الفعاليةالمضادة المايكروبية للمستخلص الكحولي والمائي لثمار نبات الزرشك *Berberis vulagaris* على نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة

Antimicrobial Activity of Ethanolic and Watery Extracts to Fruit of *Berberis vulagaris* on growth of some species of pathogenic bacteria

رنا علي حسن
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Rana Ali Hassan
College of Science for Women/ University of Baghdad

الملخص

اجريت الدراسة لمعرفة فعالية المستخلص المائي والكحولي لثمار نبات الزرشك *Berberis vulagaris* ضد نوعين من البكتريا الموجبة لصبغة غرام *Staphylococcus aureus* و*Bacillus cereus* ونوعين من البكتريا السالبة لصبغة غرام *E. coli* و *Pseudomonas aureus* بطريقة الانتشار بالحفر. أذ اظهرت النتائج ان المستخلصين المائي والكحولي لثمار نبات الزرشك ذو فعالية عالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام وكان التأثير يزداد مع زيادة التركيز بينما اظهر المستخلص تأثيرا على البكتريا السالبة لصبغة غرام في التراكيز العالية فقط وانعدم التأثير في التراكيز الواطئة كما اظهر المستخلص الكحولي فعالية اكبر من المستخلص المائي تجاه البكتريا الممرضة. تم قياس قيمة MIC وMBC وجاءت النتائج مطابقة لما ذكرسابقا من نتائج تأثير المستخلصين على نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام. لغرض دراسة تأثير المستخلص على نمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام تم اجراء تحليل HPLC لثمار نبات الزرشك وهو تحليل كمي ونوعي لقياس تركيز المركبات القلوية Tetrandrine و Berbamine وChondocurine اذ كان اعلى تركيز لمركب Tetrandrine بـ 38.42 وكانت نسبة المركبات القلوية عالية في ثمار نبات الزرشك.

الكلمات المفتاحية: نبات الزرشك، المستخلص الكحولي، البكتريا

Abstract

This study was done to test the activity of watery and alcohol extract of the fruit of *Berberis vulagaris* against of two species of gram positive bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* also ,two species of negative gram bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by agar well diffusion method, the results showed that the alcohol extract of the *Berberis vulagaris* with high activity against gram positive and the effect was increase with the increasing of the concentration. While the watery and alcohol extract has a high effect on gram negative bacteria which effect only with high concentration, while there is no effect in low concentration and the results showed that the alcohol extract of the *Berberis vulagaris* with high activity against gram positive compare with watery extract. MIC and MBC were measured and the results were identical for the previous results, for the effect of both extracts on the growth of gram negative and positive bacteria HPLC analysis was don for *Berberis vulagaris* which is quantitative and qualitative assay to measure the concentration of some alkaloid compound Tetrandrine, Chondocurine, bamine, which be with high ratio on Tetrandrine compound 38.42, the rate of alkaloid compound in fruit of *Berberis vulagaris* was higher .

Key words: *Berberis vulagaris*, alcohol extract, bacteria

المقدمة

ازدادت في الاونة الاخيرة ظاهرة الاهتمام بالنباتات والاعشاب الطبية بسبب أستخدامها كمصادر رئيسية لانتاج العقاقير الطبية لمعالجة الكثير من الاصابات الميكروبية [1]. وتزايدت بسب تزايد مشكلة المقاومة التي تبديها الاحياء المجهرية تجاه طيف واسع من المضادات الحيوية [2]. لذا استخدمت المستخلصات النباتية والاعشاب كبديل للمضادات الحيوية لمقاومة الاحياء المجهرية المختلفة[3]. اذ تنتج مركبات كيميائية تستخدم كمادة خام في انتاج المواد الدوائية المستخدمة في معالجة الكثير من الامراض المايكروبية [4]. يعد نبات الزرشك *Berberis Vulgaris* احد النباتات المستخدمة في مجال الطب البديل في وسط وجنوب اوربا وشمال غرب افريقيا وغرب استراليا وخاصة في ايران [5]. وهو نبات شوكي متساقط الاوراق ينمو بشكل منتصب, اوراقه بيضوية مسننة بشكل منشاري حاد اما ثماره فهي مستطيلة الشكل طوله 7-10ملم وعرضها 3-5ملم وتنضج في اواخر الصيف او الخريف ويعود الى عائلة Berberidaceae وتكون ثماره حامضة جدا غنية بفيتامين (C) ويستخدم لاغراض الطهو وصناعة المربى [6]. وله تاريخ قديم في الاستخدام الطبي اذ اثبت التحليل الكيميائي انه يحتوي على كثير من المركبات المثبطة لنمو الاحياء المجهرية اذ يحتوي سلسلة من القلويدات منها Berlamunine, Berberine, oxcanthine [7]. ولاهميته الطبية تم اجراء البحث عن فعاليته المضادة لنمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة وامكانية استخدامه كبديل للمضادات الحيوية.

