

المجلة العربية للبحث العلمي  
Arabian Journal of Scientific Research

Vol 2 issue 1 2021

صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تضاهي  
الصبغات الكيميائية



مقترح قائم على الإدراك السمعي  
لذوي الإعاقات البصرية







افتتاحية العدد

## افتتاحية العدد الثالث من المجلة العربية للبحث العلمي

د. موزة بنت محمد الربان

ورقة بحثية

## صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تضاهاى الصبغات الكيميائية

السيد طاهر السيد حسن عقيل ، نجوى إبراهيم البرهاوي

ورقة بحثية

## تقدير فعالية إنزيم (nitrate reductase) باستخدام دقائق

الفضة النانوية المخلقة حيويًا من الفطرين (*Pleurotus*

*pulmonarius*) و(*Pleurotus ostreatus var ostreatus*) وتأثيرها

على الفطر (*Pythium aphanidermatum*)

سيف سعدالله حسن ، عبد الله عبد الكريم حسن

ورقة بحثية

## فعالية الزيوت الطيارة لقشور نوعين من فواكه الحمضيات

على حلم العنكبوت (*Tetranychus urticae Koch*)

(*Acari: Tetranychidae*) واللحم المفترس (*Phytoseiulus*)

(*Acari: Phytoseiidae*) (*persimilis Athias-Henroit*)

أسماء البقالي العيساوي ، أمال العمراني

01

02

09

16





ورقة بحثية

قياس تجربة المستخدم لمتصفح ويب:  
مقترح قائم على الإدراك السمعي لذوي الإعاقات البصرية  
محمد بدوي مصطفى الخليفة ، عمر حاج علي حاج الحسن

23

ورقة بحثية

تقييم التلوث الفيزيائي-الكيميائي والميكروبي  
لمياه الصرف الصحي ومياه البحر في خمس دول متوسطة  
وفاء حسن<sup>1</sup>، سناء عليبي ، الهادي بن منصور

31





## افتتاحية العدد الثالث

د. موزة بنت محمد الربان\*

رئيسة التحرير  
mmr@arsco.org \*

العدد الثالث من «المجلة العربية للبحث العلمي» يضم عدداً من الأوراق المهمة في تخصصات مختلفة ستصدر تباعاً حال الانتهاء من تحريرها، بإذن الله. يسرنا أن نشكر المحررين الضيفين في هذا العدد على جهودهما في التحرير وهما:

- الأستاذ الدكتور مجدي توفيق عبد الحميد، من قسم النبات في المركز القومي للبحوث في جمهورية مصر العربية.
- الدكتور أحمد اسماعيل شعلان، من مركز بحوث وتطوير الفلزات، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

وزميل باحث ما بعد الدكتوراه في مركز الباسك للمواد والتطبيقات والبنى النانوية، اسبانيا.

كما نشكر المحكمين الذين بذلوا جهودهم ووقتهم في تحكيم الأوراق المنشورة في هذا العدد والتي أثمرت تحسين مهم عليها.

### Title

#### Editorial foreword, third issue

Dr. Moza Al-Rabban, Editor-in-Chief

Welcome to the third issue of the Arabian Journal of Scientific Research. This issue includes a number of important papers in different disciplines which will be published one after the other once each is complete.

We are pleased to thank the following guest editors for their great editorial efforts and help with this issue of the journal:

- Dr. Magdi Tawfik Abdelhamid, Botany Department, National Research Centre, Cairo, Egypt.
- Dr. Ahmed Esmail Shalan, Researcher at the Central Metallurgical Research and Development Institute (CMRDI), Cairo, Egypt. Postdoctoral Research Associate Fellow at BCMaterials, Spain.

We would like to thank all the reviewers for their time and invaluable insights on the manuscripts of this issue and for making such a significant contribution.

Received 17 March 2021; accepted 21 March 2021; published 30 April 2021

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Al-Rabban M. Editorial foreword, third issue. Arabian Journal of Scientific Research 2021:1.1.

<https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.1>

# صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تظاهي الصبغات الكيميائية

السيد طاهر السيد حسن عقيل<sup>1</sup>، نجوى إبراهيم البرهاوي<sup>2</sup>

<sup>1</sup> قسم الثقافة والعلوم والإعلام بالرابطة العلمية العالمية للأنساب الهاشمية، مكة المكرمة، المملكة العربية السعودية

<sup>2</sup> كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، العراق

<sup>1</sup> tahiraqeil@yahoo.com, <sup>2</sup> Najwa\_ibrahim@yahoo.com

## المخلص

تستخدم هذه الدراسة الماء المقطر لاستخلاص صبغة الأنثوسيانين من بذور الرمان وأوراق اللبنة البنفسجية، وذلك أن الماء ليس له أي تأثير سمي، ويتبخر عند درجات الحرارة المنخفضة من دون التأثير في التركيب الكيميائي للصبغة المستخلصة. وتبين الدراسة أن الصبغة الحمراء المستخلصة من الرمان كانت ذات وسط حامضي (pH= 3.0)، بينما كانت الصبغة البنفسجية المستخلصة من اللبنة ذات وسط حامضي خفيف (pH=6.0)، وبلغت تراكيز الصبغة في عصير كلا النباتين بعد إسقاط القيمة الامتصاصية لكل منها على منحني المحاليل القياسية 130 و 503 ملغم/ 100 مل من عصير كل نبات، على التعاقب، ونجحت هذه الصبغة، بلونيهما الأحمر والبنفسجي، في صبغ مسحات البكتيريا والمقاطع النسيجية الحيوانية والنباتية، وباستخدام مثبتتي اليود وكبريتات النحاس، على التعاقب، وعلى نحو يضاهي الصبغات الكيميائية المتعارف عليها. كما كان لهذه الصبغة تأثير فعال في صبغ الأقمشة القطنية والصوفية على نحو جيد باستخدام عصير الليمون وصودا الخبز كمثبت.

**الكلمات المفتاحية:** الأنثوسيانين، الصبغات الطبيعية والكيميائية، بذور الرمان، أوراق اللبنة.

## Title

**Natural anthocyanin dye is comparable to chemical dyes**

Alsaid Tahir Aqeil<sup>1</sup>, Najwa I. AL-Barhawi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Science, Culture and Media, World Scientific Association Hashimi Lineage, Makkah, Saudi Arabia.

<sup>2</sup> College of Education for Pure Sciences, Mosul University, Mosul, Iraq

## Abstract

In this study we used distilled water to extract pigment anthocyanin from seeds of the pomegranate and violet cabbage leaves because the water does not have any toxic effect, their evaporates happened at low temperatures, and without influence on the chemical composition of the extracted dye. It was found that the red dye extracted from the pomegranate had an acidic medium (pH 3.0), while the violet dye extracted from the cabbage leaves had a light acid medium (pH 6). The amount of dye in the juice of both plants after dropping the absorbance value of each on the curve of standard solutions was 310 and 500mg/ 100 ml of juice from each plant, respectively. This dye, with its red and violet colors, succeeded in dyeing bacterial smears, animal, and plant tissue sections, with iodine and copper sulfate fixers respectively, and in a way similar compared to conventional chemical dyes. It was also an effective dye in the dyed cotton and wool fabrics well with lemon juice and baking soda as add fixative.

**Keywords:** Anthocyanin, natural and chemical dyes, pomegranate seeds, cabbage leaves.

Received 22 April 2020; accepted: 24 November 2020; published 30 April 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Aqeil AT & Al-Barhawi NI. Natural anthocyanin dye is comparable to chemical dyes. Arabian Journal of Scientific Research 2021;1:2.

<https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.2>

الصفرائين (Safranin) والبنفسج البلوري (Crystal violet) والأوسين (Eosin) والهيماتوكسولين (Haematoxylin) وأزرق الميثيلين (Methylene blue) والفوكسين الحامضي (Acid fuchsin)، المعروفة بتأثيرها السُمّي على الإنسان.

## 2- المواد وطرائق العمل

### 1-2 النباتات المستخدمة

تم استخدام نباتي الرمان (*Punica granatum*) واللهاة البنفسجية (*Brassi-ca oleracea*) لاستخلاص صبغة الأنثوسيانين منهما.

### 2-2 البكتيريا المستخدمة

استخدمت البكتيريا الكروية الموجبة والعصوية السالبة لصبغة غرام وهما: (*Staphylococcus aureus*) و(*Pseudomonas eruginosa*)، على الترتيب.

### 3-2 الأقمشة المستخدمة

استخدم نوعين من الأقمشة هما القطنية و الصوفية.

### 4-2 الصبغات الكيميائية

تم استخدام صبغة غرام المتكونة من البنفسج البلوري والصفرائين لصبغ مسحات البكتيريا، وصبغتي الأوسين والهيماتوكسولين لصبغ مقاطع الأنسجة الحيوانية، أما المقاطع النباتية فقد تم صبغها بصبغتي أزرق الميثيلين والفوكسين الحامضي.

### 5-2 استخلاص صبغة الأنثوسيانين الخام

غُسِلت بذور الرمان وأوراق اللهاة بالمحلول الملحي العادي (Normal saline) بتركيز (0.9%)، ثم بماء الحنفية الجاري، وغُصرت ثم رُشحت بأوراق من نوع (Whatman NO.1)، وذلك للتخلص من الأجزاء الصلبة، ثم أخذ الراشح وطُرد مركزياً بجهاز (Centerifuge) بسرعة 5000 دورة/ دقيقة ولمدة ربع ساعة، ثم طُرح الراسب وأخذ الراشح الذي عُقِم بطريقة البسترة،<sup>17</sup> ثم جُفد بجهاز التجفيد الجاف (Lyophilizer) لغرض تركيزه وحفظه في الثلاجة إلى حين استخدامه عند درجة حرارة 4°م.

### 6-2 قياس الأس الهيدروجيني للمستخلص

تم قياس الأس الهيدروجيني لصبغة الأنثوسيانين المستخلصة من نباتي الرمان واللهاة باستخدام جهاز (pH meter).

### 7-2 قياس محتوى المستخلص من صبغة الأنثوسيانين

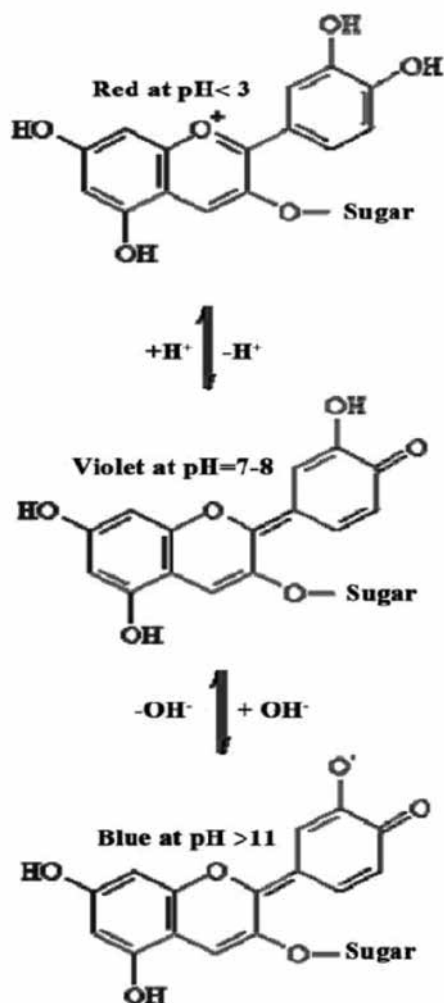
استخدم جهاز مطياف الضوء (UV-vis Spectrophotometer) لقياس امتصاصية الصبغة الحمراء والبنفسجية في كلا المستخلصين عند الطول الموجي 400-700 نانومتر،<sup>18</sup> ثم حُضِر المنحنى القياسي من صبغة أحمر الكونغو (Congo red)،<sup>19</sup> والمنحنى القياسي من صبغة البنفسج البلوري كصبغات قياسية بتركيز 5 و10 و25 و50 ملغم/ لتر، وقيست امتصاصيتهما عند الطول الموجي 525 نانومتراً بالجهاز المذكور، ثم أسقطت على هذا

توجد الصبغات الطبيعية في أغلب أجزاء النباتات الراقية، مثل السيقان والجذور والأوراق والثمار والأزهار، ومنها صبغة الأنثوسيانين (Anthocyanin) المسؤولة عن إعطاء اللون الأحمر والبنفسجي والأزرق والبرتقالي للعديد من الثمار والخضراوات والحبوب والأزهار المستخلصة منها.<sup>1</sup> ونظراً إلى خاصية هذه الصبغة على تغيير لونها بسبب اختلاف الأس الهيدروجيني (pH) لكل منها، فلونها الأحمر والبنفسجي والأزرق يظهر بوضوح في الأوساط الحامضية (pH<6) والحامضية الضعيفة (6<pH<7) والقاعدية (pH>7)، على التعاقب،<sup>2</sup> لذلك فقد تم استخدام هذه الصبغة دليلاً (Indicator) للكشف عن الأس الهيدروجيني للعديد من المواد الكيميائية.<sup>3</sup> ومن خصائص هذه الصبغة أنها عديمة الرائحة (Odorless) وعديمة الطعم (Flavorless)،<sup>4</sup> وغير سامة (Non-toxic)،<sup>5</sup> كما أنها ذات فاعلية مضادة للأكسدة (Antioxidant) ومضادة للتسرطن (Anti-carcinogenic) ومضادة للالتهابات (Anti-inflammatory)،<sup>6,7,8</sup> وهي من الناحية الكيميائية عبارة عن مركبات فلافونويدية (Flavonoid compounds)، بشكل جزيئات قطبية ذات مجاميع (Hydroxyl) و(Carboxyl) و(Methoxyl) و(Glycoxyl) مرتبطة بحلقات عطرية (Aromatic rings)، لها القابلية على الذوبان في الماء بدرجة أفضل من ذوبانها في المحاليل غير القطبية؛ لذلك امتازت بسهولة استخلاصها وفصلها من النباتات المختلفة.<sup>9</sup> أما الصبغات الكيميائية فهي عبارة عن مواد عضوية ملونة تكون في الغالب أملاحاً وتمتلك من الخواص بحيث تستطيع الأنسجة إمساكها بثبات ولا يمكن إزالتها منها حتى عند استخدام مذيبات المادة العضوية نفسها، وذلك لأن جميع الصبغات تكون محتوية على مجموعتين أساسيتين، هما: مجموعة ذرية مرتبطة باللون تدعى حاملات اللون (Chromophores) وتكون عديمة اللون، ومجموعة لها القابلية على ربط المركبات الكيميائية للصبغات مع الأنسجة وتعرف بماسكات اللون (Auxochromes) ووظيفتها تعزيز وتكثيف وعميق اللون،<sup>10</sup> وقد تبين أن صبغة الأنثوسيانين تمتلك هاتين المجموعتين مما يجعلها تحافظ، وبنجاح، على ثباتية الألوان التي تمتاز بها.<sup>11,12</sup>

كما أن هذه الصبغة تعتبر من أصناف الكيميائية النباتية، وعادة ما تكون موجودة في السوائل التي تجري حول خلايا النباتات وفيها، ولا سيما في الزهور والفاكهة والخضر، كالعنب والبرتقال والشاي والثوم وغيرها من النباتات الأخرى. ومن أكثر المصادر التجارية شيوعاً لهذه الصبغة (E163)، مستخلص ثمرة جلد العنب، والملفوف الأحمر، والتوت، والكرز، والخوخ، وفي الجزر الغامق واللهاة الحمراء والبطاطا البنفسجية.<sup>13,14</sup> وقد تميزت هذه الصبغة في عصر الرمان الغامق بوفرتها قياساً بمحتواها في النباتات الأخرى.<sup>15</sup> عادة ما يتم استخلاصها بالماء أو بالإيثانول أو بالميثانول.<sup>14</sup> وحالياً هناك عدة طرق لاستخلاصها، من أهمها: استخلاص السوائل الصلبة (Solid Liq-uid Extraction, SLE)، واستخلاص السوائل فوق الحرجة (Supercritical Fluid Extraction, SFE)، والاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية (Ultrasound Assisted Extraction, UAE)، واستخلاص السائل المضغوط (Pressurized Liquid Extraction, PLE)، والاستخلاص بمساعدة الميكروويف (Microwave Assisted Extraction, MAE).<sup>16</sup>

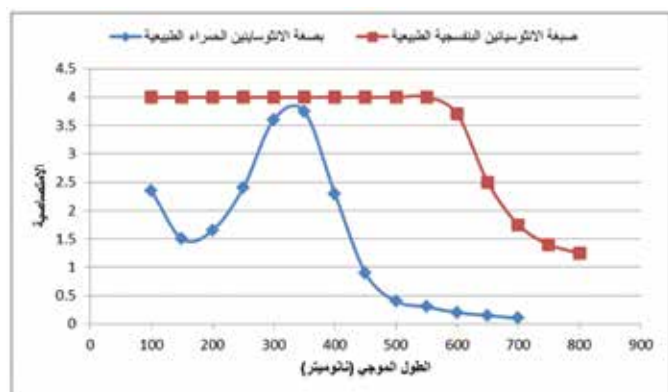
ونظراً إلى عدم وجود دراسة بحثية تبين أهمية هذه الصبغة في صبغ مسحات البكتيريا والمقاطع النسيجية، بنوعها الحيوانية والنباتية، فضلاً عن الأنسجة القطنية والصوفية، لذلك تهدف هذه الدراسة إلى استخدام صبغة الأنثوسيانين بلونها الأحمر والبنفسجي المستخلصين من عصر الرمان واللهاة، على التعاقب، كصبغة طبيعية بديلة من الصبغات الكيميائية

ذلك غالبًا إلى تغيير التركيب الجزيئي لها بسبب الطبيعة الأيونية لهذه الصبغة وما تسببه من اختلاف في قيم الأس الهيدروجيني.<sup>26,27</sup>



الشكل 1. التركيب الكيميائي لصبغة الأنثوسيانين في الأوساط الحامضية والمتعادلة والقاعدية.<sup>25</sup>

وعند قياس تركيز الصبغة في كل مستخلص بجهاز (UV-vis Spectro-) photometer، تبين أن صبغة الأنثوسيانين الحمراء بلغت أقصى امتصاصية لها (3.82) عند الطول الموجي 525 نانومترًا، في حين وصلت امتصاصية صبغة الأنثوسيانين البنفسجية 4.0، وذلك عند مدى واسع من الطول الموجي 575-216 نانومترًا، انظر الشكل (2).



الشكل 2. امتصاصية صبغة الأنثوسيانين الحمراء الطبيعية وصبغة الأنثوسيانين البنفسجية الطبيعية عند الأطوال الموجية المختلفة باستخدام جهاز (UV-Vis Spectrophotometer).

المنحنى قيم امتصاصية الصبغة في كلا المستخلصين وقُدرت كميتها بوحدة ملغم/ 100 مل من عصير كل نبات.

## 8-2 صبغ العينات

### 1-8-2 صبغ مسحات من البكتيريا

تم تحضير مسحة من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام والنامية في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) مدة 24 ساعة، وذلك بأخذ جزء صغير يطلق عليه (Loopful)، تعادل 0.01 مل، من كل بكتيريا وفرشها على سطح شريحة زجاجية نظيفة، وتُركت بجو المختبر لتجف، ثم تم تثبيتها ولصقها بتمريرها ثلاث مرات على لهب مصباح غازي، ثم صبغت بطريقة غرام (Gram method)<sup>20</sup> المتكونة من الصبغتين المتعاكستين البنفسج البلوري والصفرايين كصبغة قياسية، وصبغت مسحات أخرى بصبغة الأنثوسيانين الطبيعية وبلونها البنفسجي والأحمر، باستخدام كبريتات النحاس كمثبت لصبغة الأنثوسيانين البنفسجية، واليود كمثبت لصبغة الأنثوسيانين الحمراء.

### 2-8-2 صبغ المقاطع النسيجية

تم صبغ المقاطع النسيجية لكبد الفارة المخبرية والمقاطع النسيجية لساق النبات والمحصرة باستعمال الشمع كوسط تشريب، وطُمرت ثم صبغت المقاطع الحيوانية بصبغتي الهيماتوكسلين القاعدية والأيوسين الحامضية، وصبغت المقاطع النباتية بصبغة أزرق الميثيلين والفوكسين الحامضي<sup>21</sup> كعينات قياسية، في حين صبغت مقاطع أخرى بصبغة الأنثوسيانين الطبيعية وبلونها البنفسجي والأحمر، وذلك بتركها في كل لون مدة 24 ساعة فيها، وباستخدام كبريتات النحاس كمثبت للصبغة الأولى، والأيودين كمثبت للصبغة الثانية.

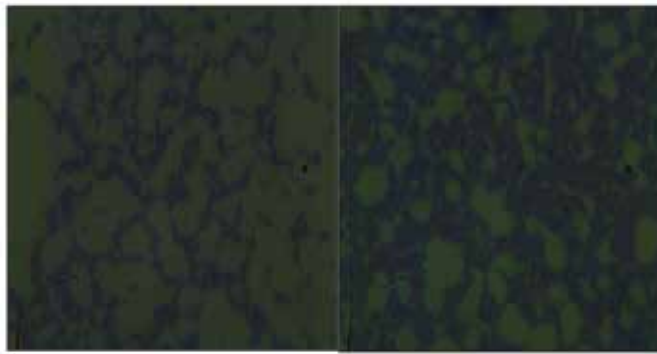
### 3-8-2 صبغ الأنسجة القطنية والصفوية

غُسلت الأنسجة القطنية والصفوية بمحلول مكون من 0.5 غم/ لتر كربونات الصوديوم و2 غم/ لتر عديد السوربات 80 (Polysorbate 80)، عند درجة حرارة 50°م، ومدة 25 دقيقة، ثم غُسلت بماء الحنفية الجاري، وتُركت لتجف في درجة حرارة المختبر، ثم غُمرت بماء نظيف مدة نصف ساعة،<sup>22,23</sup> ونقلت بعدها إلى حاوية زجاجية تحتوي على صبغة الأنثوسيانين الطبيعية بلونها البنفسجي والأحمر، كل على حدة، مع إضافة عدة قطرات من صودا الخبز وعصير الليمون للصبغة الأولى والثانية، على التعاقب، كمثبت، وتُركت في كل منها مدة ساعة، ثم غُسلت بماء بارد وتُركت لتجف بدرجة حرارة المختبر.

## 3- النتائج والمناقشة

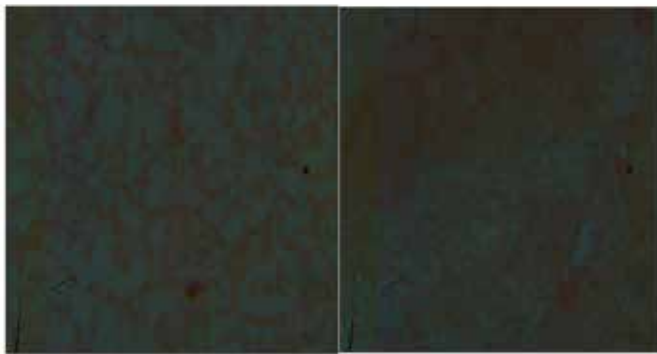
في هذه الدراسة، استُخلصت صبغة الأنثوسيانين مائيًا من بذور الرمان وأوراق اللهاة البنفسجية وذلك لأن الماء ليس له أي تأثير سُمّي، كما يمكن تبخيرها عند درجات الحرارة المنخفضة من دون التأثير في التركيب الكيميائي للصبغة المستخلصة.<sup>24</sup> أظهرت نتائج الدراسة أن الصبغة الحمراء الطبيعية والمستخلصة من بذور نبات الرمان كانت حامضية الوسط، بينما الصبغة البنفسجية المستخلصة من أوراق نبات اللهاة البنفسجية كانت ذات حامضية ضعيفة بدلالة قياس الأس الهيدروجيني لها، الذي بلغ 3.0 و6.2، لكليهما على التعاقب، وهذا مطابق لدراسة<sup>2</sup> فإن لون صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تعتمد على الأس الهيدروجيني لها، فتظهر بلون أحمر عند (pH<3) وبلون بنفسجي عند (pH=7-8)، لذلك يتغير لونها من الأحمر الزاهي إلى الأزرق عند زيادة أعداد مجموعة الهيدروكسيل القاعدية (pH>11)، انظر الشكل (1)،<sup>25</sup> ويُعزى





(A)

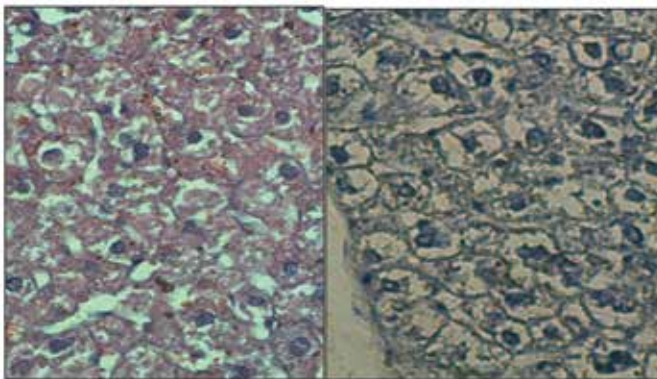
(B)



(C)

(D)

**الشكل 4.** صبغ البكتيريا بصبغتي الأنثوسيانين وصبغة غرام (100x)  
(A): بكتيريا (*Staphylococcus aureus*) موجبة لصبغة غرام؛ (B): بكتيريا (*Staphylococcus aureus*) أخذت لون صبغة الأنثوسيانين البنفسجية؛ (C): بكتيريا (*Pseudomonas aeruginosa*) سالبة لصبغة غرام؛ (D): بكتيريا (*Pseudomonas aeruginosa*) أخذت صبغة الأنثوسيانين الحمراء.



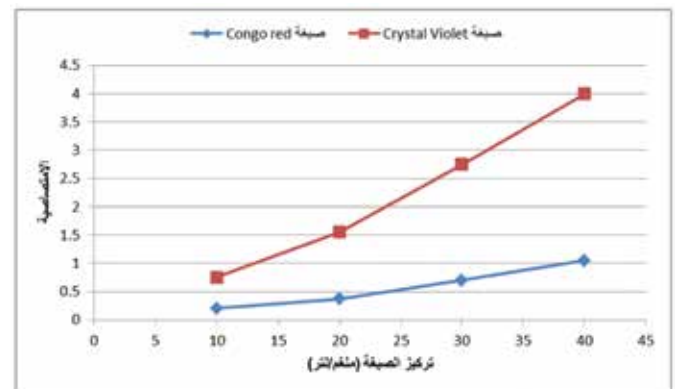
(A)

(B)

**الشكل 5.** صبغ مقاطع نسيج كبـد الفـارة المختبرية.  
(A): بصبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين (40x)؛ (B): بصبغة الأنثوسيانين الحمراء والبنفسجية (40x)

يُعزى هذا الاختلاف في الامتصاصية غالبًا إلى اختلافهما في الأس الهيدروجيني وتأثيره المباشر في ما تعانيه هذه الصبغات من تغييرات عكسية في تركيبها الكيميائي.<sup>9</sup> وقد أشارت بحوث عديدة إلى أن امتصاصية هذه الصبغة تكون على الأغلب عند الطول الموجي 525 نانومترًا،<sup>28,29</sup> والذي ظهر لدينا أثناء قياسه بجهاز المطياف الضوئي كما هو مذكور سابقًا.

وعند استخدام الصبغات الكيميائية كصبغات قياسية وبأوزان معينة وعند الطول الموجي ذاته (525 نانومترًا)، انظر الشكل (3)، بلغت كمية الصبغة الحمراء والبنفسجية 130 و 035 ملغم/ 100 مل (لأنه تم تخفيف الصبغة 10 مرات) من عصير كل نبات على التعاقب، بينما بلغت هذه الصبغة المستخلصة من الرمان في دراسات أخرى 364 ملغم/ 100 غم،<sup>15</sup> وتراوح ما بين 28-447 ملغم/ لتر،<sup>30</sup> وفي أوراق اللهاة البنفسجية غامقة اللون بلغت 134 ملغم/ 100 غم،<sup>31</sup> علمًا أن هذا التباين يرجع إلى الاختلاف في شدة اللون الذي كلما اشتد يعني زيادة في كمية الأنثوسيانين،<sup>15,31</sup> كما وجدت هذه الصبغة بمحتوى عالٍ (52 ملغم/ 100 مل) في عصير (Crowberry).<sup>32</sup>



**الشكل 3.** المنحنى القياسي لأربعة تراكيز مختلفة من صبغتي (Congo Red) و (Crystal Violet) عند الطول الموجي 525 نانومترًا.

