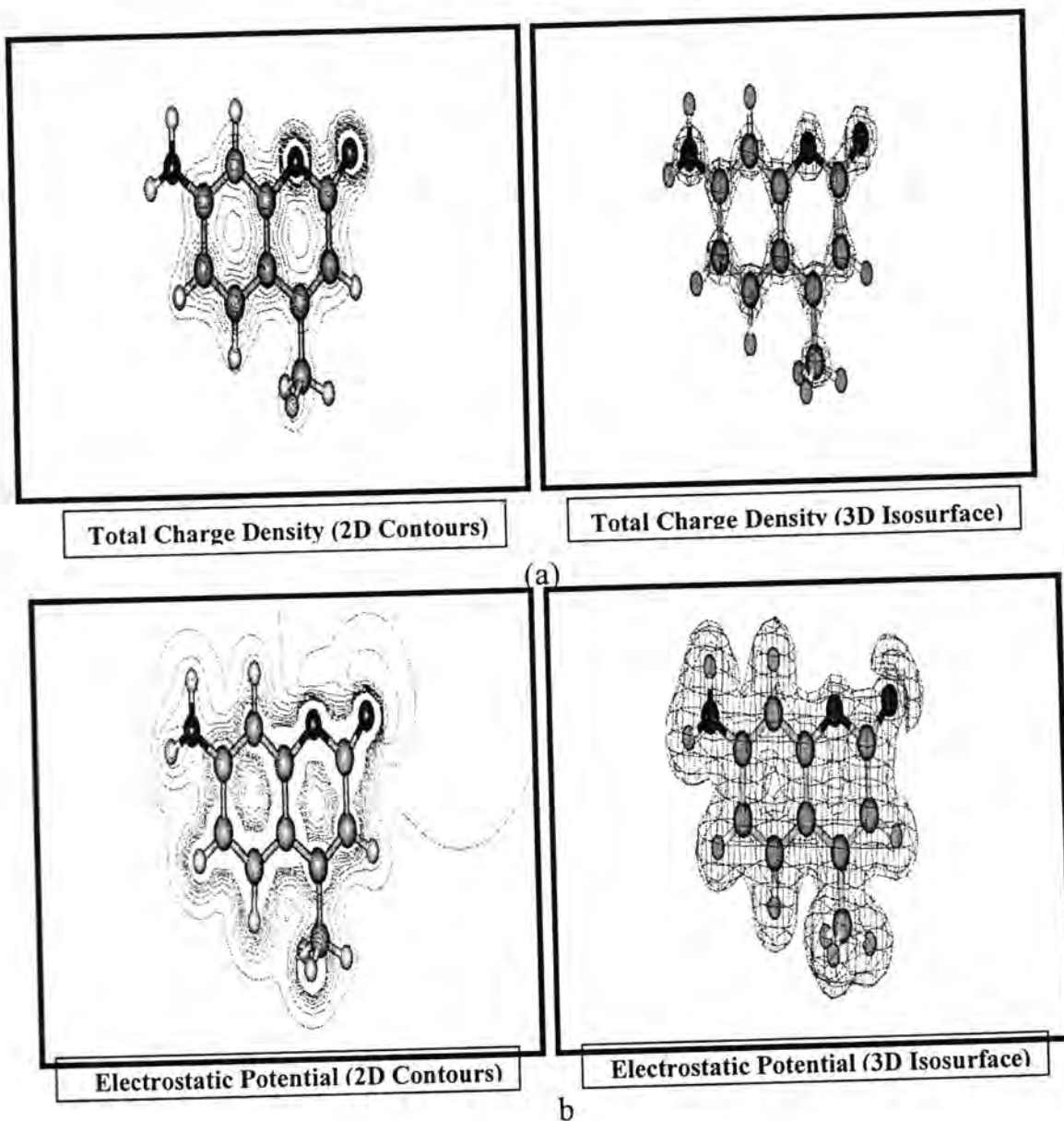
نجد ان مقدار فجوة الطاقة مساوياً لـ ( $9.2491993 \text{ eV}$ ). لقد تم توضيح هذه المدارات ببعدين (2D) شكل (5a) وبثلاثة أبعاد (3D) شكل (5b) ومن خلال برنامج الـ Hyper Chem.



شكل 5- a: أعلى مدار جزيئي مشغول بالالكترونات (HOMO) وأدنى مدار غير مشغول (LUMO) ذات بعدين b: أعلى مدار جزيئي مشغول بالالكترونات (HOMO) وأدنى مدار غير مشغول (LUMO) ذات ثلاثة أبعاد

مازن

كما تم ايجاد خصائص طيفية أخرى وبنفس البرنامج لصبغة الكومارين 120 منها كثافة الشحنة الكلية (Total Charge Density) للصبغة، وكذلك جهد الكهربية الساكنة (Electrostatic Potential) وأيضاً ببعدين (2DContours) وبثلاثة أبعاد (3DIsosurface)، كما في الشكلين (6a) و(6b) على التوالي.



شكل-6: a: توزيع كثافة الشحنة الكلية لصبغة الكومارين 120 ببعدين وبثلاثة أبعاد  
b: جهد الكهربية الساكنة لصبغة الكومارين 120 ببعدين وبثلاثة أبعاد

نلاحظ من الشكل (6a) ان كثافة الشحنة الالكترونية تتمركز حول ذرة الاوكسجين من صبغة كومارين 120 وذلك لامتلاك ذرة الاوكسجين كهروسلبية اكبر من ذرة الكربون ومن الجزئية باجمعها حيث تزداد الكهروسلبية للذرات بزيادة العدد الذري. اما شكل (6b) يوضح جهد الصبغة على شكل رسومات كنتورية ببعدين (2D Contours) او على هيئة أشكال مجسمة بثلاثة أبعاد



(3D Isosurface)، حيث ان الجهد يتأثر بتوزيع الالكترونات في الصبغة هذا التوزيع الذي يحصل بعد تداخل الاوربتالات الذرية وتكوين الاوربتالات الجزيئية فتظهر الكثافة الالكترونية على شكل خطوط ويكون توزيع هذه الخطوط منتظما كما يظهر من الشكل (6) أن كثافة الشحنة تمتد من ذرة الى أخرى باستمرار.

