

The Proceeding of 6th ICBE
International Conference of Biotechnology,
Environment and Engineering Sciences

“Sustainability and Circular bioeconomy”

28 - 29 December 2019

Alexandria-Egypt

ISBN 978-91-519-3801-1

DOI 10.46617/ICBE6

Organized by

Scientific Researchers Organization (SRO media)

www.scientificresearchers.org

Contents

Title

Welcome message

Scientific Contents

Keynote and Oral Presentations

Poster and E-Poster Presentations

Full Papers

Welcome message from SRO media

We would like to welcome you at the 6th International Conference on Biotechnology, Environment and Engineering Sciences (ICBE 2019). It is our pleasure to have you with us and being with you. The conference is being held at Alexandria - Egypt during the period of 28 - 29 December 2019.

SRO media is a consulting organization that aims to promote science and research by enhancing networking, cooperation and communication between researchers, society and industry in order to share in solving society problems. Our scientific and consulting committee consists of multi-disciplinary members of scientists, researchers, consultants and professionals from universities, research centers, educational facilities and private companies from all around the world.

This conference is one of our activities which aim to connect between scientists, researchers, academics and industrial experts from different countries to share their views and discuss their advanced research work in the various topics of Biotechnology, Environment and Engineering Sciences. The conference is an excellent platform for academic exchange and cooperation promotion. It provides an excellent opportunity for researchers, scientists and postgraduate students to interact and build up academic relationship.

Conference website

www.scientificresearchers.org

Scientific Contents

Keynote and Oral presentations

	Full Name	Country	Presentation title
1	Dalia Abdelfattah	Sweden	Sustainable resources and innovation for circular bioeconomy
2	Nadeem A. Ramadan	Iraq	Genetic effect of <i>Trichoderma harzianum</i> suspension on <i>Aspergillus niger</i> fungus
3	Aws Ibrahim Sulaiman	Iraq	The efficacy of Vancomycin on <i>Leuconostoc</i> spp. Isolated from UTI patients in Mosul city-IRAQ
4	Anmar A.ALtaie	Iraq	Detection of Cytomegalovirus by ELISA Technique in Rheumatoid Arthritis Patients in Mosul / Iraq
5	Hanan Alfy	Egypt	Semi-field application -of a new formulation based on <i>Spodopteralituranuclear</i> polyhydrosies virus and <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>mexicanensis</i> against cotton leaf worm <i>Spodopteralittoralis</i> and root knot nematode, <i>Meloidogyne incognita</i> in Egypt
6	Jailan Anwer marzouk	Egypt	Shrimp Shell Extract as a Potential Green Scale Inhibitor in Cooling Water Systems
7	Sarah Ramadan	Egypt	Extract of <i>Cymbopogon Proximus</i> as a Green Material for Water Desalination application
8	Georgena, W. R. Gabra	Egypt	Increase of biomass in some aquatic plants grow under stress with using alternative sources of water and use it as contamination indicators
9	Abdelrahman Eissa	Egypt	Prestressed Concrete Structural System For Wind Turbine Tower
10	Mohamed Abu Setta	Egypt	Assessment of Flash Flood Hazard Degrees of Wadi EL Tarfa, Eastern Desert, Egypt: Using GIS Based Morphometric Analysis Technique
11	Alaa Hussein Ali	Iraq	Study the effect of alillopathic potential for aqueous extract of leaves flax on growth two type of fenugreek <i>Trigonillafoenum-gracum L.</i>

12	Amjad Abdul-Hadi Mohammed	Iraq	Role of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles in Germination and Growth of Chickpea (<i>Cicer arietinum L.</i>) Plant Seedlings Under Water Stress Effect
13	Nadjat BEBBA	Algeria	Effect of the climate on the settlements of Mayflies in the watershed of Wadi El Abio (Aures, Algeria)
14	AOURAGH Hayat	Algeria	The impact of arid climate on the diet selection of Ouled-Djellalsheeps in Algéria

Poster and E-presentations

	Full Name	Country	Presentation title
1	Sara S. Abdel-Hakeem	Egypt	Evaluation of micronuclei and erythrocyte alterations in the Egyptian catfish, <i>Clarias gariepinus</i> infected with <i>Trypanosome</i> sp
2	Afrah Fahad Abdulkareem	Iraq	Quantification of cytotoxic levels of exotoxin A of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivated on simple synthetic medium
3	Amal Fahmy	Egypt	Improving seed qualities of <i>Tilapia zilli</i> under controlled laboratory conditions, overcoming the negative effects on broodstocks from Lake Mariout, Egypt, Challenges and solutions
4	El-Sagheer, A. M	Egypt	Current status of phytonematodes associated with banana cultivations in Assiut governorate, Upper Egypt, (First report).
5	Hend Abeidi	Malta	Investigation of copper metal presence in cattle fodder, milk, hair and manure in Malta
6	Mohamed A. Abdein	Egypt	Heterosis for some economic traits and chemical components of some health properties in Squash (<i>Cucurbita pepo</i> , L.)
7	Mona A. Taha	Egypt	Micropropagation of <i>Koelreuteria bipinnata</i> Using Juvenile and Mature Explants
8	Samar Aborhyem	Egypt	Studying the Safety of instant noodles sold in Alexandria hypermarkets
9	Samia Gamal eldin Moharram	Egypt	Ultrastructural Alternations in Ova of <i>Diplodus sargus</i> . (Perciformes) during artificial induced spawning.
10	Yasser Khedr	Egypt	Assessment of Some Biochemical Parameters and Dielectric Relaxations In β -Thalassemic Children
11	Yousra A. El Maradny	Egypt	Inhibition of Hepatitis C Virus and Hepatitis B virus by mushroom lectins

12	Eman Gusb	Libya	Identification of a Common Novel Mutation in Libyan Pediatric Patients with Congenital Metabolic Disorders at Selected Pediatric Hospitals
13	Ahmed M. Hussein	Iraq	Impact of primary sedimentation tank on wastewater treatment plant units using computer simulation program
14	Dalia Abdulelah Mohammad	Iraq	Study the viability of some bacterial species isolated from contaminated soils on the manufacture of nanoparticles
15	Nahla Salim Hammok	Iraq	Toxic Effect Of Pendimethalin and UV-C Radiation On Germination and Corn Growth Seedling
16	Sara Louriki	Morocco	Evaluation of seedling resistance to Septoria tritici blotch in diverse subsets of wheat
17	Trang Tran Y Doan	Russia	Effective treatment of oil spills by adsorbent formed from chitin and polyurethane foam
18	Zainab Nasser Nabat	Iraq	Detection of IL18 AND HSP70 levels in serum of patients with ASTHMA
19	Ameer Aqeel Kamoona	Iraq	Harmonic Reduction of a Synchronous Generator in a Wind Energy System
20	Mariam Zaki	Egypt	An Integrated Framework to Measure Urban Sustainability in the Case of Small and Medium Urban Centers Case study: The Nile Delta, Egypt
21	Benayad Djalila	Algeria	The patentability of biotechnology inventions

Keynote and Oral Presentations

Sustainable resources and innovation for circular bioeconomy

Dalia Abdelfattah *, Ventaka K.K. Upadhyayula, Mats Tysklind

Department of Chemistry, Umea University, Sweden

*(dalia.abdelfattah@umu.se)

Abstract

In order to ensure a sustainable circular bio-economy, bio-based products (BBPs) are the subject of the global research society. Research related to bio-based products is part of the strategic agenda of many countries in Europe, and Asia. Furthermore, strategic frameworks for some bio-based products were developed merging the different environmental indicators and conversion technologies in order to achieve a sustainable circular bio-based economy.

In today's world several major concerns are related to energy and environmental, such as the increasing population, high levels of living standards, and increasing industrialization. These issues require a constant consumption of energy and generate large amounts of wastes. Given the present circumstances and future projections, it is vital to identify alternative and sustainable renewable energy sources with less environmental concerns. As a result of the continuous development in this area, opportunities to develop new technologies based on renewable energies gained more and more visibility and attention.

Nowadays, renewable biofuels became a major source of energy. Furthermore, the sustainable manufacturing of products in whole or in part from renewable resources and related economic basis is now known as « bioeconomy ». In this bioeconomy, all related processes to biofuel manufacturing starting from feedstock production, through the processing stages, followed by the manufacture of end product, are included. Biofuels have been used in many sectors worldwide, their utilization and consumption is upscaling, consequently their economic value. At the same time, bioenergy production allows the opportunity of new job creation in agricultural, forestry and industry and in small, medium size and bigger enterprises.

The presentation will highlight the current status of biofuel, related bioeconomy and how life cycle thinking can be integrated for the development of a strategic framework for biofuels production and utilization, for a sustainable circular bioeconomy.

Keywords: Bioresources, Circular bioeconomy, Life cycle assessment, Sustainability.

Genetic effect of *Trichoderma harzianum* suspension on *Aspergillus niger* fungus

Nadeem A. Ramadan and Huda W. Hadi

Mosul university/Science college/Biology department

Abstract

In this research two different genera were isolated the first was *Aspergillus niger* and the second was *Trichoderma harzianum*. The antimicrobial effect between two fungi was studied in different ways: the first is the cultivation of both fungi on the petri dishes whereas the other methods relied on finding minimum inhibitory concentration of *T. harzianum* suspension secretions. Furthermore, resistant spontaneous mutations were isolated from *A. niger* by two different methods using lethal and sub-lethal concentration from bio control factor suspension (1, 0.5 ml/ml) respectively, one of these methods named (experiment 1) and second called (experiment 2). Experiment 1 recorded an average frequency of mutants estimated at $10^{-10.62}$ and $10^{-9.25}$ higher than Experiment 2, which recorded an average frequency of $10^{-6.53}$ and $10^{-5.98}$. Statically data showed possibility of resistant mutants formation in *A. niger* fungus whether suspension use with natural state in agricultural fields as bio control fungicide.

Detection of Cytomegalovirus by ELISA Technique in Rheumatoid Arthritis Patients in Mosul / Iraq

Mohammed A.Ibraheem, Anmar A.ALTaie*, Mohammad A.Muhammad

University of Mosul – College of Science Dept. of Biology
**anmaraltaee1978@yahoo.com*

Abstract

The association between CMV infection and rheumatoid arthritis was carried out. A cohort of 92 serum samples were collected from rheumatoid arthritis patients within age group of (30-62) years (25 males, 47 females) and 20 from healthy control. ELISA assay is being used to measure the levels of CMV (IgM) and CMV (IgG) antibodies. Results showed that rheumatoid arthritis patients' blood groups are 29.16 percent AB+, 25 percent A+, 22.22 percent O+, 19.44 percent B+, 1.39 percent A-, 2.78 percent B-, and 1.39 percent AB-, and 0 percent O-. According to gender the results showed the highest ABO blood groups in females with AB (20.83%), and A (19.44%) while blood group O⁻ has been not recorded. The results of Rh phenotype tests in patients with rheumatoid arthritis were Rh⁺ 94.43% and Rh⁻ 5.56%. Depended on ELISA technique the CMV (IgG and IgM), indicate that 6 patients had seropositively of IgM against CMV antigen was apportioned as 2 patients with each blood groups A, B and AB while the infection has been not showed with group O. with CMV (IgG), There were 24 patients has seropositively, apportioned as 8 (12.8 IU/ml) at blood group AB, 6 (11.1 IU/ml) at blood group B, 6 (10.2 IU/ml) at blood groups A while in blood group O was 4 (12.9 IU/ml). According to sex, the results showed that highest titers of CMV IgG in females were 14 patients (14.3 IU/ml) and in males 5 patients (10.9 IU/ml). The current study revealed no significant correlation between levels of IgG, IgM and CMV infections with rheumatoid arthritis diseases. On other hand, there was weak significant correlation between blood groups and rheumatoid arthritis diseases.

The efficacy of Vancomycin on *Leuconostoc* spp. Isolated from UTI patients in Mosul city-IRAQ

Aws Ibrahim Sulaiman

Biology department / College of Science / University of Mosul

Email: aws_isulaiman@yahoo.com

Abstract

Leuconostoc species are gram-positive, non-motile, non-spore-forming, heterofermentative, facultative cocci that are found in the environment and they have economic importance because of their use in the dairy and pickling industries and in wine making. They are also found in fermented sausages, vacuum-packed meat products, cereals, and dairy products (butter, cream, fresh/raw milk, cheese) and causes diseases for human like brain abscess and urinary tract infections and very similar in the shape like streptococcus and other related genera.

We were collected 41 urine samples midstream Male= 14 and Female= 27 from patients came to ALKHNSAA Teaching Hospital and Al-Salam Teaching Hospital in Mosul city-IRAQ.

We obtained only 3 (7.3%) of *Leuconostoc* spp. out of 41 depending on identification tests, biochemical tests and resistance to vancomycin it is important test for this bacteria.

We were study the ability of *Leuconostoc* spp. to growth on different temperature in different media and *Leuconostoc* spp. can grow only on nutrient agar at 10 °C and they can growth at 25 °C on both blood agar without hemolysis and *Leuconostoc* Selective media (LSM).

Leuconostoc spp. were sensitive to IPM₁₀ (32mm/disk) and CIP₁₀ (27mm/disk) respectively and all of them were resistance against to other antibiotics under study (AM₁₀, E₁₅, CN₁₀, P₁₀, VA₁₀ and TMP₁₀).

Semi-field application -of a new formulation based on *Spodopteralitura* nuclear polyhydrosies virus and *Bacillus thuringiensis* var. *mexicanensis* against cotton leaf worm *Spodopteralittoralis* and root knot nematode, *Meloidogyne incognita* in Egypt

Hanan Alfy^{1*}, Rehab Y. Ghareeb², Wesam Z. Aziz³

¹Field Crop Pests Department, Plant Protection Research Institute, ARC, Giza, Egypt.

²Plant Protection and Biomolecular diagnosis Dep., Arid Lands Cultivation Research Institute, City of Scientific Research and Technology Applications, Borg El-Arab, 21934, Alexandria, Egypt.

³Vegetables Pests Department, Plant Protection Research Institute, ARC, Giza, Egypt.

* alfyhanan@gmail.com

Abstract

In this study, new biopesticides based on *Spodopteralitura* nuclear polyhydrosies virus (*Slitura*NPV) and *Bacillus thuringiensis* var. *mexicanensis* (Btm) were evaluated against two important pests, cotton leaf worm, *Spodopteralittoralis*, and the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* in 2017 and 2018. The mortality of treated *S. littoralis* larvae occurred with combination treatments of *Slitura*NPV and Btm at two concentrations (20% and 30%) without significant difference between two concentrations (87.9% and 94.0%, respectively). Abnormalities in pupae were highest when insects were treated with Btm, followed by *Slitura*NPV, with the fewest abnormal pupae in the combination treatment. Increase in mean seed weight was highly significant in all treatments compared with the control in both years with the greatest increase in the combination treatment. Treatments of *M. incognita* with Btm was highly effective against nematode J₂ mortality and there were significant differences in the mean number of all recorded indicators in tomato.

Keywords: nuclear polyhydrosis virus, bacteria, cotton leaf worm, nematode, field application,

Shrimp Shell Extract as a Potential Green Scale Inhibitor in Cooling Water Systems

E. Khamis^a, D. E. Abd-El-Khalek^b, Mervat A. Abdel-Kawi^c, J. M. Anwar^d

^a Chemistry Department, Faculty of Science, Alexandria University, Ibrahimia, P.O. Box 426, Alexandria 21321, Egypt, email: essam_khamis@yahoo.com

^b Marine Chemistry Department, National Institute of Oceanography and Fisheries, Alexandria, Egypt, email: dalia1282002@yahoo.com

^c Department of Materials Science, Institute of Graduate Studies and Research, Alexandria University, 163 Horrya Avenue, El-Shatby, P.O. Box 832, Alexandria, Egypt, email: Mervat_khawi@yahoo.com

^d Alexandria water company, sharky water treatment plant, Alexandria Egypt email: jombaji@yahoo.com

Abstract

Water is the most commonly used cooling fluid to remove unwanted heat from heat transfer surfaces. In cooling system, long holding time at higher temperatures in the presence of higher dissolved solids concentration produces more scale problem. Curing scale problems costs the industry hundreds of millions of dollars per year in lost production.

This study has mainly explored the possibility for using shrimp shell extract as green scale inhibitor in cooling water systems. The control of scale formation using shrimp shell extract was studied using NACE test, Electrochemical Impedance Spectroscopy and chronoamperometry techniques, in addition to microscopic examination. The work was focused on the deposition of common types of scales; calcium carbonate, calcium sulfate, barium sulfate and strontium carbonate. Efficiency of Shrimp shell extract as scale control was compared with the performance of the commercially well-known and available phosphonate antiscalant, HEDP. Overall results showed that shrimp shell extract has high efficiency towards inhibiting different types of scales in comparison with HEDP. SEM photographs displayed that presence of the extract modified scale crystals and retard their growth. Shrimp shell extract is promising environmental friendly antiscalant and can be considered as alternative to current non-green technologies

Keywords: Scale problem, Green antiscalant; shrimp shell, phosphonate

Extract of *Cymbopogon Proximus* as a Green Material for Water Desalination application

S. R. Ramadan¹, D.E. Abd-El-Khalek², B.A. Abd-El-Nabey³, Sh. Ebrahim⁴ and A. Morsy⁴

¹*Chemist of Quality Control & Environment Department, Water Company, Holding Company of Water & Wastewater, Alexandria; sarah_ramadanchemist@yahoo.com.*

²*Marine Chemistry Department, National Institute of Oceanography and Fisheries, Elanfoshy, Alexandria, Egypt; dalia1282002@yahoo.com*

³*Faculty of Science, Department of Chemistry, Alexandria University, Egypt, beshirabdelnaby2015@gmail.com.*

⁴*Materials Science Department, Institute of Graduate Studies & Research, Alexandria University, Egypt. shakerma2006@yahoo.com (S. Ebrahim)*

Abstract

Biofouling resulting from the attachment of microorganisms communities to the membrane surface is the major obstacle for the widespread application of membrane technology. Aqueous extract of halfabarr (***Cymbopogon Proximus***) extract was used as a novel environmental friendly additive to improve the performance and anti-biofouling properties of cellulose acetate reverse osmosis (RO) membranes. Modified membrane was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy, while the anti-biofouling properties were studied by water contact-angle measurements, water content measurements, and static protein adsorption. The effect of modification of the membrane on the salt rejection and water flux was studied using a cross flow RO unit. The results indicated that modified membrane has lower contact angle accomplished with high water content. The extract exhibited pore-forming ability during the membrane formation process and, furthermore, enhanced hydrophilicity of this membrane. Furthermore, modified membrane could resist effectively protein adsorption and microbial growth. It showed limited adsorption of protein and microbes, in addition to increased salt rejection and water flux values.

Keywords: Cellulose acetate membrane; Natural extract; Biofouling; Protein adsorption

Increase of biomass in some aquatic plants grow under stress with using alternative sources of water and use it as contamination indicators

Georgena, W. R. Gabra

Antoniades Research Branch, Horticultural Research Institute, Antoniades Garden, Alexandria, Egypt.

georgena.rizk@yahoo.com

Abstract

Living organisms are distributed in ideal ecosystems in balanced proportions without prejudice to the existence of each other. The "Eutrophication" phenomena that means biomass aggravation increment of some aquatic plants occurs when increase the dietary excess by organic, inorganic nutrients and elements in waterbodies. These aquatic macrophytes play a major role in conservation of the aquatic ecosystem or even aesthetically for some aquarium, ponds and artificial lakes as a part of the botanical gardens, water parks, fish farms and it may spread a lot in slowly flowing rivers. The purpose of this study is to estimate the rates of increase in plants biomass produced under stress of using alternative water sources. Also, using these macrophytes as contamination biomarkers and in phyto-remediation process and what's for/on it and its impact in/on its presence in fresh water bodies.

The most important of these macrophytes are *Pistia stratiotes* "water lettuce" as floating plant and *Ceratophyllum demersum* as submerged one. The experiment was carried out in open field of El- Harrery village, El Montaza, at the east of Alexandria, Egypt, during two successive summer seasons 2014/ 2015 for 28, 34 days for each plant respectively. The plant samples were obtained from the National Center for Oceanography and Fisheries, El- Anfoushi, Quiet Bay, Alexandria, Egypt. The means of initial weights of plants were average at 47 gm and 32 gm respectively. The treatments media were Tap Water as a control [TW] - Primary Treated Domestic Wastewater [PTW 15%, 25%] - Ground Well Water [GWW 15%, 25%] - Mix 15%, 25% [TW+PTW+GWW] from full volume 2.5 L of plastic Jars. The treatments were increased by the same concentration when the water evaporated. The results reached to highly significant differences between treatments in vegetative growth parameters, chemical constituents [total chlorophyll, N, P, K, Na, Cd and Pb in plants shoot], sediment determination and water quality tests [color and turbidity] before and after treatments. The treatment of PTW 25% proved its superiority in most vegetative growth parameters in both plants, but it caused that the fastest growing and the most degraded in water lettuce plant. Thus, it can be recommended that these plants can be released as pollution indicators and monitored in their environment and use this in phyto-remediation process.

Keywords: phytoremediation – biomarkers – Eutrophication – macrophytes – ecosystem.

Prestressed Concrete Structural System For Wind Turbine Tower

A.Eissa¹, Mohamed Hasan², Eehab.Khalil³

¹Arab Academy for Science, Technology & Maritime Transport, Abdos1994@ gmail .com

²Arab Academy for Science, Technology & Maritime Transport, m.shakour@aast.edu

³Construction Res Ins, NWRC, dr.eehab@gmail.com

Abstract

Wind is the most seasoned and efficient energy of all renewable energies. A horizontal axis wind turbine (HAWT).HAWT regularly supported on steel, concrete, hybrid and pre-stressed concrete tower.As the turbine size grows up, the tower heightened to generatesspadesful of electricity power. The hybrid tower consists of pre-stressed concrete in the bottom and steel in the top. steel part required to be strong and stiff, consequently leading to high constructioncost, long lifetime and less maintenance requirement. To tackle this problem, a new type of pre - stressed concrete structural system for hybrid wind turbine tower.The new proposed tower is designed as octagon cross section with internal ribs in the bottom and octagon cross section in the top of the tower. The designed tower features a tapered profile that decreases the area exposed to wind, reduce the amount of pre-stressed cable, reduces the total weight, applied moment and the capital cost. 100 m height of tower system for a 3.6 MW turbine was designed using FE software (ANSYS). It is designed under wind and earthquake loads with the permanent superimposed loads of the wind turbine tower.

Keywords:Prestressed concrete wind turbine tower, Finite element method,ANSYS

Assessment of Flash Flood Hazard Degrees of Wadi EL Tarfa, Eastern Desert, Egypt: Using GIS Based Morphometric Analysis Technique

Mohamed Abu Setta¹, Hassan Garamoon² and Ashraf Shabana³

¹ *Geology Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt. mohamedsaid_p@sci.asu.edu.eg*

² *Geology Department, Faculty of Science, Ain Shams University. h_garamoon@sci.asu.edu.eg*

³ *Geology Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt. ashrafshabana@gmail.com*

Abstract

Wadi EL Tarfa basin is one of the largest basins in the Eastern Desert of Egypt where its surface area reaches 4939 Km². It is considered one of the promising agricultural reclamation areas in Egypt. Wadi EL Tarfa is mainly running on El Maaza limestone plateau and drains in the Nile River at the southeast of Beni Mazar City. The morphometric analyses of Wadi EL Tarfa was carried out through ARC GIS software 10.2 based on DEM with resolution of 30 m (SRTM 1 Arc-second Global) which downloaded online from the USGS site. Wadi EL Tarfa basin is subdivided into eight main sub-basins (from 1 to 8). According to Strahler ordering method, Wadi EL Tarfa attains eighth order and its sub-basins range between fifth order for small sub-basins (nos. 1, 3, 4 & 6) and seventh order for large sub-basins (nos. 7 & 8). The flash flood hazard degrees of EL Tarfa basin have been estimated depending on the morphometric parameters which have direct effect on the flood amount. The morphometric ranking method was used in determining the hazard degrees which divided into five hazard classes. All sub-basins are classified according to the degrees of hazard. The classification shows that the sub-basin (no. 2) has the lowest hazard while sub-basins (nos. 3, 5, 6 & 8) are the most hazardous. The resultant flash flood risk maps indicated the most probable sub-basins and the main roads expected to be affected by flood hazard. It is recommended to construct protection systems in Wadi EL Tarfa area such as retardation earthen dams to mitigate the floods risk in one hand and to increase the rain water harvesting on the other hand.

Keywords: Flash flood hazard, Wadi EL Tarfa, morphometric analyses, Eastern Desert, Egypt.

**Study the effect of alillopathic potential for aqueous extract of leaves flax on
growth two type of fenugreek *Trigonillafoenum-gracum L.***

Alaa Hussein Ali* and Inas Qusay Doori

University of Mosul / College of Science/Dept. of Biology/ Iraq

**alaashalal91@gmail.com*

Abstract

A glass house experiment carried in department of biology, collage of science , Mosul university and laboratory experiment were made to study the effect of aqueous extract of flask plant with different concentration (0,3,5,7)% on germination and growth characteristic of fenugreek varieties. Different from flax plant residue added to soil in preparation (0 , 3 , 5 , 7) % weight : weight mixed and then incubated for two weeks, in some characteristic of vegetative growth of two types of fenugreek (Iraqi and Indian).

The result showed that the different concentration of aqueous extract of the shoot caused a significant decrease of germination, length of radical, pulmule and dried weight of radical and pulmule. The concentration of flax residue significantly affected growth characteristic leaf area and relative water content caused a material decrease in these trait compared with the control treatment.

On the other hand the result of statistical analysis showed significant differences between the two fenugreek cultivars by their response to the different concentration of extract and residues of flask plant.

In general, it was noted that the increase of concentration of the extract or residues was a clear reason for the decrease of germination indicator and physiological characteristic of the fenugreek varieties.

Role of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles in Germination and Growth of Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Plant Seedlings Under Water Stress Effect

Rana Tariq Yahea¹ and Amjad Abdul-Hadi Mohamme*²

¹*Biophysics Department \ Science College \ Mosul University \ Iraq*

²*Biology Department \ Science College \ Mosul University \ Iraq*

*Email: biology19802007@yahoo.com

Abstract

The current study searched the effect of Zinc oxide (ZnO) nanoparticles with concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mgL⁻¹ on the seeds germination of chickpea *Cicer arietinum* plant and their seedlings growth under the effect of water stress with the presence the Poly Ethylene Glycol (PEG) compound at 0.5, 1.0 and 2.0 mgL⁻¹ concentrations. The results showed the inhibitor role of PEG when it's found once in the medium at all concentrations on the percentage of seeds germination, where the higher reached to 35% in the presence of 2.0 mgL⁻¹ compared with 60% in the MS alone (control). While the addition of zinc oxide nanoparticles signally to the medium led to encouraged the germination reached the best of them to 75% at 2.0 mgL⁻¹, the characteristic results are the ability of these nanoparticles at 2.0 mg L⁻¹ to reduce the inhibitor effect of PEG compound and the seedlings give perfect differences in their length and shape response to the composition of the medium and the seedlings surprised which growing on the MS medium supplemented with all of the nanoparticles concentrations. The protein content of the seedlings tissues determined in which growing on all the media with the surprised its content in seedlings growing on the MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ of ZnO alone, that reached to 1.21 mg g⁻¹

EFFECT OF THE CLIMATE ON THE SETTLEMENTS OF MAYFLIES IN THE WATERSHED OF WADI EL ABIOD (AURES, ALGERIA)

NADJAT BEBBA^{1,2}, MAJIDA EL ALAMI³, SOULEF FARIDA ARIGUE^{1,2}, ABDESLAM ARAB²

¹ *Department of Sciences of Nature and Life, Faculty of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life, University Mohamed Kheider, PB 145 Biskra – Algeria, nadjat.bebba@univ-biskra.dz / bebbanadjat@yahoo.com*

² *Laboratory of Dynamics and Biodiversity, Faculty of Biological Sciences, University of Sciences and Technology Houari Boumediene Algiers – Algeria.*

³ *Laboratory of Diversity and Conservation of Biological Systems, Faculty of Sciences, University Abdelmalek Essaâdi, PB 2121 Tetouan 93002- Morocco*

Abstract

In aquatic environments, the spatio-temporal distribution and the structuring communities benthic macro-invertebrates in general and Mayflies particularly are mainly related to changes in the hydrological factors, they are also related to a direct or indirect way to climatic factors.

This work was carried out in two areas of the watershed of wadi El Abiod (mountainous and wooded and the other desert slopes), these two areas show remarkable differences in climate, where one passes from a semi-arid bioclimatic floor in the north (wilaya of Batna) to a arid floor along the median zone of valley of wadi El Abiod, and ends with a Saharan floor in the south.

The spatio-temporal distribution of the settlement of Mayflies in the study area can be divided into three zones with a moderately different structuring, where we have the upstream zone (from Djebel Chélia until Tighanimine), which gathers sites of Inoughissene and Arris. The median zone, which includes the transitory sites between the two types of climate (semi-arid and saharan), it is spread out Tighanimine to throats of Ghassira, and finally the downstream zone, consisted of the downstream sites of wadi El Abiod, locating in the wilaya of Biskra (M'chouneche and Foug El Gherza). Moreover the eurytopic and abundant species (*Baetis pavidus* and *Caenis luctuosa*), the community of Mayflies in the upstream sector consists mostly of *Baetis rhodani* (42,27%) and *Baetis sinespinosus* (15,75%), and that of the downstream sector is composed much of *Cloeon gr. simile* (7,62%), *Ecdyonurus rhotschildi* (2,16%) and *Proclaeon stagnicola* (1%). However, the transitory sector is made mainly of *Ecdyonurus rhotschildi* (1,67%).

Keywords: Mayflies, watershed of wadi El Abiod, distribution, structuring, Algeria

The impact of arid climate on the diet selection of Ouled-Djellalsheeps in Algéria

AOURAGH Hayat¹, SEBKHI Soumia¹, SAAFI Djihane Fatima Azahra¹ and DIAB Nassima²

¹ Department of Nature and Life Sciences, Mohammed Khider University, Biskra, Algeria.

² The Technical Institute for the Development of Saharan Agriculture – Biskra- Algeria

Abstract

In Algeria the national sheep population is evaluated at around of 28.4 millions heads, dominated by the Ouled Djellal breed with 61% which has been the subject of several works on the production and reproduction performance. In animal production, feeding precedes the genetic improvement of animals and it remains useless to have well-selected animals if their diet is not well conducted

the diet of a sheep population of Ouled Djellal breed, in an arid region – Biskra- in Algeria was studied during 3 seasons: autumn, winter and spring in 2018 and 2019, using the faecal analysis, with the aims of exploring (i) the variation in diet according seasons, (ii) the relationships between consumption and relative availability, in field, of the plant species, and (iii) which plant parts, are eaten by animals.

All plant species in the study area were collected and identified at the species level; we measured the percentage of plant cover for each species. In the laboratory we prepared an atlas of epidermis of different parts in each plant.

Diet composition was obtained by faecal analysis of a population of 54 individuals and compared to plant collections. Most epidermal fragments of plant in faeces were identified to species level using a photographic atlas of epidermis of all plant species identified at the study area

The faecal analysis allows identifying 1236 plant fragments, composed of 32 species belonging to 13 botanical families, and 435 unidentified fragments.

The results show that the most consumed species during the three seasons are: *Impatiens cylindrica*, *Panicum rupens*, *Cynodon dactylon* and *Hordeum vulgare*, of the poaceae family.

Keywords: Diet, faecal analysis, epidermis, Ouled djellal breed, sheeps.

Poster and E- presentations

The patentability of biotechnology inventions

Benayad Djalila

Faculty of Law and Political Science, University of Mhamed Bougherra ,Boumerdes , Algeria

ania-rose14@hotmail.fr

Summary :

Biotechnology is a feature of contemporary life as it is the fourth scientific revolution of the twentieth century after the revolution of the destruction of the atom, space and computer and that its applications are not limited to a specific area but used in all areas of life. Biotechnology is an application of information about living systems with a view to using these systems or their components for industrial purposes, they are biology –based technology especially when used in agriculture, food science and medicine. Agricultural and economical by improving their genetic characteristics. With the use of biotechnology, new drugs, modified plants, organic and natural substances, and development in marine organisms have emerged . from this invention, this is why we highlight in this paper the specificity of biotechnology inventions as they meet the objective requirement of patenting.

Evaluation of micronuclei and erythrocyte alterations in the Egyptian catfish, *Clarias gariepinus* infected with *Trypanosoma* sp.

Sara S. Abdel-Hakeem

*Parasitology Lab, Zoology Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut (71516),
Egypt.*

Abstract

Kinetoplasts are ubiquitous blood parasites of marine and fresh water fishes which transmitted by aquatic invertebrates. The majority of infected cases were described on the basis of the morphological characteristics. The present study aims to evaluate the nuclear abnormalities and red blood cells malformations in the wild *Clarias gariepinus* infected with *Trypanosoma* sp. in River Nile, Assiut, Egypt as indicator of DNA damage. Fifty wild African catfish were collected and blood smears were stained with haematoxyline and eosine (H&E) and Giemsa stains. The trypanosomes were photographed and different measurements were assessed. The prevalence of infection was 8 % of collected specimens. According to the morphological data, the species of trypanosomes identified as *Trypanosoma mukasai*. Various erythrocyte alterations were observed with high percentage of 54.57 % and including acanthocytes, crenated cells, tear-drop cells, swollen cells and sickle cells. Small nuclear abnormalities were reported as fragmented nucleus, eccentric nucleus. The highest value of nuclear abnormalities and micronuclei (Mn) were significantly increased with the intensity of infection. We concluded that the infection of fish with blood parasites induced the alterations in the red blood cells and nuclear abnormalities in the African catfish.

Keywords: Trypanosome, morphological, *Clarias*, erythrocytes

Quantification of cytotoxic levels of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* cultivated on simple synthetic medium

Ibtisam Ghadban Auda, Afrah Fahad Abdulkareem *

Department of biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq.

**Corresponding author's e-mail: aalfahad17@uomustansiriyah.edu.iq
,stbg@uomustansiriyah.edu.iq*

Abstract

The leading microorganism of chronic otitis media is *P. aeruginosa* and the most powerful exotoxin of *P. aeruginosa* is exotoxin A that is responsible for the cytopathic effect on the host tissues. This study aimed to determine the percentage of *toxA* gene occurrences on chromosomes of the otitis media most prevalent causative agent, *P. aeruginosa*, study the effect of simple salts-based synthetic medium on the production of exotoxin A and evaluate the effect of produced exotoxin A amounts on mice vital organs. The results showed that *P. aeruginosa* is predominant in otitis media as compared with the others. Furthermore, exotoxin A gene is found on all tested *P. aeruginosa* isolates. Therefore all *toxA* positive *P. aeruginosa* isolates were subjected to produce exotoxin A by the cultivation of them on simple synthetic media (with trace iron and omitting the glutamate) and quantification of the exotoxin A by ELISA technique. *Pseudomonas aeruginosa* isolates were varied in exotoxin A production and were ranged from 78 to 1380 pg/ml. Injection of pure exotoxin A at low doses within the produced values to mice showed histopathological lesions of mice vital organs; these lesions increase with increasing the injected dose. As a conclusion, *P. aeruginosa* is still in the front of otitis media pathogens and *toxA* gene is predominant on their chromosomes. Even in poor nutrition conditions and the presence of trace amounts of iron, *P. aeruginosa* isolates are still able to grow and produce exotoxin A at amounts can exert its harmful effect on mice vital organs.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *toxA* gene, exotoxin A, histopathology.

Improving seed qualities of *Tilapia zilli* under controlled laboratory conditions, overcoming the negative effects on broodstocks from Lake Mariout, Egypt, Challenges and solutions

Amal Fahmy¹, Nawal El- Ghazaly², Abd-Allh², Kholoud Areef³

¹National Institute of Oceanography & Fisheries, Alexandria, Egypt, aml.fayez@yahoo.com

²Faculty of science, Alexandria University, Egypt.

³ Faculty of science, Omar Al- Mukhtar University, Lybia, prof_drkoloud@yahoo.com

Abstract

The successful management of environment, selection of tilapia spawners and seed quality are the important keys to quality production. Lake Mariout receives untreated or poorly treated industrial and agriculture effluent wastes that accumulated in the aquatic animals. These wastes affect the spawning performance and seed quality (eggs and larvae) of fish. This study aimed to assess and compare the spawning performance and improve the seed quality of *Tilapia zilli* broodstock selected from two different polluted sites that exposed to industrial agricultural effluent wastes. *Tilapia zilli* broodstocks were selected from two sites in the main basin of Lake Mariout during the spawning season (inshore site near the industrial and agriculture drainage and offshore site as a fishing area). Broodstocks cultured in clean brackish water (5 ‰) under laboratory conditions and fed on pelleted diet (25% crude protein). Spawning performance of *Tilapia zilli* broodstocks were verified once every 10 days. Heavy metals concentrations in all egg batches samples of brood stock caught from the two sites were analyzed to evaluate eggs and larval qualities. During May month, there was no spawning process of the broodstock from two different sites at laboratory condition. After culturing the mean concentrations of heavy metal in eggs and larvae differed significantly between two study sites. The first egg batch spawned of the broodstock caught from inshore site was characterized with contaminate heavy metals more than corresponding batch from offshore batch. Eggs and larval quality of this batch were negatively influenced from direct heavy metal exposure of the broodstocks of the industrial and agriculture discharge in inshore site compared to those from offshore site. Otherwise, the seed qualities in the other batches were positively influenced under controlled laboratory conditions. The conclusion of this study shows that *Tilapia zilli* broodstocks caught from the higher exposure heavy metal concentrations at inshore sites were affected with low spawning performance and poor seed quality while after transferring broodstocks to clean brackish water and cultured under laboratory conditions, the qualities of seeds were positively influenced. It confirms the impact of aquatic environmental condition on the aquatic living organism.

Keywords: Seeds quality, Heavy metals, *Tilapia zilli*, Lake Mariout, Industrial and agriculture Pollution

Current status of phytonematodes associated with banana cultivations in Assiut governorate, Upper Egypt, (First report)

El-Sagheer, A. M.

*Agricultural Zoology and Nematology Dept., Faculty of Agriculture, Al-Azhar University, Assiut
(71524), Egypt.*

Corresponding Author: atefelsagheer@azhar.edu.eg

Abstract

Phytonematodes (Plant parasitic nematodes) are the most destructive group of plant pathogens worldwide, so to determine the problem a survey was carried out to know the frequency of occurrence population density of phytonematodes associated with banana, *Musa sapientum* in Assiut governorate at middle of Upper Egypt. The survey results recorded the occurrence of 18 genera of phytonematodes including *Aphelenchoides* sp., *Cricone mellas* sp., *Cricone moides* sp., *Helicotylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Hoplolaimus* sp., *Longidorus* sp., *Pratylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Radopholus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Rotylenchus* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Tylenchus* sp. and *Xiphinema* sp. Whereas, burrowing nematodes, (*Radopholus* sp.) and lesion nematodes (*Pratylenchus* sp. and *Pratylenchus* sp.), were the most predominant, followed by the root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.).

Keywords: Phytonematodes, survey, banana, Upper Egypt.

Investigation of copper metal presence in cattle fodder, milk, hair and manure in Malta

Hend Abeidi¹, David Suda², Everaldo Attard³, Emmanuel Sinagra⁴

¹*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malta, Msida, MSD2080
hend.abeydi.16@um.edu.mt*

²*Department of Statistics and Operation Research, Faculty of Science, University of Malta,
Msida, MSD2080, david.suda@um.edu.mt*

³*Division of Rural Sciences and Food Systems, Institute of Earth Systems, University of Malta,
Msida, MSD2080, everaldo.attard@um.edu.mt*

⁴*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malta, Msida, MSD2080
emmanuel.sinagra@um.edu.mt*

Abstract

This study investigated the concentration of copper (Cu) present during the lifecycle of cattle in Malta to determine how metals enter and exit the animal, and their impact via the food chain on the human consumer. The determination of Cu in 10 cows from a dairy cattle farm located in Salina, Malta was estimated by taking milk (100), hair (100), fodder (15) and manure (10) samples over 10 weeks between September and November 2016 and their Cu concentration was determined using atomic absorption spectroscopy. Conventional methods were used to prepare all these samples. Cu concentration in milk samples showed high levels (0.02 to 0.07mg/L) which is higher than the maximum level recommended (0.01mg/L) by FAO and WHO. Cu concentration was significantly higher in summer than in autumn. However, hair samples results (3.04–6.88mg/kg) did not provide a clear impact by season. The concentration of Cu in different fodder types varied significantly (1.08–16.06 mg/Kg). Manure Cu concentrations ranged from 10.70 to 16.63 mg/kg but there were no distinctions between weeks or seasons. Considering the discrepancy of copper concentrations at inputs (feed) and outputs (manure, hair, milk) for a dairy cow, it can be concluded that there are other factors contributing to the copper concentration within the cow system.

Keywords: copper, seasons, dairy, heavy metals; toxicity, atomic absorption spectrophotometry.

HETEROSIS FOR SOME ECONOMIC TRAITS AND CHEMICAL COMPONENTS OF SOME HEALTH PROPERTIES IN SQUASH (*Cucurbita pepo*, L.)

Mohamed A. Abdein¹, Horeya M. Fathy Hassan¹ and Dalia M. Hikal²

¹*Vegetables Breeding Department, Horticulture Res. Inst.(HRI), ARC, Giza, Egypt.*

²*Nutrition and Food Science, Home Economics Department, Faculty of Specific Education, Mansoura University, Egypt.*

Abstract

The main objectives of this investigation were to determine the amounts of heterosis versus the mid-parents and the better parent and chemical components of some health properties in squash fruits and their peels. Four squash varieties belong to the species (*Cucurbita pepo*, L.), were crossed to obtain 6 F₁ hybrids according to a half diallel crosses mating design.

These parental varieties were: ESKANDARANI (P₁); SIYAH KABUK (P₂); ERBIL GARDEN (P₃) and ZUCCHINO ALBERALLO DI SARZANA (P₄). The seeds of these parental varieties were obtained from different countries: (P₁) Egypt; (P₂) from TURKI; (P₃) from IRAQ and (P₄) from ITALY. These parental varieties were used and their 6 F₁ hybrids were obtained through half diallel crosses mating design system.

Data were recorded for some economic traits. The results also indicated that the amounts of heterosis versus mid-parents showed highly significant values for all studied traits. The estimates of heterosis versus the better parent showed highly significance for most studied traits. None of the hybrids exhibited maximum heterosis for all the traits, but significant and desirable level of heterosis over mid-parents and better parent was obtained in several hybrids for the different traits.

The higher moisture and carbohydrate contents were established in all hybrid peels. On the other hand, the seeds of most hybrids had higher amounts of oils and proteins compare with parents.

The experimental design was the Randomized Complete Blocks Design (RCBD) with three replications.

Keywords: Squash, Hybrids, Heterosis, Economic traits, Chemical components.

Micropropagation of *Koelreuteria bipinnata* Using Juvenile and Mature Explants

Azza A. Tawfik, Omer H. Ibrahim, Mona A. Taha

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut 71526, Egypt

Abstract

An efficient micropropagation protocol for *Koelreuteria bipinnata*, an ornamental tree, through mature and juvenile phases was described. Nodal explants from one - year- old branches of a field- grown mature tree (mature phase) and from *in vitro* growing seedlings (juvenile phase) have been used. Nodal explants from mature explant cultured on MS medium supplemented with or without growth regulators did not show any axillary shoot development. BAP (6-benzyl aminopurine) at 1.5 mg/l induced axillary shoots from all juvenile explants (100%). It also produced the highest number of shoots (2.5 shoots per explant), the highest rooting percentage (100%), the maximum number of roots (2.80 roots/shoot) and the longest roots (5.87 cm) when cultured on half-strength MS medium with 15 g/l sucrose. Plantlets were successfully acclimatized and transferred to the field with 60% survival rate.

Keywords: BAP, Chinese flame tree, Juvenile nodal explants, Mature nodal explants, Sucrose, Woody plants.

Studying the Safety of instant noodles sold in Alexandria hypermarkets

Eman Trabia¹, Hanaa Ismail², Samar Aborhyem²

¹ *Pharmacist in Medical Research Institute, Alexandria University.*
koramohamedigcse@gmail.com

² *Professor of food analysis, nutrition department, high institute of public health, Alexandria University.*

E-mail ismailhanaa@yahoo.com

² *Lecturer of food analysis, nutrition department, high institute of public health, Alexandria University.*

E-mail: samaraborhyem@yahoo.com

Abstract

Background: Noodles are one of the staple foods which turn out to be globally recognized food and its global intake is increased gradually. **Aim:** This study aimed to determine some safety parameters in noodles, spices, and liquid seasoning oil of instant noodles available in Alexandria hypermarkets **Material and methods:** A total of 95 packets were purchased including four main available brands of instant noodles. These samples were categorized as follow: Brand I produce 7 flavors, Brand II produce 3 flavors, Brand III produce 3 flavors, and Brand IV produce 2 flavors. The collected 6 packets of the same flavor in the same brand were homogenized and mixed well in a blender to obtain random and representative sample. Purchased samples have nearly the same expiry date. The following parameters were measured including aflatoxin content (B1, B2, G1 and G2), heavy metals (*Cd*, *Pb*, *Hg*, *As*) and oxidation potential of liquid seasoning materials. **Results:** all spices in all brands were free from mercury (Hg) except seafood and shrimp flavor, *Hg* content was 0.02-0.32ppm respectively, while the higher content in cadmium (cd) were 0.42 and 0.36 ppm in shrimp flavor in brand IV and II respectively, which were higher than the Egyptian Standards (ES) (0.2 µg/g). Processed tomato flavor had highest contamination of AFB1 (5.1 ppb) which higher than ES (5 ppb), while sum of Aflatoxins in brand II was 10.74 ppb which higher than (ES) (10 ppb). Brand IV Creamy Shrimp flavor, and Brand I Special chicken flavor had the highest iodine value 2.86 ± 0.04 and 1.45 ± 0.02 respectively, while Brand I Vegetable flavor and Brand I Special chicken flavor had the highest acid value 5.8 ± 0.03 and 4.6 ± 0.03 respectively. Survey study is needed to calculate the limit of safe intake with respect to body weight on short and long term consumption especially in school children, teenagers as they are the highest consumers for noodles. In addition extensive studies needed on experimental animals to evaluate noodles safety and health hazards with consumption of spices and liquid seasoning.

Keywords: Noodles, Heavy metals, Aflatoxins, Rancidity Parameters, Safety.

Ultrastructural Alternations in Ova of *Diplodus sargus*. (Perciformes) during artificial induced spawning.

Fahmy, A.,F., Moharram, S. G., El-Greisy,Z.A

National Institute Of Oceanography & Fisheries, Alexandria

Abstract

This study was carried out to investigate the ultrastructure alternations induced by hormonal injection in the ova of the White sea bream , *Diplodus sargus*, during the spawning season by using two hormones Epigonal and GtRH. In control fish as reached maturity, the structure of the cortical alveoli was exclusively filamentous. Yolk globules were homogeneous. The structure of the zona radiata of ripe oocytes consisted of two layers, and an additional reticular network structure was formed on the inside of the zona radiata. The surface of the zona radiata externa maintains a compact homogenous structure with a uniform distribution of almost round pores. Ova of injected fish with Epigonal and GtRH showed completely disappearance of zona radiata externa layer, hypertrophied follicular epithelial cells with pyknotic nuclei. Follicular epithelial layer showed cells hypertrophy and hyperplasia, increased number of mitochondria and appearance of vacuoles of variable size in granulosa layer and shrinkage of its nuclei losing its normal shape. Granulosa became hypertrophied. Dilation in granulo layer, increasing of mitochondria and completely disintegration and degeneration of granulosa cell were observed. The diameter of ripe ova of control was 287.7 μm while the diameter injected fish with epigonal and GtRH was 383 and 191 μm respectively.

Assessment of Some Biochemical Parameters and Dielectric Relaxations In β -Thalassemic Children.

Yasser Khedr¹, Metwally Kotb², Samir Abd El-Kaream³, Omar El-Bayady⁴

¹ *Physics Dept, Faculty of Science, Damanhur University, E-mail:yasserkhedr2001@yahoo.com*

² *Medical Biophysics Dept., Medical Research Institute, Alexandria University, E-mail:
metkotb45@gmail.com*

³ *Applied Medical Chemistry Dept., Medical Research Institute, Alexandria University*

⁴ *Chemist at Medical Lab,Zagazig Hospital, Ministry of Health, E-mail:amr_love_22@yahoo.com*

Abstract

Background: Thalassemias, are considered a group of inherited disturbances or blood disorders characterized by formation of abnormal hemoglobin. *B*-thalassemia is the most familiar type of thalassemia worldwide and in Egypt. *B*-thalassemia is classified into three categories; minor thalassemia, intermediate thalassemia, and major thalassemia. Minor thalassemia resemble anemia with mild iron-deficiency, while the third is the more severe, where patients with major thalassemia need regular blood transfusion to be alive and for the quality of life. Intermediate thalassemia, show mild to moderate anemia without the need for regular blood transfusion therapy. So, it was of value to compare between the three types of *B*-thalassemia on the bases of some biochemical parameters and dielectric properties of the thalassemia blood in the frequency range up to 5 MHz. **Subjects and Methods:** Sixty children with *B*-thalassemia were involved, divided into three equal groups of the three types of thalassemia, in addition to an equal group of control. All children were subjected to thorough clinical examination, hemoglobin electrophoresis, complete blood picture "CBC", serum (ferritin, urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, Glutathione-S-Transferase (GST), Total Antioxidant Capacity (TAC), Catalase Assay (CAT), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Reductase (GR), Glutathione peroxidase (GPx), Lipid Peroxide (Malondialdehyde; MDA), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), total/direct bilirubin, and serum albumin. Dielectric parameters, including; conductivity, permittivity, and dielectric impedance were also considered. **Results:** Significant changes were found between thalassemia blood and the control, especially with the case of major thalassemia. Dielectric relaxations were also detected in thalassemia blood indicating possible changes in the RBCs membrane of thalassemia blood due to possible variations of the surface charges on the RBCs membrane, due to the reduction of glycoprotein sialic acid content. The results were discussed. **Conclusion:** The data of the present work reveal significant variations in the biochemical and dielectric properties of the blood of the three categories of thalassemia and with the control which may be of value in treatment of thalassemia children.

Keywords: thalassemia, Antioxidant, Dielectric parameters

Inhibition of Hepatitis C Virus and Hepatitis B virus by mushroom lectins

Yousra A. El Maradny¹, Esmail M. El-Fakharany², Marwa M. Abu-Serie³, Mona Hashish¹, Heba Selim¹

^{1.} Microbiology Department, High Institute of Public Health, Alexandria University, Alexandria, Egypt., hiph.YMaradny@alexu.edu.eg, monash64@alexu.edu.eg, drhebaselim@yahoo.com

^{2.} Protein Research Department, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, City for Scientific Research and Technology Applications (SRTA-City), New Borg EL-Arab, Alexandria, Egypt, esmailelfakharany@yahoo.co.uk

^{3.} Department of Medical Biotechnology, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, SRTA-City, New Borg EL-Arab, Alexandria, Egypt., marwaelhedaia@yahoo.com

Abstract

The attention to edible mushrooms was increased after the World Health Organization (WHO) recommended integrating the traditional and complementary medicines (T&CM) in essential health practices. *Agaricus bisporus* (white, and brown mushroom) and *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) is the most largely grown and consumed mushrooms in many countries. Mushrooms are known to produce many kinds of bioactive compounds including lectins, peptidoglycans, steroids, vitamins, polysaccharides, phenolic compounds, etc. Mushroom lectins are known to exhibit potent antiviral activities against many viruses with glycosylated surface proteins, till now, the mechanism(s) by which these carbohydrate-binding proteins exert their antiviral activities are not well understood. Novel antiviral therapies could be discovered from these lectin-glycan interactions, which could eliminate the spread of viral infection by targeting the adherence stage of viruses. Infections with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are among the leading causes of chronic liver disease worldwide. This study provides information about the procedure of purification, hemagglutination activity, carbohydrate specificity and characteristics of isolated lectins from *A. bisporus* white, and brown, and oyster mushrooms. Here, we tested the antiviral properties of the isolated lectins against HBV in HepG2 cells and HCV (genotype 4) in Huh 7 cells, as well as their binding properties towards viral particles, and target cells. Using infectivity assays, the best HBV blocking IC50 value was for *A. bisporus* brown lectin (ABL B) $0.035 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$, while neutralization for *A. bisporus* white lectin (ABL W) was $0.60 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$. In addition, ABL W showed the best HCV blocking and neutralizing activity with IC50 values of $3.13 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ and $1.48 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$, respectively. Additionally, *P. ostreatus* lectin (POL) was the best binding % to CD81 $58.80 \pm 3.18 \%$, ABL B was the best targeting to the scavenger receptor class B type I (SR-B1) with IC50 of $448.1 \pm 13.2 \text{ ng/ml}$. While the best inhibitor of HCV-NS3 (non-structural 3) protease was POL with IC50 of $878.72 \pm 16.3 \text{ ng/ml}$ and the best anti-HBV-polymerase was ABL B with

IC50 of 328.268 ± 9.71 ng/ml. Our findings offer vital insights into the mechanisms by which lectins inhibit HBV and HCV infection.

Keywords: Mushrooms, lectins, hepatitis B virus, hepatitis C virus, viral inhibitors.

Identification of a Common Novel Mutation in Libyan Pediatric Patients with Congenital Metabolic Disorders at Selected Pediatric Hospitals

Eman Gusbi¹, Rahma Abuoun², Nada Elgrw¹, Nabil Elnattah¹, Kamila Rafifi³, Abdulla Bashein³ and Abdurrauf Gusbi²

¹*Biotechnology Research Center, Libya*

²*Tripoli University Faculty of Pharmacy, Tripoli-Libya*

³*Tripoli University Faculty of Medicine, Tripoli-Libya*

Abstract

BACKGROUND: The magnitude of genetic disorders and birth defects in Libya is underestimated. The genetic mutations underlying a large number of these disorders have not yet been determined including Phenylketonuria (PKU). We study the genetic health conditions of selected families positively diagnosed with PKU to perform genetic family screening and detect the variations in mutations on exons of phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and highlight the potential effect of consanguineous marriage in predisposition of inherited metabolic disorders.

METHODS: All the children screened through first line investigations and then the confirmed diagnostic tests carried out using tandem mass spectrometer. Saliva samples collected from the affected families using FTA card. Genomic DNA from each individual was extracted according to standard protocol using the Qiagen Amp DNA Mini Kit and screened for mutations by quantitative PCR amplification of the entire PAH gene, including all 7, 10 and 12 exons by using primer analysis. **RESULTS:** The total number of five PKU families is 24 individuals, 9 of them have positive diagnosis of PKU. One family has mutation on exon 12 of PAH gene and this can be considered a novel mutation because it's not common in Libya. Two unrelated families have E280K mutations of PAH gene located on exon 7. While the other two families showed a negative result of mutational analysis of PAH gene for exon 7, 10 and they are still under further investigations. In addition, all the families that candidate in this study have consanguineous marriage.