وبعد معاملة مسحات البكتيريا (الشكل 4) والمقاطع النسيجية الحيوانية (الشكل 5) والنباتية (الشكل 6) بالصبغات الكيميائية، تبين أن جميع أجزاء الخلايا قابلة للاصطبـاغ بمعظم الصبغات، لأن الأساس في عملية تصبـيغ الأنسجة، سواء كانت حية أم ميتة، يتضمن غمر الأنسجة في محاليل الصبغات وتركها فترة زمنية يتم خلالها اتحاد بعض مكونات الأنسجة مع أيونات الصبغات منتجة ألوانًا معينة، ويُعزى سبب ذلك إلى تعادل الشحنات المحمولة على الصبغات مع شحنات الجزيئات المصبوغة، لذلك فإن صبغة الهيماتوكسيلين القاعدية تميل إلى الارتباط بجزيئات الأنسجة التي تحتفظ بشحنات سالبة، مثل جزيئات الحامض النووي. وعلى العكس من ذلك، فإن معظم جزيئات البروتين في السايـتوبلازم تحتفظ بشحنات موجبة، لذلك فإن صبغة الأيوسين الحامضية تميل إلى الارتباط بجزيئات البروتين،<sup>10</sup> لذلك ظهرت النواة بلون غامق، والسايـتوبلازم بلون وردي، بينما فشلت صبغة الأنثوسيانين الطبيعية بلونها الأحمر والبنفسجي بعملية التصبـيغ إلا بعد استخدام المرسخ (Mordant)، وقد يعود ذلك إلى أن قسمًا من الصبغات لا يمكنه الاتحاد بثبات وبصورة مباشرة مع الأنسجة أو الخلايا إلا بوجود بعض المواد الوسيطة، وعادة تكون أملاحًا معدنية مثل (Sn و Fe و Cu و Mg و K)<sup>33,34</sup>، لأنها تعزز التفاعل ما بين النسيج والصبغة بواسطة ارتباطها بمجموعة الهيدروكسيل الحرة عند الحلقة (B) (الشكل 7)،<sup>35</sup> لتعمل على زيادة اتحاد ألوان الصبغات بالأنسجة، ويطلق على هذه المواد «المرسـخات»، والتي تتحد، من جهة، مع أجزاء الأنسجة أو الخلايا، ومن جهة أخرى، فإن ألوان الصبغات تلتصق على سطوح هذه المرسـخات، وبذلك يكون موقع المرسـخ وسطًا بين لون الصبغة والأنسجة المصبوغة.<sup>36,37</sup>



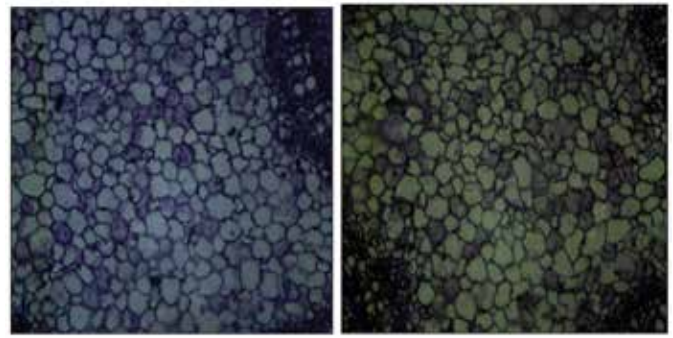
**الشكل 8.** صبغ الأقمشة الصوفية\* والقطنية\*\* بصبغتي الأنثوسيانين الحمراء والبنفسجية.  
\*المستوية أفقيًا: من القماش الصوفي؛ \*\*المستوية عموديًا: من القماش القطني.

#### 4- الاستنتاجات

تبين لنا سهولة استخلاص هذه الصبغة من النباتات وبتراكيز جيدة، فضلاً عن قلة تكلفة الاستخلاص، ووفرة المواد المثبتة للصبغة وبأسعار زهيدة، وأخيراً فإن نجاح استخدامها لصبغ المقاطع النسيجية الحيوانية والنباتية ومسحات البكتيريا والأقمشة الصوفية والقطنية، سيشجع مستقبلاً لاستخدامها على المستويين التعليمي للطلبة والتجاري بدلاً من الأصباغ الصناعية الضارة بالصحة العامة.

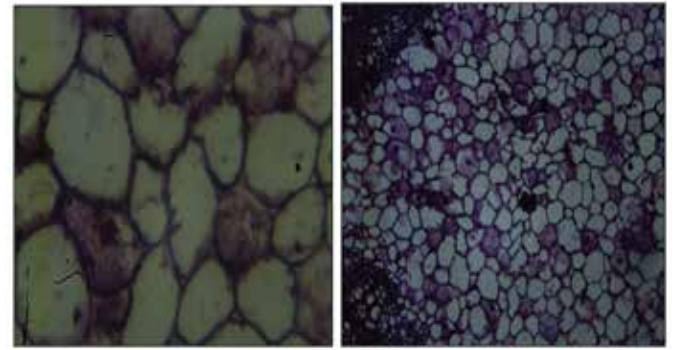
#### 5- التوصيات

- عزل الصبغة المستخلصة بطريقة قمع الفصل وتنقيتها بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography, TLC) وكروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (High-performance liquid chromatography, HPLC)، وباستخدام الصبغات الكيمائية كمحاليل قياسية.
- التأكد من هوية الصبغة المستخلصة بطريقة تحديد درجة انصهارها ودرجة غليانها، فضلاً عن تحديد تركيبها بجهاز (IR) وتجفيفها بجهاز التجفيد الجاف (Lyophilizer) لاستخدامها كمسحوق بتركيز مدروس.
- تطبيقها على بعض الحالات المرضية باعتبارها مواد مؤكسدة.



(A)

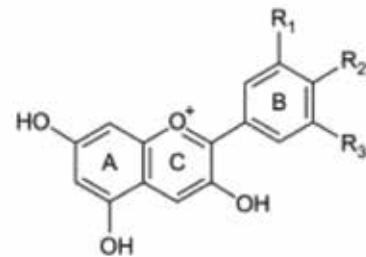
(B)



(C)

(D)

**الشكل 6.** صبغ مقاطع ساق النبات.  
(A): صبغة أزرق المثلين (25x)؛ (B): صبغة الأنثوسيانين البنفسجية (25x)؛ (C): صبغة الفوكسين الحامضية (40x)؛ (D): صبغة الأنثوسيانين الحمراء (25x)



**Basic chemical structure of anthocyanins**

**الشكل 7.** موقع الحلقة (B) في تركيب صبغة الأنثوسيانين.<sup>35</sup>

من ناحية أخرى لوحظ أن هذه الصبغة بلونها الأحمر والبنفسجي نجحت في النفاذ إلى داخل الأنسجة القطنية والصوفية (الشكل 8)، ولم تثبت الصبغة بعد غسل هذه الأنسجة بالماء إلا عند إضافة بضع قطرات من عصير الليمون أو الصودا كمرسخ إلى الصبغة، ويرجع ذلك إلى تكوين معقد ما بين الصبغة والمرسخ والذي وفر الحماية لماسك اللون من تحطيمه بعمليات التحلل المختلفة،<sup>38</sup> وبعبارة أخرى فإن هذا المعقد يمنع ذوبان الصبغة عند غسل النسيج المصبوغ بها بالماء ويعمل على ثبات اللون وترسيخه داخل النسيج.<sup>23,39</sup>

1. Jackman RL, Smith JL. Anthocyanins and betalains. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. Natural food colorants. 2nd ed. London: Blackie; 1996. pp. 244–309.
2. Vukosavljević P, Bukvić B, Janković M, Mašović S. Change of anthocyanins content during raspberry extraction. Journal of Agricultural Sciences. 2003;48(1):85–102.
3. Chigurupati N, Saiki L, Gayser C, Dash AK. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. International Journal of Pharmaceutics. 2002;241(2):293–299.
4. Lebling RW, Pepperdine D. Natural remedies of Arabia. Saudi Aramco World. 2006;57(5):12–21.
5. Zhou H, Wu L, Gao Y, Ma T. Dye-sensitized solar cells using 20 natural dyes as sensitizers. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2011;219(2–3):188–194.
6. Clifford MN. Anthocyanins – Nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000;80(7):1063–1072.
7. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 2003;64(5):923–933.
8. Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, et al. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. Free Radical Research. 2003;37(8):891–900.
9. Harborne JB, Grayer RJ. The anthocyanins. In: Harborne JB, editor. The flavonoids. London: Chapman and Hall; 1988. pp. 1–20.
10. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone; 4th Ed., 2007. pp. 744.
11. Dangles O, Saito N, Brouillard R. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. Journal of the American Chemical Society. 1993;115(8):3125–3132.
12. Kallio H, Pallasaho S, Kärppä J, Linko RR. Comparison of the half-lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, *Empetrum nigrum*. Journal of Food Science. 1986;51(2):408–410.
13. محمد، سعيد حميد. التأثيرات الحيوية للأنثوسيانينات المستخلصة من ثمرة البرتقال في بعض أنواع البكتيريا. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. 117-110:(3)27:2014.
14. المضافات الغذائية: صبغة الأنثوسيانين. مجلة اخبار الخليج (البحرين، 1437هـ)، العدد 13934.
15. Zhu F, Yuan Z, Zhao X, Yin Y, Feng L. Composition and contents of anthocyanins in different pomegranate cultivars. Acta Horticulturae. 2015;1089:35–41.
16. Silva S, Costa EM, Calhau C, Morais RM, Pintado ME. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017;57(14):3072–3083.
17. Liu X, Xiao G, Chen W, Xu Y, Wu J. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004;2004(5):326–331.
18. Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. Food Chemistry. 2008;110(3):782–786.
19. Sondheimer E, Kertesz ZI. The anthocyanin of strawberries. Journal of the American Chemical Society. 1948;70(10):3476–3479.
20. Black J.G. Microbiology: principles and applications. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall; 1993.
21. Al-Hajj HA. Light microscopic techniques: Theory and practice. Amman, Jordan: Jordan Book Center; 1998.
22. Salam MA, Salam A. Study on color fastness properties onto bleached sulfonated jute-cotton blended fabrics with basic dyes. Journal of Textile and Apparel, Technology and Management. 2005;4(4):1–6.
23. Adeel S, Ali S, Bhatti, IA, Zsila F. Dyeing of cotton fabric using pomegranate (*Punica granatum*) aqueous extract. Asian Journal of Chemistry. 2009;21(5):3493–3499.
24. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. African Journal of Biotechnology. 2008;7(12):1797–1806.
25. Mortazavi SM, Kamali Moghaddam M, Safi S, Salehi R. Saffron petals, a by-product for dyeing of wool fibers. Progress in Color, Colorants and Coatings. 2012;5(2):75–84.
26. Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins. In: Markakis P, editor. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press; 1982. pp. 1–40.
27. von Elbe JH, Schwartz SJ. Colorants. In: Fennema OR, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1996. pp. 651–722.
28. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. Journal of the AOAC International. 2005;88(5):1269–1278.
29. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, editor. Handbook of analytical food chemistry. New York: John Wiley; 2005. pp. 19–31.
30. Türkyılmaz M. Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from registered varieties in Turkey. International Journal of Food Science and Technology. 2013;48(10):2086–2095.
31. Al-Abdulla By, Oleiwi SD. Estimation of some phytochemicals in extract of eggplant peels and cabbage leaves and using of pigment of them in drinks industry. Mesopotamia Journal of Agriculture. 2019;47(2):128–138.
32. Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division, PhD Thesis; 2005.



33. Starr MS, Francis FJ. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *Journal of Food Science*. 1973;38(6):1043–1046.
34. Markakis P. Stability of anthocyanins in foods. In: Markakis P, editor. *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press; 1982. p. 163–178.
35. Valavanidis A, Vlachogianni T. Plant polyphenols: Recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2013;39:269–295.
36. Osawa Y. Copigmentation of anthocyanins. In: Markakis P, editor. *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press; 1982. pp. 41–65.
37. Kulkarni SS, Gokhale AV, Bodake UM, Pathade GR. Cotton dyeing with natural dye extracted from pomegranate (*Punica granatum*) peel. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. 2011;1(2):135–139.
38. Goodarzian H, Ekrami E. Wool dyeing with extracted dye from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel. *World Applied Sciences Journal*. 2010;8(11):1387–1389.
39. Jothi D. Extraction of natural dyes from African marigold flower (*Tagates ereectal*) for textile coloration. *AUTEX Research Journal*. 2008;8(2):49–53.

## ورقة بحثية

# تقدير فعالية إنزيم (nitrate reductase) باستخدام دقائق الفضة النانوية المخلقة حيويًا من الفطرين (*Pleurotus pulmonarius*) و(*Pleurotus ostreatus var ostreatus*) وتأثيرها على الفطر (*Pythium aphanidermatum*)

سيف سعدالله حسن<sup>1\*</sup>، عبد الله عبد الكريم حسن<sup>2</sup>

<sup>1</sup> مركز البحوث الزراعية، بغداد، العراق  
<sup>2</sup> كلية الزراعة، جامعة تكريت، تكريت، العراق  
saifnassrei@gmail.com\*

## الملخص

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم وقاية النبات بكلية الزراعة في جامعة تكريت خلال الموسم 2019/2018، بهدف دراسة فعالية إنزيم «اختزال النترات» (Nitrate reductase) باستخدام أربعة تراكيز (0.5 و 1 و 1.5 و 2 ملي مول) من دقائق الفضة النانوية المخلقة حيويًا من الفطرين الغذائيين (*Pleurotus pulmonarius*) و(*Pleurotus ostreatus var ostreatus*). لكل فطر أربعة أجزاء، هي راسح الفطر، والكتلة الحيوية، والمستخلص المائي الحار والبارد للكتلة الحيوية للفطر، ودراسة تأثير جسيمات الفضة النانوية على الفطر (*Pythium aphanidermatum*). أظهرت كافة تراكيز وأنواع جسيمات الفضة النانوية المحضرة أعلى فعالية لإنزيم (Nitrate reductase) مقارنة بمعاملة الشاهد (تركيز صفر) وهو ماء مقطر، وبلغت أعلى فعالية عند تركيز 1.5 ملي مول في رواسح الفطريات، إذ بلغت 0.65 و 0.66 وحدة/ مل للفطرين (*P. pulmonarius*) و(*P. ostreatus var ostreatus*) تلتها المعاملة المؤلفة من المستخلص المائي البارد للتركيز نفسه، إذ بلغت 0.55 و 0.56 وحدة/ مل، على التوالي، مع عدم وجود فروق معنوية بينهما. في حين أظهرت المعاملة المؤلفة من راسح الفطر فرقًا معنويًا مع باقي المعاملات، إذ بلغت أعلى فعالية إنزيمية للفطرين عند 0.32 و 0.43 وحدة/ مل، على التوالي، مقارنة بمعاملة المستخلص المائي الحار التي أظهرت أدنى فعالية إنزيمية، فبلغت 0.11 و 0.24 وحدة/ مل، على التوالي. كما أظهرت النتائج المخبرية عدم تسجيل فروق معنوية لتراكيز جسيمات الفضة النانوية في نسب انبات بذور القمح (صنف شام 6) لكافة تراكيز وأنواع جسيمات الفضة النانوية المحضرة إذ بلغت أعلى نسبة انبات 97.38% لمعاملة الكتلة الحيوية للفطر *P. pulmonarius* فيما سجل الفطر *P. ostreatus var ostreatus* أعلى نسبة أنبات عند معاملة المستخلص المائي البارد إذ بلغت 97.20%.

الكلمات المفتاحية: إنزيم (Nitrate reductase)، جسيمات الفضة النانوية، (*Pleurotus spp*)، بذور القمح.

## Title

**Assessing the efficacy of the enzyme nitrate reductase using silver nanoparticles biosynthesis by an edible mushroom *pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus var ostreatus* and its effect on *Pythium aphanidermatum***

Saif Saadallah Hassan<sup>1\*</sup>, Abdullah Abdulkrim Hassan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Research Center, Baghdad, Iraq

<sup>2</sup> College of Agriculture, Tikrit University, Tikrit, Iraq

Received 23 August 2020; accepted 18 January 2021; published 30 April 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Hassan SS & Hassan A. Assessing the efficacy of the enzyme nitrate reductase using silver nanoparticles biosynthesis by an edible mushroom *pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus var ostreatus* and its effect on *Pythium aphanidermatum*. Arabian Journal of Scientific Research 2021;1.3. <https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.3>

## Abstract:

This study was conducted in the laboratories of the Plant Protection Department, College of Agriculture at Tikrit University during the season 2018/2019. The study aimed at studying the effectiveness of nitrate reductase using four concentrations (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0) mmol of biosynthetic silver nanoparticles created from the fungi *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus* var *ostreatus*. Each fungus has four parts, including the filtrate of the fungus, the biomass, the hot and cold aqueous extract of the biomass of the fungus and its effect on *Pythium aphanidermatum*. All the concentrations and types of the prepared silver nanoparticles showed the highest efficacy of the nitrate reductase enzyme compared to the control. The highest activity was obtained at the concentration of 1.5 mmol in fungi filtrates, it was 0.65 and 0.66 units/ml for fungi *p. pulmonarius* and *p.ostreatus* var *ostreatus*, followed by the treatment consisting of cold aqueous extract of the same concentration which reached 0.55 and 0.56 units/ml, respectively with no significant differences between them. As for the treatment consisting of the fungus filtrate, this showed a significant difference with the rest of the treatments: The highest enzymatic activity of the fungi reached 0.32 and 0.43 units/ml respectively, compared with the treatment of hot water extract, which showed the lowest enzymatic activity, reaching 0.11 and 0.24 units/ml. The laboratory results did not show significant differences of silver nanoparticles in wheat seeds germination (Variety Sham6) for all concentrations and types of nanoparticles prepared. Whereas the highest germination percentage (97.38%) was for *Pythium aphanidermatum* biomass while *P.ostreatus* var *ostreatus* had highest germination percentage for cold aqueous extract which reached 97.20%.

**Keywords:** Nitrate reductase, silver nanoparticles biosynthesis, *pleurotus pulmonarius*, wheat seed

## 1- المقدمة

## 2- مواد البحث وطرقه

تم الحصول على جسيمات الفضة النانوية من مختبرات قسم وقاية النبات/ جامعة تكريت، المحضرة باستخدام الفطرين الغذائيين (*Pleurotus pulmonarius*) و (*Pleurotus ostreatus* var *ostreatus*)<sup>8</sup>.

### 1-2 محاليل تقدير إنزيم (Nitrate reductase)

- تحضير محلول (A): حُضِر المحلول من 30 ملي مول من نترات الفضة ( $\text{AgNO}_3$ ) مع 25 مل (Propanol) تركيز 5% في لتر من (Phosphate buffer).
- تحضير محلول (B): حُضِر المحلول من (58 ملي مول Sulphanilamide و 0.05 ملي مول (N-(1-naphthyl)ethylene diamine dihydrochloride) ومختصره (NEED)<sup>9</sup>.

### 2-2 تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من أنواع الفطر الغذائي (*Pleurotus*) في نسبة إنبات بذور القمح

عوملت بذور القمح (صنف شام 6) بتراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة سابقاً<sup>8</sup> لأربع معاملات هي راشح الفطر والمستخلص المائي الحار والبارد للكتلة الحيوية والكتلة الحيوية للفطر، ولكل معاملة خمسة تراكيز هي (0 و 0.5 و 1 و 1.5 و 2 ملي مول) وبواقع ثلاثة مكررات. نقتع بذور القمح بجسيمات الفضة النانوية حسب المعاملات والتراكيز المذكورة بعد وضعها في أنابيب مدة ساعتين، ثم نقلت بذور القمح إلى أطباق بتري المحتوية على أوراق ترشيح مرطبة بالماء، ثم وُضعت الأطباق في الحاضنة في درجة حرارة 25 °م، تمت متابعة الأطباق وسُجلت النسبة المئوية للإنبات وفقاً للمعادلة:

$$\text{نسبة الإنبات \%} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور الكلي}} \times 100$$

### 2-3 تقدير فعالية إنزيم (Nitrate reductase)

قُدرت فعالية إنزيم (Nitrate reductase) بإضافة 2.5 مل من تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة سابقاً لكل من الراشح الفطري، والمستخلص المائي الحار والبارد للكتلة الحيوية، للفطرين (*Pleurotus pulmonarius*) و (*Pleurotus ostreatus* var *ostreatus*) إلى 2.5 مل من محلول (A) المحضر سابقاً عند (pH 7.5) وبواقع ثلاثة مكررات، وحُضِن المزيج في درجة

يحتل محصول القمح مكانة عالية من حيث المساحة المزروعة والإنتاج، إذ قدرت المساحة المزروعة عالمياً بما يقارب 220 مليون هكتار، بينما وصل الإنتاج العالمي ما يقارب 682 مليون طن<sup>1</sup>. ويُعدّ ازدياد إنتاج القمح تحدياً للعالم لتلبية الاحتياجات الغذائية لسكانه<sup>2</sup>. وتحتاج هذه الزيادة إلى وسائل آمنة للبيئة وذات تكلفة اقتصادية منخفضة، وفي هذا السياق تعد تقنية النانو في المجال الزراعي من أهم الآليات في الزراعة الحديثة، إذ يهدف تطبيق المواد النانوية في المجال الزراعي، على وجه الخصوص، إلى تقليل تطبيقات وقاية النبات، وتقليل خسائر المغذيات، وزيادة إنتاج المحاصيل من خلال تحسين إدارة المغذيات<sup>3</sup>. توصل العلماء إلى إيجاد طريقة للتوليف الحيوي عُرفت بالبناء الأخضر (Green synthesis)، تمتاز بكونها صديقة للبيئة وتقوم بإنتاج مواد مختزلة ومثبتة للجسيمات النانوية، فضلاً عن توفير جسيمات نانوية ثابتة الحجم ومستقرة<sup>4</sup>. وتجري آلية إنتاج جسيمات الفضة النانوية باستعمال المستخلص الفطري لاختزال الفضة إلى جزيئات معدنية وتكوين الجزيئات النانوية، وللتأكد من أن التفاعل قد تم وأن جزيئات الفضة النانوية قد تكونت، يجب ملاحظة تغير لون التفاعل من أصفر باهت إلى بني، مقارنة بالمحلول الذي يحتوي على مستخلص الكتلة الحيوية للفطر من دون نترات الفضة ( $\text{AgNO}_3$ )<sup>5</sup>. يحدث تفاعل الاختزال عن طريق إنزيم (Nitrate reductase) الذي يتحرر من الفطر في محلول مستخلص الكتلة الحيوية، فيختزل نترات الفضة إلى جزيئات الفضة النانوية<sup>6</sup>. ويعد إنزيم (Nitrate reductase)، المنطلق من محلول جسيمات الفضة المخلقة من الكائنات الحية الدقيقة كالفطريات، أحد أهم العوامل في تخليق جسيمات الفضة النانوية. وقد أظهرت الدراسات أن الإنزيمات المعتمدة على (NADH) و (NAD)، وخاصةً (Nitrate reductase)، هي عوامل مهمة في التخليق الحيوي للجسيمات النانوية المعدنية أثناء عملية الاختزال<sup>7</sup>. لذا تهدف هذه الدراسة إلى:

- تقدير فعالية إنزيم (Nitrate reductase) وعملية اختزاله باستخدام تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطرين (*Pleurotus pulmonarius*) و (*Pleurotus ostreatus* var *ostreatus*).
- دراسة تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية في إنبات بذور نبات القمح (صنف شام 6).
- تقييم كفاءة جسيمات الفضة النانوية في تثبيط الفطر الممرض (*Pythium aphanidermatum*).

## 5-2 التحليل الإحصائي

طبقت تجارب البحث حسب التصميم العشوائي الكامل (RCBD) بتجربة عاملية، وحلت النتائج باستخدام (Statistical Analysis System, SAS) (2012)، وتمت المقارنة بين المتوسطات حسب أقل فرق معنوي (L.S.D<sub>0.05</sub>)<sup>10</sup>.

## 3- النتائج والمناقشة

### 1-3 تقدير فعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستخدام تراكيز جسيمات

#### الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. pulmonarius*)

تشير النتائج في الجدول (1) لفعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستعمال تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. pulmonarius*)، إلى تفوق معاملة راشح الفطر بشكل معنوي، إذ بلغت 0.32 وحدة/ مل، على باقي المعاملات، في حين أبدت معاملة المستخلص المائي الحار أدنى فعالية إنزيمية، إذ بلغت 0.11 وحدة/ مل، كما تشير النتائج إلى زيادة فعالية الإنزيم لجميع المعاملات بزيادة التركيز حتى 1.5 ملي مول، ثم انخفضت الفعالية عند التركيز 2 ملي مول، وكذلك تشير النتائج إلى تفوق التركيز 1.5 ملي مول في معاملة راشح الفطر على باقي التراكيز من المعاملات. كما أبدى التركيز 1.5 ملي مول أعلى معدل نشاط إنزيمي إذ بلغ 0.65 وحدة / مل للتداخل في معاملة راشح الفطر، تلاه التركيز نفسه من معاملة المستخلص المائي البارد، إذ بلغ 0.55 وحدة/ مل.

حرارة 25 م° مدة 60 دقيقة، ثم أضيف له 1.25 مل من المحلول (B) المحضر سابقاً لإيقاف التفاعل، مع ملاحظة تغير اللون إلى الوردي الغامق، بعدها تم قياس امتصاصية المحلول بطول موجي 540 نانومتراً باستعمال جهاز الطيف الضوئي، وفُدرت الفعالية الإنزيمية اعتماداً على الامتصاصية حسب المعادلة:

$$\text{الفعالية الإنزيمية (وحدة/ مليلتر)} = \frac{\text{الامتصاصية على طول موجي 540 نانومتراً}}{2.5 \times 60}$$

- زمن التفاعل = (60 دقيقة)
- محلول الإنزيم المضاف = (2.5 مليلتر).<sup>9</sup>

### 2-4 دراسة تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية على الفطر

#### (*P. aphanidermatum*)

تمت دراسة تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية في نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) وذلك من خلال وضع جزء من الفطر الممرض (قطره 1 سم) في منتصف أطباق تحتوي على الوسط الغذائي الصلب (PDA)، وعند نمو مستعمرة الفطر على بعد (1 سم) عوملت الأطباق بالتراكيز المختلفة لدقائق الفضة النانوية (0.5 و 1 و 1.5 و 2 ملي مول) من خلال عمل أربع حفر على بعد 2 سم من مستعمرة الفطر بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز. ثم وضعت التراكيز في الحفر بمقدار 0.1 مل، وحضنت في درجة حرارة 25 م°، وعند إكمال نمو الفطر في معاملة الشاهد (ماء مقطر بدل جسيمات الفضة النانوية) إلى نهاية الطبق، قيست المسافة من نهاية حافة المستعمرة إلى الحفر الحاوية على جسيمات الفضة النانوية (بالمليمتر).<sup>8</sup>

الجدول 1. فعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستعمال تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. pulmonarius*).

معدلات جسيمات الفضة النانوية	التراكيز (ملي مول)					معدلات المعاملات
	0	0.5	1	1.5	2	
راشح الفطر	0.071 <sup>efgh</sup>	0.15 <sup>efgh</sup>	0.26 <sup>def</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.48 <sup>abc</sup>	0.32 <sup>A</sup>
الكتلة الحيوية	0.034 <sup>gh</sup>	0.16 <sup>efgh</sup>	0.23 <sup>defg</sup>	0.41 <sup>bcd</sup>	0.25 <sup>def</sup>	0.21 <sup>C</sup>
المستخلص البارد	0.063 <sup>fgh</sup>	0.18 <sup>efgh</sup>	0.28 <sup>cde</sup>	0.55 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>bcd</sup>	0.30 <sup>B</sup>
المستخلص الحار	0.013 <sup>h</sup>	0.11 <sup>efgh</sup>	0.16 <sup>efgh</sup>	0.17 <sup>efgh</sup>	0.13 <sup>efgh</sup>	0.11 <sup>D</sup>
معدلات التراكيز	0.045 <sup>E</sup>	0.15 <sup>D</sup>	0.23 <sup>C</sup>	0.44 <sup>A</sup>	0.32 <sup>B</sup>	0.23

أقل فرق معنوي (L.S.D 0.05) للمعاملات 0.013 للتراكيز 0.017 التداخل 0.21

\* المتوسطات الأفقية والعمودية المتبوعة بالأحرف الكبيرة (A, B, C, D, E) غير مختلفة معنوياً؛ \*\* متوسطات التداخل المتبوعة بالأحرف الصغيرة (a, b, c, d, e) غير مختلفة معنوياً.

وحدة/ مل، تلاه التركيز نفسه من معاملة المستخلص المائي البارد للكتلة الحيوية 0.56 وحدة/ مل. وأبدت المعاملة المؤلفة من راشح الفطر تفوقاً معنوياً على باقي المعاملات، إذ سجلت أعلى فعالية إنزيمية 0.43 وحدة/ مل، وسجلت معاملة المستخلص الحار أدنى فعالية إنزيمية إذ بلغت 0.20 وحدة/ مل، كما توضح النتائج تفوق معاملة راشح الفطر على باقي المعاملات، وأن فعالية الإنزيم ازدادت لجميع المعاملات بزيادة التركيز حتى 1.5 ملي مول، ثم انخفضت الفعالية عند التركيز 2 ملي مول.