#### الاستنتاجات

ان صبغة الكومارين 120 التي تمتلك 60 نمط اهتزازي بحسب القاعدة (3N-6) والمعروفة مسبقا، حيث كان اعلى نمط اهتزازي عند النمط (51A) الذي عدده الموجي يساوي  $(2000.77\text{cm}^{-1})$  وشدته  $(260.495\text{ km/mol})$  الذي يمثل اهتزاز الاصرة (O-C)، بينما كان ادنى نمط اهتزازي عند النمط (47A) الذي عدده الموجي يساوي  $(1681.63\text{cm}^{-1})$  وشدته  $(0.013\text{Km/mol})$  الذي يمثل اهتزاز الاصرة (N-C) كذلك نستنتج بأن الاصرة ما بين الذرات العالية الكهروسلبية (O-C) تكون فعالة في امتصاص قيم مختلفة من الطاقة بالاضافة الى ان الحركة الاهتزازية تكون مميزة بشدة فالانتقال الذي يصاحبه تغيرا كبيرا في قطبية الجزيئة يعطي امتصاص ذو شدة عالية والعكس صحيح، ان قيمة عزم ثنائي القطب للصبغة كانت  $(5.262\text{D})$  والتي تتوافق مع [16] حيث كانت  $(6.623\text{D})$ . كان عدد الاهتزازات المدية (21) اهتزاز اما الاهتزازات الانحنائية فكانت (39). بينما كانت عدد المدارات المشغولة بالالكترونات (HOMO) 33 مدارا اما المدارات الغير مشغولة بالالكترونات (LOMO) فكانت 28 مدارا، لاحظنا ان كثافة الشحنة الالكترونية متمركزة حول ذرة الاوكسجين من صبغة الكومارين (C120) وذلك لامتلاك ذرة الاوكسجين كهروسلبية اعلى من ذرة الكربون ومن الجزيئة بأجمعها.

#### المصادر

1. بيللا آ. لينكيل، ترجمة فاروق عبودي قيصر، " الليزرات"، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، 1984م.
2. R.D. Singh, A.K. Sharma, N.V. Unnikrishnan and D. Mohan, J. Mod. Opt. Vol.37, No.3, PP. 419, (1996).
3. R.M.Fukuda and K.Mlto, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.39.,(2000).
4. Wolfgang Demtoroder, "Laser Spectroscopy, Basic Concpets and Instrumentation", Springer Verlage, Berline, Newyork, Vol.5, (1981).
5. F.L.Schafer "Dye Laser, Topics in Applied Physics , 2<sup>nd</sup> Ed. Springer, Berlin, (1977).
6. F.P. Schafer Topics in App. Phys., "Dye Laser, 22 years", ed. by (Michael Stuke), Vol.70, Springer Verlage, Berline, Heidellberg, Chap2, (1992).
7. F.P. Schafer, "Dye Lasers", Topics in Applied Physics Springer-Verlag, Berlin, Vol.1, (1973).
8. N.P. Ernisting, M. Kashke, J. Kleinschmidt, K.H. Drexhage, and V. Huth, Chem. Phys., Vol.122, PP.431, (1988).
9. U. Brachmann, Lambdachrome Laser Dyes, 3<sup>rd</sup> ed., goettingen, germany, (2000).
10. K.T. Priyadarsin, D.B. Naik and P.N. Moorthy, Chem. Phys., Lett, 148, 572, (1988).

مازن

11. A.K., KAIS EBRAHEEM, "Quantum Chemistry and Molecular Spectroscopy " Department of chemistry college of science University of Basrah ,press 1311.,(1988).
12. C.N, Banwall "Fundamental of Molecular Spectroscopy" Mc Graw-Hill Company (1983).
13. M .N., Dr. Layla Saleem "Spectroscopy"; AL-Musel University, (1985).
14. G.Herzberg, The Spectra and Structures of Simpel Free Radicals. An Introduction to Molecular Spectroscopy, Cornell University Press, Ithaca, New York, (1971).
15. P.Gans, Vibrating Molecules: An Introduction to the Interpretation of Infrared and Raman Spectra, Chapman and Hall, London, (1971) .
16. H. Abbas, "First principle calculation of the photophysical properties of silyated coumarins 120 and 151 ", computational and theoretical chemistry, 992, (2012), 55-58.



## تنشيط البنتونايت العراقي: الجزء الرابع-التنشيط بحوامض مختلفة

علوان نصيف جاسم و زهير خضير عباس و زينب إسماعيل عباس و زهراء علي عبد الأمير و أنوار شاكر إبراهيم و قريش عباس كاظم  
مركز البحوث الكيميائية والبتروكيميائية-الهيئة العامة للبحث والتطوير الصناعي-وزارة الصناعة والمعادن العراقية  
تاريخ تقديم البحث 2012/3/13 - تاريخ قبول البحث 2012/11/6

### ABSTRACT

In this work, a calcium bentonite clay from west desert of Iraq (Wadibashirah) was activated with different concentrations of  $H_2SO_4$ ,  $HCl$  and  $HAc$  at  $25^\circ C$  and  $98^\circ C$  for four hours. Some cations (Al, Mg, and Fe) were removed from natural bentonite as a result of acid activation. XRD and FT-IR curves were obtained before and after acid treatment. Specific surface area (S) and specific pore volume (V) were determined by BET method. Also, bentonite samples were observed by atomic Force microscope (AFM), and by optical scanning microscope (OSM).

The experimental results indicate that bentonite treated with  $H_2SO_4$  at  $98^\circ C$  shows the highest specific surface area and specific pore volume comparing with  $HCl$  and acetic acid ( $HAc$ ) treated samples. Besides, the results clearly show that bentonite retains its crystalline structure after acids treatment and within the conditions of this experiment.

