الجمهورية الجزائريـــــة الديمقراطيـــة الشعبيـــة
وزارة التعليـــم العالي والبحث العلمـــي

جـــامعة باجـــــي مختـــــار عنـــابة
كليـــــة العلـــــوم
قسم البيـــولوجـــيا

رســـــالة لنيل شهادة ماجستير
في العلـوم الطبيعية
تخصص: إيكوفسيولوجيا الحيـــوان

الموضـــوع

دراسة تأثير أحد المبيدات الحشرية Chlorpyriphose على التطور والتكاثر عند أحد أنواع البرمائيات *Bufo viridis*

من إعـــداد

بوالمرقة لقمـــــان

أعضـاء اللجنـــــة:

* بولعقود م.ًص:	رئيسـا	- أستـــاذ	بجامعة باجي مختار- عنابة.
*بوجليـــدة ح. :	مشرفـا	- أستـــاذ محاضر	بجامعة باجي مختار- عنابة.
* خليـــلي ك. :	مقـــررا	- أستـاذ	بجامعة باجي مختار- عنابة.
* وقيد م. ل. :	مقـــررا	- أستـاذ محاضر	بجامعة باجي مختار- عنابة.

سنـــة 2010 -2011

الشكر

الشكر و الحمد لله كثيرا على توفيقه لنا لإنجاز هذا العمل

أتوجه بالشكر الخالص و العرفان إلى الأستاذ الفاضل الدكتور بوجليدة حميد على اقتراحه للموضوع و قبول الإشراف عليه و على كفاءته العلمية و كل المساعدة الذي قدمها طوال فترة إنجاز هذا البحث .

نشكر الأستاذ الدكتور بولعقود محمد الصالح لقبوله رئاسة لجنة المناقشة

كما أتوجه بالشكر والثناء إلى الأساتذة أعضاء اللجنة لقبولهم مناقشة هذا البحث كل باسمه

الأستاذ الدكتور خليلي كمال و الدكتور وقيد محمد العيد

كما أتقدم بالشكر و التقدير إلى كل من ساعدنا في إنجاز هذا البحث من قريب أو بعيد

الملخص

تؤدي الملوثات بصفة عامة و المبيدات الكمياوية بصفة خاصة إلى حدوث تأثيرات ضارة على الكائنات الحية بطرق مباشرة أو غير مباشرة أو تؤثر في المواد غير الحية المكونة للنظام البيئي.

هذه الدراسة تهدف إلى معرفة مدى تأثير أحد المبيدات العضوية الحشرية chlorpyriphose الأكثرأستعمالا بالجزائر، على عملية النمو والتكاثر لأحد أنواع البرمائيات *Bufo viridis* لأكثر أنتشارا بالمنطقة.

تم التوصل خلال هدا العمل إلى أن للمبيد الحشري Chlorpyriphose سمية كبير ة على شراغيف الضفادع المعاملة بتراكيز مختلفة من المبيد (0.15، 0.20، 0.350،0.3 غ/ل). .إن حساسية اليرقات للمبيد تختلف باختلاف الطور و التراكيز المستعملة.

خلال المعالجة لوحظ حدوث موت اليرقات مصحوب بتشوهات مرفولوجية متعددة ، نذكر منها حالات ضعف الجسم –قصر الذيل –قلة الحركة. -كما تمتحديد الجرعة المميتة CL50 و CL90 عند الأطوار المعالجة المختلفة. من جهة اخرى أظهرت النتائج أن للمبيد الحشري تأثير معنوي على مدة النمو للأطوار اليرقية وهذا خلال المعاملة المباشرة بالتراكيز المرتفعة. كما أثبتت النتائج أن للمبيد المستعمل تأثير على التكاثرعند العلاجم البالغة المستعملة من خلال عدد البيض المسجل وكذلك انخفاض في نسبة الفقس.

النتائج النهائية أثبتت أن للمبيد الحشري سمية عالية ويعتبر ساما لجميع العضيات الغير مقصودة كما ينصح التخلي عن مثل هذه المواد وتعويضها بالمبيدات ذات الجيل الثلث واالتي تعتمد في تأثيرها على عوامل النمو المختلفة للحشرات والتي أثبث بأن ليس لها تأثير على الحيوانات الغير حشرية.

كما نطمح مستقبليا لمعرفة مدى تأثير هذا المبيد على عملية التحول بالمعايرة الهرمونية للتيركسين و معرفة دور و علاقة الكولين إستراز مع نمو الأطوار المختلفة لشراغيف *Bufo viridis*.

Résumé :

Le travail présenté par l'étudiant à pour but d'étudier l'impact d'un pesticide, organophosphoré, utiliser en Algérie pour traiter les insectes des grandes cultures, a l'égard des amphibiens considéré comme un organisme non visé. L'étude a consiste d'évaluer l'activité du pesticide, le chlorpyriphose, sur quelques paramètres morphologiques du développement et sur le potentiel de la reproduction d'un amphibien *Bufo viridis* l'espèce la plus abondante de la région. Les recherches menées complètent les travaux déjà réalisés dans le laboratoire de d'écophysiologie animale sur l'écophysiologie de la reproduction d'une part et enrichis les travaux déjà réalisés sur les amphibiens, dans la région Nort Est d'autre part.

La première partie a été consacrée à une étude toxicologique du pesticide sur quelques stades larvaires (têtards) (stade 43, 48, 49 et 50), selon Nieuwkoop & Faber, (1967). Les résultats ont montrés que le chlorpyriphose a un effet toxique et aussi une perturbation du développement avec l'apparition de type malformation avec une prolongation de la durée du développement.

La deuxième partie a été réservée d'estimer l'effet du pesticide sur la reproduction des adultes de *Bufo viridis* traités avec des différentes concentrations (0,15, 0,20, 0,30 & 0,35 g/l). Enfin, les résultats ont montrés que le pesticide, chlorpyriphose, à un effet sur le potentiel reproducteur des femelles (réduction du nombres des œufs et pourcentage d'éclosion).

En perspective il serait intéressant de connaître l'effet de cette molécule sur le phénomène du développement et la métamorphose, par le dosage de la thyroxine et le cholinestérase.

Abstract :

The aim of the current study has been to investigate the effect of an insecticide Chlorpyrifos on the development of *Bufo viridis* on different developmental stages, according to Nieuwkoop & Faber (1967), when applied at different concentrations; 0.15, 0.20, 0.30 and 0.35 g/l. The obtained results show that the pesticides exhibit a toxic effect and have led to some morphological malformations associated to the death of larva.

It has also been possible to estimate, trough this current study, both LC50 and LC90 for different treated stages.

Other results arising from second experiments showing that treatment of females of *Bufo viridis* the above mention concentrations induces a reduction in both the number of eggs and in the percentage of eggs fledging.

In perspectives, we intend to look at the effect of the used molecule on thyroxin levels and on cholinesterase activity during different stages of development.

المناقشة

النتائج

الفهرس

الصفحة

1. الـمقدمـــــة 1

2.الـمـواد و طـرق الـعمـل 4

1.2.المــادة البيـولـوجيــة 4

أ- التصنيف 4

ب- التوزع الجغرافي 4

ج- الصفات الخارجية 4

د- دورة حيــاة الضفادع 6

هـ ـ الأخطار المسببة لانقراض النوع 7

2.2 طـريقــه صيد وتربية الحيوانات 7

2.2 المبيـــد المستعمل 8

أ ـ التركيب والخصائص الكيميائية للمبيد الحشري الكلوربيريفوس 8

ب. تحضير الجـرعـات 8

ج- طريقة المعاملة بالمبيد الحشري 9

د- تحـديـد الأنمــاط والتشــوهات المـرفـولوجيــة 9

هـ - تـأثيـر منظـم النمـو chlorpyriphose عـلى مـدة الطـور 9

و- دراسة تأثير المبيد على التكاثر 9

3.2 التحليـل الإحصــائي 10

ا- تحـديـد نسب المـوت 10

ب- تحليل التباين 10

ج- تحـديـد البـر وبيـت..... 11

د- معــادلـة خـط الارتــداد..... 11

هـ - اختيــار مـربع كــآي..... 12

و- تحـديـد مجــال الثقــة..... 12

ي- مقــارنة المتــوسطــات الحســابية..... 13

3. النتــائـــج..... 14

1.3. سمية المبيد الحشري chlorpyriphose على شراغيف الطور 43.....14
أ. التأثير المباشر.....14
ب.التأثير الكلي.....15
3. 2. سمية المبيد الحشري chlorpyriphose على شراغيف الطور 48.....17
أ. التأثير المباشر.....17
ب- لتأثير الكلي.....19
3.3 سمية المبيد لبحشري chlorpyriphose على شراغيف الطور 49 21
أ. التأثير المباشر.....21
ب- التأثير الكلي.....23
4.3 سمية المبيد الحشري chlorpyriphose على شراغيف الطور 50 25
أ- التأثير المباشر.....25
ب- التأثير الكلي.....27
5.3. الأنماط والتشوهات المرفولوجية الناجمة عن المعاملة بالمبيد.....29
6.3 تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على عدد البيض الموضوعة.....29
7.3 تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على نسبة فقس البيض.....31
8.3 تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على نسبة الموت المسجلة بعد عملية الفقس.....31
9.3. تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على سرعة النمو للشراغيف الطور 43.....32
10.3. تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على زيادة وزن الشراغيف 33
11.3 تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphoseعلى زيادة الطول للشراغيف 34
4. المناقشة.....35
5- المراجع.....40

قائمة الجداول

الرقم	العنـــــــــــــــوان	الصفحة
1	نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 43*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **الـتأثير المباشر " (n=75) .**	14
2	تحليل التباين لنسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 43*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **الـتأثير المباشر ".**	15
3	نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 43 *لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير الكلي "**	16
4	تحليل التباين نسب الـموت المصححـة ليـرقـات الـطـور 43 *لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose**"الـتأثير الكلي "**	16
5	**:** نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 48*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير المباشر "(n=75)**	18
6	تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 48*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير المباشر" (n=75)**	18
7	نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 48*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير الكلي" (n=75)**	20
8	تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 48*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير الكلي" (n=75)**	20
9	نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 49*لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الـتأثير المباشر "**	22

10	نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 49 *لضفدع Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير المباشر "**	22
11	نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 49 *لضفدع Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي "**	24
12	تحليل التباين نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 49 *لضفدع Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي".**	24
13	نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 50 لضفدع *Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير المباشر".**	26
14	نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 50 لضفدع *Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير المباشر".**	26
15	نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 50 لضفدع *Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي".**	28
16	تحليل التباين نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 50 لضفدع *Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي".**	28

قائمة الأشكال

الرقم	العنـــــــــــوان	الصفحة
1	صورة توضح بعض مراحل التطور للبرمائيات في وسطها الطبيعي.	8
2	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 43 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير المباشر".	15
3	وحدات البروبيت باللوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 43 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير الكلي".	17
4	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 48 من نوع الضفادع *Bufo viridis* " التأثير المباشر ".	19
5	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 48 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "التأثير الكلي".	21
6	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 49 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير المباشر".	23
7	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 49 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "التأثير الكلي" .	25
8	وحدات البروبيت باللوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chloropyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 50 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "التأثير المباشر".	27
9	وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 50 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير الكلي".	29

10	**تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على عدد البيوض الموضوعة خلال أسبوع بعد المعاملة بتراكيز مختلفة(C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل ة C3 = 0,35 غ/ل) بالغة من الضفادع *Bufo viridis* .	30
11	**تأثير المبيد** الحشري Chloropyriphose على نسبة فقس البيوض الموضوعة خلال أسبوع بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل ة C3 = 0,35 غ/ل) لحيوانات بالغة من الضفادع *Bufo viridis*	31
12	**تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على نسبة الموت المسجلة خلال أسبوعين من الفقس بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis* .	32
13	تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على متوسط الوزن (ملغ) المسجلة خلال فترات الأطوار الموالية بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis*.	33
14	**تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على متوسط الطول (ملم) المسجلة خلال فترات الأطوار الموالية بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف*Bufo viridis* .	34

1. الـمقدمـــــــة:

لقد حظي موضوع التلوث البيئي باهتمام المختصين و الرأي العالمي و كثرت الأبحاث و الدراسات التي تناولت التلوث البيئي، خاصة بعد إنتشاره بنسبة كبيرة مما أدى إلى صعوبة كبيرة في السيطرة عليه، و نتج عنه اضطراب في التوازن البيئي و انقراض العديد من الكائنات الحية التي تلعب دورا هاما في السلسلة الغذائية. و ينتج التلوث أساسا عن تدخل الإنسان في قوانين البيئة الطبيعية و إخلاله بتوازن عناصرها و مكوناتها. من أبرز الملوثات البيئية أهمها المخلفات الكميائية الصناعية التي يتم تصريفها في مجاري الوديان أو في اراضي مفتوحة، وكذلك المبيدات بصفة عامة المتستعملة في الميدان الزراعي. يعتبر هذين المصدرين من أكبر الملوثات للمياه الموجودة بالأنهار والوديان أو المستنقعات. إن تلوث المياه بالمبيدات الحشرية أصبح من الأهتمامات الكبرى في الميدان البيئي, وهذا بأستكشاف الزيادة في نوعية المبيدات في المياه السطحي. هذا الأهتمام يكمن في الحفاض على المياه المستعملة في الشرب (Ceregeira *et al*., 2OO3; Rodriguez-Mozaz *et al*., 2006). المياه السطحية الموجودة بحدود المناطق الزراعية الكثيفة معرضة لضاهرة التلوث بالمبيدات الكمياوية. لأن أهمية أستعمال المبيدات تكمن في التأثير على الكائنات المستهدفة وليس الحفاظ على البيئة.

تؤدي الملوثات بصفة عامة و المبيدات الكمياوية بصفة خاصة إلى حدوث تأثيرات ضارة على الكائنات الحية بطرق مباشرة أو غير مباشرة أو تؤثر في المواد غير الحية المكونة للنظام البيئي (McCarthy and Shugart, 1990). من بين الكائنات الحية الأكثر عرضة للتلوث البيئي نجد الحيوانات البرمائية، و ذلك لطريقة حياتها خاصة المائية منها. و التلوث عن طريق المبيدات الكلورعضوية (organochlorine pesticide) و مبيدات أخرى مستعملة في الميدان الزراعي تؤثر مباشرة على حياة البرمائيات منها الضفادع بأنواعها المختلفة ، خاصة أثناء تطور الشر اغ ف (Sparling *et al*., 2001). ويرجع ذلك إلى الحساسية الكبيرة للبرمائيات للمواد الكيميائية منها المبيدات التي تتواجد و تنتقل إلى الماء الموجود في محيط المناطق الزراعية، خاصة أثناء فترة التكاثر ومراحل الأولى للنمو التي تكون في الماء. هذا التأثير أدى إلى انقراض أعداد و أنواع من الضفادع التي تعيش بالقرب من المناطق الزراعية أين يكثر استعمال المبيدات(Gomez-Mestre *et al*., 2006) .إن البرمائيات من أهم الفقاريا ت التي تعيش في المياه السطحية، وعلية فتم الملاحظة خلال العشرية الأخيرة تراجعا كبيرا في عشائر هذه البرمائيات (Alfrod *et al*., 2001). في الوقت الراهن إن ثلث البرمائيات قد أزيل بفعل هذه المولوثات (Stuart *et al*., 2004).