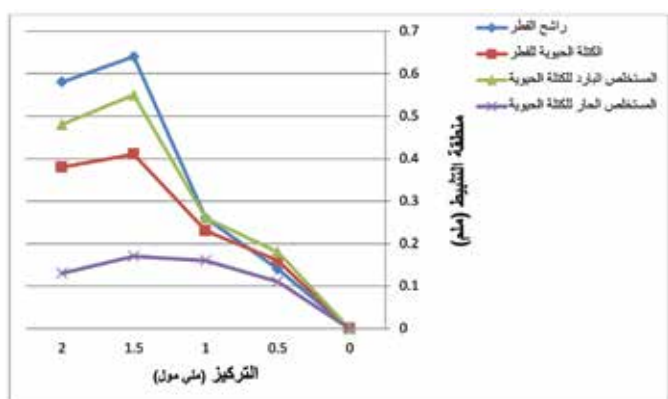
### 2-3 تقدير فعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستخدام تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. ostreatus var ostreatus*)

تشير النتائج في الجدول (2) لفعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستعمال تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. ostreatus var ostreatus*) إلى تفوق التركيز 1.5 ملي مول في معاملة راشح الفطر على باقي التراكيز من المعاملات، إذ أبدى أعلى معدل نشاط إنزيمي 0.66

الجدول 2. فعالية إنزيم (Nitrate reductase) باستعمال تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. ostreatus var ostreatus*).

معدلات المعاملات	التراكيز (ملي مول)					معاملات جسيمات الفضة النانوية
	2	1.5	1	0.5	0	
0.43 <sup>A</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.56 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>defgh</sup>	0.083 <sup>ghi</sup>	راشح الفطر
0.30 <sup>AB</sup>	0.47 <sup>abcd</sup>	0.51 <sup>abc</sup>	0.34 <sup>cdef</sup>	0.16 <sup>fghi</sup>	0.041 <sup>hi</sup>	الكتلة الحيوية
0.35 <sup>AB</sup>	0.45 <sup>abcd</sup>	0.56 <sup>ab</sup>	0.47 <sup>abcd</sup>	0.22 <sup>efghi</sup>	0.059 <sup>ab</sup>	المستخلص البارد
0.24 <sup>B</sup>	0.32 <sup>cdef</sup>	0.39 <sup>bcde</sup>	0.30 <sup>cdefg</sup>	0.18 <sup>efghi</sup>	0.034 <sup>i</sup>	المستخلص الحار
0.33	0.46 <sup>B</sup>	0.53 <sup>A</sup>	0.41 <sup>C</sup>	0.20 <sup>D</sup>	0.054 <sup>E</sup>	معدلات التراكيز
أقل فرق معنوي (L.S.D <sub>0.05</sub> ) للمعاملات 0.016 للتراكيز 0.017 التداخل 0.22						

\* المتوسطات الأفقية والعمودية المتبوعة بالأحرف الكبيرة (A, B, C, D, E) غير مختلفة معنوياً؛ \*\* متوسطات التداخل المتبوعة بالأحرف الصغيرة (a, b, c, d, e) غير مختلفة معنوياً.



الشكل 1. تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح والكتلة الحيوية والمستخلص الحار والبارد للفطر (*P. pulmonarius*) في تثبيط نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*).

### 4-3 تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح

والكتلة الحيوية والمستخلص الحار والبارد للفطر (*P. ostreatus var. ostreatus*)

تشير النتائج في الشكل (2) إلى تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح والكتلة الحيوية والمستخلص الحار والبارد للفطر (*P. ostreatus var. ostreatus*) في تثبيط نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*)، إلى أن هناك ارتفاعاً في نسبة التثبيط عند زيادة التركيز حتى 1.5 ملي مول، حيث أبدت المعاملة المؤلفة من الراشح الفطر تفوقاً واضحاً على باقي المعاملات، في حين أبدت المعاملة المؤلفة من المستخلص الحار أقل نسبة تثبيط من بين المعاملات. وتشير النتائج أيضاً إلى تفوق التركيز 1.5 ملي مول في معاملة الراشح الفطر على باقي التراكيز في جميع المعاملات إذ بلغ التركيز 1.5 ملي مول 0.68 ملم، مقارنة بمعاملة مستخلص الحار عند التركيز 0.5 ملي مول، إذ بلغ 0.20 ملم.

تشير النتائج في الجدول (2) إلى أن إنزيم (Nitrate reductase)، المنطلق من المحلول المخلق من الكائنات الحية الدقيقة كالفطريات، هو أحد أهم العوامل في تخليق جسيمات الفضة. وأظهرت الدراسات أن الإنزيمات المعتمدة على (NADH) و (NAD)، وخاصةً (Nitrate reductase)، هي عوامل مهمة في التخليق الحيوي<sup>7</sup>. وأثناء عملية الاختزال، يتم تحويل النترات إلى النترت، الذي بدوره يقوم بنقل الإلكترون إلى أيونات الفضة، ونتيجة لذلك تتحول أيونات الفضة إلى جسيمات الفضة النانوية<sup>14</sup>. ويرجع سبب تفوق الراشح الفطر كأعلى فعالية إنزيمية إلى أن الفطر ينتج الإنزيم بشكله الخارج-الخلوي (Extracellular) بشكل أعلى من الداخل-الخلوي، أما عن المستخلص البارد للكتلة الحيوية فظروف التبريد حافظت على فعالية الإنزيم؛ الأمر الذي أدى إلى أن كانت الفعالية الإنزيمية للمستخلص البارد أعلى من المستخلص الحار، الذي بدوره تأثرت فعاليته الإنزيمية بالحرارة، كون الإنزيم يتألف من بروتين وجزء معدني. ويرجع سبب انخفاض الفعالية الإنزيمية للكتلة الحيوية إلى محدودية إنتاج الإنزيم في وجود التراكيز المختلفة من نترات الفضة مقارنة براشح الفطر الذي يُنتج الإنزيم فيه من الفطر<sup>16,15</sup>.

### 3-3 تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح والكتلة الحيوية والمستخلص الحار والبارد للفطر (*P. pulmonarius*)

تشير النتائج في الشكل (1) لتأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح والكتلة الحيوية والمستخلص المائي الحار والبارد للفطر (*P. pulmonarius*) في تثبيط نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*)، إلى أن هناك ارتفاعاً في نسبة التثبيط عند زيادة التركيز حتى 1.5 ملي مول في جميع المعاملات، كما تبين النتائج تفوق جميع المعاملات في تثبيط الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) على معاملة المستخلص الحار للكتلة الحيوية للفطر، وتبين النتائج أيضاً أن الراشح الفطر سجل أعلى نسبة تثبيط عند تركيز 1.5 ملي مول، إذ بلغت 0.64 ملم، مقارنة بمعاملة المستخلص الحار عند التركيز 0.5 ملي مول، إذ بلغت 0.11 ملم.

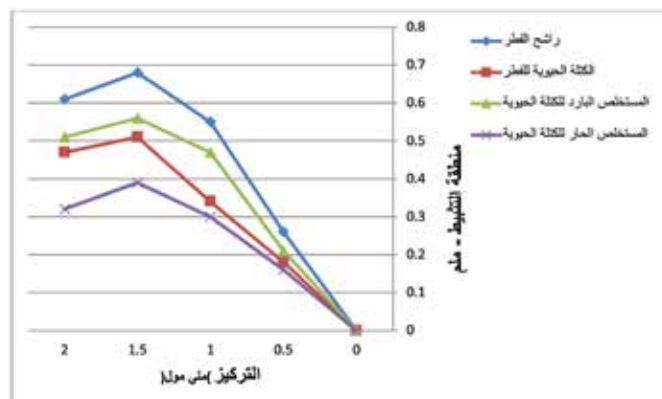


يرجع سبب تثبيط الفطر من قبل تراكيز جسيمات الفضة النانوية إلى أن جسيمات الفضة النانوية تمتلك القدرة بالتأثير على الحامض النووي (DNA) الفطر الممرض، وذلك بفقدان (DNA) قدرته على الاستنساخ والتضاعف، مما يؤدي إلى خلل في عملية استنساخ شريط الـ (DNA).<sup>17</sup> كذلك تمتلك القدرة على اختراق جدران خلايا الفطر.<sup>18</sup> وذلك لأن جسيمات الفضة النانوية لها القدرة على الالتصاق بجدران الخلايا الفطرية ومن ثم الاختراق وتحليل الجدر الخلوية وامتصاصها من خلال التفاعل مع العمليات الأيضية والحيوية داخل الفطر الذي يؤدي إلى التأثير في العمليات التنظيمية للبروتينات والإنزيمات الخاصة بالفطر، ومن ثم تثبيط الفطر، وأيضاً لها دور فعال في إلحاق الضرر بالبروتينات والدهون والأحماض النووية الخاصة بالخلايا الفطرية، كذلك يمكن للجسيمات النانوية أن ترتبط مباشرة بغشاء الخلية الفطرية، مما يؤدي إلى تحطيم الأبواغ والخيوط الفطرية والتراكيب التكاثرية للفطر الممرض.<sup>12</sup>

### 3-5 تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي

#### (*P. pulmonarius*) في نسبة إنبات بذور القمح (صنف شام 6)

تشير النتائج في الجدول (3) إلى تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. pulmonarius*) في نسبة إنبات بذور القمح (صنف شام 6) إلى عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات، وفي ما يتعلق بالتراكيز لم تظهر أي فروق معنوية في نسبة الإنبات بين جميع التراكيز المطبقة، أما بالنسبة إلى التداخل فقد تفوقت المعاملة بالمستخلص البارد للكتلة الحيوية للفطر عند التركيز 1.5 ملي مول بشكل معنوي على باقي المعاملات وبلغت نسبة الإنبات 97.92%.



الشكل 2. تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الراشح والكتلة الحيوية والمستخلص الحار والبارد للفطر (*P. ostreatus var. ostreatus*) في تثبيط نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*).

يوضح الشكل (3) عملية تثبيط الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) بواسطة تراكيز جسيمات الفضة النانوية المخلفة حيويًا باتباع طريقة الحفر، ويمثل الحرف (A) معاملة الشاهد التي توضح نمو الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) في أطباق بتري وعدم تأثره بالتركيز صفر (معاملة الشاهد) وهو الماء المقطر، بينما يمثل الحرفان (b) و (c) تأثير جسيمات الفضة النانوية في الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) عند التراكيز (1.5 و 2) ملي مول كما مشار في الفقرتين (3-3 و 3-4).



الشكل 3. (A) معاملة الشاهد؛ (b, c) تأثير جسيمات الفضة النانوية في تثبيط الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*).

الجدول 3. تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. pulmonarius*) في نسبة إنبات بذور القمح (صنف شام 6).

معدلات جسيمات الفضة النانوية	التراكيز (ملي مول)					معدلات التراكيز
	2	1.5	1	0.5	0	
رائح الفطر	97.20 <sup>A</sup>	97.83 <sup>abc</sup>	96.33 <sup>d</sup>	97.08 <sup>ab</sup>	97.79 <sup>abc</sup>	97.00 <sup>bcd</sup>
الكتلة الحيوية	97.38 <sup>A</sup>	97.26 <sup>abc</sup>	97.38 <sup>abc</sup>	97.40 <sup>abc</sup>	97.45 <sup>abc</sup>	97.41 <sup>abc</sup>
المستخلص البارد	97.22 <sup>A</sup>	96.99 <sup>cd</sup>	97.92 <sup>a</sup>	96.87 <sup>d</sup>	97.21 <sup>abc</sup>	97.14 <sup>bc</sup>
المستخلص الحار	97.30 <sup>A</sup>	97.41 <sup>abc</sup>	97.36 <sup>abc</sup>	97.31 <sup>abc</sup>	97.18 <sup>abc</sup>	97.27 <sup>abc</sup>
معدلات التراكيز	97.27	97.37 <sup>A</sup>	97.24 <sup>A</sup>	97.16 <sup>A</sup>	97.40 <sup>A</sup>	97.20 <sup>A</sup>

أقل فرق معنوي (L.S.D 0.05) للمعاملات 0.55 للتراكيز 0.46 للتداخل 0.88

\* المتوسطات الأفقية والعمودية المتبوعة بالأحرف الكبيرة (A, B, C, D, E) غير مختلفة معنويًا؛ \*\* متوسطات التداخل المتبوعة بالأحرف الصغيرة (a, b, c, d, e) غير مختلفة معنويًا.

### 3-6 تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي

(*P. ostreatus var ostreatus*) في نسبة إنبات بذور القمح

(صنف شام 6)

تشير النتائج في الجدول (4) إلى تأثير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. ostreatus var ostreatus*) في نسبة إنبات بذور القمح (صنف شام 6)، إذ تفوقت معاملة المستخلص الحار للكتلة الحيوية للفطر على باقي المعاملات وأعطت نسبة إنبات بلغت 97.78%،

الجدول 4. تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة من الفطر الغذائي (*P. ostreatus var ostreatus*) في نسبة إنبات بذور القمح (صنف شام 6).

معدلات المعاملات	التراكيز (ملي مول)					معاملات جسيمات الفضة النانوية
	2	1.5	1	0.5	0	
97.34 <sup>B</sup>	96.23 <sup>fg</sup>	97.87 <sup>abc</sup>	96.37 <sup>efg</sup>	98.23 <sup>ab</sup>	98.01 <sup>abc</sup>	راشح الفطر
96.18 <sup>C</sup>	97.57 <sup>abcd</sup>	96.00 <sup>gh</sup>	94.95 <sup>i</sup>	97.26 <sup>bcde</sup>	95.21 <sup>hi</sup>	الكتلة الحيوية
97.38 <sup>B</sup>	98.08 <sup>abc</sup>	96.82 <sup>defg</sup>	96.05 <sup>gh</sup>	97.82 <sup>abcd</sup>	98.16 <sup>ab</sup>	المستخلص البارد
97.78 <sup>A</sup>	98.2 <sup>ab</sup>	97.11 <sup>cdef</sup>	97.81 <sup>abcd</sup>	97.30 <sup>bcde</sup>	98.47 <sup>a</sup>	المستخلص الحار
97.17	97.52 <sup>A</sup>	96.95 <sup>B</sup>	96.29 <sup>B</sup>	97.65 <sup>A</sup>	97.46 <sup>A</sup>	معدلات التراكيز

أقل فرق معنوي (L.S.D<sub>0.05</sub>) للمعاملات 0.36 للتراكيز 0.55 التداخل 1.01

\* المتوسطات الأفقية والعمودية المتبوعة بالأحرف الكبيرة (A, B, C, D, E) غير مختلفة معنويًا؛ \*\* متوسطات التداخل المتبوعة بالأحرف الصغيرة (a, b, c, d, e) غير مختلفة معنويًا.

- الكفاءة العالية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة حيويًا من الفطرين (*P. pulmonarius*) و(*P. ostreatus var ostreatus*) في تثبيط الفطر الممرض (*P. aphanidermatum*) المسبب لمرض موت وسقوط بادرات القمح.
- عدم تسجيل تأثيرات سلبية في نسبة إنبات بذور نبات القمح المعاملة بجسيمات الفضة النانوية.

### 5- المقترحات

- استخدام الفطرين الغذائيين (*P. pulmonarius*) و(*P. ostreatus var ostreatus*) في تحضير جسيمات الفضة النانوية لكفاءتها العالية في عملية التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية أو غيرها من المعادن المستخدمة بعملية التخليق الحيوي.
- معاملة بذور القمح بجسيمات الفضة النانوية عند التركيز 1.5 ملي مول لمقاومة الأمراض النباتية.

تشير النتائج في الجدول (4) إلى أن تراكيز جسيمات الفضة النانوية لم يكن لها أي تأثير سلبي في نسبة إنبات بذور القمح في كافة المعاملات. كما أن جسيمات الفضة النانوية تمتلك القدرة على زيادة المحتوى المائي، الذي بدوره يؤدي إلى زيادة محتوى الرطوبة، علاوة على ذلك فإن جسيمات الفضة النانوية تعمل على زيادة انقسام الخلايا، الأمر الذي يؤدي إلى ارتفاع نسبة الإنبات في النبات.<sup>11</sup> وقد تعزى أسباب انخفاض أو نسبة ارتفاع الإنبات أيضًا إلى وجود مركبات أخرى ضمن الراشح الفطري أو الكتلة الحيوية أو كلا المستخلصين الحار والبارد، ووجود مثل هذه المركبات (قلويدات، إنزيمات) أو تداخلها مع تراكيز جسيمات الفضة النانوية قد يشجع أو يثبط من إنبات البذور.<sup>12</sup> ومن ناحية أخرى، فإن الفطريات المدروسة هي أنواع مختلفة، ومن ثم هناك اختلاف في تركيبها الوراثي وسلوكها الوظيفي الذي ينعكس على إنتاج مركبات طبية قد تشجع أو تثبط إنبات البذور.<sup>13</sup>

### 4- الاستنتاجات

أثبتت النتائج ما يلي:

- الكفاءة العالية لإنزيم (Nitrate reductase) باستخدام جسيمات الفضة النانوية في التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من النوعين (*P. pulmonarius*) و(*P. ostreatus var ostreatus*).

1. Alston JM, Babcock BA, Pardey PG. The shifting patterns of agricultural production and productivity worldwide. Ames: CARD-MATRIC Electronic Book, Iowa State University; 2010.
2. Arora A, Padua GW. Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food Science*. 2010;75(1):43–49.
3. Abedi T, Alemzadeh A, Kazemeini SA. Effect of organic and inorganic fertilizers on grain yield and protein banding pattern of wheat. *Australian Journal of Crop Science*. 2010;4(6):384–389.
4. Gupta D, Chauhan P. Green synthesis of silver nanoparticles involving extract of plants of different taxonomic groups. *Journal of Nanomedicine Research*. 2017;5(2):00110.
5. Magdi HM, Mourad MHE, Abd El-Aziz MM. Biosynthesis of silver nanoparticles using fungi and biological evaluation of mycosynthesized silver nanoparticles. *Egyptian Journal of Experimental Biology*. 2014;10(1):1–12.
6. الشمري، ح ع ع. تأثير المفترس *Dicrodiplosis manihoti* وجسيمات الفضة النانوية المحضرة بالطرائق البيولوجية في بعض الجوانب الحياتية لبق الحمضيات الدقيقي: Hemiptera: *Pseudococcidae citri planococcus* (Risso) أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق، 2015، 89 صفحة.
7. Jepson BJN, Mohan S, Clarke TA, Gates AJ, Cole JA, Butler CS, et al. Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(9):6425–6437.
8. حسن، س س. تقييم كفاءة الفطر الغذائي *pleurotus spp* في إنتاج دقائق الفضة النانوية وتأثيرها في الفطر الممرض *Pythium aphanidermatum* المسبب لمرض موت بادرات الحنطة. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق، 2019، 146 صفحة.
9. Hu Y, You J, Liang X. Nitrate reductase-mediated nitric oxide production is involved in copper tolerance in shoots of hullless barley. *Plant Cell Reports*. 2015;34(3):367–379.
10. الراوي، خ م وخلف الله ع م. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. الطبعة الثانية. دار الكتب للطباعة والنشر-جامعة الموصل، الموصل، العراق، 2000. 459 صفحة.
11. Farooq M, Basra SMA, Ahmad N, Hafeez K. Thermal hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2005;47(2):187193-.
12. Mahakham W, Sarmah AK, Maensiri S, Theerakulpisut P. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*. 2017;7(1):8263.
13. Chang ST, Miles PG. Mushrooms: Cultivation, nutritional value medicinal effect, and environmental impact. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
14. Ghorbani HR. Silver nanoparticles biologically synthesized using extract of *E. coli*. *Minerva Biotechnologica*. 2012;24(2): 58–61.
15. Anil Kumar S, Abyaneh MK, Gosavi SW, Kulkarni SK, Pasricha R, Ahmad A, et al. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. *Biotechnology Letters*. 2007; 29:439–445.
16. Hamed S, Ghaseminezhad M, Shokrollahzadeh S, Shojasadat SA. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017;45(8):1588–1596.
17. Narayanan KB, Park HH. Antifungal activity of silver nanoparticles synthesized using turnip leaf extract (*Brassica rapa* L.) against wood rotting pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 2014;140:185–192.
18. الوكيل، م ع. تأثير الجزيئات المتناهية في الصغر على تركيب التربة ومكوناتها، مجلة العلوم البيئية والتكنولوجية. 2013؛ 22 (4): 15-20.



ورقة بحثية

# فعالية الزيوت الطيارة لقشور نوعين من فواكه الحمضيات على حلم العنكبوت (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae) والحلم المفترس (*Phytoseiulus* (Acari: Phytoseiidae) (*persimilis* Athias-Henroit

أسماء البقالي العيساوي<sup>1\*</sup>، أمال العمراني<sup>2</sup>

<sup>2,1</sup> كلية العلوم والتقنيات بطنجة، جامعة عبد المالك السعدي، المغرب

\* طالبة باحثة في سلك الدكتوراه

<sup>1</sup> amalelamrani@yahoo.fr <sup>2</sup> asmaebakkaliaissaoui@gmail.com

## الملخص

تم استخلاص الزيوت الطيارة من قشور البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*) والبرتقال المر (*Citrus aurantium*) لتقييم سميتهما بالرش تحت ظروف المختبر على الأفراد البالغة لحلم العنكبوت ذي البقعتين (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae)، وعلى الحلم المفترس (*Phytoseiulus persimilis*) (Athias-Henroit) (Acari: Phytoseiidae) الذي يعد أهم الأعداء الطبيعيين لهذه الآفة. كما تم اختبار النشاط المتبقي لهذه الزيوت الطيارة. تم تحضير الزيوت بتركيزات مضاعفة وفقاً لأهداف الدراسة: 0.5، 1، 2، 4، و8% من كل زيت أساسي. أظهرت اختبارات السمية فعالية جيدة للزيوت الطيارة المختبرة، حيث قُدر معدل قتلى (*T. urticae*) بـ 63.33% و68.74% لكل من البرتقال الحلو والبرتقال المر على التوالي، عند تركيز 8%. وفي المقابل، تعتبر هذه الزيوت عند التركيز نفسه أقل سمية على الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) بنسب قتلى بلغت 25% و13.88% لكلا الزيتين على التوالي. كما أن النشاط المتبقي لهذه الزيوت يضمحل بمرور الزمن. نستخلص من هذه الدراسة أن الزيوت الطيارة المختبرة قد تمثل بديلاً واعداً للمبيدات المصنعة ضمن برامج مكافحة الحيوية الصديقة للبيئة.

**الكلمات المفتاحية:** حلم العنكبوت، الحلم المفترس، الزيوت الطيارة، النشاط المتبقي، البرتقال الحلو، البرتقال المر.

## Title:

**The effectiveness of essential oils from the peel of two citrus-fruit types on two-spotted spider mites: *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henroit (Acari: Phytoseiidae)**

Asmae Bakkali Aissaoui<sup>1\*</sup>, Amal Elamrani<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Faculty of Science and Technology Tangier, Abdelmalek Essaadi University, Morocco

\* PhD Student

Received 15 October 2020; accepted 22 February 2021; published 30 April 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Aissaoui AB & Elamrani A. The effectiveness of essential oils from the peel of two citrus-fruit types on two-spotted spider mites: *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henroit (Acari: Phytoseiidae). Arabian Journal of Scientific Research 2021;1.4. <https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.4>

Two essential oils were extracted from the peel of sweet orange *Citrus sinensis* and bitter orange *Citrus aurantium*. The objective of this study is to assess their toxicity by direct contact under laboratory conditions, on adult individuals of the two-spot spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and the predatory spider *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henroît (Acari: Phytoseiidae) which is one of the most important natural enemies of this pest. The residual activity of these essential oils has also been tested at five increasing concentrations: 0.5%, 1%, 2%, 4% and 8%. The concentration of 8%, toxicity tests showed good efficacy of the tested essential oils, as the mortality rate for *T. urticae* was estimated at 63.33% and 68.74% for sweet orange and bitter orange respectively. In contrast, these oils at the same concentration were found less toxic on adults of *P. persimilis*, with mortality rates of 25% and 13.88% for these oils, respectively. The residual activity of these oils also decays over time. We conclude from this study that the tested essential oils may represent a promising alternative to pesticides manufactured within environmentally friendly biological control programs.

**Keywords:** Spider mite, Predatory spider, essential oils, residual activity, sweet orange, bitter orange.

## 1- المقدمة

أدت هذه الخلاصات إلى البحث بشكل جدي ومتواصل عن منتجات طبيعية تحترم الشروط الصحية والبيئية، حيث اتجهت أنظار الباحثين إلى عالم النباتات الذي يتميز بقدراته الدفاعية الذاتية ضد الآفات الزراعية، وذلك بفضل وسائط كيميائية طبيعية. وفي هذا الصدد، تم جرد أكثر من 2000 نوع من النباتات ذات خصائص مبيدات الحشرات/العناكب، بفضل مركبات عضوية طبيعية، وهي الزيوت الطيارة.<sup>7</sup>

تعزى سمية الزيوت الطيارة إلى وجود المونوتربينات، وهي مستقبلات ثانوية للنباتات التي تعطي للنبات العطري العديد من الوظائف: (1) جذب أو طرد الحشرات، (2) حماية النبات من درجات الحرارة البيئية المنخفضة والعالية، و(3) استخدامها من طرف النبات كمواد دفاعية ضد الآفات ومسببات الأمراض. وفي جانب آخر، أظهرت دراسات سابقة أن الزيوت الطيارة ليس لديها أهداف خلوية محددة بسبب تنوع مكوناتها،<sup>8</sup> حيث تعمل هذه المبيدات الحيوية عن طريق الرش أو عن طريق الاستنشاق، ولها طرق عمل مختلفة، مما سيحد بشكل خاص من معدل تطور المقاومة.<sup>9</sup>

تؤثر هذه المستخلصات الطبيعية على الآفات الزراعية بشكل ملحوظ، إذ يؤدي رشها أو استنشاق أبخرتها إلى ظهور مجموعة من الاضطرابات في النمو وفي عملية الانسلاخ، كما تؤدي إلى تثبيط الجهاز التنفسي وانخفاض معدل الخصوبة.<sup>10</sup> كما تتميز هذه المبيدات الطبيعية بكونها موادًا انتقائية، إذ تتميز بتأثير ضئيل على الكائنات الحية غير المستهدفة، كما أنها قابلة للتحلل البيولوجي وغير ثابتة في البيئة.<sup>11</sup>

جعلت هذه الخصائص من النباتات مرشحًا واعدًا كمبيدات خضراء في المستقبل. وتعد الحمضيات من بين الأنواع النباتية التي تتميز بإنتاج الزيوت الطيارة، والتي أثبتت فعاليتها في مكافحة الآفات الزراعية بعد استكشاف الخصائص السامة للزيوت الطيارة المستخرجة منها، بفضل التقدم العلمي في المنهجيات الكيميائية التحليلية في العقود القليلة الماضية. ويعتبر قطاع الحمضيات في المغرب من القطاعات الرئيسية في البلاد، حيث يقدر الإنتاج بـ 2.6 مليون طن سنويًا. وتبحث الصناعات المحلية في مجال الحمضيات عن مصادر دخل إضافية من المواد التي تستخدمها جزئيًا فقط، إذ يتم التخلص من الأطنان من قشور الحمضيات كنفايات. لذا يعتبر استخراج الزيوت الطيارة من قشور الحمضيات حلًا جيدًا من الناحية الاقتصادية والبيئية، ذلك أنه يمكن من تحويل النفايات إلى منتجات قابلة للتسويق في عدة مجالات، من بينها مكافحة الآفات الزراعية.