### الخلاصة

استخدم في هذا البحث البنتونايت الكالسيومي العراقي من وادي ترسبات بشيرة في الصحراء الغربية من العراق. تم تنشيط هذا البنتونايت بحوامض الكبريتيك، الهيدروكلوريك، وحامض الخليك بتركيزات مختلفة ودرجات حرارية تتراوح من درجة حرارة الغرفة إلى درجة  $98^\circ C$  ولمدة أربع ساعات وبفعل تأثير الحوامض ازيلت بعض الايونات الموجبة من البنتونايت مثل  $Fe$ ،  $Mg$ ،  $Al$ . اخذت اطيفاء حيود الأشعة السينية (XRD) والأطيفاء الاهتزازية (FT-IR) إضافة إلى قياس الحجم الحبيبي بطريقة ليزيرية للبنتونايت قبل وبعد التنشيط الحامضي. كذلك حصلنا على المساحة السطحية النوعية (S) وحجم المسام النوعي (V) للعينات بطريقة BET. وتمت دراسة طبيعة السطح وشكل دقائه بواسطة المجهر الماسح الضوئي ومجهر القوة الذرية (AFM). بعد دراسة وتحليل النتائج تبين إن البنتونايت يبقى محتفظاً بمعظم تركيبه البلوري عند تلك الظروف، ومع حامض الكبريتيك حصلنا على أعلى قيم للمساحة السطحية النوعية ولحجم المسام النوعي.

### المقدمة

يستخدم البنتونايت في حفر آبار البترول، مادة رابطة لرمال القوالب السباكة، وفي تعدين خامات الحديد وكمزيج للشوائب والملوثات وقصر ألوان الزيوت النباتية والصناعية وتحسين نوعيتها وكذلك في أعمال الهندسة المدنية. يستعمل البنتونايت أيضاً في صناعة العقاقير الطبية ومواد التجميل للأنواع البيضاء منه. يمكن تحسين خواص البنتونايت المستخدم في الصناعة، وبشكل كبير، بتنشيطه بالحوامض المعدنية المختلفة<sup>(1,2)</sup>. تزيد هذه العملية من المساحة السطحية الفعالة وحجم المسام والتي تحسن بدورها كفاءة البنتونايت على الامتزاز<sup>(3-5)</sup>.

إن أطياف البنتونايت تحتوي على السمكتايت (Smectite) وغالباً ما تسمى بالمونتوريلونايت. تمتاز بلورة المونتوريلونايت بتركيبها الطبقي وتتكون من طبقات (2:1) والتي تتكون من طبقتين من السيلكا تتراهدرال بينهما طبقة الألومينا اوكتاهيدرال<sup>(6,7)</sup>. وحسب طبيعة بلورة المونتوريلونايت تحدث فيها عمليات استبدال للايونات الموجبة كاستبدال  $Al^{+3}$  بدل  $Si^{+4}$  في طبقة التتراهدرال أو استبدال  $Mg^{+2}$  بدلاً عن  $Al^{+3}$  في طبقات الاوكتاهيدرال. ونتيجة لذلك لا تكون متعادلة كهربائياً بل هي سالبة الشحنة وتعادل هذه الشحنة السالبة بايونات موجبة قابلة للاستبدال. وفي الواقع هذا هو اصل مبدأ سعة تبادل الايونات الموجبة (CEC). ولسعة تبادل الايونات الموجبة الأثر الكبير على خصائص واستخدامات أطياف البنتونايت. ينشط البنتونايت الكالسيومي الطبيعي بالحوامض المعدنية المختلفة، مثل حامض الكبريتيك وحامض

الهيدروكلوريك لتحسين خواصه بشكل عام ولتهيئته لاستخدامات صناعية متعددة. تزيد هذه العملية من قابلية البنتونايت على الامتزاز وعلى قصر ألوان الزيوت النباتية والصناعية وتحسين خصائصها وإزالة الشوائب منها<sup>(8-12)</sup>. ويمكن إجمال التغيرات التي تحدثها عملية التنشيط للبنتونايت الكالسيومي بحامض الكبريتيك أو حامض الهيدروكلوريك بالآتي:

1. زيادة المساحة السطحية النوعية للبنتونايت (المقاسة بطريقة BET) وتقل بزيادة تركيز الحامض.
2. زيادة قابلية الطين على إزالة الألوان والملوثات.
3. يتأثر التركيب البلوري للمونتوريلونايت مع زيادة تركيز الحامض ولكنه لا يتحطم كلياً<sup>(13,14)</sup>.

إن أهم العوامل التي تؤثر على خصائص البنتونايت عند التنشيط الحامضي هي درجة الحرارة، نسبة البنتونايت إلى الحامض، الفترة الزمنية للبقاء مع الحامض إضافة إلى تركيز الحامض وحجم دقائق البنتونايت مع طريقة غسله وتجفيفه. تفتح الحوامض التركيب البلوري للبنتونايت فتنتقل إلى المحلول الحامضي أيونات  $Mg^{+2}$  و  $Al^{+3}$  المنحلة من طبقات 2:1.

كذلك تستخدم حوامض معدنية أخرى مثل حامض الفسفوريك وحامض النتريك في عملية التنشيط هذه<sup>(15)</sup>. واستخدم كذلك حامض الخليك لنفس الغرض<sup>(16)</sup>. وعومل أيضاً البنتونايت المنشط مع بيروكسيد الهيدروجين للحصول على نتائج أفضل<sup>(17)</sup>. يحتاج البنتونايت إلى معالجة فيزيائية أو كيميائية، تبادل الأيونات وإلى التنشيط الحامضي لتحسين خواصه السطحية. إن التعامل الحامضي هو أحد أفضل الطرق المستخدمة لتحقيق صفات تركيبية مرغوبة في صناعة قصر زيوت الطعام وغيرها<sup>(18)</sup>.

إثناء التعامل مع الحامض تستبدل الأيونات الموجبة بين طبقات المونتوريلونايت بأيونات الهيدروجين ويتبع ذلك تحطم جزئي لطبقات الألمنيوم اوكتاهيدرال والسيلكون تتراهيدرال يعقبه انحلال الأيونات الموجبة من التركيب البلوري. إن هذه العملية تسبب تحطم الطبيعة الطبقة للبنتونايت وتؤدي بالتالي إلى زيادة المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي والتي بدورها تزيد من خاصية إزالة الألوان<sup>(19)</sup>.