تعانى معظم دول العالم من مشاكل التلوث الغذائي بمتبقيات المبيدات و التأثيرات البيئة الضارة والخطيرة الناجمة عن الاستخدام المك ثف و الغيرالسليم للمبيدات في مكافحة الآفات وقد حظيت هذه المشاكل باهتمام قطاعات عريضة من المتخصصين و المسؤولين و ذلك لارتباطها المباشر بصحة الإنسان ونظافة البيئة، و قد تكاتفت الجهود على المستوى الدولي للوصول إلى أفضل الإجراءات التي تتضمن بها حسن استخدام المبيدات دون حدوث أخطار غير مقبولة تهدد صحة الإنسان و البيئة. حيث توصل العلماء إلى اكتشاف مواد كيميائية جديدة تختلف في طريقة تأثيرها عن المبيدات التقليدية، إذ تتدخل ه ذه المركبات الجديدة في تغير الخواص الفسيولوجية للحشرات و تعمل على إعاقة نموها و تطورها، تعرف هذه المركبات بمنظمات النمو للحشرات (Dhadialla *et al*., 1998)، وهي ذات تأثير سمي يفوق 100 مرة أكتر من تأثير السمي للمبيد العضوي DDT (Kadokami et al., 2002) وهذا دون تأثيرات ثانوية على البيئة والعضويات الغير مستهدفة.

تعتبر استغلال الفلاحة لمناطق أرضية أكبر نسبة لأي نشاط إنساني (Devine and Furlong, 2007) إد يؤدي لأنخفاض عشائر البرمائيات ،الناتج عن فقدانها لأوساطها الطبيعية. بهذا فإن النشاط الفلاحي يؤدي حتما إلى التأثير على التوزيع و عدد البرمائيات ، بالرغم أن هناك بعض الأنواع من الضفادع أستطاعت المقاومةو العيش في الأراضي الزراعية بشرط توفر المياه في محيط هذه المناطق (Mann *et al*., 2009). كنتيجة حتمية فالنشاط الفلاحي يساهم في تغيير وبإستمرار نوعية الوسط البيئي، وهذا بالإستعمال المفرط والاعقلاني للمبيدات الكيميائية و المخصبة التي أصبحت تشكل مصادر تلوث. فعليه فإن معرفة مدى مقاومة أنواع البرمائيات و كثافة عشائرها لهذه المبيدات أصبح من الحتميات المطروحة في الأوساط الزراعية، و هذا نتيجة لإنخفاض في عدد البرمائيات الذي تم ملاحظته في عدة مناطق من العالم (Relyea and Mills , 2001).

عدة بحوث أثبتت أن هناك علاقة في إنخفاض عشائر وأنواع البرمائيات إذا كانت في محيط زراعي (Davidson *et al*., 2007 ; Davidson , 2004). تتم عملية البيض عند مجموعة كبيرة من أنواع الضفادع وهذا خلال دورة حياتها، في أوساط رطبة أو مستنقعات مائية موجودة في مناطق زراعية المعاملة بالمبيدات الكيميائية . و عليه أصبحت هده البرمائيات معرضة للسمية بالمبيدات الحشرية، زيادة على هذا فإن البرمائيات الفصلية تتكاثر و تنموا في فصل الربيع و الصيف و هذا يتزامن مع فترة الرش بالمبيدات و المخصبات، زيادة على المبيدات النباتية و الفطرية الموجودة المستعملة سالفا. كل هذه المواد لها تأثير مباشر على دورة حياة الضفادع، حيث عدة دراسات في بلدان مختلفة من العالم

دقت ناقوس الخطر على التأثير السلبي للمبيدات الزراعية على البيئة بصفة عامة وعلى أنواع الضفادع بصفة خاصة (Davidson and Knapp, 2007)

يهدف هذا العمل إلى معرفة مدى تأثير أحد المبيدات الحشرية المستعملة في بشكل واسع في الميدان الزراعي و المتمثل بالمبيد الكلوروعضوي كلور بيريفوس Chlorpyrifos على أحد أنواع البرمائيات الأكثر أنتشارا بالمنطقة *Bufo viridis*. حيث تمت دراسة سمية هذا المبيد على أطوار النمو 43 ، 48، 49 و 50 بمعرفة نسب الموت وإبراز أهم الظواهر و التشوهات المرفولوجية الناجمة عن المعاملة وكذلك معرفة مدى تأثير هذا المركب على سرعة النمو و الإخصاب و محاولة معرفة قدرتها على العيش في وسط ملوث بالمبيد ، و دراسة تكاثر الضفادع البالغة و قدرة البيوض على الفقس في وسط ملوث بالمبيد .

2.المـواد و طـرق الـعمـل:

1.2.المــادة البيـولـوجيــة:

المادة البيولوجية ممثلة بأحد البرمائيات الأكثر انتشارا *Bufo viridis* حيث يتواجد خلال طول السنة وهذا في أغلب المناطق بالجزائر والاسم المتداول : crapaud vert (العلجم الأخضر) .حيث يتميز هذا النوع من الضفادع بالتصنيف التالي،

أ- التصنيف:

شعبة	Chordata	**Embranchement**
صف	Amphibia	**Classe**
رتبة	Anura	**Ordre**
عائلة	Bufonidae	**Famille**
جنس	*Bufo*	**Genre**
نوع	*viridis*	**Espèce**

ب- التوزع الجغرافي :

ينتشر هذا النوع من البرمائيات في مناطق مختلفة من المعمورة. حيث يتواجد في أوروبا الجنوبية ، دول المطلة على البحر البيض المتوسط ـ إيران ، العراق ـ الشرق الأوسط ـ أوروبا الشرقية و أفريقيا الشمالية. مسكن هذه الضفادع متمثل في المناطق الرطبة مثل المستنقعا ت، الوديان، حواف البحار، السدود والمناطق التي تنتشر فيها البحيرات. وتتواجد كذلك في المناطق التي تحتفظ بكميات و لو قليلة من المياه في الفصول الجافة، مثل مناطق الهضاب العليا الشبه الجافة.

أما التغذية لهذه العلا جم البالغة تتغذى على الحشرات، الديدان، الجراد، الصراصير، ذات الألف قدم، العناكب ، .... إلخ .أما الشراغيف أو اليرقات فتتغذى على المواد العضوية العالقة بالمياه والطحالب.

ج- الصفات الخارجية:

من صفات الضفادع، عند البرمائيات ذات التحول الكامل، أن الرأس و الجذع ملتحمان عرضيا، و يوجد زوجان الأطراف أمامية وخلفية. يغطي الحيوان جميعه بجلد رطب ناعم لين وهذا لوجود غدد جلدية مرطبة وحامية. تحمل الرأس فما عرضيا متسعا لتناول الطعام ، توجد فتحتان أنفيتان صغيرتان وعينان كبيرتان كرويتان. لكل عين جفن علوي معتم لحمي و جفن سفلي أصغر يوجد تحته و يلتحم به جفن ثالث شفاف، يمكنه الحركة إلى أعلى فوق مقلة العين حتى تبقى رطبة في الهواء و يحميها عندما

تكون تحت الماء. خلف كل عين توجد طبلة الأذن المسطحة ، أو الغشاء السمعي الذي يستقبل الموجات الصوتية . عند نهاية الجسم توجد فتحة الشرج، أو فتحة المجمع، و هي فتحة صغيرة يطرد من خلالها مخلفات الطعام، و متخلفات الإخراج السائلة (البول)، والخلايا الجنسية (البيض و المنى) من أعضاء التكاثر.

تشتمل الأطراف الأمامية القصيرة على العضد، الساعد، المعصم، و اليد. لليد راحة صغيرة بها درنات من أسفل، و أربع أصابع و إبهام ضامر. أما الأطراف الخلفية فتحتوي على فخذ، و ساق و رجل سفلى، و رسغ القدم ثم القدم الطويل و له أخمص ضيق (مشط القدم) و خمسة أصابع قدم متصلة بغشاء رقيق عريض.

غطاء الجسم ويشكل من جلد رقيق مرن الذي يغطي الحيوان بكامله ويقدم له حماية طبيعية لتوفر غدد ذهنية وسامة كثيرة، تحميه من الكائنات المسببة للأمراض. كما يساعد الجلد كذلك في عملية التنفس خاصة أثناء البيات الشتوي. يستعمل كذلك كعضو لامتصاص الماء في الظروف القاسية مثل الجفاف.

يتركب جلد الضفادع ، من الناحية النسيجية، من بشرة المتكونة بدورها من نسيج طلائي حرشفي مركب كراتيني. تلي هذه الطبقة الأدمة، والتي هي عبارة عن نسيج ضام يكون على شكل دعامة للنسيج العلوي. تحتوي الأدمة على أجسام كل الغدد ذات الإفراز الخارجي. تعرف كذلك الأدمة بأنها عبارة عن نسيج مالبيجي كراتيني يتكون ستة ، من الداخ ل إلى الخارج، **طبقة جرثومية** مولدة للطبقات الموالية ذات الشكل المكعب وخلال تحركها في اتجاه الخارج تتفلطح. تحتوي هذه الطبقة كذلك على الخلايا الملونة للجلد، تعرف بالخلايا المولدة للملانين.تلي هذه الطبقة ، **طبقة مالبيجي** ثم **الطبقة المحببة** كناية لاحتوائها على حبيبات الكراتويالين التي تدخل في تركيب مادة الكراتين، بعدها **الطبقة الواضحة** بسبب بداية تشكل الكرتين، ثم تأتي **الطبقة المتقرنة**، التي هي عبارة عن خلايا ميتة مملوءة بمادة الكراتين. أخيرا تتشكل **الطبقة الزائلة** الخارجية التي تصبح غطاء قرنيا رفيعا. تتكون طبقة جديدة تحت الغطاء القديم كل شهرا تقريبا في فصل الصيف، وهذا بانسلاخ الغطاء القديم أو تآكله، فينشق عند مستوى الظهر ثم ينفصل شيئا فشيئا قطعة واحدة بواسطة اليدين و عادة يبتلعه الضفدع. تتكون الأدمة من نسيج ا ضام. جزؤها الخارجي إسفنجي و يتكون من الألياف و الخلايا الضامة المدفونة بالمادة الأساسية. الجزء العميق من الأدمة عبارة عن طبقة متماسكة من ألياف الكولاجين المتشابكة التي تزود مرونة للجلد . توجد بها كذلك النهايات العصبية، أوعية دموية غزيرة بحكم دور آلية التنفس. الجلد في الضفادع بخلاف ما هو موجود في الفقاريات الأخري ات، يلتصق بالجسم فقط خطوط محددة طولية.

تفرز الغدد الجلدية مركبات تطرح للخارج، على سطح البشرة، من خلال قنوات رفيعة، مثل الغدد المخاطية التي تفرز سائلا لزجا عديم اللون يحفظ الجلد رطبا، لامعا و لزجا. كذلك يحمي الحيوان إلى حد ما من الحيوانات المفترسة.

د- دورة حيــاة الضفادع:

تتقيز الضفادع بالـتحول الـشكلي الـكامـل، خلال دورة حيـاتـها، لكونها من الحيوانات التي تمر خلال نموها بتطور غير مباشر. أطـوار البيولوجية مختلفة، تبدأ بطور البيضة، التي توضع من طرف الكاملات البالغة جنسيا في وسط مائي. تفقس هذا البيض على أطوار يرقية أو شرغوفية يختلف عددها من نوع إلى أخر (Nieukoop & Faber, 1967) (ملحق). يدخل الطور اليرقي النهائي الكبير، المتميز بظهور الأطراف الأمامية والخلفية، عملية التحول والتي تتميز بتطور بعض الأعضاء أو الأجهزة مثل الجهاز الهضمي، وظهور بعضها مثل الجهاز التنفسي واختزال بع ض الأخر مثل الخياشيم والذيل. يصحب هذا التحول تغيرات مرفولوجية خارجية مثل شكل الرأس تؤدي في النهاية على تشكل حيوان كامل يستطيع العيش في اليابسة. تحتاج الضفادع إلى بيئة رطبة، حتى يحفظ الجلد رطبا، حيث معظم أنواع الضفادع نجدها تعيش في أو قريبا من البرك أو المجاري المائية.

البرمائيات من ذوات الدم البارد أو حرارة متغيرة. في أغلب الحالات تعتمد درجة حرارة الجسم على درجة حرارة البيئة . قليل من الأنواع تعيش في المناطق الباردة، في الجبال المرتفعة، و حتى في دائرة القطب الشمالي، و لكنها تكثر من ناحية الأنواع و الأفراد في المناطق الرطبة المعتدلة و الاستوائية. فهي تتكاثر، تتغذى و تنمو عندما يكون الطقس دافئا وتدخل في بيات شتوي في الفصول الباردة. هذا البيات الشتوي عبارة عن حالة خمول يهبط بها أيض الجسم إلى مستوى منخفض و تبطئ ضربات القلب و يقل من التنفس ليصبح جلديا فقط.

معظم أنواع الضفادع التي تعيش في المناطق المعتدلة تخرج في فصل الربيع، تحدده درجة الحرارة، و معظم الأنواع تبدأ على الفور في عملية التكاثر. تتجمع الذكور في المياه الملائمة و تبدأ في النقيق لتجذب الإناث. عندما ينضج بيض الإناث تدخل إلى الماء حيث تحتضن كل أنثى بواسطة ذكر. يمتطي ظهرها ثم يمسكها بإحكام لافا طرفيه الأماميين حول صدرها . و عندما تضع الأنثى بيضها، يقذف الذكر بالمنى أو السائل المنوي المحتوي على الحيوانات المنوية ليخصبها خارجيا. تنتفخ الأغشية الجلاتينية المحيطة بالبيض و تلتصق بأفرع النباتات المائية. تدخل البيضة في مرحلة التكوين الجنيني مباشرة ، وهذا إذا كانت مخصبة. بعد بضعة أيام تفقس على شرغوف أو بما يعرف بابي ذنيبة. لهذه اليرقة رأس و جسم بيضويان و ذيل مضغوط رفيع ، و فكوك قرنية تستخدم في حك الطحالب الخضراء العالقة بأجسام في الماء للطعام. الأمعاء طويلة و ملتوية حلزونيا وتغير في تواضعها ويمكن معاينتها وهذا لشفافية غشاء الطن. للشرغوف ثلاثة أزواج من الخياشم الخارجية

على البلعوم و التي تصبح داخلية. بعدة مدة تظهر الأرجل الخلفية و لكن الأرجل الأمامية تكون مختفية تحت غشاء على السطح البطني للجسم . بعد بضعة أسابيع أو شهور يتطور الشرغوف وهذا بوصوله لمرحلة التحول التي يتغير من خلالها إلى حيوان يستطيع العيش على اليابسة. تعتمد مدة التطور والتحول على نوع الضفدع و على درجة الحرارة السائدة في الوسط المعيشي. خلال مرحلة التحول تتكون الرئتان ويبدأ التنفس الهوائي. تظهر الأرجل الأمامية و تمتص الخياشي م و الذيل ، و تقصر الأمعاء ، و عند ذلك يصبح الشرغوف ضفدعا ، و بعد سنة أو أكثر يصير ناضجا جنسيا و يتكاثر. تضع كل أنثى المئات من البيض ، بعضها يفشل في أن يتكون ، و بعضها يؤكل بواسطة الحيوانات المفترسة ، و تستهلك كثير من الشراغف بواسطة الأسماك ، و الثعابين ، و السلاحف المائية ، و الحشرات المائية . و بعض اليرقات تموت بسبب جفاف الماء قبا أن تتطور وعدد قليل فقط ينجو ويصبح ضفدعا بالغا.