تستهدف هذه الدراسة اختبار السمية عن طريق الرش تحت ظروف المختبر، لنوعين من الزيوت الطيارة المستخرجة من قشور البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*) والبرتقال المر (*Citrus aurantium*) على الأفراد البالغة لحلم العنكبوت ذي البقعتين (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*). وفي هذا السياق، تأتي أهمية هذه الدراسة لمعرفة مدى توافق استعمال

يعتبر حلم العنكبوت ذو البقعتين (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae) آفة لمجموعة كبيرة من النباتات المضيفة، حيث يصيب أكثر من 1500 نوع نباتي،<sup>1</sup> وفي جميع أنحاء العالم.<sup>2,3</sup> أما في المغرب، فيلحق حلم العنكبوت (*T. urticae*) أضرارًا بالعديد من المحاصيل الزراعية، تم رصدها في العديد من المزروعات في الأراضي الزراعية الموجودة في سهل الغرب وحوض اللوكوس (شمال المغرب). وتستأثر هذه المنطقة على ما نسبته 88% من الإنتاج الوطني الإجمالي من الفواولة وزراعة الفواكه الحمراء الصغيرة، ويؤدي هذا القطاع دورًا اجتماعيًا واقتصاديًا هامًا يتمثل في رقم معاملات تراوح أربعة مليارات درهم مغربي، وأكثر من 18000 وظيفة عمل قارة في الأراضي الزراعية وفي محطات التعبئة. تمثل زراعة الفواولة وتجارتها في هذه المنطقة على وجه الخصوص استثمارًا للمزارعين والتجار، نظرًا للطلب المتزايد، سواء على المستوى الوطني أو الدولي، إلا أن نباتات الفواولة تتأثر بشكل كبير بهذه الآفة الزراعية. ويؤدي تفشي حلم العنكبوت في الأراضي الزراعية لزراعة الفواولة في حوض اللوكوس إلى تشوه النبات وتساقط الأوراق، كما يؤثر سلبًا على جودة إنتاج الزهور أو البذور أو الفاكهة، الأمر الذي يؤدي إلى ضعف أو فقدان غلة المحاصيل، فقد وصل انخفاض إنتاجية الفواولة في هذه المنطقة إلى 70% بسبب هذه الآفة الزراعية.<sup>4</sup> ولمواجهة هذه الوضعية المقلقة، يلجأ المزارعون إلى استخدام المبيدات المصنعة للسيطرة على حلم العنكبوت (*T. urticae*). إلا أن مكافحة هذه الآفة ليس بالأمر الهين؛ بسبب نطاق انتشاره الواسع من جهة، وقدرته التناسلية العالية إضافة إلى تطوير مقاومة سريعة للمبيدات المستخدمة من جهة أخرى.<sup>5</sup> فوفقًا لقاعدة بيانات مقاومة مبيدات الآفات (APRD) تم الإبلاغ عن أكثر من 700 حالة مقاومة للمبيدات المستعملة، إذ يشير نحو 93% من هذه التقارير إلى مقاومة تهمة حلم العنكبوت، وما يقرب من نصف حالات مقاومة حلم العنكبوت مرتبطة بحلم العنكبوت ذي البقعتين (*T. urticae*)، ولقد سجلت دراسات حديثة ظهور حالات مقاومة حلم العنكبوت ذي البقعتين في منطقة حوض اللوكوس.<sup>6</sup> أدت هذه الوضعية إلى استمرار انتشار هذه الآفة في الأراضي الزراعية. كما أن ثبات هذه المبيدات في البيئة واستقرارها في حلقات السلاسل والشبكات الغذائية أديا، من جهة، إلى اختلال التوازنات الطبيعية والإضرار بصحة الإنسان. ومن جهة أخرى، أدى الاستخدام المكثف والمستمر للمبيدات الكيميائية ذات الانتقائية الضعيفة إلى القضاء على العديد من الأعداء الطبيعيين لحلم العنكبوت عن طريق الحد من إنتاج البيض والقدرة الإنجابية، وعلى وجه الخصوص الحلم المفترس (*Phytoseiulus persimilis* Athias-) (Acari: Phytoseiidae) (Henroît)، مما أدى إلى انخفاض ضغط الافتراس على حلم العنكبوت ذي البقعتين (*T. urticae*)، الأمر الذي ساعد على انتشاره على نطاق أكبر، مما أثر سلبًا على التنوع البيولوجي.

الزيوت الطيارة المعنية في مكافحة حلم العنكبوت (*T. urticae*) مع الأعداء الطبيعيين. ومن جانب آخر، استهدف هذا العمل تحديد النشاط المتبقي لهذه الزيوت لمعرفة مدى ملائمتها للبيئة، مما قد يؤسس مستقبلاً لاستراتيجية جديدة للمكافحة الحيوية للآفات الزراعية ضمن برامج مكافحة المتكاملة، باعتبارها الخيار الأفضل والأمن لصحة الإنسان والبيئة عمومًا.

## 2- مواد وطرائق العمل

### 1-2 استخراج الزيوت الطيارة من قشور الحمضيات

تمت عملية استخراج الزيوت عن طريق التقطير المائي؛ إذ تغمر كمية 100 غرام من قشور كل فاكهة في الماء داخل جهاز التقطير كلفنجر (Clevenger, Pyrex quickfit, United Kingdom)، ثم ترفع درجة حرارته إلى درجة غليان الماء، وتترك القشور مدة ثلاث إلى أربع ساعات. يعبر بخار الماء المحمل بالزيت الطيار مبرداً، مما يؤدي إلى تكاثفه، ومن ثم سقوطه في قمع فاصل. يُفصل الماء والزيت الطيار بسبب فارق الكثافة بينهما، ويُخزن الزيت الطيار المحصل عليه في الظلام عند درجة حرارة 4 درجات مئوية.

### 2-2 تربية العناكب

تعتمد هذه المرحلة على تربية مكثفة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*). ولأجل ذلك، جُلِبَت عدة أوراق من نبات الفراولة المصابة بحلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*) من قرية فلاحية بحوض اللوكوس شمال المغرب. وتمت تربية حلم العنكبوت (*T. urticae*) على أوراق نبات الفاصوليا كنبات مضيف.

نُقل أفراد سلالتي العناكب على أوراق نبات الفاصوليا بشكل منفصل بواسطة فرشاة دقيقة. وتمت تربية حلم العنكبوت (*T. urticae*) على أوراق سليمة لنبات الفاصوليا، بينما تمت تربية الحلم المفترس (*P. persimilis*) على أوراق نبات الفاصوليا مصابة بحلم العنكبوت (*T. urticae*) مع الحرص على الإمداد المتواصل بهذا الأخير الذي يمثل غذاء للحلم المفترس، والحرص كذلك على الفصل بين الأصص. تمت صيانة نباتات الفاصوليا في كلتا الحالتين في غرفة مكيفة تحت درجة حرارة 25 درجة مئوية ورطوبة نسبية بين 50 و60% وفترة ضوئية 16D/8L.

### 3-2 اختبار السمية بالرش على حلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم

#### المفترس (*P. persimilis*)

ارتكزت المنهجية المعتمدة في استعمال أقراص من أوراق نبات الفاصوليا الطرية ووضعها على الوجه العلوي على ورق الترشيح المبلى في أطباق بتري (10 سنتيمترات)<sup>12</sup>. والمبدأ المعتمد هو معالجة الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*) بتحضيرات من الزيوت الطيارة المستخرجة من البرتقال الحلو والبرتقال المر. تم إعداد هذه التحضيرات وفق تركيزات مضاعفة: 0.5 و1 و2 و4 و8% من كل زيت أساسي مع تخفيفها في مركب (Triton X100) في 0.1%.

أخضعت السلالة البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*) لسلسلة من اختبار السمية بالرش، حيث وضعت في كل اختبار وعلى كل قرص من ورقة نبات الفاصوليا خمسة أفراد بالغة. تم رش مختلف التحضيرات على أقراص أوراق الفاصوليا بواسطة مرش يدوي بقياس  $0.83 \pm 9.6$  ميكرو لتر / سنتيمتر<sup>2</sup>. تمت إعادة الاختبار خمس مرات بالنسبة إلى

كل زيت أساسي وكل تركيز لحلم العنكبوت (*T. urticae*) والحلم المفترس (*P. persimilis*). تم تتبع عدد القتلى في كل طبق بتري بعد 24 و48 و72 ساعة. في حين تم رش الأفراد الأخرى (أفراد شاهدة) بالطريقة نفسها، لكن في غياب الزيت الطيار، إذ تُمكن هذه الأفراد من التأكد من عدم تسجيل أي نسب قتلى زائدة وتصحيح عدد القتلى وفقاً لصيغة (Abbott)<sup>13</sup>.

## 4-2 اختبار النشاط المتبقي للزيوت الطيارة

تم رش كل ورقة من نبات الفاصوليا بمختلف التراكيز المستعملة للزيتين موضوع الدراسة بكمية تقدر بـ 10 ميكرو لترات من كل زيت. وبعد مرور يوم كامل من عملية الرش، نُزعت الأوراق المرشوشة. وُضعت خمسة أفراد بالغة من حلم العنكبوت (*T. urticae*) فوق قرص من ورقة نبات الفاصوليا على ورق الترشيح المبلى في طبق بتري. وتمت إعادة الاختبار خمس مرات بالنسبة إلى كل زيت طيار وكل تركيز. وقد أثبتت الطريقة نفسها بعد مرور سبعة أيام، ثم أربعة عشر يوماً من عملية الرش. أما بالنسبة إلى الأوراق الأخرى، فُرِشت فقط بالماء المقطر مُضاعفاً إليه 0.1% من (Triton-X100).

### 5-2 التحاليل الإحصائية

تم تصحيح نسب القتل من خلال صيغة (Abbott). وتمت المعالجة الإحصائية بفضل تحليل التباين (ANOVA) بعاملَي: (التركيز، ومدة ما بعد المعالجة)، يليه اختبار (Tukey)، مما يسمح بمقارنة المعدلين اثنتين بائنتين<sup>14</sup>. وفي جميع الحالات، عتبة الأهمية المعتمدة هي ( $p < 0.05$ ). وقد تمت المعالجة الإحصائية باستخدام برنامج (SPSS 13.0).

## 3- النتائج والمناقشة

### 1-3 اختبار السمية بالرش على الأفراد البالغة لحلم العنكبوت

#### (*T. urticae*)

تم إخضاع نسب القتل المصححة للأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) التي تَمَّت معالجتها عن طريق الرش بواسطة الزيوت الطيارة لتحليل التباين بالنسبة إلى عاملي التركيز ومدة ما بعد المعالجة، واختبار (Tukey). وقد تم احتساب نسب القتل بالنسبة إلى جميع التراكيز المعتمدة بعد 24 و48 و72 ساعة بعد المعالجة. لم يتم تسجيل أي قتلى في أطباق بتري الشاهدة.

#### 1-1-3 البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*)

كشف تحليل التباين اختلافاً ذا دلالة كبيرة بالنسبة إلى عامل التركيز ( $F=55.891$ ;  $df=5$ ;  $P<0.001$ ). حيث سجلنا في المتوسط النسب التالية: 26.11 و33.33 و40 و42.08 و63.33% على التوالي بعد معالجة الأفراد البالغة بزيت البرتقال الحلو باستعمال التراكيز الخمسة: 0.5 و1 و2 و4 و8%. من جهة أخرى، تتغير نسبة القتل بدلالة مدة تعرّض الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) لزيت البرتقال الحلو بناء على تحليل التباين بالنسبة إلى عامل مدة ما بعد المعالجة ( $F=7.064$ ;  $df=2$ ;  $P<0.01$ ) (الشكل 1).

عن طريق الرش أو عن طريق الاستنشاق، على الآفات الزراعية من عائلة الحلم العنكبوتية.<sup>16,15</sup> ولقد تم تأكيد فعالية الزيوت الطيارة، موضوع هذه الدراسة، في دراسات سابقة، إلا أنها محدودة مقارنة بالزيوت الأخرى. وقد تمت الإشارة إلى سمية زيت البرتقال الحلو والبرتقال المر على حلم العنكبوت (*T. urticae*) عن طريق الاستنشاق في دراسة<sup>17</sup> شمال البرازيل، حيث يتميز زيت البرتقال المر بسمية أكبر من زيت البرتقال الحلو، وهو ما يطابق النتائج المتوصل إليها في هذه الدراسة. وفي الصد ذاته، أكدت دراسة<sup>18</sup> سمية زيت البرتقال الحلو عن طريق الرش على إناث حلم العنكبوت عند تركيز 0.1% بنسبة قتل تقدر بـ 45.6%، وذلك بعد 24 ساعة من المعالجة، كما استطاع هذا الزيت أن يخفف من نسبة وضع البيض بشكل ملحوظ.

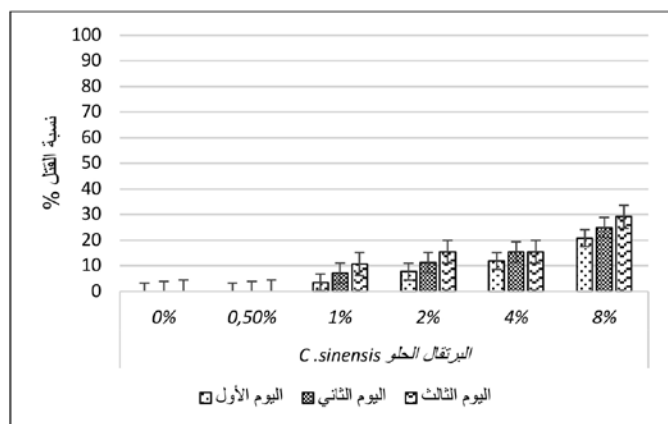
وفي سياق آخر، أثبتت أبحاث أخرى سمية هذه الزيوت الطيارة على أنواع أخرى من الآفات الزراعية. وأكدت نتائج سمية زيت البرتقال الحلو على حشرة (*Planococcus ficus vine*) (Hemiptera: Pseudococcidae)<sup>19</sup>. كما أثبتت دراستين<sup>20,21</sup> سمية هذا الزيت عن طريق الرش على الأفراد البالغة وعلى يرقات ذبابة المنزل (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae).

### 2-3 اختبار السمية بالرش على الأفراد البالغة للحلم المفترس (*Phytoseiulus persimilis*)

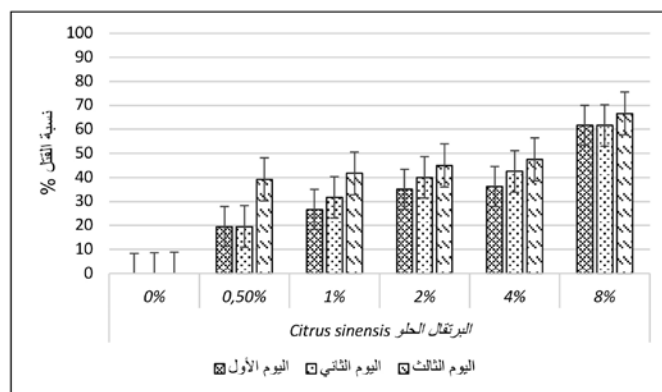
تم إخضاع نسب القتل المصححة للأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) التي تمت معالجتها عن طريق الرش بواسطة الزيوت الطيارة عن طريق تحليل التباين بالنسبة إلى عاملي التركيز ومدة ما بعد المعالجة، واختبار (Tukey). وقد تم احتساب نسب القتل بالنسبة إلى جميع التراكيز المعتمدة بعد 24 و 48 و 72 ساعة بعد المعالجة.

#### 1-2-3 البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*)

أعطت معالجة الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) بالرش بمختلف التراكيز المستعملة من زيت البرتقال الحلو نسب قتل مختلفة إحصائياً (F=22.182; df=5; P<0.001). وفي المتوسط، كانت النسب التالية: 0.00 و 7.14 و 11.49 و 14.28 و 25% عند معالجة الأفراد البالغة بالتراكيز التالية: 0.5 و 1 و 2 و 4 و 8% على التوالي. ومن جانب آخر، بين تحليل التباين أن نسب قتل (*P. persimilis*) بالرش لا تتغير إحصائياً خلال الأيام الثلاثة التي تلت عملية المعالجة (F=2.453; df=2; P>0.05) (الشكل 3).



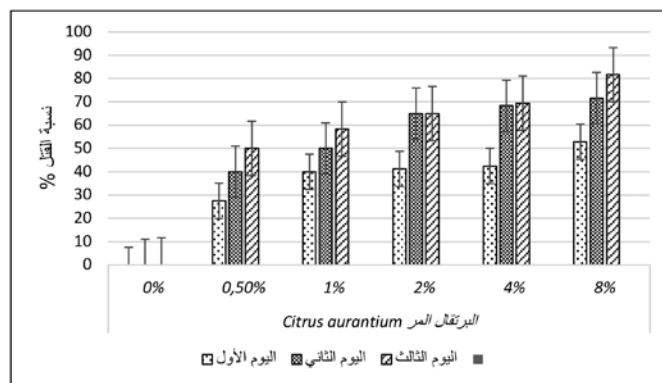
الشكل 3. نسب قتل الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) المسجلة بعد 24 و 48 و 72 ساعة بعد المعالجة بالرش بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال الحلو.



الشكل 1. نسب قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) المسجلة بعد 24 و 48 و 72 ساعة بعد المعالجة بالرش بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال الحلو.

#### 2-1-3 البرتقال المر (*Citrus aurantium*)

أظهر تحليل التباين اختلافًا ذا دلالة بين التراكيز الخمسة المستعملة لزيت البرتقال المر (F= 24.653; df=5; P<0.001). وحصلنا في المتوسط على نسب قتل 39.16 و 49.44 و 57.08 و 60.41 و 68.74% على التوالي، بعد معالجة الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) بزيت البرتقال المر باستعمال التراكيز التالية: 0.5 و 1 و 2 و 4 و 8%. من جهة أخرى، بين تحليل التباين أن نسبة القتل تتغير بشكل ملموس خلال الأيام الثلاثة ما بعد المعالجة بهذا الزيت (F=9.016; df= 2; P<0.001) (الشكل 2).



الشكل 2. نسب قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) المسجلة بعد 24 و 48 و 72 ساعة بعد المعالجة بالرش بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال المر.

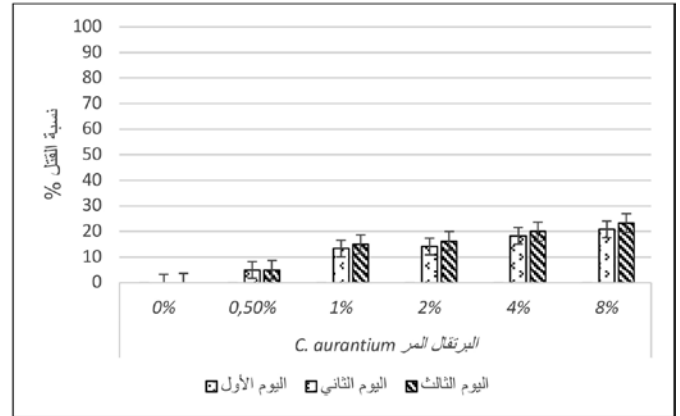
أثبتت الدراسة أن الزيوت الطيارة المستخرجة من قشور البرتقال الحلو والبرتقال المر تتميز بسمية اتجاه الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*). ولتحديد فعالية كل زيت طيار، قمنا برسم خط السمية، حيث مكن تحويل نسب القتل بعد ثلاثة أيام من المعالجة لوحدة البروبيت (probit)، وانحدار هذه البيانات بدلالة لوغاريتم التركيز لكلا الزيتين من حساب قيمة التركيز القاتل لـ 50% ( $LC_{50}$ ) من الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) حيث حصلنا على ( $LC_{50}$ =4.265) و ( $LC_{50}$ =1.24) لزيت البرتقال الحلو والبرتقال المر، على التوالي. وتظهر هذه القيم أن زيت البرتقال المر (*C. aurantium*) يتميز بسمية عالية مقارنة بزيت البرتقال الحلو (*C. sinensis*), حيث يتم القضاء على نصف العشيرة الأكاروسية باستعمال تركيز 1.24% في مقابل 4.265% في حالة البرتقال الحلو.

لقد بينت عدة دراسات سمية عدد كبير من الزيوت الطيارة، سواء



### 2-2-3 البرتقال المر (*Citrus aurantium*)

بالنسبة إلى زيت البرتقال المر، فقد تبين أن له سميةً تتراوح من ضعيفة إلى معتدلة على الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*). وبين تحليل التباين اختلافاً ملحوظاً في نسب القتل بدلالة التركيز المستعمل (F=4.47; df=5; P<0.05)، حيث سجلنا النسب التالية: 3.33 و 8.88 و 9.88 و 10.83 و 13.88% باستعمال التراكيز الخمسة 0.5 و 1 و 2 و 4 و 8% على التوالي. كما أظهر التحليل الإحصائي أن نسب القتل تتغير خلال الأيام الثلاثة من المعالجة (F=14.96; df= 2; P<0.05) (الشكل 4).



الشكل 4. نسب قتل الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) المسجلة بعد 24 و 48 و 72 ساعة بعد المعالجة بالرش بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال المر.

أثبتت الدراسة أن الزيوت الطيارة المستخرجة من قشور البرتقال الحلو والبرتقال المر تتميز بسمية ضعيفة اتجاه الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*). فعند تركيز 8% من زيت البرتقال الحلو والبرتقال المر، حصلنا على نسب قتل 25% و 13.88% لكلا الزيتين، على التوالي. في هذا السياق، كشفت عدة أبحاث أن سمية الزيوت الطيارة على المفترسين تكون إجمالاً أقل منها على الآفات الزراعية، إلا أن هناك عدداً محدوداً من الدراسات التي استهدفت تأثير الزيوت الطيارة على الأعداء الطبيعيين لحلم العنكبوت (*T. urticae*)<sup>22</sup>.

تأتي أهمية هذه العمل في أن الزيوت الطيارة، موضوع الدراسة، أظهرت فعالية ضعيفة على الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*)، وهو ما أكدته دراسات سابقة، حيث بينت دراسة<sup>23</sup> أن تركيبة تجارية مصنوعة من زيت إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) ذات فعالية عالية اتجاه حلم العنكبوت (*T. urticae*)، إلا أنها لم تؤثر بشكل فعال على الحلم المفترس (*P. persimilis*). وفي دراسة حديثة<sup>16</sup> أجريت تحت ظروف المختبر، لاختبار سمية سبعة زيوت أساسية هي (*Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum majorana*, *Coriandrum sativum*, *Mentha recutita*, *Mentha viridis*) على البيض والأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*)، وكذلك على الأفراد البالغة للحلم المفترس (*P. persimilis*) و (*Neoseiulus californicus*) (Acari: Phytoseiidae)، تم التوصل إلى أن جميع الزيوت المختبرة كانت أقل سميةً اتجاه الحلم المفترس مقارنة بحلم العنكبوت، مما يتوافق مع نتائج هذه الدراسة.

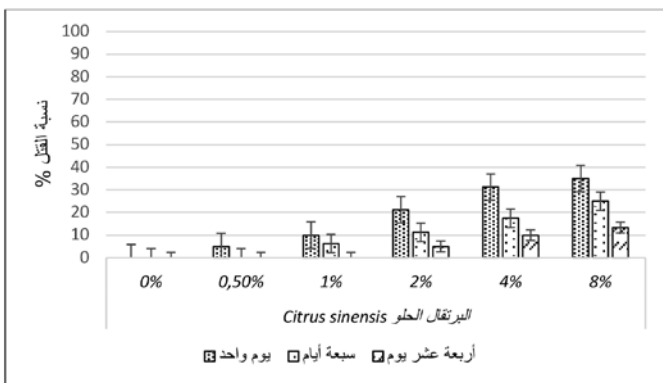
### 3-3 اختبار النشاط المتبقي للزيوت الطيارة موضوع الدراسة

تم تحديد النشاط المتبقي للزيوت المدروسة عن طريق تحديد نسبة قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) الموضوعة على أوراق تم رشها

مسبقاً بأحد التراكيز المتصاعدة من كل زيت أساسي، وذلك بعد مرور يوم واحد ثم سبعة أيام ثم أربعة عشر يوماً من عملية رش الأوراق. اعتمدت التحاليل الإحصائية على تحليل التباين بالنسبة إلى عاملي التركيز ومدة ما بعد المعالجة، واختبار (Tukey).

### 1-3-3 البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*)

أظهر تحليل التباين أن النشاط المتبقي للزيت الطيار للبرتقال الحلو الذي تم تقديره عن طريق نسبة قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) المرصودة على الأوراق المعالجة يتغير بشكل ملحوظ بدلالة التركيز المستعمل (F=10.432; df=5; P<0.001)، إذ كلما ازداد تركيز الزيت المرشوش على الأوراق ازداد نشاطه المتبقي. وفي المتوسط، كانت نسب القتل كما يلي: 1.66 و 5.41 و 12.5 و 19.58 و 24.44% عندما تم رش الأوراق مسبقاً بالتراكيز الخمسة 0.5 و 1 و 2 و 4 و 8% على التوالي لزيت البرتقال الحلو. ومن جهة أخرى، بين تحليل التباين أن النشاط المتبقي لزيت البرتقال الحلو يتناقص خلال مرور الأربعة عشر يوماً التي تلت عملية رش الأوراق (F=8.107; df=2; p<0.01) (الشكل 5).



الشكل 5. نسب قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) الموضوعة على أوراق الفاصوليا المسجلة بعد مرور يوم و 7 و 14 يوماً من المعالجة سابقاً بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال الحلو.

### 2-3-3 البرتقال المر (*Citrus aurantium*)

من خلال تحليل التباين للنشاط المتبقي للزيت الطيار للبرتقال المر، يتبين أن هناك اختلافاً ملموساً في نسب قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) المسجلة بدلالة التركيز المستعمل (F= 5.495; ddl=5; P<0.001)، فكلما ازداد تركيز الزيت المرشوش على الأوراق ازداد نشاطه المتبقي. وفي المتوسط كانت نسب القتل كما يلي: 1.66 و 5.83 و 10.83 و 16.52 و 20.83% عندما تم رش الأوراق بالتراكيز الخمسة 0.5 و 1 و 2 و 4 و 8% على التوالي لزيت البرتقال المر. كما أن النشاط المتبقي لزيت البرتقال المر ينخفض خلال الـ 14 يوماً التي تلت عملية رش الأوراق بناءً على تحليل التباين (F=7.502; ddl=2; p<0.0) (الشكل 6).

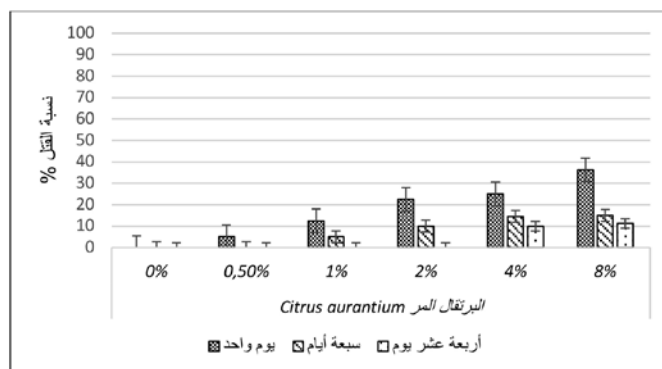
زيت البرتقال الحلو يتبخر بشكل سريع بعد رشه على أوراق القمح، حيث انتقل تركيزه من 0.0180 ميكرو لتر/ غرام بعد دقيقة من المعالجة إلى 0.00287 ميكرو لتر/ غرام بعد ستين دقيقة.

#### 4- خاتمة وتوصيات

يعتبر قطاع الحمضيات في المغرب من القطاعات الرئيسية في البلاد. وتعتبر الزيوت الطيارة المستخرجة من قشور الحمضيات حلاً جيداً من الناحية الاقتصادية والزراعية والبيئية؛ فهي تعتبر، من جهة، بديلاً جيداً لمكافحة حلم العنكبوت مع المحافظة على الأعداء الطبيعيين وعلى باقي عناصر الفونة، نظراً إلى عدم ثباتها في البيئة. ومن جهة أخرى، تبحث الصناعات التي تعتمد على الحمضيات عن مصادر دخل إضافية من المواد التي تستخدمها جزئياً فقط، ويعتبر تحويل قشور الحمضيات إلى منتجات قابلة للتسويق كالزيوت الطيارة حلاً اقتصادياً رائداً.

واستناداً إلى ما توصلت إليه هذه الدراسة، يوصى بما يلي:

- يمكن استعمال الزيوت الطيارة في مكافحة البيولوجية والمكافحة المتكاملة للقضاء على حلم العنكبوت (*T. urticae*) من دون الإضرار بالحلم المفترس (*P. persimilis*) الذي يعد من أهم الأعداء الطبيعيين لهذه الآفة.
- يعتبر استعمال الزيوت الطيارة في مكافحة البيولوجية وسيلة مستدامة لا تؤثر سلباً على البيئة.
- تمت هذه الاختبارات تحت ظروف المختبر، ويوصى أن يتم اختبارها في المزارع من أجل تحديد فعاليتها بشكل أكثر دقة، ومعرفة مدى تأثيرها على باقي عناصر الفونة.



الشكل 6. نسب قتل الأفراد البالغة لحلم العنكبوت (*T. urticae*) الموضوعة على أوراق الفاصوليا المسجلة بعد مرور يوم و7 و14 يوماً من المعالجة سابقاً بالتراكيز الخمسة للزيت الطيار للبرتقال المر.