تستهلك سنوياً مئات الآلاف من الأطنان المنشطة حامضياً لتنقية الزيوت النباتية والحيوانية والشحوم وإزالة ألوانها. ويحتاج البنتونايت إلى فحوصات تخصصية أكثر لبيان ملائمة لكل نوع من أنواع الزيوت أو المركبات الهيدروكربونية والمذيبات الأخرى التي نتعامل معها<sup>(20)</sup>. يختص بحثنا هذا بتنشيط البنتونايت العراقي- من الصحراء الغربية- بحوامض معدنية وعضوية بتراكيز ودرجات حرارية متعددة. والهدف إيجاد انسب ظروف التنشيط لتحسين صفات هذا البنتونايت لإغراض صناعية. ونود الإشارة إلى انجاز ثلاثة اجزاء من هذا البحث يختص الأول بالتنشيط القاعدي للبنتونايت<sup>(21)</sup> ومن ثم التنشيط بحامض الكبريتيك<sup>(22)</sup> والتنشيط الحراري للبنتونايت<sup>(23)</sup>.

### المواد و طرائق العمل

إن البنتونايت المستخدم في هذا البحث تم جلبه من موقع وادي بشيرة/الصحراء الغربية من العراق وهو من النوع الكالسيومي والمطحون لغاية (-75) مايكرون وتم شراؤه من الشركة العامة للمسح الجيولوجي والتعدين. والجدول (1) يبين التركيب الكيميائي لهذا البنتونايت. لإغراض هذا البحث تم تجفيف كمية مناسبة من البنتونايت في فرن كهربائي بدرجة  $105^{\circ}C$  ولمدة 24 ساعة وكانت نسبة الفقدان بالوزن 6% بسبب فقدان الرطوبة. استخدمنا العديد من الحوامض العضوية والمعدنية مثل حامض الخليك وحامض الكبريتيك وحامض الهيدروكلوريك (من شركة SDS).

### التنشيط بحامض الكبريتيك

تم تنشيط البنتونايت الكالسيومي بحامض الكبريتيك وبتراكيز 20% و 50% حجماً ووفق الخطوات التالية<sup>(16,24)</sup>.



أضفنا 500 سم<sup>3</sup> من حامض الكبريتيك بتركيز 20% حجماً إلى 20 غم من البنثونايث المجفف في ورق مخروطي بحجم 1000 سم<sup>3</sup> مع التحريك المستمر بواسطة محرك مغناطيسي لمدة أربع ساعات وبدرجة 98°م<sup>0</sup> وتحت المكثف العاكس. بعدها ترك المحلول ليبرد ثم رشح تحت ضغط مخلخل وغسل بالماء المقطر عدة مرات للتخلص التام من الكبريتات وتأكدنا من ذلك بفحص كلوريد الباريوم. جفف الراسب الناتج لمدة 24 ساعة في فرن كهربائي بدرجة حرارة 105°م<sup>0</sup> وحفظ في المجفف الزجاجي لحين إجراء الفحوصات عليه. أعيدت نفس الخطوات أعلاه باستخدام حامض الكبريتيك بتركيز 50% حجماً.

#### التشيط بحامض الهيدروكلوريك

أضفنا 200 سم<sup>3</sup> من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 3.6% حجماً إلى 20 غم من البنثونايث المجفف مع التحريك المستمر لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة وبوجود المكثف العاكس. يرشح المحلول تحت ضغط مخلخل ويغسل الراسب عدة مرات بالماء المقطر للتخلص من ايونات الكلورايد وتأكدنا من ذلك باستعمال محلول نترات الفضة. جفف الراسب في فرن كهربائي بدرجة حرارة 105°م<sup>0</sup> لمدة 24 ساعة وحفظ في المجفف الزجاجي لحين إجراء الفحوصات عليه. أعيدت نفس الخطوات أعلاه باستخدام حامض الهيدروكلوريك بتركيز 18% حجماً.

#### التشيط بحامض الخليك

استعملنا 20 غم من البنثونايث المجفف مع 500 سم<sup>3</sup> من حامض الخليك بتركيز 1 مولاري وبففس خطوات حامض الهيدروكلوريك السابقة.

### النتائج و المناقشة

#### فحص أطياف امتصاص الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)

تم إجراء فحص امتصاص الأشعة تحت الحمراء بجهاز (FT-IR Shimadzu 4400) لكافة النماذج المستخدمة في هذا البحث والشكل (1) يمثل الأطياف الاهتزازية للبنثونايث الطبيعي المجفف.

إن اهتزازات مط الأواصر Si-O و Al-O تقع في منطقة الطيف ما بين (700-1200 cm<sup>-1</sup>)، في حين إن الأطياف الاهتزازية لانحناء تلك الأواصر تقع ما بين (400-600 cm<sup>-1</sup>). إن منطقة الامتصاص الاهتزازية عند 627 cm<sup>-1</sup> تعزى إلى اهتزازات المط لمجاميع OH المرتبطة بتركيب البنثونايث. وإن حزمة الامتصاص بالقرب من 1039 cm<sup>-1</sup> ناتجة عن اهتزازات المط لمجاميع Si-O بينما حزم الامتصاص الاهتزازية في منطقة 524 cm<sup>-1</sup> ترتبط بانحناء الأصرة Al-O-Si.

وللماء في المونثوريونايث طيف امتصاص عريض عند 3421 cm<sup>-1</sup> يقابل طاقات المط في جزيئات الماء. يمكن الاستنتاج من ذلك إن طور المونثوريونايث هو الطور الغالب في البنثونايث العراقي المستخدم في هذا البحث. تتفق هذه النتائج مع الأدبيات المنشورة (25,26).

كذلك من ملاحظة الشكل (1) تظهر عندنا واضحة الأطياف الاهتزازية لكاربونات الكالسيوم عند 1429 Cm<sup>-1</sup> وكذلك في المجموعة ما بين (2300-2500 cm<sup>-1</sup>) ونتيجة لذوبان الكاربونات بالحامض تختفي جميع قمم كاربونات الكالسيوم مع جميع أنواع الحوامض المستخدمة وبكل تراكيزها وكما يتضح من الشكل (2) كذلك تذيب هذه الحوامض معدن الحديد ويتضح ذلك من نقصان تردداته المعروفة عند (850-900 cm<sup>-1</sup>) وتذيب هذه الحوامض نسباً مختلفة من بلورات المونثوريونايث محررة سليكا غير متبلورة والتي يظهر وجودها واضحاً من خلال زيادة الشدة في الترددات (470 Cm<sup>-1</sup>, 1120 cm<sup>-1</sup>, 798 cm<sup>-1</sup>).

