



مجلة المختار للعلوم

AL-Mukhtar Journal of Sciences

Volume: 33

Issue: 3

2018



MJSC

تصدرها جامعة عمر المختار

Published by
Omar Al-Mukhtar University

ISSN:26-17-2178 (Print)

ISSN:26-17-2186 (Online)

دار الكتب الوطنية - رقم الإيداع القانوني 2013-280

مجلة المختار للعلوم



جامعة عمر المختار

البيضاء، ليبيا

مجلة علمية محكمة، المجلد الثالث والثلاثون، العدد الثالث، 2018

تصدر عن جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا.

مجلة المختار للعلوم

رقم الايداع في المكتبة الوطنية 280/2013/بنغازي

جميع حقوق محفوظة للمؤلف (المؤلفون) ، وتخضع جميع البحوث المنشورة بالمجلة لسياسة الوصول المفتوح (المجاني) ويتم توزيعها بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي (CC BY-NC 4.0)، والذي يسمح بالنسخ وإعادة التوزيع للأغراض غير التجارية.

جامعة عمر المختار - البيضاء - ليبيا

مجلة محكمة تصدر عن جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا
مجلة علمية محكمة، المجلد الثالث والثلاثون، العدد الثالث، 2018

بريد إلكتروني: omu.j.sci@omu.edu.ly

ص.ب. 919 البيضاء - ليبيا، فاكس: +218 69 463 7053

أعضاء هيئة التحرير

رئيس التحرير	أ. د. علي عبد القادر بطاوي
عضواً	د. خالد مسعود الحمري
عضواً	د. كاملة عبدالرحيم الوحش
عضواً	د. نوارة علي محمد
عضواً	د. الهام عمر الحجازي
عضواً	د. فرحات إبراهيم مغيب
عضواً	د. حسن عبد العزيز بن ناصر
مدقق اللغة الانجليزية	أ. عطية عبد الكريم السنوسي
مدقق اللغة العربية	أ. ابو بكر سليمان ابونغيرة
معالجة النصوص وإخراج	منى عبد السلام فانز

Prediction of Landscape Function and Soil Surface Condition in the Libyan Rangelands Using Selected Spectral Vegetation Indices



Adel M. A. Mahmoud*, Mohamed Hasmadi I, Alias M.S. and Mohamad Azani A.

Faculty of Forestry University of Putra Malaysia (UPM) Serdang, Selangor, Malaysia

Received: 14 November 2017/ Accepted: 17 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.191>

Abstract: Spectral Vegetation Indices (SVIs) have been used to examine variations in vegetation formation and phenology. Lately, researchers and agricultural practitioners have utilized SVIs to examine various soil properties for instance moisture and nutrients. From our review of the literature, there were few comprehensive studies conducted to know whether it is possible or not to predict landscape function indices by using remote sensing technology, and which spectral vegetation index is the best predictor. It has been shown that landscape function indices can be accurately predicted by Normalized Different Vegetation Index (NDVI). Therefore, we attempted to test the ability of selected SVIs to predict landscape function indices (LFA-SSA) in the Mediterranean steppes of Al-Jabal Al-Akhdar, northeast Libya. We used data collected between May and October of 2006 and 2014. A total of 28 sites were chosen to collect the data for both SVIs and LFA-SSA. Simple linear regression was applied between LFA-SSA and SVIs. The results demonstrated that there is a positive linear relationship between LFA-SSA and the selected SVIs. The findings revealed that the Normalized Different Vegetation Index (NDVI) and Modified Soil Adjusted Vegetation Index (MSAVI) acquired from the Landsat Enhanced Thematic Mapper Plus (ETM+) could be utilized in predicting the variability of significant structural and functional qualities of soil and vegetation in the Mediterranean climate.

Keywords: SSCI, MSAVI, WII, LFA-SSA

INTRODUCTION

In arid and semi-arid areas, vegetation cover has been identified as being linked to various ecosystem indicators, for instance, microbial processes (Mazzarino, Bertiller, Sain, Laos, & Coronato, 1996), nutrient cycling and storage (Maestre & Escudero, 2009), and soil-water infiltration and overflow (Vásquez-Méndez et al., 2010). Studies have examined the ability of the Normalized Different Vegetation Index (NDVI) to determine variations in vegetation formation, phenology, and general health (Holm, Burnside, & Mitchell, 1987; Yeganeh, Jamale Khajedain, Amiri, & Shariff, 2014; Zhao et al., 2009; Jiang et al., 2006). Lately, researchers and agricultural practitioners have employed the NDVI to ex-

amine some worthy properties of soil such as moisture (Han, Wang, & Zhao, 2010) and nutrients (Rivero, Grunwald, Binford, & Osborne, 2009). A study conducted by (Paredes, 2011) examined the connection between plant cover and biomass while testing several SVIs. It seems that there were few comprehensive studies that have directly examined the relationship between landscape function and soil surface condition indices (LFA-SSA) and the SVIs. These studies were conducted to determine whether it is possible to predict LFA indices by using remote sensing technology, and which SVIs is the best predictor of landscape function indices. It has shown that LFA parameters could accurately be predicted by the NDVI as seen in restored

*Corresponding Author: Adel M. A. Mahmoud adelborabha@gmail.com, Faculty of Forestry University of Putra Malaysia (UPM) Serdang, Selangor, Malaysia

Australian mines(Lau, Hewson, Ong, & Tongway, 2008; Ong, Tongway, Caccetta, & Hindley, 2009), at two gold and uranium mining operations in the Highveld grassland biome and the Eastern Cape Province in South Africa(Furniss, 2010; Kakembo, Ndlela, & Cammeraat, 2012), semi-dry grasslands in Spain(García-Gómez & Maestre, 2011), and in the Patagonian rangeland steppes(Gaitán et al., 2013).LFA indices could be mapped using remote sensing technology(Lau et al., 2008). Some results showed a significant positive linear relationship between SVIs and both vegetation cover and plant biodiversity(Gaitán et al., 2013).

In another study, there was a positive and linear relationship between the NDVI and soil surface condition indices except in the stability index where the relationship was weak(Furniss, 2010). The NDVI could replicate the ecosystems existing in semi-arid Mediterranean steppes and might be a useful index to regulate the status of the larger regions in these ecosystems functions, and the potential encroachment of desertification (Gaitán et al., 2013; García-Gómez & Maestre, 2011; Mahmoud, Hasmadi, Alias, & Azani, 2016).

Therefore, we attempted to test the ability of selected SVIs to predict LFA-SSA. We used data collected in May and October of 2006 and 2014 in the Mediterranean steppes of Al-Jabal Al-Akhdar known as (The Green Mountain), northeast Libya.

MATERIALS AND METHODS

The Study Area: The study area is located on the southern slope of Al-Jabal Al-Akhdar, northeast Libya, approximately 32°N, and 21°E, occupying an area of about 3000 km² (Figure 1). The rainfall range in the region is between 50 to 250 mm per year and temperature reach below 0°C in January and up to 35°C in July and August. (2008).

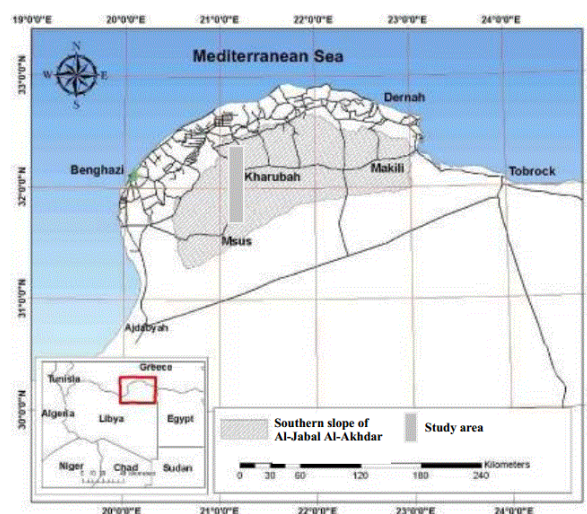


Figure:(1). Southern Al-Jabal Al-Akhdar map, shows the location of study area(Hamad, 2012)

At lower elevations and reduced rainfall, a belt of dwarf shrub steppe consisting of *Artemisia herba-alba* and *Haloxylon scoparium* occupies the low hills and the undulating and narrower alluvial plains. Further south, a steppe of stem and leaf-succulent plants occupy the board flat alluvial plains and drier undulating plains. Species in this formation include *Haloxylon scoparium*, *Anabasis articulata*, *Suaeda pruinosa*, and *Salsola tetrandra*(Mahmoud et al., 2008).

Landscape Function Analysis, Soil Surface Condition Methodology:

To achieve the objective of this research we used LFA methodology. LFA data was collected on line transects oriented in the direction of resource flow. The soil surface data are combined in different combinations to reflect major soil habitat quality indices.(Tongway & Hindley, 2004). Five LFA-SSA indices were used (Table 1).

Table: (1). Landscape Function and Soil Surface Assessment Indices (LFA, SSA)

Index Name	Code	Scale / Unit
Soil Stability Index	SSI	0 - 100
Water Infiltration Index	WII	0 - 100
Nutrient Cycling Index	NCI	0 - 100
Soil Surface Condition Index	SCCI	0 - 100
Landscape Organization Index.	LOI	0 - 1

SVIs Data Sources and Analysis: We attempted to test satellite images of the Landsat Enhanced Thematic Mapper Plus (ETM+) which would cover a vast area and save time and money. We used two Landsat satellite images captured from Landsat-7 (ETM+) in September (2006 and 2014) with eight bands and resolution of 30m (Table 2). Typically, Landsat 7 ETM+ images include many types of errors which affect the results. ERDAS Imagine software V.9 was employed to correct the satellite image’s radiometric, atmospheric and geometric errors, and calculate SVIs. It should be noted that these errors have been minimized in the sensors of newer devices. The Universal Transverse Mercator coordinator system (UTM) was used to correct the images geometrically. The Geographic Information System (GIS) data of 28 sites (ground control points) were used to correct and validate the geometric errors.

Table (2). Landsat Satellite Imagery Characteristics

Instrument	Acquisition date	Path /row	Spectral bands	
			bands	Wave-length (µm)
ETM+	Dec.2006	183/3 8	1	0.45 - 0.52
			2	0.525 - 0.60
	3		0.63 - 0.69	
	4		0.77 - 0.90	
	5		1.55 - 1.75	
	6		10.40 - 12.5	
	7		2.09 - 2.35	
	Pan.		0.52 - 0.90	

The Selected Vegetation Indices:Vegetation Indices have been widely used in remote sensing applications of rangeland management, they are also used in available software in markets(Mróz & Sobieraj, 2004). Through a review of the most common Vegetation Indices that were used in the arid and semi-arid rangelands studies included the advantages and disadvantages of each index, we concluded that the Normalized Difference Vegetation Index

(NDVI) and Modified Soil Adjusted Vegetation Index (MSAVI) are the most useful indices to achieve the objective of this study.(Rouse Jr, Haas, Schell, & Deering, 1974)was the first to describe the NDVI (Equation 1). Several Near Infra-Red (NIR) wavelengths across the 750 to 900 nm band, as he found, had no important differences. Higher NDVI values are led by darker soil substrates under incomplete canopies. Fortunately, in our study area there is no dark soil, so NDVI may be useful in predicting LFA indices to produce a model that could monitor the status of rangelands in a large area. MSAVI is a modification of the Soil Adjusted Vegetation Index (SAVI) to account for areas which have a low (i.e. <40%) vegetation cover. MSAVI is particularly important for the study areas which have different soil brightness coefficients (Gaitán et al., 2013). As a result of the abovementioned advantage, MSAVI is considered to be a suitable index for rangeland studies in arid areas. Moreover, it usually has a strong correlation relationship with field data related to vegetation cover. It is also very useful for degradation classification in monitoring desertification (Mahmoud et al., 2016), as well as the estimation of biomass. Due to the reasons above, MSAVI may be suitable for the research objective (Equation 2).

$$NDVI = NIR - R / NIR + R \dots \dots \text{Equation 1}$$

$$MSAVI = \frac{[2 * NIR + 1 - \sqrt{(2 * NIR + 1)^2 - 8 * (NIR - R)}]}{2} \dots \dots \text{Equation 2}$$

Where R is the Red band, and NIR is the Near Infra-Red.

Sampling Design and Statistical Analysis:A total of 56 values for each index were calculated from 28 sites in 2006 and 2014. The site layout was based on the Western Australia Rangeland Monitoring System(Russell, 2007; Watson, Thomas, & Fletcher, 2007). There were five line-transects per site. There was an analysis of NDVI and MSAVI variations between the years 2006 and 2014 and their links

to landscape function and soil surface condition in the study area. SPSS software, version 20, was employed for all statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In all statistical testing, significant differences were regarded as probability values less than 5 %. Our hypothesis was posed as follows: There is a linear relationship between LFA-SSA indices and the selected SVIs. In other words, LFA-SSA indices can be predicted using NDVI and MSAVI. Simple linear regression was applied with LFA-SSA indices as dependent variables and SVIs as independent variables (the predictors). 39 samples (70%) were randomly selected for the prediction model, while the rest (17 samples) were used for the cross-validation model. This process was repeated 100 times in order to estimate the means of coefficient of determination (R^2) for both prediction and validation models, as presented in Equation 3.

$$R^2 = [(1 / N) * \sum [(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})]^2 / (\sigma_x * \sigma_y)]^2$$

.....Equation 3

Where N is the number of observations used to fit the model, \sum is the summation symbol, x_i is the x value for observation i, \bar{x} is the mean x value, y_i is the y value for observation i, \bar{y} is the mean y value, σ_x is the standard deviation of x, and σ_y is the standard deviation of y.

RESULTS AND DISCUSSION

As portrayed in tables 3 and 4, the findings demonstrated that there exists a good linear relationship between LFA-SSA indices and the selected SVIs. The applied regressions showed a positive and linear correlation between both NDVI and MSAVI, and SSCI ($R^2 = 0.62$ and 0.51 respectively, and $P < 0.05$ in 89% of the cases). Increments in variability were equally computed for the five LFA-SSA indices, while the indices for landscape organization, soil stability, water infiltration, nutrient cycling, and overall soil health ranged from 0 to 0.3, 33% to 61%, 26% to 38%, 14% to 33%, and 23% to 44% in that order. In this study, a linear relation between MSAVI and

LFA indices was realized in -nutrient cycling and infiltration that had R^2 of 0.44 and 0.36 in that order, while their correlation with the NDVI was relatively weak (Table 3). In their research (García-Gómez & Maestre, 2011) calibrated vegetation cover and LFA indices with NDVI calculated from the Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer (ASTER), in Steppes semi-arid area. During the process of model's validation, the two researchers obtained R^2 values varying from 0.49 to 0.75, while MSAVI showed a weak linear relationship with SSI, WII and NCI ($R^2 = 0.10, 0.22$ and 0.33 respectively). In our results, MSAVI has a strong positive correlation with WII and NCI, $R^2 = 0.46$ and 0.55 in that order, while in the case of stability index the results were the same as Gaitán et al (2013) ($R^2 = 0.1$). There was a positive and linear relationship between NDVI and MSAVI, and landscape function and soil surface condition indices except for stability index where the relationship was weak. Our results were supported by similar results in the Mediterranean climate of South Africa (Furniss, 2010). Discrepancies in the stability index are not operated by variations in vegetation cover; hence this role cannot be suitably determined from SVIs (Furniss, 2010).

On the other hand, the frail connection amid the stability index and SVIs obtained here implies that other factors in addition to vegetation cover have an impact on the stability of soil. From the results, we realized that about 35% of Landscape Organization Index is predicted by NDVI, a finding probably operated by the constructive linear correlation amid Total Patch Area (TPA) in our data. However, the linear relationship between NDVI and LOI in 2006 was weaker than 2014, this may be attributed to the precipitation which has a very strong positive relationship with NDVI (Nicholson, Davenport, & Malo, 1990). This could explain why the linear relationship between NDVI and LFA-SSA indices especially LOI was positively very strong in both prediction and validation models ($R^2 = 0.65$ and 0.75 respectively) in the

Mediterranean Spanish steppes which receives more precipitation compared to the study area (400mm) (García-Gómez & Maestre, 2011). Referring to a research conducted by (Yeganeh et al., 2014), there was a very high linear relationship between NDVI and SAVI, and changes in the vegetation cover where R^2 was 0.85 in about 90% of the cases. Despite the approaches primarily employed in achieving the correlations found, of which could not be expounded with measurements considered in the current study, the obtained results prove that SVIs could be employed in predicting deviations in the dry areas of rangeland ecosystems. The findings of the current research demonstrate the potential of Landsat ETM+ in evaluating the changeability of functional and structural qualities over extensive areas, but it entails a few limitations that ought to be considered. For instance, the models generated entailed R^2 values being less than 0.68. Also, the average of R^2 values were less than 0.71 in all validation models as indicated in Table 3, implying that developments on the extrapolative remote sensing information ability to envisage such indicators are likely. Our results illustrate that the LFA-SSA indices may be determined remotely with the help of Vegetation Indices set from satellite imagery that is directly related to the amount of minerals in the soil, vegetation and litter cover. The findings also support similar results in the Mediterranean climate (Furniss, 2010; Gaitán et al., 2013; García-Gómez & Maestre, 2011).

Table (3). Summary of 100 Models Used to Predict and Validate LFA-SSA Indices by Using NDVI

Model	Variables	Mean R^2		General Mean R^2	% of significant ($p < 0.05$)	
		2006	2014		2006	2014
Prediction ^a	NDVI - SSI	0.26	0.37	0.32	89	89
	NDVI - WII	0.25	0.32	0.29	90	100
	NDVI - NCI	0.39	0.16	0.28	90	87
	NDVI - SSCI	0.56	0.68	0.62	100	100
	NDVI - LOI	0.26	0.46	0.35	67	100
Validation ^b	SSI	0.33	0.31	0.32	67	68
	WII	0.36	0.35	0.36	46	60
	NCI	0.46	0.32	0.39	86	73
	SSCI	0.66	0.71	0.69	75	90
	LOI	0.25	0.46	0.36	42	41

a: in all cases n = 39 b: in all cases n = 17

Table (4). Summary of 100 Models Used to Predict and Validate LFA-SSA Indices by Using MSAVI

Model	Variables	Mean R^2		General Mean R^2	% of significant ($p < 0.05$)	
		2006	2014		2006	2014
Prediction ^a	MSAVI - SSI	0.10	0.50	0.25	20	83
	MSAVI - WII	0.46	0.36	0.41	100	91
	MSAVI - NCI	0.55	0.44	0.49	93	83
	MSAVI - SSCI	0.54	0.49	0.51	87	100
	MSAVI - LOI	0.16	0.48	0.32	100	100
Validation ^b	SSI	0.19	0.53	0.36	30	100
	WII	0.30	0.38	0.34	73	47
	NCI	0.50	0.29	0.39	81	54
	SSCI	0.45	0.38	0.41	63	74
	LOI	0.07	0.38	0.22	30	69

a: in all cases n = 39 b: in all cases n = 17

CONCLUSION

NDVI and MSAVI were able to determine the changes in the function of the ecosystem that appeared to have a correlation with LFA parameters. Notably, the stability, nutrient cycling, as well as infiltration indices have emerged to be reliable from a multitude of ground-oriented and spectral data. Something is very intricate and expensive to attain when employing only field-based assessment. Therefore, SVIs can be employed as a consistent and comparatively simple to use a tool in monitoring and assessing rangeland degradation processes. Furthermore, additional case studies from different environments should be conducted.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank the Libyan Higher Education Ministry and Universiti Putra Malaysia (UPM) for supporting this research.

REFERENCES

Furniss, D. G. (2010). Can indices of landscape function analysis (LFA) be derived from ground-based spectroscopy? A case study from gold mines on the Highveld of South Africa. *Degree of Master of Science, School of Animal, Plant and Environmental Science*

University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, 167pp.

- Gaitán, J. J., Bran, D., Oliva, G., Ciari, G., Nakamatsu, V., Salomone, J., Humano, G. (2013). Evaluating the performance of multiple remote sensing indices to predict the spatial variability of ecosystem structure and functioning in Patagonian steppes. *Ecological indicators*, 34, 181-191.
- García-Gómez, M., & Maestre, F. T. (2011). Remote sensing data predict indicators of soil functioning in semi-arid steppes, central Spain. *Ecological indicators*, 11(5), 1476-1481.
- Hamad, A. M., & Taha, R. M. (2008). Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117(4), 329-334.
- Hamad, S. (2012). Status of water resources of Al Jabal Al Akhdar region, North East Libya. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, 3, 247-259.
- Han, Y., Wang, Y., & Zhao, Y. (2010). Estimating soil moisture conditions of the greater Changbai Mountains by land surface temperature and NDVI. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 48(6), 2509-2515.
- Holm, A., Burnside, D., & Mitchell, A. (1987). The development of a system for monitoring trend in range condition in the arid shrublands of Western Australia. *The Rangeland Journal*, 9(1), 14-20.
- Kakembo, V., Ndlela, S., & Cammeraat, E. (2012). Trends in vegetation patchiness loss and implications for landscape function: the case of *Pteronia incana* invasion in the Eastern Cape Province, South Africa. *Land Degradation & Development*, 23(6), 548-556.
- Lau, I., Hewson, R., Ong, C., & Tongway, D. (2008). Remote mine site rehabilitation monitoring using airborne hyperspectral imaging and landscape function analysis (LFA). *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, 37, 325-330.
- Maestre, F. T., & Escudero, A. (2009). Is the patch size distribution of vegetation a suitable indicator of desertification processes? *Ecology*, 90(7), 1729-1735.
- Mahmoud, A., Gadallah, A., Moheemmed, S., Mohamed, M., Abdel-Ghani, A., Alhendawi, R., & Russell, P. J. (2008). Aspects of range condition recovery in the southern jebel al akhdar, northeastern libya. *Paper presented at the Proceedings of the XXI International Grassland Congress and the VIII International Rangeland Congress (volume I)*.
- Mahmoud, A., Hasmadi, I. M., Alias, M., & Azani, A. M. (2016). Rangeland Degradation Assessment in the South Slope of the Al-Jabal Al-Akhdar, Northeast Libya Using Remote Sensing Technology. *Journal of Rangeland Science*, 6(1), 73-81.
- Mazzarino, M., Bertiller, M., Sain, C., Laos, F., & Coronato, F. (1996). Spatial patterns of nitrogen availability, mineralization, and immobilization in northern Patagonia, Argentina. *Arid Land Research and Management*, 10(4), 295-309.
- Mróz, M., & Sobieraj, A. (2004). Comparison of several vegetation indices calculated

- on the basis of a seasonal SPOT XS time series, and their suitability for land cover and agricultural crop identification. *Technical Sciences*, 7(7), 39-66.
- Nicholson, S. E., Davenport, M. L., & Malo, A. R. (1990). A comparison of the vegetation response to rainfall in the Sahel and East Africa, using normalized difference vegetation index from NOAA AVHRR. *Climatic change*, 17(2-3), 209-241.
- Ong, C., Tongway, D., Caccetta, M., & Hindley, N. (2009). Phase 1: deriving ecosystem function analysis indices from airborne hyperspectral data. *CSIRO Explor. Min.*
- Paredes, P. (2011). Caracterización funcional de la Estepa Magallánica y su transición a Matorral de Mata Negra (Patagonia Austral) a partir de imágenes de resolución espacial intermedia. *Magister thesis. Universidad de Buenos Aires*. 134pp
- Rivero, R., Grunwald, S., Binford, M., & Osborne, T. (2009). Integrating spectral indices into prediction models of soil phosphorus in a subtropical wetland. *Remote sensing of environment*, 113(11), 2389-2402.
- Rouse Jr, J. W., Haas, R., Schell, J., & Deering, D. (1974). Monitoring vegetation systems in the Great Plains with *ERTS-1 Symp., 1*, 309-317.
- Russell, P. J. (2007). Assessing long-term change in rangeland ecological health using the Western Australian Rangeland Monitoring System. *thesis Degree of Doctor of Philosophy Muresk Institute, Centre for the Management of Arid Environments. Curtin University.*
- Tongway, D., & Hindley, N. (2004). Landscape function analysis: a system for monitoring rangeland function. *African journal of range and forage science*, 21(2), 109-113.
- Vásquez-Méndez, R., Ventura-Ramos, E., Oleschko, K., Hernández-Sandoval, L., Parrot, J.-F., & Nearing, M. A. (2010). Soil erosion and runoff in different vegetation patches from semiarid Central Mexico. *Catena*, 80(3), 162-169.
- Watson, I., Thomas, P., & Fletcher, W. (2007). The first assessment, using a rangeland monitoring system, of change in shrub and tree populations across the arid shrublands of Western Australia. *The Rangeland Journal*, 29(1), 25-37.
- Yeganeh, H., jamale Khajedein, S., Amiri, F., & Shariff, A. R. B. M. (2014). Monitoring rangeland ground cover vegetation using multitemporal MODIS data. *Arabian Journal of Geosciences*, 7(1), 287-298.
- Zhao, B., Yan, Y., Guo, H., He, M., Gu, Y., & Li, B. (2009). Monitoring rapid vegetation succession in estuarine wetland using time series MODIS-based indicators: an application in the Yangtze River Delta area. *Ecological indicators*, 9(2), 346-356.

التنبؤ بوظائف المنظر الطبيعي وحالة سطح التربة في المراعي الليبية باستخدام مؤشرات غطاء نباتي طيفية مختارة

عادل محمود عبد القادر*، محمد هسامدي بن اسماعيل²، إلياس بن محمد سعود²، محمد أزاني بن إلياس

كلية الغابات، جامعة بوترا ماليزيا، سيردانق، ماليزيا

تاريخ الاستلام: 20 نوفمبر 2017 / تاريخ القبول: 22 سبتمبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.191>:Doi

المستخلص: استخدمت أدلة الغطاء النباتي الطيفية (SVIs) لدراسة الاختلاف في تركيب الغطاء النباتي والفيولوجيا. حديثاً وظّف باحث ومهنيين زراعيين أدلة الغطاء النباتي الطيفية في دراسة خصائص مختلفة للتربة مثل الرطوبة والمغذيات. من خلال استعراض الباحث للدراسات السابقة يبدو أنه أجريت القليل من الدراسات لمعرفة ما إذا كان من الممكن التنبؤ بمؤشرات ووظائف المنظر الطبيعي باستخدام تكنولوجيا الاستشعار عن بعد، وأي دليل غطاء نباتي طيفي هو الأفضل. بينت هذه الدراسات أن مؤشرات ووظائف المنظر الطبيعي يمكن التنبؤ بها بدقة باستخدام دليل التباين الخضري للغطاء النباتي (NDVI). لذلك قام الباحث بمحاولة اختبار قدرة أدلة غطاء نباتي طيفية مختارة على التنبؤ بمؤشرات ووظائف المنظر الطبيعي (LFA-SSA) في سهوب مناخ البحر الأبيض المتوسط بالجبل الأخضر شمال شرق ليبيا. استخدم الباحث بيانات جمعت بين مايو وأكتوبر لسنتي 2006 و2014. تم استخدام 28 موقعاً لجمع بيانات أدلة الغطاء النباتي الطيفية ومؤشرات ووظائف المنظر الطبيعي. تم تطبيق الانحدار الخطي البسيط بين SVIs وLFA-SSA. بينت النتائج وجود علاقة خطية إيجابية بين مؤشرات ووظائف المنظر الطبيعي والأدلة الطيفية المختارة. أظهرت النتائج أنه يمكن استخدام دليل التباين الخضري للغطاء النباتي (NDVI) ودليل الغطاء النباتي المعدل للتربة (MSAVI) المتحصل عليهما من صور الأقمار الصناعية لاند سات (ETM+) Landsat في التنبؤ بتغير خصائص صفات التربة والغطاء النباتي التركيبية والوظيفية المهمة في المناخ المتوسطي.

الكلمات المفتاحية: SSCI, MSAVI, WII, LFA-SSA.

Investigation of the Molecular Mechanisms Leading to Protein Translation Inhibition in Response to Endoplasmic Reticulum Stress



Abdulsalam Elfowiris^{1*}, Terence P. Herbert²

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda -Libya

²School of Health and Biomedical Sciences, RTM University Melbourne-Australia

Received: 13 January 2018/ Accepted: 01 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.192>

Abstract: Protein folding is an important process for cellular function. ER is responsible for the synthesis, folding, modification, and quality control of numerous secretory and membrane proteins. The intracellular disturbance caused by different stressors leading to the accumulation of unfolded/ misfolded proteins can all lead to an alteration in ER homeostasis. If the unfolded/misfolded proteins continue to accumulate inside the ER, the unfolded protein response (UPR) is induced to overcome this situation. UPR acts by three different mechanisms: (1) increase the ER protein-folding capacity (Robertson and Branch, 1987), (2) reduce global protein synthesis, and (3) enhance ER-associated degradation process. The UPR is mediated by three ER transmembrane protein sensors: (1) activating transcription factor 6 (ATF6), (2) inositol requiring kinase 1 (IRE1), and (3) double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) like endoplasmic reticulum kinase (PERK). Each sensor of the UPR protein responds to the certain level of unfolded/misfolded protein in the ER. If the cell fails to restore or overcome the protein-folding defect, cell-death signaling pathways are activated.

Keywords: ER stress, PERK, Translation, UPR, Protein synthesis, Firefly, Renilla, MIN6 cells.

INTRODUCTION

Translation, the first and most important phase of protein synthesis, involves a process by which mRNA is translated into proteins. The translation of mRNA into proteins involves five major components: ribosomes that perform the process of polypeptide synthesis, tRNA molecules that arrange amino acids in a specific sequence within the mRNA template, aminoacyl-tRNA synthetases that attach amino acids to their tRNA molecules, mRNA that encode the amino acids sequence information for protein synthesis, and protein initiation, elongation and termination factors that facilitate the translation mechanism (Merrick, 2010). mRNA is exported from the nucleus and enters the cytosol as a messenger

ribonucleoprotein (mRNP), which is a mRNA molecule coated with RNA binding proteins (Robertson & Branch, 1987). The mRNA can then be translated into protein and there are three main stages to this process: initiation, elongation, and termination (Kapp & Lorsch, 2004). The initiation of translation in eukaryotes is considered the most important stage in the regulation of protein translation. It is also a highly complex step which involves the recruitment of the 80S ribosome and the initiator methionyl-tRNA (Met-tRNA_i) on to the start codon (AUG) of the mRNA. This process is facilitated by at least 12 protein initiation translation factors (eIFs) (Hinnebusch, 2011). The initiation phase is completed when the Met-tRNA_i base pairs to

*Corresponding Author: Abdulsalam Elfowiris, Abdulsalam.efowiris@omu.edu.ly Faculty of Pharmacy, Omar Al Mukhtar University, El-Beida-Libya.

the start codon (AUG) in the P site of the ribosome and is ready to begin the elongation phase of protein synthesis (Hinnebusch & Lorsch, 2012). One of the critical steps during the initiation of translation is the formation of the translational ternary complex (TC) consisting of initiator methionyl-tRNA (Met-tRNA_i) and the GTP-bound form of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2). Binding of the TC to the 40S subunit requires initiation factors such as eIF1, 1A, 5, and the eIF3 complex. The 43S pre-initiation complex (PIC) binds to mRNA in a process facilitated by eIF3, the poly(A)-binding protein (PABP), eIFs 4B, 4H (in mammals), 4F, a complex consisting of the cap-binding protein eIF4E, eIF4G, and the RNA helicase eIF4A (Hinnebusch, 2011). eIF4E is the critical factor for the formation of eIF4F complex (Duncan & Hershey, 1989), and the binding of eIF4E to eIF4G is inhibited by eIF4E-binding proteins (4E-BPs). eIF4G and 4E-BPs compete for eIF4E binding and as a result of binding eIF4E to 4E-BPs inhibits the formation of eIF4F complex (Haghighat, Mader, Pause, & Sonenberg, 1995). The affinity of eIF4E for 4EBPs is decreased by 4E-BPs phosphorylation which leads to eIF4E free to bind eIF4G (Proud, 2007), (Friedland, Wooten, LaVoy, Hagedorn, & Goss, 2005).

In eukaryotes, the untranslated regions of mRNA have been shown to be essential in the regulation of protein synthesis (Jackson, Hellen, & Pestova, 2010). The 5' leaders can regulate downstream expression through upstream open reading frames (uORF), these 5' leaders structures act as codes so that ribosomes can recognize which transcripts are to be repressed or preferentially translated (Dever et al., 1993).

Internal ribosome entry site (IRES):

Eukaryotic cells apply different mechanisms to initiate translation of their mRNAs (Komar & Hatzoglou, 2005). Some viral and eukaryotic cellular mRNA are translated using a cap-independent mechanism such as the

IRES mediated mechanism by which the 40S ribosomal subunit is directed to a site 3' of the 5' end often by specific mRNA tertiary structures termed internal ribosome entry sites (IRESs) (Jackson et al., 2010). Poliovirus and encephalomyocarditis virus (EMCV) were the first biological systems found to translate their mRNA by the internal ribosome entry mechanism (Pelletier & Sonenberg, 1988). Later on, many other virus families were also found to use this mechanism for their mRNA translation (Vagner, Galy, & Pyronnet, 2001). It was found that IRES-dependent translation requires a variable number of translation initiation factors depending on the particular IRES (Hellen, 2009). For instance, the hepatitis C virus (HCV) IRES does not require any of the initiation factors of the eIF4 family (Pestova, Shatsky, Fletcher, Jackson, & Hellen, 1998), and the cricket paralysis virus (CrPV) IRES is translated without the requirement for any of the canonical initiation factors including eIF2 (Jackson et al., 2010).

Translation control under ER stress: ER plays a central role in protein synthesis. Translation of new proteins takes place on ribosomes associated with the ER. Newly synthesized membrane or secretory proteins are then folded and modified in the ER lumen (Harding & Ron, 2002). Under ER stress condition, protein folding is disrupted which leads to the accumulation of unfolded proteins resulting in activation of unfolded protein response (UPR). In reaction to ER stress, UPR is intended to restore ER homeostasis through decreasing ER load, increasing ER folding capacity and increasing ER associated degradation. This decrease in ER load is classically initiated by the activation of the ER-transmembrane protein PERK, which phosphorylates the translation initiation factor eIF2 α resulting in a decrease in global protein synthesis (Back & Kaufman, 2012). It is believed that the inhibition of protein synthesis in response to ER stress gives ER more time to qualifying the loading proteins

and correctly folded (Evans-Molina, Hatanaka, & Mirmira, 2013). During the ER stress, the kinase PERK phosphorylates eIF2 α which leads to translation attenuation to overcome ER stress. Phosphorylation of eIF2 α has a dual action during ER stress which inhibits the general mRNA translation and promoting selective translation of specific stress responsive mRNA. (Harding, Zhang, Bertolotti, Zeng, & Ron, 2000). We speculated that additional mechanisms/factors may be involved in repression of protein synthesis in response to ER stress. To investigate this, we exploit the differences in the dependency of viral IRES for translation initiation factors to identify which initiation factors are affected by ER stress and thus may be important in the ER stress response.

General reagents and materials: Thapsigargin was purchased from Merck M, and ³⁵S-L-Methionine was purchased from Perkin Elmer. Dual-luciferase Reporter Assay System was purchased from Promega. Lipofectamine 2000 was purchased from Invitrogen. Viability/Cytotoxicity Kit was purchased from Molecular Probes. Plasmids were used: pEMCV, pCrpv, Renilla/Firefly (pRF), and pHCV were provided by Professor Martin Bushell-MRC, Leicester.

Cell culture and transfection : Mouse Insulinoma 6 cells Insulinoma (MIN6) were cultured in DMEM media containing 25mM glucose, 15% heat-inactivated FBS, 100 μ g/ml streptomycin, 100units/ml penicillin, 100units/ml neomycin (PSN), 40mM NaHCO₃ and 75 μ M β -mercaptoethanol and maintained at 37°C and 5%CO₂. Lipofectamine 2000 was used for transfection, prior to transfection, cells were split into 24 sterile multi-well plates. 0.2 μ g of plasmid was used to transfect one well of 24 wells plate. Transfection were performed as recommended by the manufacturer.

Cell treatment and lysis: Detailed descriptions of treatments are provided in the figure legend. After experimentation, growth medium was

aspirated off the cells and the cells washed twice with 1x PBS. For measuring luciferase activity, cells were scrapped into 100 μ l of passive lysis buffer (Promega) on ice. Lysates were subjected to two freeze-thaw cycles and then centrifuged at 14,000rpm at 4°C for 10 min. The supernatant was kept for further analysis.

Dual-luciferase reporter assay system: Samples were harvested and prepared to measure luciferase activity using dual-luciferase reporter assay system from Promega. The Luciferase Assay Reagent II (LARII) and Stop&Glo reagent were prepared according to manufactory instruction. After treatment, cells were harvested using ice-cold 50 μ l passive lysis buffer. Before the measurement, LARII and Stop&Glo reagent should be warmed up to room temperature .10 μ l of sample lysate was added to 96 well-read plate then 50 μ l LARII were added to measure firefly luciferase activity using Novastar plate reader to determine luminescence. After that 50 μ l Stop&Glo was added to measure Renilla luciferase activity using Novastar plate reader to determine luminescence.

TCA Precipitation of protein and protein synthesis measurements: 5 μ l of cell lysate was spotted onto a 1cm of 3MM Whatman filter papers in a triplicate. Filter papers were boiled for 1 minute in 100 ml of 5% Trichloroacetic acid (TCA) with a pinch of L-methionine. The 5% TCA was discarded and replaced with 100ml of 5% TCA and boiled again for 1 minute. The 5% TCA was discarded again, and the papers were rinsed in 5% TCA followed by washing with absolute ethanol. The papers were dried at 80°C for one hour. The filter papers were immersed in 3ml of scintillant (Emulsifier-safe, PerkinElmer) and DPM determined by Scintillation counting using a Beckman-Coulter liquid scintillation counter.

Quantification and Statistical Analysis: Statistical differences between different groups were analyzed via single factor analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni.

Comparison between two sets of data was analyzed using Paired t-test or Mann-Whitney non-parametric test. A statistical test was only carried out when the experiments had at least $n=3$. Statistical significance was only presented when $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software.

RESULTS

Bicistronic constructs initiation factors requirement for translation: In order to identify which initiation factors are responsible for the inhibition of protein synthesis in response to ER stress, a series of bicistronic constructs were used in which the translation of the upstream cistron is controlled by a cap-dependent mechanism whereas the downstream cistron (cap-independent) is regulated by a specific viral IRES. These bicistronic constructs have different requirements to initiate translation via their IRES. EMCV IRES can direct translation independently of eIF4E, whereas the CrPV IRES requires no initiation factors, and directly recruits ribosomal subunits. HCV IRES requires all the initiation factors except the eIF4E/4B and 4A (Meijer et al., 2013). pRF which was translated through cap-dependent only and has no IRES was used as the control.

Determination of efficacy of the constructs: The efficacy of the constructs was determined by how protein synthesis is repressed under conditions of ER stress (Fig. 3.1) by assessing: 1. the effect of ER stress on cap-dependent renilla expression, and 2. the dependency of the expression of firefly on the presence of an intercistronic IRES. To investigate this, MIN6 cells were transfected with pRF and pEMCV. 48 h post-transfection, the cells were incubated for 4 h in the presence or absence of thapsigargin (Tg) and the expression renilla (Ren), and firefly luciferase (FF) was determined by their activity using luminometry.

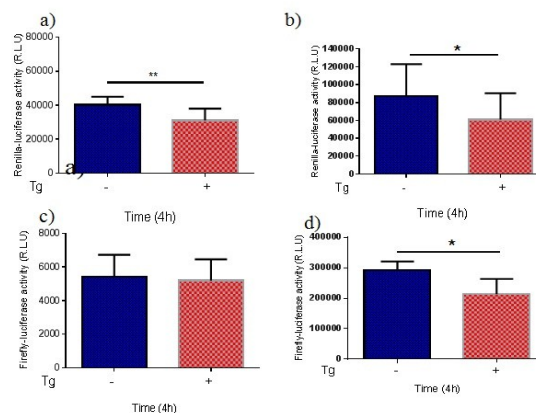


Figure (1). Characterisation of the reporter constructs. MIN6 cells transfected with pRF (a,c). Cells transfected with pEMCV (b,d) by using Lipofectamine for 48h, all the cells except the control were incubated with (Tg, 1 μ M) for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. The luciferase activity of FF and Ren was measured by using Dual-luciferase reporter assay system as a Relative Light Unit (R.L.U). The results are \pm s.e.m of $n \geq 3$ experiments, data were analyzed by using Paired t test, * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

Under control conditions, the activities of Ren either pRF or pEMCV were similar. However, treatment with Tg caused a 20-25% decrease in Ren activity compared to untreated cells. Thus, changes in Ren activity in response to ER stress can be used as a readout of ER stress-induced repression of protein synthesis (Fig. 3.1a) and (Fig. 3.1b). The expression of FF in cells transfected with pRF, in either the presence or absence of Tg, was negligible compared to the expression of FF driven by the EMCV IRES in cells transfected with pEMCV (Fig. 3.1c and 3.1d). Thus, the expression of the downstream cistron encoding FF is highly dependent upon the presence of IRES. Our results revealed that the measurement of FF expression from different IRES with different initiation factor requirements can be used to determine the role of specific initiation factors in ER stress-induced repression of protein synthesis.

The repression of protein synthesis in response to ER stress is mediated by the inhibition of the initiation : MIN6 cells were transfected with pCrPV and incubated under standard conditions. post transfection, the cells were treated with Tg and the activity of Ren and FF determined by luminometry (Fig. 3.2). The activity of Ren from cells transfected with

pCrPV, under control conditions, was (approx. 15,000 RLU). The addition of Tg caused a 30% decrease in Ren activity and readout of ER stress-induced repression of protein synthesis (Fig. 3.2a). The expression of FF in cells transfected with pCrPV in the presence or absence of Tg was unaffected and thus is able to overcome or bypass the effect of ER stress on protein synthesis repression (Fig. 3.2b). In addition, the FF/Ren ratio significantly increased in the presence of Tg (Fig. 3.2c). As a control, the effect of Tg inhibition of protein synthesis was also determined by measuring ^{35}S -Methionine incorporation into protein (Fig. 3.2d). As the translation of CrPV IRES is independent of all initiation factors, this provides evidence that the ER stress-induced repression of protein synthesis is likely caused by the repression of initiation through modulation of one or more initiation factors, but not through the inhibition of elongation phase of protein synthesis.