هـ ـ الأخطار المسببة لانقراض النوع :

إن الأخطار المسببة لانقراض العلا جم و الضفادع (البرمائيات) متنوعة و عديدة ، منها نسبة الموت المرتفعة في الطرقات، لأنه في الفترات الليلية الضفادع البالغة تخرج من المياه و تنتقل إلى المناطق المجاورة و تمر عبر الطرقات ، فيؤدي ذلك إلى موتها بفعل الشاحنات و السيارات .كما أن التناقص الحاد لوسط معيشتها بسبب الجفاف و الاستعمال المفرط لمياه الأحواض و المستنقعات لأغراض زراعية ، يلعب دورا هاما في تناقص هذا النوع من الحيوانات الذي يحتاج إلى ذلك الوسط لمعيشته. كذلك التلوث الكيميائي و الاحتباس الحراري عاملان أساسيان في انقراض الضفادع، لأنها حيوانات سريعة التأثير و ذات حساسية مفرطة لتغيرات درجة الحرارة و المبيدات الكيميائية التي تمتصها بسهولة من طرف الجسم. حتى عملية التعمير و البناءا ت الغير المدروسة من طرف الإنسان، تساعد بصورة كبيرة في تناقص مساحة عيش البرمائيات عموما و الضفادع خاصة، و منه يعتبر عاملا مهما في سبب تناقص هذه الحيوانات .

2.2. طـريقــه صيد وتربية الحيوانات :

قد تم اختيار أماكن الصيد لشراغيف الضفادع المختارة مياه البرك و المستنقعات المتواجدة بالقرب من المناطق الزراعية. حيث تم صيدها عن بواسطة الشباك اليدوية من مستنقعات وحواف وديان قريبة من مدينة الحجار (شكل 1). هذه العملية تمت خلال الأشهر الأولى من فصل الربيع.

بعد الصيد توضع الشراغيف في حوض به ماء ثم نقوم بحذف و نزع الحيوانات و الحشرات الأخرى و نترك فقط إلا الشراغف ذات النوع المطلوب وهذا من خلال التميز باللون للبشرة الذي يكون فاتحا عند نوع*Bufo viridis* . تأخذ بعد ذلك إلى المخبر ثم نقوم بإحصائها و توزيعها في أحواض، حيث

توضع في كل حوض نفس الشراغف التي تكون في نفس الطول والوزن وكذلك بعض الصفات المرفولوجية الخارجية حسب جدول Nieuwkoop and Faber (1967) .

شكل1 : صورة توضح بعض مراحل التطور للبرمائيات في وسطها الطبيعي.

2.2. المبيـــد المستعمل:

المادة الكيمائية المستعملة متمثلة بالمبيد الحشري ، الذي يعتبر من بين المركبات العضوية الفسفورية والمعروف باسمه التجاري الكلوربيريفس (le chlorpyriphose ou chlorpyrifos) ، والذي يستعمل لمكافحة الحشرات(insecticides) الضارة بالمحاصيل الزراعية، المستعملة والمعروضة للبيع في الجزائر.

أ ـ التركيب والخصائص الكيميائية للمبيد الحشري الكلوربيريفس:

تتمثل صيغته الكيميائية في : C9H11Cl3NO3PS

إن الكلوربيريفس، له دور تثبيطي على إنزيم الأستيل كولين إستيراز ، و الذي يعتبر أنزيم أساسي في عمل الجهاز العصبي و خاصة المشابك العصبية . عند انتقال الرسالة العصبية في مستوى المشابك عن طريق المبلغ العصبي الأستيل كولين ، فإنه يتفكك بسرعة بواسطة إنزيم الأستيل كولين إستراز الموجود طبيعيا في الشق المشبكي. بوجود المبيد الذي ينفذ بسرعة، (حتى لدى الإنسان عند إصابته أو استهلاكه) إلى الجسم فإنه .

ب. تحضيـر الجـرعـات:

قبـل معامـل يرقات الأطوار المختلفـة بالمبيد التجاري chlorpyriphose يتم تحضر التراكيز المختلفة في ماء مقطر وهذا بإضافة كمية التركيز في 100 ملل ماء. ثم يضاف هذا التركيز إلى أحواض التربية بمقدار التركيز نفسه (التركيز/100 ملل ماء) لكل لتر من ماء التربية والمقدرة بخمسة لترات من الماء في كل حوض.

ج- طريقة المعاملة بالمبيد الحشري:

إن الأطوار المستعملة في هذه الدراسة ممثلة ب عدة أطوار من مراحل النمو وهذا حسب جدول تحديد الأطوار لـ Nieukoop & Faber (1967) وهي طور 43، 48، 49 و 50 من الضفادع من نوع *Bufo viridis* والتي تتفاوت بعضها بعمر يقدر بحوالي ثلاثة أيام. تمت معاملة الشراغيف لمختلف هذه الأطوار بتركيزات من المبيد الحشري chlorpyriphos والمتمثلة بـ 0.15 غ/ل، 0.20 غ/ل، 0.30 غ/ل و 0.35 غ/ل لكل مجموعة والممثلة ب 25 شرغوف بكل حوض مع 3 تكرارات لكل تركيز وهذا بوجود مجموعة الشاهد والممثلة كذلك بنفس العدد. كما يتم تغيير ماء التربية كل ثلاثة أيام دائما مع إضافة الطعام والمتمثل في طعام أسماك التربية التجاري. كما يتم أخذ مختلف الملاحظات مع حساب عدد الموت خلال كامل مراحل تطور اليرقات و إلى غاية نهاية عملية التحول.

د- تحديد الأنماط والتشوهات المرفولوجية:

بعد 24 سا من معاملة يرقات الطور المختلفة حديثة العمر تسجيل مختلف الملاحظات الناتجة عن المعاملة و ذلك من اقل تركيز إلى أعلى تركيز .حيت يسجل يوميا الموت الحاصل، وكذلك مختلف التشوهات و الظواهر المرفولوجية المصاحب للموت خلال كامل مراحل التطور.

هـ - تأثير منظم النمو chlorpyriphose على مدة الطور:

في نفس الوقت الذي يتم فيه تحديد الموت ومختلف الأعراض المصاحبة للموت، يتم متابعة تأثير المبيد على مدة الطور اليرقي لكل الأطوارالمعالجة، حيت يسجل عدد اليرقات المتغيرة من طور إلى أخر، مع حساب المدة المستغرقة خلال الطور المعالج إلى غاية الوصول إلى مرحلة التحول. نفس الملاحطات تتم غلي مجموعة الشاهد ليتم مقارنتها مع المجاميع المعاملة.

و- دراسة تأثير المبيد على التكاثر:

تمت هذه الدراسة على بعض مؤشرات التكاثر والممثلة بعدد البيض الموضوع بعد المعاملة ومدى تأثير هذه المادة على مدة و نسبة الفقس. حيث تم الحصول على هذا البيض من خلال تربية حيوانات بالغة في المخبر. قد تم تقسيم البيوض المتحصل عليها من أحواض تربية الضفادع البالغة المعاملة بالمبيد و الغير معاملة. حيث تم وضع البيوض الموضوعة من طرف الضفادع ومعاملتها في أحواض و متابعة عملية الفقس، ثم التطور. بينما تم توزيع البيوض على 4 مجموعات ، كل مجموعة تضم 30 بيضة مع ثلاثة تكرارات و مجموعة الشاهد . المجموعة الأولى تمت معاملتها بالمبيد الكيميائي بتركيز0.20 غ /ل ، الثانية بتركيز 0.25 غ أما المجموعة الثالثة فتمت معاملتها بالمبيد الكيميائي بتركيز 0.35 غ/ل .المجموعة الرابعة لم تعامل بالمبيد الكيميائي ، و تركت كشاهد .

3.2. التحليـل الإحصـائي:

اعـتمدت الدراسة الإحصائية لتحديد سمية المبيد على عدت قوانين والمتمثلة في :

ا- تحـديـد نسب المـوت:

يتم تحديي النسب المئوية للموت الملاحظ ليرقات الشاهد واليرقات المعاملة وفق للعلاقة التالية:

الموت الملاحظة (%) = عدد اليرقات الميتة إثر المعاملة X 100

ا لعدد الكلي لليرقات المعاملة

في حاله ما إذا تعدي الموت في الشاهد 4 ٪ – 20 ٪ يتم تصحيح نسب الموت حسب (1925) Abbott :

علاقة Abbott(%) = نسب موت اليرقات المعاملة – نسب موت يرقات الشاهد 100X

100 – نسب موت يرقات الشاهد

ب- تحليل التباين:

بعد تحويل الزاوي لنسب الموت الملاحظة نقوم بتحليل التباين ذو معامل واحد وفقا لطريقة Dagnelie (1975) وهذا حسب الجدول تحليل التباين ذو معامل واحد لسمية المبيد الحشري chlorpyriphose على يرقات الأطوار الختلفة المعاملة من *Bufo viridis* .

مصدر التباين	درجة الحرية	SCE	CM	Fالمحسوبة
الاختلاف بين المجموع	I-1	$SCA = \sum ni(X - X..)^2$	$MCa = \frac{SCE}{I-1}$	$\frac{MCa}{MCr}$
الاختلاف داخل المجموع	N-I	$SCr = \sum\sum (Xij - Xi)^2$	$MCr = \frac{SCE}{N-I}$	
	N-1	$SCt = \sum\sum (Xij - X..)^2$		

SCE :مجموع مربع الإنحرافات

MC :معدل مربع الإنحرافات

Mca : معدل المربعات بين المجموع

MCr : معدل المربعات داخل المجموع

Sca :مجموع المربعات بين المجموعات

SCr : مجموع المربعات داخل المجموعات

SCt :المجموع

I : عدد التركيز

N : التكرار

في حاله رفض فرضيه تساوي المتوسطات يتم ترتيب تركيز حسب طريقه Dunnet

$$/Xt\text{-}Xi/ \geq D1-\alpha/2\sqrt{2CMr/n}$$

Xt=المتوسط ت الحسابي لشاهد

Xi= المتوسط الحسابي للجرعة

CMr = متوسط المربع داخل المجموعة

N = عدد التكرارات

D1-α= القيمة الجدولية

α =0.05

ج- تحـديـد البـر وبيـت :

يـسمح تـحـليل البروبيت بتـحديـد الجـرعـة الـمثبطة للانـسلاخ LC50 ، و دلك بتحـويل الـنسب المئويـة إلى وحـدات البـر وبيت حـسـب جـدول تحويـل خاص (Fisher &Yates,1957). لنحصل عـلى منـحي قـيم وحـدات البر وبيت بـدلالــه لـلـوغاريتم العشري للجرعة ، ومـن خـلال المنحنى يتم تحديد LC50 بيـانيا حسب طـريقـه (Swaroop, 1966). تقرأ LC50 من المنحني بإسقاط خـط أفـقي مـن نسبه الموت المقدرة بـ 50 ٪ عـلى المحور العمـودي المقابل لخط الارتـداد وفـي نقطـه التقاطع بـرسم خـط عمودي في الأسفل يقطع المحور الأفقي وتبعا لهده المقياس يمكـن قـراءة الـتركيز الـذي يـقتل 50 ٪ مـن الحشرات المعاملة.

د- معــادلـة خـط الارتــداد :

تم حسـاب معـادلة خط الإرتـداذ مـن خـلال وحـدات البروبيت واللوغاريتم العشري للجرعة X بحيث تكون علي شكل معادلة خط مستقيم Y= bX + a

Y: واحدات البروبيت

X: اللوغاريتم العشري للجرعة

a : الميل

ولحساب الميل يتم استعمال العلاقة

$$b=\frac{\sum\left(X-\overline{X}\right)\left(y-\overline{y}\right)}{\sum\left(X-\overline{X}\right)^2}$$

حيث أن x وy معدل متغير $a=\overline{y}-b\,\overline{X}$

هـ - اختيـار مـربع كـآي :

لا تعتمد في الحكم على صلاحية تطابق خط الارتداد والنتائج بالمشاهدة بل يتم اختبارها إحصائيا بواسطة قيمه χ^2 المحسوبة ودلك من خلال حساب الفروق بين معدلات الموت المصححة والمتوقعة من المنحنى

$$\chi^2 = \frac{(Exp(\%) - Obs(\%))}{(Exp(\%) - 100) \times Exp(\%)}.$$

Obs: الموت الملاحظة *Exp* : الموت المتوقع

يتم تجميع القيم لكل التركيز المستعملة ويضرب الناتج في معدل عدد الحشرات المعاملة لكل تركيز ونقارن القيمة المحصل عليها χ^2المحسوبة مع χ^2 الجذولية عند درجه حرية (n-2) حيت أن المنحني في وضعه الصحيح إذا كانت

χ^2 الجذولية > χ^2المحسوبة

و- تحـديـد مجـال الثقـة:

يتم تحديد مجال الثقة التي تنحصر بينها قيمه LC50 تحت احتمال 90% تبعا لطريقه الخاصة بـ Lithchfield & Wilcoxon, (1949) فتحسب معادلة الميل (S) والمعامل FLC50 بحيث يكون جداء قيمه FLC50 وقيمه LC50 هو الحد الأعلى،وحاصل القسمة هو الحد الأدنى ويمكن إيضاح ذلك من خلال المراحل التالية:

- تحديد قيمه LC50 و LC90 وLC16 من خلال المنحني
- تحديد عدد البعوض في كل تركيز ما بين 16% 84 % ونرمز لهدا العدد بـ N

بعدها بتم حساب علاقة الميل (S).