#### فحص حيود الأشعة السينية

استعملنا جهاز حيود الأشعة السينية نوع (XRD Shimadzu 6000) لإغراض هذا البحث. عند دراسة أطياف حيود الأشعة السينية للبنثونايث الطبيعي لاحظنا وجود المركبات والأطوار الآتية:

الموننتوريلوناييت (M)، الكرسوبلايت (G)، الكوارتز (Q)، وكاربونات الكالسيوم. كانت قمم (M) عند قيم  $2\theta$  الأتية (34.5, 20.8, 5.5) وقمة الكرسوبلايت (G) عند (36.5, 20.75)  $2\theta$  ويمكن ملاحظة ذلك من الشكل (3) وهذه النتائج مطابقة لما وجدناه بالأديبات المنشورة<sup>(29)</sup>

عند معاملة البنتونايت بحامض الهيدروكلوريك 3.6% في درجة حرارة الغرفة بقيت المركبات (Q, G, M) موجودة مع انخفاض ملحوظ في قمم كاربونات الكالسيوم بسبب تفاعل الكاربونات مع الحامض (الشكل 4). وحصلنا على نتيجة متشابهة عند تنشيط البنتونايت بالحوامض الأخرى (حامض الخليك وحامض الكبريتيك) وبتركيز مختلفة.

#### فحص الحجم الحبيبي للبنتونايت وطبيعة سطحه

استخدمنا جهاز (Particle size analyzer) نوع (Shimadzu sold-2101) لإيجاد معدل الحجم الحبيبي للبنتونايت بطريقة ليزرية. والشكل (5) يبين طريقة إيجاد معدل الحجم الحبيبي للبنتونايت الطبيعي ونسب توزيعه. لاحظنا نتيجة التنشيط الحامضي ازدياد حجم دقائق البنتونايت بشكل ملحوظ وكما في الجدول (2). يمكن إن تعزى الزيادة الواضحة في حجم دقائق البنتونايت هنا إلى امتصاص البنتونايت للماء إضافة إلى انتشار الماء بين طبقات بلورة الموننتوريلوناييت وأيدت ذلك صور المجهر الضوئي الماسح (لم تظهر هنا) وحسابات d001 من أطيايف حيود الأشعة السينية إذ ازدادت قيمة d001 من  $13.3 \text{ \AA}$  للبنتونايت الطبيعي إلى  $14.4 \text{ \AA}$  للبنتونايت المعامل مع حامض الهيدروكلوريك بتركيز 3.6%. والصورة في الشكل (6) أخذت بواسطة المجهر الضوئي الماسح نوع (Nikon Eclipse.ME) تبين التركيب المسطح لدقائق البنتونايت الطبيعي.

استعملنا مجهر القوة الذرية (AFM) نوع AA300 SCANNING PROBE MICROSCOPE من شركة Agnstrom Advanced Inc. لدراسة طبيعة وإبعاد دقائق البنتونايت المستخدم في بحثنا هذا. والشكل (7) صورة تمثل طبيعة عدد محدد من دقائق عالق البنتونايت المرسبة على المايكا المحضرة حديثاً مع المخطط الجانبي لإبعاد الدقائق المؤشرة بالخط المنقط من الصورة أعلاه. ومنه تتضح إن إبعاد عالق دقائق البنتونايت تتراوح من (150\*25 nm) للصغيرة وإلى (400\*40 nm) للكبيرة إن هذه الدقائق تكونت نتيجة لالتصاق صفائح الموننتوريلوناييت بنسب متفاوتة<sup>(30)</sup>.

عموماً إن مجهر القوة الذرية تقنية حديثة نسبياً ويمكن استخدامه لأخذ صور ثلاثية الأبعاد ولا يحتاج إلى طرق معقدة لتحسين العينات للفحص ويمكن الفحص في الهواء وبدرجة حرارة الغرفة وبدقة تفوق أحياناً دقة المجهر الماسح الإلكتروني<sup>(31)</sup>.

#### فحص المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي

يعتبر هذا الفحص من الفحوصات الأساسية والمحورية في هذه الدراسة. تمثل المساحة السطحية النوعية المساحة الكلية للسطح الخارجي للدقائق مع مساحات طبقاتها الداخلية. تقاس المساحة السطحية النوعية من ايزوثرومات امدصاص غاز النتروجين على مسحوق البنتونايت بدرجة 77K بطريقة BET. واستعملنا جهاز (Surface Area Analyzer) لإيجاد المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي لنماذج البنتونايت المختلفة.

من نتائج تلك الفحوصات لاحظنا زيادة واضحة في المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي عند معاملة البنتونايت الكالسيومي بحامض الكبريتيك بتركيز 50% vol. و 20% vol. أكثر من البنتونايت المعامل بحامض الهيدروكلوريك 3.6% أو 18% وحامض الخليك 1M. يدل ذلك على التأثير القوي لحامض الكبريتيك على البنتونايت الطبيعي بسبب ذوبان كاربونات الكالسيوم والحديد والمغنيسيوم مع انفتاح نسبة من التركيب البلوري للموننتوريلوناييت على زيادة المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي للبنتونايت المنشط (جدول 3). وأكدت هذه النتائج فحوصات الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) وحيود الأشعة السينية إضافة إلى التحليل



الكيميائي لنماذج البنتونايت وللراشح الناتج بعد عملية التنشيط. إن هذه النتائج تتفق مع الأدبيات المنشورة<sup>(32)</sup> والتي سبق وان اشرنا إليها.