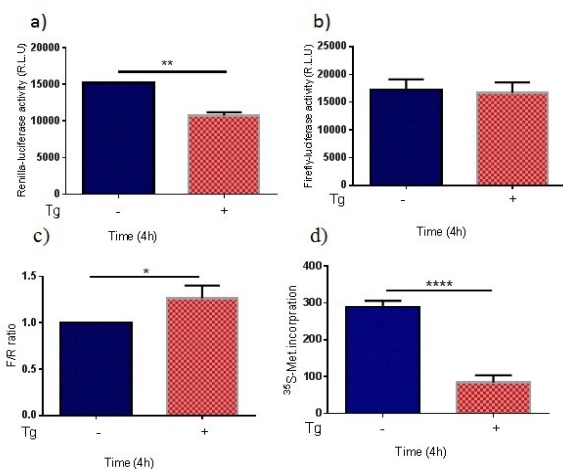


Figure (2). ER stress-induced inhibition of protein synthesis is independent of initiation factors. MIN6 cells transfected with pCrPV by using Lipofectamine for 48 h, all cells treated with (Tg, 1 μM) except control, [^{35}S]-Methionine was added to all cells include control and then incubated for 4 h at 37°C and 5% CO₂. The luciferase activity of FF and Ren was measured by using Dual-luciferase reporter assay system as R.L.U (a,b). The F/R ratio was checked (c). Total protein synthesis was determined by measuring TCA perceptible count (d). The results are \pm s.e.m of $n \geq 3$ experiments, data were analyzed by using Paired t-test, * P < 0.05, **P<0.01. For F/R ratio data were analyzed by using Mann-Whitney non-parametric test.

the repression of protein synthesis in response to ER stress occurs independently of the cap binding complex : As EMCV IRES, driven FF expression is known to occur independently of eIF4E. the results showed that the activity of Ren from cells transfected with pEMCV (Fig. 3.3) was (approx. 90,000RLU). Upon the addition of Tg, there was a 20-25% decrease in Ren activity compared to untreated cells, and thus readout of ER stress-induced repression of protein synthesis (Fig. 3.3a). Similarly, Tg caused a 30% decrease in FF luciferase activity compared to untreated cells (Fig. 3.3b). Thus, there was no significant change in the FF/Ren ratio demonstrating that both cap-dependent and EMCV IRES dependent translation are equally repressed in response to ER stress (Fig. 3.3c). Therefore, ER stress-induced repression of protein synthesis must occur independently of eIF4E. As a control, the inhibition of protein synthesis in cells treated with Tg was also determined by measuring ^{35}S -Methionine incorporation into protein (Fig. 3.3d).

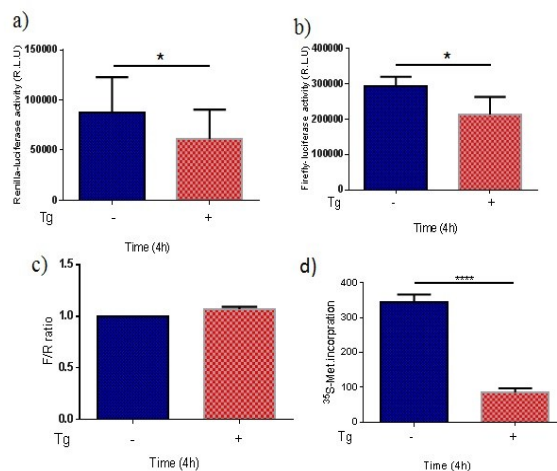


Figure (3). ER stress-induced inhibition of protein synthesis is not dependent on eIF4E. MIN6 cells were transfected with pEMCV (by using Lipofectamine for 48 h, all cells treated with Tg, 1 μM except the control, and [^{35}S]-Methionine was added to all cells including control cells and then incubated for 4 h at 37°C and 5% CO₂. The luciferase activity of FF and Ren was measured by using Dual-luciferase reporter assay system as R.L.U (a,b). The F/R ratio was checked (c). Total protein synthesis was determined by measuring TCA perceptible count (d). The results are \pm s.e.m of $n \geq 3$ experiments, data were analyzed by using Paired t-test, * P < 0.05, ****P<0.0001. For F/R ratio data were analyzed by using Mann-Whitney non-parametric test.

The repression of the initiation of protein synthesis in response to ER stress occurs independently of the cap binding complex or the RNA helicase eIF4A: MIN6 cells were transfected with pHCV. Post transfection, the cells were with Tg (Fig.3.4). The activity of Ren from cells transfected with HCV, under control conditions, was (approx. 27,000RLU).The addition of Tg caused a 25-30% decrease in Ren activity, a readout of ER stress-induced repression of protein synthesis (Fig. 3.4a), and a 35-40 % decrease in the expression of FF driven by the HCV IRES (Fig. 3.4b). The FF/Ren ratio showed no significant changes which demonstrate that both upstream and downstream translations are similarly inhibited by Tg (Fig. 3.4c). As the translation from the HCV IRES is independent of eIF4E/4B/4A, this provides evidence that ER stress-induced repression of protein synthesis is independent of eIF4E, eIF4B, and eIF4A. As a control the rate of protein synthesis was determined in cells treated with thapsigargin, and was measuring ³⁵S-Methionine incorporation into protein (Fig. 3.4d).

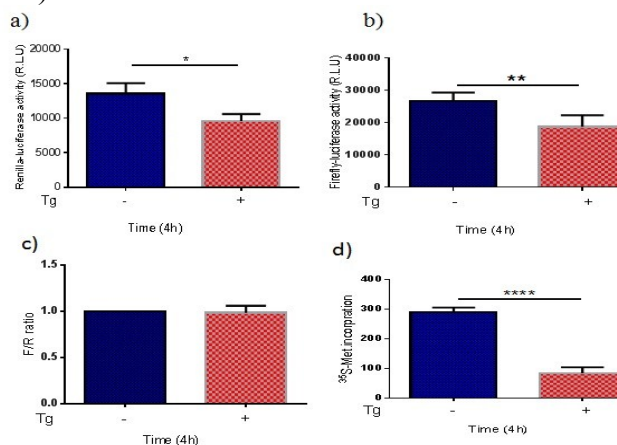
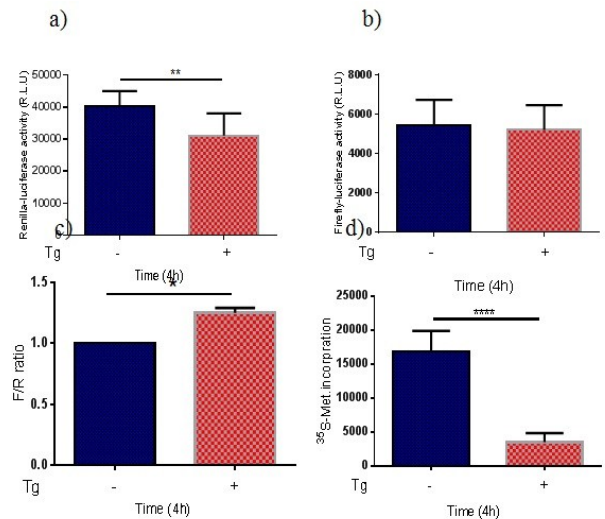


Figure (4). ER stress-induced inhibition of protein synthesis is independent of eIF4E/4B/4A. MIN6 cells were transfected with HCV by using Lipofectamine for 48 h, all the cells treated with (Tg,1μM) except control, [³⁵S]-Methionine was added to all cells including the control and then incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. The luciferase activity of FF and Ren was measured by using Dual-luciferase reporter assay system as R.L. U (a,b). The F/R ratio was checked (c). Total protein synthesis was determined by measuring TCA perceptible count (d). The results are ± S.E.M of n≥3 experiments, data were analyzed by using Paired t-test, * P < 0.05, **P<0.01, ****P<0.0001. For F/R ratio data were analyzed by using Mann-Whitney non-parametric test.



Figure(5).ER stress-induced inhibition of protein synthesis is cap-dependent only. MIN6 cells were transfected with pRF using Lipofectaminefor 48 h. The cells either treated or untreated with (Tg,1μM), [³⁵S]-Methionine was added to all cells (control cells included). incubation time 4 h at 37 °C and 5% CO₂.The luciferase activity of FF and Ren was measured by using Dual-luciferase reporter assay as R.L.U (a,b).The F/R ratio was checked (c). Total protein synthesis was determined by measuring TCA perceptible (d). The results are ± s.e.m of n=3 experiments, data were analyzed by using Paired t-test, * P < 0.05, **P<0.01, ****P<0.001. For F/R ratio data were analyzed by using Mann-Whitney non-parametric test.

Together these results demonstrate that the repression of protein synthesis in response to ER stress is independent on rates of elongation but dependent on changes in the rate of initiation and more specifically changes in initiation factors required for EMCV and HCV IRES mediated translation. One likely initiation factor is eIF2α which is known to be phosphorylated by PERK in response to ER stress resulting in the repression of protein synthesis.

Inhibition of PERK leads to restore protein synthesis in response to ER stress in MIN6 cell:

To investigate the role of PERK-dependent eIF2α phosphorylation in the repression of protein synthesis in response to ER stress, MIN6 cells were either treated or untreated with Tg in the presence or absence of PERK inhibitor (GSK2656157), and the rate of total protein synthesis was determined by measuring ³⁵S-L-Methionine incorporation into protein. The results show that upon the addition

of thapsigargin for 4 h, protein synthesis is inhibited by about 70%. However, in the presence of the PERK inhibitor, recovery of protein synthesis was around 100%. We can, therefore, conclude that the PERK is responsible for the repression of global protein synthesis via its phosphorylation of the α subunit of eIF2 (Fig. 3.6).

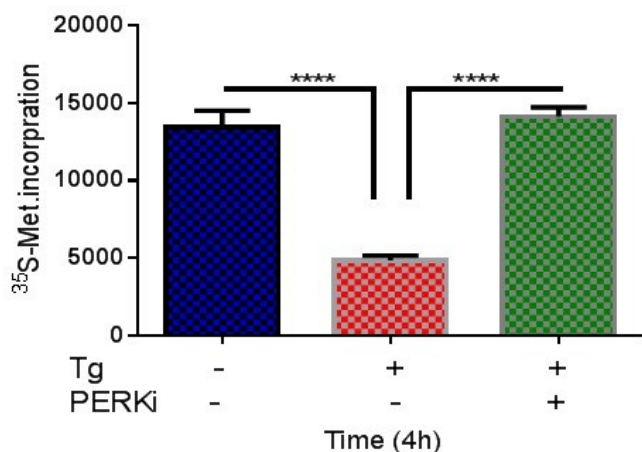


Figure (6). Inhibition of PERK can restore protein synthesis in response to ER stress. MIN6 cells were either treated or untreated (Tg, 1 μ M) with or without PERK inhibitor, GSK2656157 (0.5 μ M added 30 min prior to thapsigargin). [³⁵S]-Methionine was added to all cells including control and then incubated for 4 h (37°C and 5% CO₂). Total protein synthesis was then determined by measuring TCA perceptible count. The results are \pm s.e.m of n=3, data were analyzed by using one-way ANOVA and subsequently with Bonferroni's test, **** P < 0.0001

DISCUSSION

The results showed that the repression in protein synthesis is independent of a group of initiation factors such as eIF4E/4A and 4B. Ribosome binding to picornavirus IRESes such as EMCV IRES requires the complete set of initiation factors necessary for 5' end cap-dependent translation, except eIF4E (Meijer et al., 2013), (Pestova, Hellen, & Shatsky, 1996). eIF4E has an important role in the translation process since protein synthesis and cellular transformation in human and mouse cells are increased upon overexpression of eIF4E (Herbert & Laybutt, 2016). Under stress condition, the phosphorylation of eIF4E and the increasing in rate of translation are not always correlated. For instant, when cells stressed by arsenite or anisomycin show an increase in

eIF4E phosphorylation, however, translation rate is inhibited. Indeed, the inhibition of protein synthesis could be caused by other components of the translational machinery such as eIF2 α phosphorylation (Gingras, Raught, & Sonenberg, 1999). In an agreement with previous studies, the results showed that both cap-dependent and EMCV IRES-dependent translation are equally repressed in response to ER stress and there was no significant change in the FF/Ren ratio (Fig. 3.3c), which indicated that the ER stress-induced repression of protein synthesis must occur independently of eIF4E. Regulation of eIF4E activity is through its interaction with a proteins repressor termed the eIF4E-binding proteins (4E-BPs) (Altmann, Schmitz, Berset, & Trachsel, 1997).

4E-BP1 in its hypo phosphorylation status inhibits the initiation of translation through the interaction with eIF4E, it prevents its binding to other partners of other initiation factor complex including eIF4G. Thus, block the assembly of eIF4F complex. The study provided evidence that ER stress-induced repression of protein synthesis is independent of eIF4E, eIF4B, and eIF4A in HCV IRES. Since the FF/Ren ratio showed no significant changes which demonstrate that both upstream and downstream translations are similarly inhibited by Tg (Fig 3.4). It is believed that the effect of ER stress on translation from HCV IRES is cell-type dependent. In HeLa cells, translation from the HCV IRES is sensitive to the inhibitory effect of ER stress whereas in Huh-7 cells and HEK293T is fairly resistant. HeLa cells are equally sensitive to the inhibitory effects in response to ER stress, which is likely mediated via phosphorylation of eIF2 α (MacCallum et al., 2006). These findings are consistent with other studies that observed the degree of repression was similar in cap dependent and cap-independent translation in response to ER stress, resulting in similar IRES/Cap ratio. Moreover, using Tg shows similar suppressive effects on translational activities (Chan & Egan, 2009). It has been shown that expression of a

phosphorylated eIF2 α mimetic in HeLa cells repressed cap-dependent and IRES-mediated translation to a similar extent (MacCallum et al., 2006). In addition, the results showed that the translation of CrPV IRES was not affected by the addition of Tg, and was able to bypass the effects of ER stress on protein synthesis. As the translation from CrPV IRES is independent of all initiation factors, the repression of cap dependent/total protein synthesis is likely mediated by repression of the activity of an initiation factor (Fig 3.2). Moreover, as the efficiency of the translation from the CrPV IRES is unaffected by ER stress, it is unlikely that ER stress inhibits translation elongation. Therefore, the repression of translation could be through inhibition of a number of initiation factors including eIF2 α . Accumulation of misfolded proteins in the ER leads to phosphorylation of eIF2 α and results in the repression of global protein synthesis. It was reported that the inhibition of cellular translation is mainly caused by phosphorylation of eIF2 α (Wek, Jiang, & Anthony, 2006).

In addition to the phosphorylation of eIF2 α -dependent mechanisms for translational repression during ER stress, mTORC1 suppression activity was in parallel to the eIF2 α -P mechanism. mTORC1 is involved in the regulation of eIF4G, eIF4B and 4EBP1, of which 4EBP1 regulates the function of eIF4E that binds to the 5' mRNA cap structure. Under normal condition, hypophosphorylated 4EBP1 binds tightly to eIF4E. As 4EBP1 competes with eIF4G for binding site on eIF4E, 4EBP1 prevents eIF4G from interacting with eIF4E. However on mTORC1 activation, hyperphosphorylated 4EBP1 dissociates from eIF4E, allowing for the recruitment of eIF4G and eIF4A to the 5' end of a mRNA (Ma & Blenis, 2009). Another mechanism of regulating protein synthesis involves eukaryotic elongation factor 2 (eEF2). Phosphorylation of eEF2 at Thr56 by eEF2 kinase (eEF2K) interferes with the binding of eEF2 to the ribosome and the translocation step during elongation (Browne &

Proud, 2002). As the repression of protein synthesis in this work was independent of eIF4E/4A and 4B initiation factors as well as elongation factors. Thus, we can conclude that the repression of protein synthesis is most likely independent of mTORC1 activation and elongation translation. Accumulating evidence has shown the role of PERK-dependent eIF2 α phosphorylation in the repression of protein synthesis in response to ER stress. The data showed that there was a complete recovery of protein synthesis in the presence of the PERK inhibitor (Fig.3.6) which gives us a strong evidence for the essential role of PERK in protein synthesis. This result is consistent with other findings that prove PERK is required for both the phosphorylation of eIF2 α and the attenuation of translation in response to ER stress (Harding, Novoa, et al., 2000).

There are a number of mechanisms that are involved in the repression of protein synthesis during stress conditions. It was suggested that the regulating of ternary complex formation and subsequently, global translation and protein synthesis is through the competitive inhibition of eIF2B by the phosphorylation of eIF2 α (Ma & Blenis, 2009)[30]. Since eIF2 is highly abundant than eIF2B, phosphorylation of only a fraction of eIF2 inhibits eIF2B and leads to block protein synthesis [31]. Phosphorylation of eIF2 α under cellular stress leads to inhibition of eIF2B activity [28]. Phosphorylated eIF2 binds tightly to the regulatory subunit of eIF2B α , β , and δ which lead to inhibit its activity. Moreover, the inhibition of phosphorylated eIF2 is prevented by deletion of eIF2B α subunit from the complex (Wortham & Proud, 2015). Another mechanism includes the untranslated regions of mRNA, which have been shown an importance in the regulation of protein synthesis. Indeed, specific mRNAs are selectively translated in response to stress conditions when eIF2 is phosphorylated such as mRNA for general control non-depressible 4 (GCN4) in yeast, which is translated in response to amino acid deprivation (Hinnebusch, 2014),

and in mammals ATF4 mRNA is preferentially translated via eIF2 α phosphorylation in response to ER stress which leads to upregulate GADD34, subsequently dephosphorylates eIF2 α with aid of protein phosphatase I, resulting in a recovery of protein synthesis (Rojas, Vasconcelos, & Dever, 2015).

The data suggest that the assay system was able to determine the role of specific initiation factors in investigating how protein synthesis is repressed under conditions of ER stress in real-time based on the luciferase activity. The system has previously been used as a reporter assay in mammalian cells to monitor processing of proteins through the secretory pathway and endoplasmic reticulum monitor after treatment with the ER stress inducer Tg (Browne & Proud, 2002). Indeed, the measurement of total protein synthesis using ^{35}S -L-Methionine incorporation as control indicated that the system we used was efficient. Since we showed about 80% decrease in total protein synthesis whereas there was about 30% inhibition in luciferase (Fig. 3.3 and 3.4), which indicated that the inhibition reflected the target protein that meant to be measured. In Summary, this work is an attempt to identify which initiation factor was responsible for the repression of protein synthesis in response to ER stress. The data showed that the eIF2 α is likely responsible for the repression of protein synthesis in the presence of ER stress. Also, we showed the importance of PERK activation in repression of protein synthesis in response to ER stress.

ACKNOWLEDGMENTS

Elfowiris was supported by OMU, Libya and Herbert was supported by the School of Health and Biomedical Science, RMIT University.

REFERENCES

Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C., & Trachsel, H. (1997). A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to

eIF4E. *The EMBO Journal*, 16(5), 1114-1121. doi:10.1093/emboj/16.5.1114

Back, S. H., & Kaufman, R. J. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*, 81, 767-793. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-095555

Browne, G. J., & Proud, C. G. (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5360-5368.

Chan, S. W., & Egan, P. A. (2009). Effects of hepatitis C virus envelope glycoprotein unfolded protein response activation on translation and transcription. *Archives of Virology*, 154(10), 1631-1640. doi:10.1007/s00705-009-0495-5

Consultation, W. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: *World Health Organization* Part 1 p 65.

Dever, T. E., Chen, J. J., Barber, G. N., Cigan, A. M., Feng, L., Donahue, T. F., . . . Hinnebusch, A. G. (1993). Mammalian eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases functionally substitute for GCN2 protein kinase in the GCN4 translational control mechanism of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 90(10), 4616-4620.

Duncan, R. F., & Hershey, J. W. (1989). Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *The Journal of Cell Biology*, 109(4 Pt 1), 1467-1481.

Evans-Molina, C., Hatanaka, M., & Mirmira, R. G. (2013). Lost in translation:

- endoplasmic reticulum stress and the decline of beta-cell health in diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, 15 Suppl 3, 159-169. doi:10.1111/dom.12163
- Friedland, D. E., Wooten, W. N., LaVoy, J. E., Hagedorn, C. H., & Goss, D. J. (2005). A mutant of eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF4E(K119A) has an increased binding affinity for both m7G cap analogues and eIF4G peptides. *Biochemistry*, 44(11), 4546-4550. doi:10.1021/bi047645m
- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 913-963. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.913
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., & Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *The EMBO Journal*, 14(22), 5701-5709.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099-1108.
- Harding, H. P., & Ron, D. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S455-461.
- Harding, H. P., Zhang, Y. H., Bertolotti, A., Zeng, H. Q., & Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*, 5(5), 897-904. doi:10.1016/S1097-2765(00)80330-5
- Hellen, C. U. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10), 558-570. doi:10.1016/j.bbagr.2009.06.001
- Herbert, T. P., & Laybutt, D. R. (2016). A Reevaluation of the Role of the Unfolded Protein Response in Islet Dysfunction: Maladaptation or a Failure to Adapt? *Diabetes*, 65(6), 1472-1480. doi:10.2337/db15-1633
- Hinnebusch, A. G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 434-467.
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 779-812. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035802
- Hinnebusch, A. G., & Lorsch, J. R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 27pp. doi:10.1101/cshperspect.a011544
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113-127. doi:10.1038/nrm2838
- Kapp, L. D., & Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 657-704. doi:10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419

- Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23425-23428. doi:10.1074/jbc.R400041200.
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 307-318. doi:10.1038/nrm2672
- MacCallum, P. R., Jack, S. C., Egan, P. A., McDermott, B. T., Elliott, R. M., & Chan, S. W. (2006). Cap-dependent and hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation are modulated by phosphorylation of eIF2alpha under oxidative stress. *Journal of General Virology*, 87(Pt 11), 3251-3262. doi:10.1099/vir.0.82051-0
- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*, 340(6128), 82-85. doi:10.1126/science.1231197
- Merrick, W. C. (2010). Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(28), 21197-21201. doi:10.1074/jbc.R110.111476
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320-325. doi:10.1038/334320a
- Pestova, T. V., Hellen, C. U., & Shatsky, I. N. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Molecular and Cellular Biology*, 16(12), 6859-6869.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., & Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Development*, 12(1), 67-83.
- Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochemical Journal*, 403(2), 217-234. doi:10.1042/BJ20070024
- Robertson, H. D., & Branch, A. D. (1987). RNA processing--a meeting review. *Genes & Development*, 1(5), 415-417.
- Rojas, M., Vasconcelos, G., & Dever, T. E. (2015). An eIF2alpha-binding motif in protein phosphatase 1 subunit GADD34 and its viral orthologs is required to promote dephosphorylation of eIF2alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 112(27), E3466-3475. doi:10.1073/pnas.1501557112
- Vagner, S., Galy, B., & Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep*, 2(10), 893-898. doi:10.1093/embo-reports/kve208
- Wek, R. C., Jiang, H. Y., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.

Biochemical Society Transactions,
34(Pt 1), 7-11.
doi:10.1042/BST20060007

Wortham, N. C., & Proud, C. G. (2015).
eIF2B: recent structural and
functional insights into a key
regulator of translation. *Biochemical
Society Transactions*, 43(6), 1234-
1240. doi:10.1042/BST20150164

اختبار الآليات الجزيئية المسببة في تثبيط عمليات ترجمة البروتين في حالة إجهاد الشبكة الإندوبلازمية داخل الخلية

عبد السلام فضيل الفويرس^{1*}، تيرينس ب. هيرت²

¹ قسم علم السموم، كلية الصيدلة، جامعة عمر المختار، البيضاء-ليبيا

² مدرسة الصحة والعلوم الطبية الحيوية، جامعة RTM، ملبورن-أستراليا

تاريخ الاستلام: 13 يناير 2018 / تاريخ القبول: 01 أكتوبر 2018

© مجلة المختار للعلوم 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.192>:Doi

المستخلص: طَيّ البروتين هو عملية هامة لوظيفة الخلية. الشبكة الإندوبلازمية في الخلية هي المسؤول عن تصنيع، طَيّ، تعديل، ومراقبة الجودة للعديد من البروتينات التي تعمل وتفرز من خلال الغشاء، إن الاضطرابات داخل الخلايا والتي تنجم عن الضغوطات المختلفة قد تؤدي إلى تراكم البروتينات وعدم طَيّها بالصورة الصحيحة، والتي يمكن أن تؤدي إلى تغيير أو اختلال في التوازن داخل الشبكة الإندوبلازمية، إذا استمر تراكم البروتينات غير المطوية بصورة صحيحة داخل الشبكة الإندوبلازمية، يتم تحديث استجابة من الخلية للتغلب على هذا الوضع. وهذه الاستجابة تعمل عن طريق ثلاث آليات مختلفة: (1) زيادة قدرة البروتين للطَيّ، (2) تقليل من تخليق البروتين، و(3) تعزيز عملية التخلص من البروتينات غير المطوية بشكل صحيح، وذلك عن طريق تنشيط عوامل ومسارات مثل (ATF6)، 1 (IRE1) و (PERK) وذلك لاستعادة توازن الخلية وفي حالة إذا فشلت الخلية في الاستعادة أو التغلب على عيب الطَيّ البروتين، يتم تنشيط مسارات تؤدي إلى موت الخلية.

الكلمات المفتاحية: إجهاد الشبكة البرونوبلازمية، بروتين كيناز شبكية إندوبلازميك، الترجمة، الاستجابة لعدم طَيّ البروتين، تخليق البروتين، اليراع، رينيل، خلايا مشتقة من فأر محور جينيًا.

*عبد السلام الفويرس Abdulsalam.eafowiris@omu.edu.ly، قسم علم السموم، كلية الصيدلة، جامعة عمر المختار، البيضاء-ليبيا.



Evaluation of Gallbladder Motility in Patients With Functional Gallbladder Disorder

Salem M. Awami

Department of medicine, Faculty of medicine, Omar AL-Mukhtar University, Al-Bayda- Libya

Received: 03 April 2018./ Accepted: 05 November 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.208>

Abstract: Rome IV defines Functional gastrointestinal disorders (FGID) as disorders of gut-brain interaction. It is a group of disorders classified by gastrointestinal symptoms related to any combination of the following: motility disturbance, visceral hypersensitivity, altered mucosal and immune function, altered gut microbiota, and altered central nervous system processing. Patients with Gallbladder Functional disorder (GBFD) may have abnormal gastric emptying and colonic transit, suggesting a possible generalized gastrointestinal motility disorder. The presentation of functional gallbladder disorder mimics classic symptoms of biliary pain. 27 patients and 27 healthy volunteers (7 males and 20 females) in each group, age between 21 and 48 years were included into the study, and diagnosis of functional gallbladder disorder was based on Rome III criteria. All patients were given a standard test fatty meal, and Gallbladder volume was calculated manually by using the ellipsoid formula (Dodd's formula). The pre-meal and post-meal gallbladder volumes and ejection fraction (EF) of the gallbladder (GB) were estimated. The patients and control groups were compared for age, gender, and body mass index. The body mass index in our control and patients was high indicating a prevalence of overweight in both groups. This study demonstrated that fatty meal ultrasound is a cheap, easy to handle, and physiologic. GBFD patients have decreased emptying of gallbladder compared to healthy subjects. GBFD should be considered in patients presented with recurrent right upper quadrant abdominal pain, decreased emptying of gallbladder in the absence of visualized gallstones on abdominal ultrasound, and meeting the Rome III criteria.

Keywords: Irritable bowel syndrome, IBS, Rome III diagnostic criteria, abdominal pain or discomfort, Functional gastrointestinal disorders, (FGID).

INTRODUCTION

Functional gastrointestinal disorders are due to disturbances in sensory and/or motor gastrointestinal function, which may overlap across anatomic regions leading to a generalized functional abnormality of the smooth muscle of the gastrointestinal tract, the Gallbladder, the urinary bladder, and even of the bronchial tree (Drossman 1999). Rome IV defines Functional GI disorders as follows: "Functional GI disorders are disorders of gut-brain interaction. It is a group of disorders classified by Gastrointestinal symptoms related to any combination of the following: motility disturbance, visceral hypersensitivity,

altered mucosal and immune function, altered gut microbiota, and altered central nervous system processing (Whitehead *et al.*, 2017). The presentation of functional gallbladder disorder mimics classic symptoms of biliary pain, which manifests as steady, severe epigastric or right upper quadrant pain that might radiate through to the back and right infrascapular regions, lasting for at least thirty minutes but less than 6 hours. It can be associated with symptoms of nausea and vomiting and may awaken the patient from sleep. It has been noted that patients with functional gallbladder disorder may have abnormal gastric emptying and co-

*Corresponding Author: Salem Awami, salemawami@yahoo.com Faculty of Medicine, Omar AL-Mukhtar University, El-Bayda, Libya

lonic transit, suggesting a possible generalized gastrointestinal motility disorder. The diagnosis begins with the exclusion of other likely causes including functional dyspepsia, ischemic heart disease, sphincter of Oddi dysfunction, common bile duct obstruction, and peptic ulcer disease. Patients usually have blood work that is normal, normal liver and pancreatic biochemistries, and negative diagnostic imaging (Hansel and DiBaise 2010).

Table(1): the Rome III diagnostic criteria for functional gallbladder disorder published by Behar et al 2006.

It must include episodes of pain located in the epigastrium and/or right upper quadrant and all of the following findings:
<ul style="list-style-type: none"> • Gallbladder is present • normal liver enzymes, conjugated bilirubin, and amylase/lipase • episodes lasting ≥ 30 minutes • recurrent symptoms occurring at different intervals (not daily) • The pain builds up to a steady level • The pain is moderate to severe enough to interrupt the patient's daily activities or lead to an emergency department visit • The pain is not relieved by bowel movements • The pain is not relieved by postural change • The pain is not relieved by antacids • exclusion of other structural diseases that would explain the symptoms
Supportive criteria: The pain may present with one or more of the following findings:
<ul style="list-style-type: none"> • Pain is associated with nausea and vomiting • Pain radiates to the back and/or right infra subscapular region • Pain awakens the patient from sleep in the middle of the night

The gallbladder ejection fraction (GBEF) is abnormal in patients with functional gallbladder disorder. However, many of the studies supporting the use of the GBEF for diagnosis are not conclusive (DiBaise *et al.*, 2011). Diagnosis of functional gallbladder disorder is based on characteristic symptoms

and abnormal gallbladder function resulting in low gallbladder ejection fraction (GBEF). Oral cholecystography was the first imaging modality used to assess gallbladder dyskinesia depending on visual X-ray film assessment of gallbladder contraction after fatty meal. Other method of assessment of gallbladder contractility in terms of ejection fraction (EF) is calculated from a hepatoinodiacetic acid (HIDA) scan. Although ultrasound is considered the modality of choice for evaluating gallstones (Cooperberg and Burhenne 1980), it currently has a limited application in evaluating functional biliary disease, such as gallbladder dyskinesia. Most researchers define a normal EF as $>35\%$ (Francis and Baillie 2011), but the Rome III criteria use a cutoff of 40%. A patient who has an EF $<40\%$ and meets the other guideline criteria is diagnosed with functional gallbladder disorders (FGBD) (Goussous *et al.*, 2017). Surgical gallbladder removal (cholecystectomy) results in pain relief in more than 90% of the individuals with gallbladder dyskinesia (Mahid *et al.*, 2009).

Therefore, our study is aimed to investigate gallbladder motility in patients with functional gallbladder disorder diagnosed by Rome III diagnostic criteria for functional gallbladder disorder published by (Behar *et al.*, 2006); and in healthy subjects using a real time ultrasonography measurement.

Patients and methods: 27 patients and 27 healthy volunteers (7 males and 20 females) in each group, age between 21 and 48 years were included into the study, and diagnosis of functional gallbladder disorder was based on Rome III criteria. Table (1). All subjects gave informed consent for the study. All subjects with functional gallbladder disorder had normal results of the following tests: complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, stool hemocult test, stool culture, stool test for ova and parasites, urinalysis, blood chemistry, thyroid function tests, and studied

for anti-tissue transglutaminase IgA and IgG antibodies for Coeliac Disease.

Exclusion criteria: It includes: gallstone disease, history of cholecystectomy, diseases that influence gallbladder functions (e.g. diabetes mellitus, thyroid diseases). Also patients being prescribed drugs known to affect secretion or gallbladder motility were excluded. Gallbladder measurements were performed by the ultrasound machine with a 3.5 MHz convex transducer. The gallbladder was measured in three dimensions, one longitudinal (D1) and cross-sectional diameter (D2) and depth (D3), and the volume was calculated manually by using the ellipsoid formula (Dodd’s formula): Volume = (D1 cm x D2 cm x D3 cm) X π /6 = volume ml. All patients were studied after 12-hours of fasting and 45 min after eating. All patients were given a standard test fatty meal to stimulate gallbladder contraction: one egg, butter cube (30 g), and a single bread slice (Kishk *et al.*, 1987, Irshad *et al.*, 2011).The pre-meal and post-meal gallbladder volumes were substituted into the following formula to calculate the ejection fraction (EF) of the gallbladder (GB). EF (%) = fasting GB volume – postprandial GB volume ÷ fasting GB volume %.

Statistical analysis: All analyses, descriptive Statistics, analysis of variance (ANOVA), and Correlations (Pearson) were done using Windows-based Minitab Statistical Package (version 11.12), and P values 0.05 were considered as significant.

RESULTS

The patient and control groups were comparable for age, gender, body mass index. The body mass index in our control and patient was high indicating a prevalence of overweight in both groups, although the mean body mass index in control group is insignificantly lower than patient group (ANOVA p: 0.104) (WHO 854 (1995), (WHO 894 (2000.) table (2). The fasting gallbladder volume (FGV) was similar in patient and control groups (18.1 ± 3.0 ml vs. 18.1 ± 2.6 ml, ANOVA p 0.962), whereas the Postprandial gallbladder volume PGBV was lower in control group than in the patient group (6.6 ± 0.423 ml vs. 8.4 ± 0.542 ml, ANOVA p = 0.012).

Table (2): The characteristic features of study and control groups (BMI body mass index, FGBV fasting gallbladder volume, PGBV Postprandial gallbladder volume)

Variable	N (Female/Male)	Mean	SE Mean	Min	Max
Age Control	27 (20/7)	37.41 ±	1.61	21.00	48.00
Age Patient	27 (20/7)	38.19 ±	1.65	21.00	48.00
BMI Control	27 (20/7)	29.74 ±	1.24	17.40	45.50
BMI Patient	27 (20/7)	32.74 ±	1.33	20.10	53.40
FGBV in control	27 (20/7)	18.11 ±	0.60	12	24
FGBV in patient	27 (20/7)	18.20 ±	0.50	14	23
PGBV in control	27 (20/7)	06.60 ±	0.423	04	13
PGBV in Patient	27 (20/7)	08.40 ±	0.60	04	15

Table (3) : Descriptive Statistics of results of Gallbladder Ejection Fraction (EF) measurements

Variable	N	Mean ± SE Mean	EF< average	EF< 40%
EF Control	27	62.60 ± 2.03	09 (33%)	3 (11%)
EF Patient	27	53.78 ± 2.57	10 (37%)	8 (30%)
EF Control Female	20	61.29 ± 2.65	08 (40%)	3(15%)
EF Control Male	07	66.33 ± 1.44	01 (14%)	0 (00%)
EF Patient Female	20	52.64 ± 3.14	09 (45%)	7 (35%)
EF Patient Male	07	57.03 ± 4.37	01 (14%)	1 (14%)

The mean EF of gallbladder in control group was higher than that in the patient group (62.6% vs. 53.87%, ANOVA P: 0.010), and this was also true in comparisons of patient and control female (61.29% vs. 52.641%, ANOVA P:0.042); but insignificant difference of GBEF was found among patient and control males (66.33% vs. 57.03%, ANOVA P: 0.066). Nine out of 27 (33 %) of control group were below average GBEF, and one out of 27 (3.7%) of control group was

below or equal to 35% of GBEF. Ten out of 27 (37 %) of patient group were below average GBEF, and five out of 27 (18%) of patient group were below or equal to 35% of GBEF. Table (3) There was a strong negative correlation between EF and BMI in both groups (P < 0.01), and a significant negative correlation between EF and age in patient group (P < 0.05); Table (4)

Table (4): Correlations (Pearson) between EF and age, BMI in both groups (EF, Ejection fraction, BMI, Body mass index)

Correlations (Pearson)			
gallbladder EF and BMI in Control	= -0.541**	P= 0.004	
gallbladder EF and BMI in Patient	= -0.643**	P= 0.000	
Age and EF in Control	= 0.072	P= 0.722	NS
Age and EF in patient	= -0.482*	P= 0.011	

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).
 ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

DISCUSSION

In this study, we investigated the motility of gallbladder by using real time ultrasonography in FGBD patients and none FGBD control, we used fatty meal as a stimulant of indigenous cholecystokinin (CCK), and the gallbladder emptying study was based on a geometric formula (Çay *et al.*, 2006). There was no difference in basal volumes of the gallbladder between the control group (mean 18.1 ml) and

the patients (18.2 ml). This result is lower than that in a study by (Palotta *et al.*, 1994), they found in their study in Italy on 150 healthy volunteers a mean fasting GBV of 23.8 cm³ (±12.5). This slight difference could be attributed to the relatively younger age of our study group (Palasciano *et al.*, 1992) have found in a sonographic population study among Italians that gallbladder volume significantly increased with age in healthy non-obese males. Endogenous cholecystokinin (CCK) stimulates hepatic bile secretion, gallbladder

contraction, and relaxes the sphincter of Oddi. However, postprandial gallbladder contraction is characterized by an immediate cephalic phase regulated by a sequence of excitatory cholinergic vagal nerves, and rate of gastric emptying and endogenous cholecystokinin. Therefore, all these factors could play a role in gallbladder motility in health and disease (Funch-Jensen *et al.*, 2006). The mean differences in the fasting and postprandial gallbladder volume and ejection fraction were lower in the patient group compared to controls (P: 0.010). The cutoff of GBEF equal to 40%, which set by Rome III is met by 30% of patients and 11% of control (none of male control has value <40%) (Table III). This might explain the possibility of a statistical association of functional gallbladder disorder and gallbladder hypomotility. In our study, there is a strong significant negative correlation between BMI and gallbladder ejection fraction (Sari *et al.*, 2003). Table IV, gallbladder dysfunction denote a condition where the gallbladder empties insufficiently in a patient with biliary symptoms without demonstrable organic substrate such as gallstones. Some researches claim that functional gallbladder disorder is initiated by fatty infiltration of the gallbladder wall, causing increasing levels of inflammation and steatocholecystitis that lead to poor motility (Goldblatt *et al.*, 2006, Tsai 2009). The relative risk of gallstone formation appears to rise as body weight increases, and this positive correlation with increasing BMI is more pronounced when BMI exceeds 30 kg/m² (Kim and Popkin 2006). The limitations of our study were the lack of clear cutoff value of gallbladder ejection fraction, and USG is highly operator-dependent. The gallbladder has various configurations at fasting, and changes its shape during contraction resulting in inaccuracies in ultrasonographic estimation of gallbladder volume and contractility (Hurrell *et al.*, 1994). It would be difficult to discriminate stone impaction from sphincter of Oddi dysfunction on fatty-meal ultrasonography (Varghese *et al.*, 2000). In conclusion, this study demonstrated that fatty meal ultrasound is a cheap, easy to handle, and physiologic.

Gallbladder Functional disorder (GBFD) patients have decreased emptying of gallbladder compared to healthy subjects.

GBFD should be considered in patients presented with recurrent right upper quadrant abdominal pain, decreased emptying of gallbladder in the absence of visualized gallstones on abdominal ultrasound, and meeting the Rome III criteria (Jung *et al.*, 2017).

REFERENCES

- Behar, J., Corazziari E., Guelrud M., Hogan W., Sherman S., & Toouli J. (2006). Functional gallbladder and sphincter of Oddi disorders. *Gastroenterology*, 130(5):1498-1509.
- Çay, A., İmamoğlu M., Sarihan H., & Ahmetoğlu A. (2006). Ultrasonographic evaluation of fatty meal stimulated gallbladder contraction in the diagnosis of biliary dyskinesia in children. *Acta Paediatrica*, 95(7):838-842.
- Cooperberg, P., & Burhenne H. (1980). (Real-time ultrasonography: diagnostic technique of choice in calculous gallbladder disease. *New England Journal Of Medicine* 302(23):1277-1279.
- DiBaise, J. K., Richmond B. K., Ziessman H. H., Everson G. T., Fanelli R. D., Maurer A., Ouyang A., Shamamian P., Simons R. J., & Wall L. A. (2011). Cholecystokinin-cholescintigraphy in adults: consensus recommendations of an interdisciplinary panel. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(5):376-384.
- Drossman, D. A. (1999). The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *BMJ Publishing Group*, 45(Suppl II):II1-II5.

- Francis, G., & Baillie J. (2011). Gallbladder dyskinesia: fact or fiction? *Current Gastroenterology Reports* 13(2):188-192.
- Funch-Jensen, P., Drewes A. M., & Madácsy L. (2006). Evaluation of the biliary tract in patients with functional biliary symptoms. *World journal of gastroenterology: WJG* 12(18):2839.
- Goldblatt, M. I., Swartz-Basile D. A., Al-Azzawi H. H., Tran K. Q., Nakeeb A., & Pitt H. A. (2006). Nonalcoholic fatty gallbladder disease: the influence of diet in lean and obese mice. *Journal of gastrointestinal surgery*, 10(2):193-201.
- Goussous, N., Maqsood H., Spiegler E., Kowdley G. C., & Cunningham S. C. (2017). HIDA scan for functional gallbladder disorder: ensure that you know how the scan was done. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 16(2):197-201.
- Hansel, S. L., & DiBaise J. K. (2010). Functional gallbladder disorder: gallbladder dyskinesia. *Gastroenterology clinics of North America*, 39(2):369-379.
- Hurrell, M. A., Chapman B. A., & Wilson I. R. (1994). Variation in the estimation of gallbladder volume using the sum-of-cylinders method. *Investigative Radiology*, 29(5):536-539.
- Irshad, A., Ackerman S. J., Spicer K., Baker N., Campbell A., Anis M., & Shazly M. (2011). Ultrasound evaluation of gallbladder dyskinesia: comparison of scintigraphy and dynamic 3D and 4D ultrasound techniques. *American Journal of Roentgenology*, 197(5):1103-1110.
- Jung, S. W., Joo, M. S., Choi, H. C., Jang, S. I., Woo, Y. S., Kim, J. B., . . . Lee, M. S. (2017). Epigastric symptoms of gallbladder dyskinesia mistaken for functional dyspepsia: Retrospective observational study. *Medicine*, 96(16).
- Kim, S., & Popkin B. M. (2006). Commentary: Understanding the epidemiology of overweight and obesity—a real global public health concern. *International Journal Of Epidemiology*, 35, (1):60-67.
- Kishk, S., Darweesh R., Dodds W. J., Lawson T. L., Stewart E. T., Kern M. K., & Hassanein E. H. (1987). Sonographic evaluation of resting gallbladder volume and postprandial emptying in patients with gallstones. *American Journal of Roentgenology*, 148, (5):875-879.
- Mahid, S. S., Jafri N. S., Brangers B. C., Minor K. S., Hornung C. A., & Galandiuk S. (2009). Meta-analysis of cholecystectomy in symptomatic patients with positive hepatobiliary iminodiacetic acid scan results without gallstones. *Archives of surgery*, 144(2):180-187.
- Palasciano, G., Serio G., Portincasa P., Palmieri V., Fanelli M., Velardi A., Gabrieli B. C., & Vinciguerra V. (1992). Gallbladder volume in adults, and relationship to age, sex, body mass index, and gallstones: a sonographic population study. *American Journal of Gastroenterology*, 87(4) :493-497.
- Palotta, N., Corazziari E., Giliotti D., & Torsoli A. (1994). Gallbladder volume variations after meal ingestion. *American Journal of Gastroenterology*, 89(12) 2212-2216.