$$S = \frac{LC84/LC50 + LC50/LC\ 16}{2}$$

و نحصل على FLC50 من خلال:

$$FLC50 = S^{2,77\sqrt{N}}$$

$$A = 2,77\sqrt{N}$$

$$LogS = B$$

$$C = B \times A$$

$$Ant\text{-}LogC = FLC50$$

حـد الثقة الأعلى=FLC50 x LC50

حـد الثقة الأدنى =FLC50 /LC50

ي- مقـارنة المتـوسطـات الحسـابية:

يتم التحليل الإحصائي لمختلف النتائج المحصل عليها من خلال المعايرة الهرمونية و قياسات سمك الجليد اليرقي ، عن طريق مقارنة المتوسط الحسابي ليرقات الشاهد مع المتوسط الحسابي لليرقات المعاملة ، حسب طريقة student "t "

$$t_{obs} = \frac{\left|m_1 - m_2\right|}{\sqrt{S^2\left(\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}}$$

m_1 : المتوسط الحسابي الأول

m_2 : المتوسط الحسابي الثاني

يحسب من العلاقة:

$$S^2 = \frac{n_1 S_1^2 - n_1 S_2^2}{n_1 + n_{2-} 2}$$

ترفض الفرضية عندما تكون :

$$t_{th} \leq t_{obs}$$

3. النتـائـج:

تم معـاملـة شراغيف أحد الرمائيات *Bufo viridis* بتـراكيـز مختلفـة مـن المبيد الحشري chlorpyriphose (0.15، 0.20، 0.30، 0.35 غ/ل) لأطوار مختلفة والمتمثلة بالطور 43 الطور 48، الطور 49 والطور 50. حيث تتميز هذه الأطوار عن بعضها على مستوى العمر أساسا والتي تفرقها ثلاثة أيام بين كل طور وطور. كما حـددت سميـة المبيد الحشري على يرقات أطوار الضفادع المختلفة من خلال متابعة الموت الحاصل أثناء الطور المعالج ، أو ما يعرف **بالتـأثير المبـاشر** ، تم دراسة سمية المبيد خلال الأطوار الموالية أو ما يعرف **بالتـأثير الكـلي.**

1.3. سميـة المبيد الحشري chlorpyriphose عـلى شراغيف الطـور 43 :

أ. التأثيـر المبـاشـر:

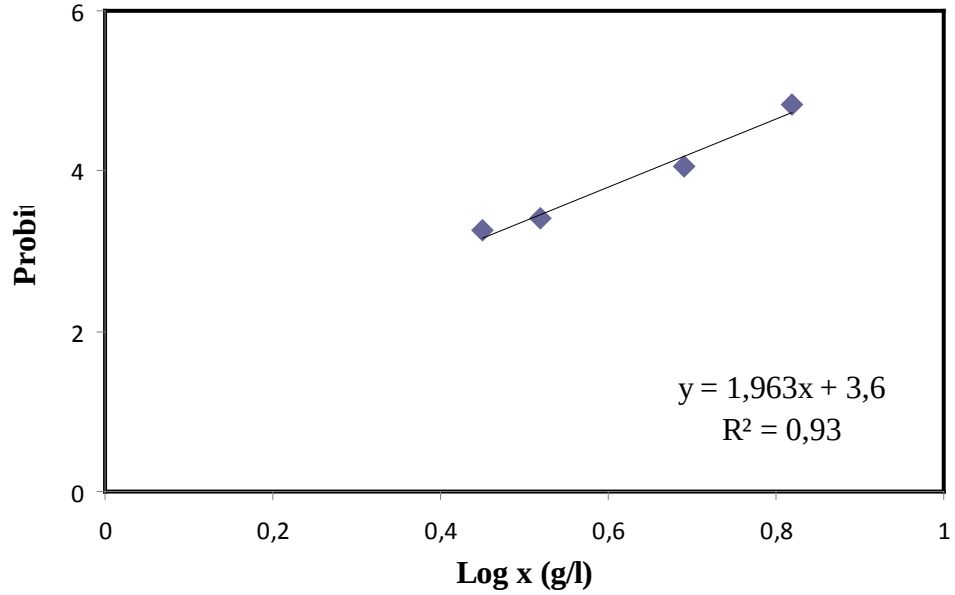
بعد معاملة اليرقات بالتراكيز المختلفة بعد 24 ساعة بدأ تسجيل الموت يوميا، خلال طول مدة عمر الطور اليرقي، حيث لوحظ حدوث موت بنسب متفاوتة في مختلـف التراكيز . الجـدول(1) يوضح نسب الموت المصححة حسب عـلاقة Abbott أين كانت نسب الموت عند الشاهد لم تتعدى 4 %. حيث نلاحظ نسب الموت تتراوح مـا بين 4.16 % عند أقل تركيز ، وتزداد هذه النسبة بزيادة التركيز إلى أن وصلت إلى 43.55 % عند أكبر تركيز. بعد التحويل الزاوي لقيم الموت المصححة، تم تحليل التباين ذو معامل واحد، **(جدول2)**، فوجد أن هناك فروق جد معنوية تحت احتمـال 0.0001 $p<$ $F_{obs}=35.10$ بعد تحويل القيم المصححة إلى وحدات البر وبيت ، و التراكيز إلى اللوغاريتم العشري ، وجدا أن هنـاك ارتبـاط معنوي مـا بين اللـوغاريتم العشري للجرعة و واحدات البروبيت حيث تم رسم منحنى الارتداد**(شكل 2)** تبين أن المنحني في وضعـــه الصحيح و منه تـم تحـديد الجـرعـة المميتـة LC50 التي قـدرت بـ 0.45 غ / ل عند مجـال ثـقـة (0.35 ± 0.49) غ/ل و الجـرعـة الميتـ ة LC90 و التـي تسـاوي 0.93 غ/ ل عند مجـال ثقـــة (0.85 ± 0.97) غ/ل.

جـــــدول 1: نسب الـموت (%) المصححـة ليـرقـات الـطـور 43 *لضفدع Bufo viridis* المـعاملـة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **الـــتأثيـر المباشر " (n=75) .**

التركيز (غ/ل) / التكـــــرار	0.15	0.20	0.30	0.35
1	4,16	4,16	16,16	40
2	4,16	4,33	16,16	45,33
3	4,16	8,33	20,80	45.3383,
s±m	**4 ,16 ± 0 ,0**	**5,60± 2,36**	**17,70 ± 2,67**	**43,55±3,07**

جـــــدول 2: تحليل التباين لنسب الموت (%) المصححـة ليرقـات الـطـور 43 *لضفدع Bufo viridis* المـعاملــة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **الــتأثير المباشر ".**

مصدر التباين	Ddl	ECS	MC	sboF	P
داخل المجموعة a	3	3133,1	1044,4	35,10	**0,000**
خارج المجموعة r	8	238,0	29,8		
المجموع T	11	3371,1			



شكل2: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 43 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الــتأثير المباشر".

ب.التــأثيــر الـكــلــي:

إضافـة إلـى الـموت المباشر الناجم عن المعاملة بالمبيد الحشري chorpyriphose لوحظ أن له ذا الأخير تأثير على الأطوار المـوالية بنسـب موت متفاوتة حسب التراكيز. حيت سجل ارتفاع في نسب

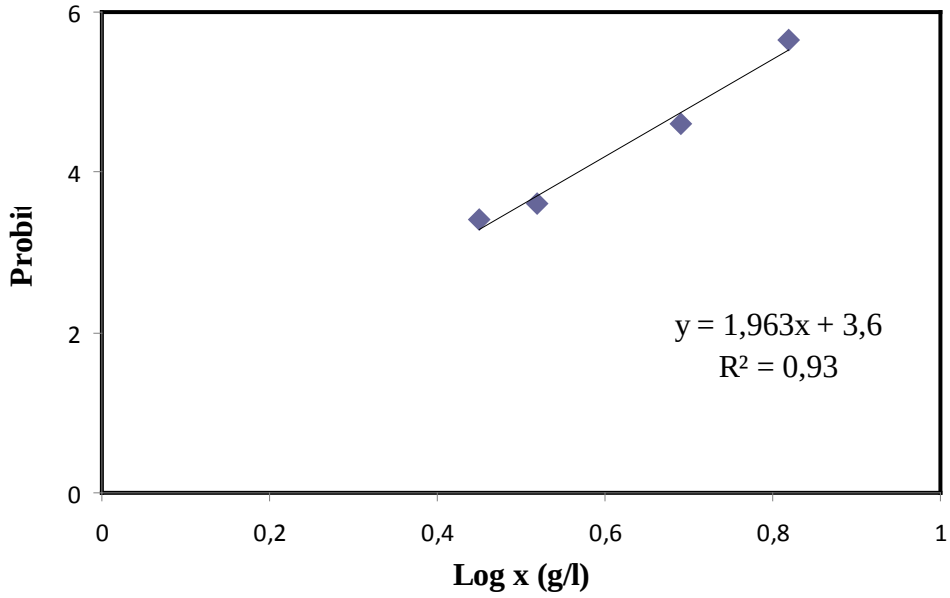
الموت 5.60 % عند التركيز 0.15 غ/ ل إلى 74.44 % عند التركيز 0.53 غ/ل (جدول3). كما اظهر التحليل التباين ذو معامل واحد وهذا بعد التحويل الزاوي لنسب الموت المصححة وجود فروق معنوية جدا عند احتمال $p < 0.0001$ و $F_{obs} = 27.07$ (جدول 4). حيث نلاحظ أن نسب الموت ترتفع بارتفاع التراكيز المستعملة . ف بعد حساب معادلة خط الارتداد ومعامل الارتباط الذي قدر بـ 0.93 بأن هناك ارتباط معنوي ما بين اللوغاريتم العشري للجرعات و وحدات البر وبيت تم رسم المنحني **(شكل 3)** و حساب قيمة مربع كاي وجد أن المنحني في وضعه الصحيح ومنه تم تحديد LC50 التي قدرت بـ 0.32 مكغ/ ل عند مجال ثقة (0.28 ± 0.35) مكغ / ل كما قدرت LC 90 ب 0.52 غ / ل عند مجال ثقة (0.49 ± 0.54) غ / ل.

جـــدول 3: : نسب الموت (%) المصححة ليرقات الطور 43 *لضفدع Bufo viridis* المعاملة بتراكيز مختلفة من مبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي "**

التركيز (غ/ل) / التكـــرار	0.15	0.20	0.30	0.35
1	6,33	8.50	33,33	73,33
2	6.33	8,33	33.33	75
3	4,16	8.50	37,50	75
s±m	5,60 ±1,25	8,44± 0,09	34,72 ± 2,40	74,44± 0,96

جـــدول 4: تحليل التباين نسب الموت المصححة ليرقات الطور 43 *لضفدع Bufo viridis* المعاملة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"التأثير الكلي ".**

مصدر التباين	Ddl	ECS	MC	sboF	P
داخل المجموعة a	3	5835,659	1945,22	2707,302	0,000
خارج المجموعة r	8	5,748	0,719		
المجموع T	11	5841,407			



شكل3: وحدات البروبي ت باللوغاريت م العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 43 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـتأثيـر الكلي".

3. 2. سميـة المبيد الحشري chlorpyriphose عـلى شراغيف الطـور 48 :

أ. التأثيـر المبـاشــر:

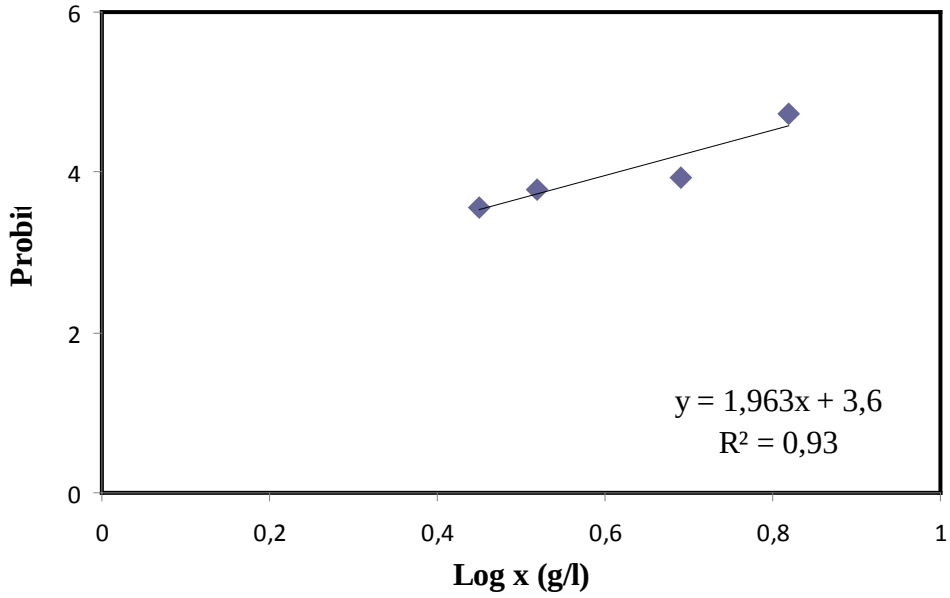
بدأ تسجيل الموت كذلك بالنسبة ليرقات الطور 48 ابتداء من اليوم الثاني. حيث سجل حدوث موت بنسب متفاوتة لمختلـف التراكيز . مـن خـلال **الجـدول5** نسجل أن نسب المـوت الم صححة كانت 7.57 % عند التركيز 0.15 غ/ل ;وتزداد هذه ا النسبة بزيـادة التركـيز حيث بلغت 39.58 % عنـد التـركيـز 0.35 غ/ل. بعد التحويل الزاوي لقيم الموت الم صححة والقيام بتحليل التباين ذو معامـل واحد، وجد كذلك أن هناك فروق جـد معنوية تحت احتمـال p< 0, 001 و F*obs* = 12.48 **(جـدول 6)**. بعـد تحويل القيم المصححة إلى واحدات البر وبيت، و الثراكيز إلى اللوغاريتم العشري، وجدا أن هنـاك ارتبـاط معنوي مـا بين اللـوغاريتم العشري للجرعة و واحدات البروبيت عند معـامل ارتبـاط يساوي 0.93 ، تم رسم منحنى الارتداد (**شكل 4**) و منه تـم تحـديد الـجـرعـة الـمـيتـ ة LC50 التي قـدرت بـ 0.57 غ / ل عند مجـال ثـقـة (0.52 ± 45,45) مكغ/ل و الجـرعـة الميتـة LC90 و التـي تسـاوي 50,11 مكغ/ ل عنـد مجـال ثقـة (48,70 ± 0.55) غ/ل.

جـــــدول 5 : نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 48*لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر " (n=75).**

التركيز (غ/ل) التكـــــرار	0.15	0.20	0.30	0.35
1	6,25	10,41	14.58	43,75
2	8.14	10.41	14,58	37,50
3	8,33	13,54	14,58	37.50
s±m	**7,57± 1,14**	**11,45 ± 1,8**	**14,58 ± 0,0**	**39,58± 3,60**

جـــــدول 6: تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 48*لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر" (n=75).**

مصدر التباين	ddl	ECS	MC	sboF	P
داخل المجموعة a	3	1121,2	373,7	12,48	0,002
خارج المجموعة r	8	239,6	29,9		
المجموع T	11	1360,7			



شكل4: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 48 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثيـر المباشر".