بيّنت نتائج هذا البحث أيضاً انخفاض النشاط المتبقي للزيوت الطيارة للبرتقال الحلو والبرتقال المر عبر الزمن. وتعتبر هذه الخاصية من الخصائص المستهدفة في مسيرة البحث عن بدائل للمبيدات المصنعة ذات التأثير المستدام في البيئة والثابت على طول حلقات السلاسل والشبكات الغذائية؛ الأمر الذي يلحق أضراراً بباقي عناصر الفونة.<sup>25,24</sup> وتعزى هذه الخاصية إلى أن الزيوت الطيارة تتميز بنصف حياة بسبب التحلل الحراري و/ أو التحلل الضوئي، ومن ثم اضمحلال تأثيرها بمرور الوقت،<sup>26</sup> مما سيجعل تأثيرها على مكونات الفونة ضعيفاً، وهو ما يؤهلها لتكون بديلاً واعداً لمكافحة الآفات الزراعية.<sup>27</sup> وفي هذا الصدد، توصلت عدة أبحاث سابقة إلى أن النشاط المتبقي للزيوت الطيارة يختفي في مدة وجيزة.<sup>29,28</sup> حيث بينت دراسة<sup>30</sup> أن

#### المراجع

1. Zhang ZQ. Mites of greenhouses. Identification, biology and control. Cambridge, MA: CABI Publishing; 2003.
2. Lee S, Peterson CJ, Coats JR. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. Journal of Stored Products Research. 2003;39:77–85.
3. Migeon A, Nougier E, Dorkeld F. Spider mites web: A comprehensive database for the Tetranychidae. In: Sabelis M, Bruin J, editors. Trends in acarology. Dordrecht: Springer; 2010. pp. 557–560.
4. Biswas GC, Islam W, Haque MM, Saha RK, Hoque KMP, Islam MS, et al. Some biological aspects of carmine mite, *Tetranychus cinnabarinus* Boisd. (Acari: Tetranychidae) infesting egg-plant from Rajshahi. Journal of Biosciences. 2004;4(5):588–591.
5. Badawy MEI, El-Arabi SAA, Abdelgaleil SAM. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Experimental and Applied Acarology. 2010;52:261–274.
6. Lagziri M, Benicha M, Mrabet R, El Amrani A. Influence de l'usage préventif des pesticides sur les acariens *Tetranychus urticae* et *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) présents en cultures de fraisiers du Nord du Maroc. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 2015;19:355–363.
7. Ngamo TSL, Ngatanko I, Ngassoum MB, Mapongmestsem PM, Hance T. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. African Journal of Agricultural Research. 2007;2:173–177.
8. Houël E. Etude de substances bioactives issues de la flore Amazonienne. Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) et de *Psidium acutangulum* DC (Myrtaceae) utilisées en Guyane française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolomique d'huiles essentielles à activité antifongique. Thèse de doctorat en chimie des substances. Université des Antilles et de Guyane; 2011. 283 pp.
9. Attia S, Lebdi KG, Heuskin S, Lognay G, Hance T. An analysis of potential resistance of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to four botanical pesticides. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 2015;19(3):232–238.
10. Ilboudo Z, Dabiré LCB, Nébié RCH, Dicko IO, Dugravot S, Cortesero AM, et al. Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 2010;46(2):124–128.
11. Walia S, Saha S, Tripathi V, Sharma KK. Phytochemical biopesticides: Some recent developments. Phytochemistry Reviews. 2017;16:989–1007.

12. Overmeer WPJ. Genetics of resistance to tedian in *Tetranychus urticae* C.L. Koch. Archives Néerlandaises de Zoologie. 1966;17(3):295–349.
13. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 1925;18:265–267.
14. Dagnelie P. Analyse statistique à plusieurs variables. Les presses Agronomiques de Gembloux; 1975. 362 pp.
15. Pavela R, Stepanycheva E, Shchenikova A, Chermenskaya T, Petrova M. Essential oils as prospective fumigants against *Tetranychus urticae* Koch. Industrial Crops and Products. 2016;94:755–761.
16. Elhalawany AS, Dewidar AA. Efficiency of some plant essential oils against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch and the two predatory mites *Phytoseiulus persimilis* (A.-H.), and *Neoseiulus californicus* (McGregor). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. 2017;10(7):135–147.
17. Araújo CP Jr, da Camara CA, Neves IA, Ribeiro Nde C, Gomes CA, de Moraes MM, et al. Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and chemical composition of peel essential oils of three *Citrus* species cultivated in NE Brazil. Natural Product Communications. 2010;5(3):471–476.
18. Roh HS, Lim EG, Kim J, Park CG. Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acar: Tetranychidae). Journal of Pest Science. 2011;84:495–501.
19. Karamaouna F, Kimbaris A, Michaelakis A, Papachristos D, Polissiou M, Papatsakona P, et al. Insecticidal activity of plant essential oils against the vine mealybug, *Planococcus ficus*. Journal of Insect Science. 2013;13(1):142.
20. Tarelli G, Zerba EN, Alzogaray RA. Toxicity to vapour exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Journal of Economic Entomology. 2009;102(3):1383–1388.
21. Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. Medical and Veterinary Entomology. 2011;25(3):302–310.
22. Roobakkumar A, Subramaniam MSR, Babu A, Muraleedharan N. Bioefficacy of certain plant extracts against the red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acarina: Tetranychidae) infesting tea in Tamil Nadu, India. International Journal of Acarology. 2010;36(3):255–258.
23. Isman MB, Machial CM. Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. In: Rai M, Carpinella MC, editors. Naturally occurring bioactive compounds. Amsterdam: Elsevier; 2006. pp. 29–44.
24. Goudoum A, Tinkeu LSN, Ngassoum MB, Mbofung CM. Persistence of active compounds of essential oils of *Clausena anisata* (Rutaceae) and *Plectranthus glandulosus* (Labiatae) used as insecticides on maize grains and flour. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development. 2013;13(1):7325–7338.
25. Nenaah GE, Ibrahim SIA, Al-Assiuty BA. Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). Journal of Stored Products Research. 2015;61:9–16.
26. Tomlin CDS. The pesticide manual: A world compendium. 15th ed. Alton, UK: British Crop Production Council; 2009.
27. Regnault-Roger C, Vincent C, Arnasson JT. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. Annual Review of Entomology. 2012;57:405–425.
28. Ngamo Tinkeu LS, Goudoum A, Ngassoum MB, Mapongmetsem PM, Kouninki H, Hance T. Persistence of the insecticidal activity of five essential oils on the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 2004;69(3):145–147.
29. Najafabadi SSM. Comparative study on the acaricidal activities of essential oils from *Ziziphora clinopodioides*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula angustifolia* against *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, on cut roses. Journal of Medicinal Plants and By-products. 2014;3(1):13–19.
30. Zarubova L, Kourimska L, Zouhar M, Novy P, Douda O, Skuhrovec J. Botanical pesticides and their human health safety on the example of *Citrus sinensis* essential oil and *Oulema melanopus* under laboratory conditions. Acta Agriculturae Scandinavica. 2015;65(1):89–93.

## ورقة بحثية

# قياس تجربة المستخدم لمتصفح ويب: مقترح قائم على الإدراك السمعي لذوي الإعاقات البصرية

محمد بدوي مصطفى الخليفة<sup>1</sup>، عمر حاج علي حاج الحسن<sup>1</sup>

<sup>1</sup> قسم الذكاء الاصطناعي، كلية علوم الحاسوب وتقانة المعلومات، جامعة المشرق، الخرطوم، السودان.

\* [muhmad.badawi@gmail.com](mailto:muhmad.badawi@gmail.com)

## الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى إلقاء الضوء على دمج ذوي الإعاقة في مجتمعاتنا من خلال التكنولوجيا، عبر تطوير أساليب وأدوات جديدة تتيح لذوي الإعاقة البصرية القدرة على التفاعل مع تطبيقات الإنترنت بكفاءة وفعالية وسهولة في الاستخدامية اعتماداً على الإدراك السمعي والذاكرة الصدية التي هي أحد مكونات الذاكرة الحسية والمسؤولة عن الاحتفاظ بجميع المعلومات السمعية التي يتم تلقيها من المحيط البيئي على المدى القصير. استُخدمت في هذه الدراسة خصائص التحليل المعرفي في الحوسبة الإدراكية، كالقدرة على التكيف وتفاعل اللغة الطبيعية للتعامل مع المواقع المعقدة المصاحبة للعملية التفاعلية بين المستخدمين من ذوي الإعاقات البصرية مع البرمجيات بواجهاتها الرسومية والمرئية لغرض تحقيق وصول سريع وسهل للمحتوى، ولضمان تفاعل مع تطبيقات الإنترنت يتسم بالمرونة وبقابلية التنبؤ. وقد تم تطوير متصفح إنترنت يعتمد على الأسلوب المقترح لقياس فعاليته في ضمانه لوصول وتفاعل غير مرئي يحقق رضا المستخدمين المصابين بإعاقة بصرية عند تصفحهم الإنترنت، عبر قياس تجربة المستخدم عن طريق اختبار أ/ب. أُجريت مجموعة اختبارات على عينة مكونة من 26 مستخدماً للإنترنت من ذوي الإعاقة البصرية، أثبتت نتائجها فعالية الحلول المقدمة في هذه الدراسة؛ إذ تجاوز وصول المستخدمين من ذوي الإعاقات البصرية لمواقع الويب والخدمات الإلكترونية المقدمة عبر الإنترنت اعتماداً على الأسلوب المقدم وباستخدام متصفح الويب المقترح نسبة 88.3% كحد أدنى لجميع فئات الإعاقة، و100% لبعض الحالات، مما عكس مدى فعالية الحلول المقدمة في هذه الدراسة. وقد قدم الباحثان توصيات ملائمة لنتائج الدراسة.

**الكلمات المفتاحية:** التفاعل بين الإنسان والحاسوب، الحوار وتوليد السرد، معالجة اللغة الطبيعية، تكنولوجيا مساعدة، قابلية الوصول، هندسة الاستخدامية، دمج ذوي الإعاقة.

## Title:

**Measuring the user experience of a proposed web browser based on auditory perception of visually impaired people**

Muhmed Bdawai Elkhalfifa<sup>1\*</sup>, Omer H. A. Elhassan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Artificial Intelligence, Mashreq University, Khartoum, Sudan.

## Abstract

This study aims to present new methods and tools for the inclusion of people with visual impairments through technology. Specifically, we evaluate the ability to interact with Internet applications and web sites efficiently, effectively, and easily. In this work, cognitive computing was used for the interaction of users with visual impairments with the graphic and visual interfaces of online software. We developed an Internet browser to measure the user experience through A/B tests. Using a sample consisting of 26 Internet users with visual impairment, the suggested solutions showed its

Received 15 December 2020; accepted 12 April 2021; published 3 June 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Elkhalfifa MB & Elhassan OHA. Measuring the user experience of a proposed web browser based on auditory perception of visually impaired people. Arabian Journal of Scientific Research 2021;1.5. <https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.5>



effectiveness. In particular, by using the web browser we developed the success rate of access increased by at least 88.3% for all categories of disability. These preliminary results suggest that this path should be pursued in further studies.

**Keywords:** Human-computer interaction, dialogue and narration generation, natural language processing, assistive technology, accessibility, usability engineering, inclusion of people with disabilities.

## 1- المقدمة

لأكثر من مستخدم التحكم في الإجراءات والعمليات الأساسية، مما يساهم في استيعاب التنوع والاختلاف في مهارات ومقدرات المستخدمين. يؤثر الشعور اللحظي في العملية التفاعلية للمستخدمين من ذوي الإعاقة البصرية، وخاصة عندما يستخدمون برمجيات مساعدة تحتاج إلى عمليات تدريب متقدمة قبل استخدامها، مما يثبطهم عن الاستخدام،<sup>7</sup> ونقص بها تحديدًا المتعة والقيمة وليس الأداء، مما يمنع تحقيق أعلى درجات الرضا عن التطبيق المُستخدم عند تصفح الإنترنت.

## 2- مشكلة الدراسة

تؤثر الإعاقة البصرية في العملية التفاعلية مع تطبيقات الإنترنت، وذلك لتأثير الإعاقة البصرية للمستخدم في الكفاءة الإدراكية، وبالذات الأشكال وألوانها وأحجامها والمسافة بينها بسبب عدم القدرة على المحاكاة البصرية، وبناء عليه يعتمد المستخدم من ذوي الإعاقة البصرية اعتمادًا كليًا على اللمس والسمع، فهما المدخل الأساسي لإتمام العملية التفاعلية بالفعالية المطلوبة وتحقيق أكبر قدر من رضا المستخدم.

ولتعويض القصور الناجم عن فقدان الإبصار أو ضعفه في العملية التفاعلية، لا بد للبرمجيات التطبيقية من إيجاد آليات تسمح لحاسني السمع واللمس للعمل بكامل طاقتهمما للتعامل مع جميع المثيرات بواجهة التطبيق البرمجي بالكفاءة المطلوبة.

وفي ضوء ما سبق، يمكن صياغة مشكلة الدراسة في السؤال الرئيس التالي:

ما فعالية الحلول التي تم تقديمها وحوسبتها في تحسين تجربة المستخدمين المصابين بإعاقة بصرية عند تصفحهم الإنترنت باستخدام البرمجية المقترحة (متصفح الويب)؟

## 3- المنهجية والأدوات

### 1-3 منهج الدراسة

المنهج المتبع في هذه الدراسة هو المنهج التجريبي، من أجل دراسة المؤثرات الخارجية وتفسير النتائج والتحكم فيها.

كما، استخدم نموذج المجموعة الدراسية المنفردة، باختيار عينة واختبارها بمعزل عن البرمجية المقترحة، وبعدها تم الاستعانة بالمتغير التجريبي، ونعني به البرمجية المقترحة في هذا العمل، وأخيرًا قام الباحثان بقرأة التأثيرات للمتغير واستخلاص نتائجها.

### 2-3 أدوات الدراسة

في هذه الدراسة، استُخدمت مجموعة أدوات لتطوير حلول مرنة وقابلة للحوسبة تساهم في إثراء تجربة المستخدمين من ذوي الإعاقة البصرية عند تصفحهم الإنترنت، وهي على النحو التالي:

### 1-2-3 الإدراك السمعي

بما أن البرمجية المُقدمة في هذه الدراسة موجهة إلى مستخدمي الإنترنت

يؤدي الإنترنت في عصرنا الراهن دورًا أساسيًا في جميع نواحي الحياة بمختلف أوجهها؛ الصحة والعلمية والمعرفية والاجتماعية والسياسية والاقتصادية وغيرها،<sup>1</sup> حيث أصبحت هذه التقنية الوسيلة الأولى في عمليات الاتصال وإنجاز الأعمال لمختلف الحقول. وفي هذا الإطار، تحول مفهوم الأمية إلى عدم القدرة على استخدام تقنيات وتطبيقات الإنترنت المختلفة، التي من خلالها يستفيد البشر من الخدمات الحكومية والتعليمية والصحية والتجارية،<sup>2</sup> وبناء عليه وجب على مطوري تطبيقات وبرمجيات الإنترنت، سواء أكانوا أفرادًا أم مؤسسات، الأخذ في الاعتبار جميع شرائح المستخدمين بمختلف مقدراتهم العضوية والذهنية وكذلك الإدراكية، ومراعاة نقاط ضعفهم أو إعاقاتهم التي تحول دون وصولهم إلى تلك الخدمات الإلكترونية المقدمة من خلال شبكة الإنترنت بالكفاءة والاستخدامية المطلوبتين.

يواجه ذوو الاحتياجات الخاصة، وخاصة المصابين بمختلف أنواع الإعاقات بصرية مثل العمى التام وعمى الألوان وضعف البصر بدرجاته المختلفة، صعوبات كبيرة عند ولوجهم شبكة الإنترنت؛ تبدأ من اختيارهم لبرمجية التصفح، مرورًا بالقدرة على الوصول إلى عناوين المواقع، وانتهاءً بالتفاعل مع محتوى صفحات الويب.

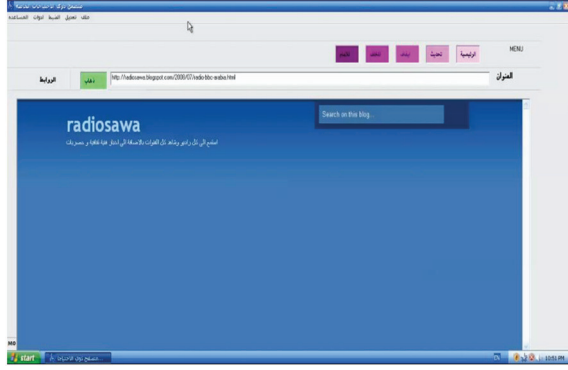
لذا يحتاج مستخدمو الإنترنت من ذوي الإعاقات البصرية توفير أكبر قدر من عوامل التفاعلية أثناء التصفح، مما ساهم في ظهور أدوات وبرمجيات موجهة إلى ذوي الإعاقة البصرية خاصة تُعينهم على إدخال المعلومات وإخراجها بعد معالجتها بصورة سلسلة ومتوافقة مع مقدراتهم، مثل برمجيات الإملاء الصوتي وبرمجيات القراءة الناطقة للنص المكتوب، كبرنامج «جاسوس» وبرنامج «هال». وتعمل هذه على تحويل الملفات الإلكترونية إلى ملفات صوتية يمكن سماعها.<sup>3</sup> وهناك أيضًا برمجيات تكبير النص على الشاشة التي تستهدف فئة ضعاف البصر تحديدًا، كبرمجية تقريب النص التي تقوم بتكبير الشاشة بما يفوق 16 مرة من حجمها الأصلي، وكذلك الطباعة بطريقة برايل، من خلال طابعات خاصة تحول النصوص المكتوبة بصيغتي (.txt) و(.doc) إلى نصوص مكتوبة بطريقة برايل.<sup>4</sup>

ويرتكز التفاعل بين تطبيقات الإنترنت من جهة والمستخدمين من ذوي الإعاقة البصرية من جهة أخرى، على الجوانب التجريبية، وردود أفعالهم فيما يتعلق بالفائدة والكفاءة وسهولة الاستخدام وخصوصًا عند تصفحهم الإنترنت من خلال تطبيقات المتصفحات بمساعدة إحدى الأدوات المذكورة آنفًا، التي هي في الأساس برمجيات تطبيقية لاسترجاع المعلومات عبر الشبكة العنكبوتية بعد تحديدها من معرف الموارد الموحد، وهو العنوان الفريد المستخدم لتحديد المحتوى على شبكة الإنترنت. كما تتأثر العملية التفاعلية بجوانب أخرى مثل خصائص النظام، إضافة إلى خصائص المستخدم ومحيط الاستخدام، وتؤدي الخبرات السابقة للمستخدمين من ذوي الإعاقة البصرية إلى تحسين التفاعل مع جميع المكونات البرمجية لتطبيقات الإنترنت.<sup>5</sup>

من ناحية أخرى، لا بد من مراعاة جوانب أخرى توافق التطبيق مع خصائص المستخدم، سواء أكانت نفسية أم فسيولوجية، لتقليل وقت اكتساب الخبرة ومعالجة الأخطاء، والقدرة على التذكر، وذلك من خلال التجميع المنطقي لعناصر واجهات التطبيق،<sup>6</sup> ومرونة البرمجيات التطبيقية التي تتيح

### 3-2-3 واجهة المستخدم

تم تصميم واجهة مستخدم مرنة وتدمج بين الرسومات ذات الخلفية الصوتية والواجهة الصوتية التفاعلية، حتى يوفر متصفح الويب واجهة تفاعلية تقبل أوامر المستخدم الصوتية فتتجهأ بيئة تخاطب صوتي بينه وبين المتصفح مع دعم المتصفح للغة العربية، حيث يستند متصفح الويب المقدم في هذا العمل علي معايير الويب التي أقرتها رابطة شبكة الويب العالمية. ويعرض الشكل (2) رسماً مبسطاً لواجهة المتصفح باللغة العربية.



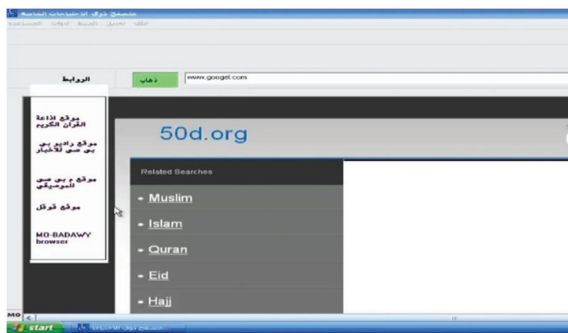
الشكل 2. واجهة متصفح الويب الأساسية باللغة العربية.

وردود المتصفح كلها صوتية في أي تفاعل مع المستخدم. وتعتمد كل مكونات المتصفح الرسومية على خلفيات صوتية تعمل تلقائياً عند تمرير الفأرة على المكون البرمجي أو عنصر الواجهة ومكونات المتصفح الأساسية، وهي مبنية في العناصر التالية.

### 3-2-4 قائمة الروابط المنطوقة

تم تطوير قائمة روابط تعتمد على مفهوم الحوسبة السحابية وتقنيات خدمات الويب، حيث يقوم المتصفح عند «التنصيب» بالاتصال وطلب الخدمة من مجموعة محركات بحث راديو على الإنترنت وخدمات تقنية راديو الإنترنت المفتوحة المصدر والتي تدعم مفهوم الراديو كخدمة، وبدوره يقوم متصفح الويب بإضافة «قائمة الروابط» بعد استقبال ردود الطلبات الواردة على هيئة لغة الترميز قابلة للامتداد (XML)، ويعرض الشكل (3) إضافة قوائم الروابط التي يتم تفعيلها بواسطة أمر صوتي صاد عن المستخدم ذي الإعاقة البصرية، وبعدها يضيف المتصفح قوائم الإذاعات الصوتية ويجهز قوائم صوتية تُدرج فيها مجموعة الأوامر لتسهيل الوصول إلى محتوى مواقع البث الإذاعي على شبكة الإنترنت كالتالي.

يقوم المستخدم بالاستماع لقائمة الروابط بعد أمره المتصفح سردها ثم يختار الموقع الإذاعي المنشود بأمر كلامي للمتصفح، ويوضح الشكل (4) ترسل البيانات بين الكيانات المختلفة المشتركة في عملية تكوين القائمة باستخدام مخطط التتابع من مخططات لغة النمذجة الموحدة.



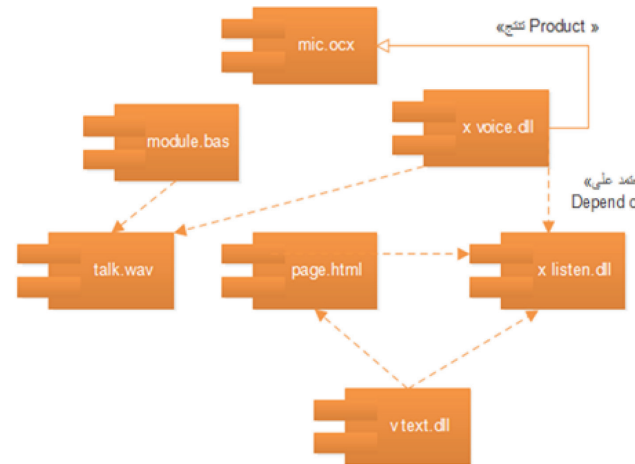
الشكل 3. قائمة الروابط المنطوقة.

من ذوي الإعاقات البصرية بمختلف أنواعها، تم اعتماد حاسة السمع كحاسة أساسية لتفاعل التطبيق والمستخدم، حيث تتيح حاسة السمع لذوي الإعاقة البصرية طريقة طبيعية بديلة للتكيف والتوافق مع البيئة المحيطة، ويستطيعون من خلالها إتمام عمليات التعلم والتدريب على المهارات المطلوبة وتمييز الأصوات المختلفة والانتقاء من بين تلك الأصوات. فالإدراك السمعي هو قدرة ذهنية تنظم وتفسر المدخلات الواردة بالسمع، وما يترتب عليه من وعي بالأفعال والأحداث المحيطة.<sup>8</sup>

ويعتبر التمييز الصوتي العنصر الأهم في الإدراك السمعي، وقد تم الاعتماد عليه في هذه الدراسة؛ فهو يُعبّر عن مقدرة المستخدم على تمييز شدة الصوت ومدى ارتفاعه أو انخفاضه، وكذلك التمييز بين الأصوات اللغوية («الفونيمات»)<sup>9</sup>، وهو ما تم اعتماده في العملية التفاعلية. ومن جانب آخر، تكمن أهمية التمييز السمعي في أنه يتيح المقارنة بين الأصوات والكلمات،<sup>10,11</sup> وهو ما يحتاجه المستخدم المتفاعل مع برمجية البحث و هي كالتالي. مجموعة من الأصوات بعضها مسجل مسبقاً في ملفات للتدريب على استخدام الأزرار وحقوق النص الصوتية وتعليمات الاستخدام لمتصفح الويب، والبعض الآخر تم مزجها بتقنية تحويل النص إلى كلام لخلق حوار تفاعلي بين المستخدم ومتصفح الويب يساعده على القيام بمهامه باستخدام تقنيات تمييز الكلام.

### 3-2-2 متصفح الإنترنت

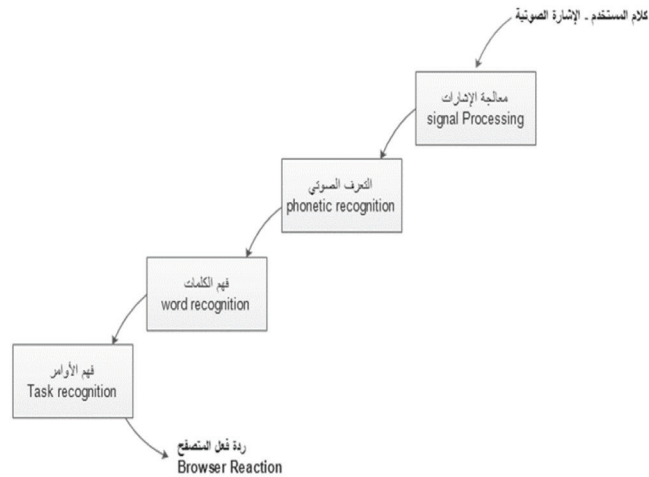
تم تصميم متصفح ويب بهدف جلب موارد المعلومات من على شبكة الإنترنت للمستخدمين من ذوي الإعاقة البصرية، بالتخاطب مع التطبيق، وذلك بدمج تقنيات تمييز الكلام و تمييز الأوامر الصوتية وتقنية تحويل النص إلى كلام وتقنية إملاء الكلمات، وكذلك الإدراك السمعي عند المستخدمين. ويوضح الشكل رقم (1) أهم المكونات البرمجية من مكتبات وملفات ارتباط وملفات صوتية والعلاقة بينها باستخدام لغة النمذجة الموحدة. كم يدعم متصفح الويب بروتوكول نقل الملفات (FTP).



الشكل 1. مخطط المكونات البرمجية الأساسية لمتصفح الويب.

تبدأ العملية التفاعلية مع متصفح الويب باستماع المستخدم المعاق بصرياً إلى قوائم الأوامر الصوتية وإلى قائمة مكونات واجهة المستخدم السمعية، ومن ثم يحدد المستخدم عنوان المورد المنشود (URI) ليقوم المتصفح باسترداد المعلومات عبر بروتوكول نقل النص الفائق (http). وقد تم استخدام محرك متصفح مفتوح المصدر ليتولى ترجمة محتوى الصفحة من شفرات لغات النص الفائق والجافا سكريبت وغيرها من لغات البرمجة من جانب الخادم.

والجمل، وقد استُخدمت تقنية تمييز الكلام المقدمة من شركة ميكروسوفت والمضمنة في حزمة (Visual Studio)، حيث كانت الأكثر توافقًا مع المكونات البرمجية الأخرى. بينهما، ويكون الكلام فيها في شكل سلسلة من الإشارات المتصلة، تقوم التقنية على تحويله أولاً إلى إشارات متقطعة والتي من خلالها تتم حوسبة الكلام بوضعها في صيغة ثنائية 0 أو 1.<sup>14</sup> ويوضح الشكل (5) الآلية المستخدمة لتمييز الكلام في العملية التفاعلية للبرمجية المقدمة في هذه الدراسة، حيث تم وضع نموذج لعمل التقنية ضمن البرمجية التطبيقية في ثلاث مراحل، وهي: مرحلة ما قبل التعرف، ومرحلة التعرف (ومرحلة التفاعل المباشر بين المستخدم والبرمجية بالكلام).



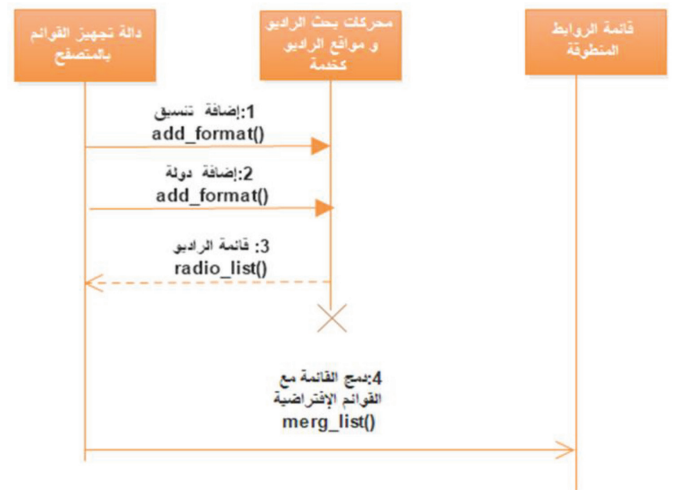
الشكل 5. آلية العملية التفاعلية القائمة على فهم الكلام في متصفح الويب.

### 11-2-3 تجربة المستخدم

في علم الحوسبة الإدراكية، يُعبر مصطلح تجربة المستخدم عن كل ما يرتبط بأحاسيسه وسلوكه ومواقفه تجاه برمجية معينة، حيث يتم من خلال تجربة المستخدم التعرف على الجوانب القيمة والعاطفية والتجريبية وذات المعاني والمدلولات في التفاعل بين الإنسان والحاسب الآلي، كما تهدف تجربة المستخدم إلى تحديد تصور كل مستخدم على حدة فيما يتعلق بتحقيق البرمجية لكل من الأمان والفائدة والفعالية والكفاءة والاستخدامية وأخيراً رضا المستخدمين.