- Sari, R., Balci M. K., Coban E., &Karayalcin U. (2003). Sonographic evaluation of gallbladder volume and ejection fraction in obese women without gallstones. *Journal Of Clinical Ultrasound*, 31(7):352-3.57
- Tsai, C.-J. (2009). Steatocholecystitis and fatty gallbladder disease. *Digestive diseases and sciences* 54(9):1857-1863.
- Varghese, J., LiddellR., Farrell M., Murray F., Osborne D., &Lee M. (2000). Diagnostic accuracy of magnetic resonance cholangiopancreatography and ultrasound compared with direct cholangiography in the detection of choledocholithiasis. *Clinical Radiology*, 55(1):25-35.
- Whitehead, W. E., Palsson O. S., &Simrén M. (2017). Irritable bowel syndrome: what do the new Rome IV diagnostic guidelines mean for patient management?*Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 11(4):281-283.
- WHO (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series*, 854.
- WHO (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. *WHO Technical Report Series*, 894.

تقييم حركية الحوصلة المرارية في المرضى الذين يعانون من اضطراب المرارة الوظيفي

سالم محمد العوامي

قسم الامراض الباطنة كلية الطب البشري، جامعة عمر المختار، البيضاء. ليبيا

تاريخ الاستلام: 03 أبريل 2018 / تاريخ القبول: 05 نوفمبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.208>:Doi

المستخلص: عرف اجتماع روما الرابع اضطرابات الجهاز الهضمي الوظيفية كاضطرابات في تفاعل الأمعاء مع الدماغ، وازداد التعريف أنها مجموعة من الاضطرابات المصنفة من قبل أعراض الجهاز الهضمي المتعلقة بأي مزيج مما يلي: اضطراب حركة الجهاز الهضمي، فرط الحساسية الحشوية، وتغيير كل من الغشاء المخاطي والمناعة، والجراثيم المعوية، وتفاعل الجهاز العصبي المركزي للمرضي. المرضى الذين يعانون من اضطراب المرارة الوظيفي قد يكون إفراغ المعدة والقولون غير طبيعي، مما يشير إلى احتمال تعميم اضطراب حركية الجهاز الهضمي. عرض اضطراب المرارة الوظيفي يحاكي الأعراض الكلاسيكية لألم القناة الصفراوية، تم تضمين 27 مريض و 27 متطوعاً أصحاء (7 ذكور و 20 إناث) في كل مجموعة، تتراوح أعمارهم بين 21 و 48 سنة في الدراسة، واستند تشخيص اضطراب المرارة الوظيفي على معايير اجتماع روما الثالث. أعطيت جميع المرضى وجبة اختبار الدهون القياسية، وتم حساب معدل انقباض وإفراغ الحوصلة المرارية يدوياً باستخدام الصيغة الإهليلجية (صيغة دود) بعد إجراء صورة الموجات الصوتية. تم تقدير حجم المرارة قبل وبعد وجبة طعام خاص ومن ثم تم حساب معدل إفراغ الحوصلة المرارية، في مجموعتين مقارنة من المرضى الذين يعانون من اضطراب المرارة الوظيفي والذين لا يعانون؛ وكانت كلتا المجموعتين متقاربة في العمر والجنس ومؤشر كتلة الجسم. كان مؤشر كتلة الجسم في كلتا المجموعتين مرتفع، مما يوحي بانتشار زيادة الوزن في كلتا المجموعتين. المناقشة والخلاصة: أظهرت الدراسة أن اختبار وظيفة وانقباض الحوصلة الصفراوية باستخدام الموجات فوق الصوتية تحت تأثير وجبة طعام خاص معدة من الدهون هي سهلة وفسولوجية وريضة، ونتج في هذا الاختبار انخفاض معدل تفريغ المرارة عند المرضى مقارنة مع الأشخاص الأصحاء. ومن هذا نستنتج بأن المرضى الذين يعانون من اضطراب المرارة الوظيفي يعانون من الام متكررة في الربع العلوي الأيمن للبطن، وانخفاض معدل إفراغ المرارة في غياب حصى في المرارة بعد استعمال الموجات فوق الصوتية، وتلبية معايير اجتماع روما الثالث.

الكلمات المفتاحية: اضطرابات الجهاز الهضمي الوظيفي، اضطرابات المرارة الوظيفية، انقباض الحوصلة الصفراوية، الموجات فوق الصوتية، وجبة دهنية.



Age Structure and Current Status of Aleppo Pine (*Pinus Halepensis*) Trees on the Western Side of Sidi Alhumry Pine Plantation in Aljabal Al-Akhdar Region

Attia. A. Alsanousi and Abdusalam. M. Ali

Department of Forests and Rangelands, Faculty of Natural Resources and Environmental Sciences, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda- Libya

Received: 26 April 2018/ Accepted: 08 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.209>

Abstract: Aleppo pine trees have been extensively planted in many areas in Aljabal Al-Akhdar region for ecological and recreational purposes. The objectives of this study were to investigate the age structure and current status of *Pinus halepensis*. Miller trees on the western side of Sidi Alhumry plantation. More than 70 pine trees were sampled to estimate the year of establishment, parameters for dbh and tree-height were noted for every sampled tree in the study design. The oldest pine tree found on the site was established in 1962 while the youngest tree found was established in 1984. Our results indicated a gap of over 20 years between pine trees on the study area which suggests either a long afforestation process or an effective regeneration during the first 2 decades. Average dbh and height for pine trees were typical for similar pine stands in the area with an overall dbh average of 29cm and tree-height of 10m. However, thinning would be advisable to ensure better growth and high yield for pine trees on the site.

Keywords: *Pinus halepensis* , Age structure, Sidi Alhumry Pine Plantation.

INTRODUCTION

Pinus species are planted in many areas around the world for multiple purposes. They provide both ecological (recreational areas, carbon sequestration, and preventing soil erosion) and commercial benefits (logs and wood production) (Richardson, 1998) (Barbéro, Loisel, Quézel, & Richardson, 1998) (Lavi, Perevolotsky, & Kigel, 2005). In eastern Libya (Cyrenaica), the establishments of pine plantations took place roughly around the 1950s, and were mostly for environmental purposes. *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine) is the most widespread coniferous species in the Mediterranean basin (Barbéro, Loisel, Quézel, & Richardson, 1998) (Prevosto, Amandier, Quesney, & de Boisgelin, 2012) (Maestre & Cortina, 2004) (Pu-

glisi, 1995) (Novak, et al., 2016) (Michelozzi, Loreto, Colom, Rossi, & Calamassi, 2011), and it is among the few conifer species which can thrive in semiarid regions (Que'zel, 2000) (Nahal, 1981), and favorable for afforestation purposes due to its tolerance to drought (Schiller, 2000). In Cyrenaica, it is considered to be second only to Phoenician Juniper (*Juniperus phoenicea*), and grows naturally in pure or mixed stands across Aljabal Al-Akhdar region. Nevertheless, the vast number of Aleppo pine trees in the region occurs in plantations established over 60 years ago. Sidi Alhumry Pine Plantation is one of the largest Aleppo pine plantations in Cyrenaica, and expands on an area of approximately 108 ha. The plantation is considered as one of the oldest pine plantations in the

*Corresponding Author: ¹(Attia Alsanousi) attiaalsanousi@yahoo.com. Department of forests and Rangelands, Faculty of Natural resources & Environmental Sciences, Omar Al-Mukhtar University. Al-Beida, Libya

southern part of Al-jabal Al-Akhdar and classified as a pure *P. halepensis* stand. Previous report stated that the plantation was established in 1951 (OMUReport, 2005). The same report mentioned that the actual establishment of the plantation took place between 1954- 1956. However, the shortage of information about the afforestation process and whether the site was occupied by pine trees prior to the establishment was a great motive to investigate the age structure for this site.

This study aims at examining the age structure at which the majority of *P. halepensis* trees on the western part of the plantation occur, and to determine whether the natural regeneration was effective especially during the first years of establishment to create different cohorts of pine trees.

MATERIALS AND METHODS

Field data for this study were collected in the time between July and October of 2013 from Sidi Alhumry Pine Plantation in the southern part of Al-Jabal Al-Akhdar (32° 32' N, 21°47' E). Four random locations were chosen to set triangular experimental design (methods were similar to Binkley, et al., 2014). At each location, an equilateral triangle (50 m each side) was placed and 3 sampling points were conducted at each of the triangle points (total of 12 sampling points). At each sampling point, a BAF (basal area factor) prism of 2 m².ha⁻¹ for high density coniferous stands was used to determine Pine sampled trees (Bentley, 1996) (Nyyssönen, Kilkki, & Mikkola, 1967). All pine trees included by prism were cored at the height of 1.4 m to determine the year of establishment, and all of the uncertain borderline trees were counted in to avoid data misinterpretation. A circle of 5m radius was made at each sampling point to count the number of emerging seedling of pine trees on the site. Other parameters including diameter at breast height (dbh) and tree height were also recorded for statistical analysis. All sampled pine cores were left to air drying for several days, then were mounted on wooden trays and sanded with a

fine sandpaper to obtain a better vision of the annual rings. Annual rings for these trees were dated by using a binocular microscope and following standard dendrochronological procedures (Stokes & Smiley, 1968). Missing rings for Aleppo Pine cores which failed to reach the pith were calculated by estimating the length of the missing radius and ring width (Duncan, 1989). dbh was measured for all sampled trees by using dbh tape or a caliper, and trees heights were measured by using Silva clinometer (Avalos, Salazar, & Araya, 2005) at a distance of 20 m from the tree base (Wright, Jessen, Burke, & Garza, 1997). The data obtained in this study were extrapolated to give a better representation of the age structure of Aleppo Pine trees on the site. The number of trees/ha represented by each tree included by the prism had been calculated by using the basal area for each tree and the chosen basal area factor. Then, the age of the sampled tree was assumed to be the age of the calculated number of trees.

RESULTS

Out of 81 core samples of *P. halepensis*, 73 were dateable and suitable to count the annual rings for each. The rest were either damaged or difficult to identify their total rings, therefore, they were eliminated from statistical analysis. 46 out of 73 (almost 63% of the total core samples) hit the pith of the tree, and 28 (37% of the total core samples) failed to reach the pith and the missing rings were calculated according to the radius of the previous rings, and by estimating the remaining rings to hit the pith (Duncan, 1989). The oldest tree in our sampling plots was established in 1962 (current age is 56 years) while the youngest tree was established in 1984 (current age is 34 years). The estimated number of pine trees per hectare on the western side of the plantation was 747 trees/ha. The establishment of those trees occurred during the time from 1962 to 1984 creating multiple cohorts of more than 20 years differences in their age. Since the establishment, the number of pine trees/ha has increased to reach its peak at age class of (1977-1979),

which has the highest presentation of pine trees on the site, with approximately 243 trees/ha (32% of the total pine occupation) followed by age class of

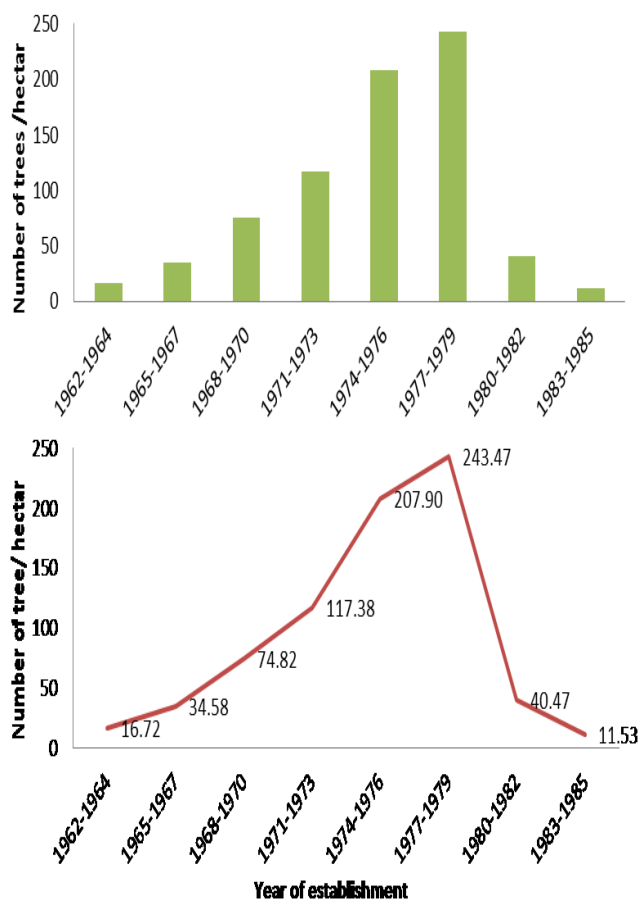


Figure (1): Age distribution of Aleppo Pine (*P. halepensis*) on the western side of Sidi Alhumry Pine Plantation.

(1974-1976) with 208 trees/ha (around 28% of the total pine occupation) as shown in (figure1) (table 1). The number of trees/ha dropped significantly in age class of (1980-1982) to only 40 trees/ha. The lowest pine recruitments encountered were in age classes (1962-1964) and (1983-1985) with just 16.8 and 11.5 trees/ha respectively.

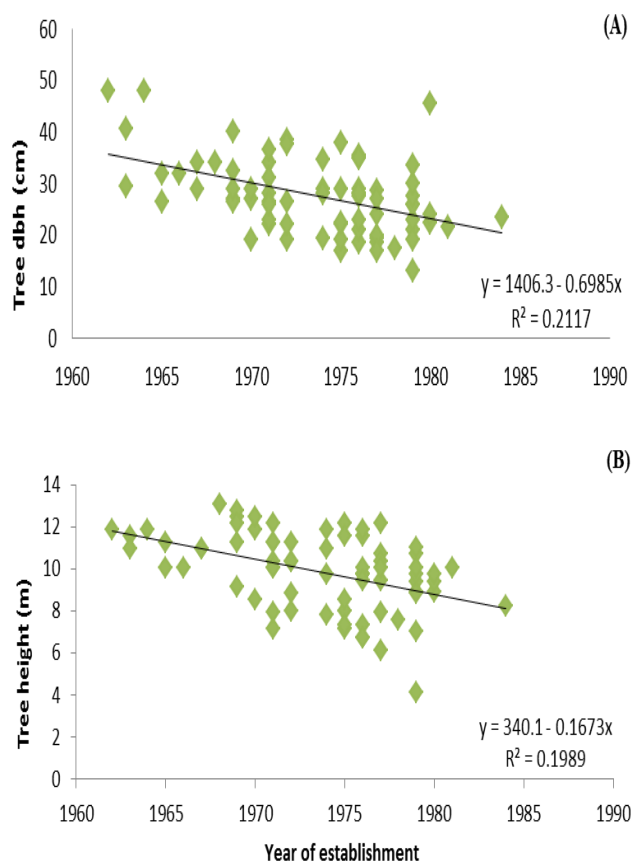


Figure (2): The relationship between tree age and other parameters: (A) Age-dbh relationship. (B) Age- tree height relationship of Aleppo Pine tree on Sidi Alhumry Pine Plantation.

As the tree grows, it encounters an increase in both size and height. Older trees have the highest dbh recorded with 41.5 cm for age class (1962-1964), more than 10 cm bigger than the next age class (1965-1967) with 30.7 cm. The gap between dbh averages for the rest of age classes were tight and ranged from 29.3cm to 23.5cm for all age classes from 1968 to 1985. Average pine tree height as well showed a steady but narrow increase over years. Youngest age class of (1983-1985) showed the lowest height of approximately 8.2 m while the highest tree height recorded was for the oldest age class of (1962-1964) with an average of 11.55m. (Figure 2, and table 1). Results showed also that average height for pine trees of age class (1968-1970) (11.51m) was higher than that for the older age class of (1965-1970) (10.64m).

Not a single *P. halepensis* seedling was found in a radius of 5m at any of the twelve sampling points in this study, which suggests a very low regeneration percentage in the recent years.

Table (1): Number of trees/ha and average diameter at breast height (cm) and average tree height (m) for each age class of Aleppo pine trees on Sidi Alhumry Pine Plantation.

Year of establishment	Number of tree/ha	Percentage of the total occupation %	Avg.dbh (cm)	Avg..height (m)
1962-1964	16.72	2.23	41.5	11.55
1965-1967	34.57	4.62	30.7	10.64
1968-1970	74.81	10.01	29.33	11.51
1971-1973	117.37	15.71	28.5	9.9
1974-1976	207.89	27.83	26.95	9.38
1977-1979	243.47	32.6	23	9.04
1980-1982	40.47	5.41	28.37	9.5
1983-1985	11.52	1.54	23.5	8.2

DISCUSSION

According to previous reports, Sidi Alhumry Pine Plantation was established in 1951 (OMUReport, 2005) and the actual recruitment of the current stand occurred in 1956. Local references stated that the afforestation process started first on the Eastern side of the plantation, which suggests a possible later date for the establishment on the subjected study area on the western side. The outcome of the present study indicated that the majority of *P. halepensis* trees on the site were established in the period between 1962-1984 with more than three-quarters of these trees established between 1971 and 1979 (76.14% of the total pine recruitments). These results suggested that the establishment of *P. halepensis* trees on the site either occurred on a long period of time and the afforestation process last for over two decades, or the natural regeneration was effective during the first two decades of the establishment and then dropped substantially afterward. *P. halepensis* can live up to 150 years. However, it is often susceptible to major disturbances such as fire (Agee, 2000) and its life span is

much shorter. Diameter at breast height ranged from 23 cm for the younger age cohorts (established after 1977) to 41cm for the oldest age cohort (1963). Average dbh for more than 70% of the actual pine recruitment on the site ranged from (23-29.3 cm). Largest Aleppo pine trees can reach up to 50cm of diameter (Mòdol & Casals, 2012) (Elaieb, et al., 2017). However, the chance of getting rotten cores and inner damages is higher when the trees exceed 40cm in diameter. Average pine trees height varied from 8.2 m for the youngest age cohorts to 11.55m for the oldest trees found on the site. On individual bases, the highest tree recorded on the site reached 13.1 m and was established in 1968 while the least height recorded was 4.1 m for a pine tree that was established in 1979. Although Aleppo pine trees may reach 20 m height, they usually do not grow higher than 15 m (Elaieb, et al., 2017) (Mòdol & Casals, 2012) (Way, 2006). Competition between different or same tree species, particularly for light interception, is a determinant factor for the growth and the development of trees (Schulze & Chapin, 1987) (Rouvinen & Kuuluvainen, 1997) and most competition-related mortality occurs in lower diameter classes with small crown at or below the stand mean (Oliver & Larson, 1996) (Jokelaa, Doughertyb, & Martin, 2004).

Our study indicated the complete absence of new emerging pine seedlings beneath mature trees canopies in a radius of 5m from the mature pine trunk. The existed understory vegetation was mainly consisting of *Urginea maritima* and *Sarcopoterium spinosum* and both species were concentrated mostly in the gaps between tree canopies where they receive a full sunlight. The site is in inappropriate condition. It is used as a landfill site and subjected to illegal logging by locals. An effective administrative protocol to protect the plantation from overgrazing, possible disease outbreak and fire hazards, and invaders interfere is required to maintain the site on appropriate and productive levels. Moreover, silvicultural practices such as thinning to reduce fire hazard and diseases out-

break, and to retain profitable basal area are needed to enhance the site and make the most out of it.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to extend their sincere appreciation to Abdalkarim Alhomry for the great help during fieldwork, and to prof. Omar Assaady for his logistical support and insights through this work.

REFERENCES

- Agee, J. K. (2000). Fire & pine ecosystems: Ecology and Biogeography of pinus. *Cambridge University Press*, 193-218.
- Avalos, G., Salazar, D., & Araya, A. L. (2005). Stilt Root Structure in the Neotropical Palms *Iriartea deltoidea* and *Socratea exorrhiza*. *Biotropica*, 1, 44-53.
- Barbéro, M., Loisel, R., Quézel, P., & Richardson, D. (1998). Pines of The Mediterranean Basin. *Ecology and biogeography of Pinus*, 153-170.
- Bentley, C. v. (1996). Prediction of residual canopy cover for White Pine in central Ontario. *Her Majesty the Queen in Right of Canada*, 6pp
- Binkley, D. Alsanousi, A., & Romme, W. H. (2014). Age structure of aspen forests on the Uncompahgre Plateau, Colorado. *The Canadian Journal of Forest Research*, 44, 836-841.
- Duncan, R. P. (1989). An evaluation of errors in tree age estimates based on increment cores in Kahikatea. *New Zealand Natural Sciences*, 16, 31-37.
- Elaieb, M. T. Shel, F. Elouellani, S., Janah, T., Rahouti, M., Thévenon, M. F., & Candelier, K. (2017). Physical, mechanical and natural durability properties of wood from reforestation *Pinus halepensis* Mill. in the Mediterranean Basin. *Bois et Forêts Des Tropiques*, 331(1), 19-31.
- Jokelaa, E. J. Dougherty, P. M., & Martin, T. A. (2004). Production dynamics of intensively managed loblolly pine stands in the southern United States: a synthesis of seven long-term experiments. *Elsevier. Forest Ecology and Management*, 192, 117-130.
- Lavi, A., Perevolotsky, A., and Kigel, J. & -M. (2005). Invasion of *Pinus halepensis* from plantations into adjacent natural habitats. *Applied Vegetation Science*, 8, 85-92.
- Maestre, F. T., & Cortina, J. (2004). Are *Pinus halepensis* plantations useful as a restoration tool in semiarid Mediterranean areas? *Forest Ecology and Management*, 198, 303-317.
- Michelozzi, M., Loreto, F., Colom, R., Rossi, F., and Calamassi, R. (2011). Drought responses in Aleppo pine seedlings from two wild provenances with different climatic features. *Photosynthetica*, 49(4), 564-572.
- Mòdol, E. C., & Casals, M. V. (2012). Properties of clear wood and structural timber of *Pinus halepensis* from North-Eastern Spain. Auckland: WCTW. *World Conference on Timber Engineering*.
- Nahal, I. (1981). The Mediterranean climate from a biological viewpoint. In: *Di Castri, F. (ed.), Ecosystems of the World*, 63-86.
- Novak, K., De Luis, M., Gričar, J., Prisljan, P., Merela, M., Smith, K. T., & Čufar, K. (2016). Missing & dark rings associated with drought in *Pinus halepensis*. *IAWA Journal*, 37(2), 260-274.
- Nyysönen, A., Kilkki, P., & Mikkola, E. (1967). On the precision of some

- methods of forest inventory. *Acta Forestalia Fennica*, 81 (4), 7169.
- Oliver, C. D., and Larson, B. C. (1996). Forest Stand Dynamics. *Wiley, New York*, p. 544.
- OMUReport. (2005). Studying and evaluating the natural vegetation of Al-Jabal Al-Akhdar. Publications of Omar Al-Mukhtar University. El-baida - Libya:pp945.
- Prévosto, B. Amandier, L. Quesney, T. De Boisgelin, G. Ripert. C. (2012). Regenerating mature Aleppo pine stands in fire-free conditions: Site preparation treatments matter. *Forest Ecology and Management, Elsevier*, 282, 70-77.
- Puglisi, S. (1995). Gene conservation in pine species. *Forest Genetics*, 2(3), 145-153.
- Que'zel, P. (2000). Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *P. brutia*). *Backhuys Publishers, Leiden*, 1-12.
- Richardson, D. (1998). Forestry trees as invasive aliens. *Journal of Biology*, 18-26.
- Rouvinen, S., and Kuuluvainen, T. (1997). Structure and asymmetry of tree crowns in relation to local competition in a natural mature Scots pine forest. *Can. J. For. Res*, 27, 890-902.
- Schiller, G. (2000). Eco-physiology of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus brutia* Ten. *Ecology, Biogeography and Management of Mediterranean Pine Forest.*, 51-65.
- Schulze, E. D., and Chapin, F. S. (1987). Plant speciation to environments of different resource availability. In Potentials and limitations of ecosystem analysis. *Springer-Verlag, Berlin.*, 120-148.
- Stokes, M. A., and Smiley, T. L. (1968). An introduction to tree-ring dating. *University of Chicago Press, Chicago, Illinois*
- Way, s. (2006). Strategic management of Aleppo Pines on Lower Eyre Peninsula to maximise biodiversity conservation outcomes. Port Lincoln, *South Australia: Department for Environment and Heritage*.
- Wright, D. D., Jessen, J. H., Burke, P., and Garza, H. G. (1997). Tree and Liana Enumeration and diversity on a one-hectare plot in Papua New Guinea. *Biotropica*, 29(3), 250-260.

التركيب العمري والوضع الحالي لأشجار الصنوبر الحلبي *pinus halepensis* النامية في الجزء الغربي من مشجر صنوبر سيدي الحمري في منطقة الجبل الأخضر

عطية عبد الكريم السنوسي*، عبد السلام اقويدر

قسم الغابات والمراعي، كلية الموارد الطبيعية وعلوم البيئة، جامعة عمر المختار البيضاء، ليبيا

تاريخ الاستلام: 26 أبريل 2018 / تاريخ القبول: 08 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.209>:Doi

المستخلص: أشجار الصنوبر الحلبي تزرع بكثرة في مساحات كبيرة من منطقة الجبل الأخضر للعديد من الأغراض البيئية والترويحية. استهدفت هذه الدراسة معرفة التركيب العمري والوضع الحالي لأشجار الصنوبر الحلبي *Pinus halepensis* في الجانب الغربي من مشجر سيدي الحمري. تم أخذ عينات لأكثر من 70 شجرة صنوبر لتقدير سنة الإنبات، كما تم تسجيل بيانات للقطر عند مستوى الصدر وارتفاع الشجرة لكل عينة من عينات الأشجار الموجودة في موقع الدراسة. أقدم شجرة وجدت بالموقع كانت قد زرعت سنة 1962، بينما أصغر شجرة وجدت كانت قد زرعت سنة 1984. أشارت نتائجنا إلى وجود اختلاف عمري بأكثر من 20 سنة بين أشجار الصنوبر الموجودة بمنطقة الدراسة مما يشير إلى إمكانية أن يكون التشجير قد تم على فترات زمنية طويلة، أو احتمالية أن يكون التجديد الطبيعي وخاصة في السنوات العشرين الأولى فعلاً لتكوين هذه الاختلافات العمرية. متوسطات القطر عند مستوى الصدر dbh، وارتفاع الأشجار كانت مماثلة إلى حد ما لمشجرات الصنوبر الموجودة في المنطقة بمتوسط عام للقطر عند مستوى الصدر بحوالي 29 م ومتوسط ارتفاع للأشجار بحدود 10 م. ومع ذلك، فينصح بتطبيق التخفيف في هذا المشجر لضمان نمو أفضل ومحصول أمثل من أشجار الصنوبر في المنطقة.

الكلمات المفتاحية: *Pinus halepensis*. الصنوبر الحلبي؛ التركيب العمري. مشجر غابة سيدي الحمري.



Hydrological Spatial Analysis of Wadi Alkuf Catchment Area, Cyrenaica, Northeastern Libya

Ammar A Ammar

CEO BeidaGeoplan Company, Geomatics Engineering, Shahhat, Libya

Received: 02May 2018/ Accepted: 22 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.237>

Abstract: Morphometric analysis reveals that the Wadi Alkuf drainage, on the northern flank of Al Jabal Al Akhdar, Cyrenaica, northeastern Libya, is characterized by dendritic to sub-dendritic drainage pattern. The development of stream segments in the basin area is apparently affected by intermittent rainfall and geological structure control such as joints set, fractures and faults, as the general area is of limestone karstic character. The analysis reveals that the total number and total length of stream segments reach maximum of 6233 segments in first order streams but decrease to 620 segments in 6th order streams. The bifurcation ratio (R_b) between different successive orders varies between 0.7 in 6th order and 3.5 for third order passing through 2.43 in second order. A mean bifurcation ratio of 1.42 indicates a partial structural control. The stream frequency (F_s) value of 8.87 exhibits positive correlation with the drainage density value of 1.97, whereas the drainage density (D_d) indicates clearly that the region has permeable subsoil and relatively moderate vegetation cover. Calculated Circularity Ratio (R_c) of 0.215 and Elongation Ratio (R_e) of 0.15 suggest that the drainage basin is typically elongated in shape, has a low discharge of runoff and relatively permeable subsoil condition. Form Factor (R_f) of 0.22, represents a flatter peak of flow for a longer duration. Flood flows of such elongated basins are easier to manage than of circular basins. It becomes evident that morphometric analysis would contribute to understanding of the dominant geohydrological characteristics and processing of watershed planning and management utilizing geospatial techniques based on GIS application and Digital Terrain Model (DTM) analysis.

Keywords: Wadi Alkuf, catchment area, morphometry, hydrologic, geospatial, drainage pattern, DTM.

INTRODUCTION

Numerical Morphometry is the measurement and mathematical analysis of shape behavior of the watershed and catchment area of water bodies in streams and wadies. The measurement deals with shape, dimension, location and size of landforms (Agarwal 1998, Obi Reddy *et al.*, 2002). Morphometry relevant to the fields of hydrology and geomorphology were studied by (Horton 1941) and Stahler (1950), who were the pioneers of morphometry. Morphometric studies play a key role in understanding the geological and hydrologi-

cal behavior of the drainage basin and channel network. The relationship between various drainage parameters and the aforesaid factors are well recognized by many (Horton 1945, Chorley *et al.*, 1957, Melton 1958, Pakhmode *et al.*, 2003, Reddy *et al.*, 2004). Detailed morphometric analysis of a basin helps to understand the influence of drainage network on topography and their characteristics. The numerical analysis of morphometric parameters greatly facilitates watershed valuation and prioritization for soil and water conservation and natural resources management. The influence of drainage morphomet-

*Corresponding Author: Ammar A Ammar, ammar@email.com, CEO BeidaGeoplan Company, Geomatics Engineering, Shahhat, Libya.

ric system is crucial in helping to understand the landform processes, soil physical properties, and erosion characteristics (Horton 1945, Strahler 1957, Krishnamurthy *et al.*, 1996). Recently, geospatial techniques are used for digital terrain modeling (DTM) on a 30 m grade space of (SRTM) Shuttle Radar Topography Mission in conjunction with morphometric parameters of the drainage basins and watersheds, as they both provide a flexible environment and a powerful tool for the manipulation and analysis of spatial data. The main objective of the present study is to analyze the linear and areal morphometric characteristics of Wadi Alkuf drainage basin on the northern flank of Al Jabal Al Akhdar using Geographical Information System (GIS) and arc-hydrologic tools. Lacking previous quantitative work on the morphometry of the whole of Al Jabal Al Akhdar, Cyrenaica Libya, this quantitative study calculated its hydrological parameters to help in understanding the geo-hydrological characteristics of the drainage basin, which in turn helps in the management of the water and other natural resources of the study area. Therefore, analysis of Wadi Alkuf catchment area in this manner is an integral part in its hydrological investigations, groundwater evaluation and management, as well as its soil physics. This study aspires to recognize the interconnected relationships of various morphological, hydrological, and geological characteristic of the watershed system.

Physiography and Geology: Wadi Alkuf catchment basin, which has valuable historical and economical value, covers an area of approximately 960 Km² and has a perimeter of 222.5 km. In the heart of Al Jabal Al Akhdar, it is bounded by longitudes 21° 25' 00" and 22° 00' 00" and latitudes 32° 32' 50" and 32° 47' 17" (Figure 1) and reaches a maximum elevation of 860 m whereas its lowest is that of mean sea level. Elongated in shape and exhibiting variable topography, it comprises six orders of streams that mainly trend

east-west.

The drainage dendritic pattern reflects the effects of physical and chemical weathering characteristic of karstic, joint-dominated carbonate geology of Eocene to Holocene age (Figure 2). Details of the geology of this region can be found in El Hawat and Abdulsamad (2004), Anketell, J.M.,(1996) Mediterranean to subtropical mid- latitude climates conditions are prevalent in the region where by annual precipitation is more than 550 ml.

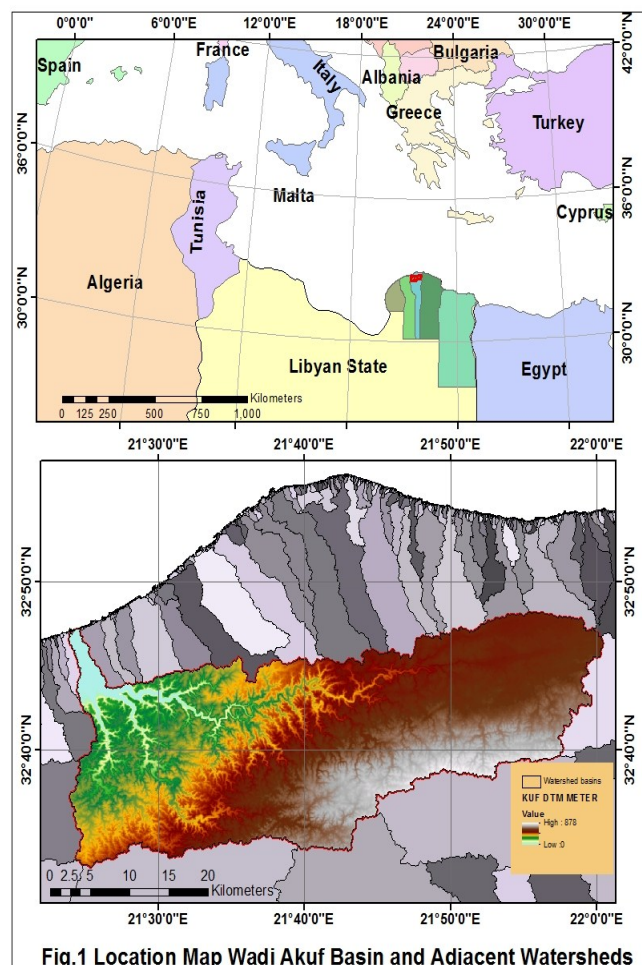
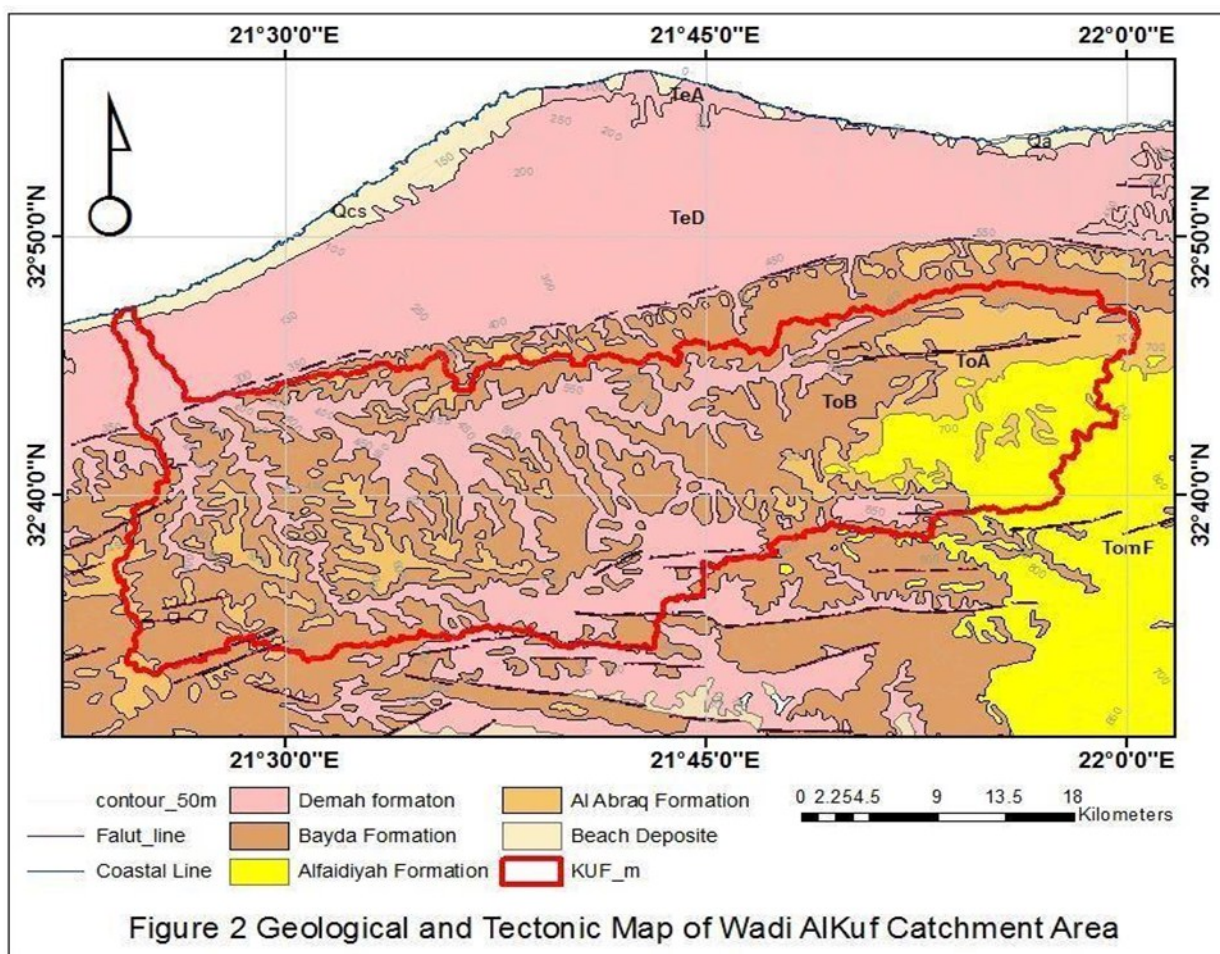


Fig.1 Location Map Wadi Akuf Basin and Adjacent Watersheds



Methodology and Techniques

It was deemed important that to understand the watershed basin behavior of Wadi Alkuf catchment, one needs to calculate its morphometric parameters and network geometry as well as runoff of water and sediments throughout. The logical description of the geometry of a drainage basin and stream channel requires measurement of its linear and spatial factors in addition to assessment of channel network relief (gradient) and contributing ground slopes (Strahler, 1964). Emphasis was placed in this morphometric study on the hydraulic parameters that enable some understanding of the watershed basin behavior of Wadi Alkuf as derived from mathematical formulae, geomatics analysis of digital terrain models based on 30 m grid space, as well as a review of pertinent geomorphological literature of the region.

Several calculations were needed for this present morphometric analysis and parameters such as stream order, stream length, bifurcation ratio, stream length ratio, basin length, drainage density, stream frequency, elongation ratio, circularity ratio, form factor, etc. Other morphometric parameters such as relief, shape, and length strongly influence basin discharge pattern through their varying effects on lag time (Gregory and Walling, 1973). The natural run-off is one of the most potent geomorphological and geological effects shaping the landscape, drainage pattern, stream orders, and shape of a drainage basin. Röhlich (1974,1980). An assortment of topographic and geologic maps as well as satellite imagery were use in this study. Satellite imagery included Landsat 7 TM imagery at 14 m resolution, Spot 5 at 5 m resolution, Quickbird imagery at 60 cm resolution,

SRTM 30 m grade. The area stream system was delineated as required by morphometric analysis. Delineation, in turn, required that topographic maps published by the Survey Department of Libya in 1978 at a scale of 50,000 be mosaiced and rectified. ArcGIS 10.4.1 was used to assign UTM, WGS 1984, 34N zone projection systems. Digitization of the drainage basin was carried out using

ArcGIS' HydroArc tool. Attributes were assigned to create the digital database for the drainage layer of the catchment basin. Various morphometric parameters such as linear and aerial aspects of the drainage basin were computed. The different morphometric parameters have been determined as per the standard methodology shown in Table 1.

Table (1). Linear morphometric parameters of Wadi AlKuf Catchment Area drainage network

Stream Order	Stream Segment	Stream Length Km Lu	Bifurcation Ratio	Main Bifurcation Ratio	Main Stream Length (Lsm)	Cumulative Mean stream length (CLsm)	Stream length Ratio RL
1	6078	1040.39	0.00	1.50	0.17	0.17	0
2	2529	555.45	2.40		0.22	0.39	1.29
3	1377	310.91	1.84		0.23	0.62	1.04
4	820	154.06	1.68		0.19	0.80	0.83
5	455	95.01	1.80		0.21	1.01	1.11
6	357	74.63	1.27		0.21	1.22	1.00
	11616	2230.44					

RESULTS AND DISCUSSION

Parameters and Calculations: According to Strahler (1964), the smallest fingertip tributaries in a stream system are designated as order 1. Where two first order channels join, a channel segment of order 2 is formed and where two of order 2 joins, a segment of order 3 is formed, and so on. The trunk stream through which all discharge of water and sediment passes is, therefore, the stream segment of the highest order. The study area is a 6 order drainage basin. It is observed that stream frequency decreases as the stream order increases. Thus, the law of “lower the order higher the number of streams” is implied throughout the catchment area. This is expounded upon in several following sections. In the following section, linear and spatial

parameters are first explained briefly and basin's values calculations-measurements are introduced thereafter.

Linear Morphometric Parameters: Linear factors of the basin are related to channel patterns of the drainage network wherein the topological characteristics of the stream segments (i.e., open links of the network system) are analyzed. The morphometric investigation of the linear parameters of the watershed basin includes stream order (S_μ), bifurcation ratio (R_b), stream length (L_μ), mean stream length (L_{sm}), stream length ratio (RL), length of overland flow (L_g), basin perimeter (P), basin length (L_b), index of Gravelius (KG), fitness ratio (R_f), wandering ratio (R_w), sinuosity indices, etc. Some of the important linear factors have been computed as shown in (Tables 3 and 4).

Table (2). Stream order and Drainage Texture and its classification

Stream Order	Segment	Length,km	Percent %	Drainage Texture	Texture Category
1 st	6078.00	1040.39	0.52	27.30	very fine
2 nd	2529.00	555.45	0.22	11.36	very fine
3 rd	1377.00	310.91	0.12	6.19	fine
4 th	820.00	154.06	0.07	3.68	Coarse
5 th	455.00	95.01	0.04	2.04	Coarse
6 th	357.00	74.63	0.03	1.60	Very Coarse
	11616.00	2230.44	1.00	8.70	very fine

Table (3). Hydrologic parameters with formula for the Wadi Alkuf watershed basin.