ب- لتـــأثيـــر الـكـــلـي:

إضافـة إلـى الـموت المباشر الناجم عن المعاملة بـــالمبيد الحشري، لوحظ أن له ذا الأخير تأثير على الأطوار المـوالية، حتى وصولها لعملية التحول، بنسـب موت تختلف باختلاف التراكيز. حيت سجل ارتفاع معتبر في نسب الموت مقارنة مع نسب الموت المسجلة خلال مرحلة الطور. حيث ارتفعت نسبة الموت المصححة عند أقل تركيز والمقدرة ب 25.83 % إلى 85.88 %عند أكبر تركيز والمقدر ب 0.35 غ/ل. **(**جدول 7). كما اظهر التحليل ا لتباين ذو معامل واحد وجود فروق معنوية جدا عند احتمال $p < 0,0001$ و $Fobs = 432.68$ **(**جدول 8) .

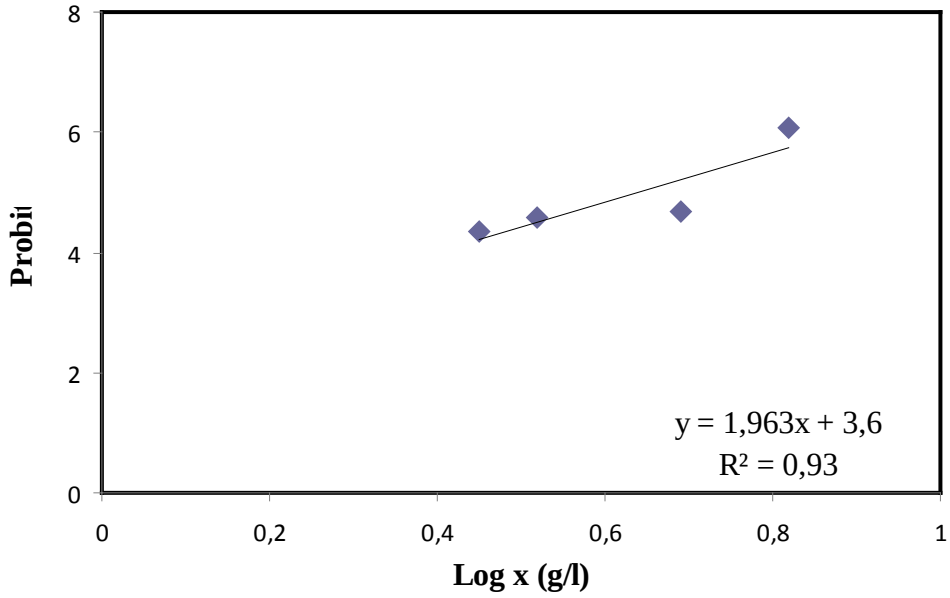
كذلك وبنفس الطريقة تم رسم منحنى الارتداد **(شكل 5)** و حسـاب قيمة مربع كاي وجد أن المنحني في وضعه الصحيح ، ومنـــه تـم تحـد يي LC50 التي قـدرت بـ 0.25 غ/ ل عنـد مجال ثقـة (0.23 ± 0.28) غ/ل LC 90 = 0.55 غ / ل عند مجال ثقة (0.49 ± 0.51) غ / ل. .

جـــــدول 7: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 48*لضفدع* *Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي" (n=75).**

التركيز (غ/ل) **التكـــــرار**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**
1	30.0	35.41	37.46	66.42
2	30.0	36.27	37.46	66.42
3	31.31	33.21	38.65	69.73
s±m	**25,83 ±1,44**	**33,66 ± 3,03**	**38,22 ± 1,24**	**85,88 ± 2,31**

جـــــدول 8: تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 48 *لضفدع* *Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي"(n=75)** .

مصدر التباين	**ddl**	ECS	**MC**	**sboF**	**P**
داخل المجموعة a	3	2536,59	845,53	432,65	**0,000**
خارج المجموعة r	8	15,63	1,95		
المجموع T	11	2552,22			



شكل5: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 48 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـتأثير الالكلي".

3.3. سمية المبيد لبحشري chlorpyriphose على شراغيف الطور 49 :

أ. التأثير المباشر:

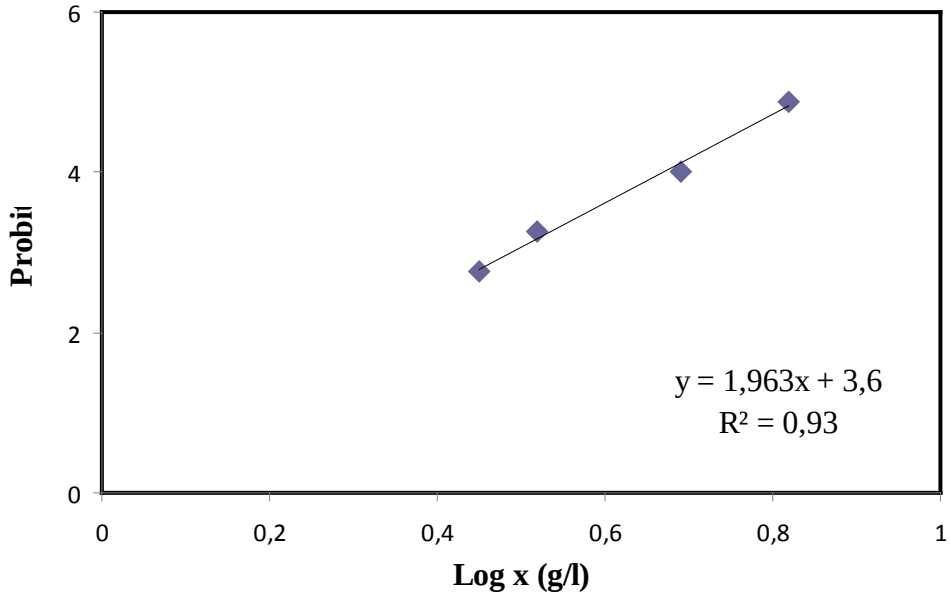
بدأ تسجيل الموت كذلك بالنسبة ليرقات الطور 49 ابتداء من اليوم الثاني. حيث سجل حدوث موت بنسب متفاوتة لمختلف التراكيز . من خلال **الجدول9** نسجل أن نسب موت م صححة ضعيفة تساوي 1.38 % عند التركيز 0.15 غ/ل ;وتزداد هذه ا النسبة بزيادة التركيز حيث بلغت 44.99 % عند التركيز 0.35 غ/ل. بعد التحويل الزاوي لقيم الموت الم صححة والقيام بتحليل التباين ذو معامل واحد، وجد كذلك أن هناك فروق جد معنوية تحت احتمال $p< 0, 001$ و $F_{obs} = 108.82$ **(جدول 10)**. بعد تحويل القيم المصححة إلى واحدات البر وبيت ، و التراكيز إلى اللوغاريتم العشري ، وجدا أن هناك ارتباط معنوي ما بين اللوغاريتم العشري للجرعة و واحدات البر وبيت عند معامل ارتباط يساوي 0.939 ، تم رسم منحنى الارتداد (**شكل 6**) و منه تم تحديد الجرعة المميتة LC50 التي قدرت بـ 0.41 غ / ل عند مجال ثقة (0.38 ± 0.45) غ/ل و الجرعة الميتة LC90 و التي تساوي 0.71 غ/ ل عند مجال ثقة (0.67 ± 0.74) غ/ل.

جـــــدول 9: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 49 *لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر "**

التركيز (غ/ل) التكـــرار	0.15	0.20	0.30	0.35
1	4,16	4,16	16,66	43,33
2	00	4,16	16.66	48,33
3	0	4,16	16,66	43,33
s±m	**1,38 ±2,40**	**4,16 ± 0,0**	**16,66 ± 0,0**	**44,99 ±2,88**

جـــــدول 10: تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 49 *لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر".**

مصدر التباين	ddl	ECS	MC	sboF	P
داخل المجموعة a	3	3724,776	1241,592	108,82	0,000
خارج المجموعة r	8	5,491	0,686		
المجموع T	11	3730,267			



شكل6: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 49 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـتأثير المباشر".

ب- التـأثيـر الكـلـي:

إضافة إلى الموت المباشر الناجم عن المعاملة بالمبيد لوحظ أن له ذا الأخير تأثير على الأطوار الموالية بنسب موت متفاوتة حسب التراكيز . يظهر التأثير الحقيقي لمنظم النمو عند تصحيح هـ ذه القيم حيت سجلت نسب الموت الملاحظة ما بين 13.88% عند التركيز 0.15 غ/ ل إلى 68.5 % عند التركيز 0.35 غ/ل (جدول11). كما اظهر التحليل ا لتباين ذو معامل واحد وهذا بعد التحويل الزاوي لقيم الموت الملاحظـة (جدول 12) وجود فروق معنوية جدا عند احتمال $p > 0,001$ و $F_{obs}=57.36$ (جدول 12).

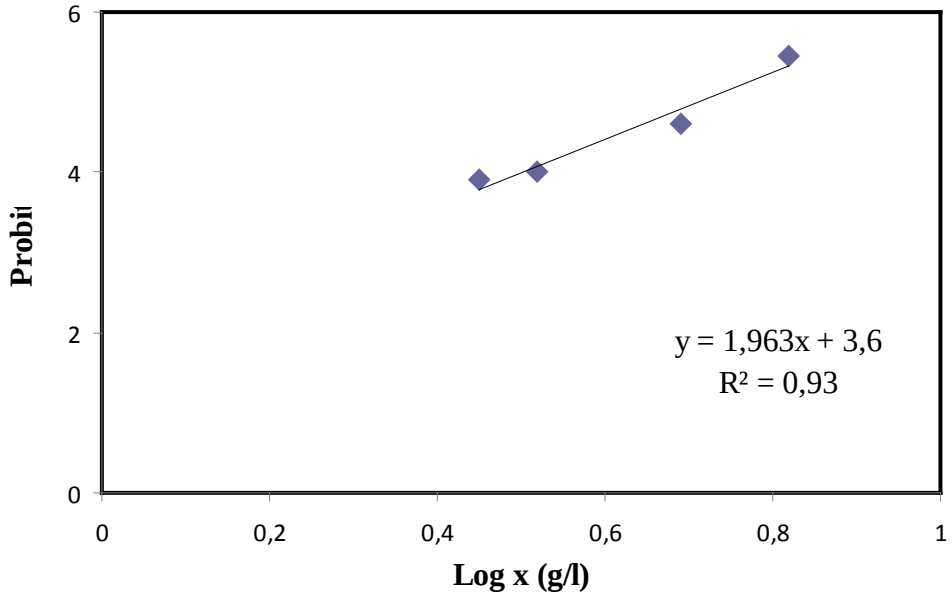
الشكل 6 يبين ترتيب مختلف التراكيز المستعملة وفقا لدرجة تأثيرها و ذلك حسب طريقة Dunnet. بعد حساب معادلة خط الارتداد ومعامل الارتباط الذي قدر بـ 0.93 تبين أن هناك ارتباط معنوي ما بين اللوغاريتم العشري للجرعات و واحدات البر وبيت (شكل 7). بعد رسم المنحني (شكل 6) وحساب قيمة مربع كاي وجد أن المنحني في وضعه الصحيح، منه تم تحديد LC50 التي قدرت بـ 0.32 غ/ ل عند مجال ثقة (028 ± 0.36) غ/ل أما قيمة LC90 , فقدرت 0.68 غ / ل عند مجال ثقة (0.64± 0.73) غ/ل .

جـــدول 11: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 49 *لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي "**

***التركيز* (غ/ل) التكـــــرار**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**
1	8,33	16,33	33,33	70,83
2	25	16,66	37,50	66,66
3	8,33	16.33	33.33	66.66
s±m	**13,88 ±9,62**	**16,44 ± 0,19**	**34,72± 2,40**	**68,05 ±2,40**

جـــدول 12: تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 49 *لضفدع Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي".**

مصدر التباين	**ddl**	ECS	**MC**	**oFbs**	**P**
داخل المجموعة a	3	2089,1	696,4	57.36	0,000
خارج المجموعة r	8	97,1	12,1		
المجموع T	11	2186,2			



شكل7: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 49 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير الكلي".

3.3. سميـة المبيد الحشري chlorpyriphose عـلى شراغيف الطـور 50 :

أ- التــأثير المبــاشــر:

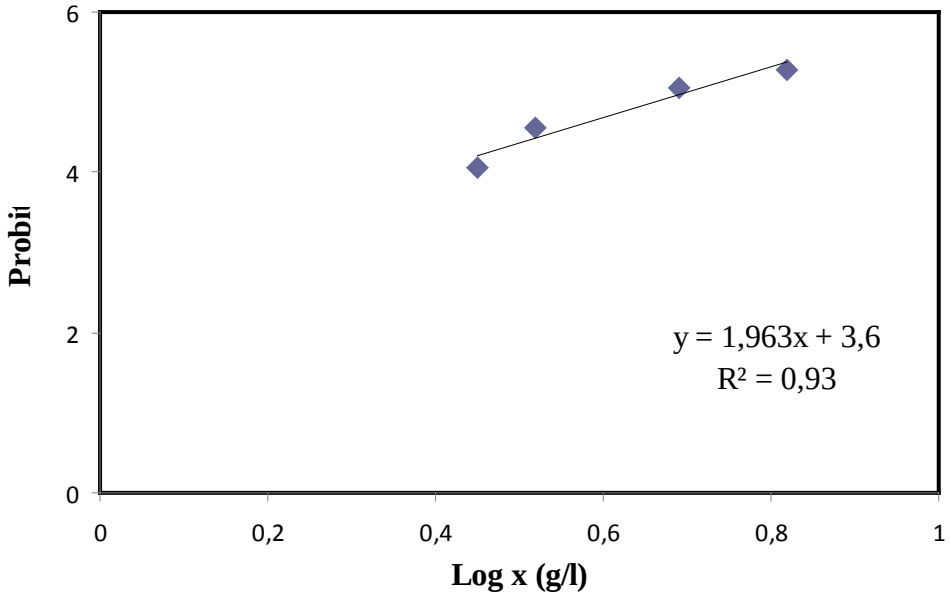
الجدول 13 يوضح نسب الموت الم صححة للطور اليرقي 50 والملاحظة خلال مدة الطور. حيث كان عدد الموت بالنسبة للشاهد ضعيف جدا، وهذا نستطيع القول بأن الموت الحاصل عند اليرقات ناتج من أثر المعاملة ب بمبيد chlorpyriphose. فعند أصغر تركيز (0.15 غ/ل) نلاحظ أن نسبة الموت كانت ضعيفة ، مقارنة مع الأطوار السابقة ، بعد تصحيح الموت الملاحظ حسب علاقة Abbott، تم تحديد التأثير الحقيقي للمبيد حيت قدرت نسب الموت المصححة عند أقل تركيـز ب 16%. كما سجل ارتفاع محسوس في نسب الموت بارتفاع التركيز إل ى 61.66 % عند أكبر تركيز 0.35 غ/ل. التحويل الزاوي لقيم الموت الملاحظة (جدول14)، وتحليل التبـاين أتبت وجود فروق معنوية جدا عند احتمال p= 0.000 و F_{obs}=248.97 (جدول14) . قيمة معامل الارتباط قدرت بـ 0.93 ، مما تدل على وجود ارتباط معنوي ما بين اللوغاريتم العشـري للتركيز و وحدات البر وبيت. بعد رسم المنحني (شكل 8) و حسب علاقة كاي تبين أن المنحنى في وضعه الصحيح ، و من خلال المنحني تم تحديد LC50 التي قدرت بـ 0.28 غ / ل عند مجال ثقة (0.17 ± 0.31) غ/ ل و LC90 بـ 0.68 غ/ ل عند مجال ثقة (0.61 ± 0.72) غ/ ل.