CONCLUSION: We confirm the heterogeneity of mutations at the (PAH) locus within pediatric patients and emphasize on raising the awareness of decision makers toward introducing different preventive programs, including Prenatal Screening for chromosome abnormalities. It's strongly

recommended to encourage the genetic researcher in this field because it became very clear worldwide, the origin of inherited metabolic disorders is purely genetic.

Keywords: Gene mutation, chromosome abnormalities, genetic disorders

Impact of primary sedimentation tank on wastewater treatment plant units using computer simulation program

Ahmed M. Hussein ¹, Dhiaa Neama Jabbar ², Shereen Qasim Abdulridha ³

Civil Techniques Department, Babylon Technical Institute, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Iraq

¹amh.eng85@gmail.com , inb.ahd@atu.edu.iq

²dhiaanj@yahoo.com , inb.dya@atu.edu.iq

³inb.sh.qasim@atu.edu.iq

Abstract

This study presents a computer program designed in Visual Basic 6 program. The capability of this program is to design wastewater treatment plant units and determination of its construction cost.

The program deals with two types of wasted sludge the first type is wasted sludge from the aeration basin, while the second system is wasted sludge from the secondary clarifier. Also, there is a detailed output shows the design flowrate, mass balance analysis and composition of each stream in and out of each treatment unit. Program results are verified with hand calculations within the allowable recommended values and they showed a good accuracy.

The volume of aeration basin and secondary sedimentation tank increased with the elimination of primary sedimentation tank from the design of the wastewater treatment plant. Generally, an increment of about (52 – 170) % for aeration basins and (58-185) % for secondary sedimentation tanks are observed in the present study. From other hand, gravity thickener volume is decreased by (29 - 42) %, anaerobic digester volume is decreased about (38 - 52) % and drying beds is decreased by (29 - 38) % approximately.

The cost analysis showed that the cost of a wastewater treatment plant is increased after a certain amount of influent. That amount is nearly (36,708.33) m³/d when wasted sludge is taken from aeration basin and (24,833.33) m³/d when wasted sludge is taken from secondary clarifier.

Keywords: Sedimentation tank, Wastewater treatment,

Study the viability of some bacterial species isolated from contaminated soils on the manufacture of nanoparticles

Eman Mohammad Taher , Dalia Abdulelah Mohammad , Najla Ahmad Suleiman

University of Mosul /college of science/department of biology, Iraq

Abstract

Researchers in nanoparticle manufacturing have recently turned to biomanufacturing to reduce silver ions into silver nanoparticles because these microorganisms work as ecofriendly nanofactories, which were controlled on the size and shape of manufactured nanoparticles, this technique can occur either inter the cellular structure or extracellular structure, but the extracellular synthesis is cheaper and require simple processing technique .Therefore, in the current study bacterial strains isolated from contaminated soil with motor oil were selected to synthesize silver nanoparticles by extracellular method at 37C° for (72-168)hours. The result of fabrication was observed by the shift in thecolor of reacted solution into yellowish brown and confirmed the fabrication of Ag NPs by UV-Visible spectroscopy that measured the absorption spectra of Ag NPs which was located between (404 -444) nm. Also,FITR analysis was used to determine the functional groups of bacteria that participated in the reduction of Ag⁺ into Ago through notice the presence of band located between (3344-3310) cm⁻¹ related to NH(Amide) and the presence of bandbetween(1633-1636) cm⁻¹ assigned to C=O(carbonyl amide). Finally, AgNPs fabricated by supernatant of Bacillus strains when reacted with 3mM AgNO₃ solution showed more effective against Staphylococcus aureus than E. coli.

Keyword: *Bacillus spp.*, Extracellular Biosynthesis of Ag NPs, UV-Visible Spectroscopy ,FITR ,Antibacterial activity.

Toxic Effect Of Pendimethalin and UV-C Radiation On Germination and Corn Growth Seedling

Nahla Salim Hammok

Environmental Researches center/University of Mosul/ Iraq.

e-mali:Nahlahammok@yahoo.com

Abstract

Pendimethalin (PM) is pre-emergence herbicide for weed control in corn crop. which high doses gave more damage to crop. UV-C radiation is important factor in ecology which its level increase as the result of Ozon layer imbalance ,so the objective of this experiment was to determine the damage or toxicity of tow factor on corn Seedling. . The experiment tested in the laboratory with two factors ,the first was herbicide dose (0.0 , 1.4 , 2.8 ,4.1ml/L) which equal to the dose in field a (0.5 , 1, 1.5 L/Donme) while the second factors was seed corn treated with UV-C radiation in different time (0.0 ,30 ,60 ,120 minet) it used CRD disigne .the percentage of germination was taken after four and seven days.

The results showed a significant decrease in the: percentage of germination after seven days ,shoot , root length(cm) and survival rate of the seedling at all doses of herbicide. except the germination percentage after four days and seedling fresh weight where the results were not significant .Also maristimic tissue were distend and deformities while appeared from low concentrations and this distinguishes the (pm) herbicide from the remnant of the herbicides studied. UV-C had reduced germination percentage of seeds exposed to different periods and all studied traits also more hair root on radical had seen with increase shoot length(mutant). On other hand corn seeds which exposit to radiation did not infect with fungus during the experiment. The interaction (herbicide x radiation) gave a significant effect on reducing all parameters of the seedling.

Keywords: Herbicide , UV-C radiation , ZeamaysL. , Germination , Pendimethalin.

Evaluation of seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in diverse subsets of wheat

Louriki, S^{1,2}, Al Jaboobi¹, M., Amri, A¹., Douira, A²., Rehman, S¹.

¹ Biodiversity and Crop Improvement Program, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Rabat, Morocco

² Laboratory of Botany, Biotechnology and Plant Protection, Ibn Tofail University, Kenitra, Morocco

Abstract

Septoria tritici blotch (STB), caused by the fungus *Zymoseptoria tritici*, is a devastating foliar disease affecting durum and bread wheat cultivation worldwide. Growing resistant cultivars is a preferred approach to managing this disease, and novel STB resistance genes are needed for new cultivar development. This study aims at the identification of effective sources of resistance to STB within 517 wheat genotypes, including association mapping panel developed by ICARDA breeders (377 accessions), Focused Identification of Germplasm Strategy (FIGS) subset (105 accessions) and wild relatives (35 accessions). Wheat genotypes were evaluated at seedling stage under controlled conditions and a range of reactions was observed, with 50 and 44 highly resistant and resistant genotypes respectively, and 280 susceptible genotypes. The resistant germplasm accessions identified in this study could be excellent potential candidates to be employed in wheat resistance breeding programs.

Keywords: *Septoria tritici* blotch, FIGS, wild relatives, sources of resistance, seedling stage.

Effective treatment of oil spills by adsorbent formed from chitin and polyurethane foam.

Trang Tran Y Doan ¹, Zenhitova Liubov Andreena ²

¹*Department of Synthetic Rubber Technology, Kazan National Research Technological University,
Tatarstan, Russia*

tydtrang@gmail.com

²*Department of Synthetic Rubber Technology, Kazan National Research Technological University,
Tatarstan, Russia*

liubov_zenitova@mail.ru

Abstract

Currently, one of the most serious environmental problems is water contamination by oil spills. Using sorbents are considered as one of the most promising approaches to treatment this problem. In this study, polyurethane foam was used as a basal body material and chitin was used as filler for the purpose of decreasing the cost for the sorbent. The technological parameters of the synthesis process and heat resistance of the new adsorbent were investigated. Three oil-water phases: distilled water, artificial sea water and artificial river water were tested about oil adsorption capacity of PU10M in the ranges contact time from 5 to 120 min. The results showed that PU10M also has high heat resistance, up to 300⁰C it only lost up 5% of the mass. There was almost no too large difference in the technological parameters of the synthesis process between the sorbent material using chitin and the primitive PUF. At the same time, the combined adsorbent PU10M reached the high oil adsorption capacity in all three oil-water phases; oil adsorption capacity was 13,78 g in distilled water; 14,96 g in artificial sea water and 14,46 g in artificial river water, respectively. The removal percentage obtained about 55-59%. Therefore, the new combined sorbent PU10M was a viable adsorbent with many advantages that can be widely used for oil spills removal.

Keywords: Oil spills, adsorption capacity, adsorbent, chitin, polyurethane foam.

Detection of IL18 AND HSP70 LEVELS IN SERUM OF PATIENTS WITH ASTHMA

Zainab Nasser Nabat*, BareqA.ALateef, Entsir marzoq

¹Babylon Technical institute/ AL-Furat AL Awsat Technical University, 51015 Babylon, Iraq

Corresponding Author:zainabnasser1989@gmail.com

inb.znb3@atu.edu.iq

Abstract

The current study included 5ml blood were collected from 100 patients with asthma and 100 controls. Who admitted to Hila General teaching hospital and margin hospital through the period from October 2017 to April 2018. The study deals with detection of cytokines concentration IL-18 showed increased at in concentration especially in age group (12-21years) years and reached reach 314.777pg/ml compared to control group. HSP70 showed increase in their concentrations in asthma patient than in controls especially at age group (12 – 21 years) years which reached 117pg/ml. The patient samples were applied to determine some parameters include (Hb, RBCcount, WBC & Eosinophil count) .The results revealed that the mean Hb and RBC levels for asthmatic patients were lower than control (8.5000±4.65855g/dL, 10.9979±4.09533g/dL, 6.5000±4.07999310x12/l, 3.5183±6.0721610x12/L) respectively.

In this study the patients suffered from Iron deficiency anemia and nutritional deficiency. While leukocyte and Eosinophile count values were higher than normal (8.5000±4.65855g/dl, 10.9979±4.09533g/dl).

Keywords: Asthma, IL18, HSP70

Harmonic Reduction of a Synchronous Generator in a Wind Energy System

Ameer Aqeel Kamoona¹, Ahmed Najm alfadli², Israa Ali Alshabeeb¹, Ali Salah AlKhafaji¹

¹*Computer System Department, Babylon Technical Institute, Al-Furat Al-Awsat
Technical University, 51015 Babylon, Iraq
Inb.amer@atu.edu.iq, inb.esr@atu.edu.iq*

²*Ministry of Education
goldenpower98@yahoo.com*

Abstract

Among the various sources of renewable energy, wind power is one of the fastest growing and most promising sources of electricity in the world. In this paper, a design of the single tuning filter is proposed to reduce the total harmonic distortion of a synchronous generator (SG) in wind energy system. The simulation results show that the proposed design eliminates effectively a **7th** harmonics, and the wave form output of voltage and current are in low Total Harmonic Distortion (THD). The proposed design improves the power quality, in addition to the improving of the power factor which reduces the losses of the power and enhance the generator performance at the abnormal condition.

Keywords: Wind Energy, Harmonic Reduction, Synchronous Generator (SG), Total Harmonic Distortion (THD).

An Integrated Framework to Measure Urban Sustainability in the Case of Small and Medium Urban Centers Case study: The Nile Delta, Egypt

Mariam Zaki Mohamed^{1*}, Mahmoud Adel Hassaan¹, Saleh Mesbah Elkaffas²

¹*Institute of Graduate Studies & Research (IGSR), Alexandria University, Egypt*

²*Arab Academy of Science, Technology and Maritime Transport (AAST), Egypt*

* m.zaky.mm@gmail.com

Abstract

Urban areas contribute largely to promoting human socio-economic activities, meanwhile, they have a wide range of negative external impacts on the environment and its ecosystems. Sustainability is crucial in the case of urban areas that accommodate high densities of population and economic activities consuming massive quantities of energy and natural resources and generating waste materials and pollutants.

Urban sustainability has multi-dimensional nature including various economic, social and environmental aspects. The interrelationships between these three dimensions determine the degree at which natural and man-made capital are substituted. Assessing urban sustainability should consider various social, economic and environmental interrelationships between the city and its surrounding. For this purpose, a number of sustainable development indicators was introduced since mid-1990s.

This paper is intended to develop an integrated framework for assessing urban sustainability highlighting different dimensions of sustainability and reflecting the local conditions of Egyptian urban areas. To validate the suggested framework, an urban sustainability composite index was developed and applied to small and medium urban centers in Kafr EL Shiekh governorate, Egypt.

The application of the proposed urban sustainability index revealed different levels of sustainability. The variations in urban sustainability were explained and interpreted as a function of a number of sociodemographic, economic and environmental determinants.

Keywords: Urban sustainability, composite indices, The Nile Delta.

Full Papers

Investigation of copper metal presence in cattle fodder, milk, hair and manure in Malta

Hend Abeidi¹, David Suda², Everaldo Attard³, Emmanuel Sinagra⁴

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malta, Msida, MSD2080, hend.abeidi.16@um.edu.mt

²Department of Statistics and Operation Research, Faculty of Science, University of Malta, Msida, MSD2080,
david.suda@um.edu.mt

³Division of Rural Sciences and Food Systems, Institute of Earth Systems, University of Malta, Msida, MSD2080,
everaldo.attard@um.edu.mt

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malta, Msida, MSD2080,
emmanuel.sinagra@um.edu.mt

Abstract: This study investigated the concentration of copper (Cu) present during the lifecycle of cattle in Malta to determine how metals enter and exit the animal, and their impact via the food chain on the human consumer. The determination of Cu in 10 cows from a dairy cattle farm located in Salina, Malta was estimated by taking milk (100), hair (100), fodder (15) and manure (10) samples over 10 weeks between September and November 2016 and their Cu concentration was determined using atomic absorption spectroscopy. Conventional methods were used to prepare all these samples. Cu concentration in milk samples showed high levels (0.02 to 0.07mg/L) which is higher than the maximum level recommended (0.01mg/L) by FAO and WHO. Cu concentration was significantly higher in summer than in autumn. However, hair samples results (3.04–6.88mg/kg) did not provide a clear impact by season. The concentration of Cu in different fodder types varied significantly (1.08–16.06 mg/Kg). Manure Cu concentrations ranged from 10.70 to 16.63 mg/kg but there were no distinctions between weeks or seasons. Considering the discrepancy of copper concentrations at inputs (feed) and outputs (manure, hair, milk) for a dairy cow, it can be concluded that there are other factors contributing to the copper concentration within the cow system.

Keywords: copper, seasons, dairy, heavy metals; toxicity, atomic absorptionspectrophotometry.
DOI : doi.org/10.46617/icbe6001

1) Introduction

Heavy metals are known to be highly reactive and can be toxic even at low concentrations [1]. Although naturally occurring in the environment, anthropogenic activities, such as mining, smelting, transportation, military operations, industrial manufacturing and agricultural activities, result in the accumulation of pollutants in the environment. A typical example is the release of heavy metals from pesticides and fertilizer, leading to the contamination of the abiotic environment. These metals are transferred from the abiotic environment to the biotic ecosystems, with a build up along food webs leading to the consequential accumulation and toxicity in humans [2]. Environmental pollutants, including heavy metals, may reach target organs in humans both by ingestion[3] and by inhalation [4]. Heavy metals most commonly found to contaminate sites are lead (Pb), chromium (Cr), arsenic (As), zinc (Zn), cadmium (Cd), copper (Cu), mercury (Hg), and nickel (Ni).

The fate of heavy metals within a food chain is complex, which involves their movement through various different matrices and biological systems. Typically, the passage of heavy metals from

milk to humans involves a series of passages between different abiotic and biotic media. Some studies have raised concerns about heavy metal contamination of irrigation water used for fodder crop cultivation, pesticides and fertilizers, drinking water for cows, atmospheric pollution, amongst others [5-6-7]. These all lead to the accumulation of these metals in the cow's tissues [8-9] and hairs [10], a proportion of which may then be removed in urine, faeces, other excreta and milk [11]. In certain instances, soil is contaminated with heavy metals when it is amended with manure [12-13].

The copper status of dairy cows depends on various factors. Copper intake may be through fodder, water and environmental pollution. However, even though copper may be present in the diet, minerals such as Fe, Mo and S, may affect the uptake of copper by the cow. A low copper intake may result in elevated plasma copper and low copper content in milk [14]. Copper intoxication is emerging concern in dairy cows [15]. In fact, copper also alters lipid metabolism in dairy cows. In a study by Engle and coworkers a high copper dietary intake resulted in a decrease in polyunsaturated fatty acids in milk [16].

The aim of this study was to understand fate of copper within the dairy food chain, under intensive production in Malta, and also was to understand more about the complex pollution system under a pilot dairy setup. The final consumer within this food chain is the human.

2) *Materials and Methods*

Reagents and glassware

Ultrapure water (18 Ω) was used throughout the experimental procedure, using an Elga Purelab Classic purification system (Elga, UK). All reagents used were of an ultra-trace analysis grade. Hydrochloric acid, nitric acid and hydrogen peroxide were purchased from Fisher chemical (UK), and acetone and Triton X-100 from BDH (UK). A standard solution of copper was prepared by the dilution of certified standard solutions for AAS (1000 ppm) from (Mono-element, Indian).

All glassware and polyethylene material used were previously treated for at least 24 hrs in 10% nitric acid and rinsed with distilled water and then with ultrapure water, prior to use.

Sample collection

The samples were collected from a dairy cattle farm located in Salina, Malta. Ten cows (age from 2 to 6 years) were selected randomly from the herd representing the dairy population of this farm.

Milk and hair samples were collected from these ten cows, once a week over a period of 10 weeks starting from September 2016 until November 2016. A total of 100 milk samples and 100 hair samples were collected for analysis. Approximately 30 ml milk samples were collected in polyethylene containers immediately from individual dairy cows. The samples were frozen immediately and stored until further analysis. Containers of each sample were put in and frozen until they were ready to be prepared for analysis. Approximately 1 g hair samples were taken from the tails of individual dairy cows and stored separately in polyethylene bags. Over the same time, 15 fodder samples were collected once a week from different feed sources (table 2) on the farm. The fodder samples were taken and stored in polyethylene bags. Two manure samples were collected for every fortnight period, over the same time span. The samples were placed in

polythene bags, transferred to the laboratory and dried in an oven at 75 ± 5 °C [17]. The dried manure samples were stored separately in polyethylene bags.

Sample preparation

Milk samples were thawed and subsequently 3 ml were prepared for the digestion process. Prior to digestion, the hair samples were cut into approximately 0.5 cm pieces and mixed to allow a representative subsample of the cow's hair. The sample was then washed with 5% Triton X-100. These were then rinsed with distilled water and subsequently with ultrapure water. The samples were then rinsed three times with acetone [17-18-19], then dried in an oven at 75 ± 5 °C. 0.2 g of hair were taken from the dried sample for the digestion process. Fodder samples (Maltese hay and imported hay) were washed with ultra-pure water and dried at 105 °C in an oven. All the fodder samples (Maltese hay, imported hay, pellets and mixed seeds) were ground into a powder and passed through a 0.02 mm sieve. 0.2 g subsamples of the dried feeds and manure were weighed and then subjected to digestion.

Sample digestion

3 ml of each milk sample and 0.2 g of each hair, fodder and manure sample were transferred to Pyrex beakers. 5–10 ml of concentrated HNO₃ were added to the beakers, which were subsequently covered with a watch glass. The beakers were placed on an electric hot plate 70–80°C for 1–2 hours. Each digestate was then treated with additional 5 ml concentrated HNO₃ and a few drops of H₂O₂ and heated on a hot plate at about 80°C for another 1–2 hours until the colour of the digestion solution was a clear transparent yellow. When the resultant solutions cooled to room temperature, they were diluted up to a volume of 25 ml in volumetric flasks with ultrapure water [17].

Copper concentration determination

The concentration of copper was determined using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer (contraAA 700, Analytik Jena AG, Germany) and a calibration curve obtained from the standard solution (0.04, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 ppm), the AAS parameters used are shown in table 1.

Table 1 Measurement conditions for AAS

Element	Line	Wave length(nm)	Oxidant (air) (Kg/cm ²)	Fuel (acetylene) (Kg/cm ²)
Cu	Cu324	324.754	1.6	0.2

Data Analysis

The data for copper results in milk and hair for each cow were grouped into 5 fortnight period means. The data for fodder was grouped according to source and the data for manure was grouped according to same aforementioned fortnight periods. The Friedman test with Bonferroni post-hoc tests were conducted on milk and hair samples. The Kruskal Wallis test with Bonferroni post-hoc tests were conducted on fodder and manure. For fodder, milk, hair and manure, means and standard deviations for the relevant subcategories are given. Descriptive statistics and relevant statistical tests were all conducted using IBM SPSS Version 25.

3) Results and discussion

In livestock, copper is an essential microelement that is required to maintain health and immunity. Specifically, it is required for thyroid function, production and reproduction [20]. Cows with copper deficiency are susceptible to growth impairment, anemia, reproductive problems, bone fragility and diarrhea. This is typical of grazing animals, as the copper intake cannot be estimated [21]. However, high Ca, Zn and Fe dietary intake may lead to a decrease in copper absorption. Copper intoxication can also occur from feed formulation errors. Toxicity may be exhibited as intravascular haemolysis and methaemoglobinemia, susceptibility to secondary infections and debilitations, and poor milk production and morbidity [22]. Other studies have shown that copper can cause subclinical intoxication. Although in Malta, signs of copper toxicity are rarely encountered in cows, this issue should not be underestimated, especially in cases where producers are rearing cows and sheep. In most cases, sheep are more likely to respond to copper toxicosis than cows [23]. Other causes of copper intoxication can occur in areas contaminated with heavy metals industrial emission. In a study by Skalicka, Korenekova and Nad on the determination of copper levels in bovine situated 5.5 km from a metallurgical plant, it was found that contaminated pasture contributed to higher mean Cu level in cow tissue samples [24].

Feeds

In this present study a number of individual feeds and fodders were analysed individually (Table 2). It was observed that the main copper contributor is the special dairy concentrate with a value of 16.06 mg/kg, and mixed seeds the least with a value of 1.08±0.07 mg/kg. The former, however, only contributed to 19.7 % of the total ration. Taking the ration composition as quoted by Agius and coworkers [25], the total copper composition of the ration in this study is 6.18 mg/kg (Table 3). The dietary copper concentration should be around 15.70 mg/kg of ration [26]. Several studies have shown feed copper concentrations ranging between 0.3 and 141.4 mg/kg [27-28-29]. A cow that consumes between 9-18 kg of ration, the copper daily intake would be around 56 – 111 mg. For a 650-kg cow, the estimated dietary copper requirement is 313 mg/day [26]. This shows that the local cows are not receiving the optimum dietary copper intake. However, one should take into account also intake of copper from other sources. It is likely that from this source, copper intoxication is not an issue. In a study, a copper concentration of 400-500 mg/kg of the whole ration resulted in morbidity and mortality in dairy [22]. Chronic copper intoxication can occur at concentrations higher than 12 mg of Cu/kg of body mass per day [30].

Table 2. The Cu content for different fodder types (mg/kg)

	Imported hay	Maltese hay	Mixed corn	Small pellets	Large pellets	Mixed seeds	Dairy pellets
N (Cases)	3	3	2	2	2	2	1
Mean±SD	4.93±0.751	3.73±0.224	9.81±0.774	7.33±0.837	2.83±0.844	1.08±0.069 [†]	16.06 ^a

[†]statistically different from other levels at $p < 0.1$, ^aonly based on a single observation and not included in the analysis

Table3. A typical ration composition [25] and the contribution of different feeds and fodder to the copper concentration in the ration.

	%DM	Mg Cu per kg ration
Imported Hay	21.37	1.054
Straw(Local)	5.79	0.216
Crushed Maize/Mixed seeds	7.54	0.458
Normal dairy Pellets	45.6	1.290
Special dairy Pellets	19.7	3.164

Milk

As a microelement, copper is found in relatively small amounts in milk [31]. The copper content of milk as recommended by the National Research Council is 0.15-0.20 mg/L of milk [26]. In this present study, most values obtained for copper concentration in milk (0.02-0.06 mg/L) were lower than this recommended (Table 4), particularly in later (autumn) periods. Pilarczyk and coworkers [32], in a study on Simmental and Holstein–Friesian cows from an organic farm, found particularly low Cu concentrations amounting to 0.04 and 0.05mg/L, respectively, indicating the deficiency of this element in animals and thus in the environment and feed, typical of extensive systems. Several studies show copper concentrations below 0.07 mg/L [33-34-35]. In a local study [36], the Cu milk content for cows was 0.23±0.13 mg/L which goes in accordance with the findings of Bresci and coworkers (0.31-0.32 mg/L)[37]. Al-Wabel found a level of 1.88 mg copper per litre of milk [38]. In another study, the level copper in milk from cows fed on a conventional diet and hydroponic fodder [25], the mean Cu contents were up to 0.75 mg/L, during a 4-week trial. The values found agree with results of Meshref who found Cu values equal to 0.6 mg/kg [39]. Moreover, Bilandžić reported Cu concentrations ranging from 0.10 to 0.90mg/L [40].

Hair

Cu contributes to the formation of keratin and melanin, of which there are two types; eumelanin, giving the brown-black coloration and pheomelanin, giving the yellow-red coloration [41]. There is an initial oxidation reaction between the copper-protein enzyme tyrosinase and tyrosine [42]. In present study (see Table 4 for full results), the mean copper concentration in hairs was 4.80 mg/kg, with significant period-to-period variation. This is much lower than those quoted by Dorn and coworkers, i.e. 7.33- 7.74 mg/kg [43].

Table 4. The Cu content for milk (mg/L), hair and manure (mg/kg)

Period	1	2	3	4	5
Milk	0.07±0.05***	0.06±0.02***	0.04±0.01	0.02±0.02***	0.02±0.01***
Hair	3.04±1.21***	6.88±4.43***	5.83±2.34***	4.29±0.84 [†]	3.98±2.19*
Manure	12.20±2.77	10.70±1.98	16.63±7.64	10.49±3.81	15.06±1.16

statistically different from other levels at $p < 0.001$ ***, $p < 0.01$ ** , $p < 0.05$ *, $p < 0.1$ [†]

Manure

The accumulation of copper in manure may contribute to copper passed on to ground water and soil which then can become available to crops and fodder crops [44]. Accumulation of copper in soil is much higher with dairy manure amendment than with manure from other farm animals [45]. Cows eliminate excess copper into faeces (manure). In most cases, cow manure is used as an organic fertilizer in situations where soil amendment is deemed necessary, hence enriching the soil with important minerals. In fact, in a study by Moscuza and coworkers, it was deduced that forage was enriched with micronutrients when manure was used during the cultivation of the fodder crops [46]. Several studies have shown manure copper concentrations ranging between 31.80 and 1726.30 mg/kg [27-28-29]. In this present study, the copper concentration of manure reached a maximum of 16.63 ± 7.637 mg/kg (Table 4), which is on the lower end of the range, quoted in other studies. A cow produces approximately 29.5 kg of manure daily. The copper lost in faeces by a cow is 383.972 mg daily (Figure 1).

In conclusion, Figure 1 provides an overview of the copper contribution of feed, manure, hair and milk as input and output parameters within the cow system [47,48]. It can be observed that the input of copper from feed does not tally to the output of copper through manure, hair and milk. A high copper concentration was expressed in manure as compared to all other input/output parameters. This may be due to the copper entering the system through other inputs parameters and/or copper accumulation and release from outputs. This provides the basis for further research taking into account more inputs, such as drinking water and atmospheric pollution and other outputs such as urine in liquid manure.

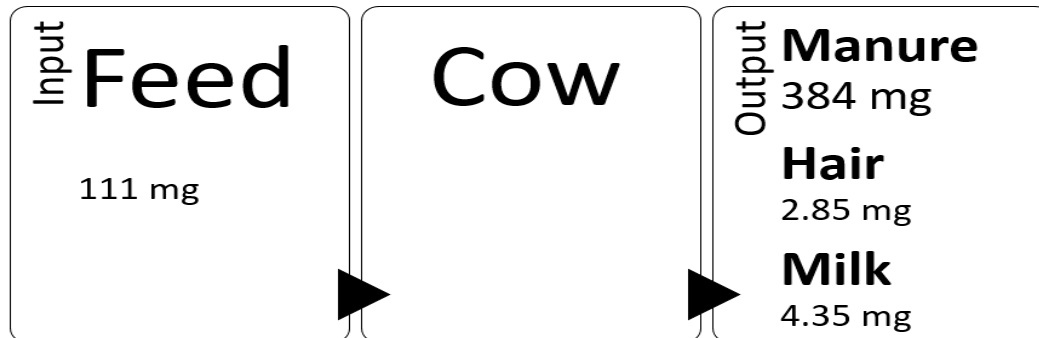


Figure 1. The input and output parameters considered in this study, and the copper contribution of each parameter on a daily basis.

4) References

- [1] Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182. doi:<https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>.
- [2] De Vries, W., Groenenberg, J. E., Lofts, S., Tipping, E. and Posch, M., 2013. Critical loads of heavy metals for soils. Heavy metals in soils (pp. 211-2) *Springer* 37.
- [3] Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y., Huang, Y. and Zhu, Y., 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152(3), 686-692.
- [4] Brauer, M., Hoek, G., Van Vliet, P., Meliefste, K., Fischer, P. H., Wijga, A. and Kerkhof, M., 2002. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(8), 1092-1098.
- [5] Javed, I., Jan, I., Muhammad, F., Khan, M. Z., Aslam, B. and Sultan, J. I., 2009. Heavy metal residues in the milk of cattle and goats during winter season. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), 616-620.

- [6] Nazir, R., Khan, M., Masab, M., Rehman, H. U., Rauf, N. U., Shahab, S. and Rafeeq, M., 2015. Accumulation of heavy metals (Ni, Cu, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe) in the soil, water and plants and analysis of physico-chemical parameters of soil and water collected from Tanda Dam Kohat. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(3), 89.
- [7] Rajaganapathy, V., Xavier, F., Sreekumar, D. and Mandal, P. K., 2011. Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: a review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(3), 234-249.
- [8] Jukna, C., Jukna, V. and Siugzdaite, J., 2006. Determination of heavy metals in viscera and muscles of cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 9(1), 35-41.
- [9] Nwude, D. O., Okoye, P. A. C. and Babayemi, J. O., 2011. Assessment of heavy metal concentrations in the liver of cattle slaughter during three different seasons. *Res J Environ Sci*, 5(3), 288-294.
- [10] Patra, R. C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Nandi, D., Shekhar, P. and Ali, S. L., 2007. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(1), 127-131.
- [11] Li, J., Xu, Y., Wang, L. and Li, F., 2019. Heavy metal occurrence and risk assessment in dairy feeds and manures from the typical intensive dairy farms in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(7), 6348-6358.
- [12] Sinclair, L. A., Hart, K. J., Johnson, D. and Mackenzie, A. M., 2013. Effect of inorganic or organic copper fed without or with added sulfur and molybdenum on the performance, indicators of copper status, and hepatic mRNA in dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(7), 4355-4367.
- [13] Sinclair, L. A., Johnson, D., Wilson, S. and Mackenzie, A. M., 2017. Added dietary sulfur and molybdenum has a greater influence on hepatic copper concentration, intake, and performance in Holstein-Friesian dairy cows offered a grass silage-rather than corn silage-based diet. *Journal of dairy science*, 100(6), 4365-4376.
- [14] Morales, M. S., Palmquist, D. L. and Weiss, W. P., 2000. Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 2105-2111.
- [15] Bidewell, C. and Livesey, C., 2002. Copper poisoning: an emerging disease in dairy cattle. *State Veterinary Journal*, 12(2), 16-19.
- [16] Engle, T. E., Fellner, V. and Spears, J. W., 2001. Copper status, serum cholesterol, and milk fatty acid profile in Holstein cows fed varying concentrations of copper. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2308-2313.
- [17] Afridi, H. I., Kazi, T. G., Jamali, M. K., Kazi, G. H., Arain, M. B., Jalbani, N. and Shar, G. Q., 2006. Analysis of heavy metals in scalp hair samples of hypertensive patients by conventional and microwave digestion methods. *Spectroscopy Letters*, 39(2), 203-214.
- [18] Assarian, G. S. and Oberleas, D., 1977. Effect of washing procedures on trace-element content of hair. *Clinical Chemistry*, 23(9), 1771-1772.
- [19] Salmela, S., Vuori, E. and Kilpiö, J. O., 1981. The effect of washing procedures on trace element content of human hair. *Analytica Chimica Acta*, 125, 131-137.
- [20] Yattoo, M. I., Saxena, A., Deepa, P. M., Habeab, B. P., Devi, S., Jatav, R. S. and Dimri, U., 2013. Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary world*, 6(12), 963. doi:http://dx.doi.org.ejournals.um.edu.mt/10.14202/vetworld.2013.963-967.
- [21] Khan, Z. I., Ashraf, M., Al-qurainy, F., Ahmad, K., Gondal, S. and Fardous, A., 2011. Studies on the transfer of copper from soil to pastures at different sampling periods: A case study of a semiarid region (sargodha) in pakistan. *Biological Trace Element Research*, 141(1-3), 126-30.
- [22] Perrin, D. J., Schiefer, H. B. and Blakley, B. R., 1990. Chronic copper toxicity in a dairy herd. *The Canadian Veterinary Journal*, 31(9), 629.
- [23] Christodouloupoulos, G. and Roubies, N., 2007. Diagnosis and treatment of copper poisoning caused by accidental feeding on poultry litter in a sheep flock. *Australian Veterinary Journal*, 85(11), 451-453. doi:10.1111/j.1751-0813.2007.00186.
- [24] Skalicka, M., Korenekova, B. and Nad', P., 2005. Copper in livestock from polluted area. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(4), 740-744.
- [25] Agius, A., Pastorelli, G. and Attard, E., 2019. Cows fed hydroponic fodder and conventional diet: effects on milk quality. *Archives Animal Breeding*, 62(2), 517-525.
- [26] National Research Council. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. *Seventh Revised*. <https://www.nap.edu/read/9825/chapter/8#133>
- [27] Nicholson FA, Chambers BJ, Williams JR, Unwin RJ., 1999. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology*, 70(1):23-31.
- [28] Cang L, Wang YJ, Zhou DM. and Dong YH., 2004. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. *Journal of Environmental Sciences*; 16(3):371-4.
- [29] Xiong, X., Yanxia, L., Wei, L., Chunye, L., Wei, H. and Ming, Y., 2010. Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(11), 985-990.
- [30] Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 63:277-288.
- [31] Gaucheron, F., 2011. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination, *Journal of the American College of Nutrition*, 30 (5), 400S-409S.
- [32] Pilarczyk, R., Wójcik, J., Czerniak, P., Sablik, P., Pilarczyk, B., and Tomza-Marciniak, A., 2013. Concentrations of toxic heavy metals and trace elements in raw milk of Simmental and trace elements in raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from organic farm, *Environ. Monit. Assess.*, 185, 8383-8392.

- [33]Sola-Larrañaga, C. and Navarro-Blasco, I., 2009. Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of navarra, spain. *FoodChemistry*, 112(1), 189-196.
- [34]Perween, R., Bhutto, A., Ara, D., Shaukat, S. S. and Haq, Q., 2013. Elucidation of physico-chemical characteristics and mycoflora of bovine milk available in selected area of karachi, pakistan. *Journal of Applied Science & Environmental Management*, 17(2), 259-265.
- [35]Dobrzanski, Z., Kolacz, R., Górecka, H., Chojnacka, K. and Bartkowiak, A., 2005. The content of microelements and trace elements in raw milk from cows in the silesian region. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(5), 685-689.
- [36]Spiteri, R. and Attard, E., 2017. Determination of major and minor elements in maltese sheep, goat and cow milk using microwave plasma-atomic emission spectrophotometry. *J. Agr. Sci*, 9, 43-50.
- [37]Brescia, M. A., Caldarola, V., Buccolieri, G., Dell' Atti, A. and Sacco, A., 2003. Chemometric Determination of the Geographical Origin of Cow Milk using ICP-OES Data and Isotopic Ratios: A Preliminary Study. *Italian Journal of Food Science*, 15(329), 3.
- [38]Al-Wabel, N. A., 2008. Mineral contents of milk of cattle, camels, goats and sheep in the central region of Saudi Arabia. *Asian Journal of Biochemistry*, 3(6), 373-375.
- [37]Meshref, A. M. S., Moselhy, W. A., El-Houda, N. and Hassan, Y., 2014. Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products, *J. Food Meas. Charact.*, 8, 381-388.
- [40]Bilandžić, N., Dokić, M., Sedak, M., Solomun, B., Varenina, I., Knežević, Z. and Benić, M., 2011. Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia, *Food Chem*, 127, 63-66.
- [41]Tomlinson, D. J., Mülling, C. H. and Fakler, T. M., 2004. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. *Journal of dairy science*, 87(4), 797-809.
- [42]Seo, K., Mohanty, T. R., Choi, T. and Hwang, I., 2007. Biology of epidermal and hair pigmentation in cattle: a mini-review. *Veterinary dermatology*, 18(6), 392-400.
- [43]Dorn, C. R., Phillips, P. E., Pierce, J. O. and Chase, G. R., 1974. Cadmium, copper, lead and zinc in bovine hair in the new lead belt of Missouri. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 12(5), 626-632.
- [44]Arnesen, A. K. M. and Singh, B. R., 1998. Plant uptake and DTPA-extractability of Cd, Cu, Ni and Zn in a Norwegian alum shale soil as affected by previous addition of dairy and pig manures and peat. *Canadian Journal of Soil Science*, 78(3), 531-539.
- [45]Brock, E. H., Ketterings, Q. M. and McBride, M., 2006. Copper and zinc accumulation in poultry and dairy manure-amended fields. *Soil Science*, 171(5), 388-399.
- [46] Moscuzza, C. H., Pérez-Carrera, A. L., Volpedo, A. V. and Fernández-Cirelli, A., 2012. Forage enrichment with copper and zinc in beef grazing systems in Argentina. *Journal of Geochemical Exploration*, 121(0), 25-29.
- [47]Udo, H. M. J. Veenman, H. And Zonen BV., 1978. Hair coat characteristics in Friesian heifers in the Netherlands and Kenya.
- [48] McDowell, R. E., Lee, D. H., McMullan, H. W., Fohrman, M. H. and Swett, W. W. 1954. Body weights, body measurements, and surface area of Jersey and Sindhi-Jersey (F1) crossbred females. *Journal of Dairy Science*, 37(12), 1420-1428.

Study the Viability of Some Bacterial Species Isolated from Contaminated Soils on the Manufacture of Nanoparticles

Eman MohammadTaher, Dalia Abdulelah Mohammad, NajlaAhmad Suleiman

University of Mosul /college of science/department of biology

Abstract: Researchers in nanoparticle manufacturing have recently turned to biomanufacturing to reduce silver ions into silver nanoparticles because these microorganisms work as ecofriendly nanofactories, which were controlled on the size and shape of manufactured nanoparticles, this technique can occur either inter the cellular structure or extracellular structure, but the extracellular synthesis is cheaper and require simple processing technique .Therefore, in the current study bacterial strains isolated from contaminated soil with motor oil were selected to synthesize silver nanoparticles by extracellular method at 37C° for (72-168)hours. The result of fabrication was observed by the shift in thecolor of reacted solution into yellowish brown and confirmed the fabrication of Ag NPs by UV-Visible spectroscopy that measured the absorption spectra of Ag NPs which was located between (404 -444) nm. Also,FITR analysis was used to determine the functional groups of bacteria that participated in the reduction of Ag⁺ into Ago through notice the presence of band located between (3344-3310) cm⁻¹ related to NH(Amide) and the presence of bandbetween(1633-1636) cm⁻¹ assigned to C=O(carbonyl amide). Finally, AgNPs fabricated by supernatant of Bacillus strains when reacted with 3mM AgNO₃ solution showed more effective against *Staphylococcus aureus* than *E. coli*.

Keyword: Biosynthesis of Ag NPs, *Bacillus spp.*, UV-Visible Spectroscopy ,FITR ,Antibacterial Activity.
DOI : doi.org/10.46617/icbe6002

1.Introduction:

One of the most important fields for researches in nanotechnology is biosynthesis of metal nanoparticles due to having numerous applications in various fields like therapeutics, bimolecular detection, catalysis [1,2]. Therefore, the studies in this fieldwere turned on to use biological approach because these nanofactories method have significant advantages compared toother process because these nanofactories have the ability to synthesize nanoparticles in an ecofriendly method [3] bacteria is the most favorable between microorganisms because it is relatively easy to handle and can produce bio component like enzymes, proteins and bio-surfactant (lipopeptides) ,these biomolecules form bio-reducing agent by bacterial cell metabolic activities[4,5,6]. In many bacteria strains these biomolecules are used as capping agent which makes nanoparticles more stable. Bio reductionof silver ions by microorganism can occur by extracellular orintracellular[7].Extracellular manufacturing of nanoparticles happens by limitation metal on the surface of bacteria while intracellular manufacturing occurs inside bacteria and needs extra steps to obtain nanoparticles like treatment by ultrasound to release the synthesized silver nanoparticles.Many studies concentrated on Extracellular synthesis because of it is cheap, simple and provides large scale production[8,1].RecentresearchesreportedthesynthesisofAgNPsby *Bacillus subtilis* and *Enterococcus spp.*, *Morganella spp.* [9,10,4]. Bacterial strains isolated from soil contaminated with hydrocarbons materials were tested for their strength to reduce Ag ions to Ag NPs, which identified biochemical and molecular by 16SrRNA as Gram-positive Bacilli bacterium forming spores related to genus Bacillus [11]

2. Material and methods:

2.1. Isolation and identification of bacteria from contaminated soil :

10 gm. of each soil sample contaminated with generator oils in Mosul was collected and taken from a depth of 5cm using a sterile spatula and placed in sterile plastic bags, then transferred to the laboratory for making serial of ten dilution by adding it to 90ml of sterile D.W. to obtain the first dilution 10^{-1} [12]. Then added 0.1ml of 10^{-4} , 10^{-5} dilution separately to sterile Petridis containing Nutrient Agar and incubated at 37°C for 24 hours to obtain bacterial colonies that were subculture individually on N.A. for purification. Later bacterial isolates identified biochemically and molecularly based on 16srRNA gene sequence analysis described [13,14,15].

2.2. Synthesis of silver nanoparticles:

Some bacterial strains identified by molecular and biochemical methods were selected to synthesize silver nanoparticles by inoculating it individually in 100ml of sterile N.B. media and incubated in incubator shaker rotate at 200 rpm for 24 hours to obtain bacterial suspension with concentration 1.5×10^8 compared with McFarland tube (0.5). Then added 50ml of a bacterial strain to flask containing 50 ml of 1mM of AgNO_3 solution and incubated in 150 rpm for 72-168 hours in dark condition. After that supernatant of the reaction mixture was separated by centrifuged it at speed 10000 rpm for 10 min. Finally, the pellet of Ag NPs was collected and stored for further usage [13,16,17].

2.3. Characterization of silver nanoparticles :

The initial detection of Ag NPs was noted for color changing for solution resulting from the reaction to check the fabrication of nanoparticles by nanofactories through the extracellular method and analyzed optical characteristics of Ag NPs and scanned the absorption spectra between 200-900 nm. Also, FITR were analyzed for the reaction mixture to investigate functional groups that participated to reduce Ag^+ into silver atom Ag^0 [16,18].

2.4. Antimicrobial Activity of Fabricated AgNPS:

The antimicrobial activity of synthesized Ag NPs against some bacteria was investigated on Mueller-Hinton agar (M.H.A.) plates by using disk diffusion method. About 0.1ml of suspension for pathogenic bacteria like *E. coli*, and *staphylococcus aureus* at concentration 1.5×10^8 compared with McFarland tube after incubated it for 24 hours then was spread evenly on solid media of M.H.A. plate by sterile swabs. Later 20 μl for the pellet of Ag NPs and AgNO_3 at (3mM, 2mM) concentration and supernatant of Bacillus strains was added separately to the wells which was made by Cork borer then incubated it at 37°C for 24 hours. From the observation of inhibition zone appeared around the wells can determine antibacterial activity against pathogenic bacteria [19,20].

3. Results and Discussions

3.1. Identification of bacterial strains :

The isolates bacteria from soil were identified biochemically as gram positive bacilli forming spore and by 16srRNA gene sequences showed that the isolates M1, M2, M3, M4, S10 were identified as *Bacillus paramycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus wiedmannii* illustrated in the Table (1).

Table (2) Diagnosis of bacterial isolates according to 16srRNA

Number of strain	Name of strain	DNA Extraction	PCR Result 16srRNA 1250 bp
M1	<i>Bacillus paramycoides</i>	+	+
M2	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
M3	<i>Bacillus paramycoides</i>	+	+
M4	<i>Bacillus cereus</i>	+	+
S10	<i>Bacillus wiedmannii</i>	+	+

3.2.Characterization of Fabricated Ag NPs:

Formation of silver nanoparticles by supernatant of *Bacillus* strains when treated with a solution of $AgNO_3$ was observed visually by the color shift of reaction mixture from pale yellow to yellowish brown at the end of incubation. Brown properties may be due to excitation of the Plasmon Surface Resonance (SPR) of the nanoparticles and were provided appropriate substantiates of their fabrication. These color changes were shown in Fig. [1]

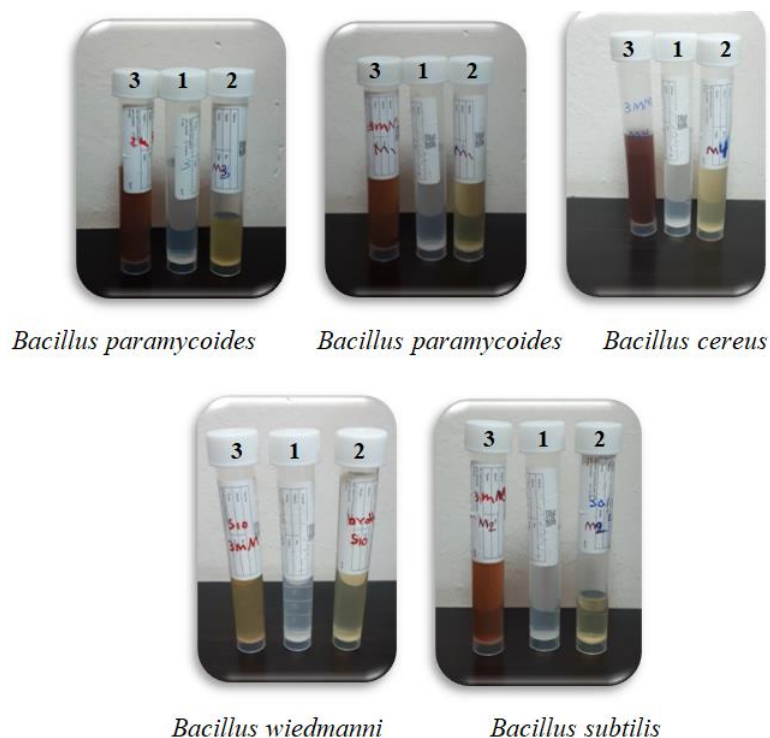


Figure (1) Visual observation of synthesized silver nanoparticles by supernatant of bacterial strains(1)(Control) $AgNO_3$ solution(2) supernatant of bacteria(3) Ag NPs solution

There was evidence that an electron shuttle or other reducing agents were released into the culture of *Bacillus spp.*, and participated in bioreduction of silver ions Ag^+ into silver atom [21,22]. By measurement of UV-Visible spectroscopy can be observed a absorption peak located between (404-444)nm suggest the presence of Surface Plasmon Resonance which is properties of silver nanoparticles that prepared using culture supernatant of selected strains used in this study

like *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus paramycoids*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paramycoids* was concentrated at (404,424,438,444)nm respectively and illustrated in Fig.(2) similar observation was previously reported by [9,19,23].

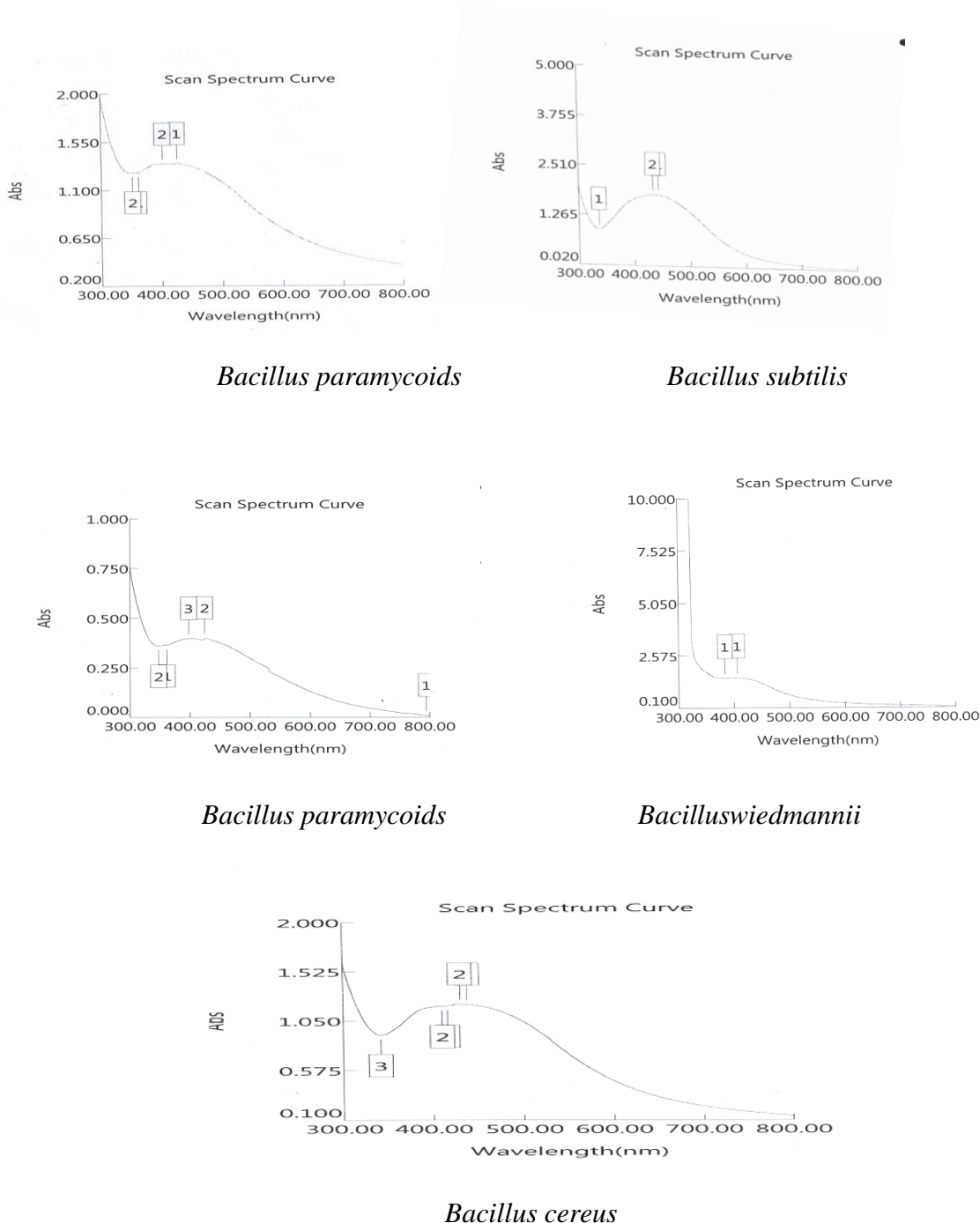
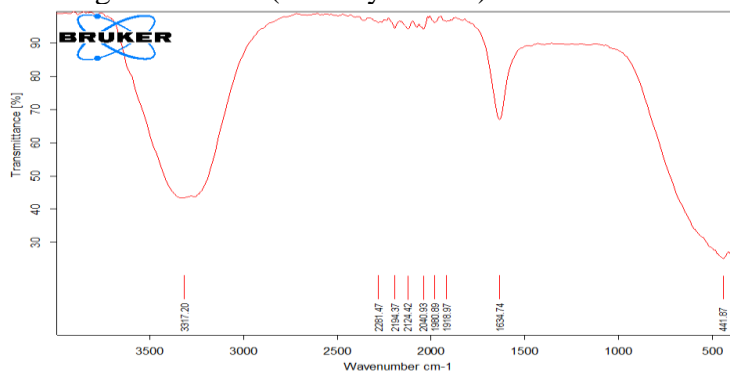


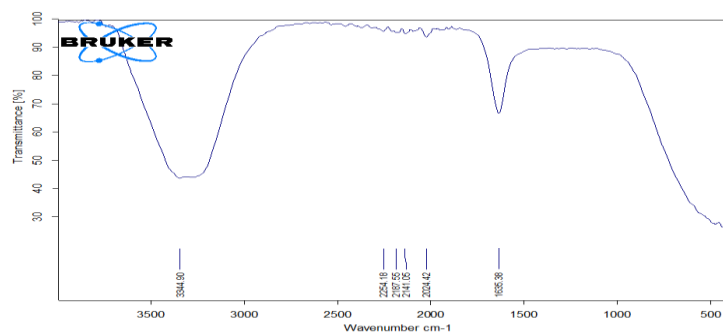
Figure (2) Show UV-Visible absorption beak of Ag NPS synthesized by supernatant of *Bacillus SPP*.