Parameter	Formula	Results	Reference
Linear Morphometric parameters			
Bifurcation Ration Rb	$Rb = Nu / Nu + 1$, $N\mu$ = No. of stream segments of a given order	See table 1	Schumn(1965)
Mean Bifurcation Ratio	Rbm = Average of bifurcation ratios of all orders	1.5	Stahler(1964)
Stream Length Lu	Length of the stream (kilometers)	2236.7 km	Horton (1945)
Mean Stream Length Lsm	$Lsm = L\mu / N\mu$, Where, $L\mu$ = Total stream length of order 'μ', $N\mu$ = Total no. of stream segments of order 'μ'	0.204	Stahler(1964)
Stream Length Ration RL	$RL = Lsm / Lsm - 1$, Where, Lsm = Mean stream length of a given order and $Lsm - 1$ = Mean stream length of next lower order	0.4291 84549	Horton (1945)
Length of Over Land Flow Lg	$Lg = 1 / 2D$ Km, Where, D = Drainage density (Km/Km ²),	0.4288 16467	Horton (1945)
Basine Perimeter Km	P = Outer boundary of drainage basin measured in kilometers	222.53k m	Schumm (1956)
Basin Length Lb, Km	$(Lb) Lb = 1.312 * A^{0.568}$	64.81 km	Gregory and Wallig (1973)
Spatial Morphometric Parameters			
Basin Area A, Km ²	Area from which water drains to a common stream and boundary determined by opposite ridges.	959.26 km ²	Stahlar(1964)
Drainage Density Dd Km/km ²	$Dd = Lu / A$, Where, Dd = Drainage density (Km/Km ²), $L\mu$ = Total stream length of all orders and A = Area of the basin (Km ²).	2.33	Horton(1932)
Stream Frequency Fs, 1/km ²	$Fs = Nu / A$, Where, Fs = Drainage frequency, $N\mu$ = Total no. of streams of all orders and, A = Area of the basin (Km ²).	12.14	Smith(1950)
DraiangeTexture Dt	$Dt = Nu / P$, Where, $N\mu$ = No. of streams in a given order and P = Perimeter KM	52.35	Smith(1950)
Form Ration Rf	$Rf = A / Lb^2$, Where, A = Area of the basin and Lb = (Maximum) basin length	0.228	Horton(1932)
Elongation Ratio Re	$Re = \sqrt{A} / \pi / Lb$, Where, A = Area of the Basin (Km ²), Lb = Maximum Basin length (Km)	0.152	Schumm(1956)
Circularity Ration Rc	$Rc = 4\pi A / P^2$, Where, A = Basin Area (Km ²) and P = Perimeter of the basin (Km)	0.24	Miller(1953)

Stream Order (S_{μ}): Stream order starting at the mouth defines a Wadi's place in the network, which suites general cartographic purposes. Nature of stream order is the first step to understand the drainage basin

analysis. It is defined as a measure of the position of a stream in the hierarchy of tributaries

(Leopold *et al.*, 1964). In the area under consideration, there are 11616 stream segments linked with 6 orders of streams. Total stream length is 2230.4 km covering about 959.26 km². First order tributaries constitute more than 52 % of all segments at a stream length of about 1040 km (see the table in Figure 3).

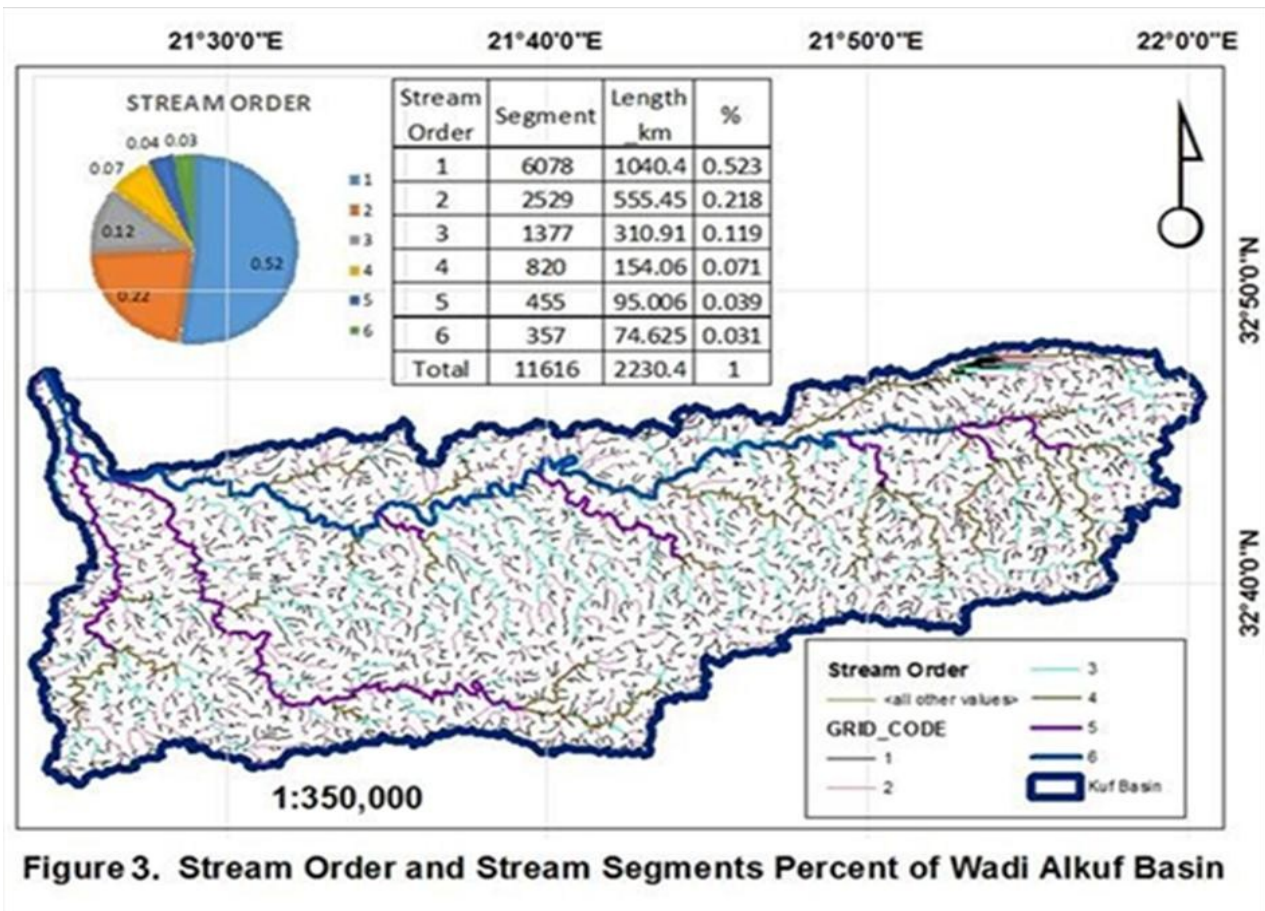


Figure 3. Stream Order and Stream Segments Percent of Wadi Alkuf Basin

Bifurcation Ratio (R_b): Bifurcation ratio is related to the branching pattern of a drainage network, and is defined as the ratio between the total number of stream segments of one order to that of the next higher order in a drainage basin (Schumm 1956). It is a dimensionless ratio that varies from one region of one environment to another that has a different environment, except where powerful geological control is dominant (Strahler, 1964). The bifurcation Values of R_b for Alkuf basin reflect control of the dominant geological fea-

tures of the region's joint system, where joint distribution and trends have somewhat impacted the drainage pattern. The lower values of R_b are characteristics of watersheds or drainage basins that suffer little structural disturbances and consequently the drainage patterns are less deformed (Strahler, 1964; (Nag 1998). Table 1 shows that the bifurcation ratio values for the Alkuf Basin drainage vary from 1.27 to 2 and a mean bifurcation ratio of 1.5 reflecting the average of bifurcation ratios of all orders. The highest R_b found (2.4)

characterizes 2nd and 3rd order, which indicates corresponding highest overland flow and discharge due to more topographically elevated (high slope configuration), less permeable rock formation. The mean bifurcation ratio, which is relatively low, suggests geological heterogeneity, higher permeability, and only mild structural control.

Stream Length (L_{μ}): Stream length is an indicative of the geomorphological development processes of stream segments including weathering and tectonics of Al Jabal Al Akhdar watershed basins. In Wadi Alkuf Basin, stream lengths of various orders were measured using Arc View 10.4.1. The analysis found that stream segment lengths are inversely related to the increase in the stream order except for the 6th order stream, whose length is greater than the total length of the 6th order stream segments. Table 3 shows percentages of each stream order as follows: first order at 52 percent of the total, whereas second order at 22 percent, third order at 12 percent, 4th order at 7 percent, 5th order at 4 percent, and 6th order at 3 percent. Generally, the higher the order, the longer the length of streams.

This was also attested to in the Wadi Alkuf drainage basin. Correlation of order to the percentage, as shown above, appears to reflect flow from high altitude, change in rock type, and variation in slope and topography (Singh and Singh, 1997; Vittala *et al.*, (2004). When the logarithm of the number of streams is plotted against the order, most drainage networks show a linear relationship, with a small deviation from a straight line (Strahler, 1964). According to Horton's principle, the number of streams is negatively correlated with the order (Horton 1932). Wadi Alkuf-basin river basin shows a near perfect correlation with the plots falling near the regression line.

Mean Stream Length (L_{sm}): Mean stream length is an expression of the characteristic

size of components of a drainage pattern network and its contributing surfaces (Strahler, 1964). The mean stream length is calculated by dividing the total stream length of a given order by the number of streams of that order. In the study area, it is noted that L_{sm} (Table 1) varies from 0.17 to 0.23 km, and that its value for any given order is greater than that of the lower order and less than that of its next higher order in the whole drainage basin.

Stream Length Ratio (RL): The stream length ratio can be defined as the ratio of the mean stream length of a given order to the mean stream length of next lower order, and it has an important relationship with surface flow and discharge as well as the erosional stage of the basin (Horton 1945). It is also noted that the RL values among successive stream orders within a basin vary because of differences in slope and topographic conditions (Srinivasa *et al.*, 1998). The values of RL vary erratically from 0.80 to 1.29 from one order to another in Wadi Alkuf Basin. Such conforms to the state of the basin, which is of late youth to an early mature stage of geomorphic development.

Length of Overland Flow (L_g): Length of overland flow is defined as the length of flow path, projected to the horizontal. Open channel flows from point on the drainage divide to a point on the adjacent stream channel (Horton 1945). For the sake of convenience, it is taken to be roughly equal to half the reciprocal of the drainage density. Overland flow is significantly affected by infiltration (exfiltration) and percolation through the soil, both varying in time and space (Schmid, 1997). In this study, the length of overland flow of the Wadi Alkuf drainage basin is 0.22 kilometers, which indicates low surface runoff.

Basin Perimeter (P): Basin perimeter is the outer boundary of the drainage basin network that encloses its area and reflecting the boundary of the stream divide as the line that separates neighboring drainage basins. In Al

Jabal Al Akhdar Mountain, the divider separates two topographically prominent ridges in the form of mountain escarpments (Figure 1). The present work used Arc map10.4.1 to compute the basin's perimeter, the subject of this study, and found it to be 222.26 km.

Basin Length (Lb): Basin length (Lb) has been given different meanings (Schumm 1956) Gregory and Walling (1973); Gardiner (1975) and Cannon (1976). The Lb is the longest length of the basin measured from the catchment to the point of confluence (Gregory and Walling, 1973). From the point of confluence in the south-east of the study area, Wadi Alkuf meets the Mediterranean Sea northward. The length of Wadi Alkuf Basin is 64.81 kilometers.

Fitness Ratio (Rf): Fitness ratio is the ratio of main channel length to the length of the basin perimeter and thus, is a measure of topographic fitness (Melton 1958). The Rf for Wadi Alkuf catchment drainage basin or watershed is 0.30.

Gravelius's Index (KG): Different geomorphologic indices can be used for the analysis of a watershed if its shape is taken into consideration. The most frequently used index is the Gravelius's index KG, which is defined as the relation between the perimeter of the watershed and that of a circle having a surface equal to that of a watershed. A KG of 2.07 suggests that the watershed basin is more elongated than circular.

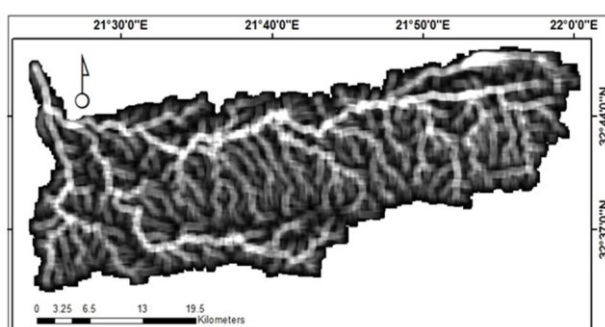


Figure 4 Drainage Density Distribution of Wadi Alkuf Basin

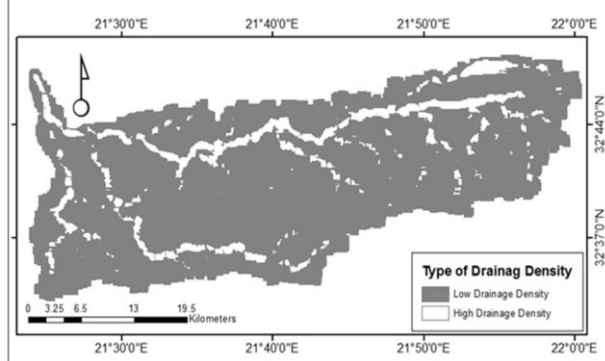


Figure 5 Classification of Drainage Density of Wadi Alkuf Basin

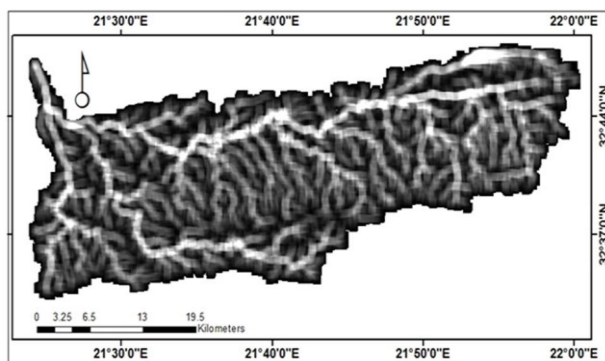


Figure 4 Drainage Density Distribution of Wadi Alkuf Basin

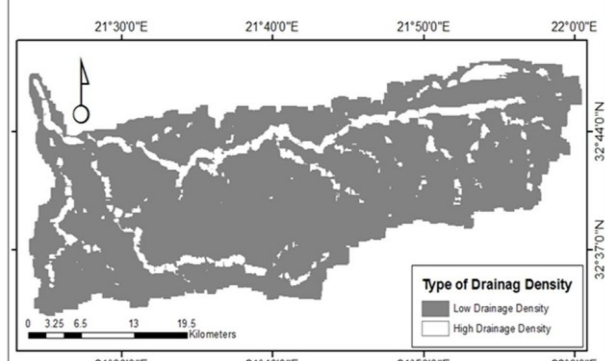


Figure 5 Classification of Drainage Density of Wadi Alkuf Basin

$$KG = P / 2\sqrt{\pi A}$$

KG	Gravelius's shape index
A	watershed area [km ²]
P	watershed perimeter [km]

Spatial Morphometric Parameters General

The area of a basin is a significant morphometric parameter affecting the spatial distribution of several morphometric attributes and controlling factors such as drainage density DD, drainage texture Dt, stream frequency Fs, slopes, Elongation Ratio Re, circularity ratio Rc, etc. (Anderson 1957).

Drainage density (Dd) :The density of stream network in a basin has long been recognized as a topographic characteristic of fundamental significance. It is an expression of the closeness or spacing of channels (Horton 1932). The significance of drainage density is recognized as a factor determining the time travel by water (Schumm 1956). The measurement of Dd is a useful numerical measure of landscape dissection and runoff potential Chorley,(1969). On the one hand, the Dd is a result of interacting factors controlling the surface runoff; on the other, it is itself influencing the output of water and sediment from the drainage basin (Ozdemir and Bird 2009). Dd is known to vary with climate and vegetation, soil, rock properties, relief, and landscape evolution processes (Kelson and Wells 1989, Oguchi 1997, Moglen *et al.*, 1998). The Dd of the Wadi Alkuf- watershed basin is 2.33 km/km². Figure 4 shows that the drainage density in the study area, which is relatively low, clearly indicates that the region has permeable subsoil, relatively moderate vegetation cover, and gentle to medium relief (Nag 1998). Drainage density in the study area varies between low and high as shown in Figure 5. Furthermore, the illustration shows aggregation around and in the main trunk of first and second order streams.

Drainage frequency (Fs): Like drainage density, the stream frequency is also one of

the most important morphometric parameters of the drainage basin. Horton (1945) introduced stream frequency (or drainage frequency Fs) as the number of stream segments per unit area. Stream frequency is calculated by the total number of streams in a drainage basin divided by the area of the basin. In other words, it is a calculation of the total number of streams in a unit area per a drainage basin. For determination of stream frequency, the Hortonian formula $FS=(N/A)$ is used whereas N is the total number of streams and A is the area of the basin. A figure of 959.26 km² is adopted for the study area. For convenience and expediency, the entire Wadi Alkuf drainage basin is transformed into 30X30 m grid space resolution of SRTM radar image and topographic maps sheets at a scale of 1:50,000. A general overview of the frequency distribution of drainage net of the basin indicates high frequency as one moves from the foothill zone to the floodplain. (Table 3) shows the spatial pattern of drainage frequency distribution and area, the FS value is 12.14.

Drainage Texture (Dt): Drainage texture is simply the relative spacing of drainage lines within a basin. It is believed to be the most promising and useful variable in the morphometric analysis of drainage basins because it relates to the dynamic nature of the network of the stream segments and the area of the catchment area. In WadiAlkuf basin, this variable can be usefully used in the classification of drainage basin order architecture to determine processes and interpret temporal changes of the drainage network. Drainage texture may be regarded as a function of climate and catchment characteristics (Table2). Horton (1945) defined drainage texture based on stream frequency (number of streams per unit area). In fact, the term texture has been used loosely and no success has been made to search out a quantitative parameter for its calculation. According to Singh and Srivastva (1974), the term texture is indicative of the

relative spacing of streams per unit area along a linear direction. For the present study, the basin is divided into grids. Then the numbers of streams crossing along both the diagonals are counted and averaged. Further, the number of streams crossing should be calculated per km length based on Savindra Singh's formula. (Table 2) suggests the main texture of the basin to be very fine texture because the formula yields a number greater than 8. However, in some higher stream order, the texture is mainly coarse to very coarse, especially in the 6th and 5th order streams.

Form Factor Ratio (Rf): A quantitative form of the outline of a drainage basin may be illustrated through a form factor ratio (Rf), which is the dimensionless ratio of a basin area to the square of basin length (Horton 1932). Basin shape may be indexed by simple dimensionless ratios of the basic measurements of area, perimeter, and length (Singh, 1998). The form factor value of Alkuf basin equals a low value of 0.23, which represents an elongated shape. The elongated basin with low form factor indicates that the basin will have a flatter peak of flow for a longer duration. Flood flows of such elongated basins are easier to manage than those which are circular (Christopher *et al.*, 2010).

Elongation Ratio (Re): Elongation ratio (Re) is defined as the ratio of a diameter of a circle of the same area as the basin to the maximum basin length (Schumm 1956). It is a very significant index in the analysis of basin shape that helps to shed light on the hydrological character of a drainage basin. $Re = \sqrt{A} / \pi / L_b$, where A = Area of the Basin (Km²), L_b = Maximum Basin length in km's. If values are near 1.0, the region is typical of low relief (Strahler, 1964). The elongation ratio in the study area was found to be 0.15 indicating relatively moderate relief of the terrain and elongation of the drainage basin (Table3).

Circularity Ratio (Rc): The circularity ratio (Rc) has been used as a quantitative measure

for visualizing the shape of the basin and is expressed as the ratio of basin area (A) to the area of a circle (A_c) having the same perimeter as the basin (Miller 1953; Strahler 1964). It is affected by the lithological character of the basin. However, the ratio is more influenced by length, frequency (Fs), and gradient of streams of various orders rather than slope conditions and drainage pattern of the basin. It is a significant ratio that signifies the dendritic stage of a basin. The Circularity Ratio $Rc = 4\pi A / P^2$, Where A = Basin Area (Km²) and P = perimeter of the basin (Km). Low, medium and high values indicate youth, mature, and old stages of the life cycle of the tributary basins, successively. The calculated Rc value for the study area is 0.24, which affirms that Alkuf drainage basin is elongated in shape and is characterized by medium to low relief. Such drainage systems are partially affected by structural disturbances (Zavoianca, 1985).

CONCLUSION

Wadi Alkuf catchment basin is being frequently selected as a unit of hydrological morphometric analysis because of its topographic and hydrological unity. As a part of the region of Al Jabal Al Akhdar, it has been affected by its geologic evolution and tectonics that contributed to its elongation and size of its drainage catchment area. The morphometric analysis (linear parameters) of Wadi Alkuf was greatly aided and enhanced through the use of geospatial tools (spatial parameters) that resulted in a better understanding of the hydrologic configuration of the drainage basin. It was found that an ArcGIS-based approach facilitates analysis of different morphometric parameters and exploration of the relationship between the drainage morphometry and effects of lithology, soils cover and eroded lands and karst features. Based on drainage orders, Wadi Alkuf Basin has been classified as 6th order tributaries basin. The mean R_b indicates that the

dendritic and sub- dendritic drainage pattern systems is much influenced by geologic structures. The study reveals that the drainage area of the basin is passing through an early amateur stage of the fluvial geomorphic cycle. Lower order streams mostly dominate the basin. The development of stream segments in the basin area is somewhat affected by rainfall. Circularity Ratio R_c , Stream Frequency R_f , and Elongation Ratio R_e show that the elongated shape of the basin is characterized by low discharge of runoff. It is noted that stream segments up to 4th order traverse parts of the high altitude, comparatively flatland, and maximum infiltration of runoff occurs and is aided by gentle slopes.

As karstic limestone lithology controls the behavior of the underlying rocks (Eesterbrooks, 1969), the drainage pattern of Wadi Alkuf watershed basin is dendritic in nature and geometry. The details of stream characteristics conform to Horton's (1932) "laws of stream numbers" which stated that the number of streams of different orders in a given drainage basin tends closely to approximate an inverse geometric ratio. There is also an attestation in this study to the validity of his law, which stipulates that the average length of streams of each of the different orders in a drainage basin tends closely to approximate a direct geometric ratio.

ACKNOWLEDGMENTS

I gratefully appreciate the helpful review and discussion of Prof. R.A Alkhazmi and Prof A. Zaied, the Hydrogeologist A. Alkaseh, Adem Tunca and the Beida Geoplan's Staff Company for digitizing the geological maps and the topographic maps of the study region.

REFERENCES

- Anderson M.G, (1957). Hydrological Forecasting, Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons Ltd.
- Horton, R. E. (1932). Drainage-basin characteristics. *Eos, Transactions American Geophysical Union* 13(1),350-361.
- Horton, R. E. (1940). An Approach Toward a Physical Interpretation of Infiltration-Capacity 1.

- Anketell, J.M., (1996). Structural history of Sirt basin and its relationship to the Sabratah basin and Cyrenaica platform, Nern Libya. In: M.J. Salem, M.T. Busrewil, A.A. Misallati & M.A. Sola (eds.), *Geology of Sirt Basin*, III,57-89. Elsevier, Amsterdam
- Cannon J.P. (1976). Generation of explicit parameters for a quantitative geomorphic study of the Mill Creek Drainage Basin. *Oklahoma Geology notes*. 36(1), 13-17.
- Chorley R. J. (1969). Introduction to physical hydrology. *Methuen and Co. Ltd., Suffolk*. 211.
- Chorley, R. J., Donald-Malm E.G. and Pogorzelski H. A. (1957). A new standard for estimating drainage basin shape. *American Journal of Science*, 255(2),138-141.
- Christopher, O., Idowu A. O., and Olugbenga A. S. (2010). Hydrological analysis of Onitsha north east drainage basin using geoinformatic techniques. *World Applied Sciences Journal*, 11(10),1297-1302.
- Eesterbrooks D (1969). Principles of geomorphology. *McGraw-Hill Inc. New York*.
- ElHawat, A.S. and Abdulsamad, E.O., (2004). A field guide to the geology and archaeology of Cyrenaica. In: 32nd International Geological Congress, Florence, Italy, p 03-18.
- Gardiner V (1975). Drainage Basin Morphometry British geomorphological research group technical *Bulletin*,14, 48-50
- Gregory, K.J. and Walling, D.E. (1973) Drainage Basin. *Form and Process: A Geomorphological Approach*. Edward Arnold, London.

- Soil Science Society of America Journal* 5(C),399-417.
- Horton, R. E. (1945). Erosional development of streams and their drainage basins; hydro-physical approach to quantitative morphology. *Geological Society of America* 56,275-370.
- Krishnamurthy, J., Srinivas G., Jayaraman V., and Chandrasekhar M. G. (1996). Influence of rock types and structures in the development of drainage networks in typical hardrock terrain. *Interdenominational Theological Center (ITC) Journal*, 3(4):252-259.
- Leopold, L. B., Wolman, M. G., and Miller, J. P. (1964). "Fluvial processes in geomorphology," *Freeman, San Francisco*, 522 p.
- Melton, M. A. (1958). Correlation structure of morphometric properties of drainage systems and their controlling agents. *The Journal of Geology*, 66(4):442-460.
- Miller, V.C. (1953). A quantitative geomorphic study of drainage basin characteristics in the Clinch Mountain area, Virginia and Tennessee. *Geography Branch, Project New York. Rep. 3*, 589-042.
- Moglen, G. E., Eltahir E. A., and Bras R. L. (1998). On the sensitivity of drainage density to climate change. *Water Resources Research* 34(4):855-862.
- Nag, S. (1998). Morphometric analysis using remote sensing techniques in the Chaka sub-basin, Purulia district, West Bengal. *Journal of the Indian Society of Remote Sensing* 26(1-2),69-76.
- Oguchi, T. (1997). Drainage density and relative relief in humid steep mountains with frequent slope failure. *Earth Surface Processes and Landforms: The Journal of the British Geomorphological Group* 22(2), 107-120.
- Ozdemir, H., and Bird D. (2009). Evaluation of morphometric parameters of drainage networks derived from topographic maps and DEM in point of floods. *Environmental Geology*, 56(7),1405-1415.
- Pakhmode, V., Kulkarni H., and Deolankar S. (2003). Hydrological-drainage analysis in watershed-programme planning: a case from the Deccan basalt, India. *Hydrogeology Journal*, 11(5), 595-604.
- Reddy, G.P., O., Maji A., and Gajbhiye K. (2002). GIS for morphometric analysis of drainage basins. *GIS India*, 11(4),9-14.
- Reddy, G. P. O., Maji A. K., and Gajbhiye K. S. (2004). Drainage morphometry and its influence on landform characteristics in a basaltic terrain, Central India—a remote sensing and GIS approach. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 6(1),1-16.
- Röhlich, P.,(1974). Geological map of Libya; 1:250,000 sheet, Al Bayda sheet NI34-15, explanatory booklet. *Industrial Research Center, Tripoli*, 70 pp
- Röhlich P (1980) Tectonic development of Al Jabal al Akhdar. In: Salem MJ, Buserwil MT (eds) *The geology of Libya, III, Academic, London*, 923–931.
- Schmid B. H. (1997). Critical rainfall duration for overland flow an infiltrating plane surface. *Journal Of Hydrology*, 193, 45-60.
- Schumm, S. A. (1956). Evolution of drainage systems and slopes in badlands at Perth Amboy, New Jersey. *Geological society of America bulletin*,67(5),597-646.
- Singh S (1998). *Geomorphology. Prayag Pustak Bhawan, Allahabad*,334-412.

- Singh S, and Singh MC (1997). Morphometric analysis of Kanhar river basin. *National Geographical Journal Of India*, 43(1),31-43.
- Singh, S. and Srivastva R. (1974): A morphometric study of the tributary basins of upper reaches of the Belan River, *National Geography*, 9, 31-44.
- Smith, K.G., (1950). Standards for grading texture of erosional topography. *American Journal of Science*, 248, 655-668.
- Srinivasa Gowd, S, Sudheer, A.S., Srinivasulu, S, and Sreedevi, P.D. (1998) Remote Sensing Analysis to Delineate Groundwater Potential Zones of Peddavanka Watershed, Anantapur District, A.P. *Geographical Review of India* 60, 145-154
- Strahler, A. N., (1950), Equilibrium theory of erosional slopes, approached by frequency distribution analysis: *American Journal of Science*, 248, 673-696.
- Strahler, A. N. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Eos, Transactions American Geophysical Union* 38(6),913-920.
- Strahler, A. N., (1964). Quantitative geomorphology of drainage basins and channel networks. *In Handbook of Applied Hydrology, McGraw-Hill, New York.* pp 4-11
- Vittala, S.S., Govindaiah, S., Gowda, H.H. (2004). Morphometric analysis of sub watersheds in the Pavagada area of Tumkar district, south India using remote sensing and GIS techniques, *Journal of Indian Society of Remote Sensing*. 32 (4), 351-361.
- Zavoianc I (1985). Morphometry of Drainage Basins. *Developments in Water Science* 20,104-105

التحليل المكاني لهيدرولوجيا حوض وادي الكوف، برقة، شمال شرق ليبيا

عمار عبد المطلب عمار

الرئيس التنفيذي لشركة البيضاء غيبيلان لأعمال الجيوماتكس الهندسية، شحات - ليبيا

تاريخ الاستلام: 02 مايو 2017 / تاريخ القبول: 22 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.237>:Doi

المستخلص: التحليل المورفومتري لحوض تصريف وادي الكوف في برقة بالجزء الشمالي من الجبل الأخضر في شمال شرق ليبيا يكشف نمط خواص الحوض شجري إلى شبه شجري. تطوير وتنمية القطاعات النهرية لوادي الحوض وادي الكوف متأثرة بكميات هطول الأمطار والتراكيب الجيولوجية للمنطقة مثل الفواصل والصدوع والشقوق وغيرها من السمات الجيولوجية الكارستية للجر الجيري المكون الرئيسي لجيولوجيا الجبل الأخضر، وهذا التحليل يكشف وجود إجمالي 6233 قطعة نهرية من الرتبة الأولى، وتتناقص إلى 620 قطعة نهرية في الرتبة السادسة ومعدلات التشعب النهري (Rb) متغيرة بتغير رتبة التصريف ما بين 0.7 في الرتبة السادسة و3.6 للرتبة الأولى، مروراً بـ 2.4 للرتبة الثانية وتوسط التشعب النهري 1.42 وهذا مؤشر لتأثر التراكيب الجيولوجية عليه، ومؤشرات التردد النهري للحوض (Fs) بقيمة 8.87 إيجابية بالترابط مع الكثافة النهرية (Dd) والتي تبين بقيمتها 1.97 والتي تكشف عن السماحية الهيدروليكية للترب السفلية والغطاء النباتي متوسطة، وحساب معدل الاستدارة للحوض (Rc) 0.215 ومعامل الاستطالة للحوض (Re) 0.15 وهذا يعكس رياضياً أن الحوض مستطيل وهذا واضح من الصور الفضائية والتخريط الحقلية لمنطقة الدراسة، وغيرها من المعاملات المورفومترية الهامة والتي تم دراستها في حوض الكوف والجبل الأخضر لأول مرة باستخدام التقنيات المكانية وتطبيقات نظم المعلومات الجغرافية وتحليل الصور الرادارية لنموذج الارتفاعات الرقمية للمنطقة والمناطق المجاورة لكي تستخلص تلك النتائج الهامة للدراسات الهيدرولوجية والجيومورفولوجية للحوض لتساعد على الاستغلال والتحكم الأمثل لمياه الأمطار الجارية وحركة المياه الجوفية من بداية الحوض إلى بلوغ مرامه في البحر.

الكلمات المفتاحية: وادي الكوف، حوض التصريف، المورفومتري، الهيدرولوجي، المكانية، شبكة التصريف، نموذج الارتفاع الرقمي.



Effects of Different Types of Honey on Wound Healing in rats

Khaled. M. A. Hussin^{1*}, Asma. Saleh. W. El-Mabrok², Nawara. M. B. Eissa¹, Akaram Husain³ and Marwan Saleh Wanesh⁴

¹Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda, Libya

²Department of Botany, Faculty of Science, Toubrk University, Toubrk, Libya

³Department Food Biotechnology Faculty of Science and Technology, University Sains Lslam Malaysia

⁴Agricultural Research Center, Al-Bayda, Libya

Received: 02 September 2018/ Accepted: 24 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.238>

Abstract: One hundred and twenty healthy female Sprague-Dawley rats weighing between 300 to 350g were used in this study over a 20-day period. They were allocated randomly into 4 groups of 30 animals each. After the creation of 2cm x 2cm open wound, Group I was control treated with Gentamycin ointment. Groups II, III and IV were treated with Different Types of Honey. On application, the honey was well accepted by the animals without any adverse reaction. On clinical examination, Groups II, III and IV showed bright beefy red color granulation tissue with angiogenesis when compared to Groups I. On bacteriological examination, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Proteus* and *Klebsiella species* were isolated from all the groups. Mean percentage of epithelialistion, wound contraction and total healing were significantly better in Group IV (P<0.05). Honey can be a better wound healing biomaterial in rats. It can be used as a less expensive skin substitute in order to stimulate and promote wound healing in animals.

Keywords: Honey, Induced skin wound, wound healing, Rats

INTRODUCTION

A wound is a physical bodily injury resulting in the disruption of normal continuity of structures and wound healing is the restoration of the continuity. The treatment of wounds has improved considerably in the past 30 years, and will continue to progress rapidly with the advancing technology and a greater understanding of chronic wounds (Ashraf & Khaled, 2008; Ballard & Baxter, 2000; M. A. Hussin Khaled & Ashraf, 2008; Rafi, Ashraf, & Khaled, 2008). The objectives of any wound management are relief of pain and distress to the animal, functional and cosmetic repair, economic and time efficient procedures and

prompt decision making in the event of signs of delayed healing (Cockbill, 2002). In chronic wounds, the major focus of wound healing has been on the relationship between tissue destruction by excess inflammation and tissue synthesis stimulated by a pro-healing environment. Natural polymers have been increasingly studied for applications in health care due to their biocompatibility, biodegradability, and nontoxity (Mali, Grossmann, García, Martino, & Zaritzky, 2006). Topical application of honey to wound has been recognized for centuries as effective in controlling infection and producing a clean granulating wound bed. The recorded observations show that inflammation, swelling, and pain are quickly reduced, unpleasant

*Corresponding Author: Khaled. M. A. Hussin, khaled.elhmri@omu.edu.ly, Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Omar Al- Mukhtar University, Al-Bayda, Libya

odors cease, sloughing of necrotic tissue occurs without the need for debridement, dressings can be removed painlessly (Dunford, Cooper, Molan, & White, 2000; Peter. C Molan, 1999). It is one of the most enduring materials to be used in wound care, attributed to its antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties (Peter. C Molan, 1999) Honey is mildly acidic and has a pH between topical acidification of wounds promotes healing (P. Molan & Betts, 2004; P. C. Molan, 1996; Peter. C Molan, 1999). The hydrogen peroxide produced by honey is responsible for the stimulation of tissue growth. Hydrogen peroxide has been shown to stimulate fibroblast growth in cell culture at micro- and nanomolar concentrations (Schmidt, Chung, Andrews, & Turner, 1992). The medical and nutritional properties of honey depend on its chemical composition. The chemical composition of honey varies depending on the plant source, season, and production methods (Moore et al., 2001). Honey has an obvious potential for use in a variety of clinical settings, and while a few clinics and individuals are using honey therapeutically, further research is needed to determine whether the source of honey can affect wound healing. The present paper discusses the effect of different types of honey for management of an full thickness skin wound in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals: One hundred and twenty healthy female Sprague-Dawley rats weighing between 300 to 350g were used in this study. The animals were randomly into four experimental groups with each group consisted of 30 animals. Group I was left untreated and acts as control group. Group II, III and IV were treated with Hanon honey, Sidr honey and Rosemary honey respectively.

The progress of wound healing was recorded at dyes 4, 8, 12, 16 and Day 20 post-operation. An Elizabethan collar was applied to prevent self-mutilation of the surgical site.

Honey samples: Three selected honeys which produced by bees from Al-Jabal Al-Akhdar Libya kept under different planting were used in this study the floral sources were Hanon honey from (Arbutus unedo) tree, Sidr honey from (Sidr) tree and Rosemary honey from (Rosemary) tree. The honeys were named according to their floral sources. all the honeys were supplied from Al-Jabal Al-Akhdar farms, Libya.

Surgical protocol: The rats were anaesthetized with an intramuscular injection of 35.0 mg/kg Ketamine and 5.0 mg/kg Xylazine in the gluteal area (M A.Hussin. Khaled, Asma, & Almahdi, 2016). When fully anaesthetized, the animals were positioned on their dorsal area, which was prepared aseptically for the creation of an open wound (2 X 2cm). The skin was disinfected with hibiscrub, containing 0.6% chlorhexidin then with 70 % alcohol solution and with 2% iodine solution (Druecke et al., 2004).

Using a sterile millimetre ruler and cotton tipped applicator dipped in sterile methylene blue, a 2cm square was drawn on the skin. A full thickness skin defect in which all tissue down to and including the panniculus muscle was excised using no. 15 scalpel blade. Therapeutic ultrasound massage was given on the periwound skin after smearing the area with coupling gel 10mts @ 0.5 watts/ cm² area (Altomare, Nascimento, Romana-Souza, Amadeu, & Monte-Alto-Costa, 2009).

The wound was covered with honey and kept on the wound and protected with a bandage. The limb was immobilized using a PVC splint and bandage. The same procedure was repeated once a week and the progress in healing was evaluated through wound colour coding, nature and quantity of exudates and odour (James & Bayat, 2003).

Clinical observation: The colour of the wound bed gives an indication of the phase of healing. The colour coding taken into account are red, yellow, black and pink areas as the main varia-

bles in a wound. Shiny beefy red or red indicates healthy granulation tissue. Yellow colour is due to fibrous tissue or necrotic slough, black is eschar or necrotic tissue and pink or purple means re-epithelialisation has begun (James & Bayat, 2003).

Mal-odour of the wound is commonly associated with infection or attributed to poor hygiene or from a dressing that has not been changed regularly. The presence of necrotic tissue gives off an offensive repulsive odour, and anaerobes typically produce a distinctive or putrid odour (James & Bayat, 2003).

Exudate: Exudates can be scored as no exudates, moderate or excessive. Type of discharge can be described as serous (clear fluid without blood), pus or debris. Serosanguineous and sanguineous indicates thin watery pale red to pink fluid and bloody to bright red, respectively. Purulent discharge is thick, cloudy, and yellow or tans (James & Bayat, 2003).

A more accurate method for determining the wound area in healing studies is tracing of the wound margins onto a clear plastic sandwich film. In this method, a double layer sterile plastic sandwich bag was placed on the wound for tracing; the layer that comes into contact with the wound can be removed and disposed of accordingly. The outer layer was placed on to a graph sheet and the squares were measured by square counting procedure. The number of squares (0.04 cm^2) that lay completely (N_c) and partially (N_p) inside the tracing were counted and the area was determined using the following formula: $A_{c+p} = (N_c + 0.40 \times N_p) \times 0.04$ (Richard, Daures, Richard, Vannereau, & Boulot, 2000). The wound margin at the border between normal skin and the wound and the outlined area was considered to be the total wound area. Next the leading edge of advancing epithelium was traced. The area between these two margins was considered to be the area for epithelialization. The area within the margin of advancing epithelium was taken as

the area of open or unhealed wound (Bohling, Henderson, Swaim, Kincaid, & Wright, 2004).

Calculation of wound healing
Percentage of epithelialization

$$\text{Percentage of epithelialization Day } n = \frac{\text{Area of epithelium Day } n}{\text{Total wound area Day } n} \times 100$$

Percentage of wound contraction

$$\text{Step 1: Total wound on Day } n = \frac{\text{Total wound area Day } n}{\text{Original wound area Day } 0} \times 100$$

Step 2: % wound on Day $n = 100 -$ total wound on Day n as % of original

Percentage of total wound healing was calculated by

$$\text{Step 1: open wound Day } n \text{ as \% of original} = \frac{\text{Open wound area Day } n}{\text{Original wound area Day } 0} \times 100$$

Step 2: Percentage of total wound healing Day $n = 100 -$ open wound Day n as % of original (Bohling et al., 2004; M. Khaled, Jalila, Kalthum, Noordin, & Saleh, 2014; M A.Hussin. Khaled et al., 2016)

Sterile cotton swabs were rolled over the wounds and streaked on blood and MacConkey agar plates. The colony growth was examined and identified by biochemical test after an incubation period of 24 hours.

Data analysis: In all groups, wound epithelialization, contraction, and total wound healing, analysis across treatment groups were compared using the repeated measures analysis of variance method for Days 0, 4, 8, 12, 16 and 20 post-operation. The significant means were elucidated using Duncan's multiple range tests. All statistical tests were conducted at $P < 0.05$ level of significance.

RESULTS

On application, the Hanon honey, adhered uniformly to the wound site, and were absorbed on the wound site. No unabsorbed remnants were noticed during the next application. In Groups I and II animals, the wound colour was red up to

Day 12 post- operation and pink in colour from Day 16 and 20. Groups III and IV showed bright beefy red colour up to Day 12 and it were red from Day 16 to 20. Malodour was observed up to Day 12 post-operation in Group I and II animals. In Group III and IV mild malodour were observed up to Day 8. Serous exudate was noticed up to Day 12 in Group I. Mild serous exudate was noticed up to Day 8 post-operation in Group II animals. No exudate was seen in Groups III and IV animals throughout the study (Table 1).

Table:(1). Clinical observation of the open wound

	Days	Group I	Group II	Group III	Group IV
Colour	4	Red	Red	Red	Bright shiny red
	8	Red	Red	Bright shiny red	Bright shiny red
	12	Red	Red	Bright shiny red	Bright shiny red
	16	Pink	Pink	Red	Red
	20	Pink	Pink	Pink	Pink
Odour	4	Malodour	Malodour	Mild malodour	Mild malodour
	8	Malodour	Malodour	Mild malodour	Mild malodour
	12	Malodour	Malodour	No odour	No odour
	16	No odour	No odour	No odour	No odour
	20	No odour	No odour	No odour	No odour
Exudate	4	Exudate	Mile exudates	No exudates	No exudate
	8	Exudate	Mile exudates	No exudates	No exudate
	12	Exudate	No exudates	No exudates	No exudate
	16	No exudate	No exudates	No exudates	No exudate
	20	No exudate	No exudates	No exudates	No exudate

The percentage of epithelialization was consistently better in Group IV throughout the trial. The difference between Groups I, II, and III compared to IV were evident as early as Day 4. The percentage of epithelialization improved from 18.68% (Day 4) to almost 99.41% on Day 20 in Group IV. This was almost twice that of Group I until Day 12. Groups II and III however, demonstrated more than average epithelialization throughout the trial (Figure 1). The percentage of wound contraction was better in Group III up to Day 12 (59.24%), however, it was best in Group IV on Days 16 and 20. The difference between Groups II, III and IV compared to Group I was evident on Day 8. The percentage of wound contraction improved from 75.64 % (Day 16) to almost 93.13 % on Day 20 in Group IV, but Group III showed an improvement from 17.69 % (Day 4) to almost 84.55 % on Day 20, and Group II showed an improvement from 15.68 % (Day 4) to almost 78.57 % on Day 20. Nevertheless, Group IV

demonstrated better than average total wound healing throughout the trial (Figure 2).