جـــدول 13: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 50 لضفدع *Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر".**

التركيز (غ/ل) **التكـــرار**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**
1	16	33,33	50	62.50
2	16	33,33	58,33	62,50
3	16	33.33	50	60
s±m	**16 ±0,0**	**33,33 ± 0,0**	**52,77 ± 4,80**	**61,66 ±1,44**

جـــدول 14: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 50 لضفدع *Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر المباشر".**

مصدر التباين	**ddl**	ECS	**MC**	**sboF**	**P**
داخل المجموعة a	3	1402,27	467,42	248,97	0,000
خارج المجموعة r	8	15,02	1,88		
المجموع T	11	1417,29			



شكل8: وحدات البروبيت باللوغاريت م العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chloropyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 50 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـتأثير المباشر".

ب- التـأثيـر الكـلـي :

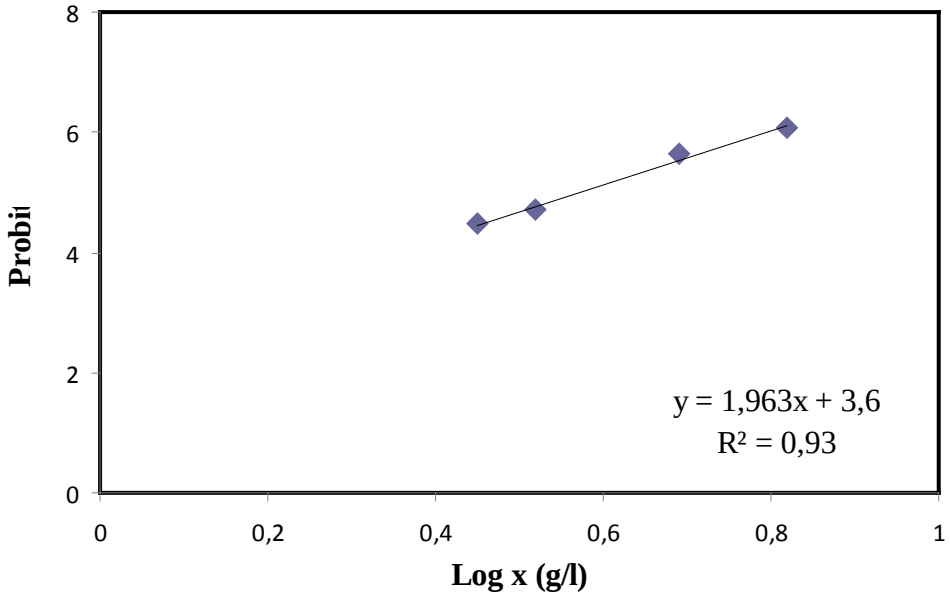
بعد تصحيح القيم الملاحظة لنسب الموت حسب علاقة Abbott المقدرة بالجدول (15) تبين أن نسب الموت المصححة تراوحت ما بين 30.55 % عند التركيز 0.15 غ/ ل إلى 85.83% عند التركيز 0.35 غ/ل. بعد التحويل الزاوي لقيم الموت الملاحظ (جدول 16) وتحليل التباين ذو معامل واحد تبين وجود فروق معنوية جدا عند احتمال $p< 0,001$ و قدرت $F_{obs} = 114.07$ (جدول 16). بعدها تم ترتيب التركيز حسب درجة فعاليتها وفقا لطريقة Dunnet .كما لوحظ وجود ارتباط معنوي ما بين اللوغاريتم العشري للجرعة وواحدات البروبيث عند معامل ارتباط قدر بـ 0.93، وتبث أن المنحنى في وضعه الصحيح (شكل 9) من خلاله قدرت لهدا الطور LC50 بـ 0.21غ/ ل عند مجال ثقة (0.17 .25±) غ/ل و LC 90 بـ 0.41 غ/ل عند مجال ثقة (0.39 ± 0.44) غ/ل.

جـــدول 15: نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 50 لضفدع *Bufo viridis* المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي".**

التركيز (غ/ل) التكـــــرار	0.15	0.20	0.30	0.35
1	33,33	41,66	70,83	91,66
2	29,16	37,50	75	85,83
3	29.16	37.50	75	80
s±m	**30,55 ±2,40**	**38,88 ± 2,40**	**73,61 ±2,40**	**85,83 ±5,83**

جـــدول 16: تحليل التباين نسب الـموت (%) المصححــة ليـرقــات الــطــور 50 لضفدع *Bufo viridis*المــعاملــة بمبيد حشري Chlorpyriphose **"الــتأثيـر الكلي".**

مصدر التباين	ddl	ECS	MC	sboF	P
داخل المجموعة a	3	2420,24	806,75	114,07	00,00
خارج المجموعة r	8	56,58	7,07		
المجموع T	11	2476,81			



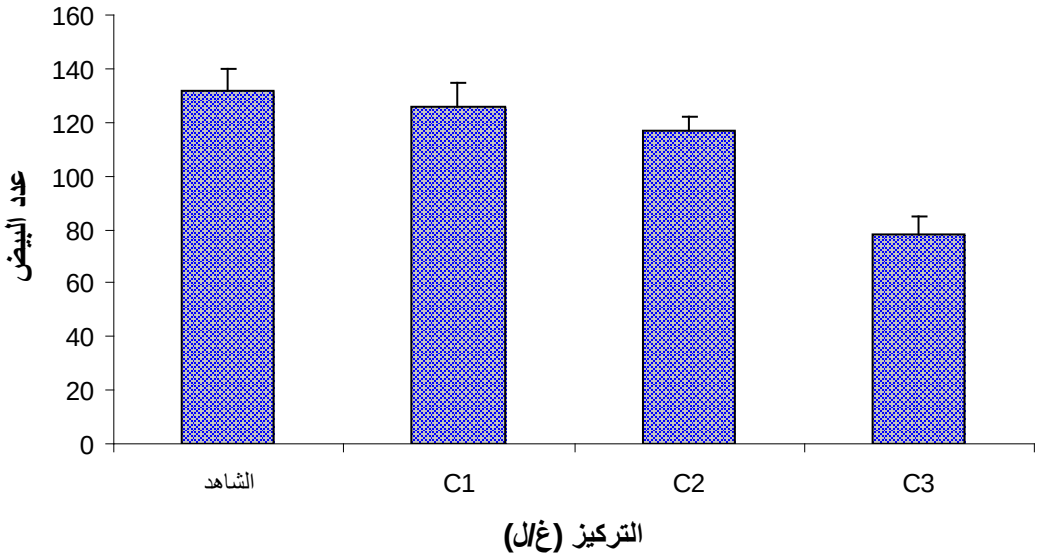
شكل9: وحدات البروبيت بالوغاريتم العشري للتراكيز المستعملة من المبيد الحشري Chlorpyriphose ومدى فعالياتها علي يرقات الطور 50 من نوع الضفادع *Bufo viridis* "الـــتأثير الكلي".

2.3. الأنمــاط والتشــوهـات المــرفــولـوجيــة الناجمة عن المعاملة بالمبيد:

أدت المعاملة المباشرة لشراغيف الأطوار المختلفة بالمبيد الحشري إلى ضعف في الجسم وتأخر في عملية النمو والمتمثلة بظهور الأطراف الخلفية والتي كانت مصحوبة بـحـدوث مـوت اليرقـات نتيجة إضطراب حاصل في عملية النمو ،ويتجلى هذا الاضطراب في بـروز حـالات مـوت.

3.3. **تأثير المبيد الحشري** Chlorpyriphose **على عدد البيوض الموضوعة:**

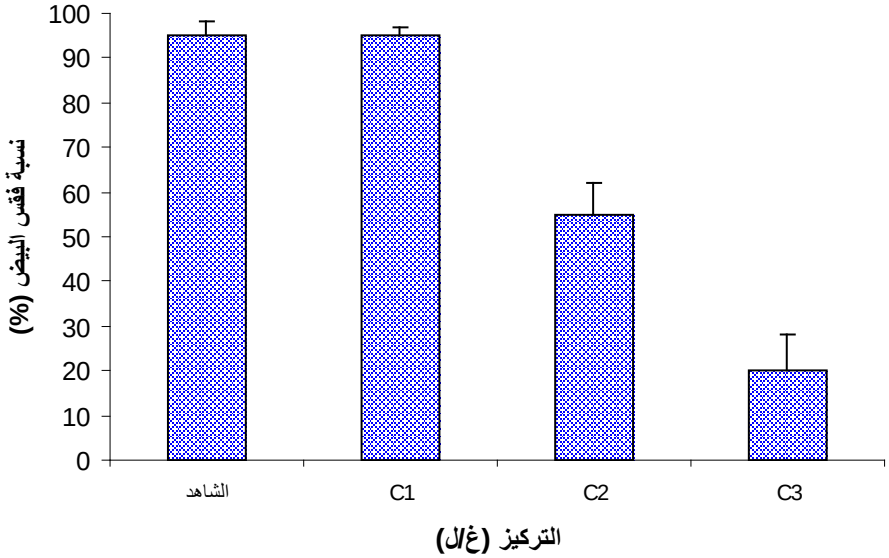
عند معاملة الضفادع البالغة بالمبيد الحشري Chlorpyriphose و متابعة قدرتها على وضع البيض خلال الأسبوعين (15 يوم) التابعة للمعاملة والممثلة في الشكل 10، لوحظ بأن الضفادع المعاملة بالتركيز الضعيف (0.20 غ/ل) كان عدد البيوض يفوق 120 بيضة ، والتي لم نسجل أي فرق معنوي مقارنة بالشاهد. حيث سجل أنخفاض معنوي عند المعاملة بالتراكيز المرتفعة (0,30 غ/ل و 0,35 غ/ل) وخاصة عند الجرعة الكبيرة والتي كان فيها عدد البيوض بحوالي 80 بيضة في المتوسط والتي تمثل تقريبا ثلثي عدد الشاهد فقظ. إن المجموعات المعاملة بتركيز 0.30 غ/ل و 0.35 غ/ل سجل بها وضع البيوض بعد مرور أسبوع من المعاملة بعكس الشاهد الذي كانت بداية وضع البيض خلال اليوم الثالث من المعاملة.



شكل **10 : تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على عدد البيوض الموضوعة خلال أسبوع بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل ة C3 = 0,35 غ/ل) لحيوانات بالغة من الضفادع *Bufo viridis* .

4.3. **تأثير المبيد الحشري** Chlorpyriphose **على نسبة فقس البيض:**

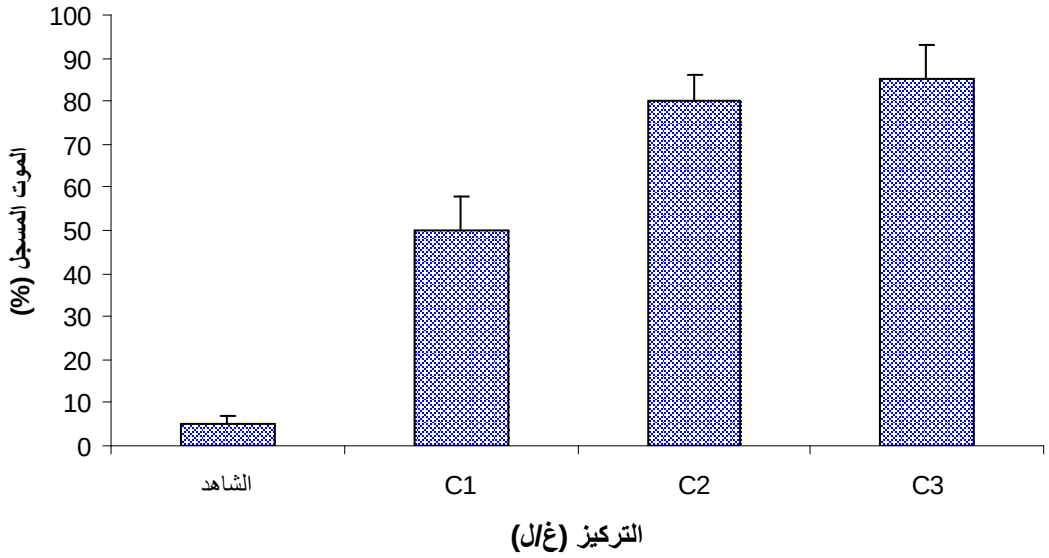
يمثل الشكل 11 تأثير المبيد الكيميائي المستعمل على نسبة فقس البيوض المعاملة بعد وضعها من ضفادع غير معاملة. بعد معاملة الوسط الذي تم فيه وضع البيض بالمبيد بتراكيز مختلفة تم ملاحظة الفقس بعد 24 ساعة من الوضع وهذا عند الشاهد وكذلك المجموعات المعاملة. حيث بلغت نسبة الفقس عند الشاهد 95% وكانت نفس النسبة مسجلة عند التركيز الضعيف. أما عند التراكيز العالية فأنخفضت هذه النسبة بصفة معنوية جدا, حيث بلغت 55 % عند التركيز 0.30 غ/ل ولم تتعدى هذه النسبة 20 % عند التركيز العالي (0.35 غ/ل).



شكل **11 : تأثير المبيد** الحشري Chloropyriphose على نسبة فقس البيوض الموضوعة خلال أسبوع بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل ة C3 = 0,35 غ/ل) لحيوانات بالغة من الضفادع */Bufo viridis*

5.3. **تأثير المبيد الحشري** Chlorpyriphose **على نسبة الموت المسجلة بعد عملية الفقس:**

بعد عملية الفقس تمت متابعة تسجيل الموت الناجم إثر معاملة البيض, كانت نسب الموت متفاوتة بأرتفاع التركيز. فمن خلال الشكل 12 يتضح أن أكبر نسبة للموت مسجلة عند أكبر التركيزين (0,30 غ/ل و 0,35 غ/ل) أين فاقت 80 %. حيث أن الفرق مقارنة بالشاهد كان جد معنويا.