3.3.FITR analysis :

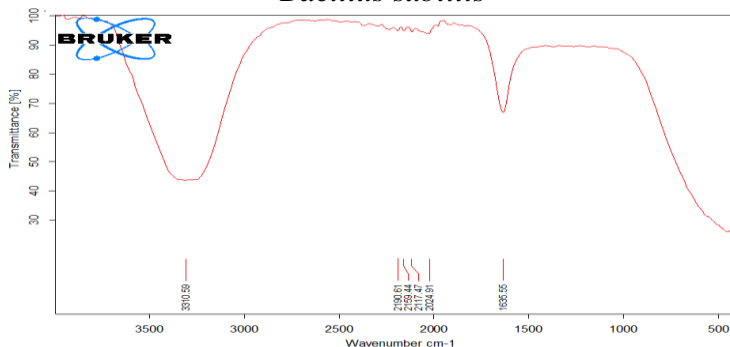
measurement of FTIR for solution Ag NPs showed the presence of bands located at region between (33310-3344) cm^{-1} were possibly related to NH (amide) that confirm presence of protein in the sample and corresponding with previously studies [9,19,23]. Also presence of band located between (2190-2281) cm^{-1} assigned to C=N (Nitrile) and the appearance of band at (1633-1634-1635-1636) cm^{-1} assigned to C=O (carbonyl amide). all bands illustrated in Fig (3)



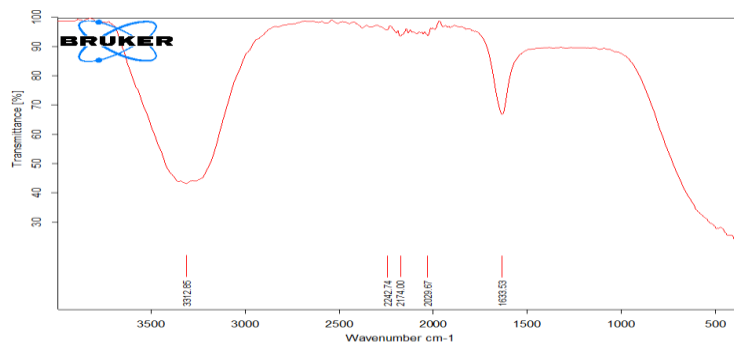
Bacillus paramycoids



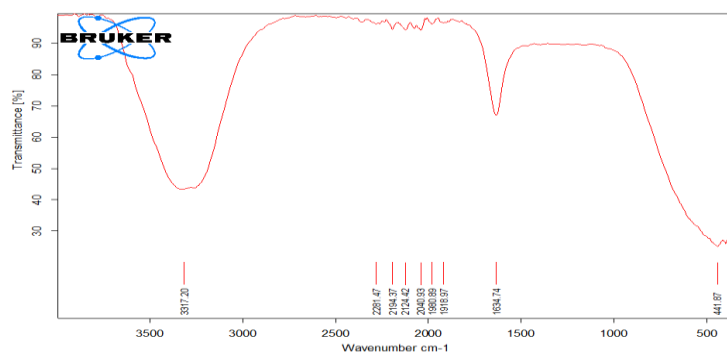
Bacillus subtilis



Bacillus paramycoids



Bacillus cereus



Bacilluswiedmannii

Figure (3) FITR analysis of Ag NPs fabricated by supernatant of Bacillus strains

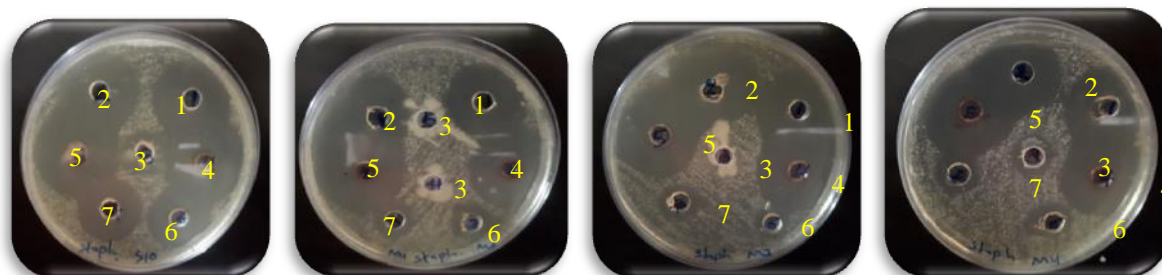
3.4. Antibacterial Effectiveness of AgNPs:

The synthesized Ag NPs by supernatant of *Bacillus subtilis* *Bacillus cereus* *Bacillus wiedmannii*, which incubated with 3mM AgNO₃ solution showed the highest antimicrobial efficiency against *staphylococcus aureus* comparison to *E. coli* the reason may be due the plasmolysis of the cell wall and separate cytoplasm from it, the mechanism of antibacterial activity of bio silver was differ from species to another and depending on the size of nanoparticles .this result was in agreement with previously studies by [19,24].The activity of Ag NPs was illustrated in Table(2)

Table (2) Antibacterial activity of Ag NPs synthesized by supernatant of Bcillus strains

Tested Bacterial strain	Type of bacillus	AgNO ₃ 3mM	AgNO ₃ 2mM	suspension of bacteria	sediment 3mM	Sediment 2mM	Filtrate 3mM	Filtrate 2mM
<i>Staph. aureus</i>	<i>Bacillus paramycoid</i>	15	12	6	21	15	14	13
	<i>Bacillus subtilis</i>	26	26	6	29	32	14	12

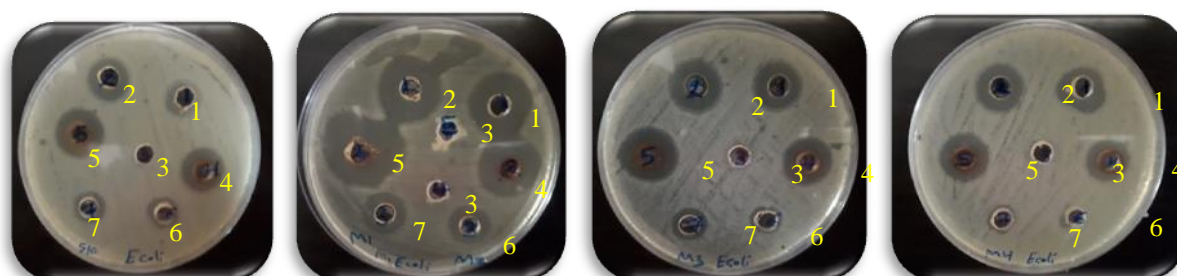
	<i>Bacillus cereus</i>	27	26	6	30	29	14	15
	<i>Bacillus</i>	30	29	6	35	32	11	11
<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	16	13	6	28	15	15	11
	<i>Bacillus</i>	16	15	6	20	19	12	11
	<i>Bacillus cereus</i>	14	15	6	22	20	6	6
	<i>Bacillus</i>	14	11	6	20	10	16	6



Bacillus wiedmannii *Bacillus subtilis*

Bacillus paramyroid *Bacillus cereus*

Antimicrobial activity of Ag NP synthesized by supernatant of *Bacillus* SPP against *staphylococcus aureus*



Bacillus wiedmannii *Bacillus subtilis*

Bacillus paramyroid *Bacillus cereus*

Figure (3) Illustrating antimicrobial activity of Ag NP synthesized by supernatant of *Bacillus* SPP against *E. coli*

- (1) 2mM AgNO₃ solution (2) 3mM AgNO₃ solution (3) supernatant of bacteria (4) sediment of 2mM AgNPs (5) sediment of 3mM AgNPs (6) filtrate of 2mM AgNPs (7) filtrate of 3mM of AgNPs

4. Conclusion:

We conclude from the present study the possibility of bacteria isolated from soil contaminated with motor oils to reduce silver ions to silver atoms by producing them for some effective compounds such as proteins and enzymes to form nanoparticles that is showed more effective against *staphylococcus aureus* than *E. coli* when the bacterial supernatant of some *Bacillus* strains reacted with 3mM AgNO₃.

5. Reference:

- [1] Duran, N., Priscyla, D., Marcato, P.D., Alves, O., De Souza, G. and Esposito, E., 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol*, 3, 1–7.

- [2] Christopher, P., Xin, H. and Linic, S., 2011. Visible-light-enhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures. *NatChem*, 3,467–472.
- [3] Wei, X., Luo, M., Li, W., Yang, L., Liang, X., Xu, L., Kong, P. and Liu, H., 2012. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO_3 . *Bioresour Technol*, 103,273–278.
- [4] Parikh, R.Y., Singh, S., Prasad, B.L.V., Patole, M.S., Sastry, M. and Schouche, Y.S., 2008. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella sp.*: towards understanding biochemical synthesis mechanism. *Chem. Bio. Chem*, 9, 1415-1422.
- [5] Mandal, D., Bolander, M.E., and Mukhopadhyay, D., 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 69 (4) ,485–492.
- [6] Zhang, X., Yan, S. and Tyagi, R.D., 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 82 (3) ,489–494.
- [7] Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S.R.K., Kottaisamy, M., Barath M, S., Kartikeyan, B. and Gurunathan, S., 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Coll. Surf. B* ,77,257–262.
- [8] Kalimuthu, K., Babu, R.S., Venkataraman, D., Bilal, M. and Gurunathan, S., 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Coll. Surf B*, 65,150–153.
- [9] Maduabuchi, E. K., Noundou, X. S., Ejike, U. S. and Atuzie, W., 2018. Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Using Cell Free Lysate of *Bacillus Subtilis*: A Biotechnology Approach. *American Journal of Nanoscience & Nanotechnology Research*, 6(1),18-27.
- [10] Rajeshkumar, S. and Malarkodi, C., 2014. In vitro antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against food borne pathogens. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/581890>.
- [11] Mugg, P., Seymour, S. and Clark, S., 2013. A new method for the identification of *Bacillus spp.*, and related species involved in food poisoning and spoilage. Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, Surrey, UK.
- [12] Ekhaie, F. O. and Nkwelle, J., 2011. Microbiological And Physicochemical Analyses Of Oil Contaminated Soil From Major Motor Mechanic Workshops In Benin City Metropolis, Edo State, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ*, 15 (4), 597-600.
- [13] Vithiya, K., Rajendran, K. and Shampa, S., 2014. *Bacillus spp.* Mediated Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles. *Int. J. Pharm. and Pharm. Sci*, 6(2),82-88.
- [14] Dilmi, F., Chibani, A. and Rezkallah, K. S., 2017. Isolation and molecular identification of hydrocarbon degrading bacteria from oil contaminated soil. *International and journal of bioscience*, 11(4),272-283.
- [15] Mukherjee, K., Gupta, R., Kumar, G., Kumari, S., Biswas, S., Padmanabhan, P., 2018. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus clausii* and computational profiling of nitrate reductase enzyme involved in production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 ,527–536.
- [16] Grazyna, A. P., Joanna, C., Barbara, M., Barbara, T., Libor, K., Ales, P., Robert, P., Radek, Z., Katarzyna, P. and Przemysław, B., 2015. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* T-1 growing on agro-industrial wastes and producing bio surfactant. *The Institution of Engineering and Technology*, 1–7.
- [17] Saravanan, M., Davoodbasha, M. A., Prakash, P. and Pugazhendhi, A., 2018. Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, (116),221-226.
- [18] Wang, C., Kim, Y. J., Singh, P., Mathiyalagan, R., Jin, Y. and Yang, D. C., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1–6.
- [19] Silambarasan, S. and Abraham, J., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles using the bacteria *Bacillus cereus* and their antimicrobial property. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4 (1) , 536-540.
- [20] Maduabuchi, E. K., Noundou, X. S., Ejike, U. S. and Atuzie, W., 2018. Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Using Cell Free Lysate of *Bacillus Subtilis*: A Biotechnology Approach. *American Journal of Nanoscience & Nanotechnology Research*, 6,18-27.
- [21] Safuddin, N., Wong, C.W. and Yasumira, N. A., 2009. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with Microwave irradiation. *E-Journal of chemistry*, 6(1),61-70.

- [22] El- Shanshoury, A.R., Elsilk, S. E .and Ebeid, M. E., 2011. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Esherichia coli* ATCC 8739 *Bacillus subtilis* ATCC6633 and *Streptococcus thermophiles* ESh1 and Their Antimicrobial Activities .*International Scholarly Research Nanotechnology ISRN*,1-7.
- [23]Dahikar, S. B. and Bhutada ,S.A.,2013 .Biosynthesis of silver nanoparticles using bacillus megaterium and their antibacterial potential. *IJADD*,3 (1), 13 -19.
- [24]Singh,N.,Saha, P.,Rajkumar,K. andAbraham, J.,2014. Biosynthesis of silver and selenium nanoparticles by *Bacillus sp.* JAPSK2 andevaluation of antimicrobial activity.*Der Pharmacia Lettre*,6 (1),175-181.

Impact of primary sedimentation tank on wastewater treatment plant units using computer simulation program

Ahmed M. Hussein ¹, Dhiaa Neama Jabbar ², Shereen Qasim Abdulridha ³

Civil Techniques Department, Babylon Technical Institute, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Iraq

¹*amh.eng85@gmail.com , inb.ahd@atu.edu.iq*

²*dhiaanj@yahoo.com , inb.dya@atu.edu.iq*

³*Shereenqasim82@gmail.com , inb.sh.qasim@atu.edu.iq*

Abstract: This study presents a computer program designed in Visual Basic 6 program. The capability of this program is to design wastewater treatment plant units and determination of its construction cost.

The program deals with two types of wasted sludge the first type is wasted sludge from the aeration basin, while the second system is wasted sludge from the secondary clarifier. Also, there is a detailed output shows the design flowrate, mass balance analysis and composition of each stream in and out of each treatment unit. Program results are verified with hand calculations within the allowable recommended values and they showed a good accuracy.

The volume of aeration basin and secondary sedimentation tank increased with the elimination of primary sedimentation tank from the design of the wastewater treatment plant. Generally, an increment of about (52 – 170) % for aeration basins and (58-185) % for secondary sedimentation tanks are observed in the present study. From other hand, gravity thickener volume is decreased by (29 - 42) %, anaerobic digester volume is decreased about (38 - 52) % and drying beds is decreased by (29 - 38) % approximately.

The cost analysis showed that the cost of a wastewater treatment plant is increased after a certain amount of influent. That amount is nearly (36,708.33) m³/d when wasted sludge is taken from aeration basin and (24,833.33) m³/d when wasted sludge is taken from secondary clarifier.

Keywords: Sedimentation tank, Wastewater treatment,

DOI : doi.org/10.46617/icbe6003

1.Introduction

The purpose of wastewater treatment is to prepare controlled conditions with comparatively small size to remove suspended and soluble materials, treatment biodegradable organics and elimination of pathogenic organisms [1]. Wastewater treatment plant contains various interacting unit processes. The design, operation, and control of these plants are not a simple task [2]. The control of the treatment process is very complex, because of the large number of variables that can affect it [3].

The primary sedimentation tank has great effect on the biological treatment, because, it has considerable roll on removing a great deal of BOD and TSS , in other words, the sedimentation tank facility reduces the organic load that will be processed in the biological unit earlier[4]. Many studies have been done to evaluate the effects of environmental factors on the performance of biological wastewater treatment plants :

AL- Turaihy, T.A, 1993 studied the factors affecting the choice of sewage treatment methods[5]; While Ujang, Z.andSairan, F.2006 designed a computer program in that field.[6] Also E. C. C. F., 2005 made studies on optimal design of wastewater treatment plant [7]; Xiaoyi Z., 2005used Poisson rectangular pulse model to estimate peaking factors[8]. There are also researches done by Arcadio P. S. S., 2003 to find the differences between chemical and physical treatments.[9]Donald. L. B.*et. al.*, 2004 showed how domestic wastewater treatment is affected by many environmental factors.[10], Also Nikoletta K. and DespoF., 2004 showed how urban wastewater treatment is greatly changed by changing the environmental factors.[11]

2. Objective of the present paper are:

The main objectives of this study can be stated as:

1. Building a computer program that will design a wastewater treatment plant with completely mixed activated sludge method by using Visual Basic 6.0 software.
2. Making the program capable of doing the design job for a wastewater treatment plant with two options; the first is with primary sedimentation tank facility while the second option is without the primary sedimentation tank.
3. Discussing the results that will be revealed from these designs.

A typical wastewater treatment plant is accomplished by general steps which are shown in figure (1)[12]

3. Computer Program Construction

The program is designed to calculate wastewater treatment plant units dimensions. The program will focus on the design of the facilities that follows preliminary treatment, i.e., primary treatment, secondary treatment and sludge treatment facilities in two cases, the first case is the design of the treatment plant in presence of sedimentation tanks. While the second case is the design in absence of sedimentation tanks. Data that was used for design were obtained between minimum and maximum standard values used for design. [13][14][15]

The analysis of the two cases is based upon the analysis of cost as well as performance of the plant. A brief sample of the program forms is shown in Figure (2)

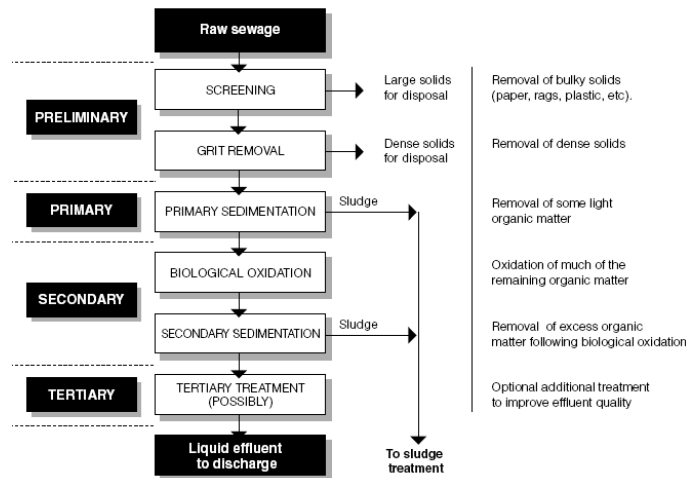


Figure (1) Typical Wastewater Treatment Plant Unit

4. Verification of Computer Program Results

It is necessary to check program results before depending on results in the final design of wastewater treatment plant.

Usually, any check is done by comparing the results that have been taken from the program with a standard formulas or equations, in the absence of such equations the program is to be checked with data that has been determined by hand calculation.

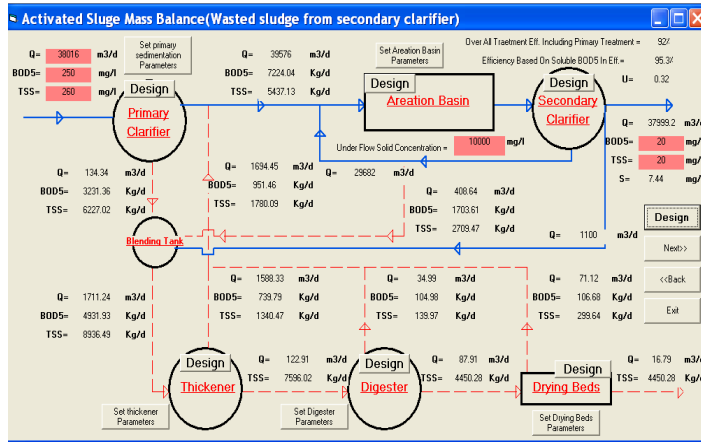


Figure (2) Wasted sludge from secondary clarifier mass balance window

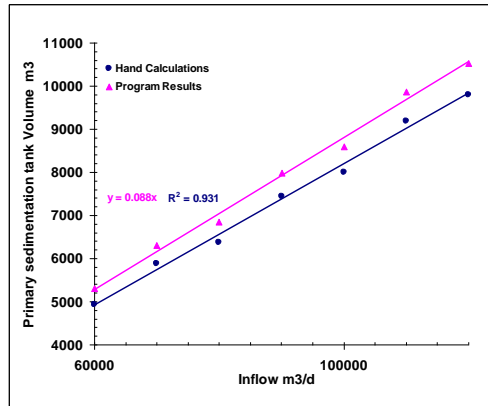


Figure (3) Verification between Hand Calculations and Program Results for Primary Sedimentation Tank Volume

The results obtained from verification are accepted as the program results show good convergence with that obtained by with hand calculation and a sample is shown in Figure (3)

5. Analysis of Data and Results

5.1 DATA

The flow rates and its characteristics used in the present study to obtain the data used in analysis are shown in table (1). [13][14][15]. Additional two inflows (2500,5000)m³/s was taken to enhance the regression analysis. The wastewater treatment plant units was designed for each of the mentioned (22) influents and this design was repeated (6) times, each time with different TSS and BOD ranging from (150)mg/l to (400)mg/l.

Table (1) Values of Characteristics of Sewage as used in the program in the present study

Item	Units	Limits		
		Lower	Upper	Increment
Influent Flow Rate	m ³ /d	10000	200000	10000
TSS In Influent	mg/l	150	400	50
BOD ₅ In Influent	mg/l	150	400	50

5.2 Analysis

Multiple regression analysis were used in this study. In the present work, the volume of each treatment units is assumed to be the dependent variables (y) and the independent variables will be the influent to the wastewater treatment plant. Cost analysis was performed also for the designed plant. The construction costs of each unit for activated sludge treatment plant used in the present study are shown in Table(2). Single regression models in five forms are used for each one of design requirements to investigate which form gives the best fitting of data Table (3) shows these regression models.

Table (2) : Cost of Wastewater Treatment Plant units

Unit	Cost %
Inlet Pumping Station	6.75
Screening, Grit Removal and flow measurement	7.90
Primary Settlement	6.04
Biological Treatment	7.90
Final Settlement	6.22
Chlorination Plant	2.13
Sludge Treatment Plant	30.92
Recirculation or Sludge Return Pumps	1.33
Sludge Pumping Station	1.77
Electrical Works	5.34
Administration Block	2.33
Miscellaneous, Pipe work, Chambers, etc.	12.14
General Site Works, Roads, etc.	9.25
Total	100

5.3 Results

Single regression analysis is made to 22 models to find the relationship between independent variables (the influent flow rates, BOD₅ and TSS) and dependent variables (volume of each treatment unit) considering presence and absence of primary sedimentation tanks with different values of TSS_{inf} and BOD_{5inf}. Relationships between the influent and volume of each unit are found using (Microsoft Excel 2019) program for statistical calculations which showed a good degree of accuracy

Table (3): The Proposed Models in the Present Study

No.	Equation	Description
A	$y = a_1 X + a_2$	Linear
B	$y = a_1 \ln(X) + a_2$	logarithmic
C	$y = a_1 X + a_2 X^2 + a_3 X^3 + \dots + a_k X^n$	Polynomial
D	$y = a_1 X^{a_2}$	Power
E	$y = a_1 e^{a_2 X}$	Exponential

5.3.1 Volume of primary sedimentation tank

Model No. A was found to be the most suitable model for determining the volume of primary sedimentation tank. The predicted model can be written as:

$$y = 0.0874X$$

Where;

y= dependent variables, X = the independent variable, $a_1, a_2, a_3, \dots, a_k$ = are model coefficients

n = number refers to the polynomial degree

Figure (4) shows the primary sedimentation tank data fit model and its R^2 value.

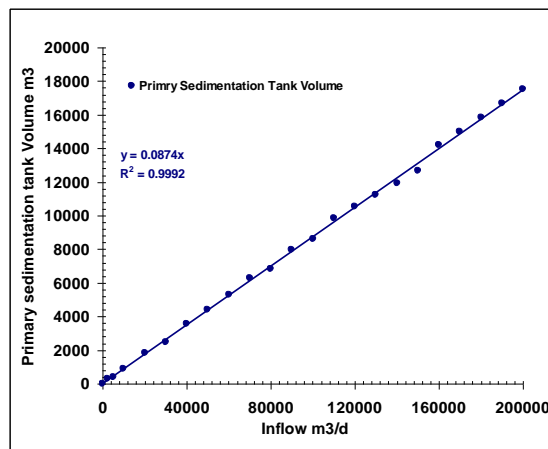


Figure (4): Primary Sedimentation Tank Regression Analysis

5.3.2 Volume of Aeration Basins Models

Table (4):Aeration Basin Models(WS From AB)

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Models			
		With PS	R ²	Without PS	R ²
150	150	y = 0.1338X	0.9997	y = 0.1861X	0.9998
200	200	y = 0.18X	0.9997	y = 0.2505X	0.9998
250	250	y = 0.2262X	0.9998	y = 0.3138X	0.9998
300	300	y = 0.2726X	0.9994	y = 0.3778X	0.9974
350	350	y = 0.3194X	0.9998	y = 0.3781X	0.9998
400	400	y = 0.3658X	0.9998	y = 0.506X	0.9998

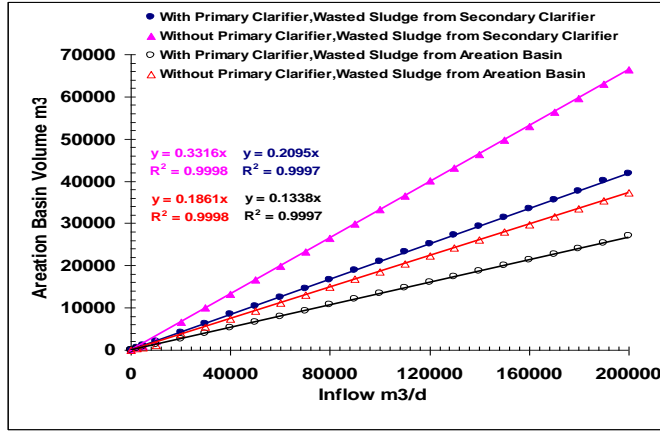


Figure (5): Aeration Basin Volume Data Fit ($TSS_{inf} = 150$, $BOD_{5inf} = 150$) mg/l

5.3.3 Volume of Secondary clarifier Models

Table (5) Secondary clarifier Models (WS From AB)

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Models			
		With PS	R ²	Without PS	R ²
150	150	$y = 0.2566X$	0.9998	$y = 0.3067$	0.9998
200	200	$y = 0.3008X$	0.9998	$y = 0.3675X$	0.9998
250	250	$y = 0.3448$	0.9998	$y = 0.4276$	0.9985
300	300	$y = 0.3888X$	0.9998	$y = 0.4876$	0.9973
350	350	$y = 0.4328X$	0.9998	$y = 0.488$	0.9997
400	400	$y = 0.4764X$	0.9998	$y = 0.6075$	0.9997

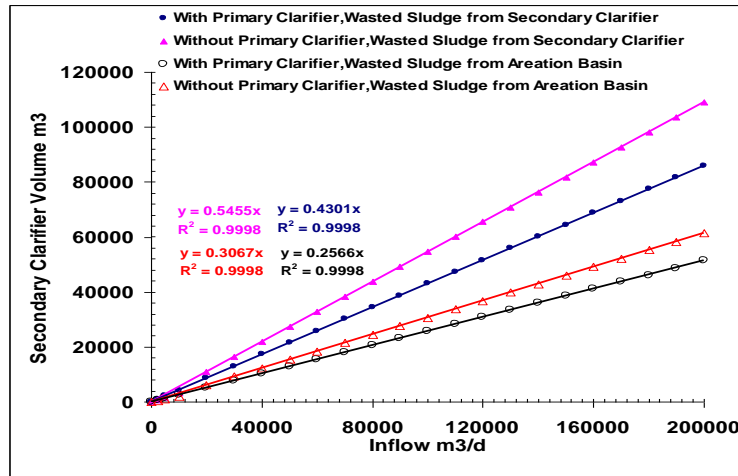


Figure (6): Final Clarifier Volume Data Fit ($TSS_{inf} = 150$, $BOD_{5inf} = 150$) mg/l

5.3.4 Volume of Gravity thickener Models

Table (6) Gravity thickener Models (WS From AB)

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Models			
		With PS	R ²	Without PS	R ²
150	150	y = 0.0104X	0.9986	y = 0.0033X	0.9981
200	200	y = 0.0147X	0.9995	y = 0.0053X	0.9986
250	250	y = 0.0191X	0.9996	y = 0.0074X	0.9981
300	300	y = 0.0235X	0.9994	y = 0.0094X	0.9977
350	350	y = 0.0278X	0.9996	y = 0.0095X	0.9993
400	400	y = 0.0322X	0.9997	y = 0.0136X	0.9993

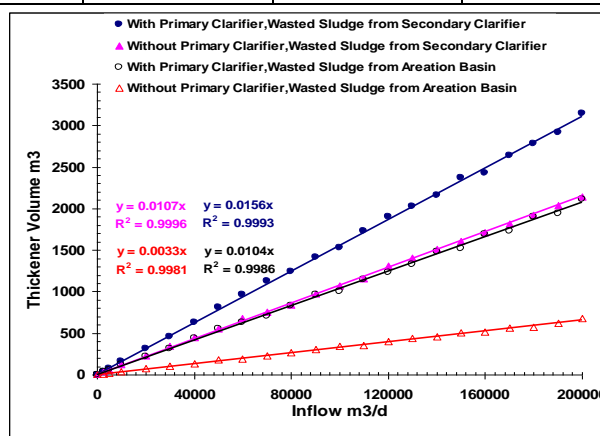


Figure (7): Gravity Thickener Volume Data Fit (TSS_{inf} = 150, BOD_{5inf} = 150)mg/l

5.3.5 Volume of Anaerobic digester Models

Table (7) Anaerobic Digester Models (WS From AB)

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Models			
		With PS	R ²	Without PS	R ²
150	150	y = 0.0894X	0.9948	y = 0.0613X	0.9927
200	200	y = 0.0894X	0.9950	y = 0.0613X	0.9927
250	250	y = 0.1067X	0.9995	y = 0.0414X	0.996
300	300	y = 0.1313X	0.9998	y = 0.0531X	0.9987
350	350	y = 0.1562X	0.9998	y = 0.0531X	0.9972
400	400	y = 0.1806X	0.9998	y = 0.0757X	0.9991

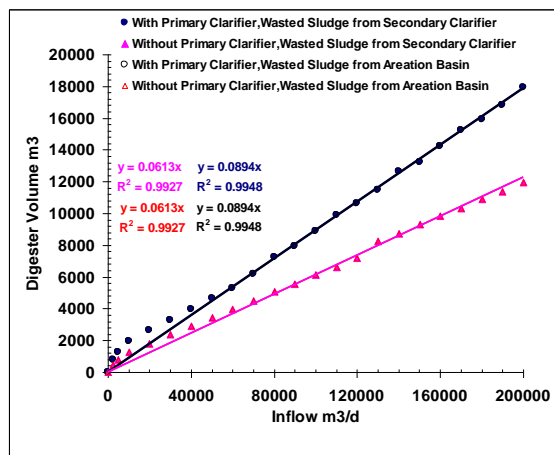


Figure (8): Anaerobic Digester Volume Data Fit ($TSS_{inf} = 150$, $BOD_{5inf} = 150$) mg/l

5.3.6 Volume of Drying bed Models

Table (8) Drying Bed Models (WS From AB)

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Models			
		With PS	R ²	Without PS	R ²
150	150	0.0007X	0.9998	y = 0.0002X	0.9998
200	200	y = 0.001X	0.9998	y = 0.0003X	0.9998
250	250	y = 0.0013X	0.9998	y = 0.0004X	0.9989
300	300	y = 0.0016X	0.9998	y = 0.0006X	0.9982
350	350	y = 0.0019X	0.9998	y = 0.0006X	0.9998
400	400	y = 0.0022X	0.9998	y = 0.0008X	0.9998

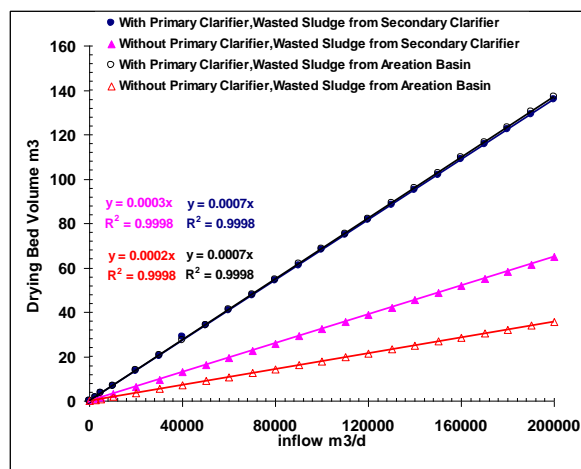


Figure (9): Drying Beds Volume Data Fit ($TSS_{inf} = 150$, $BOD_{5inf} = 150$) mg/l

5.3.7 Cost Estimation models

Table (9): Cost Analysis Models

TSS _{inf} mg/l	BOD _{5inf} mg/l	Equation	R ²
150	150	$y = 3 \cdot 10^{-24} X^5 - 2 \cdot 10^{-18} X^4 + 4 \cdot 10^{-13} X^3 - 3 \cdot 10^{-8} X^2 + 0.0015 X + 81.075$	0.9591
200	200	$y = 10^{-25} X^5 - 2 \cdot 10^{-19} X^4 + 9 \cdot 10^{-14} X^3 - 10^{-8} X^2 + 0.0009 X + 81.069$	0.9017
250	250	$y = 3 \cdot 10^{-25} X^5 - 3 \cdot 10^{-19} X^4 + 10^{-13} X^3 - 2 \cdot 10^{-8} X^2 + 0.0011 X + 75.141$	0.9006
300	300	$y = 5 \cdot 10^{-25} X^5 - 4 \cdot 10^{-19} X^4 + 9 \cdot 10^{-14} X^3 - 10^{-8} X^2 + 0.0007 X + 85.808$	0.9064
350	350	$y = -10^{-24} X^5 + 6 \cdot 10^{-19} X^4 - 10^{-13} X^3 + 7 \cdot 10^{-9} X^2 + 4 \cdot 10^{-5} X + 91.044$	0.9622
400	400	$y = 2 \cdot 10^{-24} X^5 - 10^{-18} X^4 + 3 \cdot 10^{-13} X^3 - 3 \cdot 10^{-8} X^2 + 0.0013 X + 79.553$	0.9747

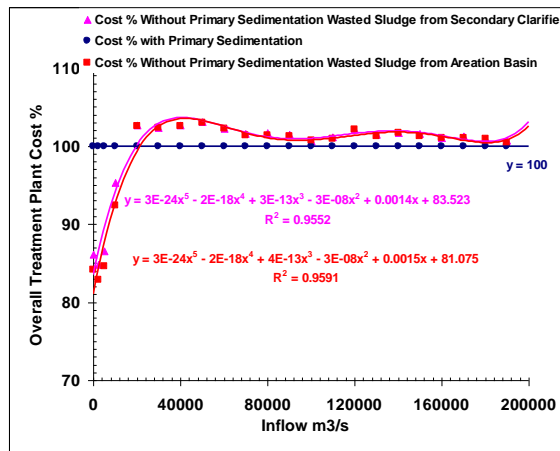


Figure (10): Cost Analysis of WWTP (TSS_{inf}= 150 ,BOD_{5inf} = 150) mg/l

6. Conclusions and Recommendations:

The present study has come out with the following conclusions:

1. It is more engineering convenient, much faster and accurate to build a computer program software for wastewater treatment plant design.
2. Generally an increments about (52 – 170) % for aeration basins volume and (58-185) % for secondary sedimentation tanks were observed in the present study.
3. Approximately gravity thickener volume is decreased by about (29 - 42) %, anaerobic digester volume is decreased by (38 - 52) % and drying beds is decreased by (29 - 38) % if the design disregarded the presence of primary sedimentation in the present study.
4. The analysis showed that the usage of primary sedimentation tanks on a wastewater treatment plant is more economic when the influent is above (36,708.33) m³/d when the wasted sludge from aeration basin, and (24,833.33) m³/d if the wasted sludge from secondary clarifier.

The effect of altering in temperature, pH. Value and the presence of heavy metals in the effluent in the dimensional design of the treatment plant are recommended for practical future researches.

7. References

- [1] Izrail S. T. and P. K. Mathai, 2006, " **Wastewater Sludge Processing** ", John Wiley & Sons, Inc. , New Jersey, USA.
- [2] E.P.A., 2003," **Biosolids Technology Fact Sheet. Gravity Thickening**", Municipal Technology Branch. E.P.A. EPA 832-F-03-022, Washington D.C.
- [3] Frank R. S., 2004 "**Environmental engineer's mathematics handbook** ", CRC Press LLC , USA.
- [4] B. P and J. Oleszkiewicz, 2006, "**Impact of Sludge Thickening on Energy Recovery from Anaerobic Digestion**", Technical Paper, Department of Civil Engineering, University of Manitoba.
- [5] AL- Turaihy, T.A, 1993 "**Factors Affecting the Choice of Sewage Treatment Methods**", MSc. thesis, College of Engineering, Department of Civil Engineering, Baghdad university.
- [6] Ujang, Z. and Sairan, F. 2006 "**How to use wastewater treatment plant design advisor program**" , Technical paper, University of technology, College of civil engineering, 81310 Skudai Johor, Malaysia university, E-mail: zaini@utm.my , fadzlin@utm.my.
- [7] E. C. C. Ferreira, 2005 "**Biological Process Optimal Design in a Wastewater Treatment Plant** ", Technical paper, College of engineering, University of Minho, Brazil.
- [8] Xiaoyi Zhang, 2005 "**Estimating Peaking Factors with Poisson Rectangular Pulse Model and Extreme Value Theory**" Master of Science Thesis, University of Cincinnati ,USA.
- [9] Arcadio P. S. S., 2003 "**Physical-Chemical treatment of water and wastewater**", CRC press LLC, USA.
- [10] Donald. L. B. *et al.*, 2004 "**Domestic Wastewater Treatment**" Unified Facilities Criteria UFC3-240-09A 16 Department of the US army and the air force and Design Guide.
- [11] Nikoletta K. and Despo F., 2004 "**Urban Wastewater Treatment Technologies Part I**" Report, Meda Water, Europe.
- [12] WEF and American Society of Civil Engineers, 2008, "**Operation of municipal wastewater treatment plants** ", 6th edition., Vol. 1, McGraw Hill companies, USA.
- [13] Qasim, S. (1999). "**Wastewater Treatment Plants**". New York: Routledge, <https://doi.org/10.1201/9780203734209>
- [14] Peavy, Howard S., et al. "**Environmental engineering**". McGraw-Hill, 1987
- [15] C. C. Lee and Shun Dar Lin, 2007 "**Hand book of environmental engineering calculation** ", 2nd edition, McGraw-Hill companies, USA.

**Assessment of Flash Flood Hazard Degrees of Wadi EL Tarfa, Eastern Desert,
Egypt: Using GIS Based Morphometric Analysis Technique.**

Mohamed Abu Setta¹, Hassan Garamoon² and Ashraf Shabana³

¹ *Geology Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt. mohamedsaid_p@sci.asu.edu.eg*

² *Geology Department, Faculty of Science, Ain Shams University. h_garamoon@sci.asu.edu.eg*

³ *Geology Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt. ashrafshabana@ymail.com*

Abstract: Wadi EL Tarfa basin is one of the largest basins in the Eastern Desert of Egypt where its surface area reaches 4939 Km². It is considered one of the promising agricultural reclamation areas in Egypt. Wadi EL Tarfa is mainly running on El Maaza limestone plateau and drains in the Nile River at the southeast of BeniMazar City. The morphometric analyses of Wadi El Tarfa was carried out through ARC GIS software 10.2 based on DEM with resolution of 30 m (SRTM 1 Arc-second Global) which downloaded online from the USGS site. Wadi El Tarfa basin is subdivided into eight main sub-basins (from 1 to 8). According to Strahler ordering method, Wadi EL Tarfa attains eighth order and its sub-basins range between fifth order for small sub-basins (nos. 1, 3, 4 & 6) and seventh order for large sub-basins (nos. 7 & 8). The flash flood hazard degrees of El Tarfa basin have been estimated depending on the morphometric parameters which have direct effect on the flood amount. The morphometric ranking method was used in determining the hazard degrees which are divided into five hazard classes. All sub-basins are classified according to the degrees of hazard. The classification shows that the sub-basin (no. 2) has the lowest hazard while sub-basins (nos. 3, 5, 6 & 8) are the most hazardous. The resultant flash flood risk maps indicate the most probable sub-basins and the main roads expected to be affected by flood hazard. It is recommended to construct protection systems in Wadi El Tarfa area such as retardation earthen dams to mitigate the floods risk in one hand and to increase the rain water harvesting on the other hand.

Keywords: Flash flood hazard, Wadi EL Tarfa, morphometric analyses, Eastern Desert, Egypt.
DOI : doi.org/10.46617/icbe6004

1. Introduction

Flash flood is considered one of the major natural disasters which causes large amount of deaths and damage [1]. In arid zones, flash flood is an unexpected phenomena which occur suddenly as result of the high intensity of rainfall precipitation during short time over specific areas of the catchment, causes large damage of infrastructure and in some times effects extent to lose of life. Flash flood occurs due to high intensity rainy storm over the catchment areas which characterized by steep slope and sparse vegetation cover and it occur sudden with high velocity flows [2].

Egypt suffers from shortage in the water resources. The Nile River is the main source of water in Egypt with limited storage of the groundwater resources. Generally, the high intensity rain storms is considered double-edged sword which can be led to flash flood risk or can be used as a source of fresh water storage. The main objectives of this study are to estimate and assess the flash flood hazard degrees in Wadi El Tarfa basin and

recommend sites for constructive retardant and storage dams to mitigate the flash flood hazard and to increase the rain water harvesting based on the morphometric analyses.

According to the rapid advanced of the remote sensing technology and related programs, the geographic information system (GIS) is considered one of the most important techniques used in morphometric analyses and delineating the boundaries of the watershed of the basins. The morphometric analysis is an important technique for both hydrological and hydrogeological researches and gives an overview about the surface geometry and the behavior of the surface with the runoff water in the drainage basin. It helps in the evaluation of the hydrological characteristics of the basin to assess the availability of the water resources [3].

Wadi El Tarfa is located in the eastern side of the Nile Valley at south east Beni Mazar City, El Minia Governorate, Egypt, (Fig. 1). It is bounded from east by the Red Sea drainage system (Wadi El Hawashiya), from west by the Nile River, from south by Wadi El Bustan and Wadi El Siririya and it is bounded from north by Wadi El Mihasham and Wadi Sannur. It is considered one of the largest basins in the Eastern Desert which drains in the Nile River. It has a surface area that reaches about 4939 km², covered mainly by carbonate rocks of Cretaceous and Eocene ages.

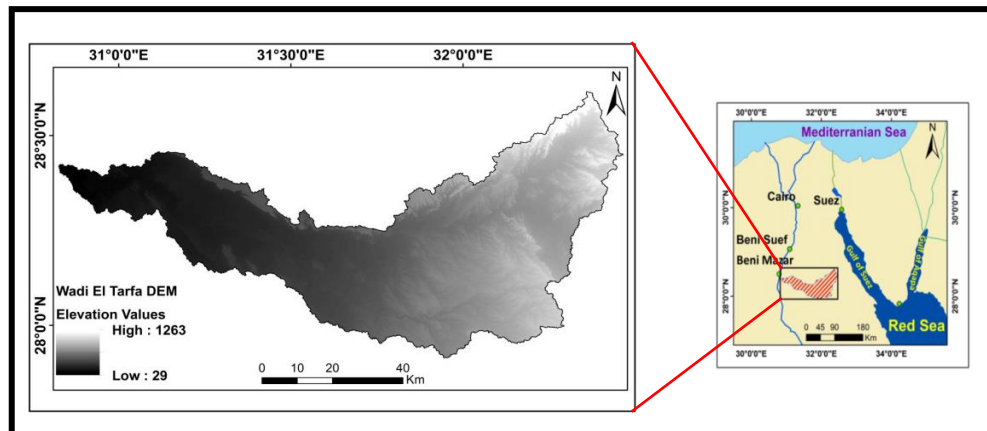


Fig (1): Location map and Digital Elevation Model of Wadi El Tarfa.

Flash flood hazard of Wadi El Tarfa has been evaluated based on morphometric ranking method by using ten morphometric parameters that involve density (D), frequency (F), area (A), relief ratio (Rr), shape index (Ish), circularity ratio (Rc), gradient (S%), bifurcation ratio (Rb), length of overland flow (Lo) and the sinuosity index (Si), [4].

The stream orders of Wadi El Tarfa have been determined using Strahler's ordering method, [5]. Wadi El Tarfa is subdivided into eight main sub-basins (Fig.2). It attains eighth order and its sub-basins range between fifth order for small sub-basins (nos.1, 3, 4& 6) and seventh order for large sub-basins (nos. 7& 8). All eight sub-basins as well as Wadi El Tarfa itself have been subjected to morphometric analyses through different morphometric parameters to evaluate the degrees of flash flood hazards and determine the best sites to induce the effective recharge the Eocene groundwater aquifers.

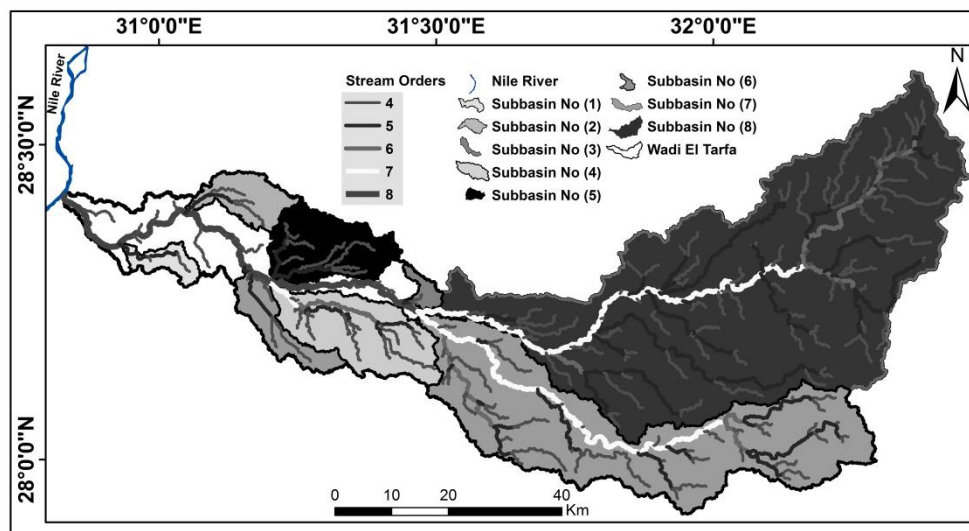


Fig (2): The main drainage network of Wadi El Tarfa and its sub-basins.

2. Material and Methods

The extraction of the main drainage network of Wadi El Tarfa as well as the morphometric analysis has been performed based on Digital Elevation Model (DEM) with resolution 30 m that derived from Shuttle Radar Topography Mission (SRTM 1 Arc-Second Global) which obtained from the USGS site by using ARC GIS software 10.2 (Fig.1) [6]. The topographic maps (scale 1:50,000 and 1:500,000) have been used in the verification of the watershed outlines of Wadi El Tarfa. The geological map of Conoco, (1987) has been used for the delineation of the structural lineaments to calculate the structural lineaments density [7]. The flow chart of the main steps for production the flash flood risk maps are shown in (Fig.3).

The estimation of the flood risk degrees have been estimated by using morphometric ranking method based on the morphometric analyses of thirteen parameters which have direct effect on the flooding (Table.1). The morphometric ranking method is a statistical method in which each parameter is classified into five classes with five rank categories of risk, [8- 9] depend on the following equation [9]:

$$\text{Risk equation} = \frac{\text{Max} - \text{Min}}{5}$$

Where: Max: maximum value of each morphometric parameter, Min: minimum value of each morphometric parameter

Table (1): Hazard degrees of the sub-basins of Wadi El Tarfa.

No	Basin Name	Hazard Degrees of Morphometric Parameters													Total	Hazard Degree
		Direct Relationship									Reverse Relationship					
		A	D	F	Rc	Ish	Rt	Rr	Rn	SI%	WMRb	Lo	Si	Sld		
1	Sub-basin (no. 1)	1	1	3	3	1	1	2	1	2	5	1	1	5	27	2
2	W. Abu - Thumaymat, (no. 2)	1	1	1	3	3	1	1	1	2	3	1	2	3	23	1
3	Sub-basin (no. 3)	1	5	5	1	1	1	1	1	1	1	5	4	5	32	5
4	Sub-basin (no. 4)	1	1	1	5	2	2	1	1	1	4	1	3	3	26	2
5	W. Abu Kibithat, (no. 5)	1	1	1	5	5	2	4	1	1	4	1	3	5	34	5
6	Sub-basin (no. 6)	1	1	3	3	1	1	5	1	5	4	2	5	2	34	5
7	W. Abu Ghaza, (no. 7)	3	1	1	1	1	3	2	4	3	3	1	1	4	28	3
8	W. Abu Sayyal, (no. 8)	5	1	1	2	1	5	3	5	2	4	1	1	1	32	5

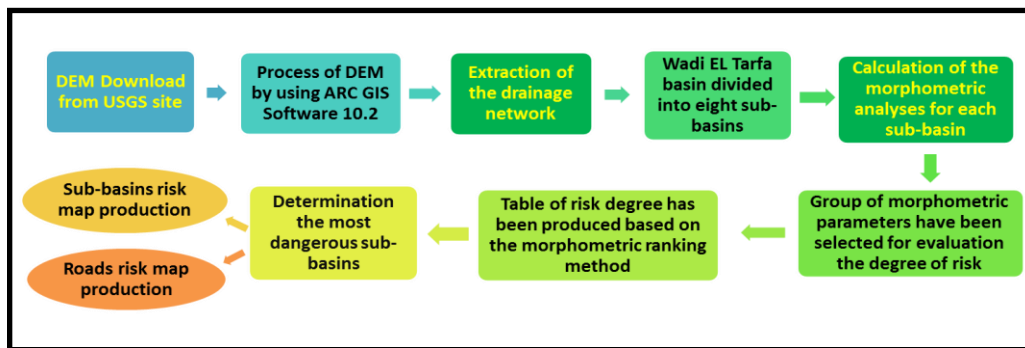


Fig (3): Flow chart for the production of the flash flood risk map.

3. Results and Discussion

Thirteen morphometric parameters have been selected for estimating the flash flood hazard degrees which have direct impact on the flooding and these parameters are classified into two groups as follows, as shown in (Table.1):

1. Group (I): contain nine morphometric parameters which have direct proportion with flood hazards and these parameters are the basin area (A), drainage density (D), stream frequency (F), relief ratio (Rr), ruggedness number (Rn), texture ratio (Rt), slope index (SI%), circularity ratio (Rc) and basin shape index (Ish).
2. Group (II): contain four morphometric parameters which inversely proportional with flooding hazards and these parameters are the weighted mean bifurcation ratio

(WMRb), length of overland flow (Lo), structural lineaments density (Sld) and sinuosity index (Si).

Each parameter is classified into five class intervals with five rank categories of risk. For group (I) rank (1) refer to lower risk degree while rank (5) refer to higher risk and for group (II) rank (1) refer to higher risk degree while rank (5) refer to lower risk. Then all risk degrees of all different parameters for each sub-basin are summed and the collected values are also classified into five class intervals with five rank categories of risk by using the pervious equation, rank (1) refer to lower risk degree while rank (5) refer to higher risk degree. The risk values range between 23 (W. Abu Thumaymat (no.2) and 34 (W. Abu Kibithat (no.5) and sub-basin no.6) (Table.1). The summation degrees of hazard of each sub-basin represent the degree of flood hazard of this sub-basin which is relative value to any other sub-basin.

The class intervals of flood hazard degrees are classified in ascending order and all sub-basins are classified into five classes of hazard depending on these class intervals as follows:

1. Weakly hazardous; for class interval (23-25.2) which is represented by (W. Abu Thumaymat (no.2)) with risk degree 1.
2. Slightly hazardous; for class interval (25.3-27.4) which is represented by (sub-basins nos. 1 and 4) with risk degree 2.
3. Moderately hazardous; for class interval (27.5-29.6) which is represented by (W. Abu Ghaza (no.7)) with risk degree 3.
4. Highly hazardous; for class interval (29.7-31.8) with risk degree 4.
5. Extreme highly hazardous; for class interval (31.9-34) which is represented by (sub-basin (no.3), sub-basin (no.6), W. Abu Kibithat (no.5) and W. Abu Sayyal (no.8)) with risk degree 5.

Two different risk maps have been produced. The first one represents the flood risk map of the sub-basins of Wadi El Tarfa which indicates:

1. Sub-basins (nos. 3, 5, 6 & 8) are the most dangerous sub-basins in Wadi El Tarfa and it needs the priority of the protection systems to mitigate the expected flood hazard, (Fig.4).
2. Sub-basin (no.7) is moderately hazard.
3. Sub-basins (nos. 1, 2 & 4) are safe and reflect the probability of recharging the shallow carbonate aquifers in Wadi El Tarfa, (Fig.4).

The second map represents the flood risk maps of Wadi El Tarfa and its sub-basins on the main roads passing through it which indicates:

1. Wadi Abu Sayyal (sub-basin no.8) represents high risk on a large area of El Shiekh Fadl – Ras Gharab road as indicated by arrows (Fig.5). It is recommended to construct a protection system for El Shiekh Fadl – Ras Gharab road as it crossing the concerned sub-basin, (Fig.5).

2. Wadi El Tarfa in general represents high risk on the roads as indicated by arrows (Fig.6). It is recommended to construct a protection system at the intersection of main channels with all roads passing through it (El Shiekh Fadol– Ras Gharab road, Cairo – Assuit road and Cairo – Aswan road) (Fig.6).

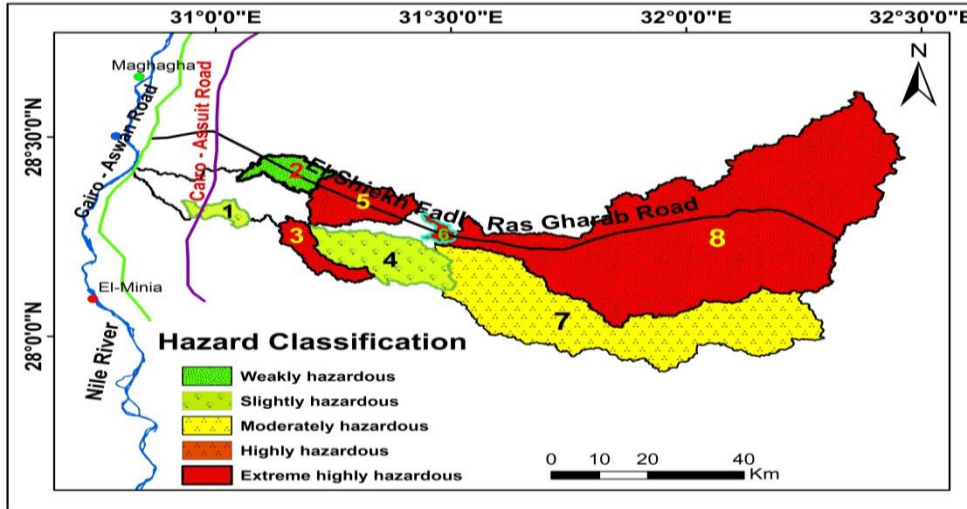


Fig (4): Flood risk map of the sub-basins of Wadi El Tarfa.

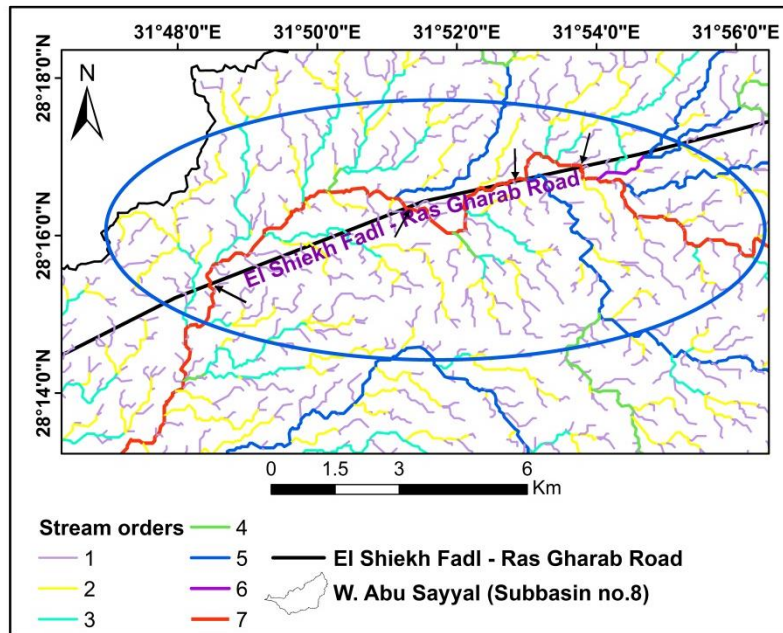


Fig (5): Risk map of Wadi Abu Sayyal (no.8).