## 4- الاختبارات

في هذا المحور، نعرض ما تم إجراؤه من اختبارات لقياس تجربة المستخدم التي هي في الأساس جمع لبيانات كمية ونوعية، ومن ثم تحليلها، أثناء استخدام عينة مكونة من 26 شخصاً من ذوي الإعاقة البصرية بمختلف أنواعها لمتصفح الإنترنت المقدم في هذه الدراسة، وذلك بغرض التحقق من مدى فعالية الأسلوب المقترح للعملية التفاعلية والمعتمدة على الإدراك السمعي والذاكرة السمعية. ويعرض الجدول (1) بيانات المشاركين في الاختبارات ووصفاً لحالتهم ومستوى إدراكهم البصري والرمز المستخدم للإشارة إليهم في باقي الدراسة.



الشكل 4. آلية عمل قائمة الروابط المنطوقة وتكاملها مع محركات الراديو على الإنترنت.

### 5-2-3 شريط العنوان

تم تطوير شريط عنوان يعتمد على تقنية الإملاء الصوتي حيث يُتيح متصفح الويب للمستخدم إدخال معرف الموارد الموحد (URI) من خلال خاصية إملاء حروف العنوان، كما يمكن للمستخدم تغيير إعدادات الإدخال من خلال الشريط لتعتمد فقط على الإدخال من خلال لوحة الإدخال وذلك في حالات الإعاقة البصرية الخفيفة كعمى الألوان وضعف البصر المتوسط، وفي كلتا الحالتين وعند تمرير المؤشر على شريط العنوان يسمع المستخدم رسالة صوتية عالية الجودة تساعده على إتمام عملية الوصول.

### 6-2-3 محرك (KHTML)

هو المحرك الأساسي لبرمجية متصفح الويب، وهو أحد محركات التصفح مفتوحة المصدر،<sup>12</sup> قد تطوره مشروع (KDE) وهو منشور تحت رخصة جنو العمومية (GNU)، و أُدمج فيه محركا التنسيق والتقديم. وله دور مساعد في تكامل المكونات البرمجية المختلفة وملفات الارتباط من جهة، وأدوات التطوير المستخدمة من جهة أخرى.

### 7-2-3 واجهة (SAPI)

هي واجهة تطبيقات الكلام من ميكروسوفت، تحتوي مجموعة من المكونات البرمجية، واستُخدمت في شتى العمليات التفاعلية مع واجهة المستخدم الصوتية لمتصفح الإنترنت لضمان سهولة استخدام ذوي الإعاقة البصرية. والمكونات البرمجية فيها وعملياتها التفاعلية كما يلي.<sup>13</sup>

### 8-2-3 تقنية الأوامر الصوتية

هي وحدات برمجية عالية المستوى تهدف إلى التعرف على مجموعة من الأوامر الصوتية والتحكم في الكلام، وقد استُخدمت هذه التقنية لخلق وسط تفاعلي يعتمد على الذاكرة السمعية أو الذاكرة الصودية التي هي أحد سجلات الذاكرة الحسية للمستخدمين.

### 9-2-3 تقنية الإملاء (Voice Dictation)

تتكون من وحدات برمجية عالية المستوى تتعرف على الكلام المسرود إملاءً، وقد استُخدمت لإدراج عناوين المواقع على شريط العنوان من خلال إملاء المستخدم حروف اسم الموقع (Domain Name) بالمتصفح صوت.

### 10-2-3 تقنية فهم الكلام (ASR)

هي وحدات برمجية تتولى ترجمة إشارات الكلام إلى سلسلة من الكلمات

نوع الإعاقة البصرية	وصف مختصر للإعاقة وآلية التفاعل	الرمز	الذكور	الإناث	العدد الكلي
عمى تام	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة من دون مساعدة أشخاص آخرين، وهم فاقدون للإدراك البصري تمامًا.	ع ت	3	1	4
عمى تام	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة وبمساعدة أشخاص آخرين، وهم فاقدون للإدراك البصري تمامًا.	ع ت*	2	0	2
ضعف رؤية حاد	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة من دون مساعدة أشخاص آخرين، وهم مستخدمون تقل حدة البصر لديهم عن 60/6.	ض ح	2	3	5
ضعف رؤية حاد	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة وبمساعدة أشخاص آخرين، وهم مستخدمون تقل حدة البصر لديهم عن 60/6.	ض ح*	4	3	7
عمى ألوان	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة وبمساعدة أشخاص آخرين، وهم مستخدمون مصابون بخلل يفقدهم القدرة على رؤية أحد الألوان الأحمر، الأزرق والأحمر أو اللون الناتج من دمجهما.	ع أ	2	1	3
عمى ألوان	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة ومن دون مساعدة أشخاص آخرين، وهم مستخدمون مصابون بخلل يفقدهم القدرة على رؤية أحد الألوان الأحمر، الأزرق والأحمر أو اللون الناتج من دمجهما.	ع أ*	0	1	1
عمى ألوان	يتصفحون مواقع الإنترنت باستخدام برمجيات قراءة الشاشة وبمساعدة أشخاص آخرين، وهم مستخدمون لهم القدرة على رؤية القليل فقط من الألوان المختلفة من بين آلاف الألوان.	ع أ**	2	2	4

تشغيل قدرة 10 دقائق يعكس تفاصيلها الجدول (2)، إذ تفاوتت نسبة وصول المستخدمين عند إجراء الاختبارات على المستخدمين المصابين بعمى تام، فنجد أن الفئة (ع ت) استطاعت الوصول إلى مواقع الويب (10 مواقع) من خلال المتغير (A) بنسبة بلغت 47.5%، في حين أن الفئة (ع ت\*) وعند استخدام المتغير (A) لم تتجاوز نسبة وصولها 30%. وفي كلتا الحالتين، نجد أن التفاعل من خلال النقر على الأزرار بعد سماع المستخدم للصوت المصاحب تسبب في زمن تأخير إضافي؛ وذلك لحاجة المستخدمين إلى سماع الأصوات، ثم الشروع في إدخال عناوين الويب التي تُقرأ كذلك من قبل قارئات الشاشة، مما رفع الزمن الكلي للوصول لإجراء العملية التفاعلية إجمالاً.

الجدول 2. وصول فئات العمى التام إلى المواقع باستخدام المتغيرين (A) و(B).

نوع الإعاقة	ع ت	ع ت*	المجموع
الوصول المستهدف	20*4 (80)	20*2 (40)	120
الوصول الفعلي	53	25	78
المتغير (A)	40/19 (%47.5)	20/6 (%30)	60/25 (%41.7)
المتغير (B)	40/34 (%85)	20/19 (%95)	60/53 (%88.3)

في المرحلة الثانية، أعيد الاختبار مرة أخرى عبر المتغير (B) لقياس مستوى التفاعلية بين المستخدمين والمتصفح الذي يبدأ بالوصول إلى المواقع، حيث قفزت نسبة وصول المستخدمين (ع ت) إلى 85% بفارق بلغ 37.5%

#### 1-4 اختبار أ/ب (A/B Testing)

لقياس فعالية متصفح الويب المعتمد على الإدراك الصوتي والذاكرة السمعية عبر قياس تجربة المستخدم، تم اعتماد اختبار (A/B) الذي يعتبر أحد الأساليب المتبعة للبحث في تجربة المستخدم، ويتكون من مجموعة اختبارات لتجربة عشوائية من المتغيرين (A) و(B) واختبارهما، ويشمل أيضًا تطبيق الفرضيات الإحصائية.<sup>15,16</sup> في هذا الجزء، نعرض اختبار وصول الأشخاص من ذوي الإعاقة البصرية إلى 10 مواقع ويب إذاعية والتفاعل مع محتواها في وقت قدره 20 دقيقة بمعدل دقيقتين لكل موقع، وذلك باستخدام متصفحات مثل (Internet Explore و Firefox) مع تشغيل برمجيات قارئات الشاشة، وقد استُخدمت برمجية (JAWS) وأسندت إلى المتغير (A)، ومن ناحية أخرى استُخدم المتصفح المعتمد على الإدراك الصوتي والذاكرة السمعية، من خلال تفاعل المستخدم عبر تخطابه مع البرمجية، وأسند إلى المتغير (B).

وبناء عليه، تكون متغيرات الاختبارات على النحو التالي:

- المتغير A (Variant A) = عدد مرات الوصول ومن ثم التفاعل باستخدام برمجية قارئ الشاشة.
- المتغير B (Variant B) = عدد مرات الوصول ومن ثم التفاعل باستخدام متصفح الويب المقترح.

اعتمادًا على عدد العينة لكل نوع من أنواع الإعاقات البصرية وعدد المواقع المستهدف الوصول إليها والتفاعل معها (10 مواقع) من خلال المتغيرين (A) و(B)، تم تنفيذ عدد من الاختبارات واحتساب نسبة مئوية لنتائج كل اختبار على حدة، إذ إن (الوصول = عدد أفراد العينة \* عدد المواقع للمتغيرين A و B).

#### 1-1-4 نتائج اختبارات للمستخدمين من فئة العمى التام

عملية الوصول إلى 10 مواقع من خلال المتغيرين (A) و(B) في وقت



مقارنته باستخدامهم المتغير (A) في المرحلة الأولى للاختبار، ونجد كذلك أن نسبة وصول المستخدمين (ع ت) ارتفعت إلى 95% أي بفارق 60%، وقد عكست هذه النسب مدى الاستجابة العالية للمستخدمين المصابين بالعمى التام في العملية التفاعلية؛ ما يعني فعالية وكفاءة الحلول البديلة للوصول المعتمدة على الانتباه الصوتي للمستخدمين والواجهة الصوتية للبرمجية.

ويمكن أن نرجع الفارق الكبير في ارتفاع نسبة وصول المستخدمين من فئات العمى التام لاعتمادنا مبدأ التوافقية من خلال معرفة أنواع المستخدمين ومقدراتهم الفسيولوجية والإدراكية وتطوير الحلول اعتماداً على تلك المقدرات، مما ساهم في تقليل وقت التعلم والأخطاء، كما أن البرمجية لها قدرة على التعامل مع مدخلات المستخدم الصوتية الخاطئة عبر مقارنة البرمجية لمدخلات المستخدمين بقائمة شروط تنفيذ الأفعال في العملية التفاعلية، مما عزز سهولة الاستخدام في إنجاز عملية التصفح عبر البرمجية.

#### 4-1-2 نتائج اختبارات للمستخدمين من فئة ضعف الرؤية الحاد

أجريت اختبارات جديدة على المستخدمين المصابين بضعف الرؤية الحاد، وذلك بغرض قياس جدوى العملية التفاعلية مع المتصفح. يوضح الجدول (3) أن الفئة (ض ح) استطاعت بلوغ مواقع الويب (10 مواقع) من خلال المتغير (A) بنسبة بلغت 62%، أما الفئة (ض ح\*) عند استخدامها للمتغير (A) فبلغت نسبة وصولها 70%. وفي كلتا الحالتين نجد أن التفاعل من خلال النقر على الأزرار بعد سماع المستخدم للصوت مصحوباً بدرجة رؤية منخفضة لعناصر واجهة غير صوتية للمتغير (A) تسبب أيضاً في زمن تأخير إضافي، وذلك لحاجة المستخدمين إلى اللجوء لحاسة البصر لرؤية عناصر الواجهة من أزرار وقوائم وصناديق إدخال، ثم من بعد ذلك الشروع في إدخال عناوين الويب التي تُقرأ كذلك من قبل قارئ الشاشة، مما رفع الزمن الكلي للوصول وإجراء العملية التفاعلية.

#### الجدول 3. وصول فئة ضعف الرؤية الحاد إلى المواقع باستخدام المتغيرين (A) و(B).

نوع الإعاقة	ض ح	ض ح*	المجموع
الوصول المستهدف	20*5 (100)	20*7 (140)	240
الوصول الفعلي	74	114	188
المتغير (A)	50/31 (%62)	70/49 (%70)	120/80 (%66.7)
المتغير (B)	50/43 (%86)	70/65 (%92.8)	120/108 (90%)

في المرحلة الثانية الخاصة بفئة (ض ح)، أعيد الاختبار مره أخرى عبر المتغير (B) لقياس مستوى التفاعلية بين المستخدمين والمتصفح الذي يبدأ بالوصول إلى المواقع، حيث ارتفعت نسبة وصول المستخدمين (ض ح) إلى 86% بفارق بلغ 24% مقارنة باستخدامهم المتغير (A) في المرحلة الأولى للاختبار، كما نجد أن نسبة وصول المستخدمين (ض ح\*) ارتفعت إلى 92.8% بواقع فرق بلغ 22.8%، وتعكس هذه النسب مدى الاستجابة العالية للمستخدمين المصابين بضعف حاد في البصر، ويمكن أن نرجع ذلك إلى اعتماد المتغير (B) في العملية التفاعلية على الذاكرة السمعية للمستخدمين المسؤولة عن حفظ المعلومات السمعية من البيئة المحيطة على المدى القصير، وهذا ما تم اعتماده عند تصميمنا لمتصفح الويب المقدم في هذا العمل، إذ إن

عناصر الواجهة الصوتية من مستودع المعلومات السمعية قصيرة المدى، كما تم تطوير محفزات صوتية عبر عناصر الواجهة التي لا تحتاج إلى استخدام المعالج السمعي المركزي، مما قلل الزمن الكلي لردة فعل المستخدمين بعد سماعهم للواجهة الصوتية، إضافة إلى ذلك فإن ردة الفعل تعتمد على التخاطب ولا تحتاج إلى أي نشاط فيزيائي في استخدام وحدات إدخال.

#### 4-1-3 نتائج اختبارات للمستخدمين من فئة عمى الألوان

على المستوى الثالث من عملية التحقق من فعالية وكفاءة الحلول و المقدمة في هذه الدراسة، تم تنفيذ اختبارات جديدة على 8 أفراد مصابين بعمى الألوان من جميع أفراد عينة الاختبار البالغ عددهم 26 مستخدماً للإنترنت، ولطبيعة إعاقته المرتبطة بالألوان ودرجة إزاحة البكسلات (pixels) ناحية الألوان الأبيض والأسود والرمادي (Gray Scale) من خلال المرشحات التي تضمنها المتصفح للتحكم في الألوان ودرجة التباين لجميع عناصر الواجهة كل على حدة كما يتضح في الشكل (2)، وتظهر نتائج الاختبارات الموضحة في الجدول (4) جدوى هذا الأسلوب وارتفاع نتائجه.

#### الجدول 4. نسب بلوغ فئة المصابين بعمى الألوان إلى المواقع باستخدام المتغيرين (A) و(B).

نوع الإعاقة	ع أ	ع أ*	ع أ**	المجموع
الوصول المستهدف	20*3 (60)	20*1 (20)	20*4 (80)	160
الوصول الفعلي	50	13	43	106
المتغير (A)	30/20 (%66.6)	10/3 (%30)	40/10 (%25)	120/80 (%66.7)
المتغير (B)	30/30 (%100)	10/10 (%100)	40/33 (%82.5)	120/108 (%90)

في المرحلة الأولى التي تم إجراؤها على المتغير (A) بلغت نسبة وصول فئة (ع أ) 66.6%، في حين أن الفئة (ع أ\*) لم تتجاوز نسبة وصولها أكثر من 30%، بينما تراجعت نسبة وصول الفئة (ع أ\*\*) إلى أقل من 25%. في المرحلة الثانية من قياس تجربة المستخدم، تم إعادة الاختبارات على المتغير (B)، فارتفعت نسبة الوصول إلى مواقع الويب عبر البرمجية إلى (100%) للمستخدمين من فئة (ع أ) بزيادة عن حالة المتغير (A) قدرها 33.4%، كما ارتفعت نسبة وصول المستخدمين من فئة (ع أ\*) إلى 100% بفارق 70%، في حين تجاوزت وصول الفئة (ع أ\*\*) نسبة 82%، بفارق 60%. والفارق الكبير في نسبة الوصول لصالح البرمجية المقدمة في هذا العمل والمعتمدة على الأسلوب المقترح يمكن إرجاعه إلى القدرة العالية على التذكر وذلك من خلال التجميع المنطقي لأجزاء الواجهة الصوتية والرسومية، كما أن اعتمادنا على مبدأ التكنولوجيا الخفية حيث لم تكن هناك حاجة إلى معرفة المستخدمين من فئة عمى الألوان والفئات الأخرى لآليات عمل التقنيات المدمجة في المتصفح أو طريقة عملها وتنصيبها، إذ تم تقديمها كحزمة برمجية واحدة لا تحتاج إلى أي إضافات برمجية ملحقة عند استخدامها لتصفح الإنترنت.

والخلاصة أنه ساهمت الإضافات المقدمة للتحكم في سطوع الألوان الأساسية وتدرجاتها مع استخدام الإدراك الصوتي والذاكرة السمعية للمستخدمين من فئة عمى الألوان في تعزيز رضا المستخدمين من خلال إتاحة آليات تحكم في خصائص عناصر الواجهة، وأيضاً استخدام آلية

فسيولوجية، وهنا نقصد آلية الكلام والتخاطب مع التطبيق لترتفع نسب الوصول ومن ثم التفاعل مع تطبيقات الويب عبر المتصفح المقدم في هذا العمل بهذه الصورة المطردة.

## 5- خاتمة وتوصيات

في هذه الدراسة، تم اعتماد مجموعة من الأساليب القائمة على الحوسبة الإدراكية؛ اعتمد أسلوب تصفح الإنترنت لذوي الإعاقة البصرية على مجموعة محددات أساسية في الحوسبة الإدراكية مثل التكيف، فنجد أن النظام المقدم يعتمد على أكثر من آلية للوصول والتصفح، مما ضمن عمله بصورة متوازنة مع مختلف أنواع الإعاقات البصرية ودرجاتها المختلفة، مع الأخذ في الاعتبار أن المتصفح يمكن استخدامه من قبل الأشخاص المبصرين.

كما أن أسلوب تطوير واجهة التطبيقات الذي عُرض في هذه الدراسة يقوم على مبدأ القدرة على فهم السياق، حيث وُفّر النظام آلية للتعامل مع البيانات السياقية كالبيانات المنطوقة عند إدخال عناوين الويب أو ردة الفعل القائمة على الأفعال الصوتية، وهنا نقصد فهم الكلام وتحويل النصوص إلى كلام وإظهار نتائج تعتمد على أسلوب فعل المستخدم في العملية التفاعلية.

من جانب آخر، نجد أن الآليات التفاعلية لمستخدمي الإنترنت من ذوي الإعاقة البصرية مع البرمجية التي قُدمت في هذه الدراسة اعتمدت على استبدال المثيرات البصرية بمثيرات سمعية وحوسبة تلك المثيرات بطريقة تضمن تدرج شدتها، إذ إن عنصر الإدراك، وهنا نقصد به التمييز الصوتي، يُتيح للمستخدمين من ذوي الإعاقات البصرية بمختلف أنواعها تنفيذ عملية اختيار

## المراجع

1. Shapley K, Sheehan D, Maloney C, Caranikas-Walker F. Effects of technology immersion on middle school students' learning opportunities and achievement. *Journal of Educational Research*. 2011;104(5):299–315.
2. Spears SA. Technology-enhanced learning: The effects of 1:1 technology on student performance and motivation. PhD Thesis, University of West Florida, USA; 2012.
3. Bigham JP, Prince CM, Ladner RE. Web Anywhere: A screen reader on-the-go. *Proceedings of the 2008 international cross-disciplinary conference on web accessibility (W4A)*; 2008. pp. 73–82.
4. Kane SK, Bigham JP, Wobbrock JO. Slide rule: Making mobile touch screens accessible to blind people using multi-touch interaction techniques. *Proceedings of the 10th international ACM SIGACCESS conference on computers and accessibility*; 2008. pp. 73–80.
5. Asakawa C, Takagi H, Ino S, Ifukube T. Auditory and tactile interfaces for representing the visual effects on the web. *Proceedings of the fifth international ACM conference on assistive technologies*; 2002. pp. 65–72.
6. Balan RVS, Punithavalli M. Software architecture, scenario and patterns. *International Journal of Computer Science Issues*. 2010;7(5):418–423.
7. WCAG. Web content accessibility guidelines 1.0; 2003 [accessed 2020 Aug 1]. Available at: <http://www.w3.org/TR/WCAG10/>.
8. Yost WA, Sheft S. Auditory perception. In: Yost WA, Popper AN, Fay RR, editors. *Human Psychophysics*. New York: Springer; 1993. pp. 193–236.
9. Collins BS, Mees IM. *The phonetics of English and Dutch*. Leiden: Brill; 1999.
10. Poirier C, Collignon O, Scheiber C, Renier L, Vanlierde A, Tranduy D, et al. Auditory motion perception activates visual motion areas in early blind subjects. *Neuroimage*. 2006;31(1):279–285.
11. Ferati M, Raufi B, Kurti A, Vogel B. Accessibility requirements for blind and visually impaired in a regional context: An exploratory study. *Proceedings of the IEEE 2nd international workshop on usability and accessibility focused requirements engineering (UsARE)*. Karlskrona, Sweden: IEEE; 2014. pp. 13–16.
12. Grier C, Tang S, King ST. Secure web browsing with the OP web browser. *Proceedings of the 2008 IEEE symposium on security and privacy*. Oakland, CA: IEEE; 2008. pp. 402–416.
13. Vankayala RR, Shi H. Dynamic voice user interface using VoiceXML and active server pages. In: Zhou X, Li J, Shen HT, Kitsuregawa M, Zhang Y, editors. *Frontiers of WWW research and development. Lecture notes in computer science*, no. 3841. Berlin: Springer; 2006. pp. 1181–1184.
14. Kumar K, Aggarwal RK. Hindi speech recognition system

- using HTK. International Journal of Computing and Business Research. 2011;2(2):2229–6166.
15. Räihä O. A survey on search-based software design. Computer Science Review. 2010;4(4):203–249.
  16. Kohavi R, Deng A, Frasca B, Walker T, Xu Y, Pohlmann N. Online controlled experiments at large scale. Proceedings of the 19th ACM SIGKDD international conference on knowledge discovery and data mining. New York: ACM; 2013. pp. 1168–1176.

## ورقة بحثية

# تقييم التلوث الفيزيائي-الكيميائي والميكروبي لمياه الصرف الصحي ومياه البحر في خمس دول متوسطية

وفاء حسن<sup>1</sup>، سناء عليبي<sup>1\*</sup>، الهادي بن منصور<sup>1</sup>

<sup>1</sup> وحدة البحث: تحاليل وأسابيل مطبقة في البيئة (UR17ES32)، المعهد العالي للعلوم التطبيقية والتكنولوجيا بالمهدية،  
جامعة المنستير، تونس

\* alibi\_sana@hotmail.fr

## الملخص

يُشكل التلوث البيئي الناتج من الأنشطة الصناعية والمنزلية والزراعية ضغطاً كبيراً على الموارد المائية على مستوى العالم؛ ذلك أنّ للمياه المستعملة تأثيراً مباشراً في البيئة، إذ يتم تصريفها مباشرة في الطبيعة بعد إخضاعها للمعالجة وفق معايير محدّدة، فتحتوي بذلك على مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكائنات الحية الدقيقة والمركبات العضوية وغير العضوية التي تسبب العديد من الأمراض والمخاطر. وفي هذا الإطار، جمع الباحثون عينات من مياه البحر ومن مياه الصرف الصحي المعالجة وغير المعالجة من أربعة بلدان في جنوب البحر الأبيض المتوسط، هي: مصر والمغرب والجزائر وتونس. خضعت هذه العينات لمجموعة من التحاليل الفيزيائية-الكيميائية والميكروبية، ثمّ تمّت مقارنة النتائج المتحصّلة عليها بدراسة أُجريت في الفترة نفسها بدولة في شمال البحر الأبيض المتوسط، وهي إيطاليا. أظهرت الدراسات الفيزيائية-الكيميائية تلوثاً بارزاً لمياه الصرف ومياه البحر التي تمّ جمعها وتحليلها من البلدان العربية الأربعة وإيطاليا، حيث أثبتت وجود الملوثات: الأكسجين الكيميائي (COD) والطلب على الأكسجين البيولوجي ( $BOD_5$ ) و(TOC)، والنترات ( $NO_3^-$ ) وغيرها، وأيضاً بعض المعادن الثقيلة. من ناحية أخرى، سمحت تقنية (DGGE) بتقييم مباشر للتنوع البكتيري الموجود بهذه المياه المستعملة وكذلك مياه البحر، وقد أثبتت هذه التحاليل شدة التنوع البكتيري في هذه المياه.

**الكلمات المفتاحية:** المياه المستعملة، التلوث، المعادن الثقيلة، تقنية DGGE، التنوع البكتيري.

## Title:

**Assessment of the physico-chemical and microbiol pollution of wastewater and seawater collected from five Mediterranean countries**

Wafa Hassen<sup>1</sup>, Sana Alibi<sup>1\*</sup>, Hedi Ben Mansour<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Unit of Analysis and Process Applied to the Environment, APAE Higher Institute of Applied Sciences and Technology, Mahdia, University of Monastir, Tunisia.

## Abstract

The availability of water resources worldwide suffers from pollution pressures caused by many assets, such as industrial, domestic, and agricultural activities. Wastewater has a direct impact on the natural environment, as it is drained after some specific treatments, so it contains a large variety of microorganisms, organic, and inorganic compounds that cause many diseases and harms. In this context, the authors collected samples of seawater as well as treated and untreated wastewater from southern Mediterranean countries (Egypt, Morocco, Algeria, and Tunisia), then carried out some physico-chemical and microbiological analysis. After that, the obtained results were compared with some of the results found in the same period in a northern Mediterranean country (Italy). Physico-chemical studies showed significant pollution of wastewater and seawater collected

Received 11 August 2020; accepted 12 April 2021; published 10 June 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Hassen W, Alibi S & Ben Mansour H . Assessment of the physico-chemical and microbiol pollution of wastewater and seawater collected from five Mediterranean countries. Arabian Journal of Scientific Research 2021;1.6. <https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.6>



and analyzed from the Arab countries and Italy in terms of the presence of pollutants (COD, BOD, TOC, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ... etc.), and some heavy metals. On the other hand, DGGE technology allowed a direct evaluation of bacterial diversity in this wastewater as well as seawater. These tests have demonstrated the intensity of bacterial diversity in these water types.

**Keywords:** Wastewater, pollution, heavy metals, DGGE, bacterial diversity.

## 1- المقدمة

تعتبر المياه عنصراً حيوياً داخل المنظومة البيئية، كما تمثل رابطاً أساسياً في السلاسل الغذائية. ولكن هذا المكون، وعلى الرغم من وفرة، فإنه يعاني من ضغوط التلوث المتأتية من عدة مصادر، وأبرزها الفضلات الصناعية والمنزلية والزراعية. وغالباً ما تُشكل معالجة مياه الصرف الصحي في المناطق الريفية مشكلة كبيرة؛ ذلك أن هذه المياه المتأتية من المجتمعات الريفية تتطلب معالجة متكاملة ومراقبة حتى يتسنى تصريفها بشكل منتظم إلى البيئة البحرية والساحلية من دون أضرار بيئية ملموسة. تحتوي مياه الصرف الصحي على مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكائنات الحية الدقيقة، يسبب بعضها عدة أمراض خطيرة للإنسان والحيوان والنبات، في حين أن غالبيتها غير ضارة، بل يمكن أن تكون نافعة وتُستعمل أداةً مهمةً وفعالة لتطهير المياه.<sup>2,1</sup>

وفقاً لمنظمة الصحة العالمية، فإن الأمراض التي تنقلها المياه، مثل الكوليرا والتيفوئيد والتهاب الكبد، مسؤولة عن نحو مليوني حالة وفاة سنوياً في بعض المناطق الريفية من بلدان العالم الثالث، غالبيتها لدى الأطفال دون سن الخامسة. وبناء عليه، تعتبر المعالجة البيولوجية والفيزيائية-الكيميائية لتحسين الجودة الصحية لمياه الصرف الصحي بالغة الأهمية في هذه الأماكن. في البلدان المتوسطة، تعتبر النسبة المئوية للسكان المتمتعين بنظام الصرف الصحي للبلديات عالية، في حين لا تزال العديد من القرى غير مجهزة بمحطات معالجة مياه الصرف الصحي، إذ ترتفع تكلفة تركيبها بشكل ملحوظ كلما زادت الكثافة السكانية.<sup>3</sup> وبذلك يتم تصريف كمية كبيرة من مياه الصرف المعالجة أو غير المعالجة في البيئات البحرية وخاصة البيئات الساحلية، من ناحية. ومن ناحية أخرى، تخضع هذه المواقع لتغيرات دائمة في تركيبها الفيزيائية-الكيميائية والبيولوجية.<sup>5,4</sup>

عموماً، جرت دراسة المجتمع البكتيري في العينات البحرية والساحلية بالاعتماد على تقنية إنماء البكتيريا باستعمال وسط زراعة صلب. ولكن هذه الطريقة مرتبطة بقابلية البكتيريا للزراعة، ما يُقصي إمكانية الكشف عن السلالات «القابلة للحياة، ولكن غير قابلة للزراعة» (Viable but non cultivable)، فتستجيب هذه النوعية من البكتيريا لمختلف تلك الضغوطات بتقليص حجم خليتها. ولذلك فإن الحل الأنسب لتجاوز هذا التحدي يكمن في استخدام طريقة التشريد الكهربائي للهِلام المتدرج المتفكك (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) التي تقوم على التحليل التسلسلي للجينات (16S rRNA)، وبذلك تسمح بتقييم التنوع البكتيري للعينات مباشرة. وتعتمد هذه الطريقة على تقنية البصمات، وذلك بتغيير طبيعة التدرج الكهربائي للهِلام.<sup>6</sup>

بناء على ما سبق، فإن الأهداف الرئيسية لهذه الدراسة هي: (1) تقييم الإعدادات الفيزيائية-الكيميائية والمعادن الثقيلة في مياه الصرف الصحي قبل دخولها لمحطات المعالجة (المدخل)، وبعد مرورها بمختلف مراحل العلاج البيولوجي (المخرج)، وفي عينات مياه البحر التي تم جمعها من 5 دول على سواحل البحر الأبيض المتوسط (تونس والجزائر والمغرب ومصر وإيطاليا). (2) تقييم آثار إجراءات معالجة مياه الصرف الصحي في البنية المجتمعية البكتيرية الإجمالية، من حيث كثافتها وتنوعها في مختلف المياه المنتقاة ببعض البلدان المتوسطة.