The percentage of wound contraction was better in Group IV throughout the trial. The difference between the animals in Groups II, III and IV compared to Group I was evident from Day 8. The percentage of total wound healing improved from 38.59 % (Day 4) to almost 99.13 % on Day 20 in Group IV. However, Group IV, demonstrated better than average total wound healing throughout the study (Figure 3).

On bacteriological examination, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Proteus* and *Klebsiella species* were isolated from all the Groups.

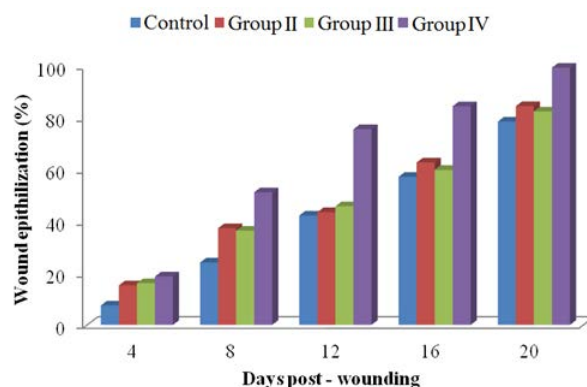


Figure: (1). Percentage of epithelialization of the wound

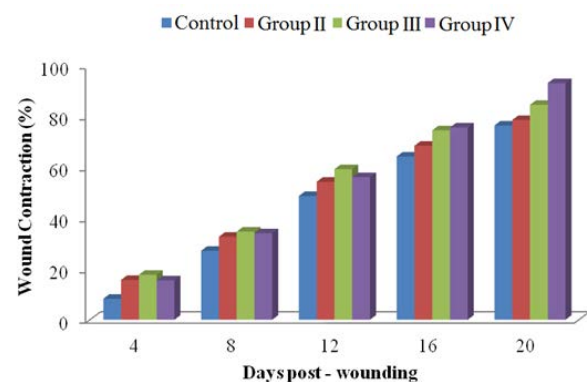


Figure: (2). Percentage of contraction of the wound

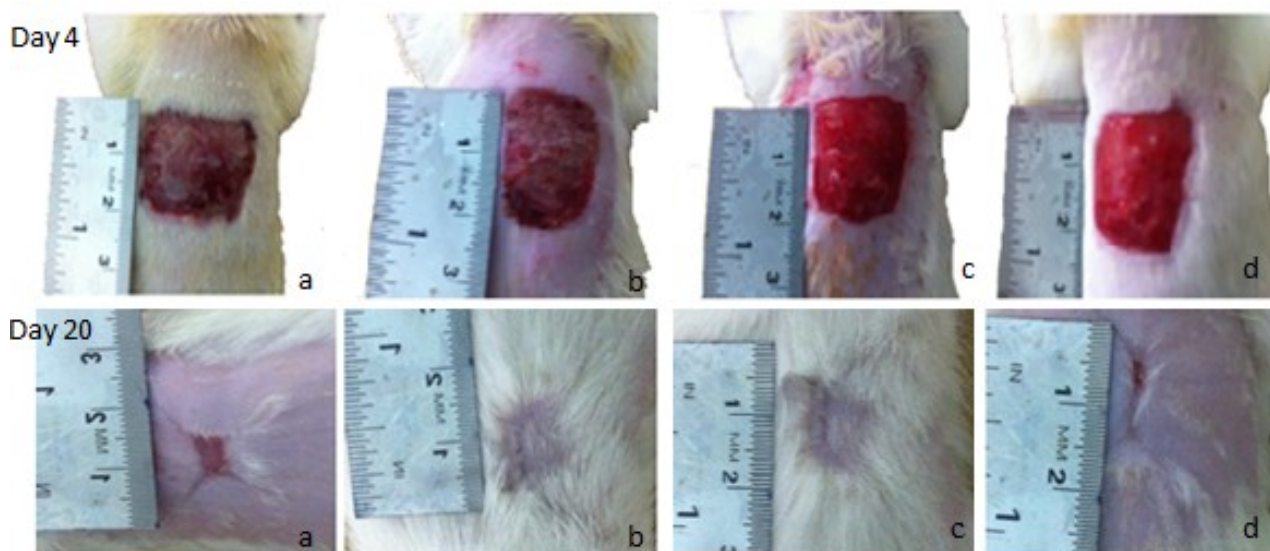


Figure (3): Percentage of total wound healing of the wound, Open wound on day 4 and 20 post-wounding: a) Group I; b) Group II; c) Group III; Group IV

DISCUSSION

In Groups II, III and IV, the application of honey was well tolerated by the animals. The honey is easy to apply on the wound without any adverse reaction and was well accepted by all the animals. The application of Hanon honey did not show any adhesion of the gauze during wound dressing.

The colour of the wound bed in Groups I and II was red while Groups III and IV showed a bright beefy red colour, which indicates healthy granulation tissue with neovascularisation, (James and Bayat, 2003) and resistance to infection until the epithelial barrier is re-established (Hosgood, 2003; Pope, 1993). The bright red colour observed is due to the micro vascular network throughout the granulation tissue (Tonnesen, Feng, & Clark, 2000). The basic fibroblast growth factor set the stage for angiogenesis during the first three days of wound repair (Schäffer, Tantry, & Barbul, 2004) and plays an important role in granulation tissue formation and the wound healing process (Takehara, 2000). Granulation in all the cases was flat without any exuberant nature; granulation tissue with a smooth surface facilitates migration of epithelial cells (Pope,

1993). On Days 16 and 20, the granulation tissue was observed to be pink in colour in Groups I and II, which indicates the final stage of wound healing. In Groups III and IV the granulation tissue was red in colour due to neovascularisation (James & Bayat, 2003).

Mal-odour was observed up to Day 12 in Groups I and II; however, in Groups III and IV mild mal-odour was observed up to Day 8 which may be due to infection (James & Bayat, 2003). The presence of bacterial infection was the common cause for the mal-odour observed, because all the wounds were infected. Serous discharge was noticed up to Day 12 in Group I and mild serous discharge was noticed up to Day 8 in Groups II and III; subsequently, the discharge was reduced because healthy vascular granulation tissue is resistant to infection (Hosgood, 2003; Pope, 1993).

Wound epithelialisation of Group IV was consistently better than Group I, and also better than Groups II and III because the re-epithelialisation process in a full-thickness wound is accelerated by the presence of collagen and its proliferation is essential for optimal wound healing (Rangaraj, Harding, & Leaper, 2011). On Day 4, epithelialisation was signifi-

cantly better in Groups II, III and IV, compared to Group I, because collagen from the wound margins began to migrate to form new epithelium (Rangaraj et al., 2011).

The mean percentage of wound epithelialisation in Group IV was maximum between Days 4 and 8 (32.56 %) but in Groups I, II and III, it was between Days 16 and 20 (21.36%, 21.79% and 22.61 %). Collagen is a potent specific growth factor for epithelial cells and assists in re-epithelialisation (Rangaraj et al., 2011).

The percentage of wound contraction on post wound Days 4 and 8 of all Groups showed no significant difference, this may be because of an inherent property of fibroblasts that appears early in the process of wound contraction, which, after some time, do not contract as forcefully as those that appear later (Bohling et al., 2004). Schaffer et al. (2004) reported that there is increased fibroblast activity of the body until post-wound Day 14. On Days 12, 16 and 20, Group IV was significantly better than Groups I, II and III since basic fibroblast growth factor effectively accelerated wound fibroblast proliferation (Kawai, Suzuki, Tabata, Ikada, & Nishimura, 2000) and has a characteristic myofibroblastic appearance, which plays a critical role in closure and healing (Cheng et al., 1999).

The mean percentage of wound contraction of Group IV on Day 20 was significantly better than other groups; in open wounds, contraction becomes an important feature and epithelialisation assumes a more predominant role. However, the two processes are independent of each other (Probst, 2003). All the groups showed maximum rates of contraction in the period between Days 8 and 12 post-wound; similar findings have been previously reported (Aljady, Kamaruddin, Jamal, & Mohd-Yassim, 2000; Baie & Sheikh, 2000; Bohling et al., 2004; Swaim et al., 1993).

The percentage of total wound healing of Group IV was significantly better than Group I

and consistently better than Group II and III because of more rapid epithelialisation; there is a corresponding reduction in area of exposed granulation tissue in the wound (Bohling et al., 2004). On Day 20, among Groups II, III and IV there was no significant difference but healing was significantly better than in Group I. Basic FGF is well known for promoting the proliferation of almost all cells associated with wound healing (Michiyo, Toshito, & Shigehiko, 2005). All the groups showed maximum mean percentage of total wound healing from Days 4 to 8; this is in concurrence with the results of Bohling, *et al.* (2004) but differs from the findings of Swaim, *et al.* (1993). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella sp* *Escherichia coli* is the common infection in wounds (Kumar, Sripriya, Raghavan, & Sehgal, 2006). All wounds can be contaminated regardless of the precautions taken (Arul Jothi et al., 2006; Pope, 1993).

It is a biocompatible protein that does not interfere with the body's normal immunologic response and can be used in non-healing chronic wounds, which require a trigger to stimulate the normal healing process.

CONCLUSION

Honey can be a better wound healing biomaterial in rats. It can be used as a less expensive skin substitute in order to stimulate and promote wound healing in animals.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Dean of the Faculty of Veterinary Medical, the Head of Department of Medicine and Animal Surgery for the facilities provided and help rendered during the study.

REFERENCES

Aljady, A., Kamaruddin, M., Jamal, A., & Mohd-Yassim, M. (2000). Biochemical study on the efficacy of Malaysian honey on inflicted wounds: an animal

- model. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 13(3), 125-132.
- Altomare, M., Nascimento, A. P., Romana-Souza, B., Amadeu, T. P., & Monte-Alto-Costa, A. (2009). Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. *Wound repair and regeneration*, 17(6), 825-831.
- Arul Jothi, N., Thilagar, S., Sheikh Omar, A. R., Kamaruddin, M. y., Shanthi, G., Goh, Y. M., & Sabri, M. Y. (2006). Effects of biomaterials keratin-gelatin and basic fibroblast growth factor-gelatin composite film on wound healing in dogs. *journal veterinar Malaysia*, 18(1), 21-26.
- Ashraf, A. H., & Khaled, M. A. H. (2008). Diagnosis of joint affection in camels by studies on synovial fluid which give the degree of affections & response to treatment. *Al-Mukhtar Journa of Sciences*, 20(1), 58-72.
- Baie, S. H., & Sheikh, K. A. (2000). The wound healing properties of *Channa striatus*-cetrimide cream—tensile strength measurement. *Journal of ethnopharmacology*, 73(1), 15-30.
- Ballard, K., & Baxter, H. (2000). Developments in wound care for difficult to manage wounds. *British journal of nursing*, 9(7), 405-412.
- Bhatia, P., & Ashwath, N. (2002). *Development of a rapid method for micropropagation of a new pineapple [Ananas comosus (L.) Murr.] clone, 'Yeppoon gold'*. Paper presented at the International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits 575.
- Bohling, M. W., Henderson, R. A., Swaim, S. F., Kincaid, S. A., & Wright, J. C. (2004). Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Veterinary Surgery*, 33(6), 579-587.
- Cheng, B., Fu, X., Sheng, Z., Gu, X., Sun, T., & Sun, X. (1999). The effect of basic fibroblast growth factor on myofibroblasts and its significance on wound healing. *Zhonghua yi xue za zhi*, 82(17), 1187-1191.
- Cockbill, S. (2002). Wounds the healing process. *Hospital pharmacist-london*, 9(9), 255-260.
- Consultation, W. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Part.
- Druecke, D., Lamme, E. N., Hermann, S., Pieper, J., May, P. S., Steinau, H. U., & Steinstraesser, L. (2004). Modulation of scar tissue formation using different dermal regeneration templates in the treatment of experimental full-thickness wounds. *Wound repair and regeneration*, 12(5), 518-527.
- Dunford, C., Cooper, R., Molan, P., & White, R. (2000). The use of honey in wound management. *Nursing Standard (through 2013)*, 15(11), 63.
- Hamad, A. M., & Taha, R. M. (2008). Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117(4), 329-334.
- Hosgood, G. (2003). Wound repair and specific tissue response to injury. *Textbook of Small Animal Surgery. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1*, 327-329.

- James, A., & Bayat, A. (2003). basic plastic surgery techniques and principles: chronic wound management. *Student Br Med J*, 11, 406-407.
- Kawai, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Ikada, Y., & Nishimura, Y. (2000). Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials*, 21(5), 489-499.
- Khaled, M., Jalila, A., Kalthum, H., Noordin, M., & Saleh, W. A. (2014). Collagen-Calcium Alginate Film Dressing with Therapeutic Ultrasound to Treat Open Wound in Rats. *Research Journal of Biological Sciences*, 9(2), 57-61.
- Khaled, M. A. H., & Ashraf, A.-h. H. (2008). Unusual foreign bodies cause obstruction of the esophagus in dogs. *Al-Mukhtar Journa of Sciences*, 19(1), 51-61.
- Khaled, M. A. H., Asma, S. E., & Almahdi, A. K. H. (2016). Clinical Evaluation of Collagen-Calcium Alginate Film along with Therapeutic Ultrasound Massage for Wound Healing in Cats. *Acta Biologica Malaysiana*, 5(2&3), 49-52.
- Kumar, M. S., Sripriya, R., Raghavan, H. V., & Sehgal, P. V. (2006). Wound Healing Potential of *Cassia fistula* on Infected Albino Rat Model. *Journal of Surgical Research*, 131(2), 283-289.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of food engineering*, 75(4), 453-460.
- Michiyo, M., Toshito, I., & Shigehiko, S. (2005). Effrcets of bFGFgelatin composite film incorporated into gelatin sheet on wound healing. *J. Biomat. sci. poly. ed*, 16(7), 893-907.
- Molan, P., & Betts, J. (2004). Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *Journal of wound care*, 13(9), 353-356.
- Molan, P. C. (1996). Honey as an antimicrobial agent. *Bee Products*, 3, 27-37.
- Molan, P. C. (1999). The role of honey in the management of wounds. *Journal of wound care*, 8(8), 415-418.
- Moore, O. A., Smith, L. A., Campbell, F., Seers, K., McQuay, H. J., & Moore, R. A. (2001). Systematic review of the use of honey as a wound dressing. *BMC complementary and alternative medicine*, 1(1), 2.
- Pope, E. R. (1993). skin healing .In: Disease mechanisms in small animal surgery. *2nd ED Philadelphia, London*, 152-155.
- Probst, C. W. (2003). Wound healing and specific tissue regeneration. In. *Texbook of small animal surgery. 3rd Ed. Saunders Company. Philadelphia*, 1, 53-63.
- Rafi, M. E. A., Ashraf, A.-h. H., & Khaled, M. A. (2008). Foreign bodies in the rumen of the sheep and goats. *Al-Mukhtar Journa of Sciences*, 19(1), 38-50.
- Rangaraj, A., Harding, K., & Leaper, D. (2011). Role of collagen in wound management. *Wounds UK*, 7(2), 54-63.
- Richard, J. L., Daures, J. P., Richard, C. P., Vannereau, D., & Boulot, I. (2000). Of mice and wound reproducibility and accuracy of a novel planimetry

program for measuring wound area.
Wounds, 12(6), 148-154.

Schäffer, M. R., Tantry, U., & Barbul, A. (2004). Wound fluid inhibits wound fibroblast nitric oxide synthesis. *Journal of Surgical Research*, 122(1), 43-48.

Schmidt, R., Chung, L., Andrews, A., & Turner, T. (1992). *Hydrogen peroxide is a murine (L929) fibroblast cell proliferant at micro-to nanomolar concentrations*. Paper presented at the Second European Conference on Advances in Wound Management, Harrogate, October 20-23.

Swaim, S., Bradley, D., Spano, J., McGuire, J., Hoffman, C., & Trachy, R. (1993). Evaluation of multipeptide-copper complex medications on open wound healing in dogs. *The Journal of the American Animal Hospital Association*, 29, 519-525.

Takehara, K. (2000). Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*, 24(1), 70-77.

Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 40-46.

تأثير أنواع مختلفة من العسل على التئام الجروح في الجرذان

خالد مسعود عبدالخالق^{1*}، أسماء صالح ونيس²، نواره محمد بالقاسم¹ أكرم حسين³ ومروان صالح ونيس⁴

¹ قسم طب وجراحة الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا، ² قسم النبات، كلية العلوم، جامعة طبرق، طبرق، ليبيا، ³ قسم الاغذية الحيوية، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة العلوم الاسلامية الماليزية، ماليزيا، ⁴ مركز البحوث الزراعية والحيوانية، البيضاء، ليبيا

تاريخ الاستلام: 02 سبتمبر 2018 / تاريخ القبول: 24 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.238>:Doi

المستخلص: الجرح هو إصابة جسدية تؤدي إلى تعطيل الاستمرارية الطبيعية للبناء، وشفاء الجروح هو استعادة الاستمرارية. تحسنت معالجة الجروح بشكل كبير في الثلاثين سنة الماضية، وسوف تستمر في التقدم بسرعة مع التكنولوجيا المتقدمة وفهم أكبر للجروح المزمنة، في هذه الدراسة تم استخدام مائة وعشرون من إناث الجرذان التي يتراوح وزنها بين 300 إلى 350 جرام على مدى 20 يومًا. تم توزيعها عشوائيًا إلى 4 مجموعات في كل مجموعة 30 حيوان. بعد إنشاء جروح مفتوحة 2 سم × 2 سم، تم علاج المجموعة الأولى بمرهم جنتاميسين والمجموعات الثانية والثالثة والرابعة تمت معاملتها بأنواع مختلفة من العسل، حيث أعطت نتائج جيدة علي الحيوانات دون أي رد فعل سلبي في الفحص السريري، أما المجموعتان الثالثة والرابعة فقد كونت نسيج حبيبي مع تكوين أوعية دموية بالمقارنة مع المجموعتين الأولى والثانية، وعند الفحص البكتيري، تم عزل الأنواع البكتيرية التالية *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas*، *Escherichia coli*، *Proteus* و *Klebsiella* في جميع المجموعات، بينما كان انكماش الجروح والشفاء الكلي أفضل بكثير في المجموعة الرابعة بعد معاملتها بعسل الحنون، ومن المعروف إن العسل هو بروتين حيوي لا يتعارض مع الاستجابة المناعية الطبيعية للجسم ويمكن استخدامه في الجروح المزمنة الغير شافية، والتي تتطلب التحفيز لعملية الشفاء الطبيعية، في الجروح الواسعة عندما يكون هناك نقص في الأنسجة الذاتية.

الكلمات المفتاحية: العسل، تقلص الجروح، التئام الجروح، الجرذان.



تواجد الأوكرا توكسين (أ) في القمح الطريّ ونواتجه تحت ظروف الطحن المتبعة في بعض المطاحن بمنطقة طرابلس

عمار محمد اللافي^{1*} سالم السنوسي زغيل²

¹ قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس - ليبيا

² مدرسة على وريت الثانوية-طرابلس

تاريخ الاستلام: 24 يناير 2018 / تاريخ القبول : 08 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.239>:Doi

المستخلص : استهدف هذا البحث الكشف عن تواجد الأوكرا توكسين أ (OTA) في القمح الطريّ ونواتجه (الدقيق و النخالة) ببعض المطاحن بمنطقة طرابلس. تم تجميع 96 عينة قمح ونواتجه من 3 مطاحن خلال: خزن القمح الخام، تنقيته وتنظيفه، إنتاج الدقيق و فصل النخالة. استخدمت طريقة الاستخلاص القلوي وأعمدة "الطور الصلب" (SPE) لفصل وتنظيف المستخلص بالتوالي وجهاز (HPLC) للكشف عن (OTA) وتقدير مستوياته بحدود كشف 0.025 ميكروجرام/كيلوجرام وبنسبة استرجاع 94. أوضحت النتائج أنّ 91 % من عينات القمح الخام وجدت ملوثة ب OTA وبمستويات تتراوح بين 0.7 - 12.4 ميكروجرام/كيلوجرام ومتوسط 2.6 ميكروجرام/كيلوجرام. بلغت نسبة التلوث في القمح بعد التنظيف 75 % وبمستويات تتراوح بين 0.6 - 3.5 ميكروجرام/كيلوجرام ومتوسط 1.9 ميكروجرام/كيلوجرام. انخفض مستوى التلوث بالدقيق إلى 46 % مقارنة بالقمح الخام كما انخفضت مستويات التركيز ما بين 0.5 - 1.1 ميكروجرام/كيلوجرام بمتوسط 0.7 ميكروجرام/كيلوجرام. بالمقابل ارتفعت نسبة التلوث في النخالة 88% و تراوح مدى التركيز بين 0.9-2.1 ميكروجرام/كيلوجرام بمتوسط 1.19 ميكروجرام/كيلوجرام. 84 % من عينات القمح لم يتجاوز تركيز OTA فيها الحد المقرر بالمواصفة القياسية الليبية رقم 231 لقمح الدقيق . جميع عينات الدقيق ظلّ متوسط تركيز OTA فيها دون الحد المسموح به بالمواصفة القياسية الليبية رقم 177 لدقيق القمح. أدت عمليات الطحن إلى انخفاض كبير في تواجد OTA في الدقيق بلغ 46% ، كما انخفض متوسط تركيزه في الدقيق بنسبة 73 % . التحليل الإحصائي عند مستوى معنوية 0.01% اظهر فروقات معنوية في تركيز OTA بين كل من القمح الخام، القمح المنظف، الدقيق و النخالة . يستخلص إلى أهمية تصحيح الممارسات المتبعة حالياً في تداول وتخزين القمح وإلى تشديد التفطيش على القمح أثناء استلامه بالمطاحن قيد الدراسة.

الكلمات المفتاحية: الأوكرا توكسين (أ)، القمح الطريّ، دقيق القمح، النخالة، المطاحن، طرابلس، HPLC

المقدمة

والبعض الآخر يسبب مشاكل تعفن وإفراز سموم أثناء التخزين مما قد يهدد صحة المستهلك ومن ثم فهذه المركبات تعتبر أحد أهم الملوثات للأغذية والتي نالت اهتماماً كبيراً من قبل العديد من الدول والمنظمات نظراً لخطورتها على الصحة العامة وعلاقتها المباشرة بالعديد من الأمراض المزمنة (الشبل، 2004).

من أهم السموم الفطرية الملوثة للقمح الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) بأنواعها والأوكرا توكسينات (Ochratoxins) والزيزالينون (Zearalenone)

تتعرض حبوب القمح للإصابة بفطريات مختلفة ابتداءً من وقت النضج الفسيولوجي ومروراً إلى مرحلة الاستخدام النهائي سواء للزراعة أو للاستهلاك حيث يزيد عدد الفطريات التي يمكن أن تصاحب الحبوب على 100 نوع، بعضها يشكل مخاطر مرضية على النباتات المزروعة من هذه الحبوب مثل ظهور أعراض التشوه والتلون أو البقع السوداء على حبوب القمح بسبب الإصابة ببعض الفطريات في الحقل خاصةً عندما تكون الرطوبة أعلى من 90%

* عمار اللافي: amarellafi@gmail.com ، قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس - ليبيا

ونخاله ومن ثم تتبع وتحديد مصيره في هذه المواد تحت ظروف وممارسات التصنيع لنماذج من المطاحن المحلية لمعرفة تأثير هذه العمليات وبالتالي إمكانية اقتراح بعض الحلول المناسبة لذلك.

المواد وطرق البحث

الكيمياءيات: تم الحصول على محلول الأوكراتوكسين (OTA) القياسي (10ug/kg) من شركة Sigma-Aldrich) و حضرت المحاليل التشغيلية بتخفيف المحلول القياسي في الميثانول، أسيتونيتريل وأرثوحمض الفوسفوريك 85% والتي تراوحت من 1-0.025 ميكروجرام/كيلوجرام. تم فصل السم عن باقي مكونات العينة باستخدام محلول بيكربونات الصوديوم الهيدروجينية 1% وزن/حجم كما استخدم محلول منظم الفوسفات (PBS)، الماء والميثانول لتنظيف المستخلص على أعمدة الطور الصلب (SPE,RP18) من أي عوامل مسببة للتداخل (AOAC International ، 2004).

تجميع العينات: تم تجميع عدد 96 عينة من حبوب القمح الطريّ المستورد (Triticum Aestivum) (روسي وماكسيكي المنشأ) ونواتجه من 3 مطاحن بمدينة طرابلس تابعة للشركة الوطنية للمطاحن والأعلاف، العينات أخذت عند أربع مراحل لعملية الطحن: خزن القمح الخام، تنقية وتنظيف القمح، إنتاج الدقيق / وفصل النخاله، وترافق ذلك مع قياس محتوى رطوبة القمح الخام وبعد تنظيفه والتي تراوحت بين 6-12% و 13-14% على التوالي. تم حفظ العينات عند 4-°م لحين تحليلها. أجريت عمليات الاستخلاص والقياس في الفترة ما بين ديسمبر 2010 ويناير 2011م.

تحضير محاليل المعايرة التشغيلية: تم تحضير المحاليل التالية:

1-0.5 جزء في البليون محلول OTA القياسي:

نقل 100 µL من محلول OTA القياسي (10 ميكروجرام/كيلوجرام) بواسطة ماصة آلية إلى قارورة زجاجية (vial glass) وخففت إلى حجم 2 ml بواسطة (1900 µL) من خليط التولوين : حمض الخليك 1:99 (ح/ح).

والفيومونيسين (Fumonisin) وغيرها من السموم الفطرية، إلا أن في مقدمتها على الإطلاق الأوكراتوكسين أ (OTA) الذي يعتبر ناتج أيض ثانوياً لبعض الأعفان من الأجناس (*Aspergillus*) و (*Penicillium*) على بعض الأغذية، في مقدمتها الحبوب التي تساهم بنسبة 55% من كمية OTA المتناولة في بعض الدول الأوروبية حسب الأحصائيات المنشورة في (Commision، 2006). بينت الدراسات المنشورة في مختلف الدول بما لا يدع مجالاً للشك تواجد OTA في اصناف متعددة من السلع الزراعية (من أبرزها القمح (Zebiri وآخرون، 2018)، كما يمكن لهذا المركب تلويث المنتجات ذات الأصل الحيواني وحتى تواجده في حليب الأمهات. يعتبر القمح بعد البن أحد الأغذية الرئيسية المساهمة في غذاء الإنسان من OTA، والأكثر أهمية من ذلك ثباتيته العالية في البيئة الحامضية وتحمله للعمليات الحرارية المرتفعة، وبالتالي يمكن أن نجده في منتجات الحبوب، والقهوة المحمصه ما يجعل مهمة استبعاده تحت ظروف الطبخ الاعتيادية مسألة صعبة (Alshannaq و Yu، 2017). تاريخياً العديد من الدراسات أثبتت علاقة OTA بعدة حالات تسمم في العالم، عليه يعتبر OTA من أبرز الملوثات التي يجب رصدها وتقدير مستوى التعرض لها، فقد تم الكشف عن مستويات مختلفة من الأوكراتوكسينات في البول والدم والحليب. والأنسجة تتناسب مع ما هو متناول من السموم الفطرية مع الأغذية. في ليبيا، يبلغ عدد المطاحن التابعة للشركة العامة للمطاحن والأعلاف المساهمة وشركات القطاع الخاص 42 مطحناً موزعة على مختلف المناطق، يصل إجمالي طاقتها التصنيعية 3.1 مليون طن سنوياً من القمح الطريّ (مصادر الشركة، 2014) والذي يجب أن يخزن في صوامع تتوفر فيها شروط الخزن المناسب والمناولة والنقل بالطرق الصحيحة. هذه العوامل قد لا تجتمع بصورة دائمة في صناعة الطحن المحلية مما قد يعرض مادة القمح وناتج الدقيق للتلوث ببعض السموم الفطرية.

وبناء على ذلك فقد صممت هذه الدراسة بهدف الكشف عن احتمال تواجد OTA في القمح الطريّ ونواتجه من دقيق

0.45 μm) إلى قارورة سعة 5 مل مزودة بغطاء، وبذلك تكون العينة جاهزة للحقن في جهاز HPLC حيث حقن (20 μL) من كل عينة ومن المحاليل القياسية المستعملة في منحنى المعايرة، واستخدم الكاشف الفلورنسي عند طول موجي (330nm) للإثارة و(477nm) للانبعاث ومعدل تدفق 0.8 مل/الدقيقة للطور المتحرك الذي يتكون من مخلوط من أسيتونيتريل: الميثانول: وأرثوحمض الفوسفوريك بنسبة 1:1:1 ح: ح: ح وعمود الفصل (C18; Water-) 5 μl (Milford 3.9×150mm).

صلاحية النتائج: اختبرت صلاحية طريقة التحليل وذلك باستعمال عينات قمح خالية من OTA (تحت حدود كشف الجهاز: 0.025 ميكروجرام/كيلوجرام). أضيفت لعينات القمح تراكيز مختلفة من OTA تراوحت بين 0.025 إلى 1.0 ميكروجرام/كيلوجرام. وبلغ أدنى تركيز يمكن لجهاز الكروماتوجرافي الكشف عنه 0.025 ميكروجرام/كيلوجرام (جدول 2).

جدول (2). حدود الكشف بعينات القمح المقواة بتركيزات مختلفة من (OTA).

حدود الكشف	عينات القمح (ug/kg)
0.025	0.025
0.09	0.1
0.24	0.25
0.47	0.5
0.99	1

تم تحضير منحنى المحاليل القياسية عند خمسة مستويات من المركب مكررة ثلاث مرات (0.025 ، 0.1 ، 0.25 ، 0.5 ، 1). بلغ معامل الارتباط لاستجابة الكاشف 0.998 (r) ومتوسط استرجاع استخلاص OTA من العينات 94% (جدول 3) ما يعكس فاعلية طريقة الاستخلاص المتبعة في هذه الدراسة. أمكن التعرف على OTA بمقارنة زمن الاحتجاز لكل عينة مع تلك المحاليل القياسية. تراوحت أزمنة الاحتجاز بين 5 و 5.5 دقيقة. تم تقدير OTA كميًا في العينات المختبرة بقياس المساحة تحت المنحنى عند زمن احتجاز OTA نسبة إلى مساحة منحنى المعايرة بنفس زمن الاحتجاز.

2-5 ميكروجرام/كيلوجرام محلول OTA القياسي:

نقل 100 μl من محلول OTA 0.5 ميكروجرام/كيلوجرام إلى دورق حجمي سعة 10 ml، ثم ترك ليتبخر تحت النيتروجين حتى الجفاف التام واخيرا أُذيب في 10 مل من مخلوط الماء: الميثانول (v/v7/3). ورشح المخلوط بواسطة مرشح (0.2 μm). تم خزن الراشح الناتج عند 4 م لاستخدامه لاحقًا في تحضير محاليل المعايرة (جدول 1).

جدول (1). اعداد محاليل المعايرة القياسية

HPLC	حجم (ul) محاليل المعايرة*	الحجم (ul) من (الماء + الميثانول)	التركيزات (ug/kg)
1	25	4975	0.025
2	100	4900	0.11
4	250	4750	0.25
5	500	4500	0.5

* (ug/kg) لكل منها

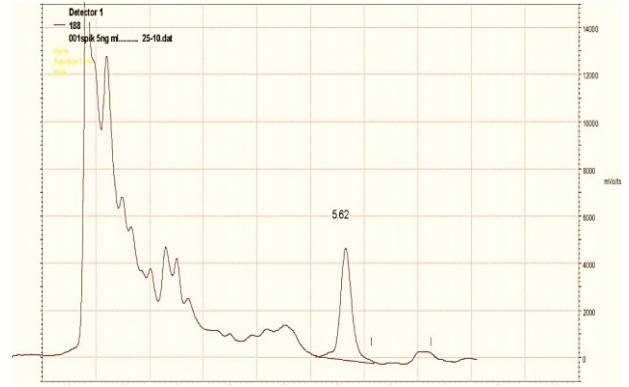
استخلاص OTA: أخذت 10 جرامات من كل العينات المطحونة بواسطة الميزان الحساس ووضعت في دوارق زجاجية سعة 250 مل واستخلص OTA بخلط العينة جيداً لمدة 30 دقيقة مع 200 مل من محلول بيكربونات الصوديوم الهيدروجينية (1% w/v) على جهاز الخلط (Orbital Shaker)، ثم رشح المستخلص خلال ورق ترشيح رقم 1 بالاستعانة بـ 10 مل من محلول منظم الفوسفات (AOAC International، 2004).

تنظيف مستخلص العينة: استخدم في هذه العملية أعمدة الطور الصلب (Milford -Waters (6ml, RP18) SPE Column) والتي جهزت ونشطت أولاً بتمرير 10 مل منظم الفوسفات والذي اتبع بتمرير 5 مل ماء مقطر. عند اكتمال التنشيط مرر مخلوط كل من الراشح ومحلول منظم الفوسفات (10 مل/10 مل) خلال العمود تم غسل العمود بواسطة المحاليل التالية بالترتيب: 5 مل من الماء المقطرو 3 مل ميثانول. استقبل محلول الإزاحة في أنبوبة سعة 4 مل (Conical amber tube) وجفف المستخلص تمامًا تحت النيتروجين عند 40 درجة مئوية.

ظروف تشغيل (HPLC): تم إذابة المستخلص في 500 مل من الطور المتحرك ورشح بواسطة إبرة ترشيح حجم

نفس القدر من الحدة والخطورة كما هو الحال بالجزائر. يتضح أيضاً من النتائج أن عملية الطحن أدت إلى انخفاض في مستوى تواجد OTA في الدقيق إلى 46% حيث وُجِدَ أن 11 عينة كانت موجبة من أصل 24 عينة وأن الحد الأدنى والأقصى لتركيز OTA يتراوح بين 0.5 و 1.1 ميكروجرام/ كيلوجرام بمتوسط 0.7 ميكروجرام/ كيلوجرام (شكل 1 يبين كروماتوجرام OTA في عينة دقيق). بالمقابل ارتفعت نسبة التلوث في عينات النخالة إلى 88% تقريباً (24/21) كما تراوح مدى التركيز في هذا الناتج بين 0.9 – 2.1 ميكروجرام/ كيلوجرام وسجل متوسط التركيز مستوى قدره 1.19 ميكروجرام/ كيلوجرام، كذلك بينت النتائج أن 84% من عينات القمح الطريّ كان محتواها من OTA أقل من الحد المقرر في المواصفة الليبية وأن 16% فقط منها يتجاوز متوسط تركيزها منه الحد الأقصى المسموح به في القمح من قبل المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسية والذي حدد ب 5 ميكروجرام/ كيلوجرام.

بينما جميع عينات الدقيق التي تمّ تحليلها لم يتجاوز متوسط OTA فيها الحد الأقصى المسموح به في هذا الناتج من قبل المركز الوطني للمواصفات وهو 3 ميكروجرام/ كيلوجرام، هذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه (Ghali وآخرون، 2009) بأن 81% من عينات القمح المدروسة (180/147) وجدت ملوثة بهذا المركب لكن بمدى تركيز اوسع تراوح بين 0.11-33.8 ميكروجرام/ كيلوجرام وأن 16.3% منها تجاوزت الحدود المسموح بها من قبل دول الاتحاد الأوروبي والمقررة بخمسة ميكروجرام/ كيلوجرام. وبالمثل مع ما توصل إليه كل من (Duarte وآخرون، 2010) بأن 90% من عينات حبوب القمح الطريّ وجدت ملوثة بسمّ OTA وبمستوى تركيز أقلّ تراوح بين 0.1 – 2.7 ميكروجرام/ كيلوجرام، و نوعاً ما مع (Vega وآخرون، 2009) الذي بين أن 30/21 عينة دقيق (70%) كانت ملوثة بالمركب بمتوسط تركيز 0.15 ميكروجرام/ كيلوجرام. من جهة أخرى، هذه النتائج أقلّ مما أبلغ عنه (Scudamore وآخرون، 2003) الذي وجد أن التنظيف الأولي يعمل على إزالة ما بين 25 إلى 35% من تركيز هذا



شكل (1): منحنيات الكروماتوجرام لعينة دقيق ملوثة

جدول (3). نسب الاسترجاع من عينات القمح المقواة بمستويات مختلفة من OTA.

%	OTA	
	الكمية المضافة (ug/kg)	الكمية المكتشفة (ug/kg)
100	0.025	0.025
90	0.09	0.1
96	0.24	0.25
92	0.46	0.5
92	0.95	1

النتائج والمناقشة

تواجد OTA في القمح الطريّ ونواتجه: صممت هذه التجربة للكشف عن امكانية تواجد هذا المركب في عينات من حبوب القمح الطريّ وكذلك تتبع مصيره في نواتجه من الدقيق والنخالة المجمعة من بعض المطاحن التابعة للشركة العامة للمطاحن والأعلاف بمدينة طرابلس. جدول (4) يشتمل على نتائج تحليل عدد (96) عينة أخذت أثناء الطحن حيث يتبين أن معظم عينات القمح الخام غير المنظف (24/22) 91% كانت ملوثة بمستوى يتراوح بين 0.7-12.4 ميكروجرام/ كيلوجرام ومتوسط تركيز 2.6 ميكروجرام/ كيلوجرام. بعد عملية التنظيف انخفضت نسبة التلوث في القمح إلى 75% (24/18) كما انخفض مدى ومتوسط التركيز ما بين 0.6 – 3.5 و 1.9 ميكروجرام / كيلوجرام على التوالي. وهذه النتائج مع أنها أعلى في نسبة العينات الملوثة في دول كالجائز (Zerbiri et.al, 2018) (التي قد تعرف ظروف مناولة وممارسات طحن مشابهة نوعاً ما لماهي عليه الصناعة المحلية) إلا أنها أقل بكثير في مستوى تركيز OTA بالرغم من أنها قد لا تكون على

هناك حاجة لتشديد التفقيش والاختبار على مادة القمح المستوردة، ناهيك عن ضرورة التقيد بالممارسات الجيدة في مناولة، تخزين وتصنيع (غربلة، تنظيف وطحن) هذه السلعة الأساسية.

المركب في القمح الخام وهو ما يمكن أن يعكس التباين في فاعلية تقانات التنظيف المستخدمة وهي كذلك أقل مما توصل اليه (Duarte وآخرون، 2010) من أن التنظيف يعمل على إزالة 26% من كمية OTA في القمح بعد التنظيف. يستخلص من المعطيات التي تم التوصل إليها بأن

جدول (4). مستوى التلوث، أدنى، أقصى ومتوسط تركيز OTA في القمح الطري ونواتجه ببعض المطاحن بطرابلس

العينات	عدد العينات المدروسة	عدد العينات الملوثة	نسبة التلوث (%)	تركيز OTA (ug/kg)			* (C.V)
				أدنى	أقصى	متوسط	
القمح الخام	24	22	91	0.7	12.4	2.6 ± 0.02	8.5
القمح المنظف	24	18	75	0.6	5.3	1.9 ± 0.12	6.3
الدقيق	24	11	45.8	0.5	1.1	0.7 ± 0.06	8.5
النخالة	24	21	87.5	0.9	2.1	1.19 ± 0.1	8.4

* C.V: معامل الاختلاف

USA. Analytical Chemists. Washington, DC.

المراجع

Commision, E. (2006). Commission Regulation (EC) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of European Communities*, 32,5-22.

Duarte, S., Pena, A., and Lino, C. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27(2),187-198.

Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., and Hedili, A. (2009). HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. *Food Control*, 20(8):716-720.

Scudamore, K., Banks, J., and MacDonald, S. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants*, 20(12),1153-1163.

الشبل، س، م. (2004). الفطريات المصاحبة لحبوب القمح في أربع مناطق من المملكة العربية السعودية. مطابع جامعة الملك سعود. الرياض.

المركز الوطني للمواصفات والمعايير الفنية. (2005). قمح الدقيق (تريتيمك أستيفيوم). م ق ل. 231.

المركز الوطني للمواصفات والمعايير الفنية. (2005). دقيق القمح. م ق ل. 177. مصادر الشركة، (2014). ندوة إنتاج القمح في ليبيا وانعكاسه على الأمن الغذائي. الشركة الوطنية للمطاحن والأعلاف المساهمة. طرابلس 23 يونيو/20014.

Alshannaq, A., and Yu, J.-H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal Of Environmental Research And Public Health* 14(6),632.

AOAC International. (2004). Association Methods of Analysis: Natural Toxins. 49th ed by Association of Official

Vega, M., Muñoz, K., Sepúlveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R., and Villarroel, O. (2009). Solid-phase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*, 20(7),631-634.

Zebiri, S. , Mokrane, S., Verhereck, C. Cheque, E., Regbioui, H., Sabaou, N., Mathieu, F. and Riba, A. (2018). Occurrence of Ochratoxin A in Algerian wheat and its milling dreivatives. *Toxin Reviews*, (DOI:10.1080/15569543.2018.1438472)

The occurrence of Ochratoxin (A) in soft wheat and its products under milling conditions used in some mills in Tripoli region

Amar M. Ellafi^{1*} and Salem S. Zeegal²

¹ *Department of food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tripoli*

² *Ali Wryeet s' Scoondary School, Tripoli*

Received: 24 January 2018/ Accepted: 08 October 2018

Doi : <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.239>

Abstract: This research aimed at detecting the presence of Ochratoxin A (OTA) in common wheat and its products (flour/bran) in some mills in the area of Tripoli. 96 samples of wheat and its products were collected from three mills at the wheat storage, screening and cleaning, flour production, and bran separation. Alkali method and a solid phase column (SPE 18) were applied to extract the poison and clean the extract respectively, and (HPLC) to detect and estimate OTA with quantifications level and the recovery of 0.025 µg/kg and 94% respectively. The results showed that 91% of the (uncleaned) wheat samples were contaminated with OTA, with concentrations ranging from 0.7-12.4 µg/kg and an average of 2.6 µg/kg. The percentage of contamination in the cleaned wheat reached 75% with concentrations ranging from 0.6 to 3.5 µg/kg and an average of 1.9 µg/kg. The toxins presence in flour decreased by 46% and the concentration level ranged between 0.5 and 1.1 µg/kg, with an average of 0.7 µg/kg. Contrary, the percentage of contaminated bran samples went up to 88% with a concentration level of 0.9 to 2.1 7 µg/kg and an average of 1.19 µg/ kg respectively. 84% of wheat samples did not exceed the OTA limit of 5 µg/kg as set by the Libyan Standard. Also, the average OTA concentration in all flour samples was below the limit of 3 µg/kg set by the Libyan Standard. Milling led to a significant reduction of 46% of the presence of OTA in flour. The average concentration of the toxin in the flour also dropped by 73%. The statistical analysis at a confidence level of 99 showed significant differences in OTA presence between each of: the raw, cleaned wheat, and flour/bran. It was concluded that present wheat handling practices should be corrected as well as tightening of the inspection of wheat in the studied mills.

Keywords: Ochratoxin A, Soft wheat, Wheat flour, Brand, Mills, Tripoli, HPLC.