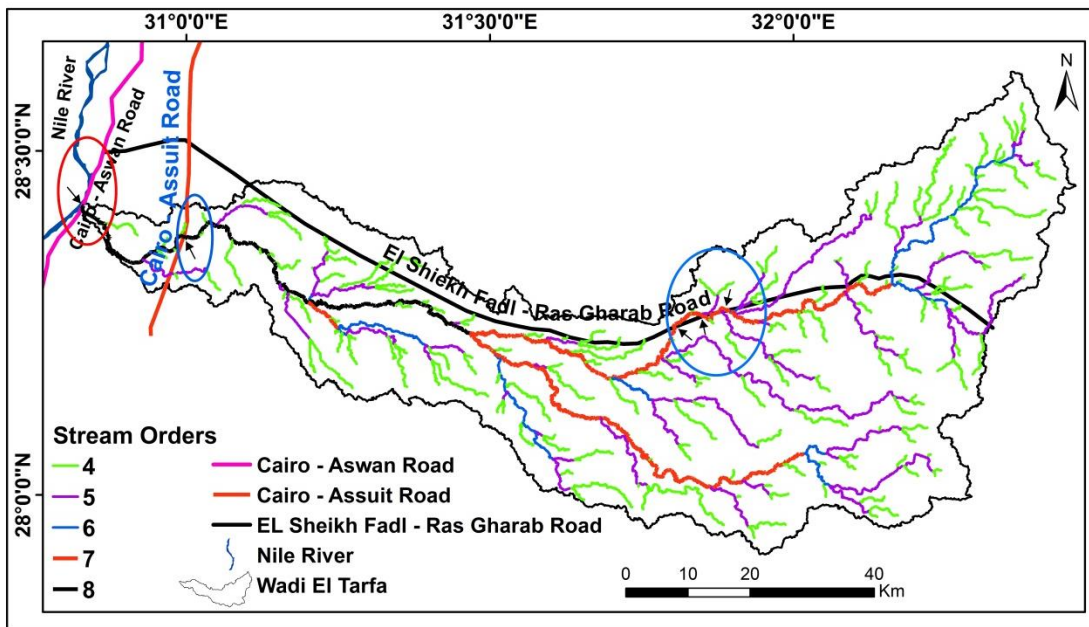


Fig (6): Wadi El Tarfa risk map on the main roads.

According to the estimated flash flood hazard degrees, sub-basins (nos. 3, 5, 6&8) have the highest degrees of risk, so the mitigation systems such as artificial barriers, retardation earthen dams and storage dams are recommended at the up stream and the down stream portions of these sub-basins to mitigate the effect of flooding in one hand and to harvest the surface runoff on the other hand. Sub-basins (nos. 1, 2 & 4) have the lowest hazard degrees which illustrate the surface runoff water reaches from the up stream to the down stream in long duration as well as the high rate of infiltration due to the geological nature of the high fractured intensity in the limestone terrain, so these sub-basins reflect the possibility of recharging the shallow carbonate aquifers in Wadi El Tarfa.

The field study in (November 2018) revealed the presence of a protection system which was constructed under Cairo–Aswan road (Fig.7). It is also observed accumulations of runoff water on both sides of El Shiekh Fadl – Ras Gharab road at Wadi Abu Kibithat (sub-basin no.5). It is recommended to construct a protection tools at the intersection of the concerned sub-basin with the road (Fig.8).



Fig (7): Field photographs showing the protection systems at Cairo – Aswan road (22/11/2018).



Fig (8): Field photographs showing the runoff water on both sides of El Sheikh Fadl – RasGharab road (20/11/2018).

4. References

- [1] CEOS (2003): The use of earth observing satellites for hazard support, assessments and scenarios. Final report of the CEOS Disaster Management Support Group (DMSG).
- [2] Xiao, L. (1999): Flash Floods in Arid and Semi-Arid Zones. International Hydrological Program, Technical Documents in Hydrology, No. 23, UNESCO, Paris.
- [3] Khadri, S. F. R., (2013): Morphometric analysis of Bordi River Basin, Akola District Maharashtra, India, using remote sensing and GIS techniques. IJPRET. Department of Geology, Vol. 1(9), p.1-21.
- [4] Shabana, A. R., (2014): Geology of water resources of Wadi EL Tarfa, Eastern desert, Egypt: Egyptian Journal of Geology, Vol. 58, P. 23-42.
- [5] Strahler, A. N., (1952): Hypsometric (area-altitude) analysis of erosional topography. Geol. Soc. America Bull, 63, 1117-1142.
- [6] <https://earthexplorer.usgs.gov>.
- [7] Conoco (1987): Geological Map of Egypt, Scale (1:500,000), NH 36 SW- BeniSuef sheet.
- [8] Aggour, T. A. O., (1999): Priorities of flood insurance, Gulf of Aqaba region, Southeast Sinai, Egypt. Desert. Inst. Bull., Egypt. Vol.49, No. 2, p.371-400.
- [9] Youssef, A. M., Pardhan, B. and Hassan, A. M., (2011): Flash flood risk estimation along the St. Katherine road, southern Sinai, Egypt using GIS based morphometry and satellite imagery. Environ Earth Sci, Vol. 62, p.611–623. DOI 10.1007/s12665-010-0551-1.

The efficacy of Vancomycin resistant of *Leuconostoc* spp. Isolated from UTI patients in Mosul city-IRAQ

Aws Ibrahim Sulaiman

Biology department / College of Science / University of Mosul

Email: aws_isulaiman@yahoo.com

Abstract: *Leuconostoc* species are gram-positive, non-motile, non-spore-forming, hetero-fermentative, facultative cocci that are found in the environment. They have economic importance because of their use in the dairy and pickling industries and in wine making. *Leuconostoc* species are also found in fermented sausages, vacuum-packed meat products, cereals, and dairy products (butter, cream, fresh/raw milk, cheese) and causes diseases for human like brain abscess and urinary tract infections which are very similar in the shape like streptococcus and other related genera.

We were collected 41 midstream urine samples from 14 Male and 27 Female patients came to ALKHNSAA Teaching Hospital and Al-Salam Teaching Hospital in Mosul city-IRAQ. We obtained only 3 (7.3%) of *Leuconostoc* spp. out of 41 according to identification tests, biochemical tests and resistance to vancomycin which is important test for this bacteria.

We were study the ability of *Leuconostoc* spp. to grow in different temperature and different media. *Leuconostoc* spp. can grow only on nutrient agar at 10 °C and they can growth at 25 °C on both blood agar without hemolysis and *Leuconostoc* Selective media (LSM). *Leuconostoc* spp. were sensitive to IPM₁₀ (32mm/disk) and CIP₁₀ (27mm/disk), respectively and all of them were resistance against other antibiotics under study (AM₁₀, E₁₅, CN₁₀, P₁₀, VA₁₀ and TMP₁₀).

Keywords: *Leuconostoc* spp., LSM, BHIA+VAN .

DOI : doi.org/10.46617/icbe6005

1. Introduction

Phenotypically, *Leuconostoc* spp are catalase-negative coccobacilli or cocci that produce gas from glucose, all of them are intrinsically resistant to vancomycin. Species members like *L. mesenteroides* were isolated from human clinical specimens (Horowitz, *et al.*, 1987 and Facklam and Elliott, 1995).

Leuconostoc spp. caused bacteremia has been documented predominantly in patients with underlying malignancies (acute myeloid leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, hepatocellular carcinoma) and as a complication of solid-organ (e.g., liver) and stem cell transplantation and they can organisms also colonize indwelling intravenous catheters, resulting in catheter-related bacteremia's, meningitis, breast abscess, abdominal abscess and peritonitis (Jofré *et al.*, 2006).

Nosocomial urinary tract infections may also develop; again, in those patients on long-term vancomycin therapy as opportunistic pathogens.

Leuconostoc species have been isolated from brain and liver abscesses, osteomyelitis, and pulmonary infections in compromised and debilitated patients (e.g.,

gastroenterology patients, burn patients, AIDS patients) and as agents of spontaneous bacterial peritonitis and peritonitis in CAPD patients (Buu-Hoi, *et al.*, 1985).

Despite remaining uncommon but these pathogens are gaining importance as opportunistic agents of human infections associated with high mortality rates in the last decade where, *Leuconostoc* spp. have been reported with increasing frequency as human pathogens, causing (Helali *et al.*, 2005 and Procop, *et al.*, 2017).

Leuconostoc spp. have been implicated in a variety of infections. The first cases of *Leuconostoc* infection in humans was reported at 1985 as the risk factors of infection include antibiotic pressure, foreign device, or underlying immune defects. Characteristics that differentiate the *Leuconostoc* spp. from other members of the catalase-negative, gram-positive lactic acid cocci are production of carbon dioxide during the fermentation of glucose. These microorganisms have an important physiological marker related to their intrinsic resistance to vancomycin but successfully treated with penicillin (Albanese, *et al.*, 2006 and Kulwichit, *et al.*, 2007).

Leuconostoc spp. are often mis-identified as Lactobacilli, Streptococci, Pediococci or Enterococci as all these genera share several biochemical properties but different in their behavior towered produced acid from glucose (Mahon, *et al.*, 2015).

The aim of research to isolate and identify this microbe as the first time in our city and detect the antibiotic effectiveness against them.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Samples:

We were collected 41 midstream urine samples from 14 Male and 27 Female patients visited ALKHNSAA Teaching Hospital and Al-Salam Teaching Hospital in Mosul city. All samples were transferred by Brain Heart Infusion Agar supplemented with 6 µg Vancomycin (BHIA+6 µg Van.) to scientific laboratory in biology department / college of Science / University of Mosul immediately and incubated at 37° at 24h (Khudaier, 2011).

2.2. Identification Tests:

For cultivation *Leuconostoc* spp. we were used the medium composed depending on Atlas, (2010) per liter: CaCO₃ 50.0g, NaCl 2.5g, Malt extract 50.0g, Beef extract 1.0g, Poly-peptone (Peptone + tryptone with equal amount)1.0g, Agar 15.0g and distilled / deionized water and bring volume to 1000 ml adjust the pH 7.0 ± 0.2.

After gram stain we identified our suspected bacteria depending on behavior towered Catalase and hydrolysis Bile Esculine also the ability to ferment multiple sugars (Fructose, Lactose, Maltose, and production CO₂ from Glucose fermented using Durham tubes) and growth on blood agar for detected α-hemolysis (Finegold and Martin, 1982; Cappelli, *et al.*, 1999 and Alexander and Strete, 2001).

2.3. The Growth at different temperatures:

We were incubated the *Leuconostoc* spp. on blood agar; *Leuconostoc* agar and Nutrient agar at different temperatures 10, 25 and 37 °C for 24h for differentiate and separation *Leuconostoc* spp. from other related species like *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. because *Leuconostoc* (Procop, *et al.*, 2017).

2.4. Antibiotic Sensitivity test:

The isolates which belong to *Leuconostoc* spp. were tested for the resistance to Ampicillin (AM₁₀), Ciprofloxacin (CIP₁₀), Erythromycin (E₁₅), Gentamicin (CN₁₀), Imipenem (IPM₁₀), Penicillin (P₁₀), Vancomycin (VA₁₀) and Trimethoprim (TMP₁₀) using disks belongs to Bioanalyzer Company, Turkey and the procedure according to Vandepitte, *et al.*, (2003) and CLSI, (2018).

3. Results and Discussion

We obtained 3 (7.3 %) isolates out of 41 clinical samples collected after phenotypic identification of *Leuconostoc* spp. depending on growth on selective media, gram stain, catalase, resistance to vancomycin (the best test for this microbe) and biochemical tests Figures and Tables 1 and 2.



Figure. 1: *Leuconostoc* spp. on blood agar just the white grayish colonies left and *Leuconostoc* spp. on Leuconostoc Selective Medium right

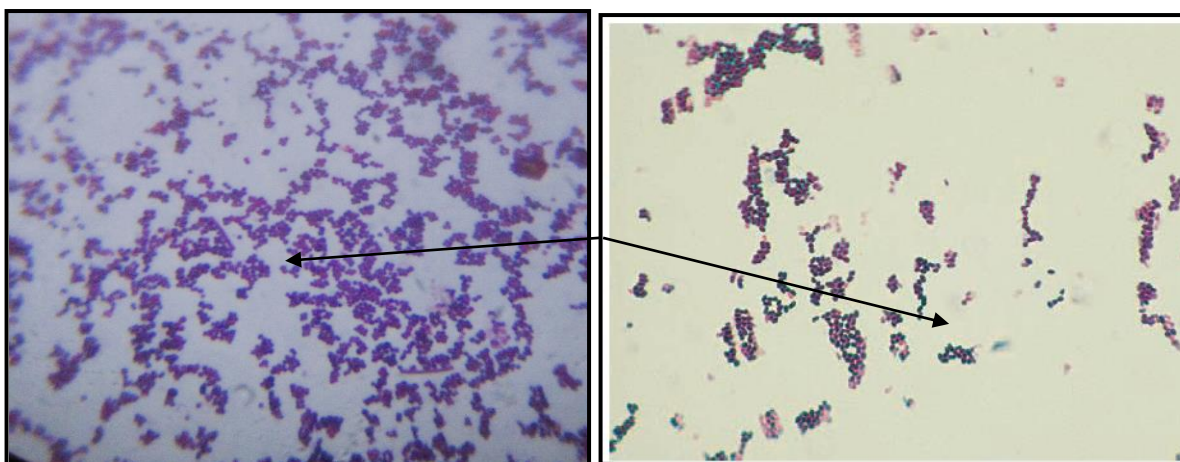


Figure 2: for comparative gram stain of *Leuconostoc* spp. positive cocci and diplococci (100X) from our local isolates on the left and *Leuconostoc* spp. standard on the right from Procop. *et al.*. 2017.

Table 1: Biochemical Identification Tests for selective samples only

NO	Catalase	Bile Esculine	Urease	Resistance to Vancomycin	α -hemolysis on blood agar	Carbohydrate Fermentation			
						Fructose	Glucose, produce CO ₂	Lactose	Maltose
3	-	+	-	R	+	+	+	+	
5	-	-	-	R	+	+	+	+	
6	-	+	-	R	+	+	+	+	

Table 2: Growth at different Temperatures at 24h

Mediums			
	Leuconostoc Selective Medium	Blood Agar	Nutrient Agar
10 C	-	-	+
25 C	+	+ non hemolytic	+
37 C	+	+ α - hemolytic	+

The morphology of *Leuconostoc* species like *Streptococcus* spp. are gram-positive cocci or diplococci, catalase-negative; that are resistant to vancomycin and produce bubbles (CO₂) gas from glucose fermentation it is very useful for differentiate from other gram positive cocci catalase negative bacteria like (*Streptococcus* species, *Enterococcus* species *Alloiococcus* species, *Gemella* species, *Pediococcus* species, and *Helcococcus* species), *Leuconostoc* species do not grow at 45°C but can grow at 10 °C and this test it is best for determined from other gram positive cocci catalase negative group also, but *Leuconostoc* species may be readily misidentified as *Streptococci* because have a same shape under microscope (Procop, *et al.*, 2017).

The biochemical identification for this microbe are catalase (-), bile esculine (+), growth in the presence of 6.5% NaCl and production of gas from glucose (+), produce α -hemolysis on blood agar (Elliott and Facklam, 1993 and Mahon, *et al.*, 2011).

From these results we exhibited just 3,5 and 6 isolates , this result was similar to Khudaier, (2011) when he studied *Leuconostoc mesenteroides* from UTI patients in North India he founded that only 8 isolates out of 558 urine samples was catalase, α -hemolysis, resistant to vancomycin and fermentation several carbohydrates and production gas from glucose and these results agreement somewhat to the study of Cappelli and their colleagues, (1999) they founded (five isolates) of *Leuconostoc mesenteroides* from UTI patients were resistant to vancomycin and production CO₂ from glucose fermented.

We think *Leuconostoc* Selective Medium (LSM) is selective because contain poly peptone as a high source of proteins and salts like some researchers were studied the selective media for this bacteria and they made to develop media for the isolation and enumeration of these organisms, and both selective and differential media have been described; however, no medium has proven to be satisfactory.

There are many media are based on the ability of *Leuconostoc* to utilize citrate, which is recognized by the presence of halos around colonies growing on media containing insoluble calcium citrate, but not all of them were utilize citrate furthermore; In combination with other ingredients these agents proved to be successful (Benkerroum, *et al.*, 1993 and Moschetti, *et al.* , 2000).

We achieved the susceptibility towards several antibiotics and the table 3 below explain these results with more details.

Table: 3 Antibiotics Sensitivity Tests

Antibiotics	Sensitivity percentage (no.)	Resistant percentage (no.)	Antibiotics	Sensitivity percentage (no.)	Resistant percentage (no.)
Ampicillin (AM ₁₀)	0	100	Gentamicin (CN ₁₀)	0	100
Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC ₃₀)	25	75	Imipenem (IPM ₁₀)	100	0
Cefixime (CFM ₅)	0	100	Penicillin (P ₁₀)	0	100
Ciprofloxacin (CIP ₁₀)	33	67	Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP ₁₀)	0	100
Erythromycin (E ₁₅)	0	100	Vancomycin (VA ₁₀)	0	100

These results demonstrated that this microbe were sensitive to Imipenem (27mm/disk) and Ciprofloxacin (27mm/disk) whereas resistant to AM₁₀, E₁₅, CN₁₀, P₁₀ and TMP₁₀ respectively disagreement with result from Khudaier, (2011). The disagreement between present results and Khudaier, (2011) could be due to location where isolates were taken i.e. from Iraq and from India. On the other hand isolates were similar about vancomycin resistance depending on CLSI (2011) which detected the value of this antibiotic was resistance ($\geq 17\text{mm}$) and also this study is similar to the study of Albanese and their colleagues (2006).

All of them were sensitive towards imipenem, Bou and their colleagues, (2008) have been demonstrated that out of 42 patients infected with *Leuconostoc* spp. 9 of the patients died and 3 of the deaths (7.1%) were directly related to the *Leuconostoc* infection and all of them were resistant to vancomycin, *Leuconostoc* spp. has been considered a high pathogen effected in the immunocompromised host.

4. Conclusion

From this article we are advice all clinical diagnostic laboratories to use vancomycin resistance, growth at 10⁰C and glucose fermentation tests to fast detect and separate *Leuconostoc* spp. from other related genera because these tests are very useful and simply.

5. REFERENCES

- Albanese, A.; Spanu, T.; Sali, M.; Novezgn, F.; D'Inzeo, T.; Santagelo, R.; Mangiola, A.; Anile, D. and Fadda, G. (2006). Molecular identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a cause of brain abscess in an immunocompromised patient. *J. Clin. Microbiol.* 44(8):3044-3045.
- Alexander, S. K. and Strete, D. (2001). *Microbiology: A photographic Atlas for the Laboratory*. Benjamin Cummings, An imprint of Addison Wesley Longman, Inc. USA. Pp.35-36.
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed. Talyor and Francis Group, an Information business. USA. P. 463.
- Benkerroum, N.; Misbah, M.; Sandine, W. and Elaraki, A. (1993). Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy product. *Appli. and Enviro. Micro.* 59(2):607-609.

-
- Bou, G.; Saleta, J.L.; Nieto, J.A.; Tomás, M.; Valdezate, S.; Sousa, D.; Lueiro, F.; Villanueva, R.; Pereira, M.J. and Llinares, P. (2008). Nosocomial Outbreaks Caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*. *Emerg. Infect. Dis.* 14(6):968-971.
- Buu-Hoi, A.; Branger, C. and Acar, J. F. (1985). Vancomycin-resistant streptococci or *Leuconostoc* sp. *Antimicrob Agents Chemother.* 28(3):458-460.
- Cappelli, E. A.; Barros, R. R.; Camello, T. C.; Teixeira, L. M and Merquior, V.C. (1999). *Leuconostoc pseudomesenteroides* as a Cause of Nosocomial Urinary Tract Infections. *J. Clin. Micro.* 37(12): 4124–4126.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. 2H-2 31(1):105.
- Clinical and laboratory standards institute CLSI. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty- eight Informational Supplement. M100. 38(3):23-24.
- Elliott, J. A. and Facklam, R. R. (1993). Identification of *Leuconostoc* spp. by analysis of soluble whole-cell protein patterns. *J. Clin. Micro.* 31(5): 1030-1033.
- Facklam, R. and Elliott, J.A. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 8(4): 479-495.
- Finegold, S. and Martin, W. (1982). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. C. V. Mosby Company. Missouri. USA. Pp. 619-648.
- Helali, A.; McAlear, D. and Osoba, A. (2005). *Leuconostoc* bacteremia in a child with short-gut syndrome. *Saudi Med J.* 26(2): 311-313.
- Horowitz, H.W.; Handwerger, S.; van Horn, K.G. and Wormser, G.P. (1987). *Leuconostoc*, an emerging vancomycin-resistant pathogen. *Lancet.* 2(8571):1329-1330.
- Jofré, M.L.; Sakurada, Z.A.; Ulloa, M.T.; Hormázabal, J.C.; Godoy, M.V.; Fernández, O.J.; Gutiérrez, M.M.; Monteverde, M.P.; Castillo, G.M. and Canales, P.A. (2006). *Leuconostoc* infections in patients with short gut syndrome, parenteral nutrition and continuous enteral feeding. *Rev Chilena Infectol.* 23(4): 340-345.
- Khudaier, B. Y. (2011). *Leuconostoc mesenteroides* cause Nosocomial UTI At a tertiary care center in North India. *J. Thi-Qar Uni.* 4(6):23-34.
- Kulwichit, W.; Nilgate,S.; Chatsuwan, T.;; Krajiw, S.; Unhasuta, C. and Anan, A. (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infect. Dis.* 7(69):1-8
- Mahon, C. R.; Lehman, D. C. and Manuselis, G. (2011). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. W. B. Saunders Company. CHINA. Pp.: 343-344.
- Mahon, C.; Lehman, D. and Manuselis, G. (2015). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Saunders, an imprint of Elsevier, Inc.
- Moschetti, G.; Blaiotta, G.; Villani, F. and Coppola, S. (2000). Specific Detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *APPL ENV. MICRO.* 66(1): 422-424.
- Procop, G.; Church, D.; Hall, G.; Janda, W.; Koneman, E.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2017). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th ed. Wolters Kluwer. CHINA.
- Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck C. (2003). *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology* 2nd. World Health Organization. Geneva.

Quantification of cytotoxic levels of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* cultivated on simple synthetic medium

Ibtesam Ghadban Auda, Afrah Fahad Abdulkareem *

Department of biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq.

*Corresponding author's e-mail:

aalfahad17@uomustansiriyah.edu.iqstbg@uomustansiriyah.edu.iq.

Abstract: The leading microorganism of chronic otitis media is *P. aeruginosa* and the most powerful exotoxin of *P. aeruginosa* is exotoxin A that is responsible for the cytopathic effect on the host tissues. This study aimed to determine the percentage of *toxA* gene occurrences on chromosome of the otitis media most prevalent causative agent, *P. aeruginosa*, study the effect of simple salts-based synthetic medium on the production of exotoxin A and evaluate the effect of produced exotoxin A amounts on mice vital organs. The results showed that *P. aeruginosa* is predominant in otitis media as compared with the others. Furthermore, exotoxin A gene is found on all tested *P. aeruginosa* isolates. Therefore, all *toxA* positive *P. aeruginosa* isolates were subjected to produce exotoxin A by the cultivation of them on simple synthetic media (with trace iron and omitting the glutamate) and quantification of the exotoxin A by ELISA technique. *Pseudomonas aeruginosa* isolates were varied in exotoxin A production and were ranged from 78 to 1380 pg/ml. Injection of pure exotoxin A at low doses within the produced values to mice showed histopathological lesions of mice vital organs; these lesions increase with increasing the injected dose. As a conclusion, *P. aeruginosa* is still in the front of otitis media pathogens and *toxA* gene is predominant on their chromosomes. Even in poor nutrition conditions and the presence of trace amounts of iron, *P. aeruginosa* isolates are still able to grow and produce exotoxin A at amounts that can exert its harmful effect on mice vital organs.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *toxA* gene, exotoxin A, histopathology.

DOI : doi.org/10.46617/icbe6005

1-Introduction

Inflammation of the middle ear, otitis media, is the frequent type of ear infection worldwide (1). The most predominated Gram-negative organisms of otitis are *Pseudomonas* sp. followed by *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, and *S. Aureus* (2,3). Acute upper respiratory tract infections may extend from the nasopharynx to the middle ear causing acute otitis media. Chronic otitis media, the other type of ear infection, usually caused by *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* (3,4). *Pseudomonas aeruginosa* also caused malignant otitis externa that is common in patients with immunosuppression or diabetes (5).

Exotoxin A (ETA), *P. aeruginosa* product, is extracellular toxin encoded by the chromosomal *toxA* gene. The toxin is an ADP-ribosyl transferase that inhibits eukaryotic cell protein synthesis, cell death will occur as a consequence (6). There are differences in killing due to steps after the ADP-ribosylation of EF2. Moreover, exotoxin A increases mitochondrial permeability, ultimately, leading to the cell death (7). The apoptosis induced by exotoxin A depends on the dose of exotoxin A received by the cell. Exotoxin A production needs some conditions, iron-limiting growth

conditions at special media. The *tox* gene is regulated at the transcriptional level by the *regAB* operon gene products. The expression of both *tox*A and *regAB* is repressed under the iron-abundant environment (8). The recent work aimed to determine the percentage of *tox*A gene occurrences on chromosome of the otitis media most prevalent causative agent, *P. aeruginosa*, and to study the effect of simple salts-based synthetic medium on the production of exotoxin A.

2-materials and methods

2.1. Samples collection and bacterial identification

Ear swabs were obtained from 50 individuals complaining of symptoms of otitis media. Patient's age ranging from several months to 80 years, 25 females and 25 males. Ear swabs were collected in the period from January to April 2017 from Al-Kadhymia teaching hospital-Baghdad. Ear swabs were inoculated ordinary media. All obtained isolates were identified initially using biochemical tests according to Forbes *et al* (9).

2.2. Molecular identification of *P. aeruginosa* isolates

Chromosomal DNA of biochemically identified *P. aeruginosa* isolates was extracted using commercially available DNA extraction kit (Promega-USA). To confirm the identification of *P. aeruginosa* isolates, PCR technique was performed using 16S rRNA gene (*rpsL*) specific primer set. The sequence of 16S rRNA gene forward primer was 5'-GCAACTATCAACCAGCTGGTG-3' whilst the reverse is 5'-GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG-3'. The amplification steps comprising 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 57°C for 10 seconds and extension at 72°C for 25 seconds. Oligonucleotide primers of 16S rRNA gene were adapted from Lianes *et al* and Xavier *et al* (10,11).

2.3. *tox*A gene detection

To ensure that *tox*A gene is present on the chromosome of *P. aeruginosa* isolates before exotoxin A been produced by synthetic medium, the *tox*A gene was detected via PCR using specific primer set, forward primer 5'-GTGCGCTACAGCTACACG-3' and the reverse primer, 5'-CTTGCCCTCCCAGGTATC-3' (3,12). The *rpsL* and *tox*A genes amplification were performed using Go – Taq green master mix kit (Promega-USA). The cycling protocol of *tox*A gene amplification comprising an initial denaturing step at 94°C for 3 minutes, followed by 32 cycles of 94°C for 30 seconds, 57°C for 45 seconds and 72°C for 1 minute³. Chromosomal DNA and PCR products were electrophoresed on agarose gel at concentrations of 1% and 1.5%, respectively (13).

2.4. synthesis of simple medium

Simple synthetic culture media were prepared according to Debell (14), with a major modification represented by omitting of amino acids and one of the salts and replacing the FeCl₃ in the original paper by FeSO₄. The following salts: 0.0427 M NaCl, 0.0335 M KCl, 0.0014 M Na₂HPO₄, 0.000415 M MgSO₄, 0.000025 M MnCl₂.4H₂O, and 0.000001 M FeSO₄ were dissolved in one liter of distilled water; the pH was adjusted to 7.5 then the medium was sterilized by autoclaving. Aliquots of 5ml of the media were made and inoculated with the test bacteria then incubated with shaking at 37°C for 20 hours in a shaker incubator.

2.5. Quantification of exotoxin A production

Produced exotoxin A was quantified by ELISA technique using standard curve method utilizing commercially available kit (Cusabio-biotec-USA) and according to manufacturer instructions. The optical density was determined of each well, using a microtiter plate reader (BioTek instrument, Inc. USA) set to 450 nm.

2.6. In vivo histopathological experiment

Five groups of Bagg Albino laboratory breed (BALB/c) white males mice aged 20 weeks each group consisting of 5 mice were obtained from Al-Kadhymiah center of infertility/ Baghdad. Pure exotoxin A (Cusabio biotech - USA) was twofold diluted and injected intraperitoneally into the five groups. Each group receives an exotoxin A dose differ from each other. The first group injected with 100 pg while the second receive 200pg, third and fourth injected with 300 pg and 400 pg respectively. The fifth group injected with normal saline intraperitoneally and considers as a negative control. Seventy-two hours later, the 5 groups were killed and four vital organs were isolated (heart, lung, spleen, and liver) from each animal, histopathological sections were prepared, stained with hematoxylin and eosin stain and examined at 40X power (15).

3. Result

3.1. Samples collection and bacterial identification

Ear swabs culture gave 41 bacterial isolates, 23 (56.1%) was belong to *P. aeruginosa*. The rest percentage belonged other types of bacteria, *Staphylococcus aureus* (29.3%), *E. coli* (4.9%), *Proteus* spp. (4.9%), *Enterobacter* spp. (2.4%) and *Streptococcus pneumoniae* (2.4%) as shown in the table (1).

Table 1: Aerobic bacterial causative agents of otitis media.

Bacteria	No.	Percentage (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	56.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	29.3
<i>E. coli</i>	2	4.9
<i>Proteus</i> spp	2	4.9
<i>Enterobacter</i> spp	1	2.4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2.4
Total	41	100

3.2. Molecular identification of *P. aeruginosa* isolates

The extracted DNA of *P. aeruginosa* was fairly pure preparation with satisfied concentration (data not shown). Amplification of *rpsL* gene revealed 201bp amplicon confirming by that *P. aeruginosa* identification (Figure 1).

3.3. *toxA* gene detection

All of *P. aeruginosa* isolates 23(100%) possess chromosomal *toxA* gene when amplified by PCR technique. Figure (2) show agarose gel electrophoretogram of *rpsL* (201bp) and *toxA* (417bp) PCR products, respectively. As shown in figure (2), the lanes reveal the band of interest, *toxA* (417bp).

3.4. Quantification of exotoxin A production

All *toxA* positive *P. aeruginosa* isolates were subjected to produce exotoxin A by the cultivation of them on simple synthetic media and quantification of the exotoxin A by ELISA technique. *Pseudomonas aeruginosa* isolates were varied in exotoxin A production and were ranged from 78 to 1380 pg/ml (figure 3).

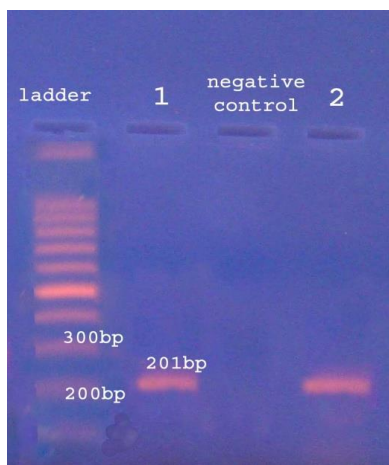


Figure 1: Agarose gel electrophoretogram of *rpsL* PCR products.

First lane: 100bp DNA ladder. Lanes 1 and 2: *rpsL* gene amplicon (201bp) and a lane of negative control in the middle. Electrophoresis was carried out in 1.5% agarose gel at (7V/cm) for 90 minutes.

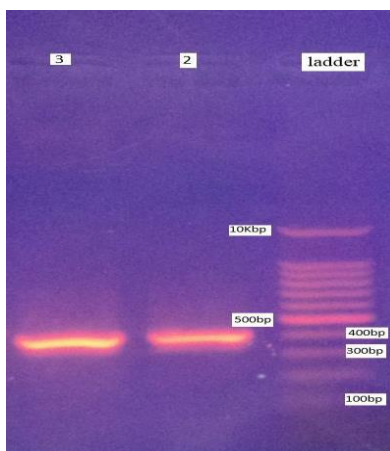


Figure 2: Agarose gel electrophoretogram of *toxA* PCR products.

Lane 1:100bp DNA ladder. Lanes 2 and 3: *toxA* gene amplicon (417bp). Electrophoresis was carried out in 1.5% agarose gel at (7V/cm) for 90 minutes.

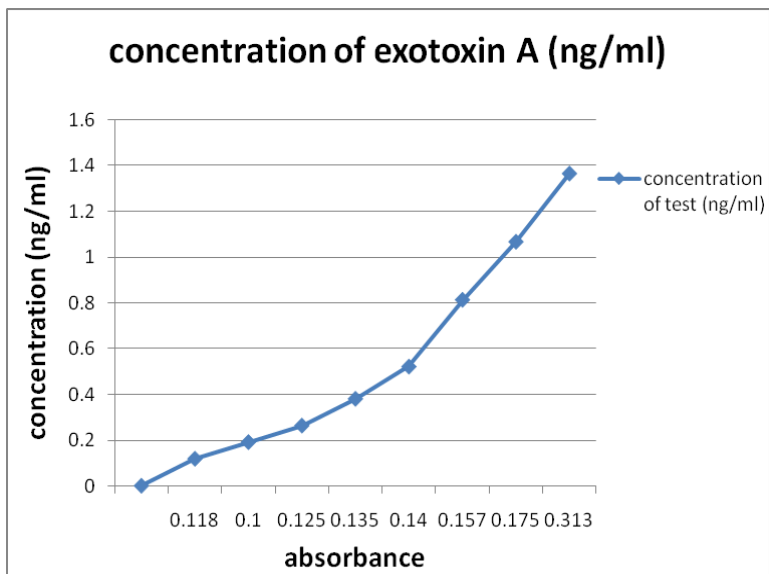


Figure 3: concentration of exotoxin A in the supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* inoculated simple synthetic media.

3.5. *In vivo* histopathological study

The observed lesions of liver tissue include hepatocytes necrosis, blood vessels congestion, infiltration of kuffer cell and ballooning degeneration of hepatocytes. The lesions were severe in the liver of mice group injected with 400pg, especially blood vessels congestion (figure 4). Micelungsreveal some histopathological lesions represented by alveolar walls thickening, infiltration of plasma cells and lymphocytes as well as mucin accumulation in the lumen of alveoli, blood vessels congestion. The severity of these lesionsis increased with the increaseof the injectedamount of the exotoxin A especially blood vessels congestion and alveolar walls thickening (figure 5).

Regarding spleen lesions, degeneration of splenocytes, white pulp enlargement, infiltration of phagocytes cell, and congestion and hyperplasia of blood vessels were observed. The spleen of mice injected with 300 and 400 pg reveal obvious enlargement of white pulp(figure 6).Heart histopathological lesions include congestion of blood vessels especially of the hearts of mice injected with 400pg, cardiac cells necrosis and degeneration and inflammatory cells infiltration (figure 7).

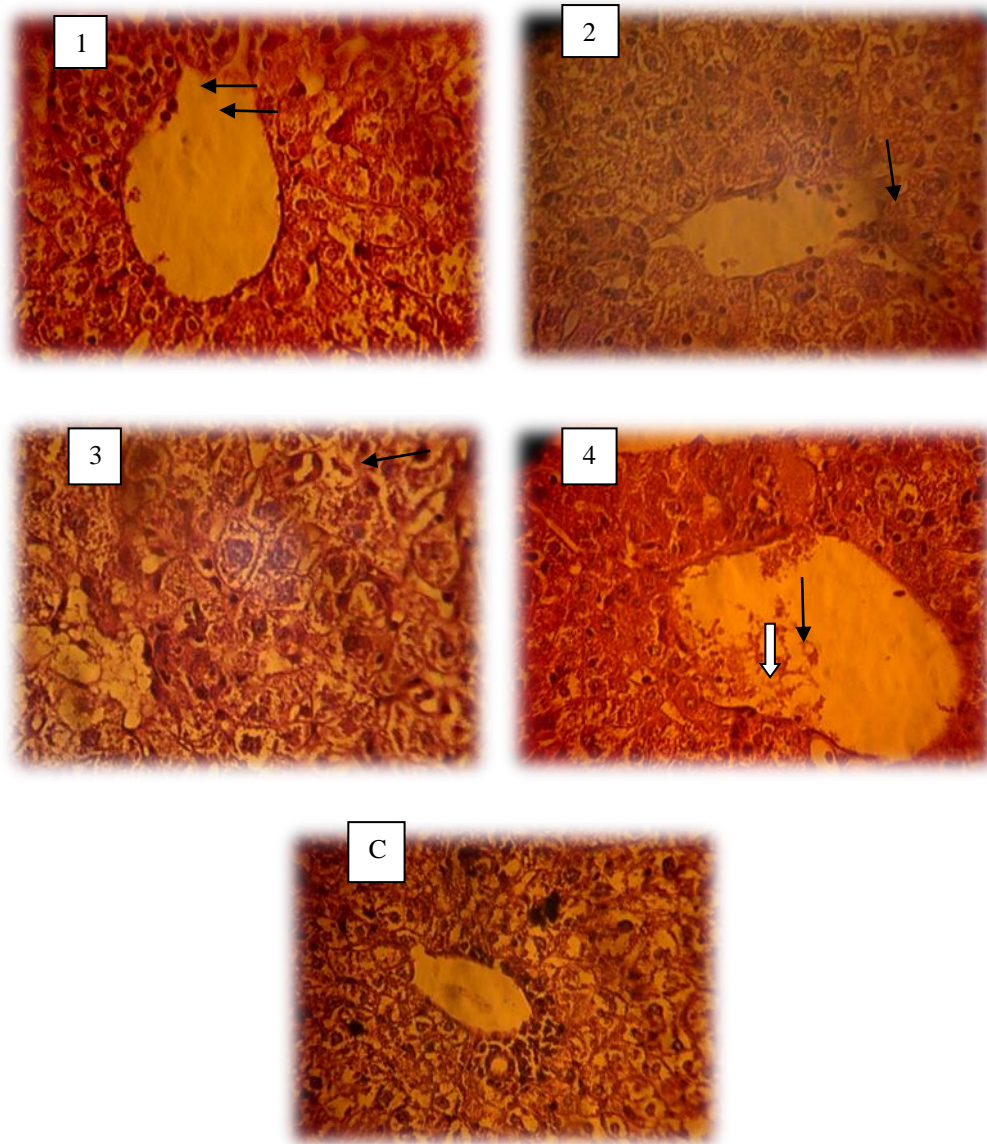


Figure 4: Histopathological sections of mice liver

Sections 1, 2, 3 and 4 liver histopathological sections of mice injected with 100, 200,300 and 400pg respectively. C is controlnegative liver.Blood vessels congestion of section 4 (thin black arrow), degeneration and necrosis of hepatocytes is in section 3 (thin black arrow), kuffer cell infiltration is in sections 1, 2 (thin black arrow) and 4 (thick white arrow).

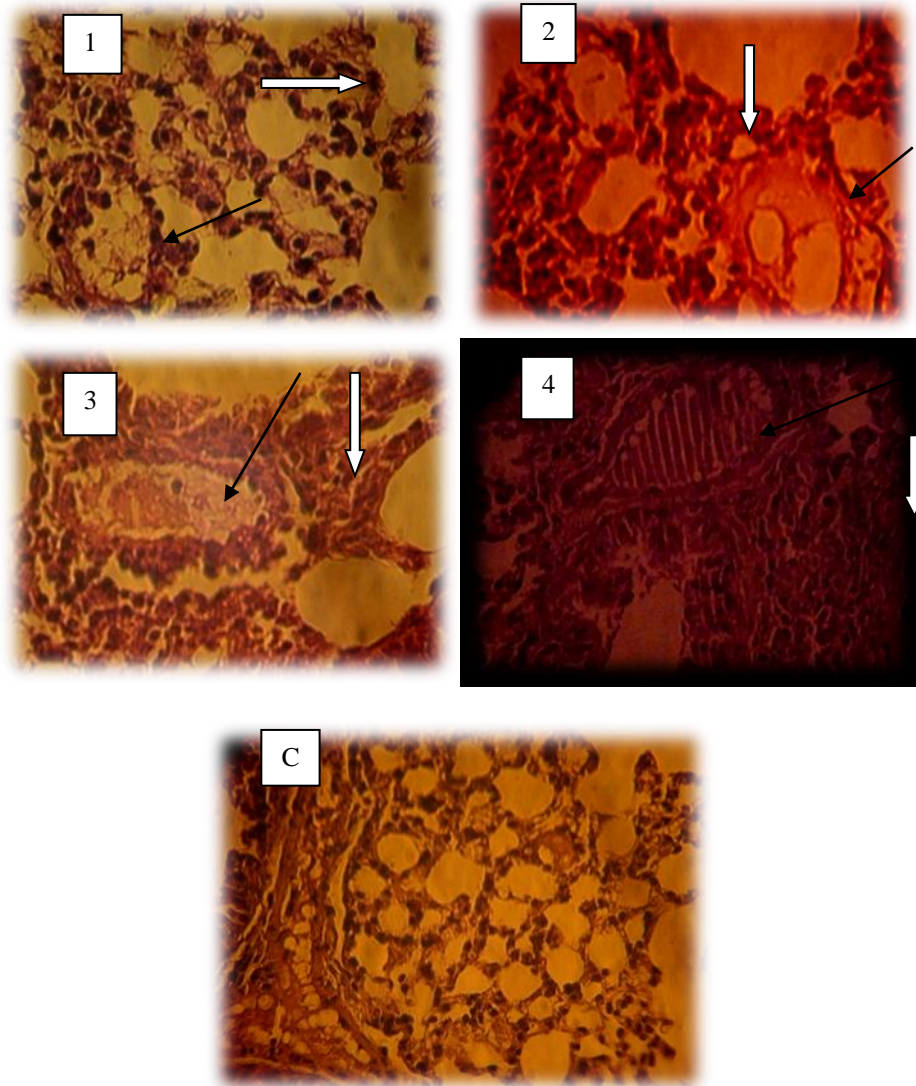


Figure 5: Histopathological sections of mice lung

Sections 1, 2, 3 and 4 lung histopathological sections of mice injected with 100, 200, 300 and 400pg respectively, C is controlnegative lung tissue. There is a thickening in alveolar walls (white arrows in all sections). Mucin accumulation in the alveoli is in sections 1, 2, and 3 (black arrows); blood vessels congestion is in section 4 (black arrow). The lesions are increased with increasing of the injected exotoxin A.

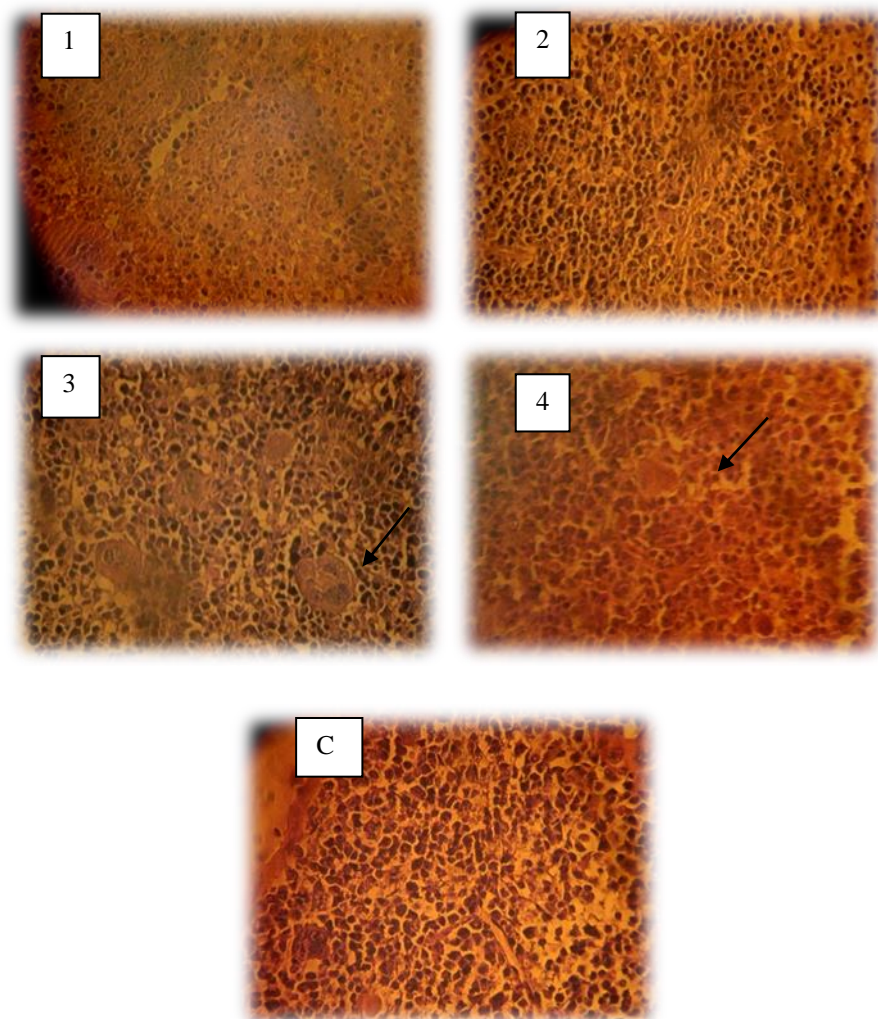


Figure 6: Histopathological sections of mice spleen

Sections 1, 2, 3 and 4 spleen histopathological sections of mice injected with 100, 200, 300 and 400pg respectively. C is controlnegative spleen. Enlargement of white pulp appeared in sections 3 and 4 (arrows).

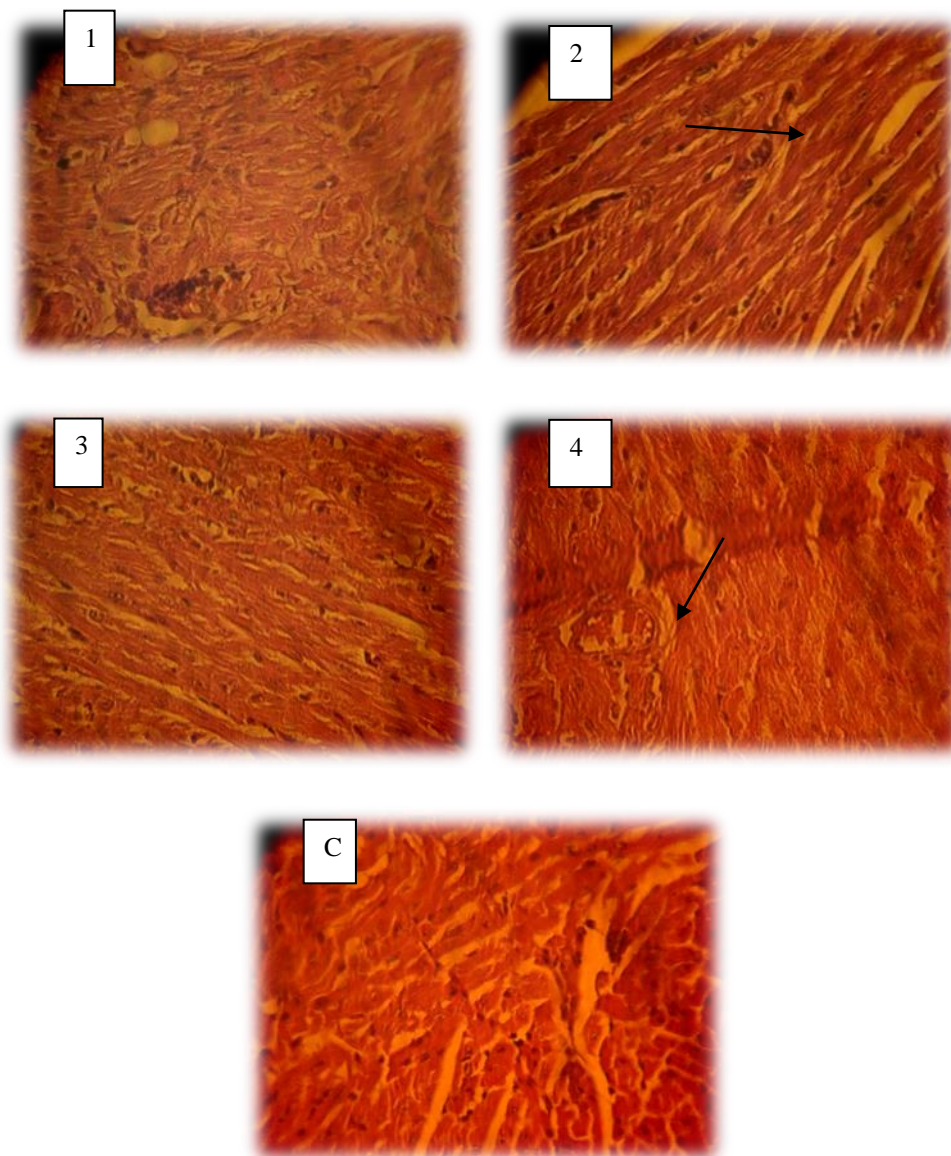


Figure 7: Histopathological sections of mice heart

Sections 1, 2, 3 and 4 heart histopathological sections of mice injected with 100, 200, 300 and 400pg respectively. C is controlnegative heart. Blood vessel congestion in section 4 (arrow) and degenerative changes are in section 2 (arrow).

4. Discussion

Pseudomonas aeruginosa is still in the front of otitis media pathogens especially in chronic infection cases in all ages of the current study and it is not far from the results obtained by other studies(16,17,18). The pathogenicity and severity of *P. aeruginosa* infection are related to excreting its own toxins and other harmful products (19). The most powerful exotoxin of *P. aeruginosa* is exotoxin A(20,21). A high percentage of clinical *P. aeruginosa* isolates carry *toxA* gene on their chromosome the percentage may reach to 100% (3) as reported here.

Previously some observations were reported as *P. aeruginosa* can grow and multiplies in unsympathetic conditions like disinfectants (22,23)but whether or not it is able to produce its extracellular toxin in such condition is still mysterious. The main aspect in *P. aeruginosa* distinction as a pathogen is its intrinsic resistance to antibiotics and disinfectants. Furthermore, the complete genome sequence of *P. aeruginosa* highlights the adaptability and intrinsic antibiotics and disinfectants resistance of *P. aeruginosa* (22). The simple salts-based media of this study has proved to not only encourage *P. aeruginosa* to grow but also to induce exotoxin A production. *Pseudomonas aeruginosa* isolates were varied in exotoxin A production, this may be due to individual variation in gene expression (24). Despite the simplicity of the medium by which the exotoxin A was produced, *P. aeruginosa* isolates still produce relatively good amounts of exotoxin A. This presumably explain the virulence of *P. aeruginosa* even in poor nutrition environment. Even in presence of trace amount of iron, that well known as an inhibitor of exotoxin A production, and omitting of glutamate that enhances the exotoxin A production (25), *P. aeruginosa* isolates still produce exotoxin A. Moreover, exotoxin A at these low concentrations can induce histopathological lesions in the mice vital organs and these effects increase with the increasing of exotoxin A concentration. From this point of view, *P. aeruginosa* isolates are able to produce exotoxin A at amounts that can exert its harmful effect on vital organ tissues. Hence exotoxin A affect internal vital organs at low concentration reached 100 picograms as proved by this study to few micrograms as reported previously (26,27).

As a conclusion, *Pseudomonas aeruginosa* is still in the front of otitis media pathogens and *toxA* gene is predominant on their chromosomes. Even in poor nutrition conditions and the presence of trace amounts of iron, *P. aeruginosa* isolates are still able to grow and produce exotoxin A at amounts can exert its harmful effect on mice vital organs.

Acknowledgment: The author would like to thank Biology Department/College of Science/Mustansiriyah University (www.uomustansiriyah.edu.iq) for its support the present work.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

5. References

- 1- Vergison A, Dagan R, Arguedas A, Bonhoeffer J, Cohen R, DHooge I, Ray GT. Otitis media and its consequences: beyond the earache. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(3):195-203.
- 2- Oyeleke SB. Screening for bacterial agents responsible for otitis media and their antibiogram. *African J. Microbiol. Res*. 2009; 3(5): 249-252 .
- 3- Auda IG, AL_Kadmy IMS, Ali, ANM, Muslim SN, Salman IMA. *toxA* gene as a chromosomal marker for rapid identification of otitis media *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Adv. Chem. Engg. Biol. Sci*. 2015;2 (10): 40-42.
- 4- Wideman WL. *Pseudomonas aeruginosa* otitis media and interna in a chinchilla ranch. *Can. Vet. J*. 2006; 47(8): 799-800.
- 5- Hobson CE, Moy JD, Byers KE, Raz Y, Hirsch BE, McCall AA. Malignant otitis externa: evolving pathogens and implications for diagnosis and treatment. *Otolaryngol*. 2014; 151(1): 112-116.
- 6- Todar. K. *Todar's Textbook of bacteriology*. 1sted. Madison and Wisconsin. 2008.
- 7- Du X, Youle RJ, FitzGerald DJ, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Mol. Cell. Biol*. 2010; 30(14): 3444-3452.
- 8- Ochsner UA, Johnson Z, Lamont IL, Cunliffe HE, Vasil ML. Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Mol. Microbiol*. 1996;21(5):1019-28.
- 9- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Diagnostic Microbiology*. 10th ed. Mosby. USA. 2002.
- 10- Lianes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48(5): 1797-1802.
- 11- Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg L, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 217-222.
- 12- Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O. Large-scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol*. 2009; 9:2180-9.

- 13- Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York. USA. 2001.
- 14- Debell RM. Production of Exotoxin A by *Pseudomonas aeruginosa* in a Chemically Defined Medium. Infect. Immun., 1979; 24(1): 132-138.
- 15- Stevens, A. the hematoxylin in: Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd edition. Bancroft, J.D. and Stevens, A. London, Churchill livingstone. 1982.
- 16- Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Wackym PA. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. Jama. 2006; 296(2): 202-211.
- 17- Mansoor T, Musani MA, Khalid G, Kamal M. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: Sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad. 2009; 21(2): 120-3.
- 18- Malkappa SK, Kondapaneni S, Surpam RB, Chakraverti TK. Study of aerobic bacterial isolates and their antibiotic susceptibility pattern in chronic suppurative otitis media. Indian J. Otol. 2012; 18(3): 136.
- 19- Bomberger JM, MacEachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. PLoS Pathogens. 2009; 5(4): e1000382.
- 20- Yates SP, Taylor PL, Jørgensen R, Ferraris D, Zhang J, Andersen GR, Merrill AR. Structure-function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. J. 2005; 385(3): 667-675.
- 21- Yates SP, Jørgensen R, Andersen GR, Merrill AR. Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. Trends Biochem. Sci. 2006; 31(2): 123-133.
- 22- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Garber RL. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406(6799): 959.
- 23- Perumal PK, Wand ME, Sutton, JM, Bock, LJ. Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens. J. Hospital Infect. 2014; 87(4): 227-233.
- 24- Gaines JM, Carty NL, Tiburzi F, Davinic M, Visca P, Colmer-Hamood, JA, Hamood AN. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen. Microbiol. 2007; 153(12): 4219 - 4233.
- 25- Somerville G, Mikoryak CA, Reitzer L. Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity. J. Bacteriol. 1999; 181(4): 1072-1078.
- 26- Al-Muhammadaw KJ. biochemical and molecular study of exotoxin A from a local isolate of *Pseudomonas aeruginosa* Ph.D. thesis. College of science. Al-Mustansiriyah University. 2006.
- 27- Manafi A, Kohanteb J, Mehrabani D, Aziz Japoni A, Amini M, Naghmachi M, Zaghi AH, Khalili N. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. BMC Microbiol. 2009; 9: 23.