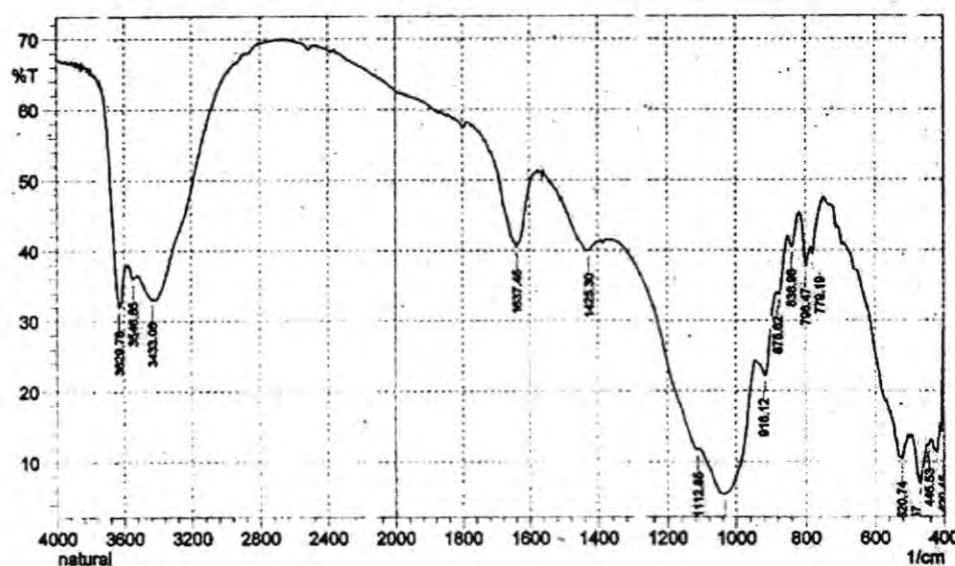
ويتضح أيضا من الجدول (3) إن التنشيط بحامض الكبريتيك وبالتراكيز التي استخدمناها أعطانا أفضل النتائج في هذه الدراسة إلا أنها غير نمطية نسبة إلى تركيز حامض الكبريتيك.

#### الاستنتاجات

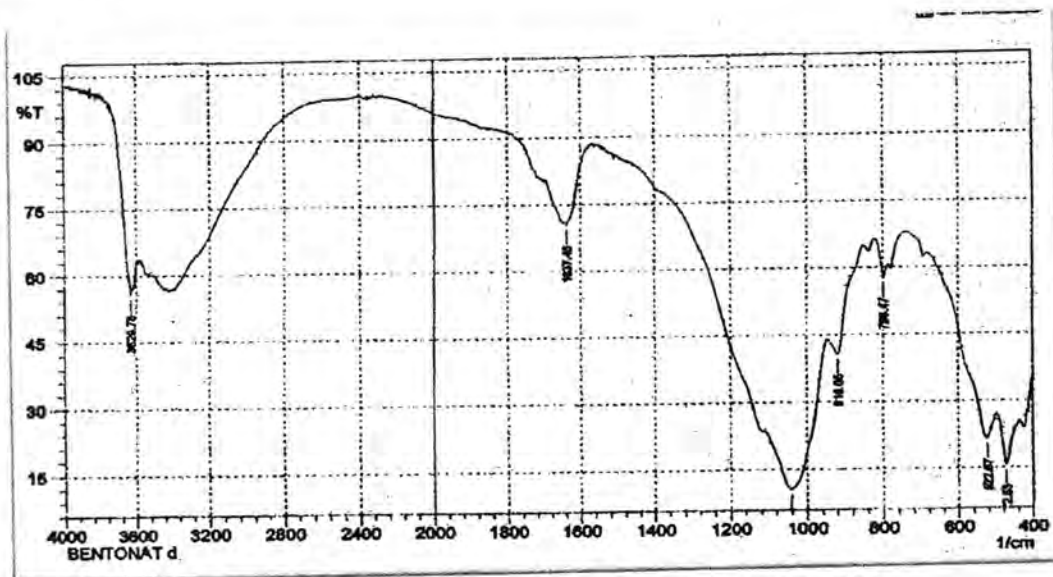
نقترح التوسع في هذا البحث لتنشيط البنتونايت بتراكيز متعددة من حامض الكبريتيك للحصول على أفضل خصائص للبنتونايت العراقي لاستخدامه في قصر الألوان وإزالة التلوث بعد إنتاجه بكميات اقتصادية كبيرة.

شكر وتقدير

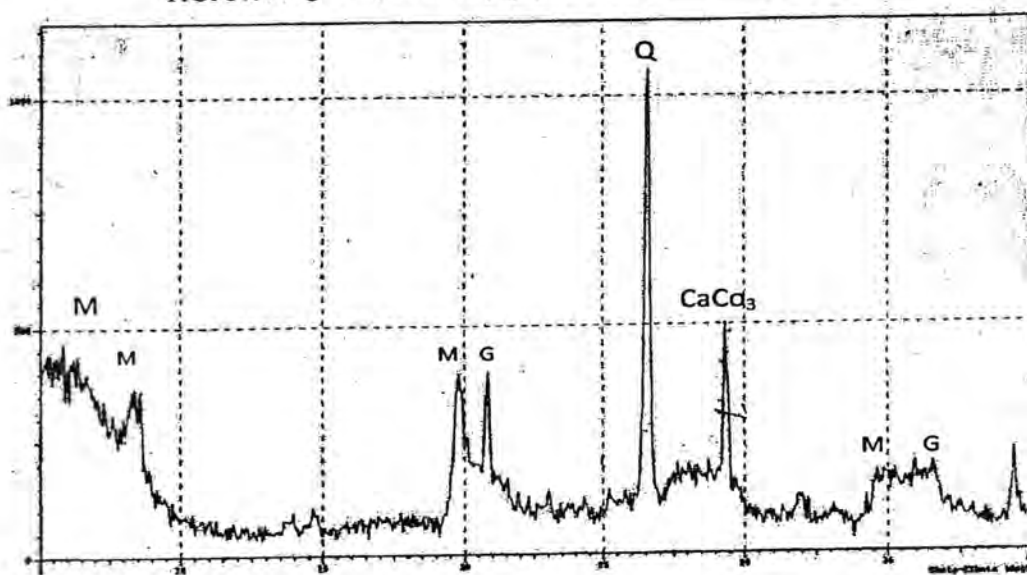
نتقدم بالشكر والتقدير لوزارة الصناعة والمعادن العراقية - قطاع الخدمات الصناعية لتمويلها هذا البحث بموجب كتابها المرقم 43085 في 2008/12/22. كذلك نشكر هيئة البحث والتطوير الصناعي لتقديمها كل إشكال الدعم والإسناد لنا.