إنتاج وتقدير بعض صفات جودة العصائر التقليدية السودانية المركزة (الكردييه، تمر الهند، التبليدي)

ريم أحمد¹، فاطمة عزت¹، بابكر آدم¹، هاجر محمد صالح عبد الله^{2*} وحسن علي مضوي³
¹ قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية كلية الزراعة، جامعة الزعيم الأزهرى، الخرطوم بحري-السودان
² قسم الصناعات الغذائية، كلية الزراعة، جامعة مصراته، مصراته-ليبيا
³ قسم علوم وتقانة الأغذية، كلية الزراعة، جامعة الخرطوم، الخرطوم-السودان

تاريخ الاستلام: 23 فبراير 2018 / تاريخ القبول: 03 أغسطس 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.244>:Doi

المستخلص: تهدف هذه الدراسة لإنتاج وتقدير بعض صفات الجودة الكيميائية والميكروبية وتفضيل المستهلكين للعصائر التقليدية السودانية المركزة (الكردييه *Roselle*، *Hibiscussabdariffa*، تمر الهند (العرييب) *Tamarind*، التبليدي *Adansoniमितigate*) كعصائر سودانية أصيلة يتم استهلاكها طيلة العام وفي شهر رمضان بصفة خاصة وذلك بدمج طريقتي التركيز العالي بإضافة السكر والتسخين ثم الحفظ بالتبريد دون إضافة مادة حافظة. جلبت العينات من السوق المحلي بأم درمان/السودان غسلت ونقعت في الماء لمدة ساعتين وصفت. تم تركيز العينات بالحرارة لعينات تمر الهند والتبليدي ولم يتم تسخين عينة الكركديه، أضيف حمض الستريك لكل العينات وأضيف الصمغ العربي لعينات تمر الهند والتبليدي، قسمت العينات إلى قسمين أحدهما أضيف له بنزوات الصوديوم (عينة ضابطة) الأخرى بدون إضافة، خزنت العينات على درجة حرارة التبريد (4م°) وأجريت الاختبارات كل 15 يوما للمواد الصلبة الكلية ورقم الـ pH والحموضة الكلية واختبارات ميكروبية وتقييم حسي) وتم تحليل النتائج إحصائياً. نتائج التحليل أظهرت أنه لم يكن هناك تغيير معنوي كبير في المواد الصلبة الكلية ورقم الـ pH والحموضة لعينات الكركديه وتمر الهند والتبليدي، ولم يكن هناك نمو ميكروبي طيلة مدة التخزين عدا عينة الكركديه بدون إضافة مادة حافظة. الاختبارات الحسية أظهرت تفضيل المحكمين لعصير الكركديه، يليه عصير التبليدي، وحلّ عصير تمر الهندي المرتبة الأخيرة. أهم التوصيات لهذه الدراسة أن يتم تصنيع العصائر التقليدية السودانية بطريقة التركيز العالي بالسكر والحرارة دون إضافة مادة حافظة لعينات تمر الهند والتبليدي، أما بالنسبة للكردييه فيوصى بإضافة مادة حافظة لأنه لا تستخدم الحرارة في تركيزه، أيضاً أوصت الدراسة باستخدام التركيز 60% لأن العصائر في هذا التركيز أظهرت ثباتاً في الخواص والكيميائية الميكروبية المختبرة.

الكلمات المفتاحية: التبليدي (البواباب)، الكركديه، بنزوات الصوديوم. تمر الهند (العرييب)، حمض الستريك.

المقدمة

تسويقية كبيرة في الأسواق المحلية وأيضاً للتصدير. على الرغم من انتشار أنواع العصائر المختلفة والمياه الغازية في السودان بصورة كبيرة، إلا أنه مازال للمشروبات التقليدية السودانية (الكردييه، تمر الهند والتبليدي) مكانتها وتفضيلها في المجتمع السوداني وبخاصة في فترة شهر رمضان الكريم. ويعتبر الكركديه بلونه الأحمر الجذاب المشروب الأكثر انتشاراً في محلات بيع العصائر التقليدية، لتوفر ثماره ورخص ثمنها،

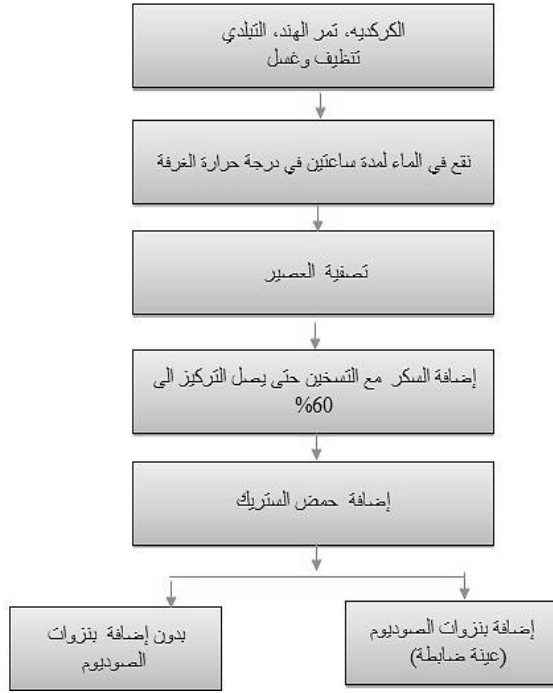
يعتبر الاتجاه إلى مشروعات التصنيع الغذائي من أفضل وأنسب الحلول الاقتصادية لحفظ الإنتاج الزراعي وتسويقه، وبصفة رئيسة تضم الصناعات الغذائية العديد من المشروعات التي يعتمد عليها الاقتصاد الوطني ومن ضمنها صناعة العصائر وهي تمثل في مضمونها اتجاهاً حديثاً له شريحة

* هاجر محمد صالح عبد الله: fatatelawasif@gmail.com *¹، كلية الزراعة، جامعة مصراته، مصراته - ليبيا.

العصائر التقليدية في السودان من كونها تعتبر العصائر الرئيسية في شهر رمضان الكريم هذا إلى جانب تفضيل استخدامها طيلة العام على أنواع العصائر المصنعة هذا إلى جانب رخص ثمنها مقارنة بالعصائر والمشروبات الغازية المصنعة. يمكن حفظ العصائر بشتى الطرق المعروفة وهي الحرارة المرتفعة (مثل البسترة والتعقيم التجاري) والحرارة المنخفضة (مثل التبريد والتجميد والتجفيف إلى مسحوق أو لفائف مثل لفائف قمر الدين) كما يمكن أن تحفظ العصائر بالمواد الحافظة الكيميائية مثل ثاني أكسيد الكبريت وحمض البنزويك وأملاحه (عبد الرحمن، 2001). يعد حمض البنزويك وأملاحه ذا تأثير مثبط لنمو الأحياء الدقيقة، وهو يتكون طبيعياً في بعض الخضروات والفواكه بتركيزات ضئيلة، ويتم إضافته في صورة تركيبية صناعية بجرعات تتراوح بين 150-300 ملجم/ لتر، ودرج على استخدام بنزوات الصوديوم صناعياً بصورة أكبر نظراً لأنها أكثر انحلالاً في الماء (الوزير، 2011). عموماً يفضل المستهلك دائماً ألا يحتوي مشروبه على أي مواد حافظة وذلك لأضرارها الصحية المعروفة. تكمن أهمية هذه الدراسة في الاستفادة من الفائض وتقليل الفاقد من المنتجات الغابية السودانية (الكردييه وتمر الهند والتبلدي) وإنتاج عصائر مركزة سهلة الإنتاج والكميات متوفرة طيلة العام وذات تكاليف إنتاجية قليلة. وكذلك إنتاج عصائر سودانية تقليدية مركزة تلبى احتياجات المدن البعيدة من مناطق الإنتاج وتتوفر في وقت ندرة الإنتاج. إضافة إلى تشجيع إنتاج وتصدير مراكز العصائر التقليدية السودانية والتي يمكن أن تكون مواد خام أولية في عدة صناعات غذائية أهمها تصنيع المشروبات الغازية والمرببات والصوصات. وفي إطار تطوير الطرق المتبعة لتخزين الأغذية، ارتأينا القيام بهذه الدراسة الحالية والتي تتناول إمكانية تصنيع وحفظ العصائر التقليدية السودانية على هيئة عصائر مركزة وذلك بدمج طريقتي التركيز العالي بالسكر والتسخين مع الحفظ في درجات حرارة منخفضة دون استعمال مواد حافظة. والتحقق من تأثير إطالة العمر التخزيني على صفات الجودة الكيميائية وتقييم نشاط هذه العصائر ضد نمو الميكروبات المسببة للفساد

وما زال يقدم في البيوت عند الزيارات الاجتماعية، وهو العصير الوحيد المسموح بتقديمه في بيوت العزاء للرجال فقط عند عودتهم من المقابر بعد دفن الميت مباشرة. الكركديه يزرع بغرب ووسط السودان، ويصنع عصيره بنقع أوراقه الحمراء التي تشبه الورود الجافة لدقائق في الماء ثم تصفيتها، وإضافة الماء حسب التركيز المطلوب والسكر. يعتبر العصير مادة أساسية في كثير من البلدان وذلك لقيمته الغذائية العالية حيث تتميز بارتفاع محتواها من السكر الذي يتراوح بين 12-18% إضافة للفيتامينات والأملاح المعدنية (عبد الرحمن، 2001). تنتشر أشجار المنتجات الغابية في غرب السودان بصورة كبيرة خاصة مناطق شمال وجنوب كردفان وتتميز هذه المناطق بإنتاجية عالية من المنتجات الغابية (الكردييه، تمر الهند، التبلدي) والتي تستخدم ثمارها بصورة رئيسية في إنتاج العصائر التقليدية السودانية (Percy 1971)، بالرغم من هذه الإنتاجية العالية، إلا أن الفاقد من هذه المحاصيل يتراوح بين 70-80% من جملة المنتج. من وجهة النظر الغذائية، تحتوي زهرة الكركديه على نسبة عالية من فيتامين ج (VitaminC) (فهمي وآخرون، 1993) وتوجد أشجار تمر الهند (العريديب) في السودان جوار الخيران والوديان في جنوب كردفان ودارفور (علي، 2008). تحتوي ثمار تمر الهند ما يقدر بـ 6% حمض الليمون، و 8% أملاح البوتاسيوم و 30% سكر وبعض الأملاح المعدنية والمواد القلوية (الرشيد، 2001)، أما التبلدي وهو المشروب المفضل لدى الكثيرين مقارنة مع بقية المشروبات التقليدية، فيستخرج من شجرة التبلدي الضخمة المعمرة، التي يكثر نموها بغرب السودان، تتميز ثمرة التبلدي بحجم كبير وشكل بيضوي أخضر اللون وبنقاط سوداء ويتم فتحها أو كسرها على الأصح بآلة قوية لقسوة الغطاء وبالداخل يتم تفريغها من حبيباتها مختلفة الأحجام ناصعة البياض والمعروفة بالقنقليز، ويتم نقعها في الماء لينتج سائلاً أبيض بلون الشعير وبرغوة جذابة ويضاف إليه الماء والسكر، وعصير القنقليز أو التبلدي له طعم لذيذ جدا وقد وجد أن ثمار التبلدي غنية جدا بـ حمض الاسكوريك إضافة إلى نسبة جيدة من الحديد والكالسيوم وتأتي أهمية

ساعتين صُفِّي العصير في إناء غير قابل للصدأ وأضيف له نصف كمية السكر (1.5كجم) ووضع على النار مع التحريك حتى تمام الذوبان ومن ثم تم إضافة بقية كمية السكر (1.5كجم) مع التحريك والتسخين إلى تمام ذوبان السكر ووصول التركيز إلى 60%. أخيراً أضيف 35جم من حمض الستريك و40 مل من محلول الصمغ العربي (لمنع فصل العصير) قسمت العينة إلى قسمين أضيف لأحدهما 0.9جم بنزوات الصوديوم كعينة ضابطة وتركت العينة الثانية بدون إضافة تمت تعبئة جميع عينات العصائر المركزة المعدة في عبوات بلاستيكية سعة لترين وحفظت على درجة حرارة (4 م⁰) لمدة 45 يوماً، الشكل رقم (1) يوضح تصميم التجربة.



الشكل (1). خطوات تصنيع العصائر التقليدية السودانية المركزة (تصميم الباحثين).

طرق التحليل: التحاليل الكيميائية:

المواد الصلبة الكلية الذائبة TSS: تم أخذ قراءة تركيز المواد الصلبة الكلية الذائبة بواسطة جهاز الـ رافراكتوميتر Refractometer وذلك وفقاً لـ (AOAC1992).

(بكتيريا وفطريات) للعصائر التقليدية السودانية المركزة وذلك بهدف تحسين وإطالة العمر التخزيني لها كذلك دراسة مدى تقبل المستهلك لهذا النوع المستحدث من العصائر التقليدية السودانية من خلال التقييم الحسي.

المواد وطرق البحث

جلبت عينات الكركديه وتمر الهند والتبلدي من السوق المحلي بمدينة أمدردمان/ السودان، والمواد المستخدمة تمثلت في: الكركديه، تمر الهند، التبلدي، حمض الستريك، الصمغ العربي، السكر وبنزوات الصوديوم.

طرق العمل :

عصير الكركديه المركز: وزن 150جم من الكركديه ونقع في 1200مل من الماء (نسبة 8:1) لمدة ساعتين (Suliman وآخرون، 2011) وتركت لمدة ساعتين بعدها صُفِّي العصير في إناء من الحديد غير القابل للصدأ Stainlesssteel و أضيف له 3كجم سكر وأذيب من غير تسخين حتى وصل التركيز إلى 60% ثم أضيف 1جم من حمض الستريك قسمت العينة إلى قسمين أضيف لأحدهما 0.9جم بنزوات الصوديوم كعينة ضابطة Control وتركت العينة الثانية بدون إضافة.

عصير تمر الهند المركز (العديب): وزن 200جم من تمر الهند ونقعت في 2400مل من الماء (نسبة 12:1) (Chavan, 2016) لمدة ساعتين وصفي في إناء من الحديد غير القابل للصدأ وأضيف له 1.5كجم من السكر وأذيب ثم وضع على النار مع التحريك وأضيف بقية كمية السكر (1.5كجم) وتم تدويبه مع التحريك حتى وصل التركيز 60% ثم أضيف 10جم من حمض الستريك و40 مل من محلول الصمغ العربي (لمنع فصل العصير)، قسمت العينة إلى قسمين وأضيف لأحدهما 1.5جم بنزوات الصوديوم كعينة ضابطة Control وتركت العينة الثانية بدون إضافة.

عصير التبلدي المركز (الباباب): وزنت 600جم من التبلدي (الباباب) ونقعت في 1800 مل من الماء (نسبة 3:1) لمدة

الغازي لمدة 4 أشهر على درجة حرارة (30-35 °م) هذا متفق أيضاً مع ما تحصل عليه (SaeedandAhmed) عند تخزين مشروب الكركديه الغازي على درجة حرارة (45 - 68 °ف) لمدة 135 يوماً، وقد يعزى انخفاض المواد الصلبة الكلية إلى ترسب البكتين الموجود طبيعياً في مشروب الكركديه أثناء مدة التخزين. تلاحظ أيضاً من نفس الجدول (1) أن هناك تغيراً في الحموضة وقيمة الـ pH إذ إن هناك ارتفاعاً في قيمة الحموضة وفي المقابل انخفاضاً في قيمة الـ pH خاصة بعد 15 يوماً من التخزين، والنتيجة المتحصل عليها في هذه الدراسة اختلفت مع ما وجدته (Ibrahim 2007) من انخفاض في الحموضة وارتفاع في قيمة الـ pH لمشروب الكركديه الغازي (الدراسة السابقة) وقد عزى ذلك إلى فقد الأحماض العضوية الموجودة طبيعياً في مشروب الكركديه.

الجدول رقم (2) يوضح التغير في الخواص الكيميائية لعصير تمر الهند المركز أثناء مدة التخزين (45 يوماً على درجة حرارة 4 °م)، وقد تلاحظ انخفاضاً غير معنوي في نسبة المواد الصلبة الكلية TSS بعد 15 و30 يوماً من التخزين تراوحت بين 59.00 إلى 56.80 % وبين 59.00 إلى 57.10 % لعينتي عصير تمر الهند المركز المضاف وغير المضاف إليها بنزوات الصوديوم على التوالي وثباتاً عند 45 يوماً من التخزين حيث سجلت 59.50 و58.00 % على التوالي، كما تلاحظ أيضاً انخفاضاً في الحموضة وارتفاعاً في قيمة الـ pH. هذا وقد نصت المواصفة القياسية لدولة جامايكا (JamicanStandardSpecifications 2010) وهيئة التقييس لدول مجلس التعاون لدول الخليج العربية 1820/2015، ومنظمة CODEX 247-2005 على أن عصير تمر الهند المركز يجب أن تكون محتوياته كافية للحصول على أقل معدل حمضية بمقدار 0.5%. الجدول رقم (3) يوضح التغير في الخواص الكيميائية لعصير التبليدي (البوابب) المركز أثناء مدة التخزين (45 يوماً على درجة حرارة 4 °م) وقد تلاحظ أيضاً انخفاضاً في كل من المواد الصلبة الكلية والحموضة وارتفاعاً غير معنوي في قيمة الـ

تقدير نسبة الحموضة Acidity: قدرت الحموضة بطريقة المعايرة وفقاً لطريقة (AOAC 1992)

تقدير الأس الهيدروجيني pH: تم قياس الأس الهيدروجيني بجهاز pHmeter وفقاً لطريقة (AOAC 1992)

التحليل الميكروبي: تم تقدير العد الكلي للبكتيريا بطريقة Platecountagar، وتم تقدير العد الكلي للفطريات والخمائر بطريقة صبب الألباق باستخدام PotatoDextroseAgar وذلك وفقاً لـ (Harrigan 1998).

التقييم الحسي: استخدم اختبار منح الدرجات وذلك باستخدام 30 من المحكمين غير المدربين من طلاب قسم الاغذية بكلية الزراعة جامعة الزعيم الأزهرى الخرطوم بحري/ السودان وطلب منهم تقييم صفات النكهة واللون والقبول العام وذلك بإعطاء 6 درجات لكل من ملامح اللون والنكهة والقبول العام وفقاً لـ (Ranganna, 2001).

التحليل الإحصائي: أجري تحليل إحصائي باستخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS، أخذ متوسط 3 مكررات لكل معاملة باستخدام تحليل التباين ANOVA وذلك وفقاً لـ Mead و Gurnow (1993) وتم فصل المتوسطات وفقاً لطريقة دنكن (Duncan 1955).

النتائج والمناقشة

كما هو موضح بالجدول (1) الذي يبين التغير في الخواص الكيميائية لعصير الكركديه المركز خلال مدة التخزين من اليوم الأول للتصنيع وحتى 45 يوم من التخزين، تلاحظ أن هناك انخفاضاً في قيمة المواد الصلبة الكلية في عصير الكركديه، تراوح الانخفاض بين 58.00 و 56.00 و بين 59 و 58 % لعينتي عصير الكركديه المضاف إليها وغير المضاف مادة بنزوات الصوديوم على التوالي، وقد وجد (Ibrahim 2007) أن المواد الصلبة الكلية TSS قد انخفضت بصورة ملحوظة عند تخزين مشروب الكركديه

pH، وقد وجد (Almustafa، 2003) أن الحموضة في بعض عينات عصير التبلدي تراوحت بين -0.153 و 0.364% وأن قيمة الـ pH تراوحت بين 2.9 - 3.15 وذكر أن الحموضة العالية و الـ pH المنخفض في عصير التبلدي

يوضحان أن هذا المنتج حامضي وقد عزى Airan و Desai (1954) حموضة عصير التبلدي (البواباب) لوجود نسبة عالية من الأحماض العضوية الطبيعية مثل حمض الستريك والتريتريك والماليك والإسكوريك.

جدول رقم (1). يوضح التغير في الخواص الكيميائية لعصير الكركديه (*Hibiscus subdariffa*) المركز خلال مدة التخزين (45 يوماً) على درجة حرارة (4 م°)

التحليل	المواد الصلبة الكلية % TSS	الأَس الهيدروجيني pH	الحموضة Acidity	مدة التخزين بالأيام
	بإضافة بنزوات الصوديوم	بدون إضافة بنزوات الصوديوم	بإضافة بنزوات الصوديوم	بدون إضافة بنزوات الصوديوم
0 Time	4.26± ^b 58.00	4.29± ^a 59.00	0.87± ^b 2.50	0.09± ^c 0.38
15 days	4.13± ^{bc} 57.50	4.27± ^{ab} 58.50	0.88± ^b 2.53	0.01± ^d 0.32
30 days	4.09± ^c 56.70	4.21± ^b 58.00	0.94± ^a 2.76	0.07± ^d 0.32
45 days	4.12± ^c 56.00	4.21± ^b 58.00	0.92± ^a 2.70	0.12± ^b 0.76
Lsd p ≤ 0.05	*	1.373	*	0.0005474
SE±	0.4579	0.4579	0.4579	0.0001826

SD value(s) bearing different superscript letter(s) within columns and rows (for each parameter) are significantly different (p ≤ 0.05) ± Mean

جدول رقم (2). يوضح التغير في الخواص الكيميائية لعصير تمر الهند (*Tamarind*) المركز خلال مدة التخزين (45 يوماً) على درجة حرارة (4 م°)

التحليل	المواد الصلبة الكلية % TSS	الأَس الهيدروجيني pH	الحموضة Acidity	مدة التخزين بالأيام
	بإضافة بنزوات الصوديوم	بدون إضافة بنزوات الصوديوم	بإضافة بنزوات الصوديوم	بدون إضافة بنزوات الصوديوم
0 Time	4.29± ^a 59.00	4.29± ^a 59.00	0.77± ^d 2.40	0.00± ^c 0.44
15 days	4.27± ^c 57.50	4.27± ^{bc} 58.00	0.87± ^c 2.54	0.00± ^f 0.38
30 days	4.28± ^c 56.80	4.26± ^c 57.10	0.88± ^c 2.59	0.00± ^d 0.57
45 days	4.29± ^a 56.50	4.27± ^c 57.00	0.88± ^c 2.60	0.00± ^b 1.08
Lsd p ≤ 0.05	1.373*	0.1224*	0.1224*	0.0005474*
SE±	0.4579	0.04082	0.04082	0.0001826

SD value(s) bearing different superscript letter(s) within columns and rows (for each parameter) are significantly different (p ≤ 0.05) ± Mean

جدول رقم (3). يوضح التغير في الخواص الكيميائية لعصير التبديدي Adanosiamitigate المركز خلال مدة التخزين (45 يوماً) على درجة حرارة (4 م) (م)

Acidity الحموضة		الأَس الهيدروجيني pH		المواد الصلبة الكلية %TSS		التحليل
بدون إضافة	بإضافة بنزوات	بدون إضافة	بإضافة بنزوات	بدون إضافة	بإضافة بنزوات	مدة التخزين بالأيام
بنزوات الصوديوم	الصوديوم	بنزوات الصوديوم	الصوديوم	بنزوات الصوديوم	الصوديوم	
0.00± ^c 0.96	0.00± ^c 0.96	0.77± ^{de} 2.40	0.88± ^{abc} 2.60	4.32± ^{ab} 60.00	4.32± ^{ab} 60.00	0 Time
0.00± ^c 0.83	0.00± ^c 0.83	0.76± ^c 2.30	0.86± ^{cd} 2.49	4.32± ^b 60.00	4.32± ^{ab} 60.00	15 days
0.00± ^c 0.96	0.00± ^d 0.89	0.86± ^c 2.58	0.93± ^a 2.73	4.29± ^b 59.00	4.30± ^b 59.10	30 days
0.00± ^b 1.21	0.13± ^a 1.34	0.88± ^c 2.60	0.92± ^{ab} 2.70	4.33± ^a 61.00	4.29± ^b 59.00	45 days
0.0005474		0.1341		1.62		Lsd p ≤ 0.05
0.0001826		0.04472		0.5404		SE±

SD value(s) bearing different superscript letter(s) within columns and rows (for each parameter) are significantly different (p ≤ 0.05±Mean)

حيث تفضيل المحكمين. من خلال هذه الدراسة نستنتج أنه أمكن إنتاج مركزات من العصائر التقليدية السودانية بتكاليف قليلة جداً وجودة عالية دون الحاجة لإضافة مواد حافظة. وأن مركزات العصائر التقليدية السودانية يمكن أن تخزن على درجة حرارة التبريد (4 م) لمدة 45 يوماً دون أي تغير في صفات جودتها الكيميائية والميكروبية والحسية عدا عينة عصير الكركديه الذي لم يُصِفْ إليه مادة حافظة. بالرغم من أن الدراسة أوضحت أن هناك تغيراً في كل من الحموضة وقيمة الـ pH إلا أن هذا التغير لم يكن ذا أثر كبير على الصفات الحسية للمركزات. من بين العصائر التقليدية السودانية المركزة التي أُجريت عليها اختبار التفضيل، وجد أن عصير الكركديه وجد قبولاً كبيراً لدى جمهور المحكمين يليه عصير التبديدي (البواباب) ثم أخيراً عصير تمر الهند.

وعليه نوصي باستخدام طريقة التركيز العالي بالسكر واستخدام الحرارة العالية لإنتاج مركزات جيدة الصفات الكيميائية والميكروبية والحسية. نوصي بعدم تسخين عصير الكركديه عند إعداد العصير المركز للحفاظ على لونه الأحمر الزاهي ويمكن إضافة مادة حافظة (مثل بنزوات الصوديوم) في الحدود المسموح بها في المواصفات الدولية لإطالة مدة حفظه. كما نوصي بالاهتمام بنواحي الممارسات الصحية

كما يبين الجدول رقم (4) التحليل الميكروبي لعينات العصائر السودانية التقليدية المركزة، وكما هو واضح أن عينات عصير تمر الهند والتبديدي وعصير الكركديه المركز المضاف إليه مادة بنزوات الصوديوم لم يوجد بها أي نمو بكتيري ولا وجود للفطريات والخمائر بها طيلة مدة التخزين (45 يوماً) عدا عينة عصير الكركديه المركز وغير المضاف إليه مادة بنزوات الصوديوم فقد أظهرت نمواً بكتيريا ضئيلاً جداً بعد مرور شهر من التخزين ويُعزى ذلك لعدم تعرضه للحرارة خلال الإعداد وذلك حفاظاً على اللون الأحمر المميز للون العصير.

وقد ذكر (المبارك، 2001) أن العصائر تكون عرضة للتلوث بالكائنات الحية المجهرية أثناء عمليات الإنتاج والتصنيع والإعداد للاستهلاك، حيث تؤثر هذه الكائنات على خواص المنتج النهائي وقابليته للحفظ. الجدول رقم (5) يوضح التقييم الحسي لعينات العصائر التقليدية السودانية المركزة، ولم يكن هناك فرق معنوي في مستوى تقبلهم لنكهة كل العصائر المقدمة. أما من ناحية اللون والقبول العام فقد فضّل المحكمون عصير الكركديه المضاف له مادة بنزوات الصوديوم ثم عصير الكركديه الخالي من مادة بنزوات الصوديوم يليه عصير التبديدي المضاف إليه مادة بنزوات الصوديوم، وجاء عصير تمر الهند في المرتبة الأخيرة من

جدول (4) العد الكلي للبكتيريا والخمائر والفطريات

العينات	0 time		15 days		30 days		45 days	
	Total count Yeast and molds	Total count	Total count Yeast and molds	Total count	Total count Yeast and molds	Total count	Total count Yeast and molds	Total count
A	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
B	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	10 ² ×1.7	Nil	10 ² ×3.0
C	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
D	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
E	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
F	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

الجيدة عند إعداد هذه الأنواع من العصائر المركزة خاصة التي لا تحتوي على مادة حافظة وذلك لضمان خلوها من التلوث الميكروبي خلال مدة التخزين. ويوصي الباحث باستخدام التركيز 60% لمركبات العصائر التقليدية السودانية لأنها أثبتت فاعليتها في المحافظة على صفات جودة المركبات. مع إجراء المزيد من الدراسات مطلوب لتغطية جوانب أخرى لم تتضمنها هذه الدراسة كتحديد مدة صلاحية هذه المركبات وكذلك إمكانية استخدامها كخامات أولية في صناعات غذائية أخرى.

جدول (5). التقييم الحسي لعينات العصائر السودانية التقليدية المركزة المضاف وغير المضاف إليها بنزوات الصوديوم

العينات	النكهة	اللون	القبول العام
A	1.14± ^a 4.73	0.79± ^a 5.17	0.89± ^a 4.97
B	1.35± ^a 4.40	1.24± ^{ab} 4.90	1.38± ^{ab} 4.50
C	1.24± ^a 4.67	1.5± ^{abc} 4.63	1.27± ^{ab} 4.33
D	1.97± ^a 4.20	1.47± ^{bc} 4.30	1.19± ^{ab} 4.43
E	1.42± ^a 4.30	1.52± ^c 4.03	1.22± ^{bc} 4.97
F	1.40± ^a 3.97	1.35± ^c 4.03	1.40± ^c 4.60
	LSD p≤ 0.05	0.6843 n.s	0.631 *
	±SD	0.2452	0.2261

SD value(s) bearing different superscript letter(s) within columns and ±Mean 0.05)rows (for each parameter) are significantly different (p ≤

التقييم	
A	عصير الكركديه المركز بإضافة بنزوات الصوديوم. ممتاز 6
B	عصير الكركديه المركز بدون إضافة بنزوات الصوديوم جيد جدا 5
C	عصير التبدي (الباباب) المركز بإضافة بنزوات الصوديوم جيد 4
D	عصير التبدي (الباباب) المركز بدون إضافة بنزوات الصوديوم متوسط 3
E	عصير تمر الهند المركز بإضافة بنزوات الصوديوم مقبول 2
F	عصير تمر الهند المركز بدون إضافة بنزوات الصوديوم رديء 1

المراجع

الرشيد، أحمد سالم (2001) المنتجات البستانية والغابية في صناعة العصائر والمشروبات - الدورة التدريبية في تقنية وضبط جودة العصائر والمشروبات، إدارة الصناعات الغذائية مركز البحوث والاستشارات الصناعية الخرطوم بحري/ السودان.

المبارك، ميمونة (2001) ميكروبيولوجيا العصائر والمشروبات - الدورة التدريبية في تقنية وضبط جودة العصائر والمشروبات، إدارة الصناعات الغذائية مركز البحوث والاستشارات الصناعية الخرطوم بحري/ السودان.

الوزير، دريد عبد الصمد (2011) تقانة الخضر والفواكه - القسم العلمي - قسم الهندسة الغذائية، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، جامعة البعث، العراق.

عبد الرحمن، حماد (2001) تقنية تصنيع العصائر - الدورة التدريبية في تقنية وضبط جودة العصائر والمشروبات، إدارة الصناعات الغذائية مركز البحوث والاستشارات الصناعية الخرطوم بحري/ السودان.

- Ibrahim, S. O. A. A. (2007). An Attempt To Prepare A Carbonated Beverage From Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Concentrate. *University Of Khartoum*.
- Jamican Standard Specifications For Fruit And Vegetable Juices And Drinks, And Fruit Nectars, *Final Draft (2010)*, FDJS CRS 27, 2010. ICS 67.160.20.
- Mead, B.; Gurnow R.W. (1993) Statistical Methods In Agricultural Experimental Biology. *London, New Yourk, Champman And Hall*.
- Percy, P. (1971). Karkade In The Sudan. *Sudan Journal Food Science And Technology*,3(1),16-17.
- Ranganna, S. (2001) Hand Book Of Analysis And Quality Control Of Fruit And Vegetable Products – *New Delhi, Tata Mc Graw-Hill*.
- Saeed, A., And Ahmed, M. (1977). Storage Stability Of Carbonated Beverage From Roselle Calyces (*Hibiscus Sabdariffa*). *Sudan Journal Of Food Science And Technology*, 9,78-81.
- Suliman, A. M., Ali, A. O., Idriss, S. E. A., And Abdualrahman, M. A. (2011). A Comparative Study On Red And White Karkade (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Calyces, Extracts And Their Products. *Pakistan Journal Of Nutrition*, 10(7), 680-683.
- علي، صلاح الدين محمد (2008) تشجير المناطق القاحلة / الخرطوم السودان، الطبعة الأولى.
- فهيمي، جمال الدين & السيد، عبد الغفور عوض & بدوي، محمد السعودي (1993) - النباتات الطبية والعطرية - القاهرة: جامعة القاهرة، مركز التعليم المفتوح.
- هيئة التقييس لدولمجلس التعاون لدول الخليج العربية (2015) عصائر ونيكتار الفواكه، GSO5/FDS1820/2015، ICS:67.160.00
- Airan, T., And Desai, R. (1954). Sugars And Organic Acids In *Adansonia Digitata* L. *Journal Of The University Of Bombay*,22(5),23-27.
- Almustafa, K. A. A. (2003). The Industrial And Nutritional Utilization Of Baobab Pulp. *Thesis Submitted For M. Sc Degree In Agriculture (Food Science And Technology) University Of Khartoum*.
- AOAC Official Methods Of Analysis – 15th Edition – (1992) – Copyright 1992 American Chemical Society.
- Chavan, T. D. (2016). Studies On Preparationof Tamaind (*Tamarindus Indica* L.) Spicy Nectar, *Athiesis Submitted In Partial Fufilment Of The Requirments For M. SC Degree In Post Harvest Mangement, Faculty Of Agriculture, DAPOLI - 415 712, DIST. RATNAGIRI (M.S.)*
- Duncan, D. B. (1955). Multiple Range And Multiple F Tests. *Biometrics*, 11(1),1-42.
- Harrigan, W. F. (1998). Laboratory Methods In Food Microbiology. *Gulf Professional Publishing*.

Production and Estimation of Some Quality Characteristics of Traditional Sudanese Concentrated Juices (Hibiscus, Tamarind and Baobab)

Reem Ahmed¹, Fatma Ezzat¹, Babeker Adam¹, Hagir Mohamed Salih Abd Allah^{*2} and Hassan Ali Mudawi³

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Al-Zaeem Azhari University, Khartoum, North Sudan

²Department of Food Industries, Faculty of Agriculture, University of Misurata, Misurata - Libya

³Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Khartoum, Khartoum, Sudan

Received: 23February 2018/ Accepted: 03August 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.244>

Abstract: This study aims to produce and estimate some of the chemical, microbiological, and consumer preference of traditional Sudanese concentrated juices (*Hibiscus sabdariffa*, *Tamarind*, *Adansonia mitigate*) as authentic Sudanese juices are consumed throughout the year and in Ramadan in particular, by combining concentration methods with sugar and heat and then refrigerating without adding a preservative. Samples were brought from the local market in Omdurman/ Sudan, washed and soaked in water for two hours and then filtered. Citric acid was added to the samples, and the Arabic gum was added to the Tamarind and Baobab juice. The samples were then divided into two parts, sodium benzoate was added to one of them and the other was left without addition. The samples were stored for 45 days at a cooling temperature of (4° C). Tests were conducted every 15 days for total solids, pH, total acidity, and microbiological test as well as sensory evaluation. The results obtained were subjected to statistical analysis. No significant differences were observed in the total solids, pH and acidity of the Baobab and Tamarind samples. There was no microbial growth during the storage period except for the Hibiscus juice without adding a preservative. Sensory evaluation showed that the panelists prefers hibiscus juice followed by Baobab juice, and Tamarind juice came in the last rank. As for hibiscus, it is recommended to add a preservative because there is no use for heat in its concentration. The study also recommended using 60% concentration because the juices in this concentration showed stability in the tested physical, chemical and microbial properties.

Key words: Baobab (Tabaldi), Hibiscus, sodium benzoate. Tamarind (Aradaib), citric acid.

*Corresponding Author: Hagir Mohamed Salih Abd Allah fatatelawasif@gmail.com¹Department of Food Industries, Faculty of Agriculture, University of Misurata, Misurata- Libya



تأثير مستخلصات نبات الفيجل *Ruta chalepensis L.* على بعض أنواع البكتيريا المعزولة من التهاب الجروح

أحمد امراجع عبد الرازق، سامي محمد صالح

قسم الاحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا

تاريخ الاستلام: 28 أبريل 2018 / تاريخ القبول: 08 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.245>:Doi

المستخلص: تعتبر البكتيريا من أهم المسببات الرئيسية لتلوث والتهابات الجروح لما تفرزه من سموم قد تؤخر عملية الشفاء، كما أصبحت هذه البكتيريا مقاومة لأغلب المضادات الحيوية، وعليه تم التوجه نحو النباتات الطبية كعلاجات بديلة. استهدفت هذه الدراسة التي أجريت في معمل أمراض النبات التابع لقسم وقاية النبات بكلية الزراعة اختبار الفاعلية التثبيطية للمستخلص المائي والأيثانولي والأسيتوني لنبات الفيجل *Ruta chalepensis L.* باستخدام عدة تراكيز (50، 100، 150، 200) ملغم/ مل ضد أربعة أنواع من البكتيريا (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Streptococcus pyogenes*) المعزولة من الجروح الملتهبة، والمتحصل عليها من مستشفى الجلاء بنغازي- ليبيا، وطُبِّق اختبار الحساسية بطريقة الأقراص ومقارنتها بالمضاد الحيوي Gentamicin. بيّنت النتائج أن التركيز 200 ملغم / مل لجميع مستخلصات نبات الفيجل هو الأكثر فاعلية، وأن التركيز 50 ملغم/ مل لم يظهر أي تأثير تثبيطي على جميع أنواع البكتيريا المدروسة، وكانت بكتيريا *Streptococcus pyogenes* الأكثر حساسية لتراكيز جميع المستخلصات بأقطار تثبيط تراوحت بين (1.3 - 14.3) ملم، في حين كانت بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* هي الأكثر مقاومة لتراكيز جميع المستخلصات والمضاد الحيوي، كما سجلت النتائج تفوق المستخلص الأيثانولي والأسيتوني على المضاد الحيوي Gentamicin على جميع أنواع البكتيريا باستثناء بكتيريا *Escherichia coli*.

لكلمات المفتاحية: نبات الفيجل، بكتيريا، التهاب الجروح.

المقدمة

بكتيريا *Staphylococcus aureus* ضمن السلالات متعددة المقاومة للمضادات (Lowy و Gordon، 2008)، كما تمتلك بكتيريا *Pseudomonas* المسببة لالتهابات الجروح مقاومة لمدى واسع من المضادات الحيوية (Stanzani وآخرون، 2007)، كما بين Kahlmeter و Menday (2003) أن البكتيريا *E. coli* اكتسبت صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بسبب سوء استخدام هذه المضادات، كما أن بكتيريا *Streptococcus pyogenes* تقاوم عديد من المضادات الحيوية وخاصة مضادات البيتالاکتام (Naas وآخرون، 2003). تعد النباتات الطبية بديلا للمضادات الحيوية في الطب الحديث لذا تتجه منظمة الصحة العالمية

يعتبر التهاب الجروح من المخاطر المهددة لحياة المرضى في المستشفيات، حيث إن منطقة الجرح الرطبة هي الأكثر عرضة للنمو الميكروبي (Zangana، 2004)، وإن حوالي 28% من الأشخاص الأصحاء العاملين بالمستشفيات حاملون لهذه البكتيريا (Forbes وآخرون، 2007)، وأشارت العديد من الدراسات أن المسبب الرئيسي لالتهابات الجروح هو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، و*Escherichia coli* (Dale وآخرون، 2004)، وتصنف

* أحمد امراجع عبد الرازق ahmed.amrajaa@omu.edu.ly، قسم الاحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا

لتهدف إلى اختبار تأثير مستخلصات أوراق وسوق نبات الفيجل بتركيز متصاعدة على بعض أنواع من البكتيريا المرتبطة بالتهاب الجروح.

المواد وطرق البحث

جمع نبات الفيجل وإعداده : جمعت العينات من محلات بيع الشتلات بمدينة البيضاء منطقة الجبل الأخضر شرقي ليبيا، وصنفت في معشبة قسم النبات/ كلية العلوم/ جامعة عمر المختار، وغسل النبات (أوراق وسوق) بالماء المقطر، ثم جففت داخل المختبر تحت درجة حرارة الغرفة، ثم طحنت بواسطة مطحنة كهربائية وحفظت لحين الاستعمال.

الحصول على المستخلصات النباتية:

الاستخلاص المائي: تم وزن 15 جراماً من المسحوق النباتي ووضع في دورق زجاجي وأضيف له 100مل من الماء المقطر ووضع في حاضنة هزاز لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°، ثم رشح المزيج بواسطة الشاش في أنابيب زجاجية ونبذت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم رشح الرائق بواسطة أوراق ترشيح Wattman No.1، بعدها بخر الراشح في الفرن بدرجة حرارة 40م° للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص، وحفظ في التلاجة بدرجة حرارة 4م° لحين الاستعمال (Parekh وChanda، 2007).

الاستخلاص بالمذيبات: أضيف وزن 10 جرام من المسحوق النباتي إلى 100مل من كل المذيبات الإيثانول (95%) والأسيتون والميثانول كل على حدة وحضن عند درجة حرارة 35م° على هزاز لمدة 24 ساعة، ورشح المزيج ونبذ في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق، وبخر في الفرن (Oven) بدرجة حرارة 60 م° للحصول على المسحوق الجاف (Abu Ghadeib وAli-Shtayeh، 1999)، وكررت العملية لمرات متتالية، ووضع في أنبوبة محكمة ومعتمة وحفظ في التلاجة لحين الاستعمال. حُضِر

إلى استخدامه كعلاج آمن للالتهابات الناتجة عن الإصابة بالكائنات الدقيقة (Bhattacharje وآخرون، 2006؛ Singh وVerma، 2011).

ينتمي نبات الفيجل *Ruta chalepensis L.* إلى عائلة *Rutaceae*، وهو من نباتات منطقة البحر الأبيض المتوسط العطرية (Lauk وآخرون، 2004). يعود استخدامه طبياً إلى احتوائه على الكثير من المواد الفعالة، حيث أشار Fakhfakh وآخرون (2012) منها 2-heptanol و2-undecanone و2-nonanol، كما يحتوي النبات على Flavonoids و Alkaloids و Terpenoid و Saponins و Coumarins و Furoquinolines و Resins و Tannins و Glycosides (Kuzovkina وآخرون، 2004)، بالإضافة لبعض العناصر المعدنية (N، P، K، Ca، Mg، Fe، Mn، Cu، Zn، Pb، Cr)، ويخلو من عنصر الكاديوم Cd السام مما يجعل استخدام النبات للأغراض الطبية ممكناً بصورة آمنة (Al-Salehy وآخرون، 2009).