شكل **12 : تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على نسبة الموت المسجلة خلال أسبوعين من الفقس بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis* .

6.3. تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose **على سرعة النمو للشراغيف الطور 43 :**

إن تأثير المبيد الكيميائي المستعمل على سرعة النمو للشراغيف المعاملة بتراكيز مختلفة موضح في الجدول 17 . حيث يسجل من النتائج المدونة أن الأنتقال مجموعة الشاهد من الطور 43 إلى الطور44 تم خلال تم بعد يومين. كما نوضح أن الطور 44 , 45 و 46 يستغرق بضعة ساعات فقط. ومن نفس الجدول نلاحظ كذلك أن الأنتقال إلى الطور 47 تم خلال 4 أيام. أما الأنتقال إلى الأطوار الموالية حتى الطور 50 أستغرق 3 أيام لكل مرحلة. فمن نفس الجدول يتضح أن المجاميع المعاملة أن عمر الأطوار المختلفة زادت مدتها. فمثلا عند الجرعة الضعيفة وصل الطور المعالج الطور 49 عند 15 يوما مقارنة بالشاهد التي كان فيها عند الطور 50. وهذا النمو كان كذلك بنسب متفاوتة نتيجة للموت الناجم إثرة المعاملة. حيث يسجل فقط 20 % من الشراغيف التي وصلت الطور 49.

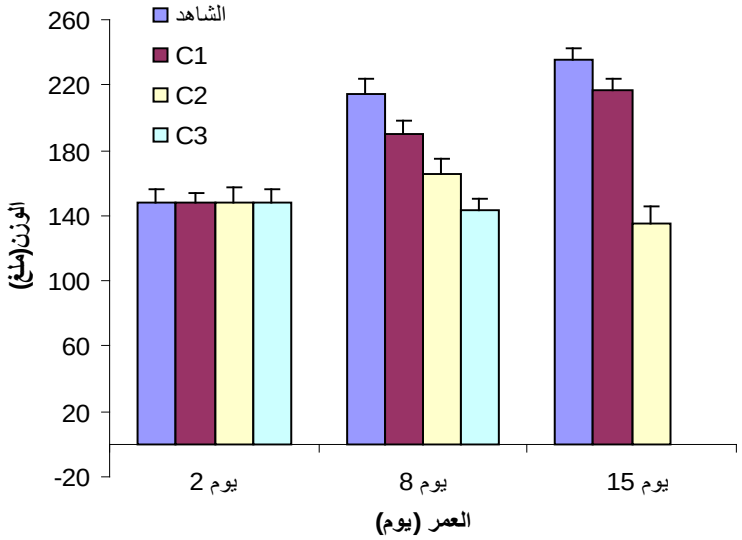
فمن اخلال الملاحظات المسجلة بعد المعاملة يتضح أن التركيز الضعيف و المتمثل بـ 0.20 غ/ل ، أثر على سرعة النمو و التطور ، حيث كان النمو بطيء جدا ، بالمقارنة مع الشاهدة . .بينما التركيز الأكبر 0.30 غ/ل كان له تأثيرا أكثر وضوحا ، أدى إلى موت غالبية الشراغف في الأسبوع الأول من المعاملة ، و ذلك لعدم قدرتها على مقاومة تأثير المبيد. بينما المجموعة الثالثة و المعاملة بتركيز مرتفع 0.35 غ/ل فإنها لم تستطيع النمو و التطور و كانت قليلة الحركة ، و خلال بداية الأسبوع الأول مات 80% من العدد الإجمالي المعالج.

الجدول 17: تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على متوسط مدة الطور (يوم) المسجلة خلال فترات الأطوار الموالية بعد معاملة الطور 43 بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis* . العدد : 25 شرغوف - .

عمر الشراغيف (يوم) بعد معاملة الطور 43 عند بدايته وأنتقالها للأطوار الموالية					
	اليوم 2	اليوم 6	اليوم 8	اليوم 12	اليوم 15
الشاهد	%100 الطور 44	%100 الطور 47	% 100 الطور 48	%100 الطور 49	%100 الطور 50
التركيز 0.20غ/ل	%100 الطور 44		%80 الطور 47		%40 الطور 49
التركيز 0.30 غ/ل	%100 الطور 44		% 30 الطور 47		% 20 الطور 49
التركيز 0.30 غ/ل	%100 الطور 44		% 15 الطور 47		

7.3. تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على زيادة وزن الشراغيف بعد فترات من العمر :

يمثل الشكل 13 تأثير المبيد الكيميائي المستعمل على الوزن عند أعمار متفاوتة والتي تمثل أطوار مختلفة بين الشاهد والمجاميع المعاملة. حيث يسجل من الشكل 19 أنه خلال اليوم الثاني من كانت كل الأوزان متساوية و مقارنتها بالمجموعة الشاهد. عند اليوم 8 يلاحظ أن الموزن أن أنخفض معنويا مند كل من المجاميع المعاملة مقارنة بالشاهد. حيثأستمر هذا الأنخفاض عند اليوم 15 ولكن عند أضعف تركيزين فقط وهذا ناتج عن الموت الكلي للتركيز العالي.

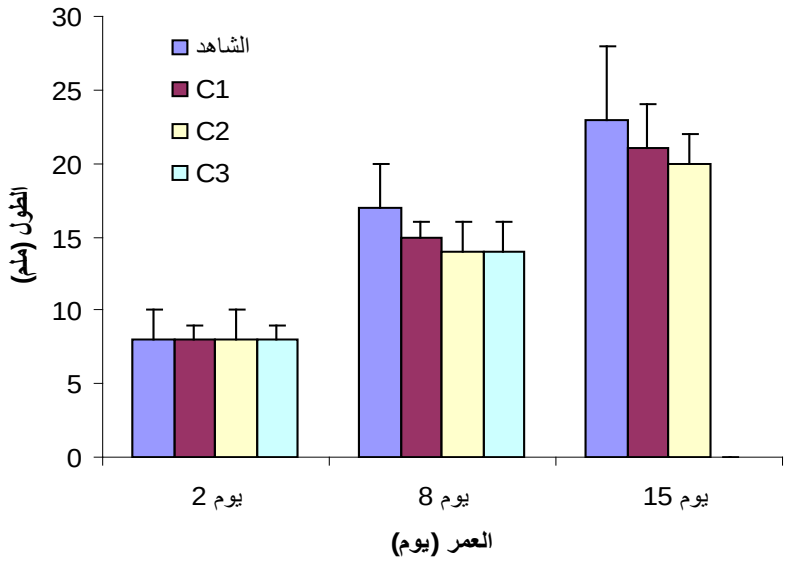


شكل **13** : تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose على متوسط الوزن (ملغ) المسجلة خلال فترات الأطوار الموالية بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis* .

8.3. تأثير المبيد الحشري Chlorpyriphose **على زيادة الطول للشراغيف بعد فترات من العمر:**

يمثل الشكل 14 تأثير المبيد الكيميائي المستعمل على طول الشراغيف أثناء مراحل النمو المختلفة.

حيث يلاحظ من هذه النتائج، و مقارنتها بالمجموعة الشاهدة ، إن المبيد لا يؤثر عن الطول بعد يومين من المعاملة حيث كان متوسط الطول يقدر ب 8 ملم. عند اليوم 8 يسجل أن الطول تأثر بالمعاملة حيث كان الفرق معنويا جدا بين كل المجاميع المعاملة مقارنة بالشاهد. كما استمر هذا الفرق عند اليوم 15 أين كان متوسط الطول 23 ملم عند الشاهد وبلغ فقط 20 ملم عند التراكيز أول تركيزين (0,20 غ/ل و 0,30 غ/ل). كما لم نستطيع تسجيل الطول عند أكبر تركيز وهذا لحدوث موت كامل لكل أفراد المجموعة المعاملة.



شكل **14 : تأثير المبيد** الحشري Chlorpyriphose على متوسط الطول (ملم) المسجلة خلال فترات الأطوار الموالية بعد المعاملة بتراكيز مختلفة (C1 = 0,20 غ/ل, C2 = 0,30 غ/ل , C3 = 0,35 غ/ل) لشراغيف *Bufo viridis* .

4. المناقشة:

عمل الإنسان على مر الزمن على إفساد البيئة التي يعيش فيها و أخل بتوازنها وجلب لنفسه مخاطر و مشاكل عديدة لم يقدر على تحملها من جراء كثرة الملوثات و نذكر منها : نفايات المصانع و المنازل و المزارع و مخلفات المدن و المواد البلاستيكية و وسائل النقل و المبيدات و الأسمدة ...وتعتبر المبيدات الزراعية من أهم وأخطر ملوثات البيئة و التي هي عبارة عن مواد كيميائية سامة تستخدم لمكافحة الآفات و تؤثر على العمليات الحيوية للعديد من الكائنات الحية. من جانب أخر للمبيدات تأثيرات ثانوية سامة على للإنسان و الحيوان.

ينتج العالم الصناعي مابين 1500-2000 مادة كيميائية جديدة سنوياً، تستخدم في شتى المجالات الصناعية و الطبية و الزراعية، وإن قسماً من هذه المواد لا يتم فحصه و دراسة التأثيرات الجانبية له بشكل دقيق. تصل المبيدات إلى البيئة بطرق عدة نذكر منها الرش المباشر للنباتات أو التربة، عن طريق التناثر أثناء الاستخدام، بواسطة التخلص من عبوات ومخلفات المبيدات، أثناء سكب المبيدات على التربة و مصادر المياه وتجدر الإشارة هنا إلى أن أكثر من 90% من المبيدات لاتصل و لا تستقر على الآفة المراد مكافحتها و لكن تصل إلى البيئة. ويتعلق هذا الوصول بعدة عوامل نذكر منها: قدرة المبيد على البقاء، حركة المبيد، عمر المبيد. المبيدات عبارة عن مواد كيماوية فعالة حيوياً تم اختبارها من حيث فعاليتها قبل طرحها للاستخدام في المجال الزراعي. أما في حال حدوث خطأ أو الإفراط في الاستخدام فإنها تصبح موادا مؤذية للإنسان و الحيوان و البيئة المحيطة لذلك يجب الالتزام بالتعليمات التقنية المتعلقة باستخدامها تتعدد طرق وصول المبيدات إلى الكائنات الغير مستهدفة عن طريق اختراق الجلد، الابتلاع عن طريق الفم مع الطعام أو الاستنشاق.

الأوساط المائية تتحصل على الملوثات عن طريق الهواء ، و كذلك من الأراضي المحيطة بها ، و في بعض الحالات تحصل عليها من المجاري المائية الملوثة المنبعثة من المصانع الكيميائية المجاورة ، و لهذا كنتيجة حتمية عدة بلدان و خاصة الصناعية و المعتمدة على الزراعة أصبحت تعاني من ظاهرة التلوث بالمواد العضوية و الغير عضوية (Mc Carthy and Shugart, 1990) .

تكون البرمائيات بمختلف أنواعها ركنا أساسيا في البيئة وخاصة المناطق الرطبة منها ، وقد أصبح وجودها عنصرا هاما لا يمكن تجهله. فأينما وجد الإنسان، الحيوان والنبات وجدت هذه البرمائيات، بل و أنها غزرت كثيرا من المناطق التي لا يمكن للإنسان أن يعيش فيها. قد نتج عن تواجد البرمائيات في مختلف البيئات وجود علاقة هامة بينها وبين الإنسان قد تكون هذه العلاقة مفيدة حتى أصبحت كمصدر غذائي.

منذ 1940 وإلى غاية 1960 ظهرت مواد تركيبية عضوية تدعى بالمركبات الكلوريدية العضوية والتي تقسم إلى أربع مجموعات DDT، HCH و lindane، cyclodiènes. بعد 1960 تم اكتشاف مواد جديدة تدعى بالمركبات الفوسفورية العضوية والتي تضم كل من parathion وmonocrotophos، تؤثر هده المبيدات عن طريق اللمس و تمتاز بسمية كبيرة أكتر بكثير من السمية الناجمة عن استعمال مبيدات الكلوريدية العضوية.

إن استعمال المواد الكيميائية في مكافحة الآفات الحشرية أدى من جهة إلى زيادة الإنتاج لكن تسبب من جهة ثانية في ظهور إضرابات جانبية أثرت مباشرة على الحيوانات الأليفة وصحة الإنسان، وساهمت بشكل كبير في تلوت المحيط (Ishaaya & Horowitz, 1998). نظرا لان عدد كبير من الحشرات الضارة أصبحت لديها مقاومة للمبيدات الكيميائية ، وهذا راجع إلى استعمال المبيدات مع الزيادة المتكررة لتركيز المادة الفعالة في كل مرة، مما يؤدي مع مرور الوقت إلى حدوث سمية لثدييات وتلوث البيئة. هذه العوامل دفعت بالعلماء إلى البحث عن مواد كيميائية أكثر تخصصا ، وذات تأثير كبير على الخصائص البيوكيميائية للآفة ، التي تدعى بمنظمات النمو للحشرات ،(IGRs) كما تسمح بمعرفة المزيد عن الخصائص الفيزيولوجية للآفة والتي تتدخل في مراحل النمو الطبيعية للحشرة .

إن الوسط البيئي يتلوث تدريجيا بعوامل طبيعية و نشاطات الإنسان، مثل التوسع الصناعي و الزيادة في إستغلال الأراضي الزراعية (Alloway , 1990). المبيدات الحشرية أصبحت من بين أهم المشاكل البيئية المطروحة، و هذا بسبب تراكمها في الطبيعة وتأثيرها على العضويات الغير مقصودة. عند الكائنات الحية. هذه التأثيرات تساعد على إنخفاض عشائر البرمائيات بعدة طرق، و هذا بتأثير سمي مباشر، والمتمثل بالموت، أو بإنخفاض في عدد البيوض، و تأثير على عملية النمو و التحول، هذه العوامل يؤدي حتما إلى ضعف الحيوانات وعدم قدرتها على التكاثر أو المكافحة ضد الحيوانات المفترسة.

لقد ثبت بأن المراحل الأولى من حياة البرمائيات (العلاجم و الضفادع) و بالتالي دورة حياتها هي من أعقد مراحل الحياة من جميع الحيوانات الأخرى . حيث تتميز بوجود مراحل مختلفة كل مرحلة تتطلب شروط معينة من درجة الحرارة و غذاء متوفر و أوساط مختلفة (Nieuwkoop & Faber, 1967) .

لهذا فإن المراحل الأولى للتطو ر عند البرمائيات أكثرها حساسية و تأثيرا بالوسط المعيشي ، كما أنها من الحيوانات التي يجب الأهتمام بها كثيرا ، نظرا لطريقة حياتها المائية و البرية ، كما أن فيزيولجيتها تسمح لها بالتأثر السريح و حساسيتها المفرطة اتجاه المبيدات و الملوثات الكيميائية المختلفة (Irina& Hana, 2009).