Detection of IL18 AND HSP70 LEVELS IN SERUM OF PATIENTS WITH ASTHMA

Zainab Nasser Nabat* Bareq A.ALateef Entsir marzoq
*Babylon Technical institute/ AL-Furat AL Awsat Technical University, 51015 Babylon,
Iraq*

*Corresponding Author: zainabnasser1989@gmail.com

Abstract: The current study included 5 ml blood were collected from 100 patients with asthma and 100 controls. Who admitted to Hila General teaching hospital and margin hospital through the period from October 2017 to April 2018. The study deals with detection of cytokines concentration IL-18 showed increased at in concentration especially in age group (12-21 years) years and reached reach 314.777 pg/ml compared to control group. HSP70 showed increase in their concentrations in asthma patient than in controls especially at age group (12-21 years) years which reached 117pg/ml. The patient samples were applied to determine some parameters include (Hb, RBC count, WBC & Eosinophil count). The results revealed that the mean Hb and RBC levels for asthmatic patients were lower than control (8.5000±4.65855g/dL, 10.9979 ±4.09533g/dL. 6.5000±4.07999310x12/l, 3.5183±6.0721610x12/L) respectively. In this study the patients suffered from Iron deficiency anemia and nutritional deficiency. While leukocyte and Eosinophile count values were higher than normal (8.5000±4.65855g/dl , 10.9979±4.09533g/dl).

Keywords: Asthma, IL18, HSP70

DOI : doi.org/10.46617/icbe6006

1.INTRODUCTION

Asthma is endemic inflammatory sickness in the airway distinguish via changeful with recurrent signs, reflux of fickle airflow with bronchospasm (1). The prevalent signs comprise pant, bark, thorax narrowness, with mansion of respiration (2). Its diagnosis is commonly established on pattern of signs, reply to therapy over time and lung function testing (3). Asthma is a prevalent respiratory trouble worldwide, it is a heterogeneous sickness, genetic plus ecological agents may participate to its inception with continuance. Asthma is a major public health problem affecting millions person in the whole world (4) presently, asthma is increasingly prevalent worldwide due to air pollution and other environmental irritants. These environmental assertions are particularly clear in land development where manufacturing progresses rapidly (5) IL-18 is a unique cytokine that enhances innate immunity and immune response to Th1 and Th2. It was primarily report as an IFN- γ stimulating factor generated through Kupffer cells, active macrophages, keratinocytes, intestinal epithelial cells, bone structures, and adrenal cortex (6) lately , although guides has been cumulative that the expression IL-18 increases in many signs of sensitivity (7)

specially , it is required to distinguish regulatory T cells and defend against allergic asthma (8) IL-18 is a cytokine multivariate known to influence the immune response balance of Th1 / Th2, and is released from activated cells / macrophages, dendritic cells, and epithelial cells (9) IL-18 has been confirmed to cause asthma in various studies showing IFF-induced activity, its ability to raise serotonin IgE levels, and to promote the flow of iodine induced by allergens into the airway (10). HPS is a highly preserved proteins that is restricted to a variety of stress (eg, insinuation temperature) and pathogens (viral, bacterial, parasitic, ulcerative) or physiological (evolution agents, cell recognition, hormonal energizing) (11).There are six main Hsp families (eg, Hsp1, Hsp90, Hsp / Hsc70, Hsp60, Hsp40, and Hsp10-30) classified depending on their visible molecular molecules detected through the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) electrolysis. (12).This indicate that Hsps may modify immune and inflammatory restraint and may be involved in causing and / or being dangerous signs and warning of a confirmed sickness involved asthma (13).

2. Material and methods

This study contains a total of 100 blood from patient's asthma and 100 control who admissible to Hila General teaching hospital and margin hospital through the time from October 2017 to April 2018. Blood samples were composed by vein puncture divided into two fractions, the first part were put in tube without anticoagulant. The serum was separated by centrifugation at about 3000 rpm for 5 minutes. The serum levels of HSP70 and IL-18 were measured by an enzyme-related immunosorbent assay (ELISA), a technique called cytoskeletal immunohistochemistry using the Peprotech group (USA). The remaining of blood were put into tube with anticoagulant (EDTA) for haematological parameters, for determination of Hb, PCV (RBCs. WBCs. eosinophil count).

3.Results

Patients Demography

This prospective study was carried out in two main hospitals at Al-Hilla General Teaching Hospital and, margin hospital from October 2017 to April 2018. A total of 100 blood from patient's asthma and 100 blood samples control were collected from patients have aged (2-71) years.

Distribution of asthma According to Gender.

This study was showing the prevalence of asthma among the male was 55 (55%) compared to in females 45(45%) as it is clear in figure (1).

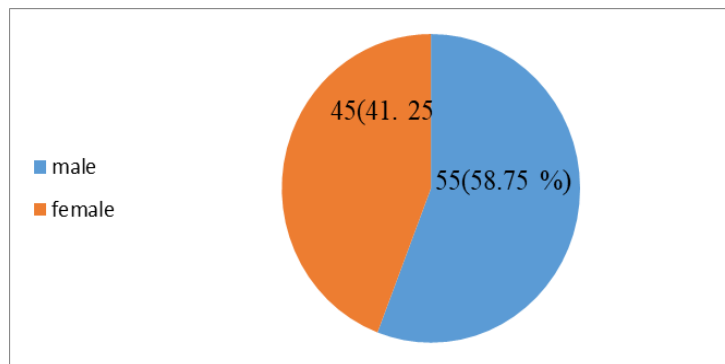


Figure (1) Distribution of asthma according to Gender.

IL18

The study shows high values of IL-18 in patient's serum compared to healthy and high values in age class (2-21years) reach 314.777 pg/ml compared to in healthy and in same classes 12.000 pg/ml. with a significant increase in mean values ($P < 0.05$), between values, IL-18 in patients compared to healthy and also between the age group (22-31years) shows low values of IL-18 which reach 37.6667 pg/ml compared to in healthy, as in list (1) (Table 1).

Table (1): List (1) IL-18 values in asthma patients and control

Age group	IL-18pg/ml	IL-18pg/ml
	Patient (M± S.D)	Control (M±S.D)
2-11	210.6667±10.06645	134.333±4.04145
12-21	314.777±12.50333	12.000±4.35890
22-31	107.333±6.42910	71.6667±6.65833
32-41	94.6667±5.85947	75.6667±5.13160
42-51	37.6667±7.09460	12.000±4.35890
52-61	42.000±8.18535	12.333±2.5161661
62-71	59.6667±5.3322	26.333±5.68624

LSD: 3.039.

HSP70

The study shows high values of HSP70 in patient's serum compared to healthy and high values in age class (12-21years) reach 117pg/ml compared to in healthy and in same classes 114 pg/ml. with a significant increase in mean values ($P < 0.05$), between values, HSP70 in patients compared to healthy and also between the age group (32-41years) shows low values of HSP70 which reach 0.7133 pg/ml compared to in healthy, as in list (2) (Table 2).

Table (2): List (2) HSP70 values in asthma patients and control

Age group	HSP70 pg/ml	
	Patient (M± S.D)	Control (M±S.D)
2-11	2.3900±0.35679	1.5333±0.37859
12-21	117±67.50556	114.000±12.16553
22-31	12.6667±0.41633	11.4500±0.39686
32-41	0.7133±0.061101	0.2033±0.2517
42-51	7.6767±0.47606	5.3267±0.23692
52-61	12.6667±0.41633	11.4500±0.39686
62-71	29.333±4.50925	20.9000±0.1000

LSD=4.1

Measures of some parameters in patient's asthma

This study show that (Hb, RBC count, levels for asthmatic patients were lower than control (8.5000±4.65855g/dl, 3.5183±6.07216g/dl, 10.9979±4.0953310/L, 6.5000±4.07999310/L). While leucocytes and Eosinophil count vales were higher compared to control (9.8638±2.8749410 g/L, 0.302±363 10g/L , 7.5000±4.07999 10g/L , 0.26±0.44 10g/L) respectively .

Table (3): Measure of some parameters in patients with asthma

parameter	patients	Control group
Hb (g/dl)	8.5000±4.65855	10.9979±4.09533
RBCs (1012/L)	3.5183±6.07216	6.5000±4.079993
Leucocytes(10g/L)	9.8638±2.87494	7.5000±4.07999
Eosinophil(109/L)	0.302±363	0.26±0.44

4. Discussion

Bronchial asthma is single of the little persistent sickness in the advanced world that is widespread, despite a better understanding of its sickness and its therapy (14). Bronchial asthma is single of the extreme prevalent trouble in clinical medicine in both children and adults. This affects about 5% of the adult population in the Western world, and it is more frequent in many developed countries. The backlash of the disease is necessary, and the pharmaceutical industry market has reached \$ 5.5 billion annually (15) The study show that asthma was prevalence in male at 47 (58.75 %) compared to female 33 (41.25 %). A result was demonstrated prevalence of asthma in male compared to female because it appears that physiology of male and hyper activity when compared with female including age and smoking has a Has an association with in the occurrence of asthma. Smoking is a major risk factor for lung disease as confirmed by many studies (16).

Immunological Assay for asthma patients

Role of IL-18 in asthma patients

In this study, shows high values of IL-18 in patient's serum compared to healthy and high values in age class (2-21years) reach 314.777 pg/ml compared to in healthy and in same classes 12.000 pg/ml. these study agreements with (5 and 6) who founds asthma prevalence in childhood in Iraq was 16.4% in children school-age. Increasing levels of IL-18 have been measured previously in the subjects of asthma in convergence. High levels of IL18 were found in patients with acute asthma (18). Its proinflammatory cytokines and as an IFN- γ -inducing factor and activation TH1 cell (19). Researches have shown recently that Interleukin -18 may possibility to act as a TH2 cell promoting factor in atopy. Interleukin -18 was found to have high concentrations in patients with asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. (20). IL-18 is excreted by total erythrocytes and was initially considered 18 (IFN- γ inducing factor (21, 22) .(23) found that Interlukin -18 was elevated in sickness with persistent allergic rhinitis and rising levels of Interleukin -18 suggesting the word in the expression of persistent and exacerbated allergic inflammation. Interleukin -18 that play important role in immunological restrain and activity invert sickness for asthma exacerbation in mid and moderate (24).

Role of HSP70 in asthma patients

The study shows high values of HSP70 in patient's serum compared to healthy and high values in age class (12-21years) reach 117pg/ml compared to in healthy and in same classes 114 pg/ml. with a significant increase in mean values ($P < 0.05$), between values, HSP70 in patients compared to healthy and also between the age group (32-41years) shows low values of HSP70 which reach 0.7133 pg/ml compared to in healthy. HSP27 have been shown elevated concentration in patients with continuous obstructive pulmonary sickness. Its interleukin suggested that play important role in Bronchial asthma and lung disease (25,26). Despite Hsp70 is known to play a role in the regulation of antigen peptides and in helping the synthesis of peptide type II, Hsp70 overexpression in APCs has a potential role for this protein in antigen and / or supply therapy, resulting in increased activity The APCs, which is essential for initiating and modifying the immune response to asthma in chronic asthma (27,28). moreover ,Its interleukin has ability to control CD23 expression of THP-1 cells and alveolar macrophages in Th2 environment. Thus, have important function in preserve continuous bronchitis in asthma (25). The results of the current study showed that asthmatic patients had anemia, as the concentration of both H B and RBC were low compared with control Furthermore. We found in

this study that WBC and eosinophils rates were higher than control group. As noted in various studies, the known risk factors for developing pulmonary disease include anemia, lower hemoglobin and a higher stable state of white blood cells (29). However decrease in hemoglobin concentration with elevation in white blood cells are common among asthma patients in compared with none asthma (30,31). Lastly, despite, the eosinophil cell play important function in defense against parasites and other pathogen, however, an increase in the number of Eosinophil is a factor in the diagnosis of asthma. (31).

References

- 1.M. FitzGerald, Chair; P. Barnes, N. Barnes, E. Bateman, A. Becker, J. DeJongste, J. R. Lemanske, P. O'Byrne, K. Ohta, S. Pedersen, E. Pizzichini, H. Reddel, S.Sullivan, S. Wenzel. Global Initiative for Asthma GINA updated 2010 Global Strategy for asthma management and prevention.
- 2-Martinez FD (2007). "Genes, environments, development and asthma: a reappraisal". *European Respiratory Journal* 29 (1): 179–84.
- 3-Akinbami, L.J. and Schoendorf, K.C. Trends in childhood asthma: Prevalence, Health care utilization and Mortality. *Pediatrics*. 2002; 110(2): 315-322.
- 4-Masoli, M. et al. (2004) the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469-478.
- 5-Lee SY, Chang YS, Cho SH. Allergic diseases and air pollution. *Asia Pac Allergy* 2013; 3:145–54.
- 6- Lachheb J, Chelb H, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Promoter polymorphism of the IL-18 gene is associated with atopic asthma in Tunisian children. *Int J Immunogenet*. 2007;35: 63–8.
- 7-Sanders NL, Mishra A. Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016; 32: 31–9.
- 8-Koch KN, Hartung ML, Urban S, et al. Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma. *J Clin Invest*. 2015; 125: 3297–302.
- 9-Sanders NL, Mishra A. Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016; 32: 31–9.
- 10-Oda H, Kawayama T, Imaoka H, et al. Interleukin-18 expression, CD8(+) T cells, and eosinophils in lungs of nonsmokers with fatal asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014; 112: 23–28 e1.
- 11-Ando M, Shima M. Serum interleukins 12 and 18 and immunoglobulin E concentrations and allergic symptoms in Japanese schoolchildren. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2007; 17: 14–9.
- 12-Hoshino T, Yagita H, Ortaldo JR, et al. In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4 T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:1998e2006.
- 13-Wong CK, Ho CY, Ko FW, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(2):177e83.
- 14-Rovina N, Dima E, Gerassimou C, Kollintza A, et al. IL-18 in induced sputum and airway hyperresponsiveness in mild asthmatics: effect of smoking. *Respir Med* 2009; 103(12): 1919e25.
- 15-McKay A, Komai-Koma M, MacLeod KJ, et al. Interleukin-18 levels in induced sputum are reduced in asthmatic and normal smokers. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:904e10.
16. Michaud S, Marin R, Tanguay RM: Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila* development. *Cell Mol Life Sci* 1997, 53:104-113.
17. Hightower LE: Heat shock, stress protein, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991, 66:191-197.

-
18. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones E, Stevenson MA, Chen LB, Finberg R, Koo GC, and Calderwood SK: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000, 6:435-442.
 19. Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, Schild H: The role of heat shock proteins and their receptors in activation of immune system. *Biol Chem* 2001, 382:629-636.
 20. Sato K, Torimoto Y, Tamura Y, Shindo M, Shinzaki H, Hirai K, Kohgo Y: Immunotherapy using heat-shock protein preparations of leukemia cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* 2001, 98:1852-1857.
 21. Minowada G, Welch WJ: Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995, 95:3-12.
 - 22-Blachere NE, Srivastava PK: Heat shock protein-based cancer vaccines and related thoughts on immunogenicity of human tumors. *Semin Cancer Biol* 1995, 6:349-355.
 - 23-National Heart, Lung, and Blood Institute, Section 2, Definition, Pathophysiology and Pathogenesis of Asthma, and Natural History of Asthma 2007, pp.1-58.
 - 24-British Guideline on Management of Asthma, 1st published 2003, revised edition published 2009, pp.2-14.
 - 25-Harkins MS, Moseley PL, Iwamoto GK. Regulation of CD23 in the chronic inflammatory response in asthma: a role for interferon-gamma and heat shock protein 70 in the TH2 environment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91:567-574, 2003.
 - 26-Vignola AM, Chanez P, Polla BS, Vic P, Godard P, Bousquet J. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:683-691, 1995.
 - 27-Tong W, Luo W. Heat shock proteins' mRNA expression in asthma. *Respirology* 5:227-230, 2000.
 - 28-Bertorelli G, Bocchino V, Zhou X, Zanini A, Bernini MV, Damia R, Di Comite V, Grima P, Olivieri D. Heat-shock protein 70 upregulation is related to HLA-DR expression in bronchial asthma. Effects of inhaled glucocorticoids. *Clin Exp Allergy* 28:551-560, 1998.
 - 29-Catro, O., Brambilla D.J. and Thorington B. 1994. The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors *Blood*, 84:643-649.
 - 30-Jessica, H.B., Eric A.M., Robert C.S. and Michael R.D. 2006. Asthma is associated with acute chest syndrome and pain in children with sickle cell one mice. *Blood* 108:2923_2927
 - 31-Zhao, MTakamura J., Yamaoka A., Odajima Y. and Likura Y. 2006. Altered eosinophil levels as a result of viral infection in asthma exacerbation in childhood *J.Pediatr. J.Allergy.Immunol.*, 13(1):47-50

دراسة تأثير الجهد الأليلوباثي للمستخلصات المائية لأوراق نبات الكتان على إنبات صنفين من الحلبة
Trigonella Foenum- graecum L.

علاء حسين علي , ايناس قصي دوري

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة / العراق

DOI : doi.org/10.46617/icbe6007 alaashalal91@gmail.com

الخلاصة: تم اجراء تجربة في البيت الزجاجي التابع لقسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل، وتجارب مخبرية لدراسة تأثير المستخلص المائي لنبات الكتان وبتراكيز مختلفة (0، 3، 5، 7) % على صفات الانبات والنمو لصنفين من نبات الحلبة (العراقي والهندي)، كما درس تأثير تراكيز مختلف من مخلفات نبات الكتان (مضاف إلى التربة بنسب (0، 3، 5، 7) % وزن: وزن ممزوجة ثم حصنت لمدة اسبوعين، في بعض خصائص النمو الخضري لصنفي الحلبة.

أظهرت النتائج أن التراكيز المختلفة من المستخلصات المائية للمجموع الخضري للكتان سببت انخفاضاً معنوياً لنسبة الانبات وطول الرويشة والجذير والوزن الجاف للرويشة والجذير وكان التركيز 7% الاشد تأثيراً كذلك بينت نتائج تجربة البيت الزجاجي بان التراكيز المختلفة من مخلفات الكتان أثرت معنوياً على صفات النمو (المساحة الورقية ومحتوى الماء النسبي) فسببت انخفاضاً واضحاً لهذه الصفات بالمقارنة مع معاملة السيطرة. ومن جهة أخرى أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود اختلافات معنوية ($p \leq 0.05$) بين الصنفين من خلال استجابتهما للتراكيز المختلفة للمستخلصات والمخلفات لنبات الكتان، وبشكل عام لوحظ بأن زيادة تراكيز المستخلص أو المخلفات كان سبباً واضحاً في انخفاض مؤشرات الانبات والصفات الفسلجية لصنفي الحلبة.

المقدمة: تعد النباتات بصورة عامة غذاء للانسان ودواء يمكن الاستشفاء به، ونبات الحلبة fenugreek واسمه العلمي *Trigonella Foenum- graecum L.* والتابع للعائلة البقولية Fabaceae هو أحد النباتات الطبية والاقتصادية المهمة، والجزء المستخدم من النبات هو المجموع الخضري والبذور والتي تكون غنية بالبروتينات والكربوهيدرات إضافة إلى وجود الزيت الثابت الذي يعزى اليه الأثر الطبي للنبات ويعتبر موطنه الأصلي الهند ومصر حيث عثر على الأنواع البرية هناك (أحمد، 2017).

يمتاز النبات بقيمته الغذائية العالية لاحتوائه على العديد من مركبات الأيض الثانوي منها الكلايكوسيدات والفلافونيدات وذلك القلوبات ومن أهمها Trigoelline و Choline المتواجدان في زيت بذور الحلبة والتي يعزى لها السبب الطبي (Hamza وآخرون، 2012). وينتمي الكتان Linseed أو Flax إلى العائلة الكتانية Linaceae تستخدم بذوره كمسكن ومرطب وملين ولهذا النبات فوائد كثيرة منها ضبط مستوى سكر الدم والمساهمة في انقاص الوزن وتحسين المناعة وحفظ مستوى الكوليسترول في الدم (محمود، 1990). يحتوي النبات على العديد من مركبات الأيض الثانوية مثل الكلايكوسيدات Glycosides والقلويدات Alkaloids والفلافونات Flavones والصابونيات Saponins والراتجات Resins ويحتوي أيضاً على البروتينات Proteins بنسبة 22.2% وكربوهيدرات بنسبة 28.09% وأحماض دهنية مثل مايرستيك والبالمتيك والستريك والاوليك والعديد من الفيتامينات والعناصر (Sarkes& Mahmood, 2018).

لقد ظهرت مشاكل عدة عند زراعة المحاصيل الاقتصادية أدت بعضها إلى انخفاض انتاجية هذه المحاصيل، ومن هذه المشاكل مخلفات نباتات المحاصيل المزروعة والأدغال. هذه المخلفات لها دور أساسي في اطلاق المواد الكيميائية المخزونة في الأجزاء النباتية والتي لها دور في تنشيط أو تثبيط نمو النباتات اللاحقة أو النامية معها في نفس التربة وهذه المواد تؤثر سلبياً أو ايجابياً في المحاصيل (صالح، 2009). تسمى ظاهرة التأثير للمواد الكيميائية المفروزة من قبل النباتات ومخلفاتها في النباتات الأخرى النامية معها بظاهرة التضاد الحياتي Allelopathy. وتعد هذه الظاهرة من الظواهر البيئية المهمة في الزراعة لدورها الفعال في الأنظمة البيئية الطبيعية Natural ecosystems والأنظمة الزراعية Agricultural ecosystems غالباً ما تتحلل مخلفات تلك النباتات في التربة مؤدي إلى تحرير العديد من السموم الباثي Phytotoxins التي تسبب بتثبيط انبات بذور المحاصيل وانخفاض نموها وانتاجيتها (Al-Saadawi, 2006). وفي ضوء ما تقدم فقد جاءت الدراسة الحالية بهدف دراسة التأثير الأليلوباثي للمستخلصات المائية ومخلفات نبات الكتان على الانبات والنمو لنبات الحلبة وبعض الصفات الفسلجية.

المواد وطرائق البحث:

أجريت الدراسة الحالية في جامعة الموصل/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة وشملت:

1- التجربة المختبرية:

تضمنت الدراسة إجراء تجربة مختبرية لدراسة التأثيرات التضادية للمستخلص المائي لمتبقيات المجموع الخضري لنبات الكتان Flax بأربعة تراكيز مع معاملة السيطرة (المقارنة) باستخدام الماء المقطر.

جمعت عينات النباتية للكتان بعد اكتمال نموها من حقول الشيخ محمد الذي يبعد 30 كم شمال غرب مدينة الموصل، شملت النماذج المجموع الخضري لنبات الكتان ومن ثم تجفيفها في الفرن الكهربائي على درجة 70م° ولمدة 72 ساعة ثم سحق المتبقيات وحفظت بأكياس بلاستيكية لاستخدامها لاحقاً (صالح، 2009).

تم تحضير المستخلصات المائية بأخذ (3، 5، 7) غم من المتبقيات ومزجت مع 100 مل من الماء المقطر حسب طريقة (Mersie, 1987) لنحصل على التراكيز (3، 5، 7) % على التوالي وزن: حجم.

تم الحصول على بذور الحلبة *Trigonella Foenum- graecum* L. بصنفها العراقي والهندي من السوق المحلية وبلغت نسبة الانبات 97% بالاختبار على ورق الترشيح. استخدمت أطباق بقطر (13,8) سم ووضع في كل طبق 25 بذرة من بذور الحلبة ولكلا الصنفين بين ورقتي ترشيح نوع (Whatman, No1) وبواقع ثلاث مكورات لكل معاملة (0، 3، 5، 7) % اضيف 8 مل من المستخلص إلى كل طبق ولكلا الصنفين وحسب كل معاملة واستعمل الماء المقطر للمقارنة ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة (20/27) لمدة ثمانية أيام وحسبت الصفات الآتية:

1- نسبة الانبات: حسب المعادلة (Saied, 1984)

$$\text{النسبة المئوية للانبات} = \frac{\text{عدد البادرات الطبيعية}}{\text{عدد البذور المزروعة}} \times 100$$

2- طول الرويشة سم.

3- طول الجذير سم.

4- الوزن الجاف للرويشة غم.

5- الوزن الجاف للجذير غم.

2- تجربة البيت الزجاجي:

أجريت التجربة في البيت الزجاجي التابع لقسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل بتاريخ 2018/11/5 لمعرفة تأثير مخلفات نبات الكتان على بعض صفات النمو لصنفين من نبات الحلبة/ حيث مزجت المخلفات النباتية مع التربة (في أصص بلاستيكي سعة 4 كلغم) وبنفس التراكيز المذكور في التجربة المختبرية ثم سقيت بالماء لحين الوصول إلى السعة الحقلية ثم غطيت بأكياس من النايلون مثقبة ووضعت في الظلام وحضنت لمد أسبوعين، وبعد انتهاء فترة التحضين زرع كل اصيص بـ 10 بذور من كل صنف وبعد مرور 20 يوم من الزرع خفف عدد البادرات إلى 5 بادرة في كل اصيص، وبعد مرور 45 يوم من تاريخ الزراعة تم إجراء القياسات الآتية:

1- محتوى الماء النسبي R.W.C: حسب المعادلة (Turner, 1981)

$$\text{المحتوى الماء النسبي} = \frac{\text{الوزن الطري} - \text{الوزن الجاف}}{\text{الوزن الاختلافي} - \text{الوزن الجاف}} \times 100$$

2- المساحة الورقية: وفقاً لطريقة (Scott وآخرون، 1973).

جدول (1): الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة الدراسة

التربة الطينية		
مفصولات التربة		
g.kg-1	175	رمل Sand
g.kg-1	380	غرين Silt
g.kg-1	445	طين Clay
مزيجية طينية غرينية		نسجة التربة
8.0		درجة تفاعل التربة PH
ds.m-1	4.1	التوصيل الكهربائي EC
mg.kg-1	0.87	النتروجين الجاهز N
mg.kg	15.2	الفسفور الجاهز P
mg.kg	14.6	البوتاسيوم الجاهز K
%	2.5	المادة العضوية O.M

التحليل الاحصائي:

تم تصميم التجربة حسب التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) وبواقع ثلاثة مكررات وتم تحليل النتائج لكل معاملة وفق برنامج (SAS) وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار دنكن المتعدد الحدود وعند مستوى احتمال (0.05) (عنتر، 2010).

Results النتائج :

1- نسبة الانبات:

يشير الجدول (2) إلى ان نسبة انبات بذور الحلبة وكلتا الصنفين قد ثبتت عند معاملتها بالتركيز 7% من مستخلص المجموع الخضري لنبات الكتان اذ بلغت أعلى نسبة للتثبيط هي 7.07% بالمقارنة مع معاملة السيطرة كذلك تفوق صنف الحلبة الهندي على صنف الحلبة العراقي في نسبة الانبات.

جدول رقم (2): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية للانبات % لصنفين من الحلبة

تأثير الصنف	تركيز المستخلص				المنافسة	الصنف
	7%	5%	3%	مقارنة		
97 a	94 d	96 c	98 b	100 a	هندي	
95 b	92 e	94 d	96 c	98 b	عراقي	
	93 d	95 c	97 b	99 a	تأثير التركيز	

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

2- طول الرويشة:

يتضح من الجدول (3) حصول انخفاض معنوي ونسبة 22.5% لصنف الحلبة العراقي و 23.7% لصالح الحلبة الهندي عند التركيز 7% من مستخلص المجموع الخضري لنبات الكتان في صفة طول الرويشة بالمقارنة مع معامل السيطرة وكما وضحت نتائج لجدول حصول تفوق معنوي للصف الهندي على الصنف العراقي لهذه الصفة.

جدول رقم (3): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية طول الرويشة (سم) لصفين من الحلبة

تأثير الصنف	تركيز المستخلص				الصنف
	%7	%5	3%	مقارنة	
7.1 a	6.2 bc	6.7 abc	7.7 ab	8.0 a	هندي
6.8 b	6.0 c	6.9 bc	7.4 abc	7.8 a	عراقي
	6.1 d	6.4 c	7.5 b	7.9 a	تأثير التركيز

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

3- طول الجذير:

النتائج في الجدول (4) دلت على صفة طول الجذير تأثرت عند معاملتها بالمستخلصات المائية لنبات الكتان حيث انخفض طول الجذير من 3.4 سم في معاملة المقارنة إلى 2.5 سم و 2.2 سم عند المعاملة بالتركيزين 7%، 5% على التوالي مع حصول تفوق معنوي واضح لنباتات الصنف الهندي على الصنف العراقي.

جدول رقم (4): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية لطول الجذير (سم) لصفين من الحلبة

تأثير التركيز	تركيز المستخلص				الصنف
	%7	%5	3%	مقارنة	
2.8 a	2.2 cd	2.5 bc	3.2 a	3.4 a	هندي
2.6 b	2.0 d	2.4 bc	2.9 ab	3.3 a	عراقي
	2.1 d	2.45 c	3.0 a	.35 a	

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

4- الوزن الجاف للرويشة:

أظهرت نتائج الجدول (5) ان المعامل بتركيز 7% لمستخلص المائي للمجموع الخضري لنبات الكتان كان لها تأثيراً معنوياً في صفة الوزن الجاف للرويشة عند مقارنتها بمعاملة السيطرة بحيث يزداد الانخفاض معنوياً لهذه الصفة كلما زاد تركيز المستخلص وكانت اكبر نسبة للانخفاض عند التركيز 7% وهي 79.3% مع تفوق واضح لصنف الحلبة الهندي على الصنف العراقي.

جدول رقم (5): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية الوزن الجاف للرويشة (غم) لصفين من الحلبة

تأثير التركيز	تركيز المستخلص				الصنف
	%7	%5	3%	مقارنة	
0.040 a	0.014 g	0.034 e	0.056 c	0.060 a	هندي
0.035 b	0.010 b	0.030 f	0.044 d	0.057 b	عراقي
	0.012 d	0.032 c	0.050 b	0.058 a	تأثير التركيز

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

5- الوزن الجاف للجذير:

من خلال الجدول (6) يتبين ان صفة الوزن الجاف للجذير انخفض معنوياً طردياً مع زيادة تركيز المستخلصات المائية للمجموع الخضري لنبات الكتان وسجل التركيز 7% أشد نسبة انخفاض وهي 70% بالنسبة للصنف الهندي و71% بالنسبة للصنف العراقي مع حصول تفوق معنوي واضح للصنف الهندي بالمقارنة مع الصنف العراقي.

جدول رقم (6): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية الوزن الجاف للجذير (غم) لصنفين من الحلبة

تأثير الصنف	تركيز المستخلص				الصنف
	7%	5%	3%	مقارنة	
0.020 a	0.009 g	0.019 f	0.025 c	0.030 a	هندي
0.018 b	0.008 h	0.017 f	0.022 d	0.028 b	عراقي
	0.008 d	0.018 c	0.023 b	0.029 a	تأثير التركيز

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

الصفات الفسلجية:

1- المساحة الورقية:

تشير النتائج المبينة في الجدول (7) ان جميع التراكيز المستعملة من المخلفات المضافة للتربة للمجموع الخضري لنبات الكتان كانت قد اختزلت معنوياً صفة المساحة الورقية لنبات الحلبة ولكلا الصنفين وسجل اكبر انخفاض معنوي عن التركيز 7% وبنسبة 55.4% في صنف الحلبة العراقي في حين سجل الصنف الهندي تفوقاً معنوياً ملحوظاً في صفة المساحة الورقية على الصنف العراقي.

جدول رقم (7): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية المساحة الورقية (سم) لصنفين من الحلبة

تأثير الصنف	تركيز المستخلص				الصنف
	7%	5%	3%	مقارنة	
2.38 a	1.45 cd	2.14 bcd	2.69 ab	3.26 a	هندي
2.01 b	1.2 d	1.78 cd	2.21 bc	2.73 ab	عراقي
	1.38 d	1.96 c	2.45 b	2.99 a	تأثير التركيز

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

2- محتوى الماء النسبي %:

تدل النتائج المدونة في الجدول (8) إلى حصول تثبيط في محتوى الماء النسبي لنبات الحلبة ولكلا الصنفين المعاملة بالمخلفات المخلوط مع التربة للمجموع الخضري لنبات الكتان ولجميع التراكيز وكان التأثير واضحاً في التركيز 7% حيث بلغت النسبة 58.2% بالمقارنة مع معاملة السيطرة مع تفوق واضح للصنف الهندي على الصنف العراقي.

جدول رقم (8): تأثير المستخلصات المائية في النسبة المئوية محتوى الماء النسبي % لصنفين من الحلبة

تأثير الصنف	تركيز المستخلص				الصنف
	7%	5%	3%	مقارنة	
21.62 a	13.43 e	18.23 d	24.70b	30.13 a	هندي
18.7 b	12.50 f	15.05 e	21.40 c	26.00 b	عراقي

	12.96 b	16.63 c	23.05 b	28.06 a	تأثير التركيز
--	---------	---------	---------	---------	---------------

* المعدلات التي تحمل حروف متشابهة كل حسب حالتها لا يوجد بينهما فروق معنوية

المناقشة:

ان التثبيط الذي لوحظ في انبات ونمو بادرات نباتات الحلبة بتأثير مستخلصات المجموع الخضري لنبات الكتان عن التراكيز (3، 5، 7) % مقارنة مع الماء المقطر وهذا التثبيط يعزى إلى احتواء مخلفات الكتان على مركبات يطلق عليها Allelochemicals والتي تكون قابلة للذوبان في الماء ولهذا امكن استخلاصها مائياً، وإذا أشارت البحوث إلى احتواء الاجزاء النباتية المختلفة على نواتج ابيضية ثانوية بتركيز معينة، اذ تحرر من طريقة الغسل أو تحلل المخلفات النباتية في التربة لتؤثر في النباتات التي تنمو فيها (Rice, 1984).

من الجدول (2) يتبين حصول تثبيط معنوي في النسبة المئوية لانبات بذور نبات الحلبة ولكلا الصنفين ولجميع التراكيز المستخدمة من المستخلصات المائية لنبات الكتان (3، 5، 7) % مقارنة مع معاملة السيطرة، ان الاختزال الحاصل في انبات البذور ربما يعود إلى احتواء المجموع الخضري للكتان على مركبات كيميائية قابلة للذوبان في الماء، سامة التأثير على جنين الحبوب مما سبب موت معظمها وثبط نمو الاخرى قوة تأثيرها يعتمد على التركيز المستخدم وهذا يعني ان التركيز 7 % أدى إلى زيادة في كمية المركبات الاليلوباثية وبالتالي زيادة تثبيطها من خلال اختراق بعض هذه المركبات لغلاف البذرة وتشرّبها بالمستخلص المائي (Kama, 2011).

ويوضح من الجدول (3) حصول انخفاض معنوي في صف طول الرويشة لبذور صنف نبات الحلبة المزروعة في اطباق بتري والمروية بالمستخلص المائي للمجموع الخضري لنبات الكتان قياساً بمعاملة المقارنة وقد يعود السبب في هذا الانخفاض إلى التأثير السمي للمستخلص المائي لنبات الكتان اذ تقوم بعض المركبات الاليلوباثية الفعالة كالفينولات والفلافونات والكلايكوسيدات والتانينات (Aboabaet, 2006) بتثبيط وانبات نمو نباتات أخرى عن طريق التضاد الحياتي Allelopathy والتي تؤثر سلباً في فعاليات الانقسام الخلوي أو استقالة الخلايا. اذ ان المركبات الفينولية والقلوية تعمل على تثبيط انزيم IAA-Oxidase و GA المحفران للنمو مسبب بذلك تثبيطه (Kamal & Bano, 2008).

وتدل البيانات في الجدول (4) إلى ان الاختزال الحاصل في طول الجذير بسبب المعاملة بالمستخلصات المائية للمجموع الخضري قد يعزى إلى دور هذه المركبات المتحررة من المخلفات النباتية والتي تؤثر تأثيراً سلبياً على الانقسام الخلوي في المنطقة المرستيمية للجذر (ابراهيم، 2017) كمال يظهر أنه كلما زاد التركيز قد يزداد التأثير التثبيطي.

ومن جهة أخرى أشارت نتائج الجدول (5) إلى انخفاض الوزن الجاف للرويشة وكان الانخفاض يزداد بزيادة تراكيز المستخلص المائي للمجموع الخضري لنبات الكتان ولصنف الحلبة (العراقي والهندي) ويمكن أن يعزى هذا الانخفاض المعنوي إلى تأثيرها بالمواد الاليلوباثية سلبياً مما أدى إلى اعاق العمليات الحيوية الخاصة بالنمو كانه انخفاض عملية البناء الضوئي وبالتالي حصل نقص في تجمع المواد الغذائية في الأوراق (محمد ومحمود، 2014).

كذلك من نتائج الجدول (6) ظهرت التأثيرات السلبية في صفة الوزن الجاف للجذير بتأثير المستخلصات المائية للمجموع الخضري لنبات الكتان حيث أظهر التركيز 7 % انخفاض واضح في هذه الصفة بالمقارنة مع التراكيز الأخرى ومعاملة السيطرة وقد يعود السبب في ذلك إلى ان الجذير يكون بتماس مباشر مع المواد الاليلوباثية في وسط النمو وان التباين والاختلاف بين معاملات المستخلصات بسبب تركيز هذه المستخلصات وانه كلما زاد التركيز زادت المواد الاليلوباثية المنتشرة في وسط النمو (James & Bala, 2003).

ويلاحظ من بيانات الجدول (7) انخفاض محتوى الماء النسبي في نباتات الحلبة ولكلا الصنفين نتيجة تأثرها بالمواد الاليلوباثي المتحررة من مخلفات نبات الكتان وأظهرت معاملة 7 % الأثر الأكبر في هذه الصفة والذي يمكن أن يكون سببه ان المواد الاليلوباثية المنتجة من المتبقيات تكون ذات قوة تثبيطية قوية لنمو الخلايا النباتية النامية كذلك فان طبيعة وكمية المواد الكيميائية ذات الفعالية التثبيطية في التركيز العالي تكون أكبر ومد بقائها بالتربة محتفظة بفعاليتها الاليلوباثية مدة أطول مما هي في التراكيز الواطنة وتتفق هذه النتائج مع (صالح وآخرون، 2017).

ومن نتائج الجدول (8) تبين ان اضافة المخلفات النباتية للكتان إلى التربة اثر سلبياً في المساحة الورقية لنباتات الحلبة ولكلا الصنفين، وقد يعود السبب إلى وجود عوامل احبائية أو غير احبائية في التربة غيرت من التركيبة الكيميائية للمواد الاليلوباثية وحولتها إلى

مواد أشد سمية قللت نمو الخلايا النباتية وان هذه المركبات الأليوباثية المتحررة تكون سلبية على الاغلب اذ تتضمن تأخير وتثبيط واختزال النمو (صالح، 2008).

كما ان التباين الوراثي لأصناف الحلبة ينعكس في سلوكها في امتصاص المغذيات من التربة تبعاً لمناشئها الجغرافية (Alam, 2001). اضافة إلى مدى استجابتها إلى الظروف البيئية وتتفق هذه النتائج مع (Muhammed, 2017) و (الشلال، 2015) اللذين وجدوا ان اصناف الحلبة قد اختلفت فيما بينها معنوياً في الصفات الفسلجية والحاصل نتيجة للتباينات الوراثية.

المصادر:

- 1- صالح، مظفر عبدالمهدي و عبدالوهاب عبدالرزاق مهدي صالح وعمر زهير عبدالمجيد الدليمي (2017). التأثير التضادي لمثبيقات دغل الخردل البري *Sinopisarvensis* في انبات ونمو بادرات الذرة الصفراء *Zea mays*، مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، عدد خاص بوقائع المؤتمر العلمي السادس للعلوم الزراعية، 662-657.
- 2- محمد، ليبي شريف ونامس أحمد محمود (2014). تأثير بعض صفات نمو الحنطة وحاصلها *Triticum aestivum* بتركيز المستخلصات المائية للجرير وزهرة الشمس والذرة الصفراء، مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، المجلد (14)، عدد خاص بوقائع المؤتمر التخصصي الثالث/ الانتاج النباتي: 325-316.
- 3- Kamal, J. (2011). Impact of Allelopathy of sunflower *Helianthus annuus* L. rots extract on physiology of wheat *Triticumaestivum* L. African Journal of Biotechnology, 10(65): 14465-14477.
- 4- Kamal, J. and Bano, A. (2008). Effect of sunflower *Helianthus annuus* L. extract on wheat *Triticumaestivum* L. and physicochemical characteristics of soil, African Journal of Biotechnology, 7(22): 4130-4135.
- 5- Muhammed, S. R. (2017). Response of two fenugreek *Triticumaestivum* L. Varieties to different cutting dates and nitrogen for growth and forage yield traits under rain feel condition, Journal Tikrit Univ. for Agri. Sci. 17: 134-142.
- 6- Alam, S. M.(2001). Genetic variation in Nutrient contents by wheat and its substitution lines, Pakistan J. of Biological Sci. 4(6): 642-644.
- 7- ابراهيم، فاتن خليل (2017). التأثير الأليوباثي لمخلفات الجت *Medicago sativa* في انبات ونمو نوعين من النباتات البقولية (اللوبياء والحمص)، مجلة ابحاث كلية التربية الأساسية، 14(1): 456-445.
- 8- Aboaba, O.; Smith, S. and Olude, F. (2006). Antibacterial effect of edible plant extract on *Escherichia coli* O157: H7, Pakistan J. of Nutrition, 5(4): 325-327.
- 9- Hamza, N.; Berke, C.; Cheze, R.; Garrec, A.; Umar, A.; Agil, R. (2012). Prereutive and curative effect of (*TrigonellaFoenum- graecum* L.) seeds in C57B/61 models of type 2 diabetes induced by high-fet diet, Jour. Ethnopharmacol, 142: 516-522.
- 10- أحمد، طه شهاب (2017). تأثير مستويات مختلفة من السماد الفوسفاتي والرشد بمستخلص الاعشاب البحرية في بعض صفات النمو الخضري والحاصل ونسبة الزيت لنبات الحلبة *TrigonellaFoenum- graecum* L.، مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 17(2): 93-87.
- 11- محمود، خليل ابراهيم (1990). المحاصيل الحقلية للمناطق الاستوائية للمناطق الاستوائية وشبه الاستوائية، المؤلف رودكا ديموفا وديكو ديكون، مطبعة التعليم العالي، جامعة بغداد.
- 12- Sarkes, N. A., Mahmood, B. J. (2018). Effect of plan density in yield and Quality of two flax cultivars (*Linumusatissimum* L.). Journal Tikrit Univ. for Agri. Sci. 18 (3): 13-20.
- 13- صالح، مظفر عبدالمهدي (2009). تأثير التضاد الحياتي لبعض الأدغال الشتوية في انبات ونمو حاصل محصولي الخبز *Triticum aestivum* والذرة الصفراء *Zeamoys*، رسالة ماجستير، كلية الزراعة/ جامعة تكريت، جمهورية العراق.
- 14- Al-Saadawi, I.S. (2006). Soil sickness in Iraq. Possible role of soil fungi and allelopathy. Allelopathy Journal. 18: 47-56.
- 15- Mersie, W. S. (1987). Allelopathy, 2nd edition Academic press. London.
- 16- Saied, S. M. (1984). Seed technology studies, seed vigor, field establishment and corp performance in cereals. Ph. D. Thesis, P. 363.
- 17- Turner, Neil, C. (1981). Techniques and experimental approaches for the measurements of plant water status . Plant and Soil , 58: 339-366 .
- 18- عنتصر، سالم حمادي (2010). التحليل الاحصائي في البحث العلمي وبرنامج SAS 2010، جامعة الموصل، كلية الزراعة والغابات، دار ابن الاثير للطباعة والنشر، موصل، العراق.
- 19- James, J. and Bala, R. (2003). Allelopathy: How plants suppress other plants, Institute of food and Agricultural sciences, University of Florida.
- 20- صالح، شاكر مهدي (2008). الجهد الأليوباثي لدغل الخردل *Sinopisarrensiss* في انبات ونمو حنطة الخبز *Triticum aestivum* والشعير *Hordeum vulgare*، مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية 8: 1.
- 21- الشلال، علاء حسين (2015). تأثير نسجة التربة وشدة الاضاءة والمعاملة بالجبرلين والجهد الأليوباثي في بعض الصفات الفسلجية والبايوكيميائية لنبات الحلبة *TrigonellaFoenum- graecum* L.، أطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، العراق.

الملخص الانجليزي

**Study the alillopathic potential of flax leaves aqueous extract on growth of
fenugreek (*Trigonillafoenum-graecum L.*) two varieties**

Alaa Hussein Ali and Inas Qusay Doori

University of Mosul / College of Science/Dept. of Biology/ Iraq

alaashalal91@gmail.com

Abstract

A greenhouse experiment carried in department of biology, collage of science , Mosul university and laboratory experiment was carried out to study the effect of aqueous extract of flax plant with different concentration (0,3,5,7)% on germination and growth characteristics of two fenugreek varieties. Different from flax plant residue added to soil in preparation (0 , 3 , 5 , 7) % weight : weight mixed and then incubated for two weeks, in some characteristics of vegetative growth of the two varieties Iraqi and Indian of fenugreek.

The result showed that the different concentration of aqueous extract of the shoot caused a significant decrease of germination, length of radical, plumule and dried weight of radical and plumule. The concentration of flax residue significantly affected growth characteristic leaf area and relative water content caused a material decrease in these traits compared with the control treatment.

On the other hand, the result of statistical analysis showed significant differences between the two fenugreek cultivars by their response to the different concentration of extract and residues of flax plant.

In general, it was noted that the increase of concentration of the extract or residues was a clear reason for the decrease of germination indicator and physiological characteristic of the fenugreek varieties.

دور الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك في انبات ونمو بادرات نبات الحمص *Cicer arietinum* L تحت تأثير الشد المائي

رنا طارق يحيى¹ امجد عبد الهادي محمد²

¹ قسم الفيزياء الحياتية / كلية العلوم / جامعة الموصل / العراق

² قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل / العراق

DOI : doi.org/10.46617/icbe6008 ²Email: biology19802007@yahoo.com

المخلص: بحثت الدراسة الحالية تأثير الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك ZnO وبتراكيز 0.5، 1.0، 2.0، 1.0 ملغم لتر⁻¹ على انبات بذور نباتات الحمص *Cicer arietinum* ونمو بادراتها في الوسط الغذائي MS تحت تأثير الشد المائي بوجود مركب البولوي اثيلين كلايكول (PEGPoly) EthyleneGlycol بتراكيز 0.5، 1.0، 2.0 ملغم لتر⁻¹. وظهرت النتائج الدور التثبيطي لمركب PEG عند اضافته منفردا في الوسط وبجميع تراكيزه على نسبة انبات البذور والتي بلغت اعلاها 35% بوجود 2.0 ملغم لتر⁻¹ منه مقارنة مع 60% في وسط MS لوحده (المقارنة). في حين ادت اضافة الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك لوحدها الى الوسط الغذائي بتشجيعها الانبات والتي بلغت افضلها 75% عند التركيز 2.0 ملغم لتر⁻¹ ومن النتائج البارزة قدرة الدقائق النانوية وبتراكيز 2.0 ملغم لتر⁻¹ على خفض التأثير التثبيطي لمركب PEG على انبات البذور. كما بدت البادرات النامية تباينا واضحا في اطوالها واشكالها استجابة لمكونات الوسط الغذائي وتوقفت تلك النامية على وسط MS ومدعما بالدقائق النانوية لوحدها وفي جميع تراكيزها. وقدر المحتوى البروتيني في انسجة البادرات النامية كافة، اذ توقفت كمياته المحسوبة في البادرات النامية على وسط MS المدعم بوجود 2.0 ملغم لتر⁻¹ من ZnO وبلغ 1.21 مايكروغرام غم⁻¹.

الكلمات المفتاحية: نباتات الحمص، الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك، PEG، المحتوى البروتيني.

المقدمة: تمثل عوامل الشد غير الحيوية مثل الجفاف، والملوحة، التطرف في درجات الحرارة والسمية الكيميائية العوامل البيئية الاساسية ذات التأثير المباشر في نمو النباتات وبصورة شائعة تشكل سلسلة من العوامل المهددة لازدهار الزراعة (Hopkins and Hüner, 2008) ويشكل الشد المائي احد اهم تلك العوامل الاساسية الذي ينتج عن الجفاف والملوحة (Almansouriet al., 2001; Kaya et al., 2006). ويعد من المشاكل النباتية واسعة الانتشار حول العالم من خلال تأثيره المباشر في تقليل سرعة ونسبة الانبات ونمو البادرات (Macaret al., 2009) وتعد مرحلة انبات البذور المرحلة الاهم في دورة حياة النباتات ونموها والتي تؤثر فيما بعد على نشوء البادرات وتواجدها (Bimponget al., 2011) وان نشوء البادرات ونموها تمثل مرحلة حساسة في البيئات الجافة اذ ان فقدان رطوبة التربة غالبا مايكون السبب الرئيسي لموت البادرات (Schützet al., 2002). ومختبرا تستخدم مادة البولوي اثيلين كلايكول (PEG) وعدد من السكريات الكحولية ومنها السوربتول والمانيتول بصورة واسعة كمواد فعالة ازموزيا اومواد محفزة للشد المائي من خلال تغيير الجهد الازموزي للخلية، وان مادة البولوي اثيلين كلايكول والمواد اعلاه هي بوليمرات غيرايونية، غير سامة وذائبة في الماء ولهذا يرجح اختراقها للانسجة النباتية المعرضة او الملامسة لها وبصورة سريعة، ويتوفر مركب PEG بمعدل وزن جزئي مختلف ومنها مايتوفر بوزن جزئي يساوي 6000 دالتون او اقل منه (Tripathy, 2015) والذي يكون اواصر هيدروجينية مع الماء وبالتالي يقلل من الجهد المائي للوسط الزراعي مما يمنع امتصاص الجذور للماء والمعادن (et al., 2004 Sánchez) وان تقليل الجهد المائي للبذور يختزل نمو البادرات ويثبط ظهور روشتاتها (Pirdashtiet al., 2003). ويعنى علم النانوتكنولوجي باستخدام المواد النانوية ذات الابعاد الاقل من 100 نانوميتر والتي اتجهت اليها الدراسات لتطبيق استخدامها في الزراعة بهدف حماية النباتات وتغذيتها وتحسن نوعها وانتاجها لما تمتلكه هذه الدقائق من خصائص فريدة من نوعها فيما يتعلق باحجامها، نوعها، المساحة السطحية لحجومها وخصائصها البصرية الفريدة (Behboudiet al., 2018).

تنتمي نباتات الحمص *Chickpea* (*Cicer arietinum* L.) الى العائلة البقولية fabaceae وتعد من اهم المحاصيل البقولية الواسعة الانتشار لأهميتها الاقتصادية العالية (Lev-Yadunet al., 2000) بالإضافة الى كونه مصدر لغذاء الانسان والحيوان كما انه يلعب دورا مهما في

الحفاظ على خصوبة التربة بالأخص في المساحات الجافة والقليلة الامطار (Katerjiet *al.*, 2001). ويعد الشد المائي هو احد العوامل المحددة والمؤثرة في نمو النباتات البقولية ومنها نباتات البزاليا (Miljus-Djukic 2013, *et al.*) ونباتات الحمص خلال مراحل النمو الخضري والتكاثري (Güneşet *al.*, 2006). وان نباتات الحمص هي من المحاصيل الحساسة للملوحة وبالأخص خلال مراحل الانبات (Macar 2009, *et al.*).

هدفت الدراسة الحالية الى بيان دور عامل الجفاف متمثلة بإضافة تراكيز مختلفة من مركب PEG الى الوسط الغذائي على انبات بذور نبات الحمص وتطور بادراتها ومن ثم اختبار قدرة الدقائق النانوية لعنصر الزنك في تحسين الانبات ونمو البادرات وكذلك امكانية اختزال الدور التثبيطي لمركب PEG.

مواد البحث وطرقه

تحضير الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

تم اخذ 1.0 غم من مسحوق الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك $ZnO > 100$ نانوميتر (Sigma Aldrich, UK) ويوزن جزئي 81.39 غم/ مولوديب في حجم معين من الماء المقطر وبعد اتمام ذوبانه اكمل الحجم النهائي الى لتر واحد من الماء المقطر اتبعه تحضير التراكيز المعتمدة في الدراسة 0.5 ، 1.0 ، 2.0 مايكروغرام \ مل من المحلول القياسي المحضر .

التعقيم السطحي للبذور

جهزت بذور نبات الحمص *Cicer arietinum* من الاسواق المحلية - الموصل /العراق، وعقمت سطحيا بغمرها بمحلول الكحول الايثيلي 96% لدقيقتين ، اتبعها غمرها بمحلول هايبيوكلوورايت الصوديوم التجاري NaOCl (القاصر) المجهز من شركة بابل لصناعة الصابون والمنظفات ، بغداد، العراق وبتركيز 6.2 % وبتخفيف 1:1، قاصر : ماء لمدة 10 دقائق مع الرج المستمر ثم غسلت بالماء المقطر المعقم اربعة مرات / دقيقة، جففت البذور بوضعها على ورق ترشيع معقم (Khaïtovet *al.*, 2016).

زراعة البذور المعقمة سطحيا على وسط MS مدعما بتراكيز متعددة من PEG والدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

زرعت البذور المعقمة سطحيا على سطح 30 مل من وسط MS (Murashige and Skoog, 1962) الصلب (المقارنة) مرة، ثم سلط الشد المائي بإضافة البولي ايثيلين كلاكول (PEG) وبتراكيز 0.0، 0.5، 1.0 ملغم لتر⁻¹ لكل منها على حدى ومتاخلا مع تراكيز الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك $ZnO < 100$ nm المستخدمة في الدراسة وهي 0.0، 0.5، 1.0، 2.0 ملغم لتر⁻¹ مرة ثانية، حفظت العينات في حاضنة النمو في ظروف الظلام ودرجة حرارة 22 ± 2 °م. وبعد ظهور الجذير والسويقة الجنينية وانتاجها بادرات كاملة نقلت الزروع الى ظروف التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوءا \ 8 ساعات ظلام وبشدة اضاءة 1500 لوكس.