هناك العديد من الدراسات حول الفاعلية التثبيطية لمستخلصات نبات الفيجل وتختلف باختلاف أجزائه حيث أعطى مستخلص الجذور الطازجة للفيجل قدرة تثبيطية ضد بكتيريا *E.coli*، *Pseudomonas aeruginosa* (Al-Sokari وEl-Sheikha، 2015)، كما لوحظ التأثير التثبيطي للمستخلص الأسيتوني ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام والمستخلص الكحولي ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (Kasimala وآخرون، 2014)، وكان لاستخدم الزيت العطري لنوعين من نبات الفيجل *Ruta chalepensis L.*، *Ruta montana (L.) L.* فاعلية تثبيطية جيدة ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Mycobacterium vaccae* (Bouzidi وآخرون، 2012)، يعود الفعل التثبيطي لمستخلص نبات الفيجل إلى وجود (قلويدات، فينولات) والتي لها تأثير ضد جميع أنواع البكتيريا (Mohammed، 2006). لذلك جاءت هذه الدراسة

ضد أنواع البكتيريا المعزولة من التهاب الجروح. حيث يلاحظ تفوق معنوي للمضاد الحيوي على المستخلص المائي لجميع أنواع البكتيريا المدروسة، كما يلاحظ تفوق معنوي للمستخلص الأيثانولي للتركيز 200 ملغم / مل على المضاد الحيوي للبكتيريا *S.aureus*، *P.aeruginosa*، *St.pyogens* بقطر تثبيط (8.5)، (6.7)، (10) مل على التوالي، كما تفوق المستخلص الأسييتوني بتركيز 200 ملغم / مل على Gentamicin بأقطار تثبيط (8.7)، (5.2)، (14.3) مل لنفس البكتيريا على التوالي، في حين تفوق المضاد الحيوي Gentamicin للبكتيريا *E.coli* بقطر تثبيط (14) مل على المستخلص الأيثانولي بقطر تثبيط (11.3)، والمستخلص الأسييتوني بقطر تثبيط (7.7) مل للتركيز 200 ملغم / مل. أما بالنسبة للتركيز 150 ملغم/مل للمستخلص الأيثانولي والأسييتوني فيلاحظ تفوق معنوي للمضاد على المستخلصات لبكتيريا *E.coli*.

أما بكتيريا *S.aureus* فتقارب تأثير المستخلص الأيثانولي مع تأثير المضاد الحيوي، في حين تفوق المضاد الحيوي على المستخلص الأسييتوني لنفس البكتيريا، ولوحظ تساوي المستخلص الأيثانولي والأسييتوني مع تأثير المضاد لنفس التركيز للبكتيريا *St.pyogens*. في حين تفوق المستخلص الأيثانولي على المضاد الحيوي للبكتيريا *P.aeruginosa* بقطر تثبيط (2) مل لنفس التركيز. كما بينت النتائج أن هناك تباينا واضحا في مقاومة العزلات المدروسة للمضاد المختبر، حيث أبدت بكتيريا *P.aeruginosa* مقاومة عالية، واتفقت هذه النتيجة مع (Hussien وآخرون، 2012)، قد يعود السبب إلى امتلاك البكتيريا لحاجز متمثل في طبقة الغشاء الخارجي لغلاف الخلية البكتيرية، أو ضيق المساحات الموجودة في الجدار بحيث تمنع مرور الجزيئات الصغيرة للمضاد الحيوي (Aghazadeh وآخرون، 2014)، أو بسبب كثرة الاستخدام الشائع لهذه المضادات (Blanchard و Magnet، 2005). أما بكتيريا *S.aureus* فكانت متوسطة الحساسية للـGentamicin بأقطار تثبيط (3-5) مل لجميع التراكيز،

المحلول الأساسي بتركيز 200ملغم/مل بإذابة 2جم من المسحوق الجاف في 10 مل ماء مقطر، ومنه حُضرت التراكيز الأخرى 50، 100، 150ملغم/مل باستخدام قانون التخفيف $C_1 V_1 = C_2 V_2$.

العزلات البكتيرية: عزلت البكتيريا عن طريق أخذ مسحات من حالات المصابين بالتهابات الجروح بمستشفى الجلاء-بنغازي، وتم تنميتها على الأوساط الغذائية الخاصة لعزل البكتيريا وشخصت عن طريق الصفات المظهرية، والاختبارات البيوكيميائية وفقا (Macfaddin، 2000؛ Abdulkadir وWaliyu، 2012).

اختبار حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي والمستخلصات النباتية: تم إجراء الاختبار بطريقة الأقراص Disk diffusion method، حيث تم تنمية البكتيريا على وسط Nutrient agar، ثم وضعت أقراص بقطر 6 ملم مشبعة بمستخلصات النبات على البكتيريا وبمسافات متساوية، وحضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م° بثلاث مكررات لكل طبق. وتم قياس أقطار مناطق التثبيط، ومقارنتها بأقراص المضاد الحيوي Gentamicin بثلاث تراكيز 5، 10، 15ug (Tendencia، 2004).

تصميم وتحليل البيانات: تم تصميم تجارب الدراسة المعملية وفق التصميم كامل العشوائية Completely Randomized Design (CRD)، وأجريت عملية التحليل الإحصائي باستخدام برنامج (Minitab 13) لتحليل تباين (ANOVA)، وتم إجراء المقارنة بين المتوسطات عند أقل فرق معنوي (LSD 0.05).

النتائج والمناقشة

اختبار حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي والمستخلصات النباتية: يتضح من الجدول (1) مقارنة التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات الفيجل (المائي، الأيثانولي، الأسييتوني) مع التأثير التثبيطي للمضاد الحيوي Gentamicin المستخدم

تأثيرا تثبيطيا للتركيز 200 و 150 ملغم/ مل على جميع البكتيريا بأقطار تثبيط تتراوح بين (2- 11.3) ملم، في حين كان للتركيز 100 ملغم/ مل أثر تثبيطي للبكتيريا *St.pyogenes* و *E.coli* بأقطار تثبيط (5) و (4.7) ملم على التوالي، وتقاربت نتائجنا مع ما ذكره (Abu-Mejdad، 2009 Abu-shanab ; وآخرون، 2008)، كما سجل المستخلص الأسيتوني أقطار تثبيط تراوحت من (1.7- 8.7) ملم على بكتيريا *E.coli*، *S.aureus* عند تركيز 200 و 150 ملغم/ مل، أما بكتيريا *St.pyogenes* فقد بلغت أقطار التثبيط بمعدل (14.3) و (9.2) ملم للتركيز 200 و 150 ملغم/ مل على التوالي، ولم تُبد بكتيريا *P.aeruginosa* أي تأثير تثبيطي للمستخلص باستثناء التركيز 200 ملغم/ مل الذي أعطى قطر تثبيط (5.2) ملم. واتفقت نتائجنا مع ما ذكره (Kasimala وآخرون، 2014) بوجود فاعلية للمستخلص الأيثانولي والأسيتوني ضد نمو بكتيريا *E.coli* و *S.aureus*

وهذا مقارب لما توصل إليه (Hosseinzadeh وآخرون، 2006). وسجلت بكتيريا *E.coli*، *St.pyogenes* أعلى حساسية بقطر تثبيط (14) و (9.5) ملم على التوالي، وهذا يقارب مع ما وجدته (Ahmed وآخرون، 2008). وبينت النتائج أيضا من الجدول (1) نتائج اختبار حساسية البكتيريا لمستخلصات نبات الفيجل أن المستخلص المائي لم يظهر تأثيرا معنويا تجاه البكتيريا المدروسة باستثناء التركيز 200 ملغم/ مل لجميع أنواع البكتيريا فيما عدا بكتيريا *P.aeruginosa* والتركيز 150، 100 ملغم / مل لبكتيريا *St.pyogenes* بأقطار تثبيط تراوحت من (1.3 - 5.3) ملم، وقد يرجع سبب عدم فاعلية المستخلص المائي ضد بعض أنواع البكتيريا إلى أن عديداً من المركبات الفعالة بالنبات لا تذوب في الماء، أو أن عملية الاستخلاص لا تعتمد على المذيب فقط وإنما على المركبات المستخلصة (Abu-shanab وآخرون، 2004)، وسجل المستخلص الأيثانولي

جدول(1): معدلات أقطار التثبيط مقيسة بالمليمتر لمستخلصات نبات الفيجل. (المتوسط ± الانحراف المعياري)

المستخلص والمضاد	البكتيريا	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>St.pyogens</i>
الشاهد (بدون معاملة)		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gentamicin	5ug	8.5±0.5	3.0±0.0	0.0±0.0	8.5±1.0
	10ug	10.0±1.0	4.0±0.0	0.0±0.0	9.5±0.0
	15ug	14.0±1.0	5.0±0.0	0.0±0.0	9.5±0.5
المائي	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±0.3
	150	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.5±0.5
ملغم/مل	200	5.2±1.2	1.3±0.6	0.0±0.0	5.3±1.0
	100	5.0±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.7±1.2
الأيثانولي	150	5.5±0.5	4.8±1.0	2.0±0.5	9.7±1.6
	200	11.3±1.3	8.5±0.9	6.7±0.6	10.0±0.0
ملغم/مل	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	150	4.0±0.9	1.7±0.3	0.0±0.0	9.2±0.8
ملغم/مل	200	7.7±1.2	8.7±0.8	5.2±0.3	14.3±3.1

L.S.D 0.05 التداخل بين المستخلصات والبكتيريا والتركيز = 0.0938

للمستخلصات إلى اختلاف نوع المذيب والمواد الفعالة المذابة وطبيعة جدار وأغشية البكتيريا (Chanda و Parekh، 2006)، وأن التركيز 200 ملغم / مل لجميع المستخلصات

وعند مقارنة مستخلصات نبات الفيجل من الناحية التثبيطية يلاحظ تفوق المستخلص الأيثانولي والأسيتوني على المستخلص المائي، ويرجع سبب تباين القدرة التثبيطية

الشكر والتقدير

نتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى الدكتورة مرفوعة صالح علي والدكتورة نوار علي محمد وإلى العاملين بمعمل تحاليل مستشفى الجلاء- بنغازي وإلى قسم وقاية النبات بكلية الزراعة- البيضاء، وإلى مختبر الرازي بالبيضاء.

المراجع

- Abdulkadir, M. and Waliyu, S. (2012). Screening and Isolation of the Soil Bacteria for Ability to Produce Antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 4, 211-215.
- Abu-Mejdad, N. M. J. (2009). Antimicrobial activity of *Citrullus colocunthis L.*, *Ruta Chalepensis L.* and *Curcuma longa Roxb.* Extract in vitro. *Journal of Univesity of Thi-Qar*. 4 (4), 1-8.
- Abu-shanab, B. Adwan, G. Abu-safiya, D. Jarrar, N. and Adwan, K. (2004). Antibacterial activity of some plant extract unit izedinpopular medicine in plant. *Turkish Journal of Biology*, 28, 99- 105.
- Abu-shanab, B. Adwan, G. Adwan, K. and Abu-shanab, F. (2008). Efficacy of Aqueous and Ethanol Extracts of Some Palestinian Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Journal The Islamic University*, 16(2), 77-86.
- Aghazadeh, M. Hojabri, Z. Mahdian, R. Nahaei, M. R. Rahmati, M. Hojabri, T. Pirzadeh, T. and Pajand, O. (2014). Role of efflux pumps: MexABOprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in nonmetallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*

هو الأكثر فاعلية ضد أنواع البكتيريا المدروسة، ولم يظهر للتركيز 50 ملغم/ مل أي فاعلية تثبيطية لجميع المستخلصات لذلك تم إقصاؤه، وتعود القدرة التثبيطية للمستخلص الأيثانولي والأسيتوني لنبات الفيجل (أوراق وسوق) ضد أنواع البكتيريا المرضية المسببة لالتهابات الجروح إلى احتواء النبات على مدى واسع من المركبات الأيضية، والتي تتمثل في الفلافونيدات، الجلايكوسيدات، الفلويونات، التانينات، الكومارينات، الراتنجيات، الفينولات، الصابونيات، التي لها قابلية للقضاء على البكتيريا من خلال تأثيرها على تركيب الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب الـDNA، وكذلك التأثير على جدار الخلية مما يؤدي إلى موت البكتيريا (Haddouchi وآخرون، 2013 ; Boberek وآخرون، 2010 ; Sher، 2009).

الخلاصة

نستنتج من هذه الدراسة أن نبات الفيجل (أوراق وسوق) يمتلك فاعلية تثبيطية ضد البكتيريا المعزولة من التهابات الجروح، وتزايدت الفاعلية بزيادة التركيز، حيث أعطى المستخلص الأيثانولي والأسيتوني بتركيز 200 ملغم / مل فاعلية أفضل بكثير من المستخلص المائي والمضاد الحيوي Gentamicin على أغلب أنواع البكتيريا المدروسة، في حين كان المضاد الحيوي Gentamicin أكثر كفاءة من المستخلص المائي، وكانت بكتيريا *P.aeruginosa* هي الأكثر مقاومة للمضاد الحيوي Gentamicin وجميع المستخلصات، بينما كانت بكتيريا *E.coli* الأكثر حساسية بالمضاد الحيوي، وكانت بكتيريا *St.pyogenes* الأكثر حساسية لجميع تراكيز المستخلصات المختبرة، لذا يوصي البحث بإجراء دراسات مستقبلية للمستخلصات النباتية وفصل المواد الفعالة منها ودراسة فاعليتها على البكتيريا الممرضة لاستخدامها طبيًا كبداية للمضادات الحيوية المستعملة حالياً وكذلك دراسة مدى حساسية السلالات البكتيرية للمضادات الحيوية المتداولة وبخاصة البكتيريا المسببة لالتهابات الجروح.

- montana* (L.) L. *Journal of Life Sciences*, (6), 898-902.
- Dale, R. M. K. Schnell, G. and Wong, J. P. (2004). Therapeutic efficacy of "Nubiotics" against burn wound infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(8), 2918-2923.
- Fakhfakh, N. Zouari, S. Zouari, M., Loussayef, C. and Zouari, N. (2012). Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 593-600.
- Forbes, B. A. Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Mosby elsevier. PP. 897.
- Gordon, R. J. and Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46, S350-S359.
- Haddouchi, F. Chaouche, T. M. Zaouali, Y. Ksouri, R. Attou, A. Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 141, 253-258.
- Hosseinzadeh, H. Bazzaz, B. S. F. and Sadati, M. M. (2006). In vitro evaluation of methyl xanthines and some antibiotics: Interaction against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Biomedical Journal*, 10, 163-167.
- Hussien, I. A. Habib, K. A. and Jassim, K. A. (2012). Bacterial Colonization of Burn isolated from cystic fibrosis and burn patients. *Infection, Genetics and Evolution*. 24, 187-192.
- Ahmed, S. A. Mahmoud, S. S. and Alkadim, L. S. (2008). Study of antimicrobial activity of *Salvia officinalis* extracts in the growth of pathogenic bacteria. *Iraqi Journal Of Biotechnology*, 7(1), 51-63.
- Ali-Shtayeh, M. S. and Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42, 665-672.
- Al-Salehy, Sh. H. Al-Hayany, A. M. Al-Mawla, R. M. (2009). Discovering secondary metabolism products and mineral elements in *Ruta chalepensis*. *Journal of Research Diyala Humanity*, (36), 69-82.
- Al-Sokari, S. S. and El-Sheikha, A. F. (2015). In vitro antimicrobial activity of crude extracts of some medicinal plants from Al-Baha region in Saudi Arabia. (<http://www.sciencepublishinggroup.com/j/jfns>), 3(1-2), 74-78.
- Bhattacharje, I. Chatterjee, S. k. and Chanadro, G. (2006). Antibacterial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extract against some pathogenic bacteria. *Mem.Inst.os-waldo cruz., Rio DeJaneiro*. 101(6), 642-648.
- Boberek, J. M. Stach, J. Good, L. (2010). Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. *www. Plosone.org*, 5 (10) e13754.
- Bouzidi, M. A. Latrèche, A. Attaoui, I. Benabderrahmane, M. Mehdadi, Z. and Benyahia, M. (2012). Antibacterial effect of the essential oils extracted from *Ruta chalepensis* L. and *Ruta*

- Positive and Negative Bacteria. *Tikrit Journal of Pure Science*, 11 (1), 183-186.
- Naas, T., Zerbib, M., Girlich, D. and Nordmann, P. (2003). Integration of a transposon TnI-encoded inhibitor-resistant-lactamase gene, *bla*_{TEM-67} from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. *J. Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 47 (1), 19-26.
- Parekh, J. and Chanda, S. (2006). In vitro antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiatae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). *African Journal of Biomedical Research*, 9, 89-93.
- Parekh, J. and Chanda, S. (2007). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 31: 53 – 58.
- Sher, A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*. 7(1):72-78.
- Singh, S. and Verma, S. S. K. (2011). Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2 (3), 114-120.
- Stanzani, M., Tumietto, F. Giannini, M. B. Bianchi, G. Nanetti, A. Vianelli, N. Arpinati, M. Giovannini, M. Bonifazi, F. Bandini, G. and Baccarani, M. (2007). Successful treatment of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis after allogeneic bone marrow transplantation with a combination of colistin and tigecycline. *Wounds. Baghdad Science Journal*, 9(4).
- Kahlmeter, G. Munday, P. (2003). Cross-resistance and associated resistance in 2478 *Escherichia coli* isolates from the Pan-European ECO.SENS project surveying the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, p128-131.
- Kasimala, M. Tukue. M. and Ermias. R. (2014). Phytochemical screening and antibacterial activity of two common terrestrial medicinal plants *Ruta Chalapensis* and *Rumex nervosus*. *Bali Medical Journal*, 3(3), 116-121.
- Kuzovkina, I., Al-terman, I. and Schneider, B. (2004). Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 65, 1095-1100.
- Lauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A. (2004). Protection against murine endotoemia by treatment with *Ruta chalepensis* L.; a plant with anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 267 - 272.
- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd edn., *Williams and Wilkins, Philadelphia*, P. A: 555-565.
- Magnet, S. and Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105 (2), 477–498.
- Mohammed, M. J. (2006). Study the Biological Effect of Alkaloids and Phenols Separated from *Ruta graveolens* L. (fruits) on Growth of Some Gram

Journal of Medical Microbiology. 56, 1692-1695.

Tendencia, E. A. (2004). Disk diffusion method. In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment, pp. 13-29. *Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.*

Zangana, P. M .M. (2004). Isolation And Identification Of Aerobic Bacteria Before And After Sterilization In The Theatres And Wards Of Tikrit Teaching Hospital. *Degree of Masters ,College of Education ,Women University of Tikrit*

Effect of *Ruta chalepensis* L. extracts on some types of bacteria isolated from wound inflammation

Ahmed Amrajaa Abdulrazziq* and Sami Mohammed Salih

Department of Biology, Faculty of Education, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda, Libya

Received: 28 April 2018/ Accepted: 08 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.245>

Abstract: Bacteria are among the main causes of infection and wound infections because of toxins that may delay the healing process, Which has become resistant to most antibiotics and has been directed towards medicinal plants as alternative treatments. This study, which was conducted in the Plant Pathology Laboratory of the Plant Protection Department of the Faculty of Agriculture, investigated the inhibitory effect of the water extract, ethanol and acetone of *Ruta chalepensis* L. using several concentrations 50, 100, 150 and 200 mg/ml against four types of bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*) isolated from wound inflammation to Al-Jalaa Hospital in Benghazi-Libya by a sensitivity test in the form of Disk diffusion method. then compared with Gentamicin. The results showed that the concentration of 200 mg/ml for all *Ruta chalepensis* L. extract was the most effective, and the concentration of 50 mg/ml did not show any inhibitory effect on all types of bacteria studied, *Streptococcus pyogenes* was the most sensitive of all concentrations of extracts with diameters of between (1.3 - 14.3)mm, While *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant to concentrations of all extracts and antibiotics, The results also showed that the ethanol and acetone extracts were superior to the Gentamicin on all bacteria except *Escherichia coli*.

Key words: *Ruta chalapensis* L., Bacteria, wound inflammation.

*Corresponding Author: Ahmed amrajaa Abdulrazziq, ahmed.amrajaa@omu.edu.ly, Department of Biology, Faculty of Education, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda, Libya



تحسين استنبات بذور أشجار الخروب *Ceratonia siliqua* L. باستخدام طرق معالجة مختلفة

سامي محمد صالح و أحمد امراجع عبدالرازق*

قسم الأحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا

تاريخ الاستلام: 28 أغسطس 2018 / تاريخ القبول: 16 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjcv.v33i3.246>:Doi

المستخلص: أجريت هذه الدراسة في كلية العلوم / جامعة عمر المختار، لتحسين إنبات بذور أشجار الخروب *Ceratonia siliqua* L. البرية والمستزرعة باستخدام عدة معاملات مختلفة شملت معاملة النقع في الماء الساخن لفترات زمنية (20، 40، 60) دقيقة، والخدش الميكانيكي، وخدش ميكانيكي مع النقع في الماء المقطر، والخدش الميكانيكي مع النقع في الجبرلين ppm500، والنقع في الجبرلين تركيز 750، 1000، 1250 ppm، وأخيراً النقع في حمض الكبريتيك تركيز 50، 70، 90%، أشارت النتائج إلى تفوق معاملة الخدش مع النقع في الجبرلين ppm500 على جميع المعاملات بنسبة إنبات 98%، وبمتوسط زمن إنبات 2.88 يوماً، كما سجلت زيادة في طول الجذير، والوزن الطازج والجاف للبادرة، بينما كانت معاملة النقع في الجبرلين أقل المعاملات كفاءة في تحسين إنبات البذور ومؤشراته، وأشارت النتائج إلى عدم وجود فروق معنوية بين بذور الخروب البرية والمستزرعة للصفات المدروسة، وخلصت الدراسة إلى أن معاملة بذور الخروب بالخدش مع النقع في الجبرلين ppm500 هي الأكثر كفاءة في تحسين الإنبات.

الكلمات المفتاحية: *Ceratonia siliqua* L.، إنبات البذور، معاملات مختلفة.

المقدمة

(2008) وللتخفيف من ظاهرة الاحتباس الحراري (Geraldo وآخرون، 2010)، وله دور مهم في كثير من الصناعات الغذائية والدوائية (Prajapati وآخرون، 2013)، ويعدّ من الأغذية الغنية بالكربوهيدرات حيث يشكل السكرز أغلبها بنسبة تصل إلى 70% بالإضافة إلى الجلوكوز والفركتوز (Biner وآخرون، 2007). يتكاثر الخروب بالبذور والعقل والتطعيم، والطريقة الأمثل هي التكاثر بالبذور (Romano وآخرون، 2002)، وتنتشر بذوره في الطبيعة عن طريق الحيوانات التي تتغذى على ثماره مما يجعل غلاف البذرة منفذا للماء بنسبة إنبات لا تتجاوز 10%، أو قد تتحلل البذرة أو تتبنت نتيجة الاحتكاك بجزيئات التربة (Perez-Garcia، 2009، Piotto وآخرون، 2003). تمتاز بذور الخروب بغلاف صلب وهذا يجعل إنباتها بطيئاً جداً ولإسراع من عملية الإنبات، تعامل البذرة قبل زراعتها بمعاملات مختلفة تقلل من صلابة غلافها وتساعد على تشرب الماء حتى تتم عملية الإنبات (Gubbuk وآخرون، 2011)، لذا تحتاج بذور الخروب قبل

نبات الخروب (*Ceratonia siliqua* L. (Carob)، يعود إلى عائلة *Caesalpinioideae* التابعة للعائلة *Fabaceae* وتحت رتبة *Leguminales* (Ekinic وآخرون، 2010). نبات شجري يصل ارتفاعه إلى 10-15 متراً، دائم الخضرة معمر يعيش حتى 200 عام (Ait Chitt وآخرون، 2007)، يعتبر من أشجار الزينة والفاكهة وينتشر على نطاق واسع في منطقة البحر الأبيض المتوسط (Manso وآخرون، 2010)، ويشكل جزءاً مهماً من الغطاء النباتي لمنطقة الجبل الأخضر شرقي ليبيا (Lamlom و Abdalrasol، 2016)، متطلباته البيئية قليلة حيث ينمو في المناطق الجافة وشبه الجافة وبشكل جيد في المناطق المعتدلة وعادة على سطوح التلال الصخرية، ومقاوم للحرارة والجفاف (Janick و Paull، 2008) يستخدم بيئياً لمكافحة التصحر وفي تشجير الغابات واستصلاح الأراضي ومقاومة الحرائق (Janick و Paull،

* أحمد امراجع عبدالرازق ahmed.amrajaa@omu.edu.ly، قسم الأحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا

شمال مدينة البيضاء وأشجار مستزرعة بمنطقة الأبرق شرق مدينة البيضاء - الجبل الأخضر - ليبيا.

المعاملات المختبرية للبذور:

انتقاء وتعقيم البذور: اختبرت حيوية البذور من خلال نقعها في الماء المقطر للتخلص من البذور الفارغة الطافية على سطح الماء، وانتقاء البذور المتجانسة قدر الإمكان، ثم نقعت البذور في محلول هايپوكلوريد الصوديوم 1% لمدة 8 دقائق (Ashraf و McNeilly، 1990) لغرض تعقيمها وتقليل التلوث الميكروبي، بعدها تم تعقيم أطباق بتري زجاجية في فرن بدرجة حرارة 120م° لمدة 20 دقيقة ثم بطنت بورقني ترشيح قطرها 15 سم (Mansour، 2013)، ثم خضعت البذور للمعاملات التالية:

الشاهد (نقع في ماء مقطر ومعقم).

الخدش الميكانيكي: تم خدش البذور بإجراء قطع صغير 1-2 ملم باستخدام شفرة حادة على أن يتم بحذر لعدم الاضرار بها (Karaguzel وآخرون، 2002).

الخدش مع نقع في الماء المقطر: خدشت البذور ثم نقعت في الماء المقطر لمدة 24 ساعة (Abdalrasol و Lamlom، 2016).

النقع في حمض الكبريتيك المركز: نقعت البذور في الحمض بتركيز 50%، 70%، 90% لمدة 20 دقيقة مع التحريك المستمر حتى لا تلتصق البذور ببعضها البعض نتيجة تحلل أغلفتها ثم غسلت بالماء المقطر لمدة ساعة لإزالة أي أثر للحمض، قبل اختبارها للإنبات (El-Bakkosh، 2013).

النقع في الجبريلين: نقعت البذور في هرمون الجبريلين بتركيز 750، 1000، 1250 ppm لمدة 24 ساعة (Bostan و Kilic، 2014)، حضرت التراكيز المذكورة من هرمون الجبريلين وذلك بعد تحضير محلول قياسي بإذابة 3 جرام من محلول الجبريلين في حجم لتر ماء مقطر ومنه حضرت التراكيز الأخرى باستخدام قانون التخفيف $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$.

الزراعة لبعض المعاملات كالخدش الميكانيكي والنقع في الماء المغلي أو حمض الكبريتيك المركز لفترة محدودة، أو النقع في الماء المقطر لمدة 15 يوماً، والنقع في الجبريلين 25 ppm لمدة 24 ساعة (Tous و Batlle، 1997). أجريت العديد من الدراسات لكسر طور السكون في البذرة، والتي كان الغرض منها مساعدة البذور على تشرب الماء للإسراع في نسبة إنباتها، ففي تركيا تمكن Gunes (2013) من تسجيل أعلى نسبة إنبات (93%) مع حمض الكبريتيك بتركيز 98% لمدة 20 دقيقة، وأشارت نتائج دراسة أخرى أجريت في اليونان إلى أن استخدام حمض الكبريتيك لمدة 15 دقيقة وكذلك النقع في الماء الساخن 90م° لمدة 5 دقائق أعطيا نسبة إنبات بلغت 86% في 10 أيام و 58% في 9 أيام على الترتيب (Tsakalidimi و Ganatsas، 2001). وفي مصر أجريت دراسة لكسر طور السكون لبذور الخروب استمرت من أبريل وحتى سبتمبر وعلى مدى عامين 2011، 2012 استخدم فيها الباحث El Deen وآخرون (2014) عددا من المعاملات اشتملت على حمض الكبريتيك 60%، الجبريلين بتركيز 25 ppm، الماء الساخن، أسيتون والتي لاحظ فيها زيادة متفاوتة في نسب إنبات البذور تحت جميع المعاملات، وأما في سوريا فوجد Mansour (2013) أن خدش البذور وكذلك المعاملة بحمض الكبريتيك المركز لمدة 30 دقيقة كانتا الطريقة الأكثر فاعلية في زيادة رفع نسبة الإنبات إلى 100%، يليهما المعاملة بالكحول لمدة 60 دقيقة ثم غمر البذور في الماء الساخن لمدة 60 دقيقة. كما بينت نتائج دراسة Abdalrasol و Lamlom (2016) لإنبات بذور الخروب في ليبيا، أن أفضل المعاملات المستخدمة في الإنبات كانت الخدش الميكانيكي مع النقع بالماء المقطر. لذلك جاءت هذه الدراسة بهدف تسريع إنبات بذور الخروب باستخدام عدة معاملات، وتحديد الأنسب منها والمدة الزمنية المطلوبة لما له من أهمية بيئية وغذائية وطبية.

المواد وطرق البحث

جمع البذور وإعدادها: جمعت قرون الخروب في فصل الخريف 2017م من أشجار برية من غابات منطقة الوسيطة

باستخدام برنامج (Minitab 13) وجدول تحليل التباين ومقارنة المتوسطات عند أقل فرق معنوي (LSD 0.05).

النتائج والمناقشة

أوضحت النتائج عدم إنبات بذور أشجار الخروب في معاملة الشاهد، وهذا دليل على أنها تعاني عدم المقدرة على الإنبات وهو ما يعرف بظاهرة السكون، ويرجع ذلك لوجود غلاف صلب يمنع نفاذية الماء، وبشكل حاجز أمام نمو وتمدد الجنين (Hartmann وآخرون، 2002)، لذلك تم تطبيق عدة معاملات على البذور البرية و المستزرعة للإسراع من عملية الإنبات، وأظهرت نتائج الدراسة أن معاملة بذور نبات الخروب قبل الزراعة أدت إلى تحسين الإنبات في مختلف المعاملات مقارنة مع الشاهد، وبعد 7 أيام بينت النتائج من الشكل (1)، أن هناك تبايناً واضحاً في نسب الإنبات للمعاملات المختلفة. حيث لوحظ من الجدول (1) تفوق معاملة الخدش مع النقع في الجبريلين ppm500 في تسجيل أعلى نسبة إنبات بمعدل (98%) وبمتوسط زمن إنبات (2.88 يوماً)، وبأفضل مؤشر إنبات بمعدل (8.09) وزيادة في طول الجذير بمعدل (7.5 سم)، والوزنين الطازج والجاف للبادرة بمعدل (0.197 جم، 0.064 جم) على التوالي، فكلما ازدادت نسبة الإنبات ازدادت متوسطات هذه الصفات، تليها معاملة الخدش مع النقع في الماء المقطر للبري والمستزرع بنسبة إنبات بمعدل (92%) وبمتوسط زمن إنبات (2.97 يوم)، وتقاربت النتيجة مع ماوجده (Lamlom و Abdalrasol، 2016) بنسبة إنبات 94% وبمتوسط زمن إنبات 2.83 يوم، في حين ان معاملة الخدش الميكانيكي بلغ معدل نسبة إنباتها (76%) وبمتوسط زمن إنبات (3.74 يوم)، وتقاربت هذه النتيجة مع (Lamlom و Abdalrasol، 2016) بنسبة 70% واختلفت عنها بمتوسط زمن إنبات 9.87 يوم، واختلفت النتيجة مع (Perez-Garcia، 2009) بنسبة إنبات 99% وبمتوسط زمن إنبات 5.5 يوم. ويظهر الجدول (2) نتائج تأثير معاملة النقع في حمض الكبريتيك على إنبات البذور، حيث سجلت معاملة النقع في حمض الكبريتيك تركيز 70% أعلى نسبة إنبات بمعدل (88%) وبمتوسط زمن إنبات (2.95 يوم)، وزيادة في طول

النقع في الماء الساخن: نقعت البذور في الماء المغلي بدرجة حرارة 100م° لفترات زمنية 20، 40، 60 دقيقة ثم تركت لتبرد في درجة حرارة الغرفة 25م° (Mansour، 2013).

الخدش مع نقع في الجبريلين : تم الدمج بين معاملي الخدش والنقع في محلول الجبريلين كمعاملة جديدة، حيث خدشت البذور أولاً ثم نقعت في الجبريلين ppm500 لمدة 24 ساعة. وزعت البذور المعاملة في أطباق بتري معقمة كغرفة رطبة بمعدل 20 بذرة/ طبق وحضنت في درجة حرارة 25م° وكررت كل معاملة ثلاث مرات، وخضعت الأطباق للملاحظة اليومية لمدة 7 أيام ومتابعة الإنبات من حيث إضافة الماء المقطر حسب الحاجة لكل طبق (Karaguzel وآخرون، 2002)، وتم حساب الإنبات بتسجيل عدد البذور النابتة في جميع المعاملات بدءاً من اليوم الثالث، وهو اليوم الذي حدث فيه أول إنبات علماً بأن معيار الإنبات هو خروج الجذير خارج غلاف البذرة (Ganatsas وآخرون، 2008)، وفي نهاية التجربة أخذت النتائج النهائية للصفات التالية:

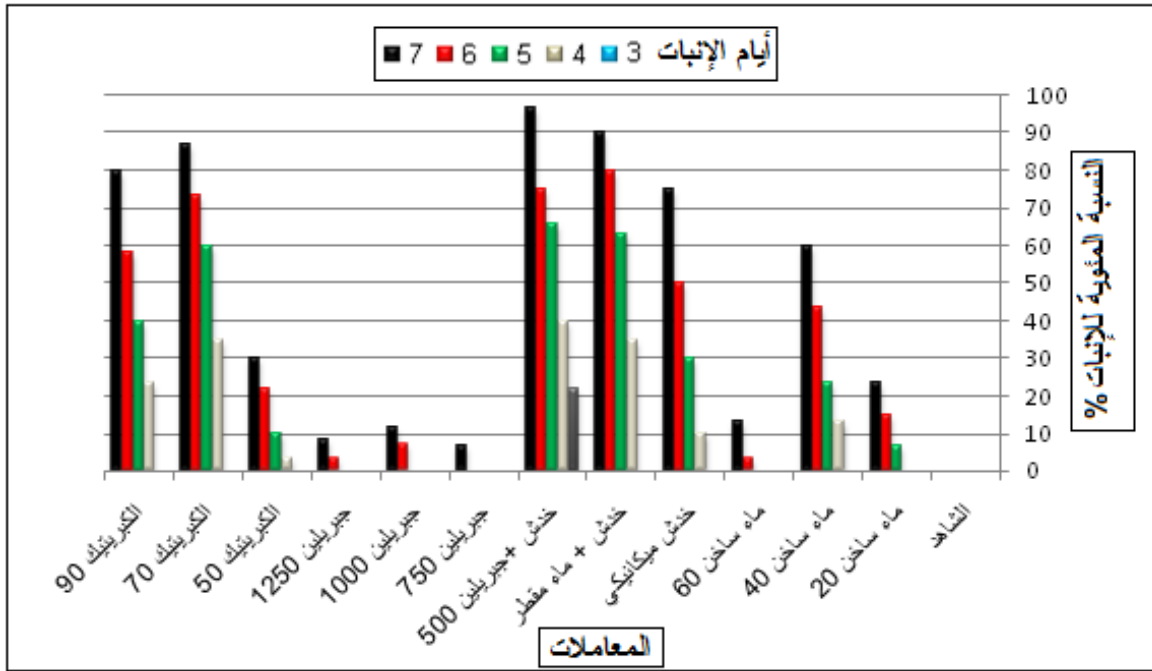
نسبة الإنبات % = عدد البذور النابتة / العدد الكلي للبذور X 100 (Naikawadi وآخرون، 2012).
متوسط زمن الإنبات = مجموع عدد البذور النابتة في كل يوماً / مجموع عدد البذور النابتة في نهاية التجربة (Moradi وآخرون، 2008).
مؤشر الإنبات = مجموع عدد البذور النابتة في كل يوماً / عدد الأيام منذ بداية التجربة (Das وآخرون، 2017).

طول الجذير: تم أخذ أطوال الجذير بأستعمال مسطرة مدرجة بعد 14 يوماً من فحص الإنبات، وحساب المتوسطات. الوزن الطازج والوزن الجاف: تم أخذ الوزن الطازج للبادرة بعد 14 يوماً من فحص الإنبات حيث تم فصل الجذير وأخذ 5 بادرات من كل طبق من أغلب المعاملات وبعض المعاملات لم يتم التوصل إلى العدد المطلوب حيث تم أخذ المتوسطات لها بناءً على البادرات النامية، ثم أزيل غلاف البادرة، ووضعت في فرن بدرجة حرارة 70م° لمدة 24 ساعة (Reynolds وآخرون، 1998).

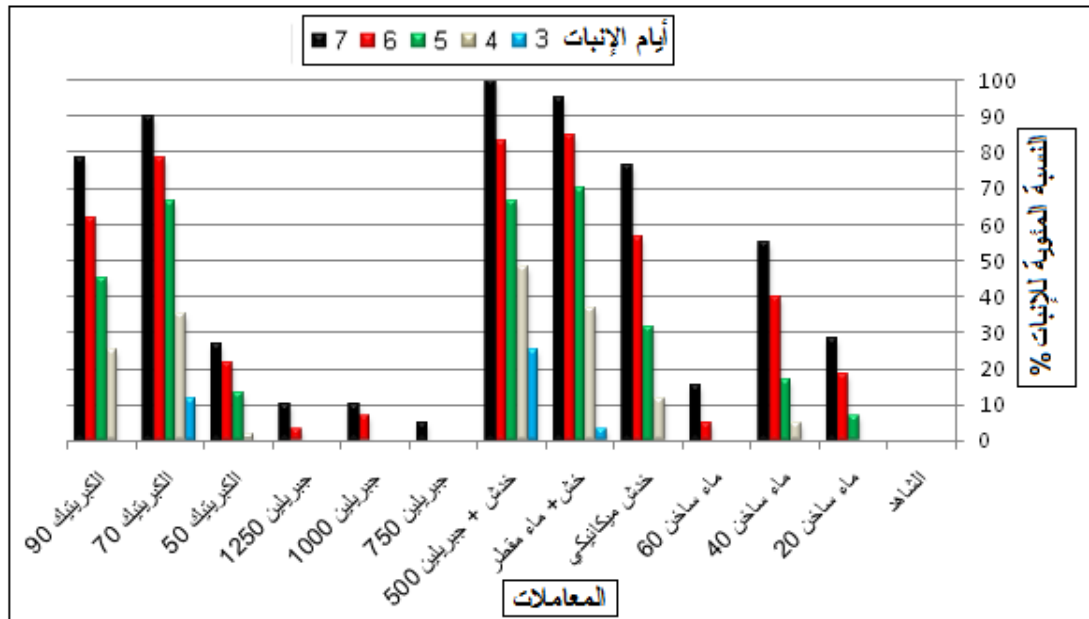
التحليل الإحصائي: تم تصميم تجارب الدراسة وفقاً للتصميم كامل العشوائية (CRD)، وأجري التحليل الإحصائي

في ليونة وثقب أغلفة البذور الصلبة مما يؤدي إلى نفاذية الرطوبة والأكسجين للجنين، وتبع ذلك انخفاض في نسبة ومتوسط زمن الإنبات ومؤشر إنبات وطول الجذير والوزنين الطازج والجاف لمعاملة النقع في حمض الكبريتيك بتركيز 50% حيث سجلت نسبة إنبات بمعدل (28%) وبمتوسط زمن إنبات (3.72 يوم).

الجذير بمتوسط (6.6 سم) والوزن الطازج بمتوسط (0.157 جم) عن بقية تراكيز حمض الكبريتيك الأخرى، في حين أن معاملة النقع في حمض الكبريتيك بتركيز 90% سجلت نسبة إنبات بمعدل (79%) وبمتوسط زمن إنبات (3.39 يوم)، وتقارب ذلك مع ما توصل إليه (Bostan و Kilic، 2014؛ Yilidiz، 1995) بأن معاملة البذور بحمض الكبريتيك تساعد



شكل (1): تأثير المعاملات المختلفة على نسبة إنبات بذور الخروب البري.



شكل (2): تأثير المعاملات المختلفة على نسبة إنبات بذور الخروب المستزرع.

جدول(1): تأثير معاملة الخدش على إنبات بذور الخروب (المتوسط \pm الانحراف المعياري)

معاملة	البذور	نسبة الإنبات	متوسط زمن الإنبات	مؤشر الإنبات	طول الجذير (سم)	الوزن الطازج للبادرة (جم)	الوزن الجاف للبادرة (جم)
ميكانيكي	بري	75.00 \pm 2.0	3.80 \pm 0.2	8.1 \pm 0.9	4.9 \pm 0.1	0.149 \pm 0.00	0.044 \pm 0.00
	مستزرع	76.67 \pm 1.9	3.69 \pm 0.1	8.09 \pm 1.0	4.8 \pm 0.2	0.151 \pm 0.00	0.050 \pm 0.00
	المتوسط	75.83	4.74	8.09	4.8	0.150	0.047
خدش	ميكانيكي مع	90.00 \pm 2.8	3.01 \pm 0.1	7.76 \pm 0.4	6.8 \pm 0.1	0.176 \pm 0.00	0.059 \pm 0.01
	نقع في ماء	95.00 \pm 2.7	2.94 \pm 0.1	8.00 \pm 0.4	6.9 \pm 0.1	0.190 \pm 0.01	0.063 \pm 0.01
	مقطر	92.5	2.97	7.88	6.8	0.183	0.061
ميكانيكي مع الجبريلين 500ppm	بري	96.66 \pm 0.4	3.00 \pm 0.2	8.28 \pm 0.9	7.4 \pm 0.2	0.195 \pm 0.03	0.062 \pm 0.00
	مستزرع	100.00 \pm 0.7	2.76 \pm 0.1	7.90 \pm 0.4	7.6 \pm 0.1	0.200 \pm 0.00	0.066 \pm 0.01
	المتوسط	98.33	2.88	8.09	7.5	0.197	0.064
الشاهد		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
للتداخل 0.05 L.S.D		5.588103	0.196579	0.850925	0.132533	0.003696	0.009839

جدول(2): تأثير معاملة النقع بالكبريتيك على إنبات بذور الخروب (المتوسط \pm الانحراف المعياري)

معاملة	البذور	نسبة الإنبات	متوسط زمن الإنبات	مؤشر الإنبات	طول الجذير (سم)	الوزن الطازج للبادرة (جم)	الوزن الجاف للبادرة (جم)
النقع بالكبريتيك	بري	30.00 \pm 0.9	3.83 \pm 0.1	3.28 \pm 0.4	2.9 \pm 0.1	0.131 \pm 0.01	0.048 \pm 0.01
	%50	26.66 \pm 0.9	3.62 \pm 0.4	2.76 \pm 0.4	2.5 \pm 0.1	0.132 \pm 0.01	0.045 \pm 0.00
	المتوسط	28.33	3.72	3.02	2.7	0.131	0.046
%70	بري	86.66 \pm 2.6	3.05 \pm 0.1	7.57 \pm 0.0	6.4 \pm 0.1	0.157 \pm 0.00	0.044 \pm 0.01
	مستزرع	90.00 \pm 1.7	2.85 \pm 0.2	7.33 \pm 0.7	6.8 \pm 0.2	0.158 \pm 0.00	0.046 \pm 0.00
	المتوسط	88.33	2.95	7.45	6.6	0.157	0.045
%90	بري	80.00 \pm 0.0	3.48 \pm 0.1	7.95 \pm 0.3	5.6 \pm 0.1	0.151 \pm 0.00	0.028 \pm 0.01
	مستزرع	78.33 \pm 1.8	3.31 \pm 0.1	7.42 \pm 0.3	5.2 \pm 0.1	0.144 \pm 0.00	0.031 \pm 0.01
	المتوسط	79.16	3.39	7.68	5.4	0.147	0.029
الشاهد		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
للتداخل 0.05 L.S.D		4.939232	0.207212	0.423739	0.108213	0.006553	0.004998

كما سجلت نتائج معاملة النقع في الجبريلين بتركيز 750، 1000، 1250 ppm من الجدول (4) أعلى معدلات لانخفاض نسبة ومتوسط زمن الإنبات حيث أعطت نسبة إنبات بمعدلات (9%، 11%، 6%) وبتوسط زمن إنبات (4.83، 4.52، 5.00 يوم) على التوالي، تبع ذلك انخفاض في معدلات مؤشر الإنبات، وأطوال الجذير، والوزنين الطازج والجاف، وتقارب ذلك مع ما توصل إليه (Bostan و Kilic، 2014) بأن معاملة البذور بالجبريلين أعطت أقل معدل نسبة إنبات.