ان الهدف الدراسة معرفة تأثير المستخلصين على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وامكانية استخدام النباتات والفواكه كبديل للمضادات الحيوية التي تحتوي على مركبات كيمياوية.

المواد وطرائق العمل

العينات النباتية

تم الحصول على عينات ثمار نبات الزرشك ***Berberis vulgaris*** من الاسواق المحلية وتم تشخيصه حسب ماورد في [8]. جففت الثمار بدرجة حرارة الغرفة 25م ثم طحنت الثمار للحصول على مسحوق ناعم وجاف.

تحضير المستخلص المائي والكحولي

حضرت المستخلصات النباتية حسب ماورد في [9]. أذ تم اخذ 10غم من المسحوق النباتي الجاف والمطحون ثم اضيف له 100مل من الماء بلنسبة للمستخلص المائي و100مل من الكحول الاثيلي بتركيز 80% بلنسبة للمستخلص الكحولي اي بنسبة 1:10وزن /حجم. وضع الدورق في حمام مائي هزاز بدرجة 37م استمرت عملية الاستخلاص من (5-6) ساعات وبعد ذلك رُشح المزيج بواساطة ورق ترشيح Whatman No.1 ثم وزع الراشح في انابيب جهاز النبذ المركزي بسرعة 4000 دورة للدقيقة ولمدة 10 دقائق أخذ الرائق ووضع في اطباق زجاجية نظيفة في الحاضنة بدرجة 37م لمدة ثلاثة ايام لحين الحصول على المستخلص الجاف.

جمع العزلات البكتيرية

تم الحصول على العينات البكتيرية المشخصة والمعزولة من كلية العلوم للبنات/ قسم علوم الحياة للفترة من 2012/11/25 ولغاية 2013/1//7.

تحضير العالق البكتيري

استخدمت الطريقة التي تم ذكرها في[10]. وذلك بأخذ (4-5) مستعمرات نامية على وسط الاكار المغذي Nutrient Agar وضعت في انبوبة اختبار حاوية على 10مل من مرق مولر –هنتون Mueller-Hinton Broth وحضنت بدرجة 37م لمدة 6ساعات لحين ظهور العكورة أذ المقارنة مع انبوبة ماكفورلاند 0.5 McFarland tub القياسية.

دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا

استخدمت طريقة الانتشارفي الحفر Agar well diffusion method لدراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الزرشك, وذلك بنشر العالق البكتيري بحجم مقداره 0.1 مل على وسط مولر –هنتون اكار وبعدها عملت حفر في الوسط الغذائي الملقح بحجم 2 ملم وبواسطة ماصة دقيقة, ثم نقل 40 مايكروليتر من كل تركيز من المستخلص النباتي ووضع داخل الحفر وعملت اطباق سيطرة بوضع ماء مقطر بالحفر بدل المستخلص وتم عمل ثلاث مكررات لكل تركيز ثم حضنت الاطباق بدرجة 37م لمدة (24) ساعة وقرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بواسطة المسطرة والتي تبين منطقة عدم نمو البكتريا في تلك المنطقة [11].

تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)والتركيز القاتل الادنى (MBC)

تم استخدام طريقة التخفيف بالانابيب لتحديدMinimum Inhibitory Concentration (MIC) أذ يعرف بأنه اقل تركيز من المستخلص يستطيع قتل البكتريا للمستخلص المائي والكحولي لثمارنبات الزرشك حضرت تخافيف من التركيز 400ملغم/مل. استخدم وسط مرق المولر-هنتون MHB ثم اضيف 0.1مل من المستخلص وبالتراكيز المختلفة المحضرة من التركيز 400ملغم/مل كالتالي 400,200,100,50,25,12.5,6.25,3.125 ملغم/مل الى انابيب تحتوي على 9.8مل من مرق مولر–هنتون MHB ثم لقحت الانابيب بـ0.1من العالق البكتيري تركيز 10×1.5خلية/مل. اصبحت التراكيز كالتالي 0,2.0,1.0,0.5,0.25,0.125,0.0625,0.03125.ملغم /مل ثم حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37م ولمدة 24ساعة وقورنت النتائج مع انبوبة السيطرة مضاف لها 0.1 مل من المذيب DMSO [12]. اما تحديد التركيز القاتل الادنى MBC فقد تم اخذ 0,1 من الانابيب خالية العكورة ووزعت على وسط اكار مولر-هنتون MHA بطريقة النشر وحضنت الاطباق بدرجة 37م ولمدة 24ساعة وتم تحديد قيمة Minimum Bactericidal Concentration(MBC) يعرف بأنة بأخذ اقل تركيزللمستخلص يقلل نمومستعمرات البكترية على الوسط الزرعي [12].

تحليل High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

أستخدم جهاز الكروموتوغرافيا السائلة نوع Shimadzu10 AV-Lc في تحليل (HPLC) لتشخيص المركبات القلوية الفعالة الموجودة في ثمار نبات الزرشك *Berberis Vulgaris* ومنها Tetrandrine Berbamine وChondocurine, فصلت المركبات بأستخدام عامود C(8) مع محلول3% H2SO4 و25% NH4OH (قيمةpH 9.5). تم التحري عن المركبات عن طريق استخدام مطياف نوع UV-Vis 10 A-SPD وعلى طول موجي 220نانومتر. وتم تحديد التراكيز الفعالة من خلال مقارنتها مع منطقة الذروة Peak area للعينة القياسية, أذ تم حساب تراكيز المركبات الفعالة حسب المعادلة التالية:

Concentration(microgram/ml) =area of sample/area of standard×conc.of standard

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج بدراسة الفعالية المضادة للمستخلص ضد العزلات البكتيرية بوساطة البرنامج الإحصائي Statistical Analysis SAS- System (2010) المستخدم في تحليل البيانات لدراسة تأثير العزلات والتركيز في قطر منطقة التثبيط المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي LSD [13].

النتائج والمناقشة

تم اختبار تأثير المستخلص الكحولي والمائي لثمار نبات الزرشك على نمو 4 أنواع بكتيرية ممرضة موجبة وسالبة لصبغة غرام (*Esherichia coli,Pseudomonas aeruginosa, Staphlococcus aureus ,Bacillus cereus*)

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي في جدول (1) وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة للانواع البكتيرية المختلفة واظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي كان فعالا وبشكل كبير ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بالبكتريا السالبة اذ تراوح قطر منطقة التثبيط للبكتريا , *Staphlococcus aureus* بين (31.00±1.00 , 17.50±o.50)ملم ولبكتريا *Bacillus cereus* بين (21.00±1.00,

2.75±0.25)ملم اما البكتريا السالبة فأظهرت مناطق تثبيط فقط في التراكيز العليا فكانت لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بين(1.500±16.50, 0.00±0.00) ولبكتريا *E. coli* تراوحت منطقة التثبيط بين (1.00±12.00, 0.00±0.00) ملم, اما جدول (2) بين تأثيرالمستخلص المائي على الانواع البكتيرية اذ بينت النتائج ان هنالك فروق معنوية بين التراكيز المختلفة كذلك للانواع البكتيرية المختلفة اذ كان المستخلص فعالا ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام أذ تراوح قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Staphlococcus aureus* , بين (0.5±28.50 , 0.50±14.00) ملم ولبكتريا *Bacillus cereus* بين (0.50±17.50 , 0.50±7.50) ملم, اما البكتريا السالبة لصبغة غرام فأظهرت مناطق تثبيط فقط في التراكيز العليا فكانت لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بين (0.75±17.25,0.00±0.00)ملم لبكتريا *E.coli* منطقة التثبيط تراوحت بين (0.50±14.50 0.00±0.00)ملم.