تقدير كمية البروتين لبادرات نبات الحمص

اخذ 1 غم من المجموع الخضري فقط لبادرات نبات الحمص والنامية على الاوساط الغذائية المستخدمة في الدراسة جميعها وسحقت باستخدام هاون خزفي مبرد وبوجود حامض الخليك الثلجي (TCA) بتركيز 5% ومن ثم اتبعت الخطوات المقدمة من قبل الباحث Lowry وجماعته سنة 1951 في تقدير البروتينات (Lowry *et al.*, 1951).

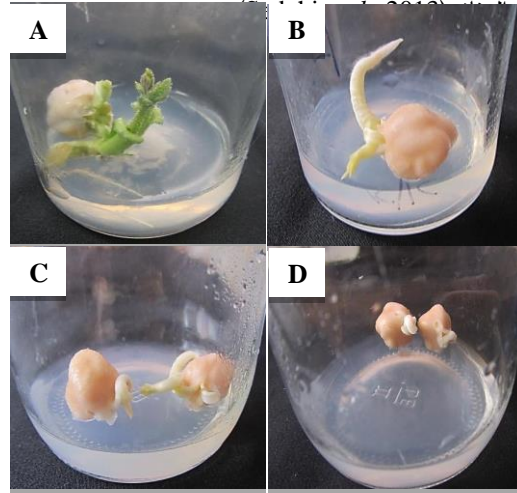
التحليل الاحصائي:

تم حساب التحليل الاحصائي من خلال حساب الوسط الحسابي ومجموع القيم وحساب الانحراف المعياري (SD) والذي تم استخدامه للمقارنة بين قيم النتائج

النتائج والمناقشة

التأثير التثبيطي للتركيز المختلفة من PEG في انبات بذور نباتات الحمص ونمو بادراتها:

تظهر نتائج الدراسة الدور التثبيطي لمركب PEG في نسبة انبات بذور نبات الحمص التي اظهرت انخفاضا مع زيادة تراكيزه المضافة الى وسط MS. اذ حفز وسط MS لوحده (المقارنة) نسبة انبات البذور 60% بعد مرور 6 ايام في حين بلغت نسبة الانبات 50 و 45% للبذور النابتة على وسط MS الحاوي على 0.5 و 1.0 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG وبالتعاقب وشهدت الدراسة انخفاضا في النسبة للبذور النابتة على وسط MS حاوي على 2.0 ملغم لتر⁻¹ من PEG والتي بلغت 35% (الجدول-1). كما لوحظ ان البذور النابتة على وسط MS الخالي من مركب PEG (المقارنة) اعطت بادرات خضراء متفرعة الى اوراق عديدة وبمعدل طول 3.5 سم (الشكل A-1) في حين اعطت تلك البذور النابتة على وسط MS مضافا له 0.5 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG بادرات غليظة (الشكل B-1)، في حين اختزلت اطوال الافرع للبادرات النامية على وسط MS مضافا له 1.0 ملغم لتر⁻¹ منه مع نمو بطيء (الشكل C-1) واختزل بشكل كبير لنمو البادرات النامية على وسط MS مضافا له 2.0 ملغم لتر⁻¹ (الشكل D-1). ويعزى اختزال نسبة انبات البذور مع زيادة تركيز PEG المستخدم النقلة تشرب وتشعب البذور بالماء مع زيادة ظروف الشد المائي (Turk et al., 2004) كما يمكن ان يعود ذلك الى حدوث اضطرابات ايضية متمثلة بتحلل المغذيات الضرورية لتطور ونمو الجنين واختزال الفعاليات الانزيمية والجهد الازموري للجنين تحت ظروف



الشكل (1): تأثير التراكيز المختلفة لمركب PEG في انبات بذور نباتات الحمص ونمو بادراتها بعد مرور 15 يوما.

- A- البادرات النامية على الوسط MS لوحده.
- B- البادرات النامية على الوسط MS + 0.5 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG.
- C- البادرات النامية على الوسط MS + 1.0 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG.
- D- البادرات النامية على الوسط MS + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG.

تأثير تراكيز مختلفة من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك (ZnO-NPs) في انبات بذور نباتات الحمص ونمو بادراتها

ابدت الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك عند اضافتها الى وسط MS تحفيزا ملحوظا لانبات بذور نبات الحمص وبدا ذلك جليا من خلال زيادة النسبة المئوية للانبات مع زيادة التراكيز المضافة. اذ حفز وسط MS والحواي على 0.5 ملغم لتر⁻¹ من ZnO-NPs نسبة انبات 55% بعد 7 يوم وتميزت البادرات بنموها بمعدل طول 4.5 سم متفرعة الى اوراق صغيرة خضراء وظهور جنود متعددة بيضاء اللون (الشكل 2 - A). وازدادت نسبة الانبات

65% بعد 7 يوم للبيذور المزروعة على وسط MS مدعما بتركيز 1.0 ملغم لتر⁻¹ من ZnO-NPs وبمعدل طول لسيقان البادرات النامية وصل الى 5.3 سمحاوية اوراق خضراء وبيذور عديدة (الشكل B-2) في حين ازدادت نسبة الانبات الى 75% بعد 7 يوم للبيذور الموضوعه على وسط MS مدعما بتركيز 2.0 ملغم لتر⁻¹ ويظهر بادرات جيدة النمو بمعدل طول وصل الى 6.8 سم حاوية عدد من الاوراق (الشكل C-2). ومن المحتمل ان يعود ذلك الى ان للدقائق النانوية تأثيرا ايجابيا مباشرا على النمو ومعظم الفعاليات الايضية للنباتات المختلفة من خلال التغييرات التي تحدث في التعبير الوراثي للنباتات (Nair *et al.*, 2010)، اذ بالاعتماد على الدراسات المختلفة لتأثيرات الدقائق النانوية في اليات وميكانيكيات فسلجه انبات البيذور فان هذه الدقائق تمنح قابلية امتصاص الماء من قبل البيذور (Zheng *et al.*, 2005)، وتزيد من مستويات انزيم اختزال النترات وبذلك تشجع قابلية البيذور لامتناس واستهلاك الماء والمخصبات وتحفز من انظمة مضادات الاكسدة للبيذور (Lu *et al.*, 2002) ايضا وهو بانها تقلل من الشد الناتج عن مضادات التاكسد بواسطة اختزال H₂O₂ وتزيد من فعاليات ونشاط العديد من الانزيمات مثل ascorbate، catalase dismutase، peroxidase ، guaiacol peroxidase (Lei 2008 *et al.*). وان مجمل هذه التغييرات يفسر الدور المهم لها في تحسين انبات البيذور (Almutairi and Alharbi , 2015).



الشكل(2): تأثير التراكيز المختلفة من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك (ZnO-NPs) في انبات بيذور نباتات الحمص ونمو بادراتها بعد مرور 15 يوما

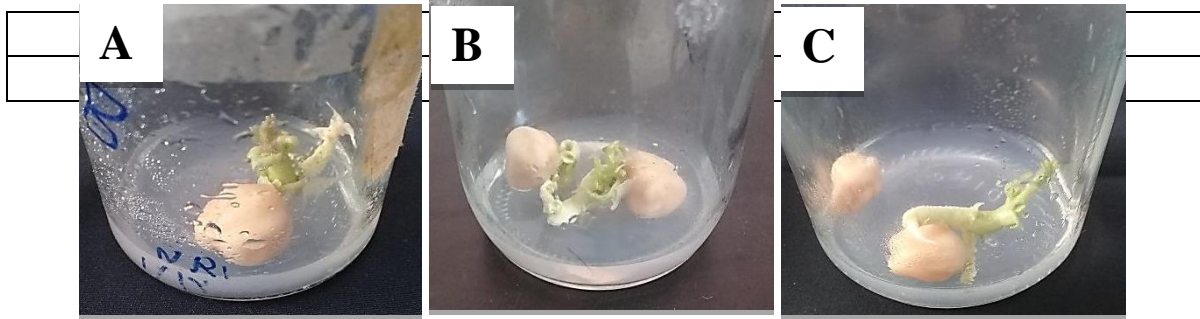
- A- البادرات النامية على وسط MS + 0.5 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك
B- البادرات النامية على وسط MS + 1.0 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك
C- البادرات النامية على وسط MS + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

دور الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك في اختزال التأثير التثبيطي لمركب PEG على انبات البيذور ونمو البادرات لنبات الحمص

من النتائج المميزة التي توصلت اليها الدراسة هو الدور التثبيطي والمميز للدقائق النانوية لأوكسيد الزنك ZnO في انبات بيذور نباتات الحمص عند تداخلها مع مركب PEG مختزلا التأثير التثبيطي او السليبي لجزيئات PEG في تقليل نسبة انبات بيذور نباتات الحمص ونمو بادراتها (الجدول 1-1) اذ ان تواجد تراكيز ZnO- NPs المختلفة في الوسط الغذائي مع تراكيز PEG اعطت تباينا ملحوظا في سرعة وكفاءة انبات البيذور والبادرات وتوضح النتائج تطابق التأثير الفسلجي للدقائق النانوية مع زيادة تراكيزها المستخدمة وكانت اعلى نسبة مئوية للإنبات للبيذور النامية على الوسط المدعم بأعلى التراكيز من كل منهما وهو 2.0 ملغم لتر⁻¹ (الجدول 1-1) والذي اعطى بادرات متفرعة (الشكل C-3) ومن ثم تليه باقي التراكيز المستخدمة من مركب PEG وهي 0.5 ، 1.0 ملغم لتر⁻¹ (الشكل A,B -3) على التوالي والتي اعطت بادرات ذات سيقان مغلظة قصيرة وخضراء ومن المحتمل ان يعود ذلك الى قدرة هذه الدقائق النانوية على اختراق غلاف البذرة واعطاء تأثير مشجع لعملية الانبات (Yahya, 2019). (Amooaghaiea 2015).

الجدول (1) النسبة المئوية لإنبات بيذور نباتات الحمص بوجود التراكيز المختلفة لكل من البولي ايثيلين كلايكول PEG والدقائق النانوية لأوكسيد الزنك ZnO في الوسط الغذائي (SD=11.9)

PEG (mg L ⁻¹) \ ZnO (mg L ⁻¹)	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	60	50	45	35
0.5	55	45	40	40



الشكل (3): تأثير التراكيز المختلفة من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك في اختزال التأثير التثبيطي لمركب PEG على انبات بذور نباتات الحمص ونمو بادراتها بعد مرور 15 يوما من الزراعة.

A-البادرات النامية على وسط MS + 0.5 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

B- البادرات النامية على وسط MS + 1.0 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

C- البادرات النامية على وسط MS + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من مركب PEG + 2.0 ملغم لتر⁻¹ من الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك

تأثير كل من تراكيز PEG وتراكيز الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك ZnO في المحتوى البروتيني لبادرات نباتات الحمص

اشارت نتائج الدراسة الى التأثير التثبيطي لتراكيز PEG المستخدمة في الدراسة في المحتوى البروتيني لبادرات نباتات الحمص مقارنة مع محتواها للبادرات النامية على وسط المقارنة الخالي منه (الجدول-2). في حين اعطت تراكيز الدقائق النانوية المستخدمة دورا تشجيعيا لمحتوى البادرات من البروتين وكان افضل محتوى بروتيني للبادرات النامية على وسط MS ومدعما بالتركيز 2.0 ملغم لتر⁻¹ ZnO والذي بلغ 1.21 مايكروغرام ١ مل. وعند تداخل هذه التراكيز للدقائق النانوية مع تراكيز PEG شجعت زيادة ملحوظة للمحتوى البروتيني اذ بلغ المحتوى البروتيني بوجود اعلى تركيز لكل من PEG والدقائق النانوية لأوكسيد الزنك 2.0 ملغم لتر⁻¹ لكل منهما 0.98 مايكروغرام امل (الجدول-2) وتشير الدراسات الى ان بعض المعادن ومنها Cu, Zn, Mn, Ni تمثل مغذيات ثانوية تملك دور مهم في نمو النباتات متضمنة في العديد من الوظائف الخلوية ومنها انتاج البروتينات، البناء الضوئي وايض حامض الاندول اسيتك اسيد (IAA Sinhal, 2007).

الجدول (2) :تأثير التراكيز المستخدمة لكل من PEG والدقائق النانوية لاوكسيد الزنك في المحتوى البروتيني (مايكروغرام اغم) لبادرات نباتات الحمص بعد مرور 21 يوما من النمو. (SD= 0.22)

PEG(mg L-1) \ ZnO(mg L-1)	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	0.85	0.72	0.56	0.31
0.5	0.86	0.80	0.75	0.68
1.0	0.98	0.89	0.79	0.70
2.0	1.21	1.18	0.91	0.98

شكر وتقدير

يتوجه الباحثان بالشكر والامتنان لجامعة الموصل / كلية العلوم على التسهيلات المقدمة لهم، مما ساعد على انجاز هذا العمل.

References

- Almansouri, M. ; Kinet, J.M. and Lutts, S.(2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant Soil, 231: 243-254.
- Almutairi , Z. M. and Alharbi, A.(2015). Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. Internat. J. Biol. Biomolecu.Agricul. Food and Biotechnol.Engin., 9(6): 594-598.
- Amooaghaica, R. ;Tabatabaiea, F. and Ahadia, A.M.(2015).Role of hematin and sodium nitroprusside in regulating *Brassica nigra* seed germination under nanosilver and silver nitrate stresses., Ecotox. Environ.Safe, 13:259-270.
- Behboudi, F.;Sarvestani, S.T.;Kassae, M.Z. ; Sanavi, M.M ; Sorooshzadeh, A. and Ahmadi, S.B.(2018). Evaluation of chitosan nanoparticles effects on yield and yield components of barley (*Hordeumvulgare* L.) under late season drought stress. J. Water Environ. Nanotechnol., 3(1): 22-39.
- Bimpong, I.K.; Serraj, R.; Chin, J.H.; Ramos, J.; Mendoza, E.; Hernandez, J.; Mendioro, M.S. and Brar, D.S.(2011). Identification of QTLs for drought-related traits in alien introgression lines derived from crosses of rice (*Oryza sativa* cv. IR64) × *O. glaberrima* under lowland moisture stress. J. Plant Biol., 54:237-250.
- Güneş, A. ; Çiçek, N. ; Dnal, A.; Alpaslan, M.; Eraslan, F., Guneri, E. and Güzelordu, T. (2006).Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre- and post- anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency, Plant Soil Environ., 52 (8): 368- 376.
- Hopkins, W.G. and Hüner, N. P. A. (2008).Introduction to Plant Physiology. Wiley and Sons, New York. 242-260.
- Katerji, N. ; Van Hoorn, J.W. ; Hamdy, A. ; Mastroilli, M. ; Oweis, T. and Malhotra, R.S.(2001). Response to soil salinity of two chickpea varieties differing in drought tolerance., Agr. Water Manago, 50:83-96.
- Kaya, M.D.; Okçu, G.; Atak, M.; Çikılı, Y. and Kolsarıcı, Ö.(2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Eur. J. Agr., 24: 291-295.
- Khaitov , B. ; Kurbonov , A. ; Abdiev , A. and Adilov, M. (2016). Effect of chickpea in association with Rhizobium to crop productivity and soil fertility. Eurasian J. Soil Sci., 5 (2): 105 - 112
- Lei, Z. ;Mingyu, S. ; Xiao, W. ; Chao, L. ; Chunxiang, Q. ; Liang , C. ; Hao, H. ; Xiaqing, L. and Fashui, H.(2008). Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation., Biol. Trace Elem. Res., 121(1):69-79.
- Lev-Yadun, S.; Gopher, A. and Abbo, S.(2000). The cradle of agriculture, Sci.288(5471):1602-1603.
- Lowry, O. H. ;Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. ; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin – phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- Lu, C.M. ; Zhang, C.Y. ; Wen, J.Q. ; Wu, G.R. and Tao, M.X. (2002). Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism, Soybean Sci., 21:168-172.
- Macar, T.K. ;Turan , Ö. and Kmekçđ , Y.(2009). Effects of water deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars and lines at early seedling stages. GU. J. Sci.,22(1): 5-14.
- Miljuš-Djukić, J.; Stanisavljević, N. ; Radović, S. ; Jovanović, Z. ; Mikić, A. and Maksimović, V.(2013). Differential response of three contrasting pea (*Pisum arvense*, *P. sativum* and *P. fulvum*) species to salt stress: assessment of variation in antioxidative defence and miRNA expression. Aust. J. Crop Sci., 7(13):2145-2153.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant.,15: 473-479.
- Nair, R. ; Varghese, S.H. ; Nair, B.G. ; Maekawa, T. ; Yoshida, Y. and Kumar , D.S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. . Plant Sci., 179 : 154–163.
- Pirdashti, H. ;Sarvestani, Z.T. ; Nematzadeh, G.H. and Ismail, A.(2003). Effect of water stress on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes .J .Agr., 2: 217-222.
- Sánchez, F.J. ; De Andrés, E.F.; Tenorio, J.L. and Ayerbe, L. (2004).Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. Field Crop.Res.,86:81-90.
- Schütz, W.; Milberg, P. and Lamont, B.B.(2002). Germination requirements and seedling responses to water availability and soil type in four eucalypt species. Acta Oecol., 23: 23-30.
- Sedghi , M. ; Hadi , M. and Toluie , S. G. (2013). Effect of nano zinc oxide on the germination parameters of soybean seeds under drought stress. Annals of West University of Timișoara, ser. Biology, 2: 73-78.
- Sinhal, V. K. (2007). Phytotoxic and cytogenetic effects of Zn⁺² and Pb⁺² in *Vicia faba* . Poll. Res., 26,417-420.
- Tripathy, S.K.(2015). In vitro screening of callus cultures and regenerates for drought tolerance in upland rice. Res. J. Biotech., 10(6):23-28.
- Turk, M.A. ;Rahmsn, A. ; Tawaha , M. and Lee , K. D. (2004). Seed germination and seedling growth of three lentil cultivars under moisture stress. Asian J. Plant Sci. 3: 394-397.
- Yahya, R. T. (2019). Effect of copper oxide nanoparticles in some biomolecules content of *Vicia faba* L. plants tissues. Eco. Env. Cons. 25 (May Suppl. Issue): S9-S13.
- Zheng, L.; Hong, F. ; Lu, S. and Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach., Biol. Trace Elem. Res., 4(1):82-93.

الملخص الانجليزي

**Role of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles in Germination and Growth of Chickpea
(*Cicer arietinum* L.) Plant Seedlings Under Water Stress Effect.**

Rana Tariq Yahea¹

² Amjad Abdul-Hadi Mohammed

¹Biophysics Department\ Science College \ Mosul University \ Iraq

² Biology Department\ Science College \ Mosul University \ Iraq

²Email: biology19802007@yahoo.com

Summary

The current study searched the effect of Zinc oxide (ZnO) nanoparticles with concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mgL⁻¹ on the seeds germination of chickpea *Cicer arietinum* plant and their seedlings growth under the effect of water stress with the presence of the Poly Ethylene Glycol (PEG) compound at 0.5, 1.0 and 2.0 mgL⁻¹ concentrations. The results showed the inhibitor role of PEG when it's found once in the medium at all concentrations on the percentage of seeds germination, where the higher reached to 35% in the presence of 2.0 mgL⁻¹ compared with 60% in the MS alone (control). While the addition of zinc oxide nanoparticles signally to the medium led to encouraged the germination reached the best of them to 75% at 2.0 mgL⁻¹, the characteristic results are the ability of these nanoparticles at 2.0 mg L⁻¹ to reduce the inhibitor effect of PEG compound and the seedlings give perfect differences in their length and shape response to the composition of the medium and the seedlings surprised which growing on the MS medium supplemented with all of the nanoparticles concentrations. The protein content of the seedlings tissues determined in which growing on all the media with the surprised its content in seedlings growing on the MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ of ZnO alone, that reached to 1.21 mg g⁻¹.

التأثير الوراثي لعائق فطر *Trichoderma harzianum* على فطر *Aspergillus niger*

هدى وليد هادي و نديم احمد رمضان

جامعة الموصل /كلية العلوم/قسم علوم الحياة -العراق

DOI : doi.org/10.46617/icbe6009

الخلاصة : جرى في هذا البحث عزل جنسين مختلفين من الفطريات هما: *Aspergillus niger* والفطر *Trichoderma harzianum* كما تمت دراسة التأثير التضادي بين الفطرين وبطرق مختلفة اولها زراعة كلا الفطرين على الاطباق اما الطريقة الاخرى فتمثلت بايجاد التركيز المثبط الادنى من راشح افرازات الفطر *T.harzianum*. كما تم عزل سلالات طافرة مقاومة تلقائية من الفطر *A.niger* وبالتكرزين القاتل وتحت القاتل من راشح عامل السيطرة الاحيائي (1 و0.5 مل/مل) على التوالي وبطريقتين مختلفتين احدهما رمز لها (التجربة 1) و(التجربة 2). اذ اعطت التجربة 1 متوسط تكرار طافرات قدر ب 10×9.25^{-6} و 10×10.62^{-6} وكانت اعلى من التجربة 2 التي سجلت متوسط تكرار 10×6.53^{-6} و 10×5.98^{-6} . بينت نتائج التحليل الاحصائي امكانية تكون طافرات مقاومة في الفطر *A.niger* فيما اذا استخدم الراشح الفطري وبحالته الطبيعية كمبيد حيوي في الحقول الزراعية. فطر

كلمات مفتاحية: فطريات *Aspergillus niger* و *Trichoderma harzianum* التأثير التطفييري.

المقدمة:

يعد الفطر *Aspergillus niger* من الفطريات المسببة لخسائر في المحاصيل الزراعية على المستوى الاقتصادي (Sharma, 2012) ونظرا لان اغلب المبيدات الفطرية المستعملة اتجاه هذه المسببات تعد سهلة الاستعمال وبتراكيز قليلة في اغلب الاحيان (شعبان والملاح, 2005, 1993; Agrios); لكنها تؤدي في الغالب الى ظهور مسببات مقاومة لهذه المبيدات نتيجة حدوث طفرات مقاومة في جينات هذه المسببات (1995; , 1995; Buchenauer, et al., 2012; Klaassen). كما انها في نفس الوقت تؤدي الى تحطيم نوعية التربة وتراكم المركبات السامة على النباتات (Matei, et al., 2011). وحاليا تستخدم طرق المكافحة الحيوية لكونها طرق امنة نسبيا وذات مفعول مؤثر عوضا عن استخدام المبيدات الكيميائية (Lewis and Larkin, 1997; Lewis and Fravel, 1996). لكن هناك تساؤل حول هذه الطرق هل تبقى امنة بمرور الوقت وبالاستعمال المتكرر, لذلك يهدف البحث الحالي الى التحري عن ايجاد التراكيز القاتلة من راشح افرازات الفطر *Trichoderma harzianum* ومن ثم التحري عن التأثير الوراثي لهذا المبيد الفطري الطبيعي في انتاج او عدم انتاج طافرات تلقائية مقاومة من الفطر *A.niger*.

المواد وطرائق العمل:

1- الاوساط المستعملة: وسط Potato Dextrose Agar (PDA) و وسط الاملاح الداني .

2- عزل الفطريات وتشخيصها: تم عزل الفطر *Aspergillus niger* من البصل وذلك بأخذ النسيج النباتي المصاب وتعقيمه سطحيا ثم غسله بالماء المعقم وزرعه على اطباق وسط PDA اما الفطر *Trichoderma harzianum* فقد تم عزله من عينات تربة قريبة من الاشجار في حديقة جامعة الموصل بحيث اجريت سلسلة من التخفيف حسب (Mustafa, et. al., 2009; Elad, et. al., 1981) او بالزرع المباشر على اطباق PDA وفي الحالتين جرى التحضين عند 28°م لمدة اربعة ايام او لحين ظهور مستعمرات جيدة التكوين.

اما التشخيص فقد تم بعمل مسحات مجهرية من المستعمرات النقية للفطريات وبالاعتماد على كلتا الصفتين المجهرية والصفات المورفولوجية للمستعمرات من حيث الشكل والقوام واللون وبالاعتماد على المصادر

(Webster and Weber, 2007 ; Pitt and Hocking, 2009) تم تشخيص الفطريات الى مستوى النوع.

3-دراسة خواص انتاج المضادات للفطر *Trichoderma harzianum*

زرع كل من الفطرين *Trichoderma harzianum* و *Aspergillus niger* على وسط PDA في الاطباق وبتحديد اتجاه الزرع لكل فطر كما تم زراعة كل فطر على حدى للمقارنة.

4- ايجاد التركيز القاتل من راشح الفطر *Trichoderma harzianum*

زرع الفطر *T.harzianum* على وسط PDA السائل لمدة لا تقل عن الاسبوعين في درجة حرارة 28°م ثم اخذت تراكيز متزايدة من الراشح الى وسط الاملاح الداني ثم زرعت هذه الاطباق بفطر *A.niger* بالوخز وحضنت عند 28°م وملاحظة مدى تأثير هذه التراكيز على نمو الفطر من خلال قياس اقطار المستعمرات النامية، واي منها يؤدي الى القتل الكلي للفطر تم حساب هذه التراكيز بالطريقة الحجمية حجم/حجم، كما تم حساب النسبة المئوية للقتل كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للقتل} = \frac{\text{متوسط المقاربات - المعاملة بالراشح}}{\text{متوسط المقاربات}} \times 100$$

5- عزل الطافرات التلقائية المقاومة

جرى عزل هذه الطافرات بطريقتين :

أ- التجربة 1: تحضين الفطر *A.niger* مع التركيز القاتل والتركيز تحت القاتل من راشح الفطر *T.harzianum* ثم اخذ 0.1 مل من كل تركيز ونشره على اطباق وسط الاملاح الداني مع زرع اطباق مقارنة في نفس الوقت وزرعت كل من اطباق المعاملة والمقارنة لمدة اربعة ايام عند 28°م اولحين ظهور مستعمرات واضحة المعالم.

ب- التجربة 2 :عمل عالق بوغي من مستعمرة جيدة النمو من الفطر *A.niger* ثم ترشيحه بواسطة شاش او قطن معقم اعتبر هذا التخفيف 10^0 اخذ 0.1 مل منه وتم نشره على اطباق حاوية على التركيز القاتل

والتركيز تحت القاتلمن المضاد , كما تم عمل تخافيف متسلسلة من التخفيف^{10⁰}لحد تخفيف^{10⁻⁶}جرى
الزرع منها على اطباق الاملاح الداني وذلك لحساب العدد الحي المتوقع للفطر حضنت الاطباق جميعها
عند²⁸°م ولمدة اربعة ايام اولحين ظهور مستعمرات واضحة المعالم. تم عزل الطافرات التلقائية المقاومة
بواقع ثلاث مكررات لكل تجربة كما تم حساب تكرار الطافرات كما يلي:

$$\text{تكرار الطافرات} = \frac{\text{عدد الطافرات المقاومة}}{\text{العدد الحي المتوقع}} \times 100$$

قدر العدد الحي المتوقع من العالق غير المخفف من خلال المعادلة الاتية :

$$\text{العدد الحي المتوقع} = \text{معدل عدد المستعمرات (المقارنة)} \times \text{مقلوب التخفيف} \times \text{عدد الاطباق الملقحة من العالق}^{10^0}$$

6- التحليل الاحصائي:

تم حساب التحليل الاحصائي من خلال حساب الوسط الحسابي ومجموع القيم وحساب النحراف المعياري و الخطأ
القياسي ومن ثم ايجاد قيمة (t) المعنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

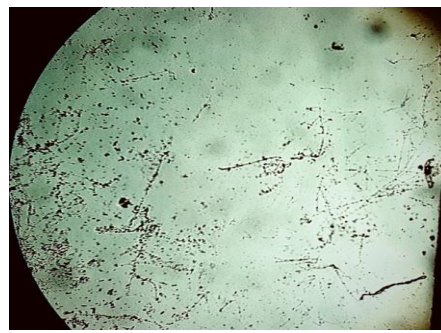
النتائج والمناقشة

1- عزل الفطريات و تشخيصها:

تم تشخيص العزلات الفطرية بعد الحصول على عزلات نقية وملاحظة الصفات الشكلية للمستعمرات والصفات
المجهرية ومقارنتها مع المصادر (Webster and Weber, 2007; Mutiaand Prilya, 2017; and Hocking, 2009; Pitt) تم التأكد بان العزلات الفطرية هي للأنواع: *Trichoderma harzianum* و *Aspergillus niger* و
يبين الشكل (1-أ و ب) التفاصيل المجهرية لكلا الفطرين.



- ب -



- أ -

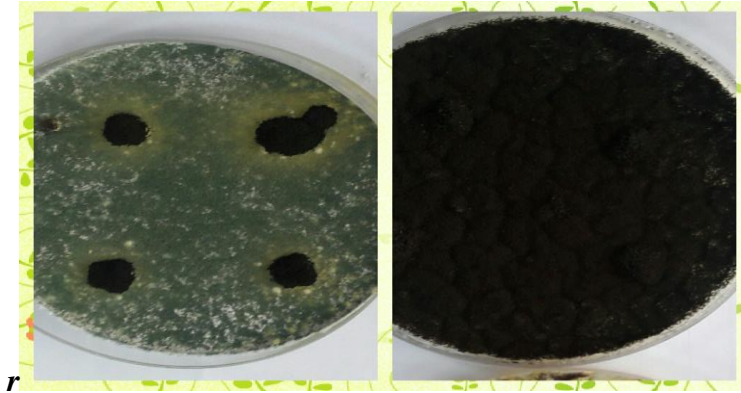
الشكل 1: الفحص المجهرى للفطرين.

أ- الفطر *Trichoderma harzianum* و ب- الفطر *Aspergillus niger*

2-دراسة خواص انتاج المضادات للفطر *Trichoderma harzianum*

من خلال الزرع لكلا الفطرين *T.harzianum* و *A.niger* على اطباق وسط PDA وجد انه بالرغم من انتاج الفطر *A.niger* العديد من المواد المضادة للأكسدة والمثبطة للفطريات (Kawai,et.al.,1993) الا ان الفطر *T.harzianum* هو الذي تغلب على فطر *A.niger* وهذا ما حصل ايضا (Hinampas,et.al.,2013) ويرجع سبب ذلك الى القدرة العالية للفطر *T.harzianum* في انتاج المضادات المجهريه للفطريات (Green,et.al.,1999) Kugukand Kivang, 2002; وكذلك بسبب التصاق الفطر على المسبب المرضي وتحليله وذلك لأنه فطر ذو نشاط ابيضي عالي لا سيما الايض الثانوي المسؤول عن انتاج هذه المواد الفعالة. كما هو مبين في الشكل (2).

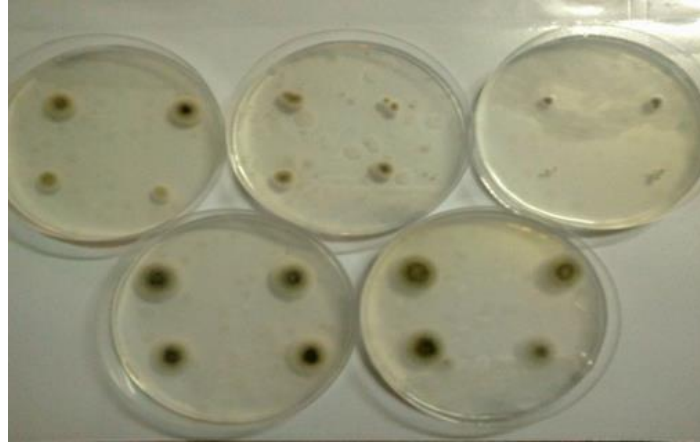
(Schusterand Schmoll,2010;Błaszczyk,et.al.,2014;Mukherjee,et.al.,2013)



الشكل 2: تغلب الفطر *T.harzianum* في النمو على الفطر *A.niger*

2- ايجاد التركيز القاتل من راشح الفطر *Trichoderma harzianum*

بعد ان تبين ان الفطر *Trichoderma harzianum* هو المتغلب في انتاج المواد المثبطة لنمو الفطر *A.niger* تم استعمال راشح افرازات الفطر *T.harzianum* بشكله الخام (الافرازات الخالية من أى تركيب فطري) وبتراكيز متصاعدة من اجل الوصول الى التركيز القاتل وحسب (الجدول 1) اذ تبين ان التركيز القاتل هو 1مل/مل اما التركيز تحت القاتل فقد كان 0.5مل/مل من الوسط الزراعي وتتألت بقية التراكيز تباعا, كذلك يوضح (الشكل 3) تاثير بعض تلك التراكيز لاحدى تجارب قياس التركيز القاتل



الشكل 3: احدى تجارب قياس التركيز القاتل لراشح الفطر *T.harzianum*

الجدول 1: أقطار مستعمرات الفطر *A.niger* المزروعة على الوسط الاملاح الداني المضاف إليه تراكيز متصاعدة من راشح افرازات الفطر *Trichoderma harzianum*

النسبة المئوية للقتل %	متوسط قطر المستعمرة	قطر المستعمرة (R) سم				راشح افرازات الفطر حجم/حجم
		R4	R3	R2	R1	
0	1.7	2.0	1.5	1.8	1.5	الراشح الخام
64.7	0.6	0.5	0.7	0.6	0.5	0.05
71.76	0.48	0.5	0.4	0.5	0.5	0.0125
81.17	0.32	0.3	0.4	0.2	0.4	0.2
85.3	0.25	0.2	0.3	0.3	0.2	0.25
91.17	0.15	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3
94.1	0.125	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4
97.1	0.05	0.1	0	0.1	0	0.5
100	0	0	0	0	0	1

3- عزل الطافرات التلقائية المقاومة

تم الحصول على طافرات تلقائية مقاومة وذلك حسب (التجربة 1 والتجربة 2) المذكور تفاصيلهما في مواد وطرائق العمل وكما مبين في (جدول 2) اذ نلاحظ ان تكرار الطافرات التلقائية ولثلاث تجارب متتالية كانت في تجربة 1 هي 8.13 و 9.75 اذ كانت اعلى من التجربة 2 6.73 و 5.32 وهذا يأتي ربما نتيجة للتفاعل الذي حدث بين المنتجات الايضية لراشح الفطر *T.harzianum* وخلايا الفطر *A.niger* اذ سمحت فترة التحضين لمدة يومين لدخول هذه المكونات الى الخلايا الفطر الثاني وبالتالي اثر ذلك على زيادة الطافرات المقاومة في هذا الفطر. وهذا يؤكد انه ربما ان هناك خطورة محتملة من استعمال راشح الفطر على الافات الزراعية لفترات كافية بحيث تؤدي الى ظهور الطافرات المقاومة لهذا المبيد الطبيعي اضافة لكثير من المواد السامة التي يمكن ان يفرزها الفطر مثل مادة pyrones و السموم الاخرى (Barakat, et al., 2006).

ومن خلال التحليل الاحصائي (الجدول 3) وايجاد قيمة (t) المحسوبة ومقارنتها مع قيمها الجدولية عند مستوى احتمالية 0.05 وجد ان هناك فروق معنوية عند مقارنتها بمعدلات الطفرات المقاومة للتلقائية التي يمكن ان تحدث بدون التعرض لهذه السيطرة الحيوية في كونيديات الفطر *A.niger* اذ يمكن حدوث طفرات مقاومة لراشح الفطر *T.harzianum* وهذا امر طبيعي كون الراشح الخام لعامل السيطرة الحيوية يحوي الكثير من المواد السامة (Ibraheem, 2009) وهو يستعمل بصورة واسعة حول العالم وبشكله الخام كسبورات معدة للرش المباشر على النباتات (Woo,et.al.,2014; Kumar,et.al.,2014) وهذا لا ننصح به في دراستنا الحالية اذ يجب استخلاص المواد ذات الفائدة لكي يكون مفعولها افضل وتأثيراتها المستقبلية قليلة قدر الامكان.

الجدول 2 : تكرار الطافرات التلقائية $\times 10^6$ للفطر *A.niger* لثلاث مكررات وفي نوعين من التجارب

نوع التجربة	تركيز الراشح	تكرار الطافرات المقاومة $\times 10^6$			متوسط تكرار الطافرات	الانحراف المعياري	الخطا القياسي
		R3	R2	R1			
تجربة (1)	0.5	8.13	10.1	9.52	1.01	0.584	
	1	9.75	11.4	10.71	0.82	0.478	
تجربة (2)	0.5	6.73	5.61	7.21	0.78	0.454	
	1	5.32	6.91	5.76	0.82	0.478	

الجدول 3: قيم t المحسوبة ل (تكرار الطافرات التلقائية المقاومة $\times 10^6$) *A.niger* والمعاملة براشح *harzianum*

نوع التجربة	تركيز الراشح	المكررات لتكرار الطافرات المقاومة $\times 10^6$			المتوسط \pm الخطأ القياسي	قيمة t المحسوبة
		R3	R2	R1		
مقارنة	0	2.1	1.9	1.75	0.1 \pm 1.91	-
التجربة 1	0.5	8.13	10.1	9.52	0.584 \pm 9.25	1.782
	1	9.75	11.4	10.71	0.478 \pm 10.62	1.734
التجربة 2	0.5	6.73	5.61	7.21	0.454 \pm 6.53	1.782
	1	5.32	6.91	5.76	0.47 \pm 5.98	1.86

المصادر العربية

شعبان، عواد والملاح نزار مصطفى. 1993. المبيدات. دار الكتب للطباعة، العراق.

المصادر الاجنبية

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier, Amsterdam.

- Barakat, R. M., Fadel Al- Mahareeq and Mohammad I. Al- Masri. (2006). Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. Isolated from Palestine. Herbron University Research J. Vol. (2). No. (2). pp. (27-47) .
- Błaszczak L, Siwulski M, Sobieralski K, Lisiecka J, Jędrzycka M. (2014) *Trichoderma* spp. Application and prospects for use in organic farming and industry. J. of Plant Protection Research. 54(4):309-317.
- Buchenauer, H. (1995). DMI-fungicides: Side effects on the Plant and Problems of resistance. In Modern Selective Fungicides. Properties , Applications , Mechanisms of Action (H- Lyr , ed) Gustav Fisher – Verlag , Jena Germany , 280 – 290 .
- Elad Y, Chet I, Henis Y. (1981) .A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*. 9(1):59-67.
- Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., & Jakobsen, I. (1999). Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(4), 1428-1434.
- Hinampas, Venus B., Ina Marie P. Kintanar, and Jan Gabrielle M. Reyes, (2013). “Biocontrol Potential of *Aspergillus niger* on *Oryza sativa* (Rice) by *Trichoderma harzianum* Under Experimental Conditions”. A Research Paper. Philippine Science High School. Central Visayas Campus, Talaytay, Argao, Cebu.
- Ibraheem, B.Y. (2009). Induced biotypes from the fungus *Trichoderma* types to improve biocontrol and enhancement plant growth parameters. Ph.D. Thesis. College of Agriculture and Forestry, Mosul Univ., Iraq (In Arabic with English abstract).
- Kawai, Y.; Oeda, Y.; Otaka, M.; Kasakawa, T.; Inoue, N. and Shinano, H. (1993). Screening and identification of antioxidant production strains in food-borne fungi. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 44:141-146.
- Klaassen, C.H., Gibbons, J.G., Fedorova, N.D., Meis, J.F., Rokas, A. (2012). Evidence for genetic differentiation and variable recombination rates among Dutch populations of the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Ecol* 21(1): 57–70.
- Kuguk, C. and Kivang, M. (2002). Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkey, J. Biol.* 27: 247 - 253 .
- Kumar S, Thakur M, Rani A. (2014) *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African J. of Agricultural Research*. 9(53):3838-3852. Available from: <http://www.AcademicJ.org/AJAR>.
- Lewis, J.A. and Fravel, D.R. (1996). Influence of Pyrex / Biomass of Biocontrol Fungi on Snap bean damping – off caused by *Sclerotium rolfsii* in the Field and Germination of Sclerotia. *Plant Dis.* 80: 655-659.
- Lewis, J.A. and Larkin, R. P. (1997). Extruded Granular Formulation with Biomass of Biocontrol *Gliocladium virens* and *Trichoderma* spp. caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic Growth of Pathogen in Soil less Mix. *Biocontrol Science Technol.* 5:397- 404.
- Matei S, Matei G-M, Cornea P, Popa G. (2011). Characterization of soil *Trichoderma* isolates for potential biocontrol of plant pathogens. *Factorii și procese pedogenetice din zonă temperată*. 10:29-37.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM. (2013) *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*. 51(1):105-129. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>.
- Mustafa A, Khan AM, Inam-ul-Haq M, Pervez AM, Umar U-D. (2009) Usefulness of different culture media for *in-vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against seed-borne fungi of economic importance. *Pakistan Journal of Phytopathology*. 21(1):83-88.
- Mutia D, Prilya F. (2017). Exploration of *Trichoderma* spp. and fungal pathogen that causes a strawberry anthracnose and examination of *in vitro* antagonistic activity. *Biotika*. 5(18):58-68.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer.
- Schuster A, Schmoll M. (2010) Computer assisted corneal topography. High resolution graphic presentation and analysis of keratometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87:787-799.
- Sharma, R. (2012). Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech journal of microbiology*, 1(1), 47-51.
- Webster, J. and Weber, R.W.S. (2007). *Introduction to Fungi*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp: 469-471.
- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, et al. (2014) *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*. 8(1):71-126. Available from: <http://benthamopen.Com/ABSTRACT/TOMYCJ-8-71>.

المخلص الانجليزي

Genetic effect of *Trichoderma harzianum* suspension on *Aspergillus niger*

Huda W. Hadi and Nadeem A. Ramadan

Mosul university/Science college/Biology department / Iraq

Abstract

In this research two different genera were isolated the first was *Aspergillus niger* and the second was *Trichoderma harzianum*. The antimicrobial effect between two fungi was studied in different ways: the first is the cultivation of both fungi on the petri dishes whereas, the other methods relied on finding minimum inhibitory concentration of *T. harzianum* suspension secretions. Furthermore, resistant spontaneous mutations were isolated from *A. niger* by two different methods using lethal and sub lethal concentration from bio control factor suspension (1, 0.5ml/ml) respectively, one of these methods named (experiment 1) and second called (experiment 2). Experiment 1 recorded an average frequency of mutants estimated at $6^{-10} \times 10.62$ and $6^{-10} \times 9.25$ higher than Experiment 2, which recorded an average frequency of $6^{-10} \times 6.53$ and $6^{-10} \times 5.98$. Statically data showed possibility of resistant mutant's formation in *A. niger* fungi weather suspension use with natural state in agricultural fields as bio control fungicide.

Keywords: *Trichoderma harzianum*; *Aspergillus niger*; Genetic effect

التأثيرات السمية لمبيد البندمتلين والأشعة فوق البنفسجية (UV-C) في أنبات ونمو بادرات الذرة الصفراء

Zea mays L.

نهلة سالم حموك

مركز بحوث البيئة/جامعة الموصل

DOI : doi.org/10.46617/icbe6010 e-mali:Nahlahammok@yahoo.com

الخلاصة: يستخدم مبيد الأعشاب البندمتلين (PM) في حقول الذرة الصفراء *Zea mays* L. (قبل البزوغ) للسيطرة على الأدغال وأن زيادة التركيز يؤدي الى ضرر المحصول. كما تعد الأشعة فوق البنفسجية UV-C من العوامل البيئية المهمة التي يتوقع العلماء زيادتها مع النضوب العالي في طبقة الأوزون نتيجة تلوث الغلاف الجوي. لذا كان الهدف من دراستنا هو الكشف عن الآثار السمية المورفولوجية للمبيد على بادرات الذرة الصفراء عند تعرضها لأشعة UV-C. نفذت التجربة مختبريا بنظام التجارب العاملية باستخدام القطاعات العشوائية الكاملة (CRD) حيث تمثل تراكيز المبيد العامل الأول (صفر ماء مقطر)، 1.4، 2.8، 4.1 (سم³/لتر) بما يعادل 0.5، 1.5، 1 لتر/دونم. أما العامل الثاني شمل فترات التعرض لأشعة (UV-C) وكانت (0، 30، 60، 120 دقيقة) على التوالي. أخذت النسبة المئوية للأنبات بعد مرور أربعة وسبعة أيام. أظهرت النتائج انخفاض معنوي في النسبة المئوية للأنبات بعد مرور سبعة أيام وطول الرويشة والجذير (سم) ونسبة البقاء عند جميع تراكيز المبيد باستثناء نسبة الأنبات بعد مرور أربعة أيام والوزن الطري للبادرات حيث كانت النتائج غير معنوية. كذلك لوحظ إنتفاخ في القمم المرستيمية وتشوهات بدأ من التراكيز المنخفضة وهذا ما يميز مبيد البندمتلين عن بقية المبيدات التي تم دراستها. بينما أدت المعاملة بالأشعة الى قلة أنبات البذور المتعرضة للفترات المختلفة وإنخفاض معنوي في جميع الصفات المدروسة. مع ملاحظة زيادة في طول البادرة (طافات) وتحفيز نمو الشعيرات الجذرية بكثافة عالية كما أن البذور المعرضة للأشعة لم تصب بالفطريات أثناء التجربة. كما سجل التداخل بين العاملين (تراكيز المبيد × فترات الأشعة) إنخفاضا معنويا في جميع الصفات المدروسة.

المفاتيح الدالة: مبيد الأدغال ، الأشعة فوق البنفسجية UV-C ، الذرة الصفراء، الأنبات، البندمتلين.

المقدمة

يعد مبيد البندمتلين (PM) مبيد أدغال اختياري يستخدم لأزالة الأدغال الحولية والأدغال عريضة الأوراق في حقول الذرة والصويا والبطاطا والقمح والبصل والطماطة والملفوف والفاصل. يوجد كمستحضر يعرف بستومب E330Stomp وصيغته التركيبية xylydine N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitr_3_4 (Alshallash، 2014). وهو من مثبطات الانقسام الخيطي meiotic والذي يثبط أنقسام الخلايا cell division ويحث على micronuclei والشذوذ الكروموسومي والذي يعتبر كمؤشر للضرر الجيني الذي تحدثه مبيدات الأعشاب Singh (2014) Srivastava ووجد المصدر أعلاه في دراسته لرصد السمية الجينية genotoxic لمبيد البندمتلين والكلايفوسيت في نبات *Vigna mungo* ودراسة الانقسام الخيطي وسلوك الكروموسومات وبعض الصفات المورفولوجية أن مبيد البندمتلين قد أثر على الانقسام الخيطي في كل أطواره مع شذوذ كروموسومي وأنخفاض في حبوب اللقاح الخصبة.

وفي دراسة لبيان تأثير مبيد البندمتلين والبيوتكلور butachlor على أنبات البذور ونمو البادرات نوعين من اللوبيا *cow pea* (*Vigna sinensis* and *Vigna unguiculat*) في ظروف المختبرية والحقلية توصلوا من خلالها أن كلا النوعين من نبات اللوبيا نبتت عند التركيز 5mg/ml وثبط الأنبات لهما عند تركيز 100-50mg/ml من كلا المبيدين. كما ثبت طول المجموع الجذري والمجموع الخضري معنويا وأختزل الوزن الطري والجاف للمجموع الجذري والخضري (karaye وآخرون 2014). كما درسوا تأثير مبيد (PM) على نبات الباقلاء *L. Vicia fabas* حيث أختزل كل صفات التي تم قياسها وهي ارتفاع النبات وطول الجذر وقطر أو عية الخشب وسمك أنسجة اللحاء والحزم الوعائية مقارنة بالنباتات غير المعاملة بالمبيد كما قيمت التأثيرات السمية لمبيد (PM) على المادة الجينية لنبات الباقلاء

ووجدوا ارتفاع غير طبيعي في معدل الأقسام الأعتيادي لنهايات جذور الباقلاء حيث سجل (63.28%) للنباتات المعاملة بالمبيد مع ارتفاع تكون الزيوغ الصبغية. وأن التركيز المستخدم في الحقل عالي وهو كثير الضرر على المستقبل النهائي في السلسلة الغذائية والمستخدم في التجربة وهو بكتريا *Pseudomonas resinovorans* والتي تعمل على التقليل من السمية الجينية لمبيد (PM) على نبات الباقلاء (Aboulila وآخرون, 2016).

ووجدوا أن مبيد (PM) يحد على ضرر أو تلف DNA في التراكيز من 1-10000. وأن ضرر أكسدة DNA هو من الأنواع الشائعة لضرر الخلايا نتيجة أصناف الأوكسجن الفعال (ROS) وهو المسؤول عن تكون الطفرات في الخلايا. (Demir وآخرون, 2017).

قامت مجموعة من الباحثين بدراسة لتحديد السمية المورفولوجية والسمية الخلوية لمبيد (PM) في التربة باستخدام مؤشرات الخلوية والمورفولوجية في نبات البصل *Alium cepa L.* حيث تم إضافة مبيد (PM) بتركيز $0.033, 0.044, 0.055, 0.066 \text{ g kg}^{-1}$ الى التربة وبعدها تم قياس (ALR) المجموع الجذري و(ARN) المجموع الخضري ولاحظوا تثبيط في كلا المجموعين الجذري والخضري مقارنة بالكنترول. وتثبيط معدل الأقسام الأعتيادي وزيادة الخلايا الشاذة وتكون الزيوغ الصبغية في الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة مما يدل على سمية مبيد (PM) حتى في التراكيز المنخفضة (Verma وآخرون, 2018).

ونظرا للتغيرات المناخية فقد زاد الأهتمام بأهمية قياس الأشعة فوق البنفسجية ومراقبتها حيث لها تأثيرات بين الفائدة والضرر على النبات. مع ترك تأثيرات سلبية قوية على المحاصيل المهمة اقتصاديا. (Castronuovo وآخرون, 2014).

يتراوح الطول الموجي للأشعة فوق البنفسجية بين (100-400 نانوميتر) وتقسم (UV) الى ثلاثة أنواع UVA -1 (315-390nm) UVB -2 (280-315nm) UV-C -3 (280-100) تكمن خطورة (UV) وتأثيراتها السلبية في الطول الموجي للأشعة (Abdulkareem وآخرون 2015). وتعتبر UV-C من الأطوال الموجية الكهرومغناطيسية القصيرة التي يتوقع العلماء زيادة مستوياتها نتيجة النضوب العالي في طبقة الأوزون الناتج من تلوث الغلاف الجوي. (Castronuovo وآخرون 2014).

تؤثر الأشعة على الشكل المورفولوجي والتركيب التشريحي والعمليات الفسيولوجية داخل الخلية مثل انخفاض في مساحة الورقة ومعدلات تراكم الكتلة الحيوية وطول النبات وكمية البروتينات والكاربوهيدرات وكمية البرولين وكمية الفلافونيدات (Salama وآخرون, 2011; Castronuovo وآخرون, 2014; Abdulkareem وآخرون, 2015). أن تعرض البذور للأشعة فوق البنفسجية يخفض من نسبة الأنبات ومعدل النمو لما تحدثه الأشعة من تغير في وظائف الأنزيمات ووجد أن النباتات تنتج حوالي 15 نوع من البروتينات ردا على التعرض لهذه الأشعة وتقل منافستها للأعشاب الضارة وأنتاجها من المركبات الأليلوباثية (محمد, 2011).

وأوضحت نتائج إحدى الدراسات أن هناك تأثير معنوي واضح للأشعة UV-C على أنبات البذور وتركيز الكلوروفيل لبعض أنواع الأشجار الخشبية. حيث وجد نقص في كمية الكلوروفيل وانخفاض نسبة الأنبات بزيادة فترة التعرض للأشعة وأن هناك تفاوت بين الأنواع في استجابتها للأشعة وأن فترة التعرض 120 دقيقة أكثر تأثيرا على تركيز الكلوروفيل A, B للأنواع محل الدراسة (Ibrahim و Shetta, 2009). وعند تعريض نبات *Juncus effusus L.* وهو من النباتات المائية لفترات مختلفة من أشعة UV-C (15, 30 و 45 دقيقة) أحدثت تغيرات فسيولوجية وتركيبية في المجموع الخضري وأن زيادة فترة التعرض أدت الى أختزال في نمو النبات وكتلته الحيوية وزيادة أنزيمات المضادة للأكسدة وأختزال محتوى الكلوروفيل وحجم الخلايا وحجم الكلوروبلاست (Najeeb وآخرون, 2011).

كما تعد أشعة UV-C أكثر الأطوال الموجية ضارا للمادة الوراثية وهذا المدى من الأطوال الموجية (250-260) هي أكثر امتصاصا من قبل المادة الوراثية DNA وبالتالي أشدها تطفيرا (هادي, 2012). وأن أشعة UV-C خصوصا تسبب تلف وتحوير DNA يعرف DNA methylation patterns (Urban وآخرون, 2016). أن المستقبل UVR8 يرسل اشارات الى باقي أجزاء النبات التي تسبب تغيرات في نمو وتطور النبات. ومن هذه التغيرات صنع أنزيمات الإصلاح DNA Repair وواقى الشمس sun screen وهي من آليات الحماية لدى النبات لمنع ضرر الأشعة على الخلايا النباتية مستقبلا وواقيات الشمس في النبات بعضها فيزيائية مثل الترايكمات Trichomes وهي

شعيرات وحيدة الخلية أو متعددة الخلايا تنشأ من الطبقة الخارجية للبشرة epiderm وتزيد كثافة الترايكمات عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية (UV-C) أما النوع الثاني من الواقيات هي الكيميائية مثل صبغات الأنثوسيانين، والبيتا كاروتين، الكلايكوسيد glycosides والهيدروكسيديسيانينك أسد (Nielsen، 2018؛ Rai، Agrawal، 2017). ونظرا للتأثيرات السلبية لأشعة (UV-C) على المحاصيل الحقلية والتي أشارت لها الأبحاث السابقة الذكر أعلاه وباعتبار نبات الذرة الصفراء *Zea mays* L. من المحاصيل الأقتصادية المهمة في العالم من حيث الأنتاجية ومحتواها الغذائي (العبيدي، 2019) وأستخدام مبيد الأدغال البندمتلين في مكافحة الأدغال في حقول الذرة الصفراء لاسيما خلال فصل الصيف. كان الهدف من دراستنا الحالية هو الكشف عن تأثير أشعة (UV-C) بوجود مبيد البندمتلين على نمو وأنبات بادرات الذرة الصفراء ومن ثم الكشف عن التداخل بينهما.

مواد وطرائق العمل

1-2 تجربة أنبات البذور

تم تعقيم بذور نبات الذرة (صنف هجين مدخل DC 6589 تم أستحصله من شركة Ard لتجارة المواد الزراعية وهو صنف معتمد من قبل وزارة الزراعة العراقية) بأستخدام هايوكلورات الصوديوم sodium hypochlorite بتراكيز 5% لمدة 10 دقائق ثم تم غسلها بماء الحنفية لعدة مرات للتخلص من مادة التعقيم بعد ذلك غسلت بالماء المقطرون ونقلت الى أطباق بتري بلاستيكية ذات قطر (9سم) بعد أن وضع ورق ترشيش فيها وبواقع 50 بذرة موزعة على 5 أطباق وبواقع 10 بذرة في كل طبق ثم تم ترطيب البذور بأضافة 5سم³ ماء مقطر لكل طبق ثم نقلت الى الحاضنة من نوع (Memmert) بدرجة 28-30م.