كما تشير نتائج معاملة النقع في الماء الساخن من الجدول (3)، أن معاملة النقع في الماء الساخن لمدة 40 دقيقة أعطت أفضل المعدلات مقارنة مع بقية معاملات النقع في الماء الساخن بنسبة إنبات (57%) وبتوسط زمن إنبات (3.78 يوم) وبمؤشر (6.21) وطول جذير (4.3 سم) ووزن طازج (0.139 جم) ووزن جاف (0.041 جم)، حيث سجلت معاملة النقع في الماء الساخن لمدة 20، 60 دقيقة لكل البذور نسبة إنبات بمعدل (26%، 14%) وبتوسط زمن إنبات (4.23، 4.70 يوم) على التوالي.

جدول(3): تأثير معاملة النقع في الماء الساخن على إنبات بذور الخروب (المتوسط \pm الانحراف المعياري).

معاملة	البذور	نسبة الإنبات	متوسط زمن الإنبات	مؤشر الإنبات	طول الجذير (سم)	الوزن الطازج للبادة (جم)	الوزن الجاف للبادة (جم)
20 دقيقة	بري	23.33 \pm 1.3	4.35 \pm 0.3	2.90 \pm 0.5	2.2 \pm 0.2	0.132 \pm 0.00	0.041 \pm 0.01
	مستزرع	28.33 \pm 1.0	4.11 \pm 0.3	3.33 \pm 0.7	2.0 \pm 0.0	0.123 \pm 0.00	0.035 \pm 0.00
	المتوسط	25.83	4.23	3.11	2.1	0.127	0.038
40 دقيقة	بري	60.00 \pm 1.5	3.66 \pm 0.1	6.28 \pm 0.5	4.5 \pm 0.0	0.142 \pm 0.01	0.042 \pm 0.00
	مستزرع	55.00 \pm 1.7	3.90 \pm 0.1	6.14 \pm 0.3	4.1 \pm 0.1	0.137 \pm 0.00	0.040 \pm 0.01
	المتوسط	57.5	3.78	6.21	4.3	0.139	0.041
60 دقيقة	بري	13.34 \pm 0.8	4.75 \pm 0.1	1.80 \pm 1.0	1.7 \pm 0.3	0.118 \pm 0.01	0.043 \pm 0.01
	مستزرع	15.00 \pm 0.9	4.66 \pm 0.0	2.00 \pm 0.0	1.9 \pm 0.1	0.119 \pm 0.00	0.038 \pm 0.00
	المتوسط	14.17	4.70	1.90	1.8	0.118	0.040
الشاهد		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
للتداخل 0.05 L.S.D		4.939232	0.197569	0.607345	0.156192	0.003422	0.005553

جدول(4): تأثير معاملة النقع بالجبريلين على إنبات بذور الخروب (المتوسط \pm الانحراف المعياري).

معاملة	البذور	نسبة الإنبات	متوسط زمن الإنبات	مؤشر الإنبات	طول الجذير (سم)	الوزن الطازج للبادة (جم)	الوزن الجاف للبادة (جم)
750 ppm	بري	6.67 \pm 0.5	5.00 \pm 0.0	0.95 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	0.100 \pm 0.01	0.018 \pm 0.00
	مستزرع	5.00 \pm 0.4	5.00 \pm 0.0	0.71 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.087 \pm 0.01	0.016 \pm 0.00
	المتوسط	5.83	5.00	0.83	1.1	0.093	0.017
1000 ppm	بري	11.66 \pm 0.7	4.71 \pm 0.2	1.57 \pm 0.7	1.5 \pm 0.1	0.103 \pm 0.00	0.021 \pm 0.00
	مستزرع	10.00 \pm 0.6	4.33 \pm 0.2	1.23 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	0.108 \pm 0.00	0.022 \pm 0.01
	المتوسط	10.83	4.52	1.40	1.4	0.105	0.021
1250 ppm	بري	8.33 \pm 0.7	5.00 \pm 0.0	1.19 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	0.114 \pm 0.01	0.037 \pm 0.00
	مستزرع	10.00 \pm 0.5	4.66 \pm 0.3	1.33 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	0.115 \pm 0.01	0.040 \pm 0.00
	المتوسط	9.16	4.83	1.26	1.4	0.114	0.038
الشاهد		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
للتداخل 0.05 L.S.D		2.851781	0.18215	0.38361	0.125732	0.007715	0.003276

Perez-، 2013، El-Bakkosh، 2013، Mansour) أن عملية الخدش ناجحة في التغلب على البذور ذات الأغلفة الصلبة والتسريع من إنباتها، والسبب الثاني أن حمض الجبريلين يعمل على تنشيط وتشجيع إنبات البذور، مما يؤدي إلى زيادة سرعة الإنبات وانقسام واستطالة الخلايا (Sharma وآخرون، 2006)، كما يقوم بتحفيز إنزيمات التحلل المائي الضرورية لتحليل الخلايا المحيطة بالجذير وغيرها من الإنزيمات المسؤولة عن الإنبات، والتي لها دور فعال في تحلل

أشارت النتائج من الجداول (1، 2، 3، 4) بعدم وجود فروق معنوية للصفات المدروسة بين بذور الخروب البري والمستزرع، كما أظهرت تفوق معاملة الخدش مع النقع في الجبريلين ppm500 بأعلى نسبة إنبات، وبأقل متوسط زمن إنبات، وبأعلى متوسطات لطول الجذير، والوزنين الطازج والجاف لبذور الخروب البري و المستزرع، وقد يرجع ذلك إلى سببين: أولهما أن معاملة الخدش لوحدها ساعدت البذرة على نفاذية الرطوبة والأكسجين للجنين، حيث أكدت جميع الدراسات

(2011). وبينت نتائج الدراسة أيضا أن أدنى المتوسطات لجميع الصفات المدروسة كانت لمعاملة النقع في الجبريلين بتراكيزه المختلفة وهذا دليل على أن سكون بذور الخروب ليس سكونا فسيولوجيا بل سكونا راجعا للغلاف الصلب للبذور .



شكل (3): طول الجذير لمعاملة الخدش مع النقع في هرمون الجبريلين 500ppm.

الكربوهيدرات والبروتينات والليبيدات إلى مواد أبسط منها تنتقل إلى الجنين (Ghodrat و Roustia، 2012)، كما يؤدي دورا مهما في إعطاء بادرات أفضل نموًا، حيث يدخل في تركيب الكلوروفيل مما يعزز فرصة أفضل للنمو الخضري، ويعمل على زيادة طول الجذير (Tsakalidi و Barouchas،



شكل (3): نسبة الانبات لمعاملة الخدش مع النقع في هرمون الجبريلين 500ppm.

Ashraf, M. and McNeilly, T. (1990). Improvement of salt tolerance in maize by selection and breeding. *Plant Breeding*. 104: 101-107.

Battle, I. and Tous, J. (1997). Carob tree. *Ceratonia Siliqua* L. Promoting the conservation and Use of Under-Utilised and neglected crops 17. Institute of plant Genetic and crop plant research, *Gatersleben/ International plant Genetic Resources Institute, Rome*, 22pp.

Biner, B. Gubbuk, H. Karham, M. Aksu, M. and Pekmeczi, M. (2007). Sugar Profiles of the pods of cultivated and wild type of carob bean (*Ceratonia Siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4), 1453-1455.

Bostan, S. Z. and kilic, D. (2014). The Effects Of Different Treatments On Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) Seed Germination *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special*, 1(25), 706-708

Das, M. Sharma, M. and Sivan, P. (2017): Seed Germination and Seedling Vigor Index in *Bixa orellana* and *Clitoria ternatea*.

الخلاصة

نستنتج من هذه الدراسة أن معاملة الخدش الميكانيكي مع النقع في الجبريلين 500ppm هي الأكثر كفاءة في تحسين استنبات بذور الخروب وأن النقع في الجبريلين هو الأقل كفاءة. لذا توصي الدراسة بالاهتمام بإجراء دراسات على الأنواع النباتية التي تعاني من سكون البذور في منطقة الجبل الأخضر، كما ينصح باستخدام معاملة الخدش مع النقع في الجبريلين للإسراع من إنبات بذور نبات الخروب لما له من أهمية بيئية وغذائية وطبية.

الشكر والتقدير

نتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى الدكتورة نورة علي محمد، وإلى الدكتور سعد الافي مؤمن، والدكتور أحمد مصطفى، والمهندس الزراعي سمير صالح.

المراجع

Ait Chitt, M. Belmir, M. and Lazrak, A. (2007). Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. *Transfert de technologie en Agriculture*, N^o.153, IAV Rabat, pp.1-4.

- Gunes, E. Gubbuk, H. Silva, T. A. Golzlekci, S. and Ercisli, S. (2013). Effects of Various Treatments on Seed Germination and Growth of Carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 45(4), 1173-1177.
- Hartmann, H.T. Kester, D. L. Davies, F.T. and Geneve, R. L. (2002). Plant Propagation: Principles and Practices. *Pearson Education limited, New Jersey*, 880 P.
- Janick, J. and Paull, R. E. (2008). The encyclopedia of fruits and nuts. *CAB International. Cambridge, MA*: 387-396.
- Karaguzel, O. Baktir, I. Cakmakci, S. Ortacesme, V. Aydinoglu B. and Atik. M. (2002). Effects of scarification methods, temperature and sowing date on some germination characteristics of *Lupinus varius* L. 2nd National Congress on Ornamental Plants, October 22-24, Citrus and Greenhouse Research Institute, *Antalya, Turkey*, 40-47.
- Lamlom, S. H. and Abdalrasol, E. M. (2016). Effects of various pre-sowing treatments on seed germination of carob (*Ceratonia siliqua* L.) from Al-Jabal AlAkhdar area (Balagrae, Al-Baida, Libya). *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 9, (9). pp.16-24.
- Manso, T. Nunes, C. Raposo, S. and Lima-Costa, M. E. (2010). Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P agglomerans* PBC-1, *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 37, 1145-1155.
- Mansour, w. (2013). The Effect of Some Mechanical and Chemical Treatments on Carob Seeds (*Ceratonia Siliqua* L.) Germination. *Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series*. 35 (6), 89-100.
- Moradi Dezfuli, P. Sharif-zadeh, F. and Janmohammadi, M. (2008). Influence of *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5 (5), 15-19.
- Ekinci K., Yilmaz D., Ertekin C. (2010) Effects of moisture content and compression positions on mechanical properties of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.). *African Journal of Agricultural Research*,. 5, 1015–1021.
- El Deen, E. M. Z. El -Sayed, O. M. El -Sayed A. I. and Hegazi, G. A. (2014). Studies on carob (*Ceratonia siliqua* L.) propagation. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7(5), 31-40.
- El-Bakkosh, A. M. (2013). Breaking seed dormancy of some ornamental trees by different chemical and physical treatments. *African Journal of Biology*, 9 (1),221-228.
- Ganatsas, P. Tsakalimi, M. and Thanos, C. (2008). Seed and cone diversity and seed germination of *Pinus pinea* in Strofylia Site of the Natura 2000 Network. *Biodiversity and Conservation* 17,2427–2439.
- Geraldo, D. Correia, P. J. Filipe, J. and Nunes, L. (2010). Carob-tree as CO2 sink in the carbon market. In *Advances in Climate Changes, Global Warming, Biological Problems and Natural Hazards* WSEAS Press: Faro, Portugal, 119–123.
- Ghodrat, V. and Roustia, M. J. (2012). Effect of priming with gibberellic acid (GA3) on germination and growth of corn (*Zea mays* L.) under saline conditions. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(13), 882-885.
- Gubbuk, H. Gunes, E. Ayala-Silva, T. and Ercisli, S. (2011). Rapid vegetative propagation method for Carob. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 251-254.

- Romano, H. Barros, S. and Martins-Loucao, M. (2002). Micropropagation of Mediterranean tree *Ceratonia siliqua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 35-41.
- Sharma, R. K. Sharma, S. and Sharma, S. S. (2006). Seed germination behavior of some medicinal plants of Lahaul and Spiti cold desert (Himachal Pradesh): implications for conservation and cultivation. *Current Science* 90(8), 1113-1118.
- Tsakaldimi, M. and Ganatsas, P. (2001). Treatments improving seeds germination of two Mediterranean sclerophyll species *Ceratonia siliqua* and *Pistacia lentiscus*. In: Proceedings of the Third Balkan Scientific Conference on Study, Conservation and Utilization of Forest Resources, *Sofia Bulgaria, II*, 119-127.
- Tsakalidi, A. L. and Barouchas, P. E. (2011). Salinity, chitin and GA3 effects on seed germination of chervil (*Anthriscus cerefolium*). *Australian Journal of Crop Science*, 5(8), 973-978.
- Yildiz, A. (1995). Propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) by different methods. (PhD Thesis). *Çukurova University, Institute of Science, Department of Horticulture*, 197 p.
- priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Biological Science*, 3(3), 22-25.
- Naikawadi, V. B. Ahire, M. L. and Nikam, T. D. (2012). Seeds characterization, Viability and Promotion of Seed Germination in Nervine Tonic Plant *Evolvulus alsinoids* Linn., *The Asia and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology*. 6 (1), 5-11.
- Perez-Garcia, F. (2009). Germination characteristics and intrapopulation variation in carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds Spanish, *Journal of Agricultural Research*, 7, 398-406.
- Piotto, B. Bartolini, G. Bussotti, F. Calderón García, A. A. Chessa, I. Ciccarese, C. Ciccarese, L. Crosti, R. Cullum, F. J. Di Noi, A. García-Fayos, P. Lambardi, M. Lisci, M. Lucci, S. Melini, S. Muñoz Reinoso, J. C. Murrancia, S. Nieddu, G. Pacini, E. Pagni, G. Patumi, M. García, F. P. Piccini, C. Rossetto, M. Tranne, G. and Tylkowski, T. (2003). Fact Sheets on The Propagation of Mediterranean Trees and Shrubs From Seed. Seed propagation of mediterranean trees and shrubs. *Rome, APAT – Agency for the Protection of the Environment and for Technical Services*, 11-51pp.
- Prajapati, V. D. Jani G. K. Moradiya N. G. Randeria N. P. Nagar B. J. Naikwadi N. N. and Variya B. C. (2013). Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 83-92.
- Reynolds, M. P. Singh, R. P. Ibrahim, A. Ageeb, O. A. A. Larquesaavedra A. and Quik J. S. (1998). Evaluating physiological traits to complement empirical selection of wheat in warm environments. *Euphytica*, 100(1-3), 85-94.

Improvement of Seeds Germination of Carob Trees (*Ceratonia Siliqua* L.) by Using Different Treating Methods

Sami Mohammed Salih and Ahmed Amrajaa Abdulrazziq*

Department of Biology, Faculty of Education, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda, Libya

Received: 28 August 2018 / Accepted: 16 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.246>

Abstract: This study was conducted at the Faculty of Science / Omar Al-Mukhtar University to improve the tree seeds germination of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) wild and cultivated by using a number of different treatments, included the treatment of soaking in hot water for periods (20, 40 and 60) minute, scarified mechanical, scarified mechanical with soaking in distilled water, and scarified mechanical soaking in gibberellin 500ppm, without scarifying and with soaking in gibberellin concentrations 750, 1000, and 1250ppm, and with soaking in concentrations 50, 70, and 90% Of sulphuric acid. The treatment of scarifying with soaking in gibberellin 500ppm was moer efficiency than all treatments with germination percentage (98%), germination time (2.88 day), and the best averages of germination index, as root length, fresh weight, and dry weight of the seedling. While the lowest germination percentage and longest germination time was was recorded treatment of soaking in different concentrations of gibberellin. The results showed no significant differences between wild and planted *Ceratonia siliqua* L. seeds for studied traits. The study concluded that the treatment of *Ceratonia siliqua* L. seeds by scarifying with soaking in gibberellin 500ppm was the most efficient in improving germination.

Key words: *Ceratonia siliqua* L., Seeds germination, Different treatments.

*Corresponding Author: Ahmed amrajaa abdulrazziq, ahmed.amrajaa@omu.edu.ly, Department of Biology, Faculty of Education, Omar Al-Mukhtar University, Al-Bayda, Libya



تأثير التلقيح ببكتيريا العقد الجذرية على نمو الأكاسيا ساليجنا (*Acacia saligna*) وتكوين العقد الجذرية تحت تأثير الإجهاد الملحي

عمران على محمد

قسم علوم البيئة، كلية الموارد الطبيعية وعلوم البيئة، جامعة عمر المختار، البيضاء-ليبيا

تاريخ الاستلام: 05 سبتمبر 2018 / تاريخ القبول: 25 أكتوبر 2018

<https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.247>:Doi

المستخلص: أجريت التجربة في الصوبة لدراسة تأثير التلقيح بسلاسل مختلفة من بكتيريا العقد الجذرية المعزولة من جذور شتلات الأكاسيا ساليجنا (*Acacia saligna*) على تكوين العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين ونمو نباتات الأكاسيا ساليجنا تحت تأثير مستويات مختلفة من الملوحة 4 dsm^{-1} ، 5 ، 8 ، 10 على التوالي والتلقيح بالسلاسل NA_1 ، NA_2 ، NA_3 ، NA_4 ومعاملة NA_0 (بدون تلقيح)، وثلاث مكررات لكل معاملة نفذت التجربة في أصص باستخدام تربة جيرية من منطقة الوسيطة وتم دراسة تأثير المستويات المختلفة للملوحة على نمو نباتات الأكاسيا ساليجنا وتكوين العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين، حيث أظهرت النتائج أن التلقيح بالسلاسل المختلفة من بكتيريا العقد الجذرية قلل معنويًا من الآثار الضارة الناجمة عن الإجهاد الملحي حيث تفوقت النباتات الملقحة بسلاسل الرايزوبيم (*Rhizobium*) المختلفة على النباتات غير الملقحة بقدرتها على تحمل التركيزات المختلفة من الملوحة. كما أشارت النتائج إلى تفوق السلالة NA_4 على بقية السلاسل NA_1 ، NA_2 ، NA_3 في كل الصفات المدروسة وأظهرت النتائج أن مستويات الملوحة العالية كان لها فروق معنوية مقارنة بأقل مستوى ملوحة 4 dsm^{-1} حيث كانت كل الصفات المدروسة (عدد العقد الجذرية المتكونة لكل نبات، الوزن الجاف للعقد الجذرية المتكونة، الوزن الجاف للمجموع الخضري، تركيز النيتروجين في التربة) أفضل عند هذا المستوى من الملوحة مقارنة ببقية المستويات وكان تأثير التداخل بين التلقيح بسلاسل الرايزوبيم ومستوى الملوحة 4 dsm^{-1} أفضل مقارنة بالمستويات الأخرى للملوحة في كل الصفات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا العقد الجذرية، الأكاسيا ساليجنا، مستويات الملوحة.

المقدمة

نباتات الأكاسيا المستخدمة في الدراسة واسعة الانتشار وتتوزع طبيعيًا على نطاق واسع في كل من أستراليا وآسيا وأفريقيا والأمريكيتين، وتزرع نباتات الأكاسيا من أجل استعمالها لمقاومة الرياح وتثبيت التربة ومنع انجرافها، كذلك تستعمل كمحصول علفي، إنتاج مادة التانين. تشمل حوالي 1350 نوعاً من الأشجار والشجيرات ومنها نبات الأكاسيا ساليجنا الذي تم استخدامه في البحث ويسمى أيضاً أكاسيا سانيوفيللا (*Acacia cyanophylla*) وهي جنس من الأكاسيا من ضمن العائلة البقولية أدخلت إلى ليبيا عام 1916 م واستخدمت كمصدات للرياح وتثبيت الكثبان الرملية

إن الاتجاه إلى استخدام التسميد الحيوي بواسطة بكتيريا العقد الجذرية بدل التسميد الكيميائي له التأثير الإيجابي على البيئة نتيجة تقليل استخدام الأسمدة الكيميائية ويحسن من نمو النبات وزيادة الإنتاج ويساعد النبات على مقاومة الظروف البيئية القاسية خاصة في المناطق الجافة وشبه الجافة مثل زيادة الملوحة ونقص المياه حيث إن الملوحة تسبب ضغطاً أسموزياً عالياً خارج منطقة الامتصاص مما يؤثر على امتصاص الماء والعناصر الغذائية اللازمة لنمو النبات. (Mudgal وآخرون، 2010).

موضحة بالجدول رقم (1) . (Page وآخرون ، 1982 و Jackson ، 1967)، وتم الحصول على مستويات الملوحة المطلوبة 4، 5، 8، 10 $ds\ m^{-1}$ بواسطة خليط من ملحي (NaCl + KCl) بنسبة 1:1.

وزعت التربة في أصص سعة 5 كجم تم تعقيمها بقطن طبي مشبع بالكحول . زرعت 5 بذور من نبات الأوكاسيا ساليجنا بعد تعقيمها في كل أصيص ثم تم خف النباتات النامية إلى نباتين في كل أصيص بعد ستة أيام من الزراعة لكل المعاملات NA_1 ، NA_2 ، NA_3 ، NA_4 إلى جانب المعاملة الشاهد (غير الملقحة) والتي يرمز لها بالرمز NA_0 وكل المعاملات كررت 3 مرات ، أضيف اللقاح تحت التربة السطحية في الاصيص على عمق 5 سم (عمق الزراعة للبذور) بعد عملية الخف. وري كل المعاملات بالتركيزات المختلفة بواسطة خليط من NaCl +KCl بنسبة 1 : 1 عند أول رية ما عدا معاملة الكنترول. تم متابعة النمو للنباتات حتى عمر 90 يوماً ، وتم قياس عدد العقد الجذرية المتكونة لكل نبات ، الوزن الجاف للعقد الجذرية المتكونة ، الوزن الجاف للمجموع الخضري ، تركيز النيتروجين في التربة بعد 90 يوماً من نمو النبات .

جدول: (I). بعض الصفات الكيميائية و الخصائص الفيزيائية المبدئية لتربة الدراسة قبل الزراعة

النتائج	خصائص التربة
2.9	التوصيل الكهربائي (EC) $ds\ m^{-1}$ (2 : 1)
8.1	تفاعل التربة (pH) (2.5 : 1)
30.1	كربونات الكالسيوم (%)
0.10	النيتروجين الكلي (%)
16.2	الفوسفور الميسر (ppm)
----	التحليل الميكانيكي للتربة
40.4	الطين(%)
24.0	السلت(%)
35.6	الرمل(%)
Clay loam	قوام التربة

ومصدر لحطب الوقود وفي تغذية الحيوانات. (Aly و Hassan ، 1993).

تهدف الدراسة لتقييم قدرة سلالات مختلفة من بكتيريا العقد الجذرية على تكوين عقد جذرية على نبات الأوكاسيا وتثبيت النيتروجين تحت مستويات مختلفة من الملوحة وتحديد أنسب سلالة من بكتيريا العقد الجذرية القادرة على تحمل الملوحة وتكوين عقد جذرية .

المواد وطرق البحث

بذور نبات الأوكاسيا ساليجنا *Acacia saligna* أحضرت من مركز تنمية الصحراء التابع للجامعة الأمريكية ، القاهرة ، مصر .

كما عزل وشخصت بكتيريا العقد الجذرية *Rhizobium* من شتلات نباتات الأوكاسيا ساليجنا من مشاتل مختلفة من منطقة الجبل الأخضر عمرها ما بين 2-4 أشهر، تم الحصول على عدد 4 عزلات NA_1 ، NA_2 ، NA_3 ، NA_4 (Somasegaran و Hoben ، 1985)، اللقاح بكتيريا المثبتة للنيتروجين لجميع العزلات المذكورة حضر على بيئة (Yest extract Mannitl agar) وتم إجراء التصيبغ الجرامي لها و إجراء الفحص بواسطة طريقة Bromothymol blue + YMA و YMA + congo red (Vancent ، 1970 و GeHong وآخرون ، 2003).

كما عقت البيئة الغذائية (YMB) Yest extract Mannital Broth بجهاز الاوتوكلاف Autoclave على درجة حرارة $121^{\circ}C$ وضغط جوي 15 بار لمدة 20 دقيقة. وحضنت للبيئة الغذائية (YMB) لكل العزلات على درجة حرارة $28^{\circ}C$ لمدة ثلاثة أيام وتم أخذ 50 مل من اللقاح . وقد جهزت التربة التي سيتم فيها الزراعة من عمق 0 - 15 سم جلبت من منطقة الوسيطة ، جففت هوائياً ومررت من منخل قطر فتحاته 2 ملم مزجت التربة لكي تكون أكثر تجانساً وأجريت عليها بعض التحاليل الكيميائية والفيزيائية قبل الزراعة

النتائج والمناقشة

/ نبات .

جدول (2) تأثير التلقيح بسلاطات بكتيريا العقد الجذرية ومستويات الملوحة على عدد العقد الجذرية في نبات الأكاسيا ساليجنا (*Acacia saligna*) عمر 90 يوماً

السلاطات المستخدمة	مستويات الملوحة ($ds\ m^{-1}$)			
	4	5	8	10
NA ₀	15	10	4	2
NA ₁	21	20	8	4
NA ₂	25	23	10	5
NA ₃	29	25	15	7
NA ₄	31	27	18	10
المتوسط	24.2	21	11	5.6

LSD_{0.05} للسلاطات = 0.95 الملوحة = 1.02 التداخل = 1.97

2 - التأثير على الوزن الجاف للعقدة البكتيرية: من خلال النتائج في الجدول (3) يتضح أن هناك فروقاً معنوية عند التلقيح بالسلاطات المختلفة مقارنة بالمعاملة الشاهد (بدون تلقيح NA₀) حيث زاد الوزن الجاف للعقد الجذرية بالنسب التالية 68.13 ، 58.77 ، 88.86 ، 108.35 % مقارنة بالمعاملة غير الملقحة ذلك لأن التلقيح بالسلاطات المختلفة من بكتيريا العقد الجذرية يؤدي إلى زيادة اعدادها في التربة وبالتالي زيادة فرصة الاصابة وتكوين عقد أكثر على النباتات الملقحة مقارنة بالنباتات غير الملقحة.

أما تأثير المستويات المختلفة للملوحة على الوزن الجاف للعقد البكتيرية المتكونة على كل نبات فنلاحظ نقص الوزن الجاف مع زيادة مستويات الملوحة حيث بلغت نسبة الانخفاض 5.73 ، 16.41 ، 37.06 % على التوالي مقارنة بالتركيز $4\ ds\ m^{-1}$ الذي أعطي أعلى متوسط 307 مليجرام / نبات . أما التداخل ما بين سلاطات الرايزوبيوم ومستويات الملوحة فكان تأثيره معنوياً على الوزن الجاف للعقد حيث كان أعلى متوسط وقيمه 382 مليجرام / نبات عند التلقيح بالسلالة NA₄ ومستوى ملوحة $4\ ds\ m^{-1}$ ، وأقل متوسط عند المعاملة (بدون تلقيح NA₀) ومستوى ملوحة $10\ ds\ m^{-1}$ الذي كان

التأثير على عدد العقد الجذرية المتكونة على كل نبات : تشير النتائج المبينة في الجدول (2) إلى وجود فروق معنوية عند التلقيح بالسلاطات المختلفة من بكتيريا العقد الجذرية NA₁ ، NA₂ ، NA₃ ، NA₄ في عدد العقد الجذرية المتكونة لكل نبات، حيث تفوقت السلالة NA₄ على كل المعاملات الأخرى بما فيها معاملة الكنترول (بدون تلقيح) حيث أعطت أكثر عدداً من العقد عند مستوى ملوحة $4\ ds^{-1}$ m بمتوسط 21.50 عقدة / نبات ، وكان أقل متوسط لعدد العقد البكتيرية المتكونة عند معاملة المقارنة (غير الملقحة) بمتوسط 7.75 عقدة / نبات، وهذا يتفق مع ما توصل إليه (Mehasen وآخرون ، 2002) ويرجع السبب في تفوق المعاملات بالسلاطات المختلفة من بكتيريا العقد الجذرية في عدد العقد المتكونة على كل نبات إلى زيادة أعداد بكتيريا العقد الجذرية الفعالة نتيجة عملية التلقيح وهذا يتفق مع ما توصل إليه (Koreish وآخرون ، 1997) على نبات الأكاسيا و (Hussain وآخرون ، 2014) على نبات الماش . وقد أوضحت النتائج أن مستوى الملوحة قد أثر معنوياً على عدد العقد الجذرية المتكونة حيث انخفض عدد العقد الجذرية المتكونة لكل نبات مع زيادة تركيزات الملوحة بنسبة 13.22 ، 54.54 ، 76.86 % مقارنة بمستوى ملوحة $4\ ds\ m^{-1}$ والذي أعطى أعلى متوسط 24.2 عقدة لكل نبات ، فزيادة تركيز الملوحة أدى إلى تثبيط تأثير بكتيريا العقد الجذرية مما أدى إلى نقص في عدد العقد الجذرية المتكونة على جذور النبات العائل مع زيادة تركيز الملوحة، وهذا ما أشار إليه (Craig وآخرون ، 1991).

ونلاحظ من النتائج (جدول 2) أن التداخل بين تأثير التلقيح بسلاطات الرايزوبيوم ومستويات الملوحة على متوسط عدد العقد البكتيرية المتكونة على كل نبات عند السلالة NA₄ ومستوى الملوحة $4\ ds\ m^{-1}$ كان 31.00 عقدة / نبات وهو أعلى معدل مقارنة بالمتوسط عند معاملة الشاهد (بدون تلقيح NA₀) ومستوى ملوحة $10\ ds\ m^{-1}$ الذي كان 2 عقدة

63 مليجرام / نبات .

نلاحظ من النتائج (جدول 4) أن التداخل بين تأثير التلقيح بسلاطات الرايزوبيوم ومستويات الملوحة على متوسط تركيز النيتروجين بالتربة لا توجد به فروق معنوية للتداخل ، إذ كان أعلى متوسط في تركيز النيتروجين في التربة عند المعاملة بالسلاطة NA₄ ومستوى ملوحة 1 ds m^{-1} كان 132.21 مليجرام / كجم تربة بينما كان أقل متوسط لتركيز النيتروجين لمعاملة التداخل بين معاملة الكنترول (بدون تلقيح) ومستوى ملوحة 10 ds m^{-1} والذي بلغ 33.65 مليجرام / كجم تربة وهذا يدل على أن مستويات الملوحة العالية أدت إلى تثبيط نشاط بكتيريا العقد الجذرية وبالتالي قلّ تركيز النيتروجين في التربة.

جدول (4) تأثير التلقيح بسلاطات بكتيريا العقد الجذرية ومستويات الملوحة في تركيز النيتروجين (مليجرام / كجم تربة) .

السلاطات المستخدمة	مستويات الملوحة (ds m^{-1})			
	10	8	5	4
NA ₀	7.59	6.24	10.11	12.5
NA ₁	9.89	7.41	13.52	15.42
NA ₂	12.08	10.22	14.65	18.22
NA ₃	14.79	13.33	17.32	22.10
NA ₄	17.41	15.11	20.11	25.33
المتوسط	5.09	10.46	15.14	18.71

LSD_{0.05} للسلاطات = 6.35 للملوحة = 6.30 التداخل = 12.70

4 - تأثير التلقيح بسلاطات بكتيريا العقد الجذرية ومستويات الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الخضري (جرام / نبات) :- بعد 90 يوماً من الزراعة أعطت المعاملات انخفاضاً معنوياً في متوسط الأوزان الجافة للمجموع الخضري مع زيادة تركيز الملوحة وكانت نسبة الانخفاض كالاتي 19.08 ، 44.09 ، 72.79 % مقارنة بالمعاملة الأولى 4 ds m^{-1} جدول (5) . بينت العديد من الدراسات حصول انخفاض معنوي في الوزن الخضري الجاف بزيادة الإجهاد الملحي نتيجة لتراكم أيونات الصوديوم في النبات والذي يؤثر بدوره على الوظائف الحيوية للنبات خاصة عملية التمثيل الضوئي فبانخفاضها تنخفض كمية المادة العضوية في النبات

جدول : (3) تأثير التلقيح بسلاطات بكتيريا العقد الجذرية ومستويات الملوحة في الوزن الجاف للعقد الجذرية (مليجرام / نبات) من نباتات الأوكاسيا ساليجنا (*Acacia saligna*) عمر 90 يوماً

السلاطات المستخدمة	مستويات الملوحة (ds m^{-1})			
	10	8	5	4
NA ₀	158.5	153	205	213
NA ₁	253.25	243	271	298
NA ₂	266.75	266	285	301
NA ₃	299.00	301	321	341
NA ₄	330.25	320	365	382
المتوسط	193.2	256.6	289.4	307

LSD_{0.05} للسلاطات = 9.45 للملوحة = 9.50 التداخل = 18.85

3-التأثير للسلاطات المستخدمة ومستويات الملوحة على تركيز النيتروجين في التربة (مليجرام / كجم تربة) : تبين النتائج في الجدول (4) أن معاملات التلقيح بالسلاطات المختلفة من الرايزوبيوم أعطت أعلى متوسط لتركيز النيتروجين في التربة حيث بلغ 100.17 ، 118.73 ، 120.83 ، 126.54 مليجرام / كجم تربة على التوالي عند التلقيح بالسلاطات NA₁ ، NA₂ ، NA₃ ، NA₄ مقارنة بالمعاملة بدون تلقيح NA₀ التي أعطت أقل متوسط لتركيز النيتروجين في التربة 57.65 مليجرام / كجم تربة ، وتفسر زيادة تركيز النيتروجين في التربة إلى انفصال عدد من العقد الجذرية المتكونة على جذور النبات العائل أثناء مراحل النمو وتحللها في التربة بالإضافة لإفرازات الجذور لبعض المركبات التي تحتوي على النيتروجين وهذا ما أثبتته كل من (Dreyfus وآخرون ، 1981 و Barnett وآخرون 1985) . مع زيادة تركيز الملوحة أدى إلى خفض تركيز النيتروجين في التربة حيث نلاحظ أن نسبة الانخفاض كانت كالاتي 10.23 ، 14.09 ، 22.93 % مقارنة بالمعاملة الأولى 1 ds m^{-1} ، في حين كان أقل متوسط لتركيز النيتروجين في التربة عند تركيز ملوحة 10 ds m^{-1} هو 91.58 مليجرام / كجم تربة وهذا يتفق مع دراسة (Hafeez وآخرون ، 1988) .

Barnet ،Y. M. ،Catt. P. C. and Hearne ،D. H . (1985) Biological nitrogen fixation and root-nodule bacteria (*Rhizobium* sp . and *Bradyrhizobium* sp.) in two sand dune areas planted with *Acacia* spp. *Aust. J. Bot.* 22،595.

Dreyfus ،B. L. and Dommregues ،Y.R. (1981 . (Nodulation of *Acacia* species by fast and slow-grow in gtropical strains of *Rhizobium* Appl. And Environ. Microbiol.41 ،97.

Ge Hong w. ،Zhi Y. T. ،Ming E. ،En T.W. ، SuZ. and Wen X. (2003). Characterization of rhiobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loss Plateau of China and description of *Rhizobium*loessensesp .nov International ،J. of systematic and Evolutionary Microbiology: 53 ،1575–1583.

Graig ،G. F. ،Atkins،C. A. and Bell ،D. T. (1991).Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their ineffectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant and Soil* . ،133 ، 253.

Hafez ،F. Y. ،Aslam ،Z. and Malik ،K. A (1988) Effect of a salinity and inoculation growth ،nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vignaradiate* ،(1) .Wilczek *Plant and Soil* ،106 : 3 – 8.

Ha ،M. J. ،Victor ،D. T. ،Alphonse ،E. N. Kitio ،P. L. N. ،Libert ،B. T. ،Tekam ، L.M.،Emmanual ،Y.(2017) Effects of Salt Stress on Plant Growth ،Nutrient Partitioning ،Chlorophyll Content ،Leaf Relative Water Content ،Accumulation of Osmolytes and Antioxidant Compounds in Papper (*Capsicum annum* L.)Cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobi.* ،45(2):481 – 490.

وبالتالي يحدث نقص في الوزن الجاف للمجموع الخضري وهذا

ما أكده (Yingzhou وآخرون 2018 و Hand. M. J وآخرون ، 2017) عند معاملة ثلاثة أصناف من *Eucalyptus* بتركيز مختلفة من الملوحة .اختلفت معاملات السلالات المختلفة معنويا فيما بينها وتوقفت جميعها على معاملة (عدم التلقيح NA_0) مقدارها 1.52 جرام / نبات بينما أعطت المعاملة بالسلالة NA_4 أعلى قيمة (25.33 جرام / نبات). جدول (5) إن التداخل بين تأثير التلقيح بسلالات الرايزوبيوم ومستويات الملوحة على متوسط الوزن الجاف للمجموع الخضري لا توجد به فروق معنوية ، وكان أعلى متوسط للوزن الجاف للمجموع الخضري عند المعاملة بالسلالة NA_4 ومستوى ملوحة $4 ds m^{-1}$ قيمته 18.71 جرام / نبات بينما كان أقل متوسط للوزن الجاف للمجموع الخضري لمعاملة التداخل بين المعاملة غير الملقحة ومستوى ملوحة $10 ds m^{-1}$ والذي بلغ 5.09 جرام / نبات

جدول : (5) تأثير التلقيح بسلالات بكتيريا العقد الجذرية ومستويات الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الخضري (جرام / نبات) تحت مستويات مختلفة من الملوحة

السلالات المستخدمة	مستويات الملوحة ($ds m^{-1}$)				
	10	8	5	4	
NA_0	57.65	33.65	48.42	50.23	98.40
NA_1	100.17	77.21	98.22	110.24	115.00
NA_2	118.73	112.20	119.40	120.11	123.20
NA_3	120.83	114.71	120.10	123.20	125.31
NA_4	126.54	120.22	124.21	129.50	132.21
المتوسط		91.58	102.07	106.66	118.82

$LSD_{0.05}$ للسلالات = 3.40 للملوحة = 3.30 التداخل = 6.65

المراجع

Aly ،A. E. and Hassan ،M. TH.(1993).Atlas of Legume plants of the North-West Coast of Egypt . Rose El-Youssef New Presses ،Cairo ،Egypt ،pp.27 – 30.

- Vincent ،J. M. (1970) .A Manual for the Practical study of Root- Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15 ، Blackwell Scientific Publications ، Oxford and Edinburgh،UK.
- Ying Z. ،N .Tang. ،L. Hung. ،Y. zhao. ،X Tang. ،and K . wang. ،(2018) . Effects of Salt stress on Plant Growth ، Antioxidant Capacity ،Glandular Trichome Density،and Volatile Exudates of Schizonepetatenuifoli Briq.Int. J. Mol. Sci. ،19 ،252.
- Hussain ،A. A. Amjed ،K. Tasneem ،A. shfaq،A. Zubair and A. Muhammad . (2014).Growth nodulation and yield components of mung bean (Vignaradiate) as affected by phosphorus in combination with Rhizobium inoculation .Afri. J. Agri. Res.2323 – 2319 : (30) . 9
- Jackson ،M. L(1967). Soil Chemical Analysis .Prentice –Hall،Inc. EnglewoodCliffs،U.S.A.
- Koreish ،E. A. ،M. H. El-Lakany ،M. H. El-Halfawi and A. S. Abdel-Ghaffar.(1997) Nodulation and Dinitrogen Fixation by Acacia saligna Seedlings as Influenced by Soil Type and Salinity. Egypt. J. Soil Sci : (4)،37 .450 -437.
- Mehasen ،S. A. S ،R. A. Zaghloul and M. A.El-Ghozoli.(2002) . Effectiveness of dual inoculation with Bradyrhizobium and endomycorrhizae in presence of different phosphate fertilizer sources on growth and yield of soybean . Annals. Agric. Sci. ،Ain Shams Univ. ،Cairo ،47 (2) 477-500.
- Mudgal ،V. ،N. Madaan ،and A. Mudgal(2010). Biochemical Mechanisms of salt tolerance in plants: A Review. Int. J. Bot.143 – 6:136 .
- Page ،A. L. ،R. H. Miller ،D. R. Keeney ،D. E.Baker ،R. Ellis and D. Rhoades.(1982) Methods of soil analysis .eds. Madison،WI(USA)،ASA SSSA ،xxiv ،1159 p.Edition 2ed..ASA Agronomy Monographs.No. 9.
- Somasegaran ،P. and H. J. Hoben.(1985)Methods in Legume Rhizobium Technology.NifTAL ،Paia ،Maui ،HI ،USA.

Effect of Root-Nodule Bacteria on Growth of *Acacia Saligna* Under Salt Stress

Omran Ali Mohamed

Department of Environment science, faculty of natural resource and Environment science,
Omar Al- Mukhtar University, Al-Bayda, Libya

Received: 05September 2018 Accepted:25 October 2018

Doi: <https://doi.org/10.54172/mjsc.v33i3.247>

Abstract: The Pot experiment was conducted at Lath-house to study the effect of Root-nodules bacteria on growth of *Acacia saligna* under different levels of salt stress 4,5,8,10 dsm^{-1} . With four root-nodule bacteria strains NA_1 , NA_2 , NA_3 , NA_4 and without inoculation NA_0 . The results showed that the inoculation of different strains of the root bacterium significantly reduced the harmful effects of saline. The inoculated plants in their ability to tolerate different concentrations of salinity. Results indicated that the strain NA_4 was superior to the rest of the strains in all studied traits, NA_1 , NA_2 , NA_3 . The high levels had significant differences compared to the lowest level of salinity 4 dsm^{-1} where this level exceeds the other concentrations in all studied traits, (number of root nodes formed for each plant, the dry weight of root-nodule, dry weight of vegetative total, concentration of nitrogen in soil). The interference transactions between the *Rhizobium* strains and the levels of salinity 4 dsm^{-1} was more significant than that of the other levels of salinity in all studied traits.

Keywords: *Acacia saligna*; *Rhizobium* strains; salinity levels.