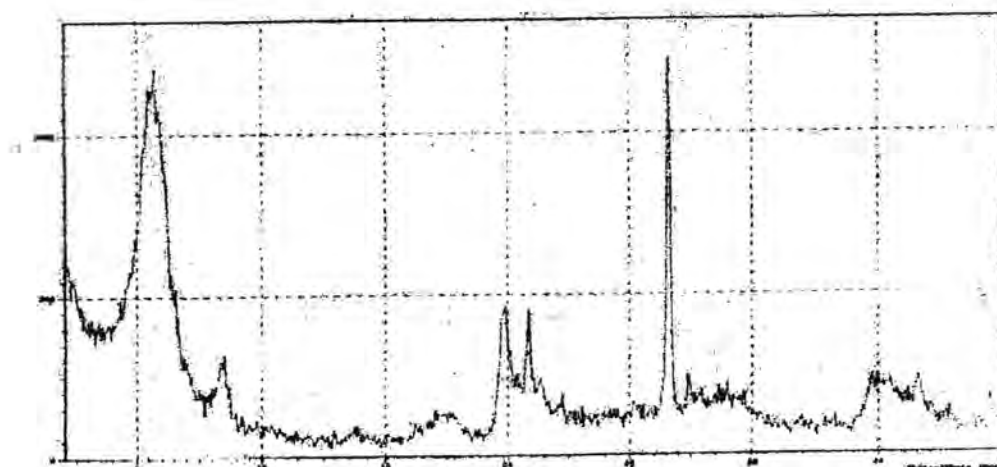
شكل-1: طيف امتصاص FT-IR للبنتونايت الطبيعي المجفف



شكل-2: طيف امتصاص FT-IR للبنتونايت المنشط بحامض HCl 3.6%

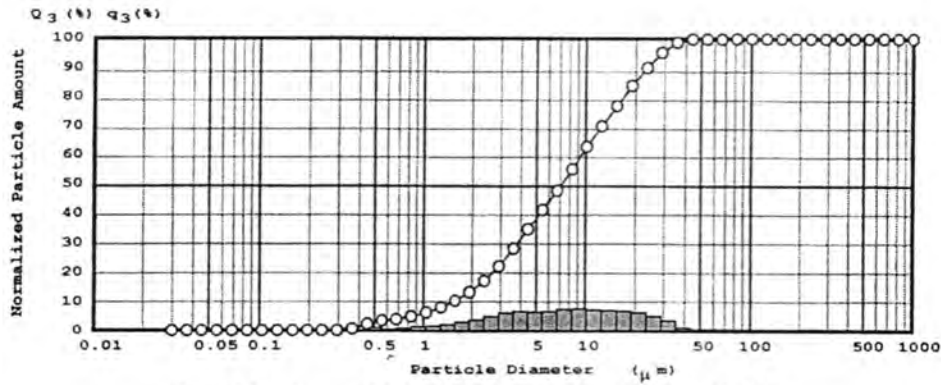


شكل-3: حيود الأشعة السينية (XRD) للبنتونايت الطبيعي

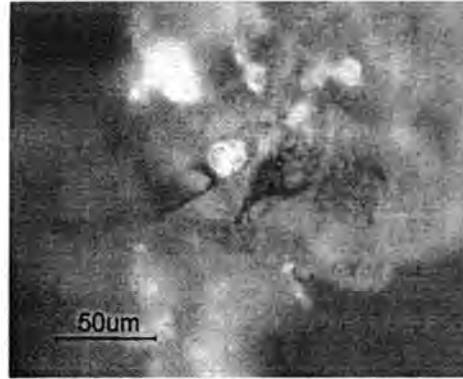


شكل-4: حيود الأشعة السينية (XRD) للبنتونايت المنشط بحامض HCl 3.6%

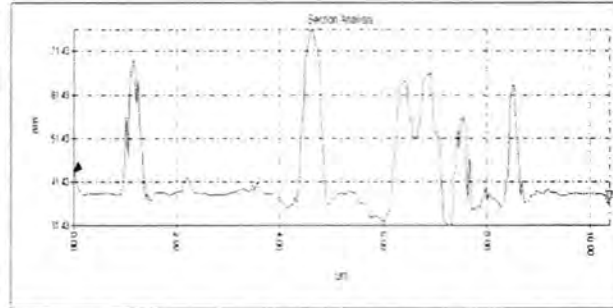




شكل-5: فحص الحجم الحبيبي للبتونايت الطبيعي بطريقة ليزرية



شكل-6: صورة بالمجهر الضوئي الماسح لدقائق البنتونايت الطبيعي



شكل-7: دقائق من عالق البنتونايت الطبيعي المرسبة على المايكا مع المخطط الجانبي لإبعاد الدقائق المؤشرة بالخط المنقط من الصورة

جدول-1: التركيب الكيميائي للبتونايت العراقي

L.O.I	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	MgO	CaO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>
9.5%	0.6%	1.1%	3.4%	4.5%	5.1%	15.7%	56.7%

جدول-2: الحجم الحبيبي للبتونايت المنشط بحوامض مختلفة

رمز النموذج	نوع النموذج	معدل الحجم الحبيبي للبتونايت (μm)
F	البتونايت الطبيعي	16.249
A	البتونايت المنشط بحامض 20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	63.316
B	البتونايت المنشط بحامض 50% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13.750
C	البتونايت المنشط بحامض CH <sub>3</sub> COOH (1M)	28.557
D	البتونايت المنشط بحامض 18% HCl	54.661

جدول-3:المساحة السطحية النوعية وحجم المسام النوعي للبنتونايت المنشط بحوامض مختلفة

رقم النموذج	النموذج	المساحة السطحية النوعية (m <sup>2</sup> /gm)	حجم المسام النوعي (cm <sup>3</sup> /gm)
F	البنتونايت الطبيعي	55.207	0.0598
A	البنتونايت المنشط بحامض 20%H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	202.617	0.3570
B	البنتونايت المنشط بحامض 50%H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	184.533	0.2803
Z	البنتونايت المنشط بحامض 18%HCl	133.29	0.273
D	البنتونايت المنشط بحامض 3.6%HCl	128.909	0.1585
C	البنتونايت المنشط بحامض CH <sub>3</sub> COOH (1M)	90.542	0.1045