## 2- المواد وطرق البحث

### 2-1 مواقع أخذ العينات

تم جمع عينات من مياه البحر والمياه المستعملة المعالجة وغير المعالجة من خمس دول (تونس والجزائر والمغرب ومصر وإيطاليا) وذلك خلال الفترة فبراير 2017-أبريل 2017 (الجدول 1). تمت تعبئة لتر واحد من الماء بطريقة معقمة من كل موقع وعلى عمق متر واحد وفي قارورة زجاجية معقمة سلفاً. ثم نُقلت العينات المجمعة مباشرة إلى المختبر في درجة حرارة تتراوح ما بين 4-6 درجات مئوية، حيث تم ترشيح العينات من خلال مرشحات غشائية بمقياس 0.22 و 0.45 ميكرومتر والاحتفاظ بها في الظلام تحت 4 درجات مئوية حتى يحين التحليل.

الجدول 1. إحداثيات (GPS) لمواقع جمع عينات المياه.

Country	GPS coordinates
Morocco	IM: 33°34'40"N; 5°08'36.7"W OM: 33°32'39"N; 5°10'37"W
Tunisia	IT: 35°28'28"N; 11°02'27"E OT: 35°28'49"N; 11°03'32"E SWT: 35°28'20"N; 11°03'14"E
Italy	II: 38°06'50"N; 14°51'46"E OI: 38°06'52"N; 14°51'42"E SWI: 38°06'56"N; 14°51'38"E
Algeria	IA: 31°11'59"N; 29°57'53"E OA: 31°09'05"N; 29°50'31"E
Egypt	IE: 31°12'08.4"N; 29°55.9'57"E OE: 31°11'59.4"N; 29°57'53.8"E SWE: 31°09'05.9"N; 29°50'31.2"E

\* (IM): مدخل المحطة في المغرب؛ (OM): مخرج المحطة في المغرب؛ (IT): مدخل المحطة في تونس؛ (OT): مخرج المحطة في تونس؛ (II): مدخل المحطة في إيطاليا؛ (OI): مخرج المحطة في إيطاليا؛ (IA): مدخل المحطة في الجزائر؛ (OA): مخرج المحطة في الجزائر؛ (IE): مدخل المحطة في مصر؛ (OE): مخرج المحطة في مصر؛ (SWT): مياه البحر في تونس؛ (SWI): مياه البحر في إيطاليا؛ (SWE): مياه البحر في مصر.

### 2-2 التحليل الفيزيائي-الكيميائي

أُجريت التحاليل الفيزيائية-الكيميائية التالية: قياس درجة الحموضة (pH)، والتوصيل الكهربائي (EC)، والعكارة (TUB) باستخدام مقياس التوصيل (pH meter WTW)، (WTW 315i) و (AQUALITIC) على جميع العينات المجمعة من مياه الصرف الصحي والمياه المعالجة ومياه البحر. كما تم تحليل الطلب على الأكسجين الكيميائي (COD)، والطلب على الأكسجين البيولوجي (BOD<sub>5</sub>)، والمواد العضوية (OM)، والكربون العضوي الإجمالي (TOC)، والصلب المعلق (SS)، والنترات (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)، والهالوجين العضوي القابل للامتصاص (AOX) باستخدام محلل الأشعة فوق البنفسجية. إضافة

إلى فحص وجود وتقدير تركيز المعادن الثقيلة كالزنك والكبريت والحديد في هذه العينات. وقد تم تحليل النتائج استناداً إلى دليل منظمة الصحة العالمية لحماية صحة السباحين والاستخدام الآمن والتخلص من مياه الصرف، إضافة إلى المعايير المحلية الخاصة بكل بلد.<sup>11,10,9,8,7</sup>

### 2-3 استخراج الحمض النووي الكلي

تم استخراج الحمض النووي الجيني الكلي (DNA) من كل عينة ماء باستخدام تقنية الضرب بالخرز.<sup>12</sup> 20 مليلتر من مياه الصرف الصحي تم فصلها عن طريق الطرد المركزي (16000 جولة/دقيقة لمدة 10 دقائق). وبعد ذلك، تم خلط الجزيئات الصلبة التي تم فصلها في 1 مليلتر من محلول التحلل للاستخراج (Extraction Buffer). ويضاف نصف أنبوب من الخرز الزجاجي (قطره 0.5 مليلتر). تم ضرب الأنابيب لمدة دقيقتين ونصف بسرعة عالية. ثم يبرد على الجليد لمدة دقيقة ويخفق مرة أخرى لمدة 2.5 دقيقة إضافية. بعد ذلك، تم طرد الأنابيب عند 16000 جولة/دقيقة لمدة 3 دقائق عند درجة حرارة الغرفة لتجميع المادة الطافية. ثم تم ترسيب الشوائب بإضافة أسيتات الأمونيوم (M2). تركت المخاليط على الجليد لمدة 5 دقائق، وطردت عند 16000 جولة/دقيقة لمدة 10 دقائق وتم جمع الأجزاء الطافية. تم تكرار خطوة التنقية هذه مرتين لإزالة الشوائب المتبقية في الجزء الطافي. تم ترسيب الأحماض النووية بإضافة الأيزوبروبانول والطرز المركزي عند 16000 جولة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. تم شطف الجزيئات الصلبة باستخدام 70% من إيثانول، وطردها مرة أخرى لمدة 5 دقائق وتجفيفها بالهواء. وأخيراً تم إذابة الأحماض النووية في 50 ميكروتر من (TE).

وبالنسبة إلى عينات مياه البحر، فتم ترشيح لتر واحد من كل عينة من خلال 0.45 و 0.22 ميكروتر مرشحات غشاء نترات السيليلوز المعقمة، على التوالي. وبعد ذلك، تم قطع المرشحات إلى قطع ونقلها إلى أنابيب صقر معقمة (15 مل). ويحدث تحلل الخلايا عن طريق احتضانها في 1.8 مل من محلول التحلل و90 ميكروترًا من «الليزوزيم» (Lysozyme) عند 37 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة. وبعد ذلك، تضاف 210 ميكروترات من 10% من (SDS) و50 ميكروترًا من بروتيناز K (Proteinase K) وخلطها واحتضانها مدة ساعتين عند 55 درجة مئوية في حاضنة اهتزاز. ثم تم خلط منتج التحلل مع كحول الفينول/ الكلوروفورم/ إيزاميل (24: 1). وبعد عملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق (13000 جولة/دقيقة)، يُنقل الطافي المائي إلى أنبوب جديد، ممزوجًا بـ كلوروفورم/ كحول إيزاميل (24: 1). وقد تم تسريع المادة الطافية التي تحتوي على الحمض النووي باستخدام الأيزوبروبانول عند -20 درجة مئوية طوال الليل. وأخيراً، تم عزل الحمض النووي عن طريق الطرد المركزي، وغسله بالإيثانول وإذابته في عازل (TAE). كما تم تحليل الحمض النووي المتحصل عليه بواسطة الهجرة الكهربائية في هلام الأغاروز للتحقق من نقائها.

### 2-4 التضخيم بـ (PCR) والتحليل بـ (DGGE)

تم تحليل المجتمعات البكتيرية الموجودة في عينات مياه الصرف الصحي الخام غير المعالجة ومياه الصرف المعالجة ومياه البحر بتقنية (DGGE). كما تم تضخيم جين (16S rRNA) باستخدام (PCR) والمشرع المناسب بمجال البكتيريا: (3'-CCGTCAATTCCTTTGATGTTT-5') ، 907R ، و 357F (3'-TACGGGAGGCAGCAG-5'; 5'-end GC-clamp) الذي يستهدف جزءاً من جين الحمض النووي (16S rRNA) الذي يشمل مناطق (V3-V5) شديدة التغير.<sup>13</sup> وأجريت تفاعلات (PCR) في حجم نهائي بـ 25 ميكروترًا

يحتوي على (1PCR buffer X)، و 2.5 مليلتر  $MgCl_2$ ، و 0.12 ملي مولار (dNTPs)، و 0.3 ملي مولار لكل إشعال و 1U/μL (Taq DNA polymerase)، وقد تم تطبيق البروتوكول الحراري التالي: 94 درجة مئوية مدة 4 دقائق، تليها 10 دورات من 94 درجة مئوية مدة 30 ثانية، و 61 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة، و 72 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة؛ تليها 20 دورة إضافية من 94 درجة مئوية مدة 30 ثانية، و 56 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة، و 72 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة؛ والتتمديد النهائي في 72 درجة مئوية مدة 10 دقائق. وقد تم التحقق من وجود وطول منتجات (PCR) بواسطة الهجرة الكهربائية في هلام الأغاروز 1% قبل تحليل (DGGE).

تم وضع منتجات (PCR) في هلام بولي أكريلاميد (Polyacrylamide) gel 7% (وزن/ حجم) في (7.4 pH TAE 1X) مع تدرج متغير يتراوح من 40 إلى 60%.<sup>13</sup> كما تم إجراء الهجرة الكهربائية مدة 18 ساعة في 60 درجة مئوية عن طريق تطبيق جهد ثابت قدره 90 فولتًا. وبعد الهجرة الكهربائية، تم تلوين هلام البولي أكريلاميد مدة 30 دقيقة في محلول بروميد الإيثيديوم (Ethidium Bromide)، وغسله بماء مقطر معقم، وتصويره على منضدة إضاءة ما فوق بنفسجية. وبعدها تم استئصال شرائط (DNA) السائدة، وتم شطفها عن طريق الحضانة في 80 ميكروترًا من الماء المقطر المعقم طوال الليل وعند 37 درجة مئوية مع ارتجاج ضعيف. بعد ذلك تم تضخيم أجزاء الحمض النووي بواسطة (PCR) باستخدام نفس الإشعال دون المشبك (GC) كما هو موضح في الفقرة السابقة، وتم تسلسلها وترسبها في (GenBank) ثم تحليل ملفات تعريف نطاق (DGGE) لإنتاج مصفوفات تشير إلى وجود أو غياب الشرائط الجينية، وتم إنشاء مخطط شريطي عن طريق تطبيق الخوارزمية (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) باستخدام برنامج (MVSP)، وتمكن هذه الطريقة من التعرف على تنوع المجتمع البكتيري من خلال مؤشر شانون للتنوع (H).<sup>14</sup>

### 2-5 التحليل الإحصائي

تم إجراء تحليل إحصائي لمختلف نتائج المعايير الفيزيائية-الكيميائية باستخدام برنامج (IBM SPSS Inc 25)، فيظهر الانحرافات المعيارية والتباين بين العينات وأهمية الاختلافات بين الوسائل، كما يمكن من تقدير القيم وفقاً لاختبار (Student-Newman-Keuls) ( $p \leq 0.05$ ).

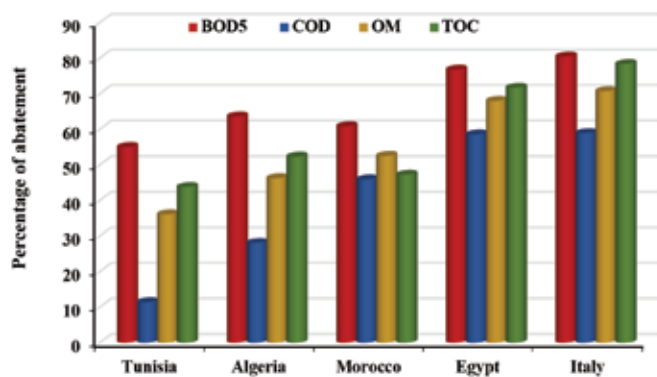
### 3- النتائج والمناقشة

#### 3-1 مراقبة جودة المياه

يعطي الجدول (2) نظرة عامة وكاملة على معايير جودة مياه الصرف الصحي والمياه البحرية المقيسة في كل موقع من مواقع أخذ العينات. ووفقاً لحدود التوصيات الخاصة بالمياه في دول البحر الأبيض المتوسط، حازت عينات مياه الصرف الصحي غير المعالجة على أعلى النسب لمعظم المعايير الفيزيائية-الكيميائية المختبرة؛ إلا أن هذه النسب لم تتجاوز المستويات المسموح بها لـ ( $BOD_5$ )، و (COD)، و (OM)، و (SS)، و (AOX)، و (TOC) والعكارة.<sup>11,10,8,9,7</sup> ومقارنةً بمواقع أخذ العينات الأخرى، أظهرت النتائج أيضاً أن غالبية المعايير الفيزيائية-الكيميائية العالية كانت في العينات المأخوذة من مدخل محطة معالجة مياه الصرف الصحي بسبب ارتفاع الأعمال العضوية التي تدخل المحطة.

على غرار دراستنا، كشفت بحوث سابقة عن تركيزات وتكثفات أعلى في عينات المياه المستعملة الواردة من تونس، وأيضاً من الجزائر، بقيم

يعتبر (pH) عاملاً مهماً يحدد مدى ملاءمة المياه المستعملة المعالجة لأغراض مختلفة، بما في ذلك تسمم الحيوانات والنباتات. وفي الدراسة الحالية، ظل (pH) بالقرب من الجياد وتراوح في جميع عينات المياه من 0.05 ± 0.06 إلى 0.2 ± 8.06 (الجدول 2).



الشكل 1. أداء مختلف أنظمة معالجة مياه الصرف الصحي.

تصل إلى 1720 و 1450 و 747 ملغ/ لتر لـ (COD) و (TSS) و (BOD<sub>5</sub>) على التوالي.<sup>17,16,15</sup> ومن ناحية أخرى، أظهرت دراسة أخرى أن معدل تركيزات النفايات السائلة للعديد من المعايير الفيزيائية-الكيميائية (TSS, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BOD<sub>5</sub>, COD) قد ازداد مقارنة بعينات مياه الصرف الخارجة،<sup>18,19</sup> مما يعكس جودة عملية معالجة مياه الصرف الصحي.

أظهرت نتائج تحليل العينات من مكان دخول مياه الصرف الصحي إلى مكان الخروج بمحطة معالجة المياه في إيطاليا انخفاضاً كبيراً ( $p \leq 0.05$ ) في جميع الاختبارات المنجزة تقريباً (الجدول 2). لذلك، فقد حققت أداءً عاماً مرضياً لإزالة (COD) و (BOD<sub>5</sub>) و (OM) و (TOC) بمتوسط كفاءة يقدر بـ 80.44% و 58.9% و 70.74% و 78.4%، على التوالي. وأعقبته محطة معالجة مياه الصرف الصحي لمصر أداءً عالياً بكفاءة بلغت 76.79% و 58.55% و 67.96% و 71.72% لـ (COD) و (BOD<sub>5</sub>) و (OM) و (TOC)، على التوالي. بينما كان نظام المعالجة بمحطة التطهير بتونس الأقل نجاعة (الجدول 2، والشكل 1). ويمكن أن تتميز فعالية الإزالة بعدد من العمليات البيولوجية والفيزيائية التي تحدث بين مياه الصرف الصحي والمكونات الأخرى التي يتم الإشراف عليها بواسطة الركيزة والنباتات والمجتمعات الميكروبية.<sup>20</sup>

الجدول 2. الخصائص الفيزيائية-الكيميائية لعينات المياه المختلفة.

Country	BOD5 (mg O2/l)			COD (mg O2/l)			OM (mg/l)		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	258±3 <sup>a</sup>	116±3 <sup>c</sup>	8.1±0.03 <sup>a</sup>	395±3 <sup>a</sup>	350±3 <sup>c</sup>	150±3 <sup>c</sup>	303.66±3 <sup>a</sup>	194±3 <sup>c</sup>	55.4±3 <sup>a</sup>
Algeria	380±2 <sup>c</sup>	138±2 <sup>c</sup>	-	730±2 <sup>b</sup>	525±2 <sup>c</sup>	-	496.66±2 <sup>b</sup>	267±2 <sup>e</sup>	-
Morocco	335±2 <sup>b</sup>	131±2 <sup>d</sup>	-	850±2 <sup>d</sup>	460±2 <sup>d</sup>	-	506.66±2 <sup>c</sup>	240.66±2 <sup>d</sup>	-
Egypt	405±3 <sup>d</sup>	94±3 <sup>b</sup>	27.4±3 <sup>b</sup>	760±3 <sup>c</sup>	315±3 <sup>b</sup>	88±3 <sup>a</sup>	523.33±3 <sup>d</sup>	167.66±3 <sup>b</sup>	47.6±3 <sup>a</sup>
Italy	445±5 <sup>c</sup>	87±5 <sup>a</sup>	7.6±0.2 <sup>a</sup>	730±5 <sup>b</sup>	300±5 <sup>a</sup>	141±5 <sup>b</sup>	540±5 <sup>e</sup>	158±5 <sup>a</sup>	52.06±5 <sup>a</sup>

Country	SS (mg/l)			AOX (mg/l)			TOC (mg/l)		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	4.4±0.458 <sup>a</sup>	105±3 <sup>c</sup>	1.2±0.106 <sup>a</sup>	62±3 <sup>d</sup>	18.20±3 <sup>b</sup>	0.33±0.006 <sup>b</sup>	178±3 <sup>a</sup>	100±3 <sup>c</sup>	46±3 <sup>b</sup>
Algeria	254±2 <sup>b</sup>	138±2 <sup>c</sup>	-	7.6±3.606 <sup>b</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>	-	262±2 <sup>c</sup>	125±2 <sup>e</sup>	-
Morocco	430±2 <sup>c</sup>	132±2 <sup>d</sup>	-	0.08±0.021 <sup>a</sup>	2.1±2 <sup>a</sup>	-	220±2 <sup>b</sup>	116±2 <sup>d</sup>	-
Egypt	276±3 <sup>d</sup>	91±3 <sup>b</sup>	71.50±3 <sup>b</sup>	0.23±0.006 <sup>a</sup>	2.8±1.5 <sup>a</sup>	0.33±0.015 <sup>b</sup>	290±3 <sup>d</sup>	82±3 <sup>b</sup>	25.6±3 <sup>a</sup>
Italy	260±5 <sup>c</sup>	76.5±5 <sup>a</sup>	2.18±0.04 <sup>a</sup>	16.40±5 <sup>c</sup>	0.43±0.006 <sup>a</sup>	0.22±0.005 <sup>a</sup>	345±5 <sup>e</sup>	74.50±5 <sup>a</sup>	43.5±5 <sup>b</sup>

Country	NO3- (mg/l)			PH			EC µs/cm		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	137±3 <sup>c</sup>	242±3 <sup>c</sup>	7±0.5 <sup>c</sup>	5.48±0.1 <sup>a</sup>	5.1±0.05 <sup>a</sup>	7.46±0.2 <sup>b</sup>	25.74±3 <sup>b</sup>	20.72±3 <sup>b</sup>	96.2±3 <sup>c</sup>
Algeria	30±2 <sup>b</sup>	29.2±2 <sup>a</sup>	-	6.56±0.05 <sup>ab</sup>	6.27±0.1 <sup>c</sup>	-	8.94±0.4 <sup>a</sup>	9.32±2 <sup>a</sup>	-
Morocco	29±2 <sup>b</sup>	67±2 <sup>d</sup>	-	7.55±1.242 <sup>b</sup>	7.6±0.1 <sup>d</sup>	-	1260±2 <sup>c</sup>	1872±2 <sup>c</sup>	-
Egypt	0.32±0.012 <sup>a</sup>	55±3 <sup>c</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	6.15±0.05 <sup>ab</sup>	6.05±0.148 <sup>b</sup>	6.12±0.4 <sup>a</sup>	3924±3 <sup>c</sup>	7.13±0.172 <sup>a</sup>	33.1±3 <sup>a</sup>
Italy	2.98±0.382 <sup>a</sup>	38±5 <sup>b</sup>	4.6±0.3 <sup>b</sup>	6.35±0.11 <sup>ab</sup>	6.32±0.1 <sup>c</sup>	6.11±0.54 <sup>a</sup>	2868±5 <sup>d</sup>	2548±5 <sup>d</sup>	87±5 <sup>b</sup>

Country	Tub (NTU)			Ratio COD/DBO5		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	135.02±3 <sup>a</sup>	16.24±0.556 <sup>d</sup>	2.72±0.051 <sup>b</sup>	1.53±0.01 <sup>a</sup>	3.02±0.05 <sup>a</sup>	18.52±0.44 <sup>b</sup>
Algeria	176.8±2 <sup>b</sup>	14.65±0.138 <sup>c</sup>	-	1.92±0.006 <sup>d</sup>	3.8±0.045 <sup>c</sup>	-
Morocco	1312±2 <sup>c</sup>	11.06±0.178 <sup>b</sup>	-	2.54±0.01 <sup>e</sup>	3.51±0.04 <sup>b</sup>	-
Egypt	234±3 <sup>c</sup>	9.19±0.076 <sup>a</sup>	3.47±0.155 <sup>c</sup>	1.88±0.006 <sup>c</sup>	3.35±0.075 <sup>b</sup>	3.23±0.245 <sup>a</sup>
Italy	322±3 <sup>d</sup>	25.43±0.191 <sup>e</sup>	0.34±0.11 <sup>a</sup>	1.64±0.01 <sup>b</sup>	3.46±0.14 <sup>b</sup>	18.55±0.17 <sup>b</sup>

\* (WWTP): Wastewater Treatment Plant; (BOD): Biochemical Oxygen Demand; (COD): Chemical Oxygen Demand; (OM): Organic Matter; (SS): Suspended Solid; (AOX): Absorbable Organically Halides; (TOC): Total Organic Carbon; (NO<sub>3</sub>-): Nitrate; (EC): Electrical Conductivity; (Tub): Turbidity; Means (n=3) followed by the same lowercase letter within columns are not significantly different according to the Student-Newman-Keuls test (p≤0.05).

(الجدول 2). وكانت هناك فروق ذات دلالة إحصائية (p≤0.05) لعينات مياه الصرف الواردة (62 ± 3؛ 7.6 ± 3.606؛ 0.021 ± 0.08؛ 0.006 ± 0.23؛ 16.40 ± 5 ملغ/ لتر). ومع ذلك، لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية (p>0.05) لمياه الصرف من الجزائر والمغرب ومصر وإيطاليا (0.21 ± 0.01؛ 2.1 ± 2؛ 2.8 ± 1.5؛ 0.43 ± 0.006 ملغ/ لتر K على التوالي)، فقط بلغت قيم مياه الصرف التونسية الصادرة 18.20 ± 3 ملغ/ لتر. وقد تم بالفعل إبراز التركيز العالي في النفايات السائلة وارتبط بمصادر المياه المستعملة مثل صناعة الورق، وصناعات تكرير النفط، والصناعات البتروكيمياوية، وتصنيع الجلود، ومصانع النسيج، ومصانع البلاستيك، ومصانع المبيدات والصناعات الدوائية.<sup>29</sup> المعادن الثقيلة هي مواد سامة للإنسان ومضرة بالبيئة.<sup>30</sup> ولحسن الحظ، كانت قيم المعادن الثقيلة المختبرة منخفضة ولم تتجاوز القدر الأعلى المحتسب في معايير كل دولة متوسطة (الجدول 3). ومع ذلك، قدمت عينات مياه الصرف الصحي في مصر مستوى أعلى من النحاس (4.24 ± 0.50 ملغ/ لتر) والحديد (3.08 ± 0.5 ملغ/ لتر). علاوة على ذلك، لم تختلف تركيزات المعادن التي تم الحصول عليها بين عينات مياه البحر الأبيض المتوسط بشكل ملحوظ (p>0.05).

### الجدول 3. نتائج تحليل المعادن الثقيلة

Country	Copper (mg/l)		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	0.90±0.50 <sup>ab</sup>	0.08±0.05 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>
Algeria	0.05±0.025 <sup>a</sup>	0.27±0.153 <sup>a</sup>	-
Morocco	0.15±0.05 <sup>a</sup>	0.09±0.05 <sup>a</sup>	-
Egypt	4.24±0.50 <sup>c</sup>	0.90±0.50 <sup>b</sup>	0.01±0.005 <sup>a</sup>
Italy	1.60±0.50 <sup>b</sup>	0.09±0.05 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>

Country	Iron (mg/l)		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	1.90±0.5 <sup>b</sup>	0.57±0.5 <sup>ab</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>
Algeria	1.08±0.51 <sup>ab</sup>	0.90±0.25 <sup>b</sup>	-
Morocco	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.01±0.005 <sup>a</sup>	-
Egypt	3.08±0.5 <sup>c</sup>	0.06±0.03 <sup>a</sup>	0.01±0.005 <sup>a</sup>
Italy	1.15±0.5 <sup>ab</sup>	1.15±0.5 <sup>b</sup>	0.01±0.005 <sup>a</sup>

وفيما يتعلق بعينات مياه البحر، أظهرت نتائجنا أن مياه الصرف الصحي المعالجة التي يتم تصريفها مباشرة في البحر ليس لها تأثير في جودة المياه، حيث إن نتائج الاختبارات المنجزة كانت ضمن الحدود المقبولة. إذًا، تبين النتائج أن مياه الصرف الصحي في جميع دول البحر الأبيض المتوسط تم علاجها بشكل ناجح قبل تصريفها (الجدول 2). وفي المقابل، أظهر بحث آخر أن تصريف مياه الصرف الصحي يؤدي إلى تدهور المياه الساحلية.<sup>21,22,23</sup> كما يمكن أن تتسبب المستويات العالية من المعايير الفيزيائية-الكيميائية في إحداث تأثيرات ضارة متعددة على البشرية والكائنات المعرضة للخطر، ويمكن أن تعدل السموميات الهيكلية والوظيفية الرئيسية للأنظمة البيئية المتأثرة بحمل مياه الصرف الصحي.<sup>21</sup>

تتراوح نسبة إزالة المواد العضوية في محطة معالجة مياه الصرف الصحي بين 36.11 و 70.74%. علاوة على ذلك، لتقدير إمكانية التحلل البيولوجي للمادة العضوية، تم حساب نسبة (COD/BOD<sub>5</sub>) في جميع العينات (مدخل ومخرج الصرف الصحي ومياه البحر) وأظهرت القيم فرقًا كبيرًا (p≤0.05) بين البلدان (الجدول 2). كما لوحظت قيم مماثلة لنسبة (COD/BOD<sub>5</sub>) في عينات مياه الصرف الصحي تتراوح بين 0.5 ± 1.7؛ 0.3 ± 3؛ 0.2 ± 2.2 لتأثيرات محطات معالجة مياه الصرف الصحي، ومياه الصرف الصحي المعالجة ومياه البحر على التوالي. ونتيجة لذلك، اقترحت بعض الدراسات أنه يمكن توقع حدوث تحلل بيولوجي محتمل.<sup>24,19,17</sup>

خلال خطوات المعالجة المختلفة، تميل مياه الصرف إلى أن تصبح مستنفدة من مواد الاختزال العضوية وغنية بالأكسجين، مما يجعل الأكسجين متاحًا لمواد أخرى مثل الكربون والنيتروجين والكبريت. وبناء عليه، سيكون هناك تخصيب غير مباشر للماء في المواد المؤكسدة بشكل أساسي مثل (CO<sub>2</sub>) و (SO<sub>2</sub>) و (SO<sub>4</sub>) و (NO) و (NO<sub>2</sub>) و (NO<sub>3</sub>). وهذا يفسر زيادة تركيزات (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) في جميع عينات مياه الصرف الصحي المعالجة (29.2 ± 2؛ 38 ± 5؛ 55 ± 3؛ 67 ± 2؛ 242 ± 3 ملغم/ لتر في الجزائر وإيطاليا ومصر والمغرب وتونس، على التوالي). على عكس عينات مياه الصرف الصحي التونسية المعالجة التي تجاوزت الحدود، كانت هذه القيم أقل من حدود بلدان البحر الأبيض المتوسط (الجدول 2). وجدت الدراسات السابقة أن التربة والنترات خطيران على صحة الإنسان والكائنات المائية.<sup>28,27,26,25</sup> وعلى الرغم من أنه تم الكشف عن قيم لعينات مياه البحر 0.5 ± 7؛ 1 ± 5؛ 1 ± 4؛ 0.25 ± 0.01 و 0.3 ± 4.6 ملغ/ لتر على التوالي في تونس والجزائر والمغرب ومصر وإيطاليا ضمن حدود مقبولة.