في هذه الدراسة تم إستعمال شراغيف *Bufo viridis* بغرض معرفة تأثير أحد المبيدات الحشرية (Chlorpyriphose) و المستعملة بكثرة في الميدان الزراعي بالجزائر، و هذا التأثير و المتمثل في نسبة الموت و مدى سرعة النمو. من خلال النتائج المتحصل عليها تبين أن المبيد الحشري chlorpyriphose تأثير سمي عالي على مختلف أطوار النمو لنوع البرمائيات *Bufo viridis* و هذا من خلال نسب الموت العالية المسجلة، و كذلك تأثيره على سرعة النمو للأطوار المختلفة و مدى إنتقالها من طور إلى آخر. و هذه النتائج تدعم الدراسات السابقة و التي تؤكد بإن للمبيدات الحشرية لها تأثير سمي على البرمائيات (Kadokami , 2004 ; Redibund *et al* , 1999). نفس الدراسة تمت على السلمندر *Ambystoma mexicanum* بإستعمال المبيد العضوي المدروس Chlorpyriphose و Malathion على الأطوار المختلفة للنمو فأعطت نفس النتائج المتحصل عليها و هذا بتأثيرها السمي و تأخر نمو الأطوار (Robles – Mendoza *et al*., , 2009).

لقد ثبت بأن المراحل الأولى من حياة البرمائيات (العلاجم و الضفادع) و بالتالي دورة حياتها هي من أعقد مراحل الحياة من جميع الحيوانات الأخرى . حيث تتميز بوجود مراحل مختلفة كل مرحلة تتطلب شروط معينة من درجة الحرارة و غذاء متوفر و أوساط مختلفة (Nieuwkoop & Faber, 1967) . لهذا فإن المراحل الأولى للتطو ر عند البرمائيات أكثرها حساسية و تأثيرا بالوسط المعيشي ، كما أنها من الحيوانات التي يجب الأهتمام بها كثيرا ، نظرا لطريقة حياتها المائية و البرية ، كما أن فيزيولجيتها تسمح لها بالتأثر السريح و حساسيتها المفرطة اتجاه المبيدات و الملوثات الكيميائية المختلفة (Irina& Hana, 2009).

إن التأخر في النمو و تجدد الأطراف و التحول ، هي بعض المؤشرات الحيوية التي تم القياس بها درجات التلوث لعدة مواد سامة ، و أصبحت الضفادع من أهم المؤشرات الحيوية للتلوث نتيجة لنفاذية جلدها في كلا الوسطين المائي و البري (Henle ,1981). نتائج هذه الدراسة والمتمثلة بتأثير مبيد Chlorpyriphose على سرعة النمو أثبتت بأن هناك تأخر معنوي في مدة الأطوار اليرقية المدروسة وهذا مايدعم الدراسات السابقة (Robles – Mendoza *et al*., 2009).
إن التأثير السمي و الحسي للمبيدات على *Bufo viridis* و على الأنواع المختلفة من الصعب طرح جواب كلي على طريقة التأثير و عملية إزالة السمية ، و هذا بإختلاف أنواع البرمائيات لمقاومتها للأوساط البيئية الصعبة و الملوثات المختلفة .إن النتائج المتحصل عليها تطرح فرضية أن البرمائيات من عائلة Urodéle (ذات التحول الكامل) تظهر بعض القوة المناعية لمقاومتها للمبيدات بعكس البرمـــائيات من عائلــة Anoure (ذات التحول الغير كامل)، التي تظهر حساسية أكثر لهذه المبيدات (El.Merhibi et al , 2004) . إن النتائج المتحصل عليها و المتمثلة في سمية المبيد تتفق مع النتائج المتحصل عليها بإستعمال مبيد Malathion على ضفدع *Xenopus laevis* و *Bufo arenarum* ، عند

تعريض شراغيفه صغيرة الأطوار لهذا المبيد مبكرا ، و لمدة طويلة (Bonfanti *et al* ., 2004)، و نفس النتائج كذلك تم الحصول عليها عند تعرض *Ambystoma barbouri* لبعض المبيدات الفلاحية مثل : Endosulfan, Atrazine , Carbaryl و Octylphenol (Rohr *et al.*, 2003).

كذلك الدراسة التي تمت على الضفادع من نوع *Limnodynastes tasmaniensis* على النمو و التكاثر و نسب الجنس تحت تأثير Atrazine ، أثبتت كذلك أن لها تأثير سمي و سلبي على كل أنواع التطور (Spolyarich *et al*., 2010).

في هذه الدراسة التأخر و تثبيط النمو للأطوار المختلفة و المعاملة بمبيد حشري Chlorpyrifos متعلقة بتناوب تطور الجهاز العصبي المسجلة عند الأطوار الجنينية الأولى ، نفس الملاحظات تم تسجيلها بإستعمال المبيد الحشري Chlorpyrifos و Malathion عند المراحل الجنينية الأولى من السلمندر Axolotl (Robles–Mendoza, 2009) ، و نفس النتائج تم الإشارة إليها عند إستعمال مبيد Malathion للأطوار الجنينية بتراكيز مختلفة (Snawder and Chambers, 1993) ، و هذا ناتج عن تنشيط cholinestérase المتسبب في تطور غير طبيعي للجاز العصبي.

إن المعادن الثقيلة مثل Cadmium له تأثير سلبي على تطور شراغيف ضفادع *Rana ridibunda* (Loumbourdis *et al*., 1999) ، هذا التأثير متمثل في موت الشراغيف بعد 15 يوم من التعرض ، مع تأخر في سرعة النمو بالنسبة للأفراد الباقية . .إن المواد الكيميائية المشبوهة هي سبب إنخفاض عدد البرمائيات و الضفادع مع ظهور تشوهات بها (Saparling *et al.* , 2001; ckibbin *et al*., 2008)

يعتبر التكاثر من أهم الآليات الفسيولوجية التي تميز الكائنات الحية بغرض إنتاج أفراد جديدة، وبالتالي المحافظة على استمرارية النوع، ونظرا لأهمية هذه الوظيفة الفسيولوجية فان أي اختلال أو اضطراب على مستوى ميكانيزمات هذه الآلية فانه يثير اهتمام الباحثين إلى التعرف على العوامل التي تتدخل وتسيطر في تنظيم هذه الوظيفة . خلال هذه الدراسة تمت معرفة تأثير المبيد الحشري chlorpyriphose على بعض مؤشرات التكاثر والمتمثلة في عدد وضع البيض ونسب الفقس.

فالنتائج أثبتت بأن هناك تأثير على عدد البيوض. حيث تم أنخفاض معنوي في العدد وكذلك نسبة الفقس. نتائج مشابهة تم الإشارة إليها بأستعمال مبيدات حشرية على أنواع أخرى من البرمائيات. إن بعض الدراسات السابقة تؤكد بأن هناك إختلافات جنسية عند تأثير مبيدات الكلوروعضوية المركزة عند الضفادع أثناء فصول التكاثر (Kadokami , 2004) .

بالنسبة لنسب الفقس تحت تأثير Chlorpyrifos على بيوض *Ambystoma mexicanum* كانت ليس هناك فرق معنوي مع مجموعة الشاهد (Robles – Mendoza , 2009). عدة دراسات تقترح بأن أجنة البرمائيات تنظم فقسها في حالة وجود أي خطر في محيطها (Mestre- Gomez *et al.* , 2006) ، ففي هذه الحالة أي أرتفاع نسب الفقس تحت تأثير Chlorpyrifos يمثل حالة تأقلم إستراتجية لرفع أحتمال

البقاء و العيش. حيث لوحظ كذلك فقس مبكر تحت تأثير المبيد الحشري Methoxyclor لنفس نوع الضفادع (Ingermann *et al.*, 1999). إن هذا التأثير ناجم عن التغيير الحادث في المستوى البيئي للبرمائيات (Takeishi, 1996) ، و هذه النتائج تأكدت بتحاليل هرمونية و ذلك بوجود تراكيز عالية من المبيدات الموجودة في الوسط على مستوى الأنسجة المختلفة (Kadokami *et al*., 2002) ، و منها على الغدد الجنسية (Quassinti *et al.* , 2009; Irina & Hanna , 2008) .

النتائج النهائية أثبتت سمية هذا المبيد الحشري ويعتبر سامل لجميع العضيات الغير مقصودة كما ينصح التخلي عن مثل هذه المواد وتعويضها بالمبيدات ذات الجيل الثلث واالتي تعتمد في تأثيرها على عوامل النمو المختلفة للحشرات والتي أثبث بأن ليس لها تأثير على الحيوانات الغي حشرية.

.

5- المـــراجـــــع:

ABBOTT W. B. 1925**.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.

Alford, R. A., Dixon, P. M., Pechmann, J. H., 2001. Ecology. Global amphibian population declines. *Nature.* **69**: 377–384.

Alloway B.J. 1990. Cadmium. In: Alloway, B.J. (Ed.), Heavy Metalsin Soils. Wiley, New York, pp. 100-124.

Bonfanti P., Colombo A., Orsi F., Nizzetto I., Andrioletti M., Bacchetta R., Mantecca P., Fascio U., Vailati G. & Vismara C. 2004. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus leavis* development. *Aquat. Toxicol*. **70**: 189–200.

Cerejeira M. J.,Viana P., Batista S., Pereira T., Silva E., Valério M. J., Silva A, Ferreira M., Silva-Fernandes A. M. 2003. Pesticides in Portugal surface and Ground waters. *Water Res*. **37**: 1055–1063.

Dagnelie P. 1998. Statistique théorique et appliquée. Tome 2 : Interférence statistique a une et deux dimensions. Bruxelles, Edt. Univ ; DeBooeck & Larcier, P :659.

Davidson C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*. **14**: 1892–1902.

Davidson C., Benard M.F., Shaffer H. B., Parker J. M., O'Leary C., Conlon J.M.& Rollins-Smith L.A. 2007. Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. *Environmental Science & Technology.* **41**: 1771–1776.

Davidson C. & Knapp R. A. 2007. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications*. **17**: 587–597.

Devine G. J. & Furlong M. J. 2007. Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*. **24**: 281–306.

El-Merhibi A., Kumar A.& Smeaton T. 2004. Role of piperonyl butoxide in the toxicity of chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia* and *Xenopus leavis*. *Ecotox. Environ. Safe*. **57**: 202–212.

Fisher R. A. & Yates. F. 1959. Statistical tables of biological, agricultural and medical research. Fifth edition, Oliver and Ryd (Eds). Edinburgh Tweedale Court.

Gomez-Mestre I., Touchon J.C. & Warkentin K.M. 2006. Amphibian embryo and parental defenses and a larval predator reduce egg mortality from water mold. *Ecology*. **87**: 2570–2581.

Henle K. 1981. A unique case of malformations in a natural population of the green toad (*Bufo viridis*) and its meaning for environmental politics. *Brit. Herpet. Soc. Bull*. **4**: 48-49.

Ingermann R. L., Bencic, D.C., Eroschenko, V.P., 1999. Methoxychlor affects on hatching and larval startle response in the salamander *Ambystoma macrodactylum* are independent of its estrogenic actions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **62**: 578–583.

Irina G. & Hanna E. (2008). Clotrimazole exposure modulates aromatase Activity in gonads and brain during gonadal Differentation in *Xenopus tropicalis* frogs. Aquatic toxicology. **91**: 102-109.

Ishaaya I. & Horowitz A. R. 1995. Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: Mechanisms and resistance *manegment. Pestc. Sci*. **43**: 227-232.

Kadokami K., Takeishi M., KuramotoM. & Ono Y. 2002. Congener-specific analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs and their habitats, Kitakyushu, Japan. *Environ. Toxicol. Chem*. **21**: 129–137.

Kadokami k., Takeishi M., Kuramoto M. & Ono Y. 2004. Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and ancoplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs. *Chemosphere.* **57**: 383–389.

Litchfield G. T.J. R. & Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap*. **69**: 367-113.

Mann R. M., Hyne R. V., Choung C. & Wilson S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* **157**: 2903–2927.

McCarthy J.F. & Shugart L.R. (Eds.) 1990. Biomarkers of Environ-mental Contamination. Lewis Publishers, FL.

McKibbin R., Dushenko W. T., vanAggelen G., Bishop C. 2008. The influence of water quality on the embryonic survivorship of the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) in British Columbia, Canada. *Science of the Total environment*. **395**: 28– 40.

Nieuwkoop P. D. & Faber J (1967). Normal table of *Xenopus laevis* (Dauddin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Second edition North-Holland Publishing Company. Amesterdam.

Quassinti L., Maccari E., Murri O. & Bramucci M. 2009. Effects of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of the frog *Rana esculenta* in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **93**: 91–95.

Relyea R. A. & Mills N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray tree frog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **98**: 2491–2496.

Ridibund N.S., Loumbourdis P., Kyriakopoulou-Sklavounou, G. & Zachariadis b. 1999. Effects of cadmium exposure on bioaccumulation and larval growth in the frog *Rana. Environmental Pollution* .**104**: 429-433

Robles-Mendoza C., García-Basilio C., Cram-Heydrich S., Hernández-Quiroz M. & Vanegas-Pérez C. 2009. Organophosphorus pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata) .*Chemosphere*. **74**: 703–710.

Rodriguez-Mozaz S., LópezdeAlda, M. J., Barceló, D. 2006. Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in adrinking water treatment plant by amulti Analyte biosensor followed by LC–MS validation.*Talanta* **,69**: 377–384.

Rohr J. R., Elskus A.A., Shepherd B.S., Crowley P.H., McCarthy T.M., Niedzwiecki J.H., Sager T., Sih A.& Palmer B.D. 2003. Lethal and sublethal effects of atrazine,

carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the stream side salamander (*Ambystoma barbouri*). *Envi ron. Toxicol. Chem*. **22**: 2385–2392.

Snawder J.E. & Chambers J.E. 1993. Osteolathyrogenic effects of malathion in *Xenopus* embryos. *Toxicol. Appl. Pharm*. **121**: 210–216.

Sparling D.W., Fellers G.M. & McConnell L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem*. **20**: 1591–1595.

Spolyarich N., Hyne R., Scott Wilson S., Palmer S. & Byrned M. 2010. Growth, development and sex ratios of Spotted Marsh Frog (*Limnodynaste stasmaniensis*) larvae exposed to atrazine and an herbicide mixture. *Chemosphere*. **78**: 807–813.

Stuart S. N., Chanson, J. S., Cox N. A., Young,B. E., Rodrigues A. S., Fischman, D. L., Waller R.W. 004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. **306:** 1783–1786.

Swaroop S., Gilroy A. B. & Uemura K. 1966. Statistical methods in malaria eradication. *Geneva: World Health Organisation*.

Takeishi M. 1996. On the frog, *Rana ornativentris*, with supernumerary limbs found at Yamada Greenery Area in Kitakyushu City, Fukuoka Prefecture, Japan. *Bull. Kitakyushu Mus. Nat. Hist*. **15**: 119–131.