## المصادر

- 1- Morgan D.J. and S.D.J. Ingthorpp, Laboratory assessment of bentonite Deposits, National Conference on Geological resources of Thailand, Nov. 1992, Department of mineral resources, Bankok. Thailand.
- 2- Foletto, E.L., Volzone, C., Proto, L.M., Braz. J.chem. Eng. 20, 2003 , PP ., 139-145 .
- 3- Francisco . et.al , studies on the acid activation of Barazilian smectite clays , Quim Nova , Vol .24, No .3 pp345-355 (2001) .
- 4- Serif sarioglan et.al , Acid activation and bleaching performance of Turkish bentonite in crude soyabean oil , particulate science & Technology , Vol.28, No. 4(2010) .
- 5- Christidis , G.G., et.al , Acid activation and bleaching capacity of bentonite from the islands of Milos and Chios , Agean, Greece ; Applied clay science , Vol .12, No.4,(1997)329-347 .
- 6- Didi, M.A, et-al; Colza oil bleaching through optimized acid activation of bentointe, A comparative study, Applied clay science, 42, 336-344 (2009).
- 7- Voarkansas, Y, Geological commission / [http: //www.stste. ar. Us. /agc/ clay. Htm. Act. 1783 of\(2005\).](http://www.stste.ar.us/agc/clay.Htm)
- 8- Rossi, M., Gianazza, M., Alamprese, C. and stanga F., The role of bleaching clay and synthetic silica in palm oil physical refining , Food chemistry , 82 , 291-296(2003) .
- 9- Kirali, E. G. and Lacin, O., Statistical modeling of acid activation on cotton oil bleaching by Turkish bentonite, Journal of Food Engineering, 75, 137-141 (2006).
- 10- Rozic L., etal, Modeling and optimization process parameters of acid activation of bentonite by response surface methodology, Applied clay science, No.48, 154-158 (2010).

- 11- Volzone, C., Masini O. Comelli, N. A., Grzona, L. M., Ponzi, E. N. and Ponzi M. I., Production of camphene and limonene from pinene over acid di- and trioctahedral smectite clays. *Applied catalysis A: General*, 2, 213-218 (2001).
- 12- Fethi Kooli , Exfoliation properties of acid – activated Monkmorillonite and their resulting organoclays ; *Langmuir* 2009 , No. 25,724-730 .
- 13- Farihausneh Husin and Mohamed Kheireddin, Textural characteristics, surface chemistry and activation of bleaching earth : Areview ; *Chemical Engineering Journal* , Vol . 170,No. 1(2011), pages 90 -106 .
- 14- Sakizili M. et.al, SO<sub>2</sub> adsorption on acid treated bentonite from Turkey , *Clay minerals* , 2011 , Vol .64, No . 1,pp 73-83 .
- 15- Mustansar Naeem and Nazir Ahmed , Characterization and activation studies on Azad Kashmir clay ; *Geol . Bull . Punjab univ* , Vol . 43,2008, pp.59 – 68.
- 16- Sabri Mahmoud and sadiq saleh , Effect of acid activation on some Jordonian clay ; *Clays and minerals* Vol. 47 ,No.4,pp(481-486)(1999) .
- 17- Sonya Abbasi et.al; Activation of bentonite to remove Cr from waste water produced by panning industry and studying the Cr recovery efficiency , *Damascus University Journal*, Vol. 26 No. 1 (2010),1523- 1531.
- 18- Temmuujin, J., Senna,M., Jadamba, T., burmaa, D., Erdenechimeg , Sh. and Mackenzie, K.J.D., *Journal of Chemical Biotechnology* ,81,2006 , PP.688,693.
- 19- Foletto, E. L. etal; Sunflower bleaching by adsorption onto acid-activated bentonite; *Brazilian Journal of chemical Engineering*, Vol. 28, No.1, pp 169-174(2011).
- 20- Santaren, J., *Industrial Minerals* (1993 ) , Vol . 304 , PP . 35-42 .
- 21- علوان نصيف جاسم وجماعته، تنشيط البنتونايت العراقي، مجلة جامعة الملك سعود، العلوم الهندسية (عدد خاص) ص ص 21-31، 2011.
- 22- علوان نصيف جاسم وجماعته، تنشيط البنتونايت العراقي، الجزء (II)، التنشيط بحامض الكبريتيك، تحت النشر.
- 23- Alwan N. Jassim et.al, Activation of Iraqi bentonite patt (III), Thermal activation, To be published in *Journal of King Soud University*, 2012.

- 24- Museref Onal , et . al , The Effect of Acid Activetion on some physicochemical properties of a bentonite , Turk J . Chem . ,26 (2002 ) , PP.409-416 .
- 25- Venkatahri , N,Characterization and catalytic properties of a naturally occurring clay ; Bulletin of catalysis of India 5(2006)61-72.
- 26- Hamsukh A,Synthesis and characterization of organic bentonite using Gugarat and Rajasthen clays , Current science ,Vol .92 ,No7 (2007) pp . 46-53 .
- 27- Juna de Dios et.al , Surface changes in an original and activated bentonite, J. Research of the National Bereau of Standands . Vol . 48, No . 4(1952 ) : 182-191.
- 28- Leposava Filipovic et . al, The effect of the fine grinding on the physico chemical properties and thermal behaviour of bentonite clay. J. Serb. Chem. Soc. 67(11), 753-760(2002) .
- 29- Onal M.,Changes in crystal structure , Thermal behavior and surface area of bentonite by acid activation , Commun. Fac . Sie . Univ . Ank . Series B, Vol .53 (1) , PP 1-14(2007) .
- 30- Plaschke, M., et. al, Size characterization of bentonite colloids by different methods, Anal. Chem. (2201),73,4338-4347.
- 31- Shubo Deng, Renbi Bai, and J.P.Chen, Behaviours and mechanisms of copper adsorption on hydrolyzed polyacrylontrile Fibers, Journal of colloid and interface science, 260 (2003) 265-272.
- 32- Al-Zahrani,A.A.,et-al; Study on the activation of Saudi natural bentonite, Part 2, Characterization of the an absorbing agent, J.King saud univ.,13, Eng. Sci(2), pp.193-203 (2000).