2-2 تشعيع البذور

تم نقل أطباق بتري الى غرفة التشعيع لتعريض البذور للأشعة فوق البنفسجية (UV-C) بأستخدام مصباح من نوع Scottish science nop والمجهز من شركة Philip Harris الأنكليزية والذي تكون أكثر من 90% من أشعته عند الطول الموجي (253.7nm). وهذا المدى من الأطوال الموجية (250-260nm) هي أكثر أطوال UV أمتصاصا من قبل المادة الوراثية DNA وبالتالي أشدها تطفيرا (هادي، 2012). جمعت البذور من أطباق بتري في دورق زجاجي سعة 1000 مل يستقر على سطح هزاز مغناطيسي (magnetic stirrer) يدور القطعة المغناطيسية أثناء فترة التشعيع وكانت المسافة بين مصدر الأشعاع والبذور في حدود 16cm. ثم جرى التشعيع لمدة 30، 60، 120 دقيقة وبعد أنتهاء مدة التشعيع تركت البذور في غرفة مظلمة وهي نفسها التي جرى فيها التشعيع لمدة ساعة كاملة على الأقل قبل أخراجها للأستعمال وذلك لمنع حصول عملية الأصلاح الضوئي (photoreactivation) لثنائيات الثايمين thymine dimer وهي العطب الوراثي الأساس الناجم عن تعرض DNA لأشعة UV في الحدود المعطاة أعلاه (هادي، 2012). بعد أنتهاء من التشعيع البذور أعيدت الى الحاضنة لأكمال الأنبات.

3-2 تحضير تراكيز المبيد

تم تحضير أربعة تراكيز من مبيد البندمتلين (stomp330) والمجهزة من شركة (Agrichem Australia) وهي (0 ماء مقطر (مجموعة السيطرة)، 1.4، 2.8، 4.1 سم³/لتر) بما يعادل 1.5، 1.0، 0.5 لتر/دونم على التوالي. ثم أضيف 5سم³ من كل تركيز الى خمسة أطباق لكل تركيز وأعيدت الى الحاضنة. وبعد مرور 4 و7 أيام تم أخذ القياسات التالية.

1- قياس نسبة الأنبات بعد مرور 4 و 7 أيام بأستخدام القانون التالي:

$$\text{النسبة المؤية} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100 \text{ (محمد، 2011)}$$

2- قياس طول الرويشة (المجموع الخضري) بأستخدام المسطرة (سم)

3- قياس طول الجذير (المجموع الجذري) بأستخدام المسطرة (سم)

4- قياس الوزن الطري للبادرات (g) قيس الوزن الطري للبادرات بأستخدام الميزان.

بعد أنتهاء من القياسات أعلاه تم زراعة البادرات بسنادين صغيرة لمتابعة نموها وقياس نسبة البقاء.

- 5- قياس نسبة البقاء بعد مرور 10 أيام من الأنبات.
6- نسبة البقاء بعد تكون بادرات بعمر 2-3 أوراق.
تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية بالتصميم العشوائىالكامل (C.R.D). إذا ميزت المعاملات المختلفة معنوياً بأحرف هجائية مختلفة حسب اختبار دنكن المتعدد المدى (Duncan، 1955؛ العبيدي، 2010).

النتائج والمناقشة

توضح نتائج جدول رقم (1) حدوث انخفاض معنوي عند مستوى احتمال 0.05 في نسبة الانبات بعد مرور 7 ايام و طول الرويشة و طول الجذير .حيث انخفضت نسبة الانبات معنوياً بوجود التراكيز المختلفه من مبيد (PM). في حين كان الانخفاض غير معنوي في نسبة الانبات بعد مرور 4 ايام . ربما بسبب عدم استقرار النمو . ان انخفاض نسبة الانبات و طول رويشه و طول الجذير ربما يعود الى تأثير المبيد على عمليات الانقسام والنمو بالنبات باعتبارها الموقع الهدف لمبيد (PM) وآلية من الآليات عمله . حيث يعتبر مبيد (PM) من مثبطات الانقسام الخيطي meiotic والذي يثبط انقسام الخلايا cell division ويحث على تكوين micronuclei والشذوذ الكروموسومي chromosomal aberration. (Singh و srivastava، 2014؛ Aboulila وآخرون 2016).

كما ان ضرر اكسدة DNA وهو من الانواع الشائعة لضرر الخلايا نتيجة اصناف الأوكسجين الفعال (ROS) و الذي يقود الى طفرات بالخلايا (Demir وآخرون 2017). قد يكون سبب في ذلك.

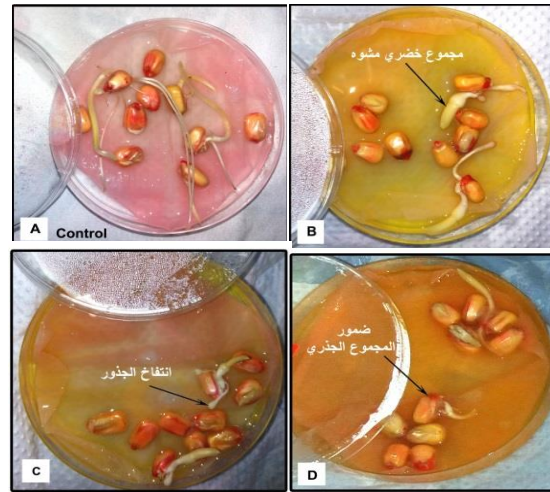
ان انخفاض نسبة الانبات مع زيادة التركيز تتفق مع ما توصل اليه karaya وآخرون 2014 في دراستهم لتأثير مبيد البندامثلين و البيوتوكلور butachlor على أنبات البذور ونمو بادرات نوعين من الحمص في ظروف المختبريه والحقلية حيث توصلوا الى ان التراكيز العالية لمبيد البندامثلين قد خفضت من نسبة الأنبات وطول المجموع الجذري ومجموع الخضري. كما تتفق نتائجنا مع الباحث Verma وآخرون (2018) في أملاك مبيد (PM) سميته جينيه قويه حتى في التراكيز الواطئه حيث بدأ الأنخفاض في تجربتنا في نسبة الانبات و طول المجموع الجذري والمجموع الخضري من تراكيز الواطئه. (وظهرت التشوهات في المجموع الجذري و المجموع الخضري من التراكيز المنخفضه) . وهو ما اكده الباحث أعلاه في نتائجه عند دراسته لمبيد (PM) في اختبار نبات البصل *Alium Cepa* L. حيث لاحظ تثبيط بالمجموع الجذري (ALR) والمجموع الخضري (ARN) بعد معاملتها بمبيد (PM) مقارنة بالكنترول .

جدول رقم(1) تأثير تراكيز مبيد البندامثلين في نسبة الأنبات بعد مرور 7و4 أيام وطول الرويشة وطول الجذير لبذور الذرة الصفراء.

تراكيز (PM) (حجم/حجم) (سم/3 لتر)	نسبة الأنبات بعد مرور 4 ايام	نسبة الأنبات بعد مرور 7 ايام	طول الرويشة (سم)	طول الجذير (سم)
صفر (السيطرة)	6.00a	25.00a	2.19a	0.49a
1.4	6.00a	8.00b	0.45b	0.30ab
2.8	5.00a	8.50b	0.40b	0.38ab
4.1	8.00a	10.50b	0.39b	0.25b

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية عند احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد المدى.

كما توضح نتائج جدول رقم (2) حدوث انخفاض معنوي عند مستوى احتمال 0.05 في نسبة بقاء البادرات بعد 10 ايام ونسبة بقاء البادرات بعمر 2-3 اوراق وهنا يظهر فعل وتأثير المبيد حيث تسبب المبيد بنسبة قتل كبيره في البذور مع ظهور البادرات المشوهة (اي بادرات بدون مجموع جذري او مجموع خضري وتورمات وانتفاخات بالمجموع الجذري او الخضري) كما موضح في الشكل رقم (1).



الشكل رقم (1): فعل وتأثير المبيد

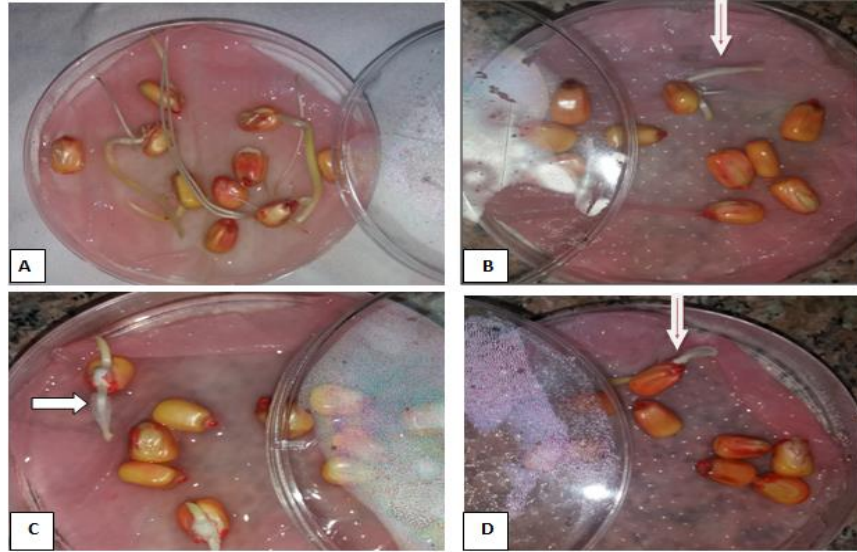
- A. بذور الذرة غير المعاملة بالمبيد (control)
 B. مجموع خضري مشوه بالتراكيز الواطئة 1.4
 C. انتفاخ وتورم الجنور مع تشوه المجموع الخضري عند التركيز 2.8
 D. ضمور المجموع الجذري وقتل البذور بالتراكيز العالية 4.1

والتي قادت الى انخفاض نسبة بقاء البادرات بعد 10 ايام حيث فشلت البذور الناتجة في البقاء نتيجة تشوه المجموع الخضري والجذري بفعل المبيد. كما لم تتمكن البادرات المشوهة من الاستمرار بالبقاء من عمر 2-3 اوراق حيث انخفضت نسبة بقاء البادرات بعمر 2-3 الى (0.00) لجميع تراكيز المبيد مقارنة بالكنترول. وهذا ما يؤكد فعل المبيد. كما لم يسجل الوزن الطري للبادرات أي تغير معنوي بعد المعاملة بالمبيد. ربما بسبب عرقلة المبيد للانقسام وعدم استقرار النمو. ان سبب ظهور البادرات المشوهة يعود على عرقلة مبيد (PM) للانقسام الخيطي meiotic كما اشارت الى ذلك اغلب البحوث Singh و Srivastava ، 2014 او لارتفاع الغير طبيعي في معدل الانقسام الاعتيادي Aboulila وآخرون 2016 كما ان ضرر الناتج من اكسدة (DNA) نتيجة تحرر اصناف الاوكسجين الفعال (ROS) والذي يقود الى الطفرات بالخلايا قديكون سبب لظهور البادرات المشوهة (Demir وآخرون 2017). كما اكد Verma وآخرون (2018) ان مبيد (PM) ثبط معدل الانقسام الاعتيادي وزاد من معدل الخلايا الشاذة و الزيوغ الصبغيه في الخلايا المنقسمة و الغير المنقسمة. وكل هذه التغيرات هي مؤشرات على الضرر الجيني .

جدول (2) تأثير تراكيز مبيد البندمتلين في الوزن الطري للبادرات (غم) ونسبة البقاء بعد 10 أيام من الأنبات، ونسبة البقاء للبادرات الذرة الصفراء بعمر 2-3 أوراق.

نسبة بقاء البادرات بعمر 2-3 أوراق.	نسبة البقاء البادرات بعد 10 أيام	الوزن الطري للبادرات (غم)	تراكيز (PM) (حجم/حجم) (سم ³ /لتر)
22.30a	25.00a	0.60a	صفر (السيطرة)
0.00b	7.50b	0.60a	1.4
0.00b	8.50b	0.50a	2.8
0.00b	10.50b	0.80a	4.1

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية عند احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد المدى.



الشكل رقم (3) يوضح تحفيز الشعيرات الجذرية بعد التعرض لأشعة UV-C عند الطول الموجي (254nm).

A- بذور غير معرضة لأشعة UV-C مجموعة السيطرة. B- فترة التعرض 30 دقيقة

C- فترة التعرض 60 دقيقة D- فترة التعرض 120 دقيقة

وبهذا نتفق مع Nielsen, 2018؛ Rai و Agrawal، 2017 التي أكدت أن ظهور الشعيرات الجذرية بعد التعرض لأشعة UV-C من آليات الحماية لدى النبات وتعرف بواقيات الشمس sunscreen والتي تمنع ضرر الأشعة على الخلايا النباتية مستقبلاً.

كما اظهرت نتائج جدول(4) حدوث انخفاض معنوي عند مستوى احتمال 0.05 في وزن الطري للبادرات أن انخفاض الوزن الطري للبادرات قد يعود الى تأثير الأشعة على شكل المورفولوجي والعمليات الفسيولوجية داخل الخلية ومعدلات تراكم الكتلة الحيوية وكمية البروتينات والكاربوهدرات وكمية البرولين وكمية الفلافونيدات (Salma وآخرون، 2011؛ محمد، 2011؛ 2014؛ Castronuovo) كما أكد الباحث Najeeb وآخرون 2011 في دراستهم لتأثير الأشعة UV-C على نبات *Juncus effusus* وهو من النباتات المائية الى ان تعرض هذا النبات للفترات (15,30 and 45) دقيقة من أشعة UV-C احدثت تغييرات في نمو النبات وكتلته الحيوية .

كما يوضح جدول(4) حدوث انخفاض عند مستوى احتمال 0.05 في نسبة بقاء البادرات بعد 10 ايام ونسبة بقاء البادرات بعمر 2-3 اوراق معنوياً عند التعرض لأشعة UV-C عند طول الموجي 254nm ان انخفاض نسبة بقاء البادرات بعد 10 ايام وبعمر 2-3 اوراق يعود الى ان تعرض لأشعة UV-C تحدث تغييرات فسيولوجية في المجموع الخضري والجذري واختزال محتوى الكلوروفيل وحجم الكلوروبلاست (Najeeb وآخرون، 2011). كما أكد (Castronuovo وآخرون، 2014) ان تعرض بادرات الطماطة لأشعة UV-C عند طول الموجي اعلاه قد سبب اضراراً فسيولوجية و مورفولوجية مؤكدة في الاوراق و الجذور قادت الى موت البادرات لنبات الطماطة . 2015, *Abdulkareem et al* ان فترات التعرض الأعلى من 60 دقيقة ليست فقط تؤثر على الصفات الفسيولوجية ولكن تؤثر ايضا على التشريح الداخلي للنبات والصبغات التي تختزل نتيجة اكسدة الكلوروفيل (photooxidation). أن التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV-C سبب ظهور طفرات (بادرات تفوقت بالطول على مجموعة السيطرة) على عكس فعل المبيد الذي تسبب بظهور بادرات مشوهة بنسبة كبيرة مقارنة مع التعرض لأشعة UV-C.

جدول (4) تأثير فترات التعرض لأشعة UV-C في الوزن الطري للبادرات (غم) نسبة البقاء للبادرات بعد 10 أيام من الأنبات، نسبة البقاء للبادرات بعمر 2-3 أوراق.

فترات التعرض لأشعة UV-C	الوزن الطري للبادرات (غم)	نسبة البقاء للبادرات بعد 10 أيام	نسبة بقاء البادات بعمر 2-3 أوراق
0 دقيقة	1.30a	38.00a	22.00a
30 دقيقة	0.05b	1.50c	0.10b
60 دقيقة	1.00a	10.00b	0.10b
120 دقيقة	1.15b	2.00c	0.10b

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية عند احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد المدى.

يشير الجدول (5) الى وجود اختلافات معنوية للتداخل بين تراكيز المبيد وفترات التعرض اذا انخفضت جميع الصفات المدروسة عند التركيز 0% لجميع فترات التعرض. وهنا يظهر تأثير الأشعة الضار على الأنبات والنمو. كما لم تسجل أي بيانات لطول الرويشة عند فترة التعرض 120 دقيقة للتركيز أعلاه. وهذا دليل على التأثير السلبي والتثبيطي للأشعة في فترات التعرض الأعلى من ساعة واحدة وبهذا تتفق مع الباحث Castronuovo وآخرون (2014) بعدم تسجيل بيانات للنباتات المعرضة للفترة 120 دقيقة بسبب موت النباتات نتيجة ضرر الأشعة. حيث يؤدي التعرض لأشعة فوق البنفسجية الى تغيرات وراثية وأخرى فسلجية تسبب خلا في وظائف الأنزيمات والهرمونات والمسارات البنائية للمواد وبالتالي تغير نسبة الأنبات والنمو (محمد، 2011).

كما سجل الجدول نفسه تداخلات معنوية بين تراكيز المبيد (1.4 و 2.8 و 4.1) وفترات التعرض اذا انخفضت جميع الصفات المدروسة وهنا يظهر التأثير السلبي المشترك للمبيد والأشعة فكلا العاملين لهما تأثير تثبيطي واضح على أنبات ونمو بادرات الذرة الصفراء. كما لم تظهر أي بادرات لمعاملات المقارنة في فترة التعرض 30 والمعاملة بتراكيز المبيد 2.8 و 4.1 حيث كلما زاد تركيز المبيد وفترات التعرض كان التأثير التثبيطي أكبر. فقد ذكر (Shetta و Ibrahim, 2009) أن فترة التعرض 120 دقيقة أكثر تأثيرا على تركيز الكلورفيل a و b لبعض أنواع الأشجار المدروسة. كما أن مبيد البندامثلين يمتلك تأثيرات سمية حتى في التراكيز المنخفضة Verma وآخرون (2018). كما سجل 0.00 لطول الرويشة عند تداخل التركيز 1.4 وفترة التعرض 120 دقيقة وكذلك التركيز 4.1 عند نفس فترة التعرض. وهذا أيضا دليل على التأثير السلبي للأشعة والمبيد في الأنبات والنمو.

تفوقت المعاملة بالمبيد بتركيز 4.1 والمعرضة للأشعة لفترة الزمنية 60 دقيقة على كافة المعاملات معنويا في نسبة الأنبات بعد مرور 4 أيام حيث سجلت 20% نسبة أنبات مقارنة بمعاملة الكنترول. أن هذا الارتفاع لا يلغي الأثر السلبي للأشعة والمبيد وهو نتيجة عدم استقرار النمو حيث أصبحت النتيجة غير معنوية بعد مرور 7 أيام من الأنبات. كما كان التداخل بين تراكيز المبيد وفترات التعرض غير معنوي في نسبة بقاء البادات بعمر 2-3 أوراق وهذا يعود الى موت البادات المعرضة للمبيد والأشعة حيث لم تستمر البادات بسبب تشوهها. في حين استمرت معاملة السيطرة والبادرات الطافرة نتيجة التعرض لأشعة UV-C.

نستنتج من نتائج دراستنا الحالية أن مبيد البندامثلين يمتلك تأثيرات سمية على بادرات الذرة الصفراء وأن تأثيره يبدأ من التراكيز الواطئة حيث ظهرت التشوهات من التركيز 1.4%. كما تمتلك أشعة UV-C تأثيرات تطفيرية حيث تسببت بنسبة قتل للبذور مع ظهور نباتات طافرة تفوقت على مجموعة السيطرة بالطول لذانوصي بتجنب استخدام المبيد عند زراعة الذرة الصفراء خاصة في فصل الصيف لتجنب تداخل المبيد مع الأشعة فوق البنفسجية وتقادي استخدام التراكيز العالية لأنها تضر بالمحصول وتلوث البيئة

جدول (5) تأثير التداخل بين تراكيز مبيد البندميتين وأشعة UV-C في نسبة الأنبات بعد مرور 4 و 7 أيام وطول الرويشة وطول الجذير (سم) والوزن الطري (غم) ونسبة البقاء بعد 10 أيام من الأنبات، نسبة البقاء بعمر 2-3 أوراق لبادرات الذرة الصفراء .

تراكيز (PM) (حجم/حجم) (سم ³ / لتر)	فترات التعرض لأشعة UV-C	نسبة الأنبات بعد مرور 4 أيام	نسبة الأنبات بعد مرور 7 أيام	طول الرويشة (سم)	طول الجذير (سم)	الوزن الطري للبادرات (غم)	نسبة البقاء البادرات بعد 10 أيام	نسبة بقاء البادرات بعمر 2-3 أوراق
صفر (السيطرة)	0	18.00a	88.00a	4.90a	0.94a	1.80b	88.00a	88.00a
	30	0.00e	4.00cd	2.20b	0.48bc	0.00e	4.00cd	0.40b
	60	4.00de	4.00cd	1.66bc	0.17cd	0.40de	4.00cd	0.40b
	120 دقيقة	2.00de	4.00cd	0.00c	0.36bcd	0.20de	4.00cd	0.40b
1.4	0	14.00abc	22.00b	1.34bc	0.67ab	1.40abc	22.00b	0.00b
	30	2.00de	2.00cd	0.10c	0.14cd	0.20de	2.00cd	0.00b
	60	6.00cde	6.00cd	0.36c	0.31bcd	0.60dec	4.00cd	0.00b
	120 دقيقة	2.00de	2.00cd	0.00c	0.10cd	0.20de	2.00cd	0.00b
2.8	0	10.00bcd	22.00b	0.80bc	0.71ab	1.00bcd	22.00b	0.00b
	30	0.00e	0.00d	0.00c	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b
	60	10.00bcd	12.00bc	0.80bc	0.72ab	1.00bcd	12.00bc	0.00b
	120	0.00e	20.00b	0.00c	0.09cd	0.00e	0.00d	0.00b
4.1	0	10.00bcd	20.00b	0.40c	0.51bc	1.00bcd	20.00b	0.00b
	30	0.00e	0.00d	0.00c	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b
	60	20.00a	20.00b	1.14bc	0.50bc	2.00a	20.00b	0.00b
	120 دقيقة	2.00de	2.00cd	0.00c	0.00d	0.20de	2.00cd	0.00b

الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية عند احتمال 0,05 حسب اختبار دنكن متعدد المدى.

المصادر

العبيدي، محمد اكرم عبداللطيف. (2019) تقييم بعض مبيدات مكافحة الادغال المصاحبة لمحصول الذرة الصفراء (*zea mays L.*) . أطروحة دكتوراة . كلية الزراعة و الغابات ، جامعة الموصل .

العبيدي، سالم حمادي عنتر. (2010) ، التحليل الاحصائي في البحث العلمي وبرنامج SAS ، دار ابن الاثير للطباعة والنشر الموصل ، العراق .

محمد ، عدي زكي (2011) . دراسة تأثير اشعة كاما و الاشعة فوق البنفسجية و عوامل بيئة اخرى و تداخلهما في طفيل الحامول *chinensis lamcuscuta* و علاقة بالنبات العائل محصول الطماطة *Lycopersicon esculentum mill* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة تكريت .

هادي ، هدى وليد (2012). السيطرة الوراثية على انتاج الميلانين في الفطر الترناريا الترناتا . رسالة ماجستير . كلية العلوم ، جامعة الموصل .

Abdul kareem ,k.A. , Mustapha ,O.T.,Garuba ,T.,Kasture ,A. ,Oreviola ,O.B.2015.Mutagenic Role of Artificial Ultraviolet (UV-C)Irradiation on the Growth and Yield of tomato (*Solanum Lycopersicon L.*)*Journal of pharmacy and Applied Sciences*.vol.2(1):16-20.

Aboulila,A.A., Belal E.B., Metwaly ,M.M.andEL Ramady H.R.. 2016. Degenotoxicity of pendimethalin Contaminated Clay Soil By Pseudomonas resinovarans Using Anatomical Cytogenetic and Biochemical Analysis in *Vicia faba* plants.*International Journal Of Current Research in Biosciences and plant Biology*.3(2):38-53.

AL-shallash,K.S.2014.Effect of pendimethalin,Trifluralin and Terbutryn on *Lolium Multiflorum*Growing with Barley during pre-emergence Stage.*Annals of Agricultural Science*(2014)59(2).

-
- Castronuovo, donito, Giuseppe, T. stella, L. Nincenzo, C. Adriano, S., Antonio, S. 2014 .UV-C IRRadiation effects on young tomato plants: preliminary results. *pak. J. Bot.*, 46(3):945-949.
- Demir, Nazli, sevta, Ardin, Ülkü , undegerbucurgat. 2017. Assessment of genotoxic effects of pendimethalin in chinese hamster over cells by singlecell gel electrophoresis (comet) assay. *turk. J. pharm. sci.* 14(2):185-190.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*. 11:1-42.
- Karaye, I.U., A.A. Aliero and I.S. Adili 2014. Effects of butachlor and pendimethalin herbicides on seed germination and early seedling growth of species of cowpea. *Annals of Biological Sciences*. 2(4):11-15.
- Najeeb , Ullah , ling , X. , zammurad , I.A., m., Rasheed, Ghulam, J., weigi, s. and weijun, z. 2011 ultraviolet –c mediated physiological and ultra structural alteration in *juncus effusus* L. shoots. *A ctaphysiological plantaru*. 33:481-488 .
- Nielsen, Vanessa 2018. What effect does UV light have on plant? Vanessa <author<ursalighting.com
- Promkaev, N., soontorn; chainaksaeng; p.mpatong , S. Rajanripap. 2010. Toxicity and genotoxicity of pendimethalin in mize and onion , *kasetsart Journal Natural Science*. 44:1010-1015 .
- Rai , K. and Agrawal , S.B. 2017. Effect of UV-B Radiation on morphological , physiological and biochemical Aspects of plants : over view. *Journal of scientific Research*. vol. 61 , 2017:87-113.
- Salama, Hadial M.H. ; Ahlam A.A watbam , Anoud T. A. Fughom. 2011. Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and contents of some annual desert plants. *Saudi journal of Bioegeical sciencs* 18:79-86.
- Shetta, N.D. Ibrahim, I.m., 2009. Impact of ultra violet –c Radiation on seed germination and chlorophyll concentration of some woody trees grown in Saudi Arabia. *Journal of Agriculture & Environmental Sciences*. Alex. Univ, Egypt. vol. 8(2) p:1-21.
- Singh, N. and srivastva, A., 2014. Biomonitoring of Genotoxic Effect of Glyphosate and pendimethalin in *Vigna mungo* populations . *Cytologia*. 79(2):173-180.
- Ulm , R. and Jankins , G.I. , 2015. How do plants sense and respond to UV -B radiation? *BMC Biol*. 13 , 4-9
- Urban, Laurent ; Florence Charles, Maria Raquel Alentara demiranda Jawad Aarrouf. 2016 . Understanding the physiological effects of UV-C and exploiting its agronomic potential before and after harvest . *Journal of plant physiology and Biochemistry* . 105(2016) pp:1-11.
- Verma, S. 2018 morphotoxicity and extogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L.- A biomarker based study. *Journal chemosphere* vol. 206, September 2018, p:248-254.

المخلص الانجليزي

Toxic Effect Of Pendimethalin and UV-C Radiation On Germination and Corn Growth *Zea mays* L Seedling

Nahla Salim Hammok

Environmental Researches center/University of Mosul/ Iraq.

e-mali:Nahlahammok@yahoo.com

ABSTRACT

Pendimethalin (PM) is pre-emergence herbicide for weed control in corn crop. Which high doses gave more damage to crop. UV-C radiation is important factor in ecology which its level increase as the result of Ozon layer imbalance. The objective of this experiment was to determine the damage or toxicity of two factors on corn Seedling. The experiment tested in the laboratory with two factors, the first was herbicide dose (0.0 , 1.4 , 2.8 ,4.1ml/L) which equal to the dose in field a (0.5 , 1, 1.5 L/Donme) while the second factors was seed corn treated with UV-C radiation in different time (0.0 ,30 ,60 ,120 minuet) it used CRD design. The percentage of germination was taken after four and seven days. The results showed a significant decrease in the: percentage of germination after seven days, shoot, root length (cm) and survival rate of the seedling at all doses of herbicide. Except the germination percentage after four days and seedling fresh weight were not significant. Also, maristimic tissue were distend and deformities while appeared from low concentrations and this distinguishes the (pm) herbicide from the remnant of the herbicides studied. UV-C had reduced germinationpercentage of seeds exposed to different periods and all studied traits also more hair root on radical had seen with increase shoot length (mutant). On other hand corn seeds which expose to radiation did not infect with fungus during the experiment. The interaction (herbicide x radiation) gave a significant effect on reducing all parameters of the seedling.

Keywords: Herbicide, UV-C radiation, *Zea mays*L., Germination, Pendimethalin.

DOI : doi.org/10.46617/icbe6011

Detection of Cytomegalovirus by ELISA Technique in Rheumatoid Arthritis Patients in Mosul / Iraq

MomammedA.Ibraheem, AnmarA.ALTaie*, Momammad A. Muhammad

Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Iraq

**Corresponding author: anmaraltaee1978@yahoo.com*

Abstract: In the present study, the association between CMV infection and rheumatoid arthritis was examined. A cohort of 92 serum samples were recruited from rheumatoid arthritis patients at age group of (30-62) years (25 males, 47females) and 20 from healthy control. ELISA *technique* was used to assess the levels of CMV (IgM) and CMV (IgG) antibodies. Results showed that rheumatoid arthritis patients blood groups are as follow: 29.16% (AB+), 25 % (A+), 22.22 % (O+), 19.44 % (B+), 1.39 % (A-), 2.78 % (B-), and 1.39 % (AB-), and 0 % (O-). According to gender the results showed the highest ABO blood groups in females with AB (20.83%), and A (19.44%) while blood group O⁻ has been not recorded. The results of Rh phenotype tests in patients with rheumatoid arthritis were Rh⁺ 94.43% and Rh⁻ 5.56%. *CMV (IgG and IgM) assay* using *ELISA* technique shows that 6 patients had seropositively of IgM against CMV antigen was apportioned as 2 patients with each blood groups A, B and AB while the infection has not detected with blood group O. In addition CMV (IgG), revealed that 24 patients has seropositively, apportioned as 8 (12.8 IU/ml) at blood group AB, 6 (11.1 IU/ml) at blood group B , 6(10.2 IU/ml) at blood groups A while in blood group O was 4 (12.9 IU/ml).According to sex , the results showed that highest titers of CMV IgG in females were 14 patients (14.3 I/ml) and in males 5 patients (10.9 IU/ml).The current study revealed no significant correlation between levels of IgG, IgM and CMV infections in rheumatoid arthritis patients. On other hand, there was weak significant correlation between blood groups and rheumatoid arthritis patients.

Key words: CMV, Rheumatoid arthritis, Blood groups, ELISA

DOI : doi.org/10.46617/icbe6011

1.Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is a member of the β -Herpesviridae family. It is the family's largest member (150-200 nm) and morphologically it can not be identified from other members. This pathogenic virus is widely distributed and can affect people of all ages (Arvin et al., 2007; Davison and Nair, 2004; Sever, 2002). The virus can affect the different organs of the body, lead to eye infections, gastrointestinal infections, hepatitis, and cytopenia. This often persists latently in cells and is distributed with blood products asymptotically (Storch, 2000). General infection routes include horizontal family members transport, sexual transmission, intra-uterine vertical transmission, and breastfeeding. Infected blood products transfusion and contaminated organ transplantation are important sources of nosocomial human cytomegalovirus (HCMV) infection (Fowler & Pass, 2006). Although anti-nuclear, anti-phospholipid and anti-CD13 autoantibodies are also common, autoantibodies evolve with HCMV infection, mainly against endothelial cells and smooth muscle cells. Emerging evidence suggests that

HCMV may precede the onset of autoimmune disease and is likely to be more common among people with autoimmune predispositions (Nauclér, 2012, Shenk and Stinski, 2008).

A prevalence of CMV infection is high, with just a worldwide incidence of (30-100) million (Al-Hakami et al., 2016; Asadi&Ismailzadeh, 2005). Alwan et al., 2017 studied the prevalence of CMV in Iraqi Children. They revealed a prevalence of cytomegalovirus specific IgM as a serum marker was 5.4% among children under five years of age. Positive cytomegalovirus was associated with low socioeconomic status, maternal bad obstetric history, and lower age of children, while the infection was not associated to geographical distribution and gender. By stratified the children into symptomatic and asymptomatic according to the signs and symptoms of cytomegalovirus congenital and acquired infection at time of sample collection, 15% and 0.9% proved to have positive specific IgM among symptomatic and asymptomatic children, respectively. Jaundice was the most predominant clinical sign 56% among symptomatic infected children, followed by hepatosplenomegaly 41.7%.

ABO blood groups are one set of agglutinogens that are genetically determined carbohydrate molecules that are borne on the red blood cell surface membranes. ABO blood typing have shown some non-infectious and resistant interaction with various diseases. In most individuals in the blood group, the cells secrete the antigens and are involved in the blood circulation. It seems that a number of pathogens are vulnerable to non-secretors. The conceptual pathogenesis for this susceptibility is that as many pathogens that can bind cells and soluble antigens in the blood group to polysaccharide can inhibit this binding (Ahmed et al., 2004). There have been numerous reports over the past two decades that antigens in the blood group can serve as receptors for parasites, bacteria and viruses. As previous studies (Brown et al., 1994; Brown, et al., 1993) revealed, the P blood group antigen was the receptor for Parvovirus B19, a virus replicating only in progenitor erythroid cells. The researchers showed in another paper that individuals with the unusual phenotype were immune to infection with Parvovirus B19. The present investigation was conducted to determine the prevalence of anti-CMV in patients with rheumatoid arthritis and to determine if there is any association of blood groups with regard to CMV infections due to limited data concerning this relation.

2. Materials and Methodsue

2.1.Sampling

Seventy two blood samples were collected from patients with rheumatoid arthritis (25 males, 47females) and 20 from healthy control, who was admitted Al-Salam Teaching general hospital from April 2019 to September 2019. These subjects were diagnosed by the physicians and the diagnosis was confirmed by specific tests for this disease. Their ages are ranging from 30- 64 years.

2.2. Detection of ABO blood groups and Rhesus factor

The standard slide agglutination is performed using commercial antisera (Biotech laboratories Ltd, UK). Two drops of whole blood were placed in two different locations of a grease-free clean glass slide on which a few drops of antisera were added to blood group A and B. The blood cells are combined with the system stick and the antigen. The slide was then tilted and the result registered accordingly to agglutination assay (Barragan et al., 2000; Zoysa, 1985).

2.3. Detection of CMV

Cytomegalovirus (CMV) IgG and IgM enzyme immunoassay kits has been used to detect the presence of CMV infection (Biotech laboratories Ltd, UK), which provides a quantitative *in vitro* assay for human anti-bodies of IgG and IgM class against CMV in serum or plasma. In brief, the first reaction steps, diluted patient samples are incubated for 30 minutes in wells then wash 5 times used 300 µl of working wash buffer and empty the wells. Specific IgG and IgM antibodies bind to antigens in the case of positive samples. A second incubation was performed to detect the bound antibodies after introducing conjugate enzyme (HRP) into each well, after wash added 100 µl of substratum into microplate wells and incubated in dark at 37 ° c for 15 minutes, then finally stopped the reaction by acid and read the absorption at 450 nm with a microwell reader within 15 minutes.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (SPSSFW; SPSS Inc). A chi-square test is use for investigating the correlation between categorical variables. Qualitative variables are given as percentages and a value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

The distribution of the blood groups of patients with rheumatoid arthritis were 29.16% AB⁺, 25% A⁺, 22.22% O⁺, 19.44% B⁺, 1.39 %A⁻, 2.78% B⁻ and 1.39% AB⁻ while blood group O⁻ has been not recorded. The results of Rh phenotype tests in the rheumatoid arthritis patients were Rh⁺94.43% and Rh⁻5.56%. On other hand, according to gender the results revealed the highest ABO blood groups in females with AB and A were 20.83%, 19.44% respectively while in males with group B and O were 9.72% and 8.33% respectively (Table 1).

Table 1: Distribution of ABO blood group and Rhesus factor in Rh patients of both sexes (*Numbers and Percentage in parentheses*).

ABO blood groups	Sex	Rh positive	Rh negative	Total
		No. (%)		
A	M	4(5.56)	1(1.39)	19(26.39)
	F	14(19.44)	-	
B	M	7(9.72)	1(1.39)	16(22.22)
	F	7(9.72)	1(1.39)	
ABnd	M	5(6.94)	1(1.39)	21(29.16)
	F	15(20.83)	-	
O	M	6(8.33)	-	16(22.22)
	F	22(30.55)	-	
Total	M	10(13.89)	3(4.17)	72(100)
	F	46(63.88)	1(1.39)	

The results showed 6 patients had seropositively of IgM against CMV antigen. The CMV infection was recorded with blood groups A, B and AB not showed with group O. Positivity of IgM antibodies against CMV dose not show significant relationships with gender ($p>0.05$) see Table 2.

Table2: Numbers of CMV (IgM) in relation of ABO blood groups and in both sex.

Blood groups	A	B	AB	O	Total
	No.(Total cases)				
Gender					
Males	0(5)	1(8)	1(6)	0(6)	2(25)
Females	2(14)	1(8)	1(15)	0(10)	4(47)
Controls	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(20)
Total	2(19)	2(16)	2(21)	0(16)	6(92)

Table 3 showed the titer of anti-CMV IgG antibodies in relation with blood groups and sex, the study showed that highest titers of CMV IgG in females were 14 persons (14.3 I/ml) and in males 5 persons (10.9 IU/ml) while 5 healthy person (controls) without rheumatoid arthritis was indicated (7.1 IU/ml) as in (Table 3).

Table 3: Seropositively of CMV (IgG) in relation of ABO blood groups and gender

Blood groups Gender	A		B		AB		O		Total	
	No.(%)	Mean (IU/ml)	No.(%)	Mean (IU/ml)	No.(%)	Mean (IU/ml)	No.(%)	Mean (IU/ml)	No.(%)	Mean (IU/ml)
Males	1(1.09)	8.6	2(2.17)	11.2	2(2.17)	12.4	0	0	5(5.43)	10.9
Females	3(3.26)	14.7	3(3.26)	13.4	4(4.35)	16.1	4(4.35)	12.9	14(15.22)	14.3
Controls	2(2.17)	6.3	1(1.09)	7.6	2(2.17)	6.9	0	0	5(5.43)	7.1
Total	6(6.522)	10.2	6(6.522)	11.1	8(8.69)	12.8	4(4.35)	12.9	24(26.08)	10.9

4. Discussions

The previous study of frequency ABO blood groups in rheumatoid arthritis patients showed that the blood group A is 42.22%, B 20.54%, O 30.10%, AB 7.13% (Stoia et al., 1967) While the blood group A is 49.10%, B 14.80%, O 28.90%, AB 7.20% (Çildağ et al., 2017) which did not acceptable with our study. However, there is no study from the Iraqi population or everywhere in the region showing blood group types frequency in patients with rheumatoid arthritis..

Several studies have shown an interaction, for example in RA or SLE, between the acquired immune responses to HCMV and the appearance of other autoimmune diseases. Precisely, the immunopathogenic mechanism by which HCMV can contribute to the course of autoimmune disease, such as molecular mimicry (UL83/ppp65) in patients with SLE in addition to joint inflammation by induction and expansion (CD4+/CD28- T-cells) in patients with HCMV infected with RA (Muhsin, 2019; Halenius and Henge, 2014). Analysis of 92 blood samples (patients and controls) showed that 24 (26.1%) and 68 (73.9%) anti-CMV IgG are positive. Only in six cases (6.52 percent) anti-CMV IgM antibody is confirm to be positive. In addition, 26.1 percent of subjects are positive for anti-CMV IgG antibody titers, indicating previous interaction with the virus and widespread disease distribution in the studied population. There was usually little evidence to support HCMV's role in arthritis pathogenesis. The peripheral blood identified low amounts of HCMV DNA (Çildağ et al., 2017; Alvarez et al., 2005) and adult joints with rheumatoid arthritis (Mousavi et al., 1998). The etiological significance of these findings is uncertain. The literature reporting HCMV infection is even more common in pediatric rheumatic diseases than it is in adult patients. In a non-quantitative PCR test (Dag et al., 2015; Tsai et al., 1995), The prevalence of HCMV DNA was found to be similar to controls in leukocytes obtained from children with SLE and JIA (Çildağ et al., 2017).

The biological function of blood groups is associated with the presence of chemical moieties on the other cells that were originally defined as red cell antigens. They act as receptors and ligands against bacteria, parasites, and viruses. Anti-A and anti-B are not RBC antibodies, but RBC-interacting bacterial antibodies. Individuals with A or B antigens make either Anti-A or Anti-B at about 3-6 months of age as they produce their own bacterial utero antibodies (Ewald and Sumner, 2016; Ahmed et al., 2004). The present study found that there was no significant difference in controls and patients with rheumatoid arthritis from the Mosul of Iraq in ABO and Rh classes. On the other hand, there are many studies associating various infections with specific blood group ABO, like type O "non-secretors" have about twice the incidence of duodenal ulcer relative to type A and type B secretors. Type A, on the other hand, has a higher incidence of relative tumors of salivary gland, stomach and pancreas with blood type O groups (Choo et al., 1998). Plasmodium vivax is similarly protected from infection by people who lack Duffy system antigen (Ewald and Sumner, 2016; Ahmed et al., 2004). Another study showed a risk factor for duodenal ulcer in the blood group O. Blood group B has the highest rate of type II diabetes, because diabetes is prevalent in our population, people with high-risk group B should have early diabetes screening (Pasha et al., 2009).

5. Conclusions

There may be a greater problem with CMV infection than is generally recognized and reported. Although existing CMV infection treatment methods are not highly effective or available globally. As a summary, in our clinic, which is in a Mosul town, we observed no association between ABO or Rhesus (D) blood groups and rheumatoid arthritis. Nonetheless, more studies with larger series and at different sites, including molecular investigations, may be useful in determining the relationship between blood groups of ABO or Rhesus (D) and rheumatoid arthritis.

6. References

1. Sever, J.L. (2002). Pediatric cytomegalovirus infections. *Clin Applied immunol.*, 3:47-49.
2. Storch, G.A. (2000). *Essentials of Diagnostic virology*. New York: Churchill Livingstone Co. pp: 203-218.
3. Fowler, K.B. and Pass, R.F. (2006). Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics*, 118(2):e286-92.
4. Nauc er, C.S. (2012). Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 14:101
5. Asadi, M.H. and Ismailzadeh, A. (2005). Prevalence of anti-CMV IgG and IgM antibodies in blood donors in Zanjan province, 2004. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences*, 3(52):43-48.
6. Ahmad, J.; Taj, A.S.; Rahim, A.; Shah, A. and Rehman, M. (2004). Frequency of Hepatitis B and Hepatitis C in healthy blood donors of NWFP: a single center experience. *Journal Postgraduate Medical Institute* 18(2) 343-52.
7. Brown, K.E.; Hibbs, J.R.; Gallinella, G.; Anderson, S.M.; Lehman, E.D.; McCarthy, P. and Young, W.S. (1994). Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Eng J Med.*, 330:1192-6.
8. Brown, K.E.; Anderson, S.M and Young, N.S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 Parvovirus. *Science*.262:114-17.

9. Barragan, A; Kremsner, P.G; Wahlgren, M. and Carlson, J. (2000). Blood group A antigen is a coreceptor in Plasmodium falciparum rosetting. *Infect Immun*, 68:2971-2975.
10. Zoysa, D. (1985). The distribution of ABO and Rhesus (Rh) blood groups in Sri Lanka. *Ceylon medical journal*, 30:37-41.
11. Stoia, I.; Ramneantu, R. and Poitas, M. (1967). Blood groups abo and Rh (D) factor in the rheumatic diseases. *Ann. rheum. Dis.*, 26: 332-333.
12. Alvarez-Lafuente R, Fernández-Gutiérrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D, Lamas JR: Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis*2005, 64(9):1357-9.
13. Mousavi-Jazi, M.; Boström, L.; Lövmark, C.; Linde, A.; Brytting, M. and Sundqvist, VA. (1998). Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 25(4):623-628.
14. Tsai, Y.T.; Chiang, B.L.; Kao, Y.F. and Hsieh, K.H. (1995). Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus genome in white blood cells from patients with juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol.*, 106(3):235-240.
15. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ (1998). Isolation of a DNA clone derived from a blood borne non A, non B viral hepatitis genome. *Science* 244(3) 362-4.
16. Pasha, A.K.;Hashir, M.M. andKhawar, S. (2009). Frequency of ABO blood group among medical students. *Journal of Surgery Pakistan*; 14(2): 93-95.
17. Lewkonja. R. M. and Ronald, F. (1969). ABO Blood Group Distribution in Serum Hepatitis. *British Medical Journal*, 3: 268-269.
18. Al-heti, N. M. A. (2002). Study of Haematological Changes in Patients with Neonatal Jaundice and Factors that affect its Occurrence in Al-Anbar Governorate. A thesis submitted to council of the science collage - Al-Anbar university in partial fulfillment for the degree of master in science.
19. Jeremiah, Z. A.; Koate, B.; Buseri, F. and Emelike, F. (2008). Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in apparently healthy Port Harcourt blood donors and association with blood groups and other risk indicators. *Blood Transfuse*, 6(3):150-155.
20. Borén, T.; Falk, P.; Roth, K.A; Larson, G. and Normark, S. (1993) Attachment of helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 62:1892-1825.
21. Westergren A. (1926). The technique of the red cell sedimentation reaction. *Am Rev Tuberc*.14: 94 – 101.
22. Alaoddoleheo,H., Sadighian,F., and Shahandeh,Z. The Study of ABO Groups and Rh factor in Active and Non-active Carriers of Hepatitis B Virus. *J. Hepatitis Mently*, 2007; 7(1): 43-44.
23. Çildağ, S., Kara, Y. and Şentürk, T., 2017. ABO blood groups and rheumatic diseases. *European journal of rheumatology*, 4(4), p.250.
24. Dag, M.S., Turkbeyler, I.H., Ozturk, Z.A., Kısacık, B., Tutar, E. and Kadayıfçı, A., 2015. Cytomegalovirus ileocolitis in a rheumatoid arthritis patient: case report and literature review. *Reumatismo*, pp.13-16.
25. Ewald, D.R. and Sumner, S.C., 2016. Blood type biochemistry and human disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(6), pp.517-535.
26. Halenius, A. and Hengel, H., 2014. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *BioMed research international*, 2014.
27. Muhsin, J.M., 2019. Study the possible Seropositivity connection of EBV, Rubella Virus & CMV infection with four groups of autoimmune diseases in sample of Iraqi patients. *Al-Nisour Journal for Medical Sciences*, 1(1), pp.108-117.
28. Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K. (2007). *Human Herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.pp.165-184.
29. Davison, F. and Nair, V., (2004). *Marek's disease: an evolving problem*. Academic Press.pp.86-97.
30. Al-Hakami, A.M., Shati, A.A., Alsuheel, A.M., Hakami, A.R., Al-Qahtani, M.A., Jelban, H.M. and Ali, A.S. (2016). Seroprevalence of human Cytomegalovirus antibodies among children with type I diabetes mellitus in the Aseer Region, Southwest KSA. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(4):388-394.
31. Shenk, T. and Stinski, M.F. (2008). *Human Cytomegalovirus*, Berlin, Springer,pp. 297-314.
32. Alwan et al., 2017. Prevalence of Cytomegalovirus in Iraqi Children. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 2017, 6(11): 113-124

" قابلية اختراعات التكنولوجيا الحيوية للحصول على براءة الاختراع "

The patentability of biotechnology inventions

Benayad Djalila

Faculty of Law and Political Science, University of Mhamed Bougherra ,Boumerdes , Algeria

ania-rose14@hotmail.fr

DOI : doi.org/10.46617/icbe6012

ملخص :

تعتبر التكنولوجيا الحيوية سمة الحياة المعاصرة فهي بمثابة الثورة العلمية الرابعة للقرن العشرين بعد ثورة تحطيم الذرة و الفضاء و الحاسب الآلي ، وان تطبيقاتها ليست مقتصرة على مجال معين و إنما تستخدم في جميع مجالات الحياة . إن التكنولوجيا الحيوية هي تطبيق المعلومات المتعلقة بالمنظومات الحية بهدف استعمال هذه المنظومات أو مكوناتها في الأغراض الصناعية، أي أنها تكنولوجيا قائمة على علم الأحياء خصوصاً عند استخدامها في الزراعة وعلم الغذاء و الطب ، فهي تتعامل مع الكائنات الحية على مستوى الخلية وتحت الخلية من أجل تحقيق أقصى استفادة منها صناعياً وزراعياً و بالتالي اقتصادياً وذلك عن طريق تحسين خواصها وصفاتها الوراثية .

فباستخدام التكنولوجيا الحيوية ظهرت أدوية جديدة ،نباتات معدلة ، مواد عضوية وطبيعية ، تطوير في الكائنات الحية البحرية... الخ كل هذه الابتكارات يقوم باختراعها أشخاص يبرزون من خلالها جميع مواهبهم و إبداعاتهم لإخراجها في صورتها النهائية حتى تستفيد منها البشرية لذا فإنه كان لزاماً وضع منظومة قانونية لحماية هذا النوع من الاختراعات ، هذا ما يجعلنا نبرز من خلال هذه الورقة البحثية الخصوصية التي تتمتع بها اختراعات التكنولوجيا الحيوية من حيث استيفائها للشروط الموضوعية لمنح البراءة .

المحور الأول

شروط حماية الاختراعات الحيوية و أهميتها

إن الاختراعات الناتجة عن التكنولوجيا الحيوية شأنها شأن أي اختراع ، لابد أن تتوفر فيها شروط الحماية من جدة وخطوة إبداعية ، وقابلية للتطبيق الصناعي ، غير أن الفقهاء يؤكدون وجود صعوبات تكتنف تطبيق أحكام البراءة على هذه الاختراعات ، حيث ان نظام الحماية عن طريق البراءة يفقد جزءاً من خصوصيته بالنسبة للاختراعات الحيوية ، فالملائمة الكلية بين نظام البراءة واختراعات التقانة الحيوية ليست سهلة ، إذ أن قانون البراءة يفترض توافر التعليم التقني أو الفني الذي من خلاله تتضح لنا معالم الاختراع شريطة أن يكون هذا التعليم التقني ضروري للتحديد الدقيق لموضوع الحماية في أن اختراعات التقانة الحيوية تسيطر عليها قوانين الطبيعة أ.

أولاً: الشروط الموضوعية و الشكلية للحصول على براءة اختراع :

لا يمكن استصدار براءة إلا إذا كان الاختراع مطابقاً للشروط القانونية المنصوص عليها في الأمر 03/07 كانت موضوعية أو شكلية وعليه متى قام المخترع باحترام الشروط القانونية فإنه يتمتع بالحماية القانونية.

1 _ الشروط الموضوعية :

هي الشروط الواجب توافرها في موضوع البراءة المتمثل في الاختراع، وتمنح براءة الاختراع عن كل اختراع جديد ناتج عن نشاط اختراعي و قابل للاستغلال الصناعي، بما في ذلك الاختراعات المتعلقة بالتكنولوجيا الحيوية .

و قد حدد المنظم الجزائري ثلاثة شروط موضوعية لمنح براءة الاختراع منصوص عليها في المواد من 3 ، 4 و 5 من الأمر 03/07.

أ _ أن يكون الاختراع جديداً:

يشترط القانون أن يكون الاختراع المراد حمايته جديداً ، فالدولة كمبدأ عام لا تحمي المخترع إلا إذا قدم للمجتمع خدمة

من خلال الكشف عن مشروع جديد لم يسبق نشره واستعمالهⁱⁱⁱ.

يعد الاختراع جديدا إذا لم يكن داخلا (معروفا) في المجال الفني السائد، وتعني الحالة التقنية السائدة إطلاع الجمهور عليها بكل وسائل الاتصال، ويترتب على ذلك أن الجودة مرتبطة ارتباطا جديدا مع السرية إذ لا يكون الاختراع جديدا ما لم يكن معروفا من الجمهور قبل إيداعه، ويبدو أن التشريعات الحديثة تبنت هذا المعيار لتحديد الجودة في الاختراع وهذا كأصل عام، إلا أنه يمكن الاعتراف بالجدة على الرغم من نشر الاختراع وإطلاع الجمهور عليه وهذا كاستثناء وفي حالات محددة جاءت بالمادة 4 من الأمر 03/07.

وعند الحديث عن توفر شرط الجودة في اختراعات التكنولوجيا الحيوية، فإن هذا الشرط يتصف بخصوصية معينة تبدو عند تحديد الفن الصناعي السائد، فالجدة تعني في هذا الإطار السرية المطلقة كما أن الجودة مرتبطة هنا بالتقنية الصناعية السائدة^{iv}.
فاختراعات التكنولوجيا الحيوية تعتمد من حيث الأصل على أمور موجودة بشكل مسبق في الطبيعة كالكائنات الدقيقة فإن ذلك يؤدي إلى استبعادها كونها جزءا من الفن الصناعي السائد، لكن نلاحظ في اختراعات التكنولوجيا الحيوية أن للتدخل الإنساني دورا كبيرا، ذلك أنه يتم استخدام تقنيات الهندسة الوراثية للقيام بعمليات تهجين على مستوى الخلية و بالتالي فإننا نرى أن مثل هذه الأمور تخرجها من إطار المنتجات الطبيعية لتضعها في إطار المنتجات البشرية أي المنتجات التي لا يمكن للطبيعة إنتاجها من تلقاء نفسها لولا تدخل الإنسان فيها وتأثيره على نشاط الطبيعة^v.

ب _ عدم البديهية والخطوة الإبتكارية:

يفترض شرط الابتكار أن يكون الاختراع لشيء جديد لم يكن موجودا من قبل أو اكتشاف شيء كان موجودا ولكنه كان مجهولا وغير ملحوظ^{vi}.

فيشترط في الاختراع أن يتضمن فكرة أصيلة قد تستند إلى نظرية علمية، ولكن لا يشترط في هذه النظرية أن تكون جديدة أو غير معروفة، فالمهم الجانب العلمي في الابتكار، وهو تحقيق التقدم بالمعنى الواسع للكلمة، فقد يكون تقدما في مبدأ الفن الصناعي أو في تخطي عقبات أو صعوبات صناعية أو تحقيق فوائد اقتصادية، أو أن تمثل هذه الفكرة تقدما في الصناعة وأن تبلغ درجة التقدم شوطا معيناً يمثل فارقا ملموسا بين ما حققته الفكرة من نتائج تفوق وتعلو المستوى السابق للفن الصناعي أو تحقق تقدما في الفن الصناعي بالمقارنة على الحالة الفنية السابقة للصناعة في مجال الاختراع وبالمقارنة لما يقدمه التطور المألوف في الصناعة في نفس الوقت^{vii}.