جدول (1): الفعالية الحيوية للمستخلص الكحولي لنبات الزرشك تجاه نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة

الانواع البكتيرية	التركيز(ملغم/مل)				LSD
	400	200	100	50	
Staphylococcus aureus.	31.00±1.00	27.00±2.00	22.50±0.50	17.50±o.50	*4.604
Bacillus cereus	21.00±1.00	17.50±0.50	9.00±1.00	2.75±0.25	*2.302
Pseudomonas aeruginosa	16.50±1.50	10.00± 1.00	6.75±0.25	0.00±0.00	*4.047
E. coli	12.00±1.00	7.25±0.75	0.00±0.00	0.00±0.00	*2.454
LSD	*4.398	*4.733	*2.249	*1.097	-------

* (P≤0.05)
* (وجود فروقات معنوية)

جدول(2): الفعالية الحيوية للمستخلص المائي لنبات الزرشك تجاه نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة

الانواع البكتيرية	التركيز(ملغم/مل)				LSD
	400	200	100	50	
Staphylococcus aureus.	28.50±0.5	22.50±0.50	16.25±0.75	14.00±0.50	*2.249
Bacillus cereus	17.50±0.50	15.75±0.25	13.75±0.75	7.50±0.50	*2.082
Pseudomonasaeruginosa	17.25±0.75	14.50±0.50	0.00±0.00	0.00±0.00	*1.769
E.coli	14.50±0.50	12.50±0.50	0.00±0.00	0.00±0.00	*1.388
LSD	*2.249	*1.769	*2.082	*1.388	--------

* (P≤0.05).
* (وجود فروقات معنوية)

يتضح من النتائج ان البكتريا السالبة لصبغة غرام هي اكثر مقاومة و اقل حساسية من البكتريا الموجبة لصبغة غرام وهذا يتطابق مع اغلب البحوث التي تناولت معظم النباتات الطبية وتأثيرها على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام [14]. وهنالك عدة اسباب لهذه النتيجة منها جدار البكتريا المعروف للبكتريا السالبة لصبغة غرام أذ يتألف من الدهون التي قد تمنع مرور الكثير من المواد الى داخل البكتريا [15]. كذلك اظهرت النتائج تفاوت للمستخلص الكجولي والمائي في تأثيرهما على تثبيط البكتريا وذلك يعود لاختلاف انواع البكتريا وكذلك ا ختلاف نوعية المستخلص وتأثيره [16]. اذ ان تاثير المستخلص النباتي على البكتريا يتم بطرق مختلفة قد تؤثر على تصنيع البروتين والاحماض الامينية اوله تاثير في تصنيع جدار البكتريا او غشاءها [17]. علما انه لاتوجد بحوث محلية تناولت دراسة تأثير نبات الزرشك على نمو الانواع البكتيرية الممرضة. لكن جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع ماذكره [18-19]. بأن تأثير المستخلص المائي والكحولي لثمار نبات الزرشك فعالة وبشكل كبير على البكتريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام .

اظهرت نتائج التحري عن قيم تحديد MIC وMBC في جدول (3،4) فهي مؤكدة لاختبارات الحساسية أذ يبين جدول (3) قيمة MIC لبكتريا *Staphlococcus aureus* 1.0 ملم ولبكتريا *Bacillus cereus* 4.0ملم اماقيمة MBC فقد ظهرت فقط لبكتريا *Staphlococcus aureus* بقيمة 2.0ملم اما البكتريا السالبة لم تظهرلها قيم MIC كذلك MBC اما بالنسبة للمستخلص المائي فقد كانت قيمة MBC لبكتريا *Staphlococcus aureus* 2.0ملم ولبكتريا *Bacillus cereus* 4.0 ملم اما قيمة MBC فقد ظهرت فقط لبكتريا *Staphlococcus aureus* بقيمة 2.0 ملم اما البكتريا السالبة لصبغة غرام لم تظهرلها قيم MIC كذلك MBC .