وفيما يتعلق بـ (AOX)، كانت التركيزات أعلى في جميع عينات مدخل المياه من تلك التي لوحظت في عينات مياه الصرف الصحي ومياه البحر



أظهرت نتائج الهجرة الكهربية عدة شرائط (DNA) بكثافات ومسافات متغيرة. وقد كانت بعض شرائط (DNA) خاصة بموقع معين، في حين كانت شرائط (DNA) أخرى شائعة في أكثر من عينة واحدة. كما كشف التحليل المرئي لهلام (DGGE) عن اختلاف في الهجرة، مما سمح بتوزيع شرائط (DNA) في ثلاثة مستويات من الهجرة: القصيرة، والمتوسطة، والطويلة. وتبدو شرائط (DNA) التي تتميز بهجرة متوسطة مقابلة للبكتيريا عالية المحتوى من (GC)، وهي السائدة.

تم تمييز نتائج هلام (DGGE) لعينات مياه الصرف الصحي المعالجة لإيطاليا (OI) والمغرب (OM) من العينات الأخرى، وتميزت بنطاقات منخفضة الهجرة (محتوى GC منخفض). وبالنسبة إلى العينات الأخرى، كانت نتائج هلام (DGGE) متشابهة عمومًا مع النطاقات المكثفة للهجرة المتوسطة. وعلى غرار دراستنا، قام فريق من الباحثين،<sup>17</sup> بتطبيق تقنية (DGGE) أثناء معالجة مياه الصرف الصحي، وقد أظهرت النتائج كفاءة هذه التقنية المطورة لتحديد الاختلافات في الوفرة البكتيرية وثرأ الأنواع بين مواقع أخذ العينات (مياه الصرف الصحي غير المعالجة والمعالجة). ومع ذلك، يمكن لهذه التقنية اكتشاف فقط 1-2% من المجتمعات الميكروبية التي تتميز بالمجتمعات السائدة.<sup>6</sup>

أظهرت النتائج اختلافات كبيرة في المجتمع البكتيري بين عينات المياه المختلفة، خاصة قبل وبعد المعالجة. وتم الكشف عن المزيد من النطاقات في عينات مداخل محطات التطهير أكثر من عينات مخارج المحطات (الشكل 2-أ). وعلاوة على ذلك، لوحظ وجود مجتمع بكتيري معقد نسبيًا في مدخل المياه المنتقاة من إيطاليا (II) ومصر (IE)، ما يعكس تنوعًا بيولوجيًا أعلى (II مع 8 شرائط DNA؛ IE مع 9 شرائط DNA). وقد اختفت العديد من شرائط (DNA) من المياه غير المعالجة إلى مياه الصرف الصحي المعالجة، ما يؤكد أداء محطة معالجة إيطاليا ومصر.

وبالنسبة إلى عينات مياه البحر، أظهرت ملفات تعريف (DGGE) اختلافًا نسبيًا بين عينات مياه البحر التي تمت تصفيتها بـ 0.45 ميكرومتر، وتلك التي تمت تصفيتها باستخدام 0.22 ميكرومتر (الشكل 2-ب). ولوحظ وجود شريطين مشتركين بهجرة طويلة في جميع عينات البحر الأبيض المتوسط. وفي هذا تتوافق وتتجانس نتائج دراستنا مع الدراسات السابقة التي أظهرت أن تكوين المجتمع الميكروبي في جزء التصفية المسبقة (0.45 ميكرومتر) يختلف عن الجزء الأصغر حجمًا (0.22 ميكرومتر).<sup>33,32</sup> ويبدو أن بعض شرائط (DNA) لمياه البحر المصفاة بـ 0.45 و 0.22 ميكرومتر (S1، S5، S8) شائعة في نتائج هلام (DGGE) للعينات. ومع ذلك، شرائط (DNA) (S2، S9، S6، S11) المكتشفة في مياه البحر التي تمت تصفيتها باستخدام 0.22 ميكرومتر غير موجودة في العينات المصفاة بـ 0.45 ميكرومتر. وتشير هذه النتائج إلى أن هذه البكتيريا (S2، S7، S9، S11) لها حجم صغير. ويمكن أن تكون هذه الخلايا إما أشكال تجويع في عملية الحد من الخلايا وإما ببساطة خلايا صغيرة.<sup>34</sup>

إضافة إلى ذلك، تم استخدام مؤشر شانون للتنوع البيئي (H) لتقدير التنوع الميكروبي في عينات المياه في بلدان البحر الأبيض المتوسط المختلفة (تونس والجزائر والمغرب ومصر وإيطاليا). وأظهرت النتائج أن مياه الصرف الصحي غير المعالجة في إيطاليا لديها أكثر مجموعة متنوعة من البكتيريا بناءً على مؤشر التنوع (الجدول 4)، ولكنها تنخفض في مياه الصرف الصحي المعالجة إلى 0.693، ما يشير إلى أن تنوع المجتمع البكتيري قد تأثر أثناء عملية المعالجة. ويذكر أنه كان للتنوع في تقنيات معالجة مياه الصرف الصحي تأثير كبير في المجتمع البكتيري (الشكل 2-أ، والجدول 4).

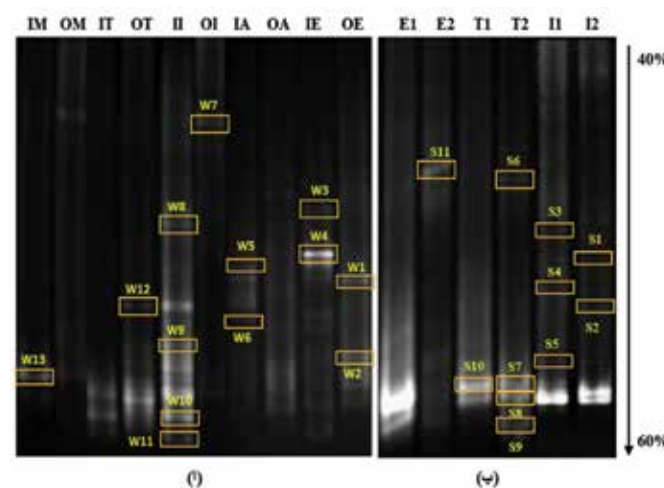
Country	Zinc (mg/l)		
	Inlet WWTP	Outlet WWTP	Seawater
Tunisia	0.04±0.02 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>a</sup>	0.01±0.005 <sup>a</sup>
Algeria	0.01±0.005 <sup>a</sup>	0.36±0.2 <sup>c</sup>	-
Morocco	0.82±0.05 <sup>b</sup>	0.10±0.005 <sup>ab</sup>	-
Egypt	0.56±0.5 <sup>ab</sup>	0.05±0.02 <sup>a</sup>	0.25±0.1 <sup>b</sup>
Italy	1.25±0.5 <sup>b</sup>	0.28±0.1b <sup>c</sup>	0.05±0.03 <sup>ab</sup>

\* (WWTP): Wastewater Treatment Plant; Means (n=3) followed by the same lowercase letter within columns are not significantly different according to the Student-Newman-Keuls test ( $p \leq 0.05$ ).

ومن ناحية أخرى، أظهرت التحليلات الكروماتوغرافية غياب المضادات الحيوية، في حين بينت دراسة المجتمع الميكروبي وجود أنواع مختلفة من البكتيريا المقاومة لمجموعة واسعة من المضادات الحيوية؛ ما يؤكد أن المضادات الحيوية غير مستقرة، وقد تم تحويلها تلقائيًا في المياه. وبناءً عليه، فإن الاتصال الدائم بالمضادات الحيوية يسمح بانتشار العديد من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية في البيئة. ويمكن أن تكون هذه البكتيريا عاملًا محتملًا في المعالجة الحيوية للبيئة الملوثة بالمضادات الحيوية لأنها يمكن أن تستخدم المضاد الحيوي مصدرًا للكربون والطاقة.<sup>31</sup>

### 2-3 بنية المجتمع البكتيري

للحصول على نظرة شاملة للمجتمع البكتيري الموجودة في عينات المياه المختلفة (مياه الصرف الصحي غير المعالجة، ومياه الصرف الصحي المعالجة، ومياه البحر) من دول البحر الأبيض المتوسط، استُخدمت تقنية (DGGE) التي تستهدف المنطقة (V3-V5) من جين (16S rRNA). وبيّن تحليل نتائج (DGGE) اختلافًا كبيرًا في بنية المجتمعات البكتيرية (الشكل 2).



الشكل 2. أنماط (DGGE) للمجتمع البكتيري بالنسبة لـ (أ) عينات مياه الصرف الصحي (مدخل ومخرج محطة معالجة مياه الصرف الصحي)، و(ب) عينات مياه البحر.

\*مياه البحر المصرية مرشحة من خلال مرشحات غشائية بمقياس 0.45 (E1) و 0.22 (E2)؛ مياه البحر التونسية مرشحة من خلال مرشحات غشائية بمقياس 0.45 (T1) و 0.22 (T2)؛ مياه البحر الإيطالية مرشحة من خلال مرشحات غشائية بمقياس 0.45 (I1) و 0.22 (I2).



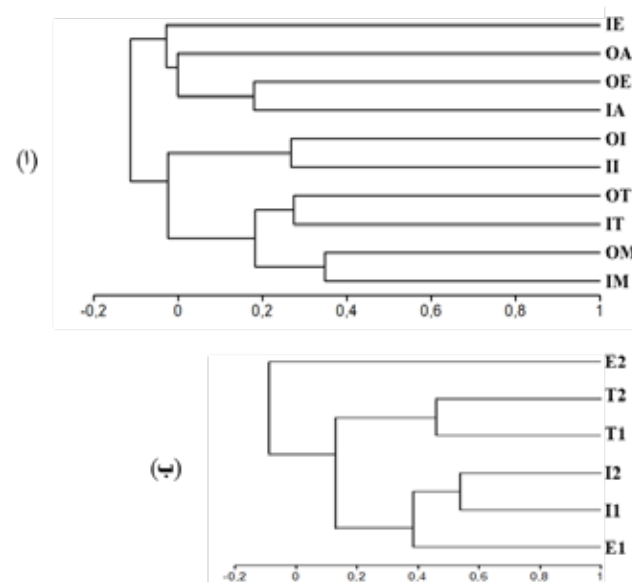
	Influent WW		Effluent WW		Seawater (0.45 µm)		Seawater (0.22 µm)	
	R	H	R	H	R	H	R	H
Tunisia	4	1.386	6	1.792	4	1.386	6	1.792
Algeria	4	1.386	4	1.386	-	-	-	-
Morocco	3	1.099	2	0.693	-	-	-	-
Egypt	8	2.079	3	1.099	4	1.386	4	1.386
Italy	14	2.639	2	0.693	8	2.079	6	1.792

التي جُمعت من تونس (الشكل 3-ب). ولتقييم هذا التنوع، تم استخراج 24 شريط (DNA) من هلام (DGGE)، وتسلسلها وتحليلها. ويلخص الجدول (5) انتماء التسلسلات المستخرجة.

أظهرت نتائج (DGGE) نسبة عالية من (*Bactroidetes*) ممثلة بـ 14 تسلسل، ونسبة 58% من تسلسلات جين (16S rRNA) البكتيرية الموجودة في جميع عينات المياه. وقد كانت نسبة كبيرة من شرائط (DNA) (67%) أكثر تشابهاً مع تلك الكائنات الحية الدقيقة التي لم يتم زرعها بعد، حيث تنتمي الغالبية إلى نوع (*Bactroidetes*) بنسبة 78%. أما شرائط (DNA) المنتمجة إلى (*Proteobacteria*) فتمثّلة في 25% من الفئات الفرعية: متمثلة في 17% من (*Gamma-proteobacteria*) متمثلة في (*Stenotrophomonas sp.*) و (*Stenotrophomonas maltophilia*) وتسلسل واحد تابع لـ (*uncultured*) و (*Stenotrophomonas sp*) 5% من شرائط (DNA) المنتمجة إلى (*Beta-proteobacteria*) تتمثل في (*Comamonas jiandensis*) و (*Uncultured bacterium*) وتنتمي التسلسلات الأربعة المتبقية إلى 17% من (*Firmicutes*) وتتمثل في (*Uncultured bacterium*) و (*Lysinibacillus*) و (*sphaericus*). وتتوافق هذه النتائج مع العديد من التقارير الأخرى التي توضح هيمنة الأنواع التي تنتمي إلى (*Bacteroides*) و (*Proteobacteria*) في مياه الصرف الصحي.<sup>37,35</sup> وفي مياه البحر، قد تقلل البكتيريا (G+) و (G-) من حجم خليتها عند تعرضها للمجاعة الغذائية. ووفقاً للعديد من الدراسات، تم الكشف عن (*Flavobacterium*) في عينات مياه البحر التي تدفقت من خلال مرشحات 0.45 ميكرومتر.<sup>38,34</sup> ومع ذلك، تم الكشف عن شريط (DNA) (S9) التابع لـ (*Flavobacterium sp.*) في دراستنا في عينة مياه البحر التي تم تصفيتها من خلال مرشح 0.45 ميكرومتر. وقد أبرزت النتائج أن هذه السلالة ربما تكون قد غيّرت التمثيل الغذائي وقلّصت الحجم للتكيف مع البيئة البحرية. وفي ظل الظروف غير الملائمة، يمكن أن تتغير مجموعة (*Bacteroides*) وتصبح أصغر حجماً.<sup>38</sup>

تشكل بعض السلالات التي تم عزلها في هذه الدراسة خطراً على صحة الإنسان، حيث بينت الأبحاث أن (*Stenotrophomonas maltophilia*) هو ممرض انتهازى مهم لدى الأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة؛ بسبب قدرته على استعمار الخلايا الظهارية في الجهاز التنفسي وأسطح الأجهزة الطبية، كما يمكن أن تتسبب هذه البكتيريا في التهابات مجرى الدم والالتهاب الرئوي.<sup>39</sup> وقد نُشرت دراسة سنة 2015 تعرض حالة إصابة بتعفن حاد للدم (Severe Sepsis) ناتجة من التسمم ببكتيريا (*Lysinibacillus*) (*sphaericus*).<sup>40</sup> إضافة إلى ذلك، تم عزل (*Comamonas jiandensis*) في حالات عدوى مجرى الدم والتهاب المعدة والأمعاء.<sup>41</sup>

ذكرت العديد من الدراسات أن التغيرات الكمية بين البكتيريا في محطات معالجة مياه الصرف الصحي قد تأثرت بخصائص مياه الصرف الصحي، ونوع وتشغيل النظام التكنولوجي أو الموقع الجغرافي.<sup>36,35</sup> ويبين الشكل (3) أوجه التشابه بين نتائج هلام (DGGE) مختلف العينات. ومن أجل فهم توزيع المجتمع البكتيري في عينات المياه التي تم جمعها من مواقع مختلفة في البلدان المتوسطية الخمسة، تم استخدام شرائط (DNA) لبناء (UPGMA dendrogram) وفقاً لارتباط بيرسون (الشكل 3).



الشكل 3. تحليل أنماط (DGGE) للمجتمعات البكتيرية في (أ) مياه الصرف الصحي، و (ب) عينات مياه البحر باستخدام طريقة (UPGMA).

ووفقاً للتنوع الملحوظ بين عينات مياه الصرف الصحي، أظهرت نتائج التكتل أن المجتمع البكتيري بين مدخل مياه الصرف الصحي ومخرجها في المغرب وتونس وإيطاليا يمثل 35% و 28% و 27% من التشابه، على التوالي (الشكل 3-أ). وبالنسبة إلى مياه الصرف الصحي غير المعالجة والمعالجة في الجزائر ومصر، كان مستوى التشابه منخفضاً جداً. وبالاتفاق مع أبحاث أخرى، أظهرت نتائج دراستنا التغيرات في المجتمعات البكتيرية بين مدخل مياه الصرف الصحي ونقطة خروجها.<sup>37,17,6</sup>

وفيما يتعلق بعينات مياه البحر، أظهرت التحاليل أن المجتمعات الميكروبية احتفظت بنسبة 53% و 46% من التشابه بين (E1) (عينة مياه البحر التي تمت تصفيتها مسبقاً بـ 0.45 ميكرومتر) و (I2) (عينة مياه البحر المصفاة بـ 0.22 ميكرومتر) على التوالي، وبين عينات مياه البحر (T2, T1)

الجدول 5. تشابه سلاسل الـ 16S rRNA V3-V5 من شرائط (DNA) مع أقرب السلاسل المسترجعة من بنك الجينات.

DGGE Band	Accession number	Length (bp)	Closest relative/ Accession number	Sequence similarity (%)	Phylogenetic group	Origin	Sampling location
W1	MT540527	320	Uncultured bacterium / LR649998.1	99	Bacteroidetes	WWO	Egypt
W2	MT540498	471	Comamonas jiangduensis / MN197985.1	100	Beta-Proteobacteria	WWO	Egypt
W3	MT540499	540	Bacteroidetes bacterium / HQ341721.1	100	Bacteroidetes	WWI	Egypt
W4	MT540528	528	Uncultured bacterium / KJ883010.1	99	Bacteroidetes	WWI	Egypt
W5	MT540529	464	Uncultured bacterium clone / MK062131.1	99	Bacteroidetes	WWI	Alger
W6	MT540530	472	Uncultured bacterium clone / KX504951.1	99	Beta-Proteobacteria	WWI	Alger
W7	MT540500	489	Flavobacterium sp. / AB833442.1	99	Bacteroidetes	WWO	Italy
W8	MT540531	464	Uncultured Bacteroidetes bacterium / AJ318151.1	99	Bacteroidetes	WWI	Italy
W9	MT540501	539	Stenotrophomonas sp. / MH368355.1	100	Gamma-Proteobacteria	WWI	Italy
W10	MT540532	413	Uncultured bacterium clone / KF736129.1	99	Firmicutes	WWI	Italy
W11	MT540533	450	Uncultured bacterium / HF937867.1	99	Firmicutes	WWI	Italy
W12	MT540534	505	Uncultured bacterium / KJ883010.1	99	Bacteroidetes	WWO	Tunisia
W13	MT540535	457	Uncultured bacterium / HF937867.1	99	Firmicutes	WWI	Morocco
S1	MT540536	269	Uncultured bacterium clone / MF655610.1	99	Bacteroidetes	SW2	Italy
S2	MT540502	530	Lysinibacillus sphaericus / JN700166.1	99	Firmicutes	SW2	Italy
S3	MT540537	467	Uncultured bacterium clone / GQ423813.1	99	Bacteroidetes	SW1	Italy
S4	MT540538	516	Uncultured bacterium / KJ883010.1	99	Bacteroidetes	SW1	Italy
S5	MT540539	394	Uncultured Stenotrophomonas sp. Clone / KC492013.1	98	Gamma-Proteobacteria	SW1	Italy
S6	MT540541	393	Uncultured bacterium / FR821429.1	100	Bacteroidetes	SW2	Tunisia
S7	MT540504	540	Stenotrophomonas maltophilia / LR797754.1	100	Gamma-Proteobacteria	SW2	Tunisia
S8	MT540540	325	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone / JN183374.1	94	Bacteroidetes	SW2	Tunisia
S9	MT540503	447	Flavobacterium sp. / MN815918.1	99	Bacteroidetes	SW1	Tunisia
S10	MT540505	474	Stenotrophomonas maltophilia / KX785153.1	99	Gamma-Proteobacteria	SW1	Tunisia
S11	MT540542	259	Uncultured bacterium / AB267041.1	97	Bacteroidetes	SW2	Egypt

#### 4- الاستنتاجات

في خمسة بلدان متوسطة. وقد أشارت النتائج إلى أن تنوع المجتمعات الميكروبية يتأثر بالتغيرات في الظروف البيئية. وقد يكون التنوع الميكروبي مؤشراً مهماً على الأداء العام لنظام العلاج.

#### شكر

أُنجز هذا البحث بتمويل من منظمة المجتمع العلمي العربي.

يعدّ تقليل الملوثات في مياه الصرف الصحي وصولاً إلى التركيزات المسموح بها ضرورياً لحماية البيئة. وقد أظهرت نتائج دراستنا أن محطتي معالجة مياه الصرف الصحي في إيطاليا ومصر كانت لهما كفاءة عالية في الحد من أنواع الملوثات التي حققت فيها أداءً مرضياً بشكل عام، ولا سيما لإزالة (TOC, OM, BOD<sub>5</sub>, COD). وبيّنت الدراسة التنوع البكتيري العالي من خلال تقنية (DGGE) في عينات المياه التي جُمعت من مواقع مختلفة

1. Cyprowski M, Szarapińska-Kwaszewska J, Dudkiewicz B, Krajewski JA, Szadkowska-Stańczyk I. Exposure assessment to harmful agents in workplaces in sewage plant workers. *Medycyna Pracy*. 2005;56(3):213–222.
2. Cyprowski M, Stobnicka-Kupiec A, Ławniczek-Wałczyk A, Bakal-Kijek A, Gołofit-Szymczak M, Górny RL. Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2018;91(5):571–579. <https://doi.org/10.1007/s00420-018-1307-6>.
3. World Health Organization. A regional overview of wastewater management and reuse in the Eastern Mediterranean Region; 2005 (no. WHO-EM/CEH/139/E).
4. Sreenivasulu G, Jayaraju N, Sundara Raja Reddy BC, Lakshmi Prasad T. Physico-chemical parameters of coastal water from Tupilipalem coast, southeast coast of India. *Journal of Coastal Sciences*. 2015;2(2):34–39.
5. Lamine I, Alla AA, Bourouache M, Moukrim A. Monitoring of physicochemical and microbiological quality of Taghazout seawater (southwest of Morocco): Impact of the new tourist resort “Taghazout Bay”. *Journal of Ecological Engineering*. 2019;20(7):79–89. <https://doi.org/10.12911/22998993/109873>.
6. Mehri I, Turki Y, Chérif H, Khessairi A, Hassen A, Gtari M. Influence of biological treatment and ultraviolet disinfection system on *Pseudomonas* spp. diversity in wastewater as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2014;42(5):578–585. <https://doi.org/10.1002/clen.201200589>.
7. TUA. Legislative decree. no. 152 03/04/2001. Unified environmental code. [Decreto Legislativo. Norme in Materia Ambientale – Testo Unico dell'Ambiente]; 2006 [accessed 2018 May 17]. [www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2006/04/14/88/so/96/sg/pdf](http://www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2006/04/14/88/so/96/sg/pdf).
8. NM. Ministère de l'Environnement du Maroc “Normes marocaines, Bulletin officiel du Maroc”, no. 5062 du 30 ramadan, 1423. Rabat; 2002.
9. JORA. Journal Officiel de la République Algérienne. Décret exécutif no. 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 April 2006, section 1, article 3.
10. NTPA-001. Normative act regarding the determination of limits of loading with pollutants of industrial and town wastewaters at evacuation in natural receptors; 2005.
11. NT106 002. Tunisian standard NT106 002 defines the maximum authorized concentrations of the various pollutants in water before discharge into the receiving environment; 2018.
12. Lemarchand K, Berthiaume F, Maynard C, Harel J, Payment P, Bayardelle P, et al. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;63(2):115–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.021>.
13. Hassen W. Biodegradation of pesticides used in agricultural soils. European University Edition 2020; ISBN: 978-613-9-53921-5 (in French).
14. Sun S, Guo Z, Yang R, Sheng Z, Cao P. Analysis of microbial diversity in tomato paste wastewater through PCR-DGGE. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013;118(1):111–118. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0155-6>.
15. Hamaidi-Chergui F, Errahmani MB, Demiai A, Hamaidi MS. Monitoring of physico-chemical characteristics and performance evaluation of a wastewater treatment plant in Algeria. 3rd International conference – Water resources and wetlands. 8–10 September, 2014, Tulcea, Romania. Dambovită: Romanian Limnogeographical Association; 2016. pp. 251–255.
16. Nasri E, Subirats J, Sánchez-Melsió A, Mansour HB, Borrego CM, Balcázar JL. Abundance of carbapenemase genes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* and *bla<sub>OXA-48</sub>*) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. *Environmental Pollution*. 2017;229:371–374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.095>.
17. Khouja I, Sullivansealey K, M'hiri F, Ouzari HI, Saidi N. Spatial-temporal variation of treatment performance and bacterial community diversity in a hybrid constructed wetland. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020;17(6):3217–3230. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02648-6>.
18. Hamaidi-Chergui F, Errahmani MB. Water quality and physicochemical parameters of outgoing waters in a pharmaceutical plant. *Applied Water Science*. 2019;9(7):165. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-1046-1>.
19. Afssa S, Hamden K, Martin PAL, Mansour HB. Occurrence of 40 pharmaceutically active compounds in hospital and urban wastewaters and their contribution to Mahdia coastal seawater contamination. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(2):1941–1955. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06866-5>.
20. Papaevangelou VA, Gikas GD, Tsihrintzis VA, Antonopoulou M, Konstantinou IK. Removal of endocrine disrupting chemicals in HSF and VF pilot-scale constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*. 2016;294:146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.02.103>.
21. Reopanichkul P, Carter RW, Worachananant S, Crossland CJ. Wastewater discharge degrades coastal waters and reef communities in southern Thailand. *Marine Environmental Research*. 2010;69(5):287–296. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.11.011>.
22. Houda B, Dorra G, Chafai A, Emna A, Khaled M. Impact of a mixed “industrial and domestic” wastewater effluent on the southern coastal sediments of Sfax (Tunisia) in the Mediterranean Sea. *International Journal of Environmental Research*. 2011;5(3):691–704.
23. Roberts RL. U.S. patent no. 9,517,947. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2016.
24. Idrissi YA, Alemad A, Aboubaker S, Daifi H, Elkharrim K, Belghyti D. Caractérisation physico-chimique des eaux usées de la ville d'Azilal -Maroc- [Physico-chemical characterization of wastewater from Azilal city -Morocco-]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 2015;11(3):556–566.
25. World Health Organization. Nitrate and nitrite in drinking-water; 2011.
26. Spellman FR. Handbook of water and wastewater treatment plant

- operations. Boca Raton, FL: CRC Press; 2013.
27. Kocour Kroupová H, Valentová O, Svobodová Z, Šauer P, Máchová J. Toxic effects of nitrite on freshwater organisms: A review. *Reviews in Aquaculture*. 2018;10(3):525–542. <https://doi.org/10.1111/raq.12184>.
  28. Miteva VI, Brenchley JE. Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(12):7806–7818. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7806-7818.2005>.
  29. Osman WHW, Abdullah SRS, Mohamad AB, Kadhum AA, Abd Rahman R. Simultaneous removal of AOX and COD from real recycled paper wastewater using GAC-SBBR. *Journal of Environmental Management*. 2013;121:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.005>.
  30. Alalwan HA, Kadhom MA, Alminshid AH. Removal of heavy metals from wastewater using agricultural byproducts. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*. 2020;69(2):99–112. <https://doi.org/10.2166/aqua.2020.133>.
  31. Tahrani L, Soufi L, Mehri I, Najjari A, Hassan A, Van Loco J, et al. Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters. *Microbial Pathogenesis*. 2015;89:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.001>.
  32. Simon M, Grossart HP, Schweitzer B, Ploug H. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*. 2002;28(2):175–211. <https://doi.org/10.3354/ame028175>.
  33. Padilla CC, Ganesh S, Gantt S, Huhman A, Parris DJ, Sarode N, et al. Standard filtration practices may significantly distort planktonic microbial diversity estimates. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:547. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00547>.
  34. Haller CM, Rölleke S, Vybiral D, Witte A, Velimirov B. Investigation of 0.2 µm filterable bacteria from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: Dominance of potential starvation forms. *FEMS Microbiology Ecology*. 2000;31(2):153–161. [https://doi.org/10.1016/S01686496\(99\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S01686496(99)00096-3).
  35. Cydzik-Kwiatkowska A, Zielińska M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(4):66. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2012-9>.
  36. Ma J, Wang Z, Yang Y, Mei X, Wu Z. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Research*. 2013;47(2):859–869. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.013>.
  37. Zhang B, Xu X, Zhu L. Activated sludge bacterial communities of typical wastewater treatment plants: Distinct genera identification and metabolic potential differential analysis. *AMB Express*. 2018;8(1):184. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0714-0>.
  38. Obayashi Y, Suzuki S. High growth potential and activity of 0.2 µm filterable bacteria habitually present in coastal seawater. *Biogeosciences Discussions*. 2017;1–9. <https://doi.org/10.5194/bg-2016-560>.
  39. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging opportunist human pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009;9(5):312–323. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0).
  40. Wenzler E, Kamboj K, Balada-Llasat JM. Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;35:93–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.04.016>.
  41. Farooq S, Farooq R, Nahvi N. *Comamonas testosteroni*: Is it still a rare human pathogen? *Case Reports in Gastroenterology*. 2017;11(1):42–47. <https://doi.org/10.1159/000452197>.