إذا كان موضوع الاختراع في الطبيعة لا يمثل عقبة لتحقيق شرط الجودة فإن الأمر يختلف إذا تعلق الأمر بالخطوة الإبداعية التي تستند إلى عمل الباحث من أجل الوصول إلى هذا الاختراع، حيث يجب فحص موضوع الاختراع بدقة لتحديد الخطوة الإبداعية وتجنب المشكلة على سبيل المثال إذا تعلق الأمر بالكائنات الدقيقة المعدلة تلقائيا والتي تتضمن أيضا نشاطا مختلفا وجديدا دونما تدخل إنساني، ولكي يمكن القول بوجود الخطوة الإبداعية فلا بد أن يكون هناك نشاط إنساني يحد من النشاط الطبيعي أو يغير المجرى الطبيعي للأمر^{viii}.

و الابتكار في اختراعات التكنولوجيا الحيوية فإنه يتم تقييمه بعد التأكد من توافر شرط الجودة، فإن كان الاختراع جديدا في مجمله أو في بعض عناصره فإنه يتم فحص العنصر الجديد للتأكد من استيفائه لشرط النشاط الابتكاري، فإذا كان الاختراع منتجا جديدا مثل كائن دقيق أو طريقة غير بيولوجية أو بيولوجية دقيقة فإنه يتم تحديد إذا ما كان هذا المنتج أو الطريقة قد تم بتدخل الإنسان

وذلك لاستيفاء شرط الجودة ، ثم تحديد درجة التدخل الإنساني و ذلك للتحقق من توفر شرط النشاط الابتكاري .

ج _ قابلية الاختراع للتطبيق الصناعي

لا يمكن القول أن الاكتشافات الناجمة عن علم الأحياء والهندسة الوراثية اختراعات محمية عن طريق البراءة إلا في حالة قابليتها للتطبيق الصناعي ، وتستند شروط البراءة إلى العقد الضمني بين المخترع والمجتمع ، فالمخترع يطرح اختراعه ليستفيد منه المجتمع وفي المقابل يوفر له الحماية والاحتكار أو الاستثناء المؤقت لاستغلال هذا الاختراع وبمجرد الإفصاح عن الاختراع وتطبيقه الصناعي يدخل في حالة التقنية ومن هذا يعد شرط القابلية للتطبيق الصناعي عنصر أساسي لمنح الحماية^{ix}.

وحسب المادة 06 من الأمر 03/07 المتعلق ببراءات الاختراع "يعتبر الاختراع قابلاً للتطبيق الصناعي إذا كان موضوعه قابلاً للصنع أو الاستخدام في أي نوع من الصناعة".

يستنتج من هذا النص انه لا يهم ميدان إنجاز الاختراع، ففيزيائياً كان أو زراعياً وحتى نووياً، طالما كان الاختراع مشروعاً ومطابقاً للقيود القانونية، فالمهم أن يكون قابلاً للتطبيق الصناعي، وعلى ذلك وما عدا أنواع الاختراعات المستبعدة عن الحماية القانونية، يمكن أن تنجز الاختراعات في أي ميدان من ميادين الصناعة، لذا يجب أن تؤخذ عبارة "الصناعة" بمفهومها الواسع أي معنى "النشاط البشري" وهو ما جاء في المادة 1 الفقرة 2 من اتفاقية باريس فعبارة الصناعة يجب أن تؤخذ بأوسع معانيها أي النشاط البشري فلا تقتصر على الصناعة فحسب بل تمتد إلى الصناعات الزراعية والاستخراجية ، ولكي يتحقق شرط القابلية للتطبيق الصناعي يجب أن يكون الاختراع صناعياً في مضمونه وفي تطبيقه وفي نتيجته^x.

ويتسم شرط القابلية للتطبيق الصناعي بأهمية كبيرة لتحديد إمكانية حماية اختراعات التكنولوجيا الحيوية عن طريق البراءة ، ويجدر بنا الإشارة إلى أن شرط القابلية للتطبيق الصناعي لا يعني احتمالية الاختراع للتطبيق الصناعي أو عدمه وإنما يعني أن يكون الاختراع قابلاً للتطبيق الصناعي بشكل مؤكد وليس محتملاً ، وبالتالي فإنه إذا تم التلاعب بالصفات الوراثية لكائن دقيق وتم إنتاج كائن دقيق آخر بصفات مختلفة فإن هذا الكائن الجديد لا يمكنه أن يتمتع بالحماية وإن كان مستوفياً لشرط الجودة والابتكار ، إذا لم يكن له استخدام محدد و مؤكد في أي من مجالات الصناعة ، كأن يمتلك هذا الكائن الدقيق الجديد القدرة على إفراز أو صنع بعض الأحماض الأمينية أو المضادات الحيوية على نطاق واسع بحيث يمكن الاستفادة منها في صناعة الأدوية^{xi} .

د _ مشروعية الاختراع :

من شروط منح البراءة هو أن يكون موضوعها مشروعاً في نظر القانون، وقد تقع الشرعية بتحديد القانون لغير المشروع أو بحسب طبيعته حين يخالف النظام العام والآداب، ولذا فقد إستثنى المشرع من جواز منح براءة الاختراع الحالات الآتية والتي أشارت إليها المادة 08 من الأمر 03/07 "لا يمكن الحصول على براءات اختراع بموجب هذا الأمر بالنسبة لما يأتي:

- الأنواع النباتية أو الأجناس الحيوانية وكذلك الطرق البيولوجية المحضة للحصول على نباتات أو حيوانات.
- الاختراعات التي يكون تطبيقها على الإقليم الجزائري مخرلاً بالنظام العام والآداب العامة.
- الاختراعات التي يكون استغلالها على الإقليم الجزائري مضرًا بصحة وحياة الأشخاص والحيوانات أو مضرًا بحفظ النباتات أو يشكل خطرًا جسيمًا على حماية البيئة".

_ الاختراعات المتعلقة بالأصناف النباتية والأجناس الحيوانية:

لم يكن الابتكار في مجال النبات محللاً لأي حق في الماضي ، ولكن تغير هذا الموقف وتزايد الاهتمام بمنح حماية حقوق

الملكية الفكرية للإبداع والابتكار في مجال النبات خاصة بعد الدور الموسع للشركات الخاصة في الدول المتقدمة في البحث الزراعي ، وبشكل خاص أبحاث التكنولوجيا الحيوية^{xii} .

تعتبر الأصناف النباتية الجديدة احد أشكال الملكية الفكرية التي أكدت اتفاقيات الملكية الفكرية على ضرورة حمايتها وذلك على سند من القول بأن الإبداع في مجال الأصناف النباتية يمثل في حد ذاته إبداعا فكريا يكون بمقتضاه لمربي الصنف النباتي ملكية فكرية يجب حمايتها من الاعتداء عليها من جهة و تشجيع المربين على تقديم المزيد من الإبداعات من جهة أخرى^{xiii} .

إذا كانت التشريعات في القانون المقارن قد تلاققت في اعترافها بحماية حقوق الملكية الفكرية الواردة على الأصناف النباتية المبتكرة ، فإنها تباينت في النظام القانوني الذي يكفل هذه الحماية حيث أن الولايات المتحدة الأمريكية تحمي هذه الابتكارات عن طريق نظام براءة الاختراع أما الدول الأوروبية فأخذت موقفا مخالفا ، حيث أن قوانينها الداخلية تحظر تطبيق براءة الاختراع على النبات وهذا ما أدى إلى ميلاد اتفاقية يوبوف^{xiv} .

بالرجوع إلى اتفاقية تريبس^{xv} نجد أنها أقرت من خلال المادة 27/3 بهذين النظامين ، حيث أكدت على ضرورة حماية النباتات تاركة الخيار للدول في انتهاج النظام القانوني الذي تراه مناسباً .

وفي هذا السياق انتهج المشرع الجزائري طبقاً للقانون 05/03 المؤرخ في 6/2/2005 المتعلق بالبذور والشتائل وحماية الحياة النباتية النظام الذي جاءت به اتفاقية يوبوف^{xvi} .

ـ الاختراعات التي يكون تطبيقها على الإقليم الجزائري مخلاً بالنظام العام أو الآداب العامة:

يشترط القانون في الاختراع كي يكون موضوعاً لبراءة اختراع ألا ينشأ عن استغلاله إخلال بالآداب أو النظام العام^{xvii} . فالمشرع يشترط لمنح البراءة أن يكون موضوع استغلال الاختراع مشروعاً ولا يؤدي إلى الإضرار بالصالح العام للدولة سواء من الناحية الصحية أو الاجتماعية أو الاقتصادية^{xviii} .

وبهذه المناسبة يثور التساؤل بالنسبة للابتكارات التي يترتب عن إستغلالها استعمالاً مزدوجاً، كما إذا ترتب عنها مزايا كبيرة في المجال الصناعي، وفي ذات الوقت يمكن استعمال تلك الاختراعات في أوجه تضر الصالح العام.

فالحل بالنسبة لهذه الاختراعات أنه يجوز للدولة أن تمنح البراءة لصاحب الاختراع، بشرط أن يتعهد بعدم استخدامه في الأوجه المخالفة للنظام العام، وإلا ألغيت البراءة، فإذا اخترع مثلاً أحد الأشخاص مادة تصلح للاستعمال في الصناعات الحربية، فإنها تعتبر ذات نفع كبير لخدمة أمن الدولة وحمايتها، إلا أنه من جهة أخرى يكون استعمالها ضاراً إذا ما استعملت في غير الغرض الأول، أو دون إشراف الدولة^{xix} .

والجزء الذي قرره القانون بصدد منح براءة اختراع يترتب على استغلالها إخلال بالآداب أو النظام العام هو بطلان البراءة، إذا كانت قد منحت، كما أن للإدارة أن ترفض منح براءة اختراع يخالف استغلالها الآداب، وإذا تعددت أوجه استغلال الاختراع فللإدارة أن تمنح المخترع براءة اختراع، فإذا استعملها فعلاً في إنتاج صناعي يخالف الآداب أو النظام العام كانت البراءة باطلة، فبراءة الاختراع من هذا القبيل والتي تعتبر باطلة هي البراءة التي ينشأ حتماً عن استغلالها إخلال بالآداب، فلا تمنح عنها براءة أصلاً، أما الاختراعات التي تتعدد أوجه استغلالها أو التي يترتب على استغلالها إخلال بالنظام العام مثل الصناعات الحربية التي تحتكر الدولة إنتاجها، فيجوز منح براءة اختراع عنها، وتقع براءة الاختراع باطلة إذا ترتب فعلاً على استغلالها إخلال بالآداب أو بالنظام العام^{xx} .

ـ الاختراعات التي يكون استغلالها على الإقليم الجزائري مضرًا بصحة وحياة الأشخاص والحيوانات أو مضرًا بحفظ النباتات أو

يشكل خطرا جسيما على حماية البيئة:

يتضح من النص المشار إليه هو توسع المشرع في مفهوم النظام العام وحسن الآداب، حيث ظهرت في الأزمنة القريبة موضوعات لها علاقة وثيقة بالنظام العام مثل مجالات البيئة، وبذلك يستبعد من الحماية القانونية أي اختراع له مساس بطريق مباشر أو غير مباشر بالأمن القومي، أو النظام العام والآداب العامة، كذلك الاختراعات التي تؤثر سلبا على البيئة أو أي من حياة أو صحة الإنسان أو الحيوان أو النبات^{xxi}.

مثل ذلك الاختراعات المتعلقة بأجزاء أو مكونات من جسم الإنسان كالخلايا والدم والبروتين البشري والهرمونات والجينات وكذلك الاختراعات المتعلقة بعمليات الاستنساخ.

فاستبعد التنظيم الجزائري صراحة هذه الاختراعات من القابلية للحصول على البراءة استنادا إلى حماية النظام العام، وعليه نصل إلى نتيجة أن منح براءة اختراع عن الكائنات الحية التي تستخدم في مجال التكنولوجيا الحيوية لمنفعة الإنسان من الأمور المسلّم بها شريطة أن تتوفر فيها الشروط المفروضة قانونا لمنح براءة الاختراع.

2 _ الشروط الشكلية

إن اتفاقية تريس قد تركت الحرية الكاملة لكل تشريع داخلي ليقرر ما يشاء بالنسبة لهذا الموضوع ، حيث تنص في مادتها الأولى و في الجزء الأول تحت عنوان نصوص عامة و المبادئ الأساسية " أن الأعضاء تلتزم بتنفيذ هذه الاتفاقية ، على أنه يجوز لهم ودون التزام على عاتقهم أن تقدم حماية أوسع من الحماية الممنوحة من قبل هذه الاتفاقية ، شريطة أن تكون الحماية الممنوحة غير مخالفة لنصوص و أحكام هذه الاتفاقية ، كما أن للأعضاء الحرية الكاملة في تحديد الطريقة الملائمة التي تراها مناسبة لتنفيذ هذه الاتفاقية وفقا لأنظمتها وتشريعاتها الداخلية وممارستها القانونية"^{xxii}.

إن طلب براءة الاختراع هو شرح كامل لتفاصيل الاختراع الذي توصل إليه المخترع بشكل مفهوم ، يستطيع رجل المهنة المختص في مجال الاختراع تنفيذ الاختراع بشكل واضح ، ويتم إيداع طلب براءة الاختراع للجهة المسؤولة والمختصة بمنح براءات الاختراع التي تتولى بدورها تسجيله ونشره بسجل براءات الاختراع^{xxiii}

لقد أخذ المشرع الجزائري بنظام التسليم التلقائي و هذا ما يتضح من نص المادة 31 من الأمر 03/07 " تصدر براءة الاختراع ذات الطلبات المستوفية الشروط دون فحص مسبق وتحت مسؤولية الطالبين و من غير أي ضمان ، سواء تعلق الأمر بواقع الاختراع أو جدته أو جدارته أو تعلق الأمر بوفاء الوصف وبدقته ، و تسلم المصلحة المختصة للطالب شهادة تثبت صحة الطلب وتمثل براءة الاختراع " ، حيث تتولى الإدارة في هذا النظام الاطلاع على الملف المودع من قبل طالب الحماية ، والذي يحتوي على الشروط الشكلية فقط ، والمتمثلة أساسا في ملء استمارة الطلب ، إيداع الوصف و المطالب دون إجراء الفحص التقني أي فحص محتواها للتأكد من توفر الشروط الموضوعية في الاختراع ، خاصة الجودة ، حيث تقوم الإدارة بالاطلاع على الاختراعات التي سبق وأن صدرت بشأنها البراءات للتأكد من أن هذا الاختراع قد سبق حمايته أم لا، فهي بذلك لا تضمن صحة البراءة بل تصدرها تحت مسؤولية صاحبها وهذا ما أكدته المادة 21 من الأمر 03/07^{xxiv}.

ويجب التنويه بالنسبة لاختراعات التكنولوجيا الحيوية انه يجب إيداع المادة الحية وهو الأمر الذي لم يتحقق وهذا لعدم تطور هذا النوع من التكنولوجيا في بلدنا ، أما فيما يخص الأصناف النباتية الجديدة أو الحيازة النباتية فإن المادة 29 تنص " يتعين على الطالب أن يقدم كل معلومة أو وثيقة أو مادة نباتية تطلبها السلطة الوطنية للفحص ... " ، وكذلك ما جاء في المادة 43/2 " ...

وبهذه الصفة يتعين عليه أن يقدم بناء على طلب السلطة الوطنية التقنية النباتية كل المعلومات أو وثيقة و / أو مادة نباتية تراها ضرورية لمراقبة الإبقاء على الصنف " وعليه يتضح أن الإيداع للمادة الحية يكون في حالة عدم كفاية الوصف كما يكون تقديم هذه العينة بناء على طلب الجهة المختصة ، وهي السلطة الوطنية التقنية النباتية^{xxv}.

ثانياً أهمية إبراء التكنولوجيا الحيوية :

مع بداية القرن العشرين المنصرم ، حدث تطور مذهل في علم الوراثة والأحياء الدقيقة ، وخصوصاً بعد اكتشاف (واطسون) و (كريك) بنية مادة الوراثة عام 1953 و بالتالي عرفت كيفية انتقال الصفات الوراثية عبر الأجيال ، وقد أدى ذلك إلى انتشار منتجات التقانة الحيوية ووسائلها في مجالات الحياة كافة ، ودخلت تطبيقاتها في حقول الصناعة والزراعة والطب والصيدلة و الطاقة والتعدين و البيئة^{xxvi}.

لذلك أصبح للتكنولوجيا الحيوية أهمية كبيرة في جميع مجالات الحياة المرتبطة مباشرة بالإنسان مما أدى بضرورة إبرائها وهذا للأسباب التالية :

1 _ تشجيع روح الابداع والاختراع :

تعتبر معظم الابتكارات ثمرة جهد ثمين وطويل للباحثين لم تكن لتظهر على أرض الواقع لولا ضمان تعويض ملائم لمن ساهم في هذه الابتكارات وذلك بتقرير حق استثنائي لهم على هذه الابتكارات تخولهم استغلالها والتصرف فيها^{xxvii}.

2 _ حماية المخترع :

إن حماية المبتكر ضرورة قانونية تقتضيها الأمانة ، إذ أنه حق كسائر الحقوق يتطلب تدخل المشرع لسن تشريعات لتجسيده ومنع التعدي عليه ، وهذا ما هو مجسد في الوقت الراهن ، فقد أدت الثورة الصناعية وما صاحبها من تقدم علمي وتكنولوجي هائل على اعتبار الابتكار مطلباً ملحا في كل جانب من جوانب هذه الثورة ، مما استوجب معه حماية مصلحة المبتكر في التمتع بحقه على ابتكاره باعتبار أنه قد قدم للمجتمع شيئاً جديداً من شأنه تطوير الصناعة وإفادة المجتمع^{xxviii}.

إلى جانب هذه الظروف الاقتصادية نشير إلى عامل آخر مهم في تقرير الحماية للمخترعين ألا هو التقليد الذي أصبح في وقتنا الحالي يمارس من قبل مؤسسات صناعية متخصصة في هذا المجال ، فلاشك أن التقليد يشكل خطراً جسيماً على الصناعة بترويج منتجات مقلدة تشبه المنتجات الأصلية^{xxix}.

3 _ الحفاظ على الملكية الفكرية ومحاربة القرصنة الفكرية الوراثية :

هناك محاولات سرقة وسطو على الأصول الوراثية للنباتات والحيوانات من قبل الشركات العالمية التي تسعى لاحتكار هذه الأصول والاستفادة من حقوق الملكية الفكرية ، إذن لا بد من إنشاء بنوك أصول وراثية في كل دولة حتى يتم منع محاولات السطو والتهرب لأصولها الوراثية وحتى يمكن جمع وتوثيق وتقييم الأصول في ك دولة لأنه لا يمكن معرفة الأصول التي يملكها إلا من خلال مثل هذه البنوك التي تقوم بهذه المهمة إلى جانب إمكانية تبادل الموارد والأصول الوراثية بين الدول وفقاً للاتفاقيات الدولية في هذا المجال والتي تضمن لكل دولة حقها في الاستفادة من أصولها الوراثية^{xxx}.

4 _ براءة الاختراع أداة لنقل التكنولوجيا :

إن الاستغلال الحكيم والعقلاني لبراءات الاختراع يؤدي إلى أحداث ثورة علمية تكنولوجية ، فمن المتفق عليه في الوقت الراهن أن براءات الاختراع تعتبر أداة مباشرة لنقل التكنولوجيا^{xxxi}.

5 _ معالجة الفضلات :

تلعب التقنية الحيوية دورا هاما في معالجة الفضلات ، مثل معالجة مياه الصرف الصحي والتخلص من الفضلات الصناعية والزراعية لاستهلاكها في إنتاج الطاقة أو تحويلها إلى مركبات قابلة للتخمر بواسطة الكائنات الحية الدقيقة ثم إلى بروتينات مفيدة^{xxxii}.

6 _ القضاء على الفقر :

يهدف نظام براءات الاختراع إلى تحقيق أهداف التنمية الشاملة المتمثلة في استغلال الدولة لمواردها وثرواتها الطبيعية ، تطوير النشاط الاقتصادي في مختلف مجالاته ، زيادة الإنتاج وخفض تكلفته ن تراكم رؤوس الأموال والحصول على العملة الصعبة وكل هذه الآثار من شأنها أن تعود بالنفع على مستوى معيشة الأفراد داخل الدولة^{xxxiii} .
يمكن للتكنولوجيا الحيوية أن توفر حولا فعالة في مساعي القضاء على الفقر المدقع و الجوع عن طريق تحسين غلة المحاصيل بالإضافة إلى تخفيض معدل وفيات الأطفال وتحسين الصحة النفاسية عن طريق رفع القيمة التغذوية للأغذية .

7 _ درجة أمان التكنولوجيا الحيوية :

التكنولوجيا الحيوية شأنها شأن أي علم آخر تتوقف درجة أمانها على طبيعة الاستخدام ، فكما يمكن استخدامها بشكل مفيد وآمن من نواحي عديدة تفيد البشرية وفي تطورات طبية وصناعية هائلة ، كذلك يمكن استخدامها في النواحي العسكرية^{xxxiv} .
فالدول النامية مطالبة بتوفير المناخ الملائم للاستثمار عن طريق رسم سياسة تشريعية تهدف إلى إزالة كل العراقيل أمام عمليات الاستثمار وذلك بتوفير الحوافز والتسهيلات للمستثمرين^{xxxv} .

8 _ براءات الاختراع والاستثمارات الأجنبية :

ان من بين الحوافز والتسهيلات التي يجب على الدولة المضيفة توفرها لجلب الاستثمارات الاجنبية وضع حماية جديده وفعالة للمخترعين إذ أن التقليل من المزايا التي توفرها براءة الاختراع لصاحبها بتقييد شروط الحماية وخاصة احتكار الاستغلال قد يؤدي إلى حرمان الدولة من مشروعات استثمارية هامة من شأنها أن تسهم في أغراض التنمية لديها^{xxxvi} .

المحور الثاني :

حقوق صاحب براءة الاختراع

تخول براءة الاختراع صاحبها حقا مؤقتا في احتكار استغلال الاختراع، وحق التصرف في البراءة بالتنازل عنها أو الترخيص باستغلالها وفي مقابل ذلك يلتزم صاحب البراءة باستغلال الاختراع ودفع الرسوم السنوية^{xxxvii} .
والاستغلال ليس حقا لصاحب البراءة فحسب، وإنما هو واجب عليه أيضا، بحيث إذا أهمل أو تراخى في شأنه، جاز إجباره على الترخيص للغير بالقيام بالاستغلال^{xxxviii} .

أولا :حقوق صاحب براءة الاختراع

1 _ الترخيص باستغلال البراءة

عقد الترخيص الاختياري من العقود الشائع استعمالها لاستغلال براءات الاختراع نظرا لفائدته للمخترع الذي قد لا تتوافر لديه الإمكانيات اللازمة لاستغلال الاختراع شخصيا مدة معينة ويرغب في أن يعود إليه احتكار الاستغلال^{xxxix} .

الترخيص الاختياري هو العقد الذي بمقتضاه يخول مالك البراءة شخص آخر استغلال الاختراع في مدة معينة لقاء أجر معلوم ، ويعتبر عقد الترخيص الاختياري في الواقع من العقود الرضائية التي تتم بمجرد توافق الإرادتين^{xi}.

فالمقصود باستغلال الاختراع هو الإفادة منه ماليا بالطرق والوسائل التي يختارها صاحب البراءة ويراها صالحة للاستغلال وبجميع الطرق الملائمة^{xii}، ويكون الترخيص إما لشخص واحد أو عدة أشخاص ، كما قد يكون كلياً أو جزئياً ، كما أن منح رخصة لا ينفي إمكانية منح نفس الترخيص إلى شخص آخر أو يقوم صاحب البراءة نفسه باستغلال اختراعه أو بواسطة شخص آخر .

2_ التنازل عن البراءة:

لقد نصت المادة 11 من الأمر 03/07 فقرة أخيرة "لصاحب البراءة الحق كذلك في التنازل عنها أو تحويلها عن طريق الإرث وإبرام عقود تراخيص".

فيفهم من نص المادة أنه يجوز بيع الحقوق المحتملة إذا كانت محققة وعلى هذا فجميع الحقوق المترتبة على منح البراءة يتم تحويلها إلى المتنازل له، كاستغلالها اقتصادياً أو التصرف بها بجميع التصرفات القانونية أو مقاضاة المعتدي عليها كما لو كان صاحبها الأصلي.

وقد يكون التنازل عن البراءة جزئياً بموجب اتفاق بينهما يحدد الجزء الذي تنازل صاحب البراءة عنه، ويختلف هذا التنازل باختلاف الاتفاق.

كالتنازل عن بعض الحقوق المترتبة عليها مثل التنازل عن حق الإنتاج فقط، أو التنازل عن حق البيع فقط، أو التنازل عن حق الاستغلال مدة معينة تعود البراءة بعدها إلى المتنازل.

وقد يتحدد التنازل في إقليم معين، وهذا التنازل الممنوح في إقليم محدد هو الحالة الأكثر شيوعاً، بحيث لا يجوز للمتنازل إليه استغلالها أو منح ترخيص باستغلالها للغير أو أي تصرف آخر خارج حدود هذا الإقليم، فإذا تعدى الإقليم إلى إقليم آخر ليس له حق فيه فإنه يعد مقصراً بعدم تنفيذ التزاماته العقدية وبالحكم عليه بالتعويض عن الأضرار الحاصلة بسبب ذلك كما يسأل عن جريمة التقليد أيضاً لأنه في أي إقليم لا يرد في عقد التنازل لا يكون فيه للمتنازل إليه حق التصنيع، ولا حق البيع، وإذا ما حصل بيع لمنتجاته خارج إقليمه فإنه يستطيع التمسك هنا بأن الاستغلال قد حصل عن طريق آخر وبمعزل عن إرادة صاحب البراءة ودخلت تلك الأقاليم بطريقة الاحتيال^{xiii} .

ويترتب على التنازل عن براءة الاختراع، ذات الآثار التي تترتب على أي عقد تنازل آخر، فتسري القواعد العامة والأحكام المترتبة عليها، فينتقل الحق في البراءة إلى المتنازل إليه ويمتنع البائع عن المنافسة غير المشروعة للمشتري الذي تنتقل إليه حقوق البائع في التصرف والاستغلال.

ويشمل التنازل عن البراءة الحقوق المادية دون المعنوية، فلا يجوز للمشتري أن ينسب الاختراع إليه، فإذا فعل ذلك جاز للمخترع مقاضاته والحصول على تعويض مادي وأدبي عن الضرر الذي أصاب سمعته لأن التعويض يشمل الضرر الأدبي وهو حق السمعة الذي لا يجوز التنازل عنه.

3_ رهن البراءة:

يعد رهن براءة الاختراع من آثار حق التصرف في الاختراع، متى ثبت للمخترع حقه في الحصول على براءة الاختراع حسب الأصول، والإجراءات القانونية، أصبح للمخترع إمكانية الاستعمال، والاستغلال والتصرف في براءة اختراعه على الوجه الذي يراه مناسباً في

إطار أحكام التشريع المعمول به، وفي هذا الشأن يجوز رهن البراءة لضمان دين على صاحبها، فتطبق والحالة هذه أحكام القانون التجاري، والقانون المدني على عملية رهن البراءة، إذ لا يتم التعاقد بمجرد توافق الإرادتين، حتى يكون صحيحا ويحتج بالرهن في مواجهة الغير بل يجب أن يكون مكتوبا، ومؤشرا عليه في سجل براءات الاختراع، وإلا كان التعاقد باطلا لأنه تصرف من العقود الشكلية^{xliii}.

ويجب إثبات رهن البراءة كتابيا وتسجيلها في سجل البراءات طبقا للمادة 36/2 من الأمر 03/07 والتي تقضي "تتطلب الكتابة في العقود المتضمنة انتقال الملكية أو التنازل عن حق الاستغلال أو توقف هذا الحق أو رهن أو رفع الرهن المتعلق بطلب براءة الاختراع أو ببراءة الاختراع وفقا للقانون الذي ينظم هذا العقد ويجب أن تقيّد في سجل البراءات، لا تكون العقود المذكورة في الفقرة أعلاه، نافذة في مواجهة الغير إلا بعد تسجيلها".

ولما كانت البراءة من المنقولات وجب إتباع أحكام رهن المنقول ومن ثم يشترط لنهاذ رهن البراءة في حق الغير أن تسلّم البراءة إلى الدائن المرتهن، وإن يدون العقد في ورقة ثابتة التاريخ يبين فيها المبلغ المضمون بالرهن والبراءة المرهونة بيانا كافيا^{xliiv} ينتهي رهن براءة الاختراع بانتهاء مدة البراءة، إذا كانت مدة الرهن أطول من مدة البراءة، كما ينتهي أيضا بتسديد الدين أو التنازل عنه أو الإبراء، أو تقادم الدين، كما يمكن التنفيذ على البراءة ببيعها أو استيفاء الدين من الثمن بالأولوية على الدائنين العاديين والدائنين المرتهنين الأدنى مرتبة من الدائن الذي نفذ عليها.

4 تقديم البراءة كإسهام في الشركة:

بناء على القواعد العامة للشركات، يجوز تقديم براءة الاختراع للمساهمة في شركة إما بصفة منفردة أو أثناء تقديم محل تجاري باعتبارها عنصر من عناصره المعنوية، لكنه يجب في الحالتين احترام الأحكام الخاصة بإجراءات النشر السالف ذكرها. ويجوز تقديم البراءة إما على سبيل الملكية وإما على سبيل الانتفاع، فإذا قدمت البراءة على سبيل الملكية، تنتج هذه العملية نفس الآثار التي تنتجها عملية التنازل عن البراءة باستثناء التزام بدفع الثمن إذ يحصل المعني بالأمر على حصص أو أسهم في رأسمال الشركة مقابل تقديم البراءة، ومن ثم تنتقل ملكية البراءة من المقدم إلى الشركة الأمر الذي على أساسه يرجع الحق في رفع دعوى التقليد إلى الشركة ونظرا لتطبيق أحكام عقد البيع، فإن الشريك المقدم يفقد كافة الحقوق التي كان يملكها على المال المقدم لصالح الشركة، لهذا تطبق الأحكام المتعلقة بالبيع لضمان الأخطار التي يتحملها المشتري حين انتقال الملكية تصبح على عاتق الشركة نفسها، وفي حالة انحلال الشركة تقسم أموال الشركة بين جميع الشركاء دون أن يتمسك الشريك المقدم بحق الشفعة لصالحه، فهو دائن بمبلغ يساوي قيمة المال المقدم ولا يجوز له طلب الوفاء إلا بعد أن تسدد ديون دائني الشركة.

أما إذا قدمت البراءة على سبيل الانتفاع لا يقدم الشريك إلى الشركة إلا حق استعمال البراءة وقبض ثمارها، إذ تسري عليها أحكام عقد الإيجار، ويترتب على ذلك أن ملكية البراءة لا تنتقل إلى الشركة وأن الأخطار يتحملها المقدم، تبعا لهذا تبقى دعوى التقليد من صلاحيات صاحب البراءة ويرجع الحق في استغلال البراءة إلى الشركة، الأمر الذي يسمح بالقول أن هذه العملية تشبه عملية الترخيص^{xlv}.

ثانيا : التزامات صاحب براءة الاختراع:

في مقابل الحقوق التي تخولها البراءة لمالكها من استئثار لاستغلالها والتنازل عنها وإعطاءه ترخيصا للغير باستغلالها، فهناك التزامات تقع على عاتق مستغل هذه البراءة سواء كانت شخص طبيعى أو معنوي وهذا نظرا للوظيفة الاجتماعية التي تؤديها ملكية

براءة الاختراع.

1 الالتزام بدفع الرسوم السنوية

تقضي المادة 09 من الأمر 03/07 "مدة البراءة هي عشرون (20) سنة ابتداء من تاريخ إيداع الطلب مع مراعاة دفع رسوم التسجيل ورسوم الإبقاء على سريان المفعول وفقا للتشريع المعمول به".

يتضح من خلال المادة 09 أن المشرع أقر نوعين من الرسوم أو الحقوق التي يجب دفعها وهي:

1- رسوم تدفع عند التسجيل.

2- رسوم الاحتفاظ بصلاحيات البراءة أو ما يطلق عليه بالرسم السنوي.

لقد فرض المشرع على صاحب البراءة رسما ماليا محددًا يجب عليه أداءه عند إيداع طلب الحصول على براءة اختراعه وأيضا عند طلب تجديدها وجدير بالإشارة أن هذه الرسوم لا ترد إلى دافعها فيما لو رفض طلبه لأي سبب من الأسباب.

فإذا منحت البراءة يلتزم صاحبها بدفع رسم يستحق سنويا طوال مدة البراءة ولحين انتهائها.

إن إرادة المشرع كانت ربط استمرار البراءة بدفع الرسوم التنظيمية، حيث نص على هذا الالتزام في المادة التي تحدد مدة الحماية القانونية ولذا قرر أن ملكية البراءة تسقط في حالة امتناع صاحبها عن دفع الرسوم التنظيمية السنوية في المهلة المحددة قانونا، غير أن لصاحب البراءة مهلة ستة (06) أشهر ابتداء من تاريخ مرور سنة على الإيداع لدفعها، أي يستفيد من مهلة إضافية للقيام بدفع الرسوم، لكنه ملزم بدفع رسم إضافي عن التأخير^{xlvi}.

2 التزام مالك البراءة باستغلال الاختراع

يعتبر منح المخترع حق استغلال براءة الاختراع بمثابة عقد اجتماعي يقابله أن يلتزم المخترع باستغلال براءته لإفادة المجتمع^{xlvii}.

وهذا الالتزام يعني أن الحماية تمنح لأهداف نفعية تخص الجماعة بأسرها ، وتتمثل هذه الأهداف في تشجيع المخترعين على إنشاء الصناعات الجديدة وتقديم منتجاتها للمستهلكين^{xlviii}.

إن العبرة في واجب استغلال الاختراع تشجيع الجهود العلمية لتحقيق التقدم الصناعي ويظهر حق احتكار استغلال الاختراع كالحافز اللازم للتقدم الصناعي، لذا ينبغي ألا يعرقل هذا التطور، فإذا لم يستغل فعلا فقدت الحماية سببها، لذلك تقضي أغلبية التشريعات على حق بوجوب استغلال الاختراع خلال فترة معينة وإلا تعرض صاحبه للترخيص الإجباري.

والجدير بالذكر أنه لا يمكن للدول التي صادقت على اتفاقية اتحاد باريس للجوء إلى إسقاط البراءة كجزاء أشد قبل انتهاء مهلة سنتين من تاريخ منح الترخيص الإجباري الأول لأنه لا يجوز النص على سقوط البراءة إلا إذا كان منح الترخيص الإجباري غير كاف لتدارك التعسف الناتج من مباشرة الحق الإستثنائي الممنوح لصاحب البراءة، وعلى كل لا جدوى في منح براءة للمخترع قصد حماية اختراعه إذا لم يقم باستغلاله^{xlix}.

الخاتمة :

إن التكنولوجيا الحيوية هي تطبيق المعلومات المتعلقة بالمنظومات الحية بهدف استعمال هذه المنظومات او مكوناتها في الأغراض الصناعية ، أي أنها تكنولوجيا قائمة على علم الأحياء خصوصا عند استخدامها في الزراعة وعلم الغذاء و الطب ، فهي تتعامل مع الكائنات الحية على مستوى الخلية وتحت الخلية من أجل تحقيق أقصى استفادة منها صناعيا وزراعيًا واقتصاديًا وذلك

عن طريق تحسين خواصها وصفاتها الوراثية لأجل الاستفادة منها .

إن اختراعات التكنولوجيا الحيوية هي نتيجة عمل ذهني لعلماء متخصصين في الكائنات الدقيقة ، وهناك صور متعددة لهذه الاختراعات فهي تشمل طرق الزراعة وطرق الإنتاج وطرق حفظ الكائنات واستعمالها في الصناعة و الزراعة والدواء كما تشمل التكنولوجيا الحيوية استعمال الفضلات التي تنتج خلال عملية بناء الخلايا بالإضافة إلى الكائنات الدقيقة ذاتها، لذلك فهي تحتاج إلى تنظيم تشريعي خاص بما لها من طبيعة خاصة والتي تتمثل في استخدام الكائنات الحية ، وبما أن التكنولوجيا الحيوية هي نتاج استخدام الكائنات الحية للوصول إلى منتجات جديدة فإن أبرز صور حمايتها هو براءة الاختراع .

فالاختراعات الناتجة عن التكنولوجيا الحيوية شأنها شأن أي اختراع لابد أن تتوفر على شروط الحماية ، ومتى تم ذلك فإنها ترتب حقوق والتزامات على عاتق المخترع صاحب البراءة .

إن اختراعات التكنولوجيا الحيوية تتصف بخصوصية كبيرة ذلك ان اختراعات التقانة الحيوية تسيطر عليها قوانين الطبيعة نظرا لكون محلها مادة حية وليست جامدة وايا كان الامر فلا بد من توافر شروط الحماية لمنح البراءة لهذه الاختراعات الحيوية.

فعدم وضع المشرع الجزائري لاحكام خاصة لهذا النوع من الاختراعات وكيفية تطبيق الشروط الموضوعية للاختراع عليها جعل الامر صعب للمخترعين في هذا المجال كما يحرم مجموعة كبيرة من العلماء و الباحثين في مجال التقنية الحيوية من الحصول على براءة إلا فيما تعلق بالاختراعات المتعلقة بالكائنات الدقيقة فهي محمية بموجب الأمر 03/07 المتعلق ببراءات الاختراع.

اما إذا تعلق الأمر باختراع صنف نبات جديد أو تعديل بعض خصائص النبات فعليه اللجوء إلى قانون 05/03 المتعلق بالبذور و الشتائل و حماية الحيازة النباتية، كون المشرع من خلال الأمر 03/07 كان واضحا بحرمان الأصناف النباتية و الحيوانية من الحماية القانونية كاختراعات.

إن القوانين التي وضعها المشرع الجزائري لحماية حقوق الملكية الفكرية أصبحت غير كافية لمنح حماية للاختراعات التي نشأت عن التطور التكنولوجي خاصة التكنولوجيا الحيوية، حيث أصبحت غير قادرة على مواكبة التطورات المذهلة التي طالت جميع ميادين الحياة ، لذلك أصبح لزاما إجراء تحديث لجميع قوانين الملكية الفكرية في الجزائر و هذا حتى يتمكن المخترع مهما كان مجال بحثه ان يستظل بحماية قانونية فعالة

و عليه يمكن التوصل إلى مجموعة من التوصيات تتمثل في :

_ تحديث قوانين الملكية الفكرية بخاصة قانون براءات الاختراع.

_ تقديم تحفيزات للمخترعين في مجال التكنولوجيا الحيوية لما لها من أهمية في حياة الانسان.

_ توفير الامكانيات اللازمة للمخترعين لأجل تحقيق أهدافهم الانسانية .

_ وضع هيئات متخصصة و ذات خبرة تتعاون مع إدارة المعهد الوطني الجزائري للملكية الصناعية و ذلك لفحص الاختراعات المتعلقة بالتكنولوجيا الحيوية.

_ تحفيز الأنشطة الابتكارية و تشجيعها بهدف تعزيز حقوق الملكية الفكرية .

_ إقامة مؤتمرات للعلماء البيولوجيين و هذا لتوفير لهم فضاءات من اجل التعريف ببحوثهم و اختراعاتهم وفتح آفاق جديدة

للبحث.

The patentability of biotechnology inventions

Benayad Djalila

Faculty of Law and Political Science, University of Mhamed Bougherra ,Boumerdes , Algeria

ania-rose14@hotmail.fr

Summary :

Biotechnology is a feature of contemporary life as it is the fourth scientific revolution of the twentieth century after the revolution of the destruction of the atom, space and computer and that its applications are not limited to a specific area but used in all areas of life.

Biotechnology is an application of information about living systems with a view to using these systems or their components for industrial purposes, they are biology –based technology especially when used in agriculture, food science and medicine.

Agricultural and economical by improving their genetic characteristics.

With the use of biotechnology, new drugs, modified plants, organic and natural substances, and development in marine organisms have emerged . from this invention, this is why we highlight in this paper the specificity of biotechnology inventions as they meet the objective requirement of patenting.

- i _ محمد احمد عبد العال محمود ، الحماية القانونية للكائنات الدقيقة في القانون المصري وفي القانون الفرنسي والاتفاقيات الدولية وفقا لآليات الملكية الفكرية ، اطروحة دكتوراه ، عين شمس مصر 2012 ، ص 280.
- ii _ الأمر 07/03 المؤرخ في 19 يونيو 2003 المتعلق ببراءات الاختراع ، ج ر عدد 44.
- iii _ فرحة زراوي صالح ، الكامل في القانون التجاري (الحقوق الفكرية) ، ابن خلدون ، وهران ، 2006 ، ص 58.
- iv _ بن عياد جليلة ، اختراعات التكنولوجيا الحيوية ، مداخلة القيت بأشغال الندوة الوطنية " دور التكنولوجيا الحيوية و الابداعات الدوائية في التنمية الاقتصادية بتاريخ 7 أكتوبر 2019 ، جامعة الجزائر 1 ، ص 3.
- v _ ماجد وليد ابو صالح ، رمزي أحمد ماضي ، خصوصية الشروط الموضوعية لمنح البراءة لاختراعات التكنولوجيا الحيوية " دراسة قانونية مقارنة " مجلة دراسات علوم الشريعة و اقانون ، المجلد 43 ، ملحق 2 السنة 2016 ، ص 980.
- vi _ عبد الله حسين الخشروم ، الوجيز في حقوق الملكية الصناعية و التجارية ، دار وائل للنشر ، الطبعة الأولى ، 2005 ص 76
- vii _ بن عياد جليلة ، اختراعات العمال في إطار علاقة العمل ، أطروحة دكتوراه ، جامعة الجزائر 1 ، 2013 ، ص 76
- viii _ محياوي فاطمة ، حماية المنتجات المعدلة وراثيا ، رسالة ماجستير ، جامعة الجزائر 1 ، 2014 ، ص 95 .
- ix _ محمد أحمد عبد العال محمود ، مرجع سابق ، ص 335.
- x _ اتفاقية باريس هي اتفاقية ابرمت في 20 مارس 1883 و المعدلة عدة مرات .
- xi _ ماجد وليد أبو صالح ، رمزي أحمد ماضي ، نفس المرجع ص 981.
- xii _ عمارة ضحى مصطفى ، حقوق الملكية الفكرية وحماية الأصناف النباتية الجديدة ، أطروحة دكتوراه جامعة المنوفية ، مصر 2010 ، 2011 ، ص 11.
- xiii _ دوار جميلة ، الحيازة النباتية وحقوق الملكية الفكرية في التشريع الجزائري ، مجلة البحوث العلمية في التشريعات البيئية ، العدد السابع ، 2016 ، ص 67
- xiv _ تعتبر اتفاقية يوتوف اتفاقية دولية لحماية الأصناف النباتية ظهرت في 2 ديسمبر 1961 بباريس عرفت هذه الاتفاقية باتفاقية يوتوف ، لحقت هذه الاتفاقية عدة تعديلات كان آخرها في 19 مارس 1991.
- xv _ الاتفاقية حول الجوانب التجارية لحقوق الملكية الفكرية او اتفاق تريبس هي اتفاق دولي تديره منظمة التجارة العالمية الذي يحدد المعايير الدنيا للقوانين المتعلقة بالعديد من اشكال الملكية الفكرية
- xvi _ مزيان أبو بكر الصديق ، حقوق الملكية الفكرية على الأصناف النباتية المبتكرة في التشريع الجزائري ، مجلة الدراسات القانونية المقارنة ، المجلد 5 العدد 1 ، سنة 2019 ، ص 61 .
- xvii _ محمد حسني عباس ، التشريع الصناعي ، دار النهضة العربية ، القاهرة ، 1967 ، ص 76.

- xviii _ سميحة القليوبي ، النظام القانوني للاختراعات في جمهورية مصر العربية ، مجلة القانون و الاقتصاد للبحث في الشؤون القانونية و الاقتصادية ، العدد الأول ، السنة 39 ، مارس 1969 ، ص 245.
- xix _ سميحة القليوبي ، الملكية الصناعية ، دار النهضة العربية ، مصر ، الطبعة الرابعة ، 2003 ، ص 131
- xx _ محمد حسني عباس ، نفس المرجع ، ص 77.
- xxi _ سميحة القليوبي ، الملكية الصناعية ، نفس المرجع ، ص 130.
- xxii _ agreement between the world intellectual property organization and the world trade organization (1995), part 1, Article 1/1, page 15.
- xxiii _ وهي المعهد الوطني الجزائري للملكية الصناعية المنشأ بموجب المرسوم التنفيذي رقم 68/98 المؤرخ في 21 فيفري 1998 الذي يتضمن إنشاء المعهد الوطني الجزائري للملكية الصناعية ويحدد قانونه الأساسي .
- xxiv _ خرخاش نادية ، تحليل وتقييم نظام براءات الاختراع الجزائري في ظل النصوص التشريعية والإجراءات الإدارية ، مجلة الاقتصاد والتنمية البشرية ، المجلد 9 العدد 2 ، جوان 2018 ، ص 149
- xxv _ وهي تابعة لوزارة الفلاحة تتكفل بالتصديق على أصناف البذور و الشتائل ومراقبة شروط إنتاجها وتسويقها واستعمالها وكذا حماية الحيازات النباتية وهذا حسب المادة 4 من القانون 03/05 المتعلق بالبذور و الشتائل و حماية الحيازة النباتية المؤرخ في 6 فيفري 2005 ، ج ر عدد 11.
- xxvi _ استخدامات التقانة الحيوية ... و محافظتها على البيئة www.al3loom.com
- xxvii _ Cherchour mustapha , propriété industrielle , première édition , EDIK , Oran , 2003 , p 42.
- xxviii _ أحمد محرز ، القانون التجاري ، النسر الذهبي ، مصر 1998 ، ص 508.
- xxix _ فرحة زراوي صالح ، نفس المرجع ، ص 6.
- xxx _ مساهمة الموارد الوراثية النباتية للأغذية والزراعة في ضمان الأمن الغذائي المستدام ، مجلة المستقبل الاقتصادي ، العدد 5 ، ص 227.
- xxxi _ هذا ما أكده تقرير الامين العام للامم المتحدة سنة 1964 " دور نظام البراءات في نقل المعارف الفنية للدول النامية " المقدم بناء على قرار الجمعية العامة المتحدة رقم 1713 سنة 1961.
- xxxii _ استخدامات التقانة الحيوية ... و محافظتها على البيئة www.al3loom.com
- xxxiii _ لحر احمد ، النظام القانوني لحماية الابتكارات في القانون الجزائري ، اطروحة دكتوراه ، جامعة ابوبكر بلقايد ، تلمسان ، الجزائر ، 2016 _ 2017 ، ص 45.
- xxxiv _ دليلك الشامل عن التكنولوجيا الحيوية www.easyunime.com
- xxxv _ لحر احمد ، نفس المرجع ، ص 44.
- xxxvi _ جلال أحمد خليل ، النظام القانوني لحماية الاختراعات ونقل التكنولوجيا إلى الدول النامية ، منشورات ذات السلاسل ، الطبعة الأولى ، الكويت 1983 ، ص 256.
- xxxvii _ مصطفى كمال طه ، الحماية القانونية لبراءات الاختراع في القانون المصري ، مجلة المحاماة السنة 52 العدد 3 _ 4 (مارس - أبريل) ص 117.
- xxxviii _ بن عياد جلييلة ، اختراعات العمال في اطار علاقة العمل ، نفس المرجع ، ص 136.
- xxxix _ سميحة القليوبي ، الملكية الصناعية ، نفس المرجع ، ص 68.
- xl _ نعيم احمد نعيم شنيار ، الحماية القانونية لبراءة الاختراع ، رسالة ماجستير ، جامعة الإسكندرية 2010 ، ص 375.
- xli _ بن عياد جلييلة ، اختراعات العمال في اطار علاقة العمل ، نفس المرجع ، ص 137.
- xlii _ سمير جميل حسين الفتلاوي ، استغلال براءة الاختراع ، ديوان المطبوعات الجامعية ، الجزائر 1984 ، ص 110.
- xliii _ فاضلي ادريس ، المدخل إلى الملكية الفكرية " الملكية الأدبية والفنية والصناعية " ، ديوان المطبوعات الجامعية ، الجزائر ، 2007 ، ص 231.
- xliv _ مصطفى كمال طه _ وائل أنور بندق ، أصول القانون التجاري ، دار الفكر الجامعي ، 2006 ، ص 720.
- xlvi _ فرحة زراوي صالح ، نفس المرجع ، ص 155.
- xlvi _ فرحة زراوي صالح ، مرجع سابق ، ص 140.
- xlvi _ فاضلي ادريس ، نفس المرجع ، ص 236.
- xlvi _ محمود مختار أحمد بريري ، الالتزام باستغلال المبتكرات الجديدة ، اطروحة دكتوراه ، مصر 1975 ، ص 30.
- xlvi _ فرحة زراوي صالح ، نفس المرجع ، ص 144.

قائمة المصادر والمراجع :

أولاً : قائمة المصادر :

القوانين

الأمر 03 / 07 المتعلق ببراءة الاختراع المؤرخ في 19 يوليو 2003 ج ر عدد 44 .
القانون 03/05 المتعلق بالبذور و الشتائل و حماية الحيازة النباتية المؤرخ في 6 فيفري 2005 ، ج ر عدد 11.

الاتفاقيات :

_ اتفاقية باريس المبرمة في 20 مارس 1883 و المعدلة عدة مرات .
_ اتفاقية يوتوف اتفاقية دولية لحماية الأصناف النباتية ظهرت في 2 ديسمبر 1961 بباريس ، المعدلة عدة مرات آخرها في 19 مارس 1991.

_ agreement between the world intellectual property organization and the world trade organization (1995)

ثانياً : قائمة المراجع :

أ_ الكتب :

_ أحمد محرز ، القانون التجاري ، النسر الذهبي ، مصر 1998 .
_ جلال أحمد خليل ، النظام القانوني لحماية الاختراعات ونقل التكنولوجيا إلى الدول النامية ، منشورات ذات السلاسل ، الطبعة الأولى ، الكويت 1983.
_ سميحة القليوبي ، الملكية الصناعية ، دار النهضة العربية ، مصر الطبعة 4 ، 2003
_ سمير جميل حسين الفتلاوي ، استغلال براءات الاختراع ، ديوان المطبوعات الجزائرية ، الجزائر 1984.
_ فاضلي ادريس ، المدخل إلى الملكية الفكرية " الملكية الأدبية والفنية والصناعية " ، ديوان المطبوعات الجامعية ، الجزائر ، 2007 ، ص 231 .
_ فرحة زراوي صالح ، الكامل في القانون التجاري (الحقوق الفكرية) ، ابن خلدون ، وهران ، 2006
_ مصطفى كمال طه _ وائل أنور بندق ، أصول القانون التجاري ، دار الفكر الجامعي ، 2006

ب_ الرسائل الجامعية :

ماجستير :

_ العربي حربوش ، التقنيات الطبية وقيمتها الأخلاقية في فلسفة فرانسو داغوني ، رسالة ماجستير ، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر ، 2008 ،
_ العايب جمال ، التنوع البيولوجي كبعد في القانون الدولي و الجهود الدولية و الجزائرية ، رسالة ماجستير ، جامعة الجزائر 1 ، 2007 .

_ محيوي فاطمة ، حماية المنتجات المعدلة وراثياً ، رسالة ماجستير ، جامعة الجزائر 1 ، 2014 .

_ نعيم احمد نعيم شنيار ، الحماية القانونية لبراءة الاختراع ، رسالة ماجستير ، جامعة الإسكندرية 2010

دكتوراه :

- بن عياد جلييلة ، اختراعات العمال في اطار علاقة العمل ، اطروحة دكتوراه ، جامعة الجزائر 1 ، 2013 .
- عمارة ضحى مصطفى ، حقوق الملكية الفكرية وحماية الأصناف النباتية الجديدة ، أطروحة دكتوراه جامعة المنوفية ، مصر 2010 ، 2011 .
- لحمر احمد ، النظام القانوني لحماية الابتكارات في القانون الجزائري ، أطروحة دكتوراه ، جامعة ابوبكر بلقايد ، تلمسان ، الجزائر ، 2016 _ 2017 .
- محمود مختار أحمد بريري ، الالتزام باستغلال المبتكرات الجديدة ، اطروحة دكتوراه ، مصر 1975 ، ص 30.
- محمد احمد عبد العال محمود ، الحماية القانونية للكائنات الدقيقة في القانون المصري وفي القانون الفرنسي والاتفاقيات الدولية وفقا لآليات الملكية الفكرية ، أطروحة دكتوراه ، عين شمس ، مصر 2012.

ج _ المقالات في المجالات :

- دوار جميلة ، الحياة النباتية وحقوق الملكية الفكرية في التشريع الجزائري ، مجلة البحوث العلمية في التشريعات البيئية ، 2016 ، ص 66 _ 82.
- خرخاش نادية ، تحليل وتقييم نظام براءات الاختراع الجزائري في ظل النصوص التشريعية والإجراءات الإدارية ، مجلة الاقتصاد والتنمية البشرية ، المجلد 9 العدد 2 ، جوان 2018 ، ص 139 _ 151.
- سميحة القليوبي ، النظام القانوني للاختراعات في جمهورية مصر العربية ، مجلة القانون و الاقتصاد للبحث في الشؤون القانونية والاقتصادية ، العدد الأول ، السنة 39 ، مارس 1969.
- ماجد وليد ابو صالح ، رمزي أحمد ماضي ، خصوصية الشروط الموضوعية لمنح البراءة لاختراعات التكنولوجيا الحيوية " دراسة قانونية مقارنة " مجلة دراسات علوم الشريعة و القانون ، المجلد 43 ، ملحق 2 السنة 2016 من ص 977 إلى 989.
- مزيان أبو بكر الصديق ، حقوق الملكية الفكرية على الأصناف النباتية المبتكرة في التشريع الجزائري ، مجلة الدراسات القانونية المقارنة ، المجلد 5 العدد 1 ، سنة 2019 ، ص 59 _ 71.
- مصطفى كمال طه ، الحماية القانونية لبراءات الاختراع في القانون المصري ، مجلة المحاماة السنة 52 العدد 3 _ 4 (مارس - أفريل) ، 1989.

المقالات بمواقع الانترنت :

استخدامات التقانة الحيوية ... و محافظتها على البيئة www.al3loom.com

دليلك الشامل عن التكنولوجيا الحيوية www.easyunime.com

الملتقيات :

- بن عياد جلييلة ، اختراعات التكنولوجيا الحيوية ، مداخلة أقيمت بأشغال الندوة الوطنية " دور التكنولوجيا الحيوية و الابداعات الدوائية في التنمية الاقتصادية بتاريخ 7 أكتوبر 2019 ، جامعة الجزائر 1.

الكتب باللغة الأجنبية

,EDIK , Oran , 2003 ,p 42. Cherchour mustapha , propriété industrielle , première édition