جدول (3): التركيز المثبط الادنى (MIC) , والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمستخلص الكحولي لنبات الزرشك ضد الانواع البكتيرية الممرضة

الانواع البكتيرية	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Staphylococcus aureus	0.1	0.2
Bacillus cereus	0.2	0.4
Pseudomonas aeruginosa	-----	-----
E.coli	-----	-----

جدول(4): التركيز المثبط الادنى (MIC) , والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمستخلص المائي لنبات الزرشك ضد الانواع البكتيرية الممرضة

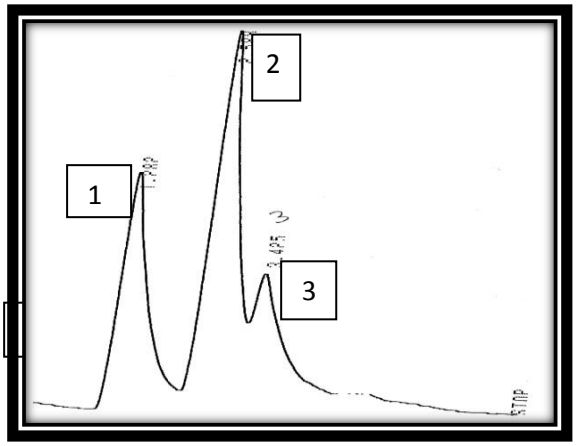
MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	الانواع البكتيرية
0.4	0.2	*Staphylococcus aureus*
-----	0.4	*Bacillus cereus*
-----	------	*E.coli*
-----	-----	*Pseudomonas aeruginosa*

بينت النتائج المستحصلة في هذه الدراسة بما يخص تأثير المستخلص الكحولي والمائي والتي بينت مقاومة وحساسية البكتريا للمستخلصين يكون السبب بعدم التاثير انها لم تكن ضمن التراكيز المطلوبة وجاءت النتائج متفقة مع ماذكره [20]. بأنه المستخلصين ذا تأثير فعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام.

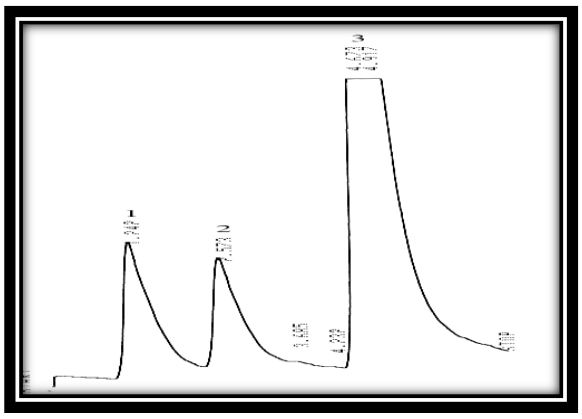
بينت نتائج تحليل HPLC لثمار نبات الزرشك الموضحة في جدول (5) وشكل (1،2) ظهور عدة مركبات قلوية فعالة ومنها Bebamine, Tetrandrine وبين التحليل ان اعلى تركيزكان لـمركب Tetrandrine 38.4 ملغم/مل اما اقل تركيز كان لمركب Chondocurine 8.2ملغم/مل.

جدول(5): تركيز بعض المركبات الفعالة لنبات الزرشك بتحليل HPLC

Retention timeللعينة القياسية	(Mg/ml) con	Retention timeلعينة ثمار الزرشك	المركبات الفعالة
1.28	38.42	1.24	Tetrandrine
2.58	21.86	2.57	Berbamine
3.42	8.2	3.68	Chondocurine



شكل(1): تركيز المركبات القلوية الفعالة للعينة القياسية المحللة بتحليل HPLC
1-Terandrine 2-Berbamine 3-Chondocurine



شكل (2): تركيز المركبات القلوية التواجدة في ثمار نبات الزرشك المحللة بتحليل HPLC
1-Terandrine 2-Brebamine 3-Chondocurine

اظهر تحليل HPLC نسبة المركبات القلوية في ثمار نبات الزرشك اذ من الملاحظ ان نسبة المركبات القلوية عالية وان هذه المركبات لها القدرة على تثبيط تصنيع وعمليات تضاعف DNA وكذلك تثبيط تصنيع البروتينات وتؤثر في ميكانيكية انتاج السموم البكتيرية والانزيمات [20]. ويعد هذا التحليل ناجحا للتحري النوعي والكمي للمركبات الفعالة في الزرشك والتي لها القدرة على قتل وتثبيط نمو البكتريا [19].

المصادر

1. Javadzadeh, S. M and Fallah, S. R. (2012). Therapeutic application of different parts *Beberis vulgaris*. International Journal Agriculture and Crop Sciences ISSN. 2227-6704.
2. Cowen, L. E. (2008). Resistance Modulating the trajectory form genotype to phenotype Not. Rev. Microbial.6(3):187-198.
3. Shahidibonjar, G. H. (2004). Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Ecsherichia coli.* Asian. J. of plant Sciences. 3(3):310-314.
4. Lansky, A. and Newman, J. (2007). *Punica gratum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation cancer.6(3):789-98.
5. Webb, D.A. and Akeroyd, J.R. (1993). Flora Europeae,Vol .I, University press, Cambridge, p, 295.
6. Freile, M., Giannini, F. and Sortino, M. (2006). Antifungal activity of aqueous extracts and Berberine isolated from *Berberis heteroohylla*. Acta form. Banaernse. 25(1):83-88.
7. Stermitz, F. R, TawarMatsuda, p., Lorenz, P. and Muller, L. (2000). J. Nat. prod.63:1146-1149.
8. Atlas, R.M, Brown, A.E. and Parks, L. C. (1995). Laboratory manual of Experimental Microbiology. Mosby company-yearbook, inc., st.Louis. 563.
9. Rani, I., Akhaud, S. H., Suhail, M. and Abro, H. (2010). Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*, pak, J. Bot. 42(4):2949-2953.
10. النعمان, اديبة يونس شريف حمو. (1998). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرعلام, اطروحة دكتوراه, كلية العلوم, جامعة الموصل.
11. Jorgensen, J. H., Turnide, S. D. and Wasington, J.A. (1999). Antibacterial susceptibility test dilution and disk diffusion methods. in: murry, P.R; Faller,M.A.; Tenorer, F.C.; Baron, E.J. Manual of clinical Microbiology,7th ed.Whashington DC, ASM press. 1526-1543.
12. الالوسي, ثائرعبدالقادر صالح. (2005). تأثير بعض المستخلصات النباتية على الاطوار اليرقية لبعوض *Culex quinquefasciatus* (Diptera:culicidae), رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة الانبار.
13. SAS. (2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
14. SAS. (2004). Sasstat users guide for personal computers release 6.12.SAS.inst.inc.cary .N.C.USA.
15. Yesilada, E. and Kwpeli, E. (2002). Berberis crataegia DC root exhibits otentanti-inflammantary. analysis and febrifuge effects in mice and rats. J. Ethnopharmacol. 79:237-248.
16. حمدان، عامر حسين ,ظاهر, عامر عبدالرحمن والقيسي, مهدي ضمد. (2009). مقارنة الكفاءة التثبيطية لمستخلصات بذور الخردل الابيض تجاه بعض عزلات ابكتريا الاختيارية. مجلة الزراعة العراقية. (14)4:47-40.
17. Chao, S. C., Young, D. G. and Obery, C. J. (2000). Screening for inhibitory of essential oil on selected bacteria ,fungi and viruses. J. Essent. OilRes.12:639-649.
18. Wang, X., Yao, X., Zhu, Z., Tang, T. and Jabbouri, S. (2009). Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilrr. volume 34,issue 1:60-66.
19. Arayne, M. S., Sultana, N. and Bahadur, S. (2007). The berberisstory: *Berberis vulgaris* in therapeutics pak. J. pharm. Science. vol20(1):83-92.
20. Doaa, A., Ghareeb, R., Abeer, E., Abd El-wahab, Eman, E., Sarhan, M., Marwa, M. (2013). Biological assessment of *Berberis Vulgaris* and its active consistent, berberine: Antibacterial, antifungal andante-hepatitis cuirus (HCV) effect. J. Medicinal plants research.Vol21(7):